

Patrones Espermatogénicos Basales  
y Desarrollo Embrionario Temprano tras ICSI  
en Oligoastenozoospermia Secretora Severa.

Tesis doctoral

José M<sup>a</sup> Vendrell Sala

Barcelona, enero 2003.

**Patrones Espermatogénicos Basales  
y Desarrollo Embrionario Temprano tras ICSI  
en Oligoastenozoospermia Secretora Severa.**

Memoria presentada por José M<sup>a</sup> Vendrell Sala para aspirar al grado de Doctor  
en Medicina por la Universitat Autònoma de Barcelona

Enero del 2003

El Dr. Josep Egozcue Cuixart, Catedràtic de Biologia Cel·lular de la Universitat Autònoma de Barcelona,

i el Dr. Pere Nolasca Barri Ragué, Cap del Servei de Medicina de la Reproducció del Departament d'Obstetrícia i Ginecologia de l'Institut Universitari Dexeus,

CERTIFIQUEN: que José M<sup>a</sup> Vendrell Sala ha realitzat, sota la nostra direcció, el treball "Parámetros espermatozoides basales y desarrollo embrionario temprano tras ICSI en oligoastenozoospermia secretora severa" per a optar al grau de Doctor.

Aquest treball s'ha dut a terme al Servei de Medicina de la Reproducció del Departament d'Obstetrícia i Ginecologia de l'Institut Universitari Dexeus.

El Director de Tesi  
Dr. Josep Egozcue Cuixart

El Director de Tesi  
Dr. Pere Nolasca Barri Ragué

El doctorand  
José M<sup>a</sup> Vendrell Sala

Bellaterra, Gener del 2003

## AGRAÏMENTS

Al Dr. Josep Egozcue, Catedràtic de Biologia Cel·lular de la Universitat Autònoma de Barcelona, pel seu mestratge, el seu suport i la seva permanent disponibilitat.

Al Dr. Pere N. Barri, Cap del Servei de Medicina de la Reproducció del Departament d'Obstetrícia i Ginecologia de l'Institut Universitari Dexeus, pel seu suport i per haver format un equip multidisciplinar pioner i vanguardista.

A ambdós, per haver acceptat co-dirigir aquest treball, a cavall de l'andrologia, la genètica i la reproducció assistida.

Al Dr. Josep M<sup>a</sup> Dexeus, per haver confiat en mi quan tot just acabava l'especialització en endocrinologia.

Al Dr. Santiago Dexeus, Cap del Departament d'Obstetrícia i Ginecologia de l'Institut Universitari Dexeus i Director de la Càtedra d'Investigació en Obstetrícia i Ginecologia (UAB), per impulsar una política d'excel·lència en la recerca dins del Departament.

A Ignasi Bolíbar, metge amic, per la seva inestimable ajuda.

Als companys i companyes del Servei de Medicina de la Reproducció, per la seva professionalitat.

A Verònica Vera, per la seva eficaç labor de secretaria.

Al Dr. Francesc Morer (*in memoriam*), per haver despertat en mi l'interès per l'andrologia.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Organización estructural e integración funcional testicular.....	2
1.2. Función testicular espermatogénica.....	4
1.3. Espermatogénesis.....	5
1.4. Meiosis.....	6
1.5. Alteraciones de la espermatogénesis.....	8
1.5.1 Ausencia de epitelio germinal.....	8
1.5.2 Hipoespermatogénesis.....	9
1.5.3 Bloqueo madurativo de la espermatogénesis.....	9
1.6. Anomalías meióticas.....	11
1.7. Repercusión clínica de las anomalías meióticas.....	14
1.8. Figuras.....	17
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
2.1. Hipótesis de trabajo.....	23
2.2. Objetivos.....	23
2.3. Justificación y presentación de las publicaciones. Objetivos alcanzados....	24
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1. Población estudiada.....	27
3.2. Estudio espermatogénico basal.....	27
3.2.1 Volumen testicular.....	27
3.2.2 Seminograma.....	28
3.2.3 FSH sérica .....	28
3.2.4 Biopsia testicular.....	28

3.2.4.1	Meiosis.....	29
3.3.	Cariotipo.....	29
3.4.	Ciclo de ICSI.....	29
3.5.	Dataset.....	30
3.6.	Análisis estadístico.....	31
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
4.1.	Artículos publicados.....	33
4.1.1	Artículo 1.....	34
	Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion.	
4.1.2	Artículo 2.....	48
	Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection.	
4.1.3	Artículo 3.....	52
	Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia.	
4.1.4	Artículo 4.....	57
	Spermatogenic patterns and early embryo development after intracytoplasmic sperm injection in severe oligoasthenozoospermia.	
4.2.	Resumen de los resultados.....	81
4.2.1	Tabla I. Distribución de frecuencias de los patrones meióticos según patrones espermatogénicos.....	84
4.2.2	Tabla II. Factores de riesgo para meiosis normal o anomalías meióticas.....	85

---

4.2.3 Tabla III. Resultados embrionarios según patrones espermatogénicos.....	86
4.2.4 Tabla IV. Resultados embrionarios según patrón combinado meiosis-concentración espermática.....	87
4.2.5 Tabla V. Riesgo relativo de desarrollo embrionario temprano lento.....	88
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>89</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>96</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>100</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## **1.1 ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL E INTEGRACIÓN FUNCIONAL TESTICULAR**

Las gónadas masculinas o testículos se componen de dos compartimentos funcionales: el compartimento intersticial vascularizado que contiene las células de Leydig y el compartimento tubular avascular que contiene las células de Sertoli y las células germinales (Kerr 1991).

