

Casos clínicos

B. Aran^a
F. Vidal^b
I. Gallostra^a
J. Blanco^b
F. García^a
J.M Vendrell^a
B. Coroleu^a
S. Egozcue^b
J. Egozcue^b
P.N. Barri^a
A. Veiga^a

^aServei de Medicina de la Reproducció.
Departament d'Obstetricia i Ginecologia.
Institut Universitari Dexeus. Barcelona.
^bUnitat de Biología Cel·lular. Facultat de Ciències.
Universitat Autònoma de Barcelona.

Correspondencia:

Dra. B. Aran.
Servei Medicina de la Reproducció.
Departament d'Obstetricia i Ginecologia.
Institut Universitari Dexeus.
P.º Bonanova, 89-91. 08017 Barcelona.
Correo electrónico: begara@iudexeus.uab.es

Fecha de recepción: 17/1/01

Aceptado para su publicación: 1/2/01

Estimación del riesgo de aneuploidías para los cromosomas sexuales en un paciente 46,XY/47,XXY candidato a fecundación *in vitro* con microinyección intracitoplasmática espermática

*Estimation of risk of
aneuploidies for sexual
chromosomes in a patient
46,XY/47,XXY candidate
for in vitro fertilization by
intracytoplasmic sperm injection*

B. Aran, F. Vidal, I. Gallostra, J. Blanco, F. García, J.M Vendrell,
B. Coroleu, S. Egozcue, J. Egozcue, P.N. Barri, A. Veiga.
Estimación del riesgo de aneuploidías para los cromosomas
sexuales en un paciente 46,XY/47,XXY candidato a fecundación
in vitro con microinyección intracitoplasmática espermática.
Prog Obstet Ginecol 2001;44:169-174.

RESUMEN

Se presenta un embarazo conseguido tras microinyección intracitoplasmática de espermatozoides del eyaculado de un paciente con síndrome de Klinefelter mosaico. El mosaicismo observado en células germinales premeióticas estaba invertido con respecto al observado en sangre periférica. A partir de los estudios meióticos y de hibridación *in situ* (FISH) en espermatozoides, se estimó que el riesgo genético del paciente para la transmisión de gonosomopatías a la descendencia era equivalente a la de la población control, aconsejándose un ciclo de fecundación *in vitro* con microinyección intracitoplasmática espermática y posterior diagnóstico prenatal en caso de gestación.

Por desgracia, el embarazo no llegó a término. Los pacientes con síndrome de Klinefelter deben ser estudiados con detalle antes de realizar un ciclo de fecundación *in vitro* con microinyección intracitoplasmática espermática. En estos pacientes se recomiendan los estudios meióticos y de FISH en espermatozoides eyaculados o testiculares, así como diagnóstico prenatal. El diagnóstico genético preimplantacional puede recomendarse sólo en casos de alto riesgo genético.

PALABRAS CLAVE

FISH. Embarazo tras ICSI. Síndrome de Klinefelter. Meiosis.

170 ABSTRACT

We report the case of a pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of ejaculated spermatozoa in a mosaic Klinefelter patient. The percentage of mosaicism observed in premeiotic germ cells was inverted with respect to that observed in peripheral blood. From meiotic and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) studies, we concluded that the patient's genetic risk of transition of sexual chromosomal abnormalities to their offspring was similar to that in the control population. Therefore, a cycle of *in vitro* fertilization by intracytoplasmic sperm injection (IVF-ICSI) and prenatal diagnosis were recommended. Unfortunately, the pregnancy ended in miscarriage. Klinefelter patients should be exhaustively studied before IVF-ICSI treatment. Meiotic studies and FISH in ejaculated or testicular spermatozoa as well as prenatal diagnosis should be carried out in these patients. Preimplantation genetic diagnosis is advisable only in patients at high genetic risk.

KEY WORDS

FISH. ICSI pregnancy. Klinefelter's syndrome. Meiosis.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Klinefelter está caracterizado por un hipergonadismo hipogonadotropo y azoospermia u oligozoospermia. Fue descrito por Klinefelter et al en 1942¹, pero no fue hasta 1959 cuando Jacobs y Strong² lo relacionaron con la existencia de un cromosoma X extra (47,XXY). La incidencia del síndrome de Klinefelter es del 0,1% en la población general y del 3,1% en la población masculina estéril^{3,4}.