La función testicular tiene dos aspectos bien diferenciados: la secreción de testosterona (función endocrina andrónica) localizada en las células de Leydig del compartimento intersticial y la producción de espermatozoides (función exocrina espermatogénica) localizada en los túbulos seminíferos del compartimento tubular (Kerr 1992). La integración funcional de ambas posibilita la capacidad reproductora masculina.

Los túbulos seminíferos son muy flexuosos y tienen un diámetro de 150 a 250  $\mu\text{m}$  y una longitud de 30 a 70 cm, confluyendo en los tubos rectos, que a su vez se anastomosan en la rete testis y mediante 8 a 15 tubos eferentes abocan al epidídimo (Fawcett 1984).

El tamaño del compartimento tubular determina el volumen testicular, que en un testículo adulto normal varía entre 15 y 25  $\text{cm}^3$ .

La pared de los túbulos seminíferos se halla revestida por un epitelio estratificado que descansa sobre una lámina basal. El epitelio germinal (Figura 1, pág. 18) comprende dos clases de células: células de sostén (células de Sertoli) y células germinales (espermatogonias, espermatoцитos primarios y secundarios, espermátides redondas, espermátides elongadas y espermatozoides). El epitelio se halla estratificado según la

progresión madurativa de la línea celular germinal. Las espermatogonias se hallan situadas en la periferia tubular junto a la lámina basal y entre los polos basales sertolianos. Los espermátocitos primarios se sitúan a mayor distancia de la lámina basal, localizándose más centralmente. Los espermátocitos secundarios se hallan raramente debido a su muy corta vida (8 horas). Las espermátides se localizan próximas a la luz tubular (Russell 1990).

Las células de Sertoli tienen un núcleo oval con nucleolo voluminoso en su polo basal y un citoplasma cilíndrico que se extiende desde la lámina basal hasta la luz tubular, rodeando a las células de la línea germinal y existiendo complejos de unión citoplásmica intersertolianos que constituyen una barrera entre el medio interno y las células germinales (barrera hemato-testicular) (Waites et al 1982).

La barrera hemato-testicular divide el epitelio germinal estratificado del compartimento tubular en dos zonas estructuralmente y funcionalmente diferenciadas: zona basal (desde la lámina basal del túbulo hasta dicha barrera) conteniendo espermatogonias y espermátocitos primarios preleptoténicos y zona yuxtaluminal (desde dicha barrera hasta la luz tubular) conteniendo espermátocitos primarios y secundarios, espermátides y espermatozoides. Funcionalmente la barrera hemato-testicular sertoliana se comporta como un filtro selectivo para la difusión de sustancias desde el líquido intersticial, regulando así las células de Sertoli la composición iónica y molecular del medio intratubular y aislando del medio interno a las células germinales diferenciadas (Waites et al 1982).

Las células de Sertoli actúan pues como soporte migratorio y nutricional de las células germinales, siendo además célula diana de la FSH (Steinberger et al 1974).

## **1.2 FUNCIÓN TESTICULAR ESPERMATOGÉNICA**

Antes de la pubertad en el epitelio germinal solo existen células de Sertoli y espermatogonias inmaduras (Cortes et al 1987).

El inicio de la espermatogénesis en la pubertad (espermarquia) ocurre antes de que finalice el desarrollo testicular, a una edad promedio de 13.4 años y con un volumen testicular promedio de  $11.5 \text{ cm}^3$  (Nielsen et al 1986).

En los túbulos seminíferos mediante la espermatogénesis las espermatogonias se convierten sucesivamente en espermátocitos primarios y secundarios, luego en espermátides y finalmente en espermatozoides que alcanzan la vía seminal. La duración de un ciclo espermatogénico es de  $74 \pm 5$  días (Heller et al 1964).

La espermatogénesis se halla regulada endocrinamente por las hormonas del eje hipotálamo-hipófiso-testicular (FSH, LH, Testosterona, Inhibina B) (Steinberger et al 1974, De Kretser et al 1989) y modulada paracrinamente por péptidos intratesticulares (ABP transportadora de testosterona hacia el epitelio germinal, etc) (Parvinen 1982, Saez et al 1987). Para que exista una espermatogénesis normal es necesaria una secreción normal tanto de FSH como de LH y consiguientemente de testosterona (Matsumoto et al 1989).

La regulación funcional de los compartimentos tubulares basal y yuxtaluminal es distinta: el compartimento basal depende de la FSH actuando directamente sobre las espermatogonias estimulando su proliferación (Van Alphen et al 1988), mientras que el compartimento yuxtaluminal depende esencialmente de las células de Sertoli mediante diversas secreciones paracrinas sertolianas (ABP, transferrina, etc) estimuladas por la FSH actuando indirectamente sobre las células germinales (espermatoцитos primarios y secundarios, espermátides y espermatozoides) (Skinner 1991).

### **1.3 ESPERMATOGÉNESIS**

La espermatogénesis es un proceso madurativo altamente complejo consistente en un conjunto de divisiones y diferenciaciones celulares sucesivas mediante las cuales las espermatogonias diploides ( $2n$ ) se convierten en espermatozoides haploides ( $n$ ).