Los pacientes con síndrome de Klinefelter presentan una reducción del tamaño testicular. En el momento de la pubertad las concentraciones séricas de hormona luteinizante (LH) sobrepasan los límites de la normalidad, ya que las células de Leydig secretan poca cantidad de testosterona pero gran cantidad de estradiol. Debido a estos altos valores de gonadotropinas, los túbulos seminíferos se vuelven fibróticos y hialinizados, se oblitera su lumen y las células ger-

minales desaparecen gradualmente. Generalmente se produce una hiperplasia de células de Leydig.

Aproximadamente el 15% de los casos son mosaicos con dos líneas celulares 46,XY y 47,XXY⁵, aunque también se presentan otras variantes en mosaico como 46,XY/47,XXY/48,XXYY o 46,XY/47,XXY/48,XXXYY⁶. Se pueden encontrar pequeños focos aislados de espermatogénesis en la mayoría de los pacientes sin evidencia de mosaicismo⁷ e incluso presencia de espermatozoides móviles en el eyaculado⁸.

La introducción de la microinyección intracitoplasmática espermática (ICSI) en los laboratorios de reproducción asistida ha permitido tratar pacientes con síndrome de Klinefelter que tienen espermatozoides en el eyaculado o en testículo con altas tasas de fecundación⁹, aunque se han descrito pocos embarazos utilizando espermatozoides testiculares¹⁰⁻¹² o con espermatozoides de eyaculado¹³.

No obstante, cabe tener en cuenta la posibilidad de obtener embriones anormales debido a la utilización de espermatozoides cromosómicamente desequilibrados producidos por estos individuos; el primer caso de un niño 47,XXY concebido con espermatozoides procedentes de un varón con síndrome de Klinefelter aparentemente no mosaico fue descrito por Ron-El et al¹⁴. De hecho, varios autores¹⁵⁻¹⁷ han observado una mayor incidencia de espermatozoides hiperhaploides (24,XY) en estos individuos respecto a los valores observados en individuos control. En este sentido, algunos autores sugieren la inclusión directa de estos pacientes en programas de diagnóstico genético preimplantacional. Sin embargo, otros^{13,18-20} no han encontrado una mayor incidencia de anomalías cromosómicas en los embriones y recién nacidos cuyos padres aparentemente tenían síndrome de Klinefelter no mosaico.

En este trabajo se presenta la estimación del riesgo de transmisión de aneuploidías para los cromosomas sexuales en un paciente 46,XY/47,XXY.

CASO CLÍNICO

Paciente de 29 años con una esterilidad de año y medio de duración, que acude a nuestro centro diagnosticado como factor masculino grave. El seminograma era compatible con oligoastenozoospermia severa; el volumen del eyaculado era de 3 ml; la concentración espermática de $1,9 \times 10^6$ espermato-

zoides/ml, con una movilidad total del 15%. Presentaba una hormona foliculostimulante (FSH) elevada, de 18,3 U/ml (valores de referencia: 1-8 U/ml), y unos valores normales de LH, de 4,06 U/ml (valores de referencia: 2-12 U/ml) y de testosterona (T) de 693 U/ml (valores de referencia 300-1.000 U/ml).

Su pareja (30 años) aportaba una histerosalpingografía (HSG) que revelaba un útero con defectos de repleción (miomas o pólipos) y trompas permeables. Presentaba una temperatura basal bifásica y un endometrio secretor en la biopsia de endometrio (BE) realizada. La analítica hormonal presentaba los siguientes valores en el sexto día del ciclo: LH de 2,8 U/l y FSH de 4,9 U/l; valores dentro de la normalidad. Se realiza a la paciente una polipectomía en el transcurso de una microcolpohisteroscopia.

Dado el factor masculino severo se orientó a la pareja a realizar un ciclo de fecundación *in vitro* (FIV) con ICSI, por lo que se solicitó un cariotipo y una biopsia testicular del varón, como cribado previo a la ICSI²⁰. El cariotipo en sangre periférica, 46,XY (34%)/47,XXY (64%), reveló que se trataba de un síndrome de Klinefelter en mosaico.