La espermatogénesis comprende tres fases (Russell 1990):

1. Fase premeiótica o espermatocitogénesis en la que las espermatogonias ( $2n$ ) proliferan y se convierten en espermatoцитos primarios ( $2n$ ), mediante división celular mitótica.
2. Meiosis en la que los espermatoцитos primarios ( $2n$ ) se convierten en espermátides redondas ( $n$ ), mediante división celular meiótica.
3. Fase postmeiótica o espermiogénesis en la que las espermátides redondas ( $n$ ) se convierten en espermatozoides ( $n$ ), mediante un proceso de diferenciación celular (elongación del núcleo, formación del acrosoma en el polo apical, reducción del citoplasma y redistribución alrededor de la hélice mitocondrial de la pieza

intermedia, desplazamiento de los centríolos y formación de la cola a partir del centríolo distal).

Los espermatozoides producidos (cabeza oval con núcleo condensado, pieza intermedia y cola móvil de 45 a 55  $\mu\text{m}$  de longitud) son finalmente liberados a la luz tubular.

La fase premeiótica tiene lugar íntegramente en la zona basal, la fase meiótica se inicia en la zona basal y culmina en la zona yuxtaluminal, mientras que la fase postmeiótica acontece íntegramente en la zona yuxtaluminal.

#### **1.4 MEIOSIS**

La meiosis (Figura 2, pág. 19) es la forma de división celular que origina gametos con dotación cromosómica haploide. Constituye en el varón la segunda fase de la espermatogénesis, mediante la cual los espermatocitos primarios ( $2n$ ) se convierten en espermátides redondas ( $n$ ), siendo la más prolongada.

La meiosis es un proceso complejo (Egozcue et al 2000) que consta de dos divisiones celulares sucesivas (meiosis I reduccional y meiosis II ecuacional) sin replicación de ADN en su interfase.

La primera división meiótica o meiosis I se produce en los espermatocitos primarios diploides (46 cromosomas) y se caracteriza por el apareamiento o sinapsis cromosómica que posibilita el intercambio y la recombinación génica – destinada a aumentar la variabilidad genética de la descendencia – entre cada par de cromosomas homólogos

(bivalente) durante el paquitene de la profase I. El apareamiento cromosómico se halla dirigido y mantenido por los complejos sinaptonémicos (Navarro et al 1981, Vidal et al 1987). El complejo sinaptonémico (Moses et al 1975) es una estructura proteica tripartida (formada por dos elementos laterales – adherido cada uno a un cromosoma homólogo – y un elemento central paralelos unidos por fibras transversas) dispuesta longitudinalmente a lo largo de cada bivalente con función de sostén del apareamiento. La profase I es un proceso largo cuya duración es de 23 días.

En metafase I, debido al apareamiento de los cromosomas homólogos, aparecen 23 bivalentes.

En anafase I se segregan (disyunción) cromosomas homólogos enteros (con 2 cromátides) que migran a los polos celulares, produciéndose espermatocitos secundarios haploides (23 cromosomas: 23,X (50%) o 23, Y (50%)).

La segunda división meiótica o meiosis II es un proceso rápido consistente en una mitosis de células haploides. Los espermatocitos secundarios rápidamente entran en división, apareciendo 23 cromosomas en metafase II y separándose las dos cromátides de cada cromosoma en anafase II, produciéndose espermátides redondas haploides (23 cromátides).

Las dos divisiones meióticas producen de cada espermatocito primario diploide cuatro espermátides redondas haploides con diferentes combinaciones génicas.

Posteriormente las espermátides iniciarán un proceso de diferenciación celular postmeiótica (espermiogénesis) para convertirse en espermatozoides, pero el ADN solo se replicará después de la fecundación.

## **1.5 ALTERACIONES DE LA ESPERMATOGÉNESIS**

La espermatogénesis puede alterarse como consecuencia de diversas lesiones del epitelio germinal.

El diagnóstico de la alteración espermatogénica se realiza mediante estudio histológico cuantitativo en biopsia testicular bilateral. El conteo promedio de cada tipo celular germinal por sección tubular transversal permite caracterizar diversas alteraciones histológicas del epitelio germinal (Silber et al 1981, Nistal et al 1996).

Existen tres tipos histológicos de lesión del epitelio germinal (ausencia de epitelio germinal, hipoespermatogénesis y bloqueo madurativo de la espermatogénesis), pudiendo observarse combinaciones de ellos.

Todas las lesiones del epitelio germinal comportan disminución de la producción de espermatozoides, cursando clínicamente con oligozoospermia o azoospermia según la severidad de la alteración espermatogénica.

### **1.5.1 Ausencia de epitelio germinal (Solo células de Sertoli)**

Histológicamente se caracteriza por una ausencia total de células germinales, existiendo solo células de Sertoli.

Ocasionalmente pueden existir focos de espermatogénesis conservada.

Etiológicamente puede ser congénita (aplasia germinal o síndrome de Del Castillo, criptorquidia) o adquirida (quimioterapia, radioterapia).

Cursa clínicamente con azoospermia o criptozoospermia (espermatogénesis focal).  
Hormonalmente existen concentraciones séricas de FSH generalmente elevadas.

### **1.5.2 Hipoespermatogénesis**

Se caracteriza histológicamente por una disminución global y proporcional de todos los tipos celulares germinales, es decir una disminución del número de líneas celulares en el epitelio germinal.

Según su grado de severidad se califica como hipoespermatogénesis leve, moderada o severa.

Etiológicamente puede ser congénita (hipoplasia germinal, criptorquidia) o raramente adquirida (quimioterapia, radioterapia).

Cursa clínicamente con oligozoospermia.

### **1.5.3 Bloqueo madurativo de la espermatogénesis**

El complejo proceso madurativo de la espermatogénesis puede detenerse (bloqueo espermatogénico) en cualquier estadio madurativo de la línea celular germinal (espermatogonia, espermatocito primario, espermatocito secundario, espermátide redonda o inmadura, espermátide elongada o madura), afectando a todas (bloqueo completo) o a algunas (bloqueo incompleto) líneas celulares germinales (Martin-du-Pan et al 1993).

Fisiopatológicamente el bloqueo espermatogénico puede originarse en la célula germinal afecta o en la célula de Sertoli.

Los bloqueos madurativos de la espermatogénesis más frecuentes son los bloqueos meióticos en espermatocono primario, seguidos de los bloqueos postmeióticos, siendo menos frecuentes los bloqueos premeióticos.

Histológicamente se caracteriza por una detención madurativa de la línea celular germinal en un determinado tipo celular con disminución de los tipos celulares subsiguientes. El conteo promedio de cada tipo celular germinal permite establecer el nivel celular de la detención madurativa espermatogénica.

Según su grado de severidad se califica como leve, moderado y severo (bloqueo incompleto) o total (bloqueo completo).

Diversos factores etiológicos pueden causar bloqueo espermatogénico, aunque muy frecuentemente la causa es desconocida (Martin-du-Pan et al 1993).

El bloqueo madurativo en espermatogonia, poco frecuente, puede ser debido a déficit gonadotropo (Smith et al 1985) o a factores tóxicos (quimioterapia, radioterapia, etanol) (Kucheria et al 1985, Damewood et al 1986).

El bloqueo madurativo de la espermatogénesis en espermatocono primario es el más frecuente, pudiendo deberse a exposición al calor (Kandeel et al 1988), déficit gonadotropo (Jequier et al 1979) o déficit de zinc (Mahajan et al 1982), aunque generalmente sea por bloqueo meiótico en profase I debido en un 70-75% de casos a anomalías sinápticas (Egozcue et al 1983, De Braekeleer et al 1991).

El bloqueo madurativo en espermátide inmadura puede deberse a déficit gonadotropo (Mancini et al 1971), varicocele (Spera et al 1979) o edad avanzada (Paniagua et al 1987).

El bloqueo espermatogénico conlleva una disminución de la producción de espermatozoides, cursando clínicamente con oligozoospermia (bloqueo incompleto) o azoospermia (bloqueo completo).

Según la etiología existen concentraciones séricas basales de FSH normales, elevadas o bajas.

## **1.6 ANOMALÍAS MEIÓTICAS**

Las anomalías meióticas comprenden dos tipos esenciales no excluyentes entre sí: bloqueo meiótico severo (presencia de profases I - normales o alteradas - y ocasionales espermatozoides, no observándose metafases I) y anomalías sinápticas (presencia de anomalías del apareamiento cromosómico).

El bloqueo meiótico severo puede estar causado por anomalías sinápticas (74% de casos) o ser de causa desconocida (Egozcue et al 1983).

Las anomalías sinápticas son anomalías cromosómicas limitadas a la línea germinal, en pacientes con cariotipo somático normal y por tanto solo detectables mediante el estudio de la meiosis, comportando generalmente un bloqueo meiótico incompleto severo.

Las anomalías sinápticas son anomalías del apareamiento cromosómico en la primera división meiótica debidas a una disminución del número de intercambios (quiasmas) entre cromosomas homólogos en profase I (Hultén et al 1970, Pearson et al 1970).

Existen dos clases de anomalías sinápticas: asinapsis y desinapsis.

En la asinapsis, muy infrecuente, los cromosomas homólogos no se aparean o lo hacen de forma muy incompleta en profase I, presentando además ausencia de vesícula sexual.

En las desinapsis, más frecuentes, existe apareamiento alterado de cromosomas homólogos en profase I con separación precoz de bivalentes en metafase I. Las anomalías de apareamiento de los bivalentes en metafase I pueden afectar a todos los bivalentes (desinapsis completa) o a algunos bivalentes (desinapsis individual), afectando a todas (desinapsis total) o más frecuentemente a algunas (desinapsis parcial) líneas celulares germinales (Templado et al 1981, Egozcue et al 1983). Una forma menor de desinapsis es la presencia de univalentes (cromosomas ya separados) de pequeño tamaño en metafase I (Egozcue et al 1983).

El bivalente sexual, debido a su único quiasma terminal, es especialmente susceptible a presentar anomalías de apareamiento con separación precoz de cromosomas X e Y en metafase I (Hassold et al 1991).

Las desinapsis completas afectando a la totalidad o casi totalidad de los bivalentes (10-20% de los casos) (Egozcue et al 1983) suelen ser debidas a mutaciones (Edelmann et al 1996, Hassold 1996, Grootegoed et al 1999).

Las desinapsis individuales afectando a un número limitado de bivalentes, menos severas, son mucho más frecuentes (80-90% de los casos) (Egozcue et al 1983) y

pueden ser debidas a la existencia de un microambiente intratesticular anormal (Finkelstein et al 1998, Rives et al 1998, Mroz et al 1999).

Las anomalías sinápticas con disminución de apareamiento e intercambios y separación precoz de cromosomas homólogos pueden resultar en bloqueo meiótico severo o comportar una alteración de la sincronía y alineación cromosómica en la placa metafásica del huso meiótico con presencia de bivalentes o univalentes erráticos en metafase I, afectando al punto de control de la anafase I en los espermatocitos primarios y pudiendo resultar en incapacidad de división celular (meiosis I sin división celular reduccional) y consiguiente producción de espermatocitos secundarios diploides (46 cromosomas) (Figura 3, pág. 20) o en no disyunción cromosómica con migración del par cromosómico a un mismo polo celular en anafase I y consiguiente producción de espermatocitos secundarios aneuploides (Figura 4, pág. 21).