El estudio meiótico en biopsia testicular fue normal. Todas las profases I presentaban vesícula sexual normal con apareamiento XY, y las figuras en metafase I pusieron de manifiesto 23 bivalentes y apareamiento normal del par XY. No se encontraron metafases II.

Se realizó también hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) de extensiones de células del tejido testicular con sondas centroméricas para los cromosomas X (Spectrum green, Vysis Inc. Downers Grove, IL, EE.UU.), Y (Spectrum orange, Vysis Inc.) y 18 (Spectrum aqua, Vysis Inc.). Las células de espermatogénesis y núcleos en los espermatozoides presentes en el tejido testicular se analizaron según el protocolo descrito anteriormente por Vidal et al²² y Blanco et al²³.

El resultado del estudio de FISH se presenta en la tabla 1.

El mosaicismo observado en las células premeióticas (46,XY: 73,2%; 47,XXY: 26,8%) estaba invertido con respecto al mosaicismo observado en sangre periférica (46,XY: 34%; 47,XXY: 64%).

El hecho de que todas las figuras meióticas y todos los espermatozoides analizados tuvieran un complemento de los cromosomas sexuales normal indica que, en este caso, el riesgo genético no es mayor

Tabla 1. Constitución cromosómica para los gonosomas en células germinales y espermatozoides determinada mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

	Complemento gonosómico	n (%)
Espermatogonias/ espermatocitos prepaquiténicos Profase I	Núcleos XXY Núcleos XY XY	74 (26,8%) 202 (73,2%) 11 (100%)
Espermatozoides	Portadores X Portadores Y	123 (49,2%) 127 (50,8%)

que en cualquier tratamiento de FIV-ICSI convencional. Aun así, se recomendó a la pareja llevar a cabo un diagnóstico prenatal en caso de embarazo.

Se realizó tratamiento estimulador de la ovulación a la paciente mediante agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en protocolo largo y FSH (29 ampollas) (Neoferlinorm, Serono®, España). Se recuperaron 9 ovocitos, seis de los cuales estaban en metafase II.

El día de la punción folicular, la muestra de semen presentaba 1×10^6 espermatozoides/ml y solamente $0,2 \times 10^6$ espermatozoides móviles/ml. Después de procesar la muestra mediante gradientes de densidad (Puresperm, NidaCon International AB, Gotemburgo, Suecia)²⁴, se realizó ICSI de los 6 ovocitos maduros²⁵. Cinco ovocitos fueron fecundados correctamente. Se transfirieron 3 embriones de buena calidad²⁶ y se congelaron dos. La paciente quedó gestante, siendo los valores séricos de gonadotropina coriónica humana β (βhCG) de 613 y 3.180 U/ml en los días 14 y 19 postransferencia, respectivamente.

La primera ecografía realizada a las 6 semanas de amenorrea informa de visualización de saco intrauterino de 11 mm con vesícula vitelina correspondiendo a 5 semanas.

La ecografía a las 8 semanas de amenorrea informa de gestación con embrión que corresponde a 6 semanas y que presenta actividad cardíaca pero con bradicardia. Se aconseja repetir ecografía en una semana, que confirmó que se trataba de una gestación interrumpida. Se realizó un legrado aspirativo instrumental a la paciente en otro centro y no se procesa para análisis genético.

A los 2 meses la paciente solicita la transferencia de los dos embriones que se mantenían criopreser-

172 vados, los cuales se lisán en el proceso de descongelación.

DISCUSIÓN

Los estudios meióticos realizados en pacientes con síndrome de Klinefelter²⁷ demostraron un bloqueo en la meiosis de los pocos espermatocitos observados.