Las anomalías de apareamiento sináptico condicionan así un reparto cromosómico anafásico anormal (no reducción o no disyunción) en meiosis I con producción de espermatocitos secundarios con dotación cromosómica no haploide (diploide o aneuploide).

Las anomalías sinápticas causan en las líneas germinales afectadas un bloqueo meiótico generalmente incompleto en espermatocito primario, ocasionando simultáneamente bloqueo meiótico de algunas líneas celulares germinales y producción de espermatozoides con distintos tipos de alteraciones cromosómicas numéricas (diploidía y/o aneuploidías mayormente gonosómicas) en otras líneas celulares germinales capaces de completar la espermatogénesis (líneas celulares no haploides) (Egozcue et al 1983, Martin 1996).

Simultáneamente pueden coexistir líneas celulares germinales con meiosis normal y producción de espermatozoides haploides (líneas celulares haploides).

Clínicamente cursan con oligozoospermia con elevada tasa de espermatozoides no haploides.

La diploidía es la alteración cromosómica espermática más frecuente, seguida de las aneuploidías gonosómicas (Egozcue et al 2000, Gil Salom et al 2000, Egozcue et al 2002).

Raramente se producen anomalías meióticas debidas a la segunda división meiótica. Muchas anomalías que se interpretaban como de meiosis II son , en realidad, de primera división meiótica.

## **1.7 REPERCUSIÓN CLÍNICA DE LAS ANOMALÍAS MEIÓTICAS**

El bloqueo meiótico severo condiciona un bloqueo madurativo de la espermatogénesis en espermatocito primario con disminución de la producción espermática, cursando clínicamente con esterilidad por oligozoospermia (bloqueo incompleto) o azoospermia (bloqueo completo).

Las anomalías sinápticas generalmente cursan con oligozoospermia (por bloqueo meiótico incompleto severo) y una elevada tasa de espermatozoides no haploides (diploidía, disomías mayormente gonosómicas o nulisomías) (Martín 1996, Arán et al 1999, Pang et al 1999, Egozcue et al 2000, Vegetti et al 2000, Macas et al 2001) que en caso de fecundación generarán embriones no euploides (triploidía, trisomías o monosomías) que según la severidad de la cromosopatía y en orden de frecuencia

condicionarán clínicamente esterilidad por fallo implantatorio (pérdidas embrionarias preimplantatorias, mayormente triploidías) (Egozcue et al 2002), abortos de primer trimestre recurrentes (pérdidas embriofetales triploides o aneuploides) (Egozcue et al 1983, Egozcue et al 2000) o cromosopatías numéricas fetales “de novo” (aneuploidías, mayormente gonosómicas) (Bonduelle et al 1998). Eventualmente puede lograrse una gestación normal.

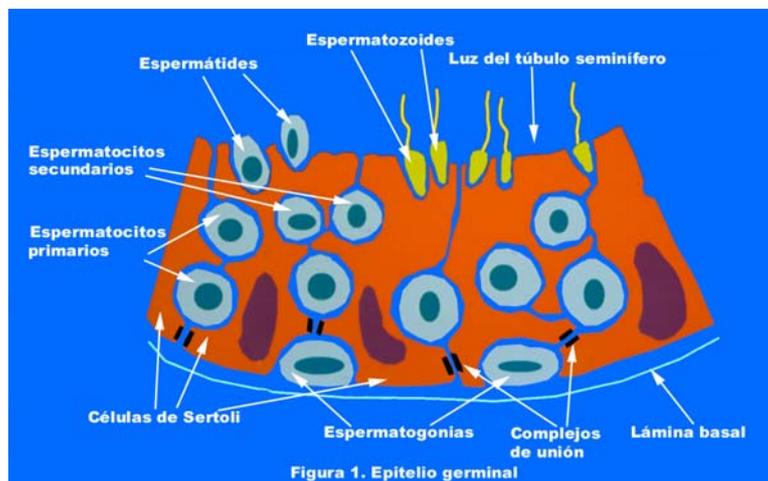
De este modo una altamente eficaz y temprana selección natural comosómica embrionaria consigue eliminar la casi totalidad de los embriones con alteraciones comosómicas numéricas autosómicas (Plachot et al 1988), mediante pérdidas embrionarias preimplantatorias con consiguiente fallo implantatorio o pérdidas embriofetales postimplantatorias con aborto de primer trimestre.

De entre las cromosopatías numéricas las poliploidías (triploidía, etc), las monosomías autosómicas y la mayoría de trisomías autosómicas generalmente son letales resultando en pérdidas embriofetales (Egozcue et al 2000, Egozcue et al 2002), siendo únicamente viables algunas aneuploidías autosómicas (trisomías 21, 18 y 13) y especialmente aneuploidías gonosómicas (XXY, XYY, XXX y muy raramente monosomía XO) (Egozcue et al 2000).

La repercusión clínica reproductiva final refleja así inversamente la severidad de las anomalías sinápticas espermáticas, incluyendo anomalías sinápticas leves (anomalías de apareamiento del par gonosómico y eventualmente de algún par autosómico de pequeño tamaño) con producción de espermatozoides aneuploides (mayormente disomías gonosómicas), anomalías sinápticas moderadamente severas (desinapsis individuales afectando a un número variable de bivalentes) con producción de

espermatozoides diploides y/o eventualmente aneuploides, y anomalías sinápticas severas (desinapsis completa afectando a la totalidad o casi totalidad de bivalentes) con producción de espermatozoides diploides o bloqueo meiótico completo de las líneas celulares germinales afectas (Egozcue et al 2000). Por ello la mayoría de varones portadores de anomalías sinápticas son estériles o infértiles.