Se han obtenido resultados discordantes en estudios realizados en pacientes mosaico 46,XY/47,XXY. Los primeros estudios meióticos realizados en estos pacientes apuntaron que únicamente la línea germinal normal podía completar la meiosis^{28,29}. Sin embargo, en estudios posteriores se presentó una incidencia mayor de espermatozoides 24,XY en este tipo de pacientes. Skakkebaek et al en 1969²⁷ y Vidal et al en 1984³⁰ observaron figuras profásicas sin presencia de vesícula sexual y 24 elementos, lo que era indicativo de la presencia de un bivalente XX y un univalente Y. Cozzi et al¹⁵, mediante la técnica de fecundación *in vitro* de ovocitos de hámster, publicaron una elevada incidencia de espermatozoides 24,XY (0,9%) en un paciente mosaico 46,XY/47,XXY. Chevret et al¹⁶ obtuvieron resultados equivalentes, mediante FISH en núcleos de espermatozoides descondensados en un paciente también mosaico, que describían una frecuencia de espermatozoides 24,XY del 2,09 frente al 0,36% en el control. Más recientemente, Estop et al¹⁷, estudiando mediante FISH espermatozoides de un paciente 47,XXY, observaron un 25% (5/24) de espermatozoides con complementos 24,XY.

Sarkar y Marimuthu³¹ sugieren que la posibilidad de que las células 47,XXY completen la meiosis vendría determinada por la proporción de células normales que las rodean. De hecho, en casos de síndrome de Klinefelter en mosaico, la presencia de células normales reduce la gravedad de las manifestaciones clínicas.

Recientemente, Blanco et al³² han demostrado que los espermatozoides cromosómicamente desequilibrados 24,XY de estos individuos no provienen de la línea celular anormal (47,XXY) sino que procederían de la línea celular normal (46,XY). El ambiente testicular anormal sería el causante de la no disyunción durante la meiosis en dicha línea celular normal y, por tanto, de la producción de espermatozoides 24,XY.

En el caso del paciente que aquí se presenta se observaron células premeióticas 47,XXY en tejido testicular pero no se encontró ningún espermatozoide que presentara aneuploidías para los cromosomas sexuales. Sin embargo, sólo fue posible analizar un bajo número de espermatozoides testiculares, ya que se encontró un número escaso de espermatozoides en la muestra. Aun así, el número de espermatozoides analizados en este caso fue mucho mayor que los descritos por otros autores ya citados.

Debido al buen pronóstico, en cuanto al riesgo genético al utilizar espermatozoides de este paciente, se aconsejó a la pareja realizar un ciclo de FIV-ICSI y diagnóstico prenatal en caso de embarazo.

Por desgracia, el embarazo no llegó a término y, puesto que no se realizó cultivo del material del aborto, no fue posible determinar si la pérdida gestacional se debió a alguna causa genética.

La experiencia con embarazos tras ICSI con y sin diagnóstico genético preimplantacional (PGD) con pacientes con síndrome de Klinefelter mosaico y no mosaico ha demostrado que la mayoría de los recién nacidos son cromosómicamente normales. Hinney et al¹⁸ presentaron un embarazo tras ICSI en un paciente con síndrome de Klinefelter no mosaico sin PGD. El embarazo se interrumpió pero el cariotipo fetal fue 46,XY. Bourne et al¹³ consiguieron un embarazo y parto de 2 gemelos sanos (varón y mujer) usando espermatozoides eyaculados de un paciente con síndrome de Klinefelter no mosaico, también sin PGD. Staessen et al¹⁹ publicaron un embarazo bioquímico tras realizar PGD en tres pacientes con síndrome de Klinefelter no mosaico. Los autores analizaron 5 embriones y todos ellos presentaron patrón normal de los cromosomas sexuales. Reubinoff et al²⁰ analizaron mediante PGD dos embriones de un paciente no mosaico; un embrión fue caótico y no se transfirió y el otro fue diagnosticado como normal, se transfirió y dio lugar a un embarazo. Sin embargo, hay que señalar que el criterio para determinar que un paciente no es mosaico no es muy claro, ya que se basa en el análisis de un reducido número de metafases de linfocitos. Los datos clínicos parecen confirmar la idea expresada por Blanco et al³² en el sentido de que todo paciente afectado de síndrome de Klinefelter que presente espermatozoides ha de ser obligatoriamente mosaico.