## 1.8 FIGURAS



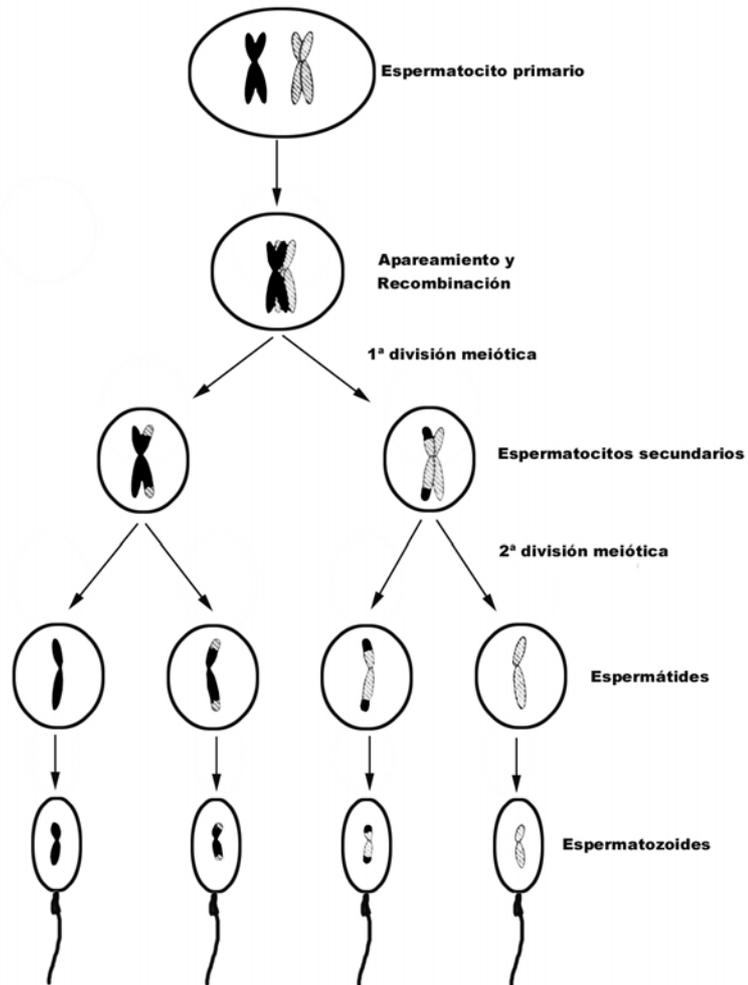
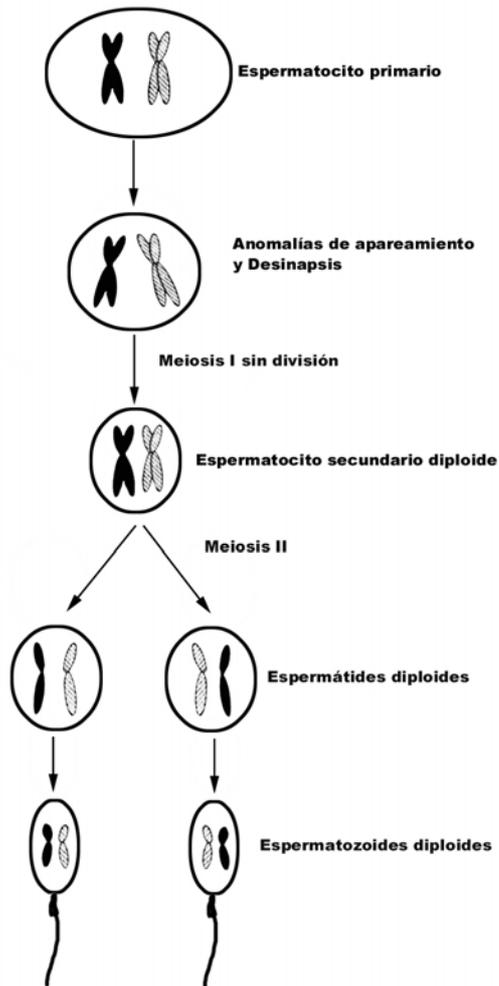
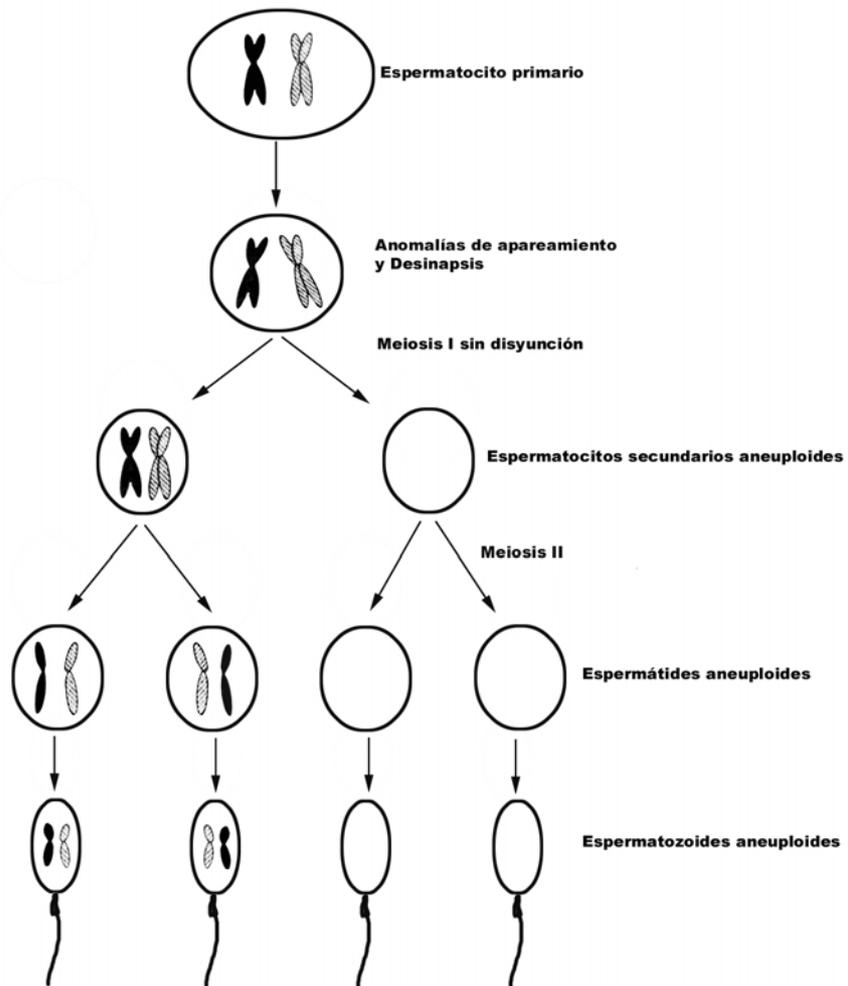


Figura 2. Meiosis normal (sólo se representa un par cromosómico)



**Figura 3. Meiosis I con anomalías sinápticas y producción de espermatozoides diploides (sólo se representa un par cromosómico)**



**Figura 4. Meiosis I con anomalías sinápticas y producción de espermatozoides aneuploides (sólo se representa un par cromosómico)**

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La hipótesis de trabajo a verificar es la existencia de subpoblaciones espermáticas de riesgo cromosómico meiótico -identificables en el estudio andrológico basal previo a su posible inclusión en un programa de microinyección espermática intracitoplasmática (ICSI)- que comportan una menor capacidad embriogénica temprana.

## **2.2 OBJETIVOS**

Los objetivos de la línea de investigación propuesta en varones estériles por oligoastenozoospermia secretora severa, y por tanto susceptibles de realizar ICSI, fueron:

1. Analizar la incidencia de anomalías meióticas (bloqueo meiótico severo o anomalías sinápticas) así como su posible relación con distintos parámetros espermátogénicos basales (volumen testicular, concentración espermática, concentración espermática mótil, FSH sérica basal) para identificar posibles marcadores de riesgo meiótico.
2. Analizar la relación de los distintos patrones espermátogénicos basales predictivos de riesgo meiótico con el ritmo de desarrollo embrionario temprano preimplantatario tras ICSI.

## **2.3 JUSTIFICACIÓN Y PRESENTACIÓN DE LAS PUBLICACIONES. OBJETIVOS ALCANZADOS**

La línea de investigación clínica desarrollada se materializa en cuatro artículos publicados en revistas internacionales indexadas de medicina de la reproducción, de los cuales los artículos 3 y 4 fueron orientados a la presentación de esta tesis doctoral como compendio de publicaciones.

- Artículo 1: Egozcue S., Blanco J., Vendrell JM., García F., Veiga A., Arán B., Barri P.N., Vidal F., and Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Human Reproduction Update* 2000; 6: 93-105.

A modo de marco general, se trata de una exhaustiva revisión actualizada sobre genética de la esterilidad e infertilidad masculinas.

- Artículo 2: Egozcue S., Vendrell JM., García F., Veiga A., Arán B., Barri P.N., and Egozcue J. Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2000; 17: 307-309.

En este estudio comparativo sobre la incidencia de anomalías meióticas en distintos síndromes andrológicos (oligoasthenozoospermia severa, azoospermia secretora, azoospermia obstructiva, asthenozoospermia, abortos de repetición) se evidencia la elevada

incidencia de anomalías meióticas en varones con oligoastenozoospermia severa, siendo en las restantes poblaciones estudiadas similar a la de la población masculina estéril general.

- Artículo 3: Vendrell JM., García F., Veiga A., Calderón G., Egozcue S., Egozcue J and Barri P.N. Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Human Reproduction* 1999; 14: 375-378.

Estudio de la espermatogénesis en el que se analiza la incidencia de anomalías meióticas y la relación del patrón meiótico con distintos patrones espermatogénicos en varones con oligoastenozoospermia secretora severa. (Objetivo 1 de la línea de investigación).

- Artículo 4: Vendrell JM., Arán B., Veiga A., García F., Coroleu B., Egozcue S., Egozcue J. and Barri P.N. Spermatogenic patterns and early embryo development after intracytoplasmic sperm injection in severe oligoasthenozoospermia (Aceptado para publicación en *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*).

Estudio de la embriogénesis temprana según los distintos patrones espermatogénicos en varones con oligoastenozoospermia secretora severa incluidos en un programa de ICSI. (Objetivo 2 de la línea de investigación).