Los pacientes con síndrome de Klinefelter deben ser estudiados con detalle como todos los pacientes

- B. Aran, F. Vidal, I. Gallostra, J. Blanco, F. García, J.M. Vendrell, B. Coroleu, S. Egozcue, J. Egozcue, P.N. Barri y A. Veiga.—Estimación del riesgo de aneuploidías para los cromosomas sexuales en un paciente 46,XY/47,XXY candidato a fecundación *in vitro* con microinyección intracitoplasmática espermatíca

candidatos a ICSI³³ para valorar el riesgo genético. Es recomendable realizar estudios meióticos y FISH en espermatozoides eyaculados y testiculares como parte del estudio genético del paciente para considerar el consejo reproductivo. En este sentido, el diagnóstico genético preimplantacional sería reco-

mendable en casos de alto riesgo genético para asegurar la transferencia de embriones normales. Aun así, en los casos de bajo riesgo genético es recomendable realizar FIV-ICSI convencional y diagnóstico prenatal si se consigue el embarazo.

BIBLIOGRAFÍA

- Klinefelter HF, Reifenstein EC Jr, Albright F. Syndrome characterised by gynecomastia, aspermatogenesis without a-Leydigism and increased secretion of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol* 1942; 2: 615-627.
- Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism. *Nature* 1959; 183: 302-303.
- De Brakeler M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991; 6: 245-250.
- Egozcue J, Templado C, Vidal F, Navarro J, Morer-Fargas F, Marina S. Meiotic studies in a series of 1.100 infertile and sterile males. *Hum Genet* 1983; 65: 185-188.
- Kruse R, Guttenbach M, Schartman B, Schubert R, Van der Ven H, Schmid M et al. Genetic counselling in a patient with XXY/XXXX/XY mosaic Klinefelter's syndrome: estimate of sex chromosome aberrations in sperm before intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69: 482-485.
- Okada H, Fujioka H, Tatsumi N, Kanzaki M, Okuda Y, Fujisawa M et al. Klinefelter's syndrome in the male infertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14: 946-952.
- Steinberger E, Smith KD, Perloff WH. Spermatogenesis in Klinefelter's syndrome. *J Clin Endocrin* 1965; 25: 1325-1330.
- Foss GL, Lewis JW. A study of four cases with Klinefelter's syndrome, showing motile spermatozoa in their ejaculates. *J Reprod Fert* 1971; 25: 401-408.
- Harari O, Bourne H, Baker G, Gronow M, Johnston I. High fertilization rate intracytoplasmic injection in mosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril* 1995; 63: 182-184.
- Tournaye H, Camus H, Vandervorst M, Nagy Z, Joris H, Van Steirteghem A et al. Surgical sperm retrieval for intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl* 1997; 20 (Supl 3): 69-73.
- Palermo G, Schlegel P, Sills S, Veeck LL, Zaninovic N, Menéndez S et al. Births after intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from men with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *N Eng J Med* 1998; 338: 558-590.
- Ron-El R, Friedler S, Strassburger D, Komarovsky D, Schachter M, Raziel A. Birth of a healthy neonate following the in-
- tracytoplasmic injection of testicular spermatozoa from a patient with Klinefelter's syndrome. *Hum Reprod* 1999; 14: 368-370.
- Bourne H, Stern K, Clarke G, Pertile M, Speirs A, Baker HWG. Delivery of normal twins following the intracytoplasmic injection of spermatozoa from a patient with 47,XXY Klinefelter's syndrome. *Hum Reprod* 1997; 12: 2447-2450.
- Ron-El R, Strassburger D, Gelman-Kohan S, Friedler S, Raziel A, Appelman Z. A 47,XXY fetus conceived after ICSI of spermatozoa from a patient with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Hum Reprod* 2000; 15: 1804-1806.
- Cozzi J, Chevret E, Rousseaux S, Pelletier R, Benitz V, Jalbert H et al. Achievement of meiosis in XXY germ cells: study of 543 sperm karyotypes from an XY/XXY mosaic patient. *Hum Genet* 1994; 93: 32-34.
- Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Usson Y, Cozzi J, Pelletier R et al. Increased incidence of hyperhaploid 24,XY spermatozoa detected by three-colour FISH in a 46,XY