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 POBLACIÓN ESTUDIADA**

La población estudiada consiste en una serie consecutiva de 103 pacientes varones que consultaron en la Unidad de Andrología por esterilidad presuntamente idiopática por oligoastenozoospermia secretora severa (concentración espermática mótil  $\leq 1.5 \times 10^6/\text{ml}$ ) en un mínimo de dos seminogramas.

### **3.2 ESTUDIO ESPERMATOGÉNICO BASAL**

A los pacientes se les realizó una historia clínica y exploración física andrológica completas y un estudio espermatogénico basal mediante determinación de volumen testicular, seminograma, FSH sérica basal, conteo tubular de espermátides elongadas y estudio de cromosomas meióticos.

#### **3.2.1 Volumen Testicular**

Para valorar el volumen testicular se midieron los ejes longitudinal y transversal de cada testículo mediante un calibrador. El volumen testicular se calculó según la siguiente fórmula (Ley et al 1985):

$$V = 4/3 \pi (a/2)^2 (b/2)$$

donde “a” representa el eje testicular longitudinal y “b” el eje testicular transversal (en cm). El volumen (V) se expresa en mililitros, como promedio de ambos testículos.

### **3.2.2 Seminograma**

Para la valoración del seminograma se recogió una muestra seminal por masturbación, tras 3-5 días de abstinencia eyaculatoria y ausencia de fiebre durante los 3 meses anteriores, en un frasco de plástico inerte de boca ancha. Las muestras seminales, tras determinarse su volumen (en ml), se evaluaron después de su licuefacción dentro de los 20 a 60 minutos tras su obtención, usando una cámara de Makler, con metodología objetiva semiautomática mediante microfotografía estroboscópica de exposición múltiple (MEP) (Makler 1978; Makler et al 1980) determinándose los siguientes parámetros espermáticos: concentración espermática (en millones/ml), motilidad espermática (en %) y concentración espermática mótil (en millones/ml).

### **3.2.3 FSH Sérica**

Para la determinación de la concentración sérica basal de FSH se utilizó el Kit AxSYM (Abbott Laboratories, S.A.), realizándose una sola determinación en cada paciente.

### **3.2.4 Biopsia Testicular**

En todos los pacientes se realizó una biopsia testicular ambulatoria bajo anestesia local, unilateral para estudio de la meiosis espermatogénica según método descrito previamente (Evans et al 1964) si ya existía diagnóstico histológico o bilateral para estudio meiótico, estudio histológico (Levin 1979) y contaje promedio de espermátides

elongadas o maduras por sección tubular transversal sobre 20 túbulos en cada testículo (Silber et al 1981) cuando no existía diagnóstico histológico previo.

#### **3.2.4.1 Meiosis**

La meiosis en muestra de tejido testicular se evaluó de forma independiente por dos expertos según tres patrones meióticos distintos: meiosis normal (N) y dos tipos de anomalías meióticas (AN) (bloqueo meiótico severo (B) – cuando existe presencia de Profases I y ocasionales espermatozoides, no observándose Metafases I- y anomalías sinápticas (S) – cuando existen anomalías del apareamiento cromosómico-) (Egozcue et al 1983).

### **3.3 CARIOTIPO**

Se solicitó asimismo un cariotipo mitótico en sangre periférica.

### **3.4 CICLO DE ICSI**

De la serie previamente estudiada 75 pacientes realizaron un primer ciclo de ICSI en el transcurso del año siguiente a su consulta.

Los detalles del protocolo de estimulación ovárica y recuperación de ovocitos (Coroleu et al 2000), y del protocolo de laboratorio de preparación del semen y de los ovocitos y

de la microinyección espermática intracitoplasmática (Calderón et al 1995) así como de evaluación de la fecundación y división embrionaria (Plachot et al 1990) han sido descritos con anterioridad.

Globalmente se microinyectaron 809 ovocitos maduros (10.79 ovocitos/ciclo), obteniéndose 575 embriones de los 75 pacientes.

Como grupo control se utilizó un grupo de 79 varones normozoospermicos que realizaron FIV por factor tubárico durante el mismo periodo de tiempo.

### **3.5 DATASET**

Los parámetros espermatogénicos basales se redujeron a categorías dicotómicas: volumen testicular ( $\geq 15$ ml(normal) o  $< 15$ ml), patrón meiótico (normal (N) o anomalías meióticas (AN)), concentración espermática ( $> 1 \times 10^6$ /ml o  $\leq 1 \times 10^6$ /ml), concentración espermática mótil ( $> 0.5 \times 10^6$ /ml o  $\leq 0.5 \times 10^6$ /ml), concentración de FSH sérica basal (normal o elevada).

Asimismo se creó el patrón combinado meiosis-concentración espermática ( $> 1 \times 10^6$ N,  $\leq 1 \times 10^6$ N,  $> 1 \times 10^6$ AN,  $\leq 1 \times 10^6$ AN) resultante de la combinación de los patrones dicotómicos meiosis y concentración espermática.

Las variables embrionarias se definieron asimismo como categorías dicotómicas: fecundación (presencia o ausencia), división del cigoto (presencia o ausencia) y ritmo de división embrionaria en día 2 ( $\geq 4$  células (normal) o  $< 4$  células (lento)).

### **3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis estadístico de los datos se usaron, según fuese apropiado, las pruebas del análisis de varianza (ANOVA) o de la t de student para las variables cuantitativas y la del chi-cuadrado para las variables cualitativas.

El valor predictivo de las variables significativas se evaluó mediante regresión logística.

Se usó un nivel de significación inferior a 0.05.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa SPSS para Windows (SPSS, Inc., Chicago,USA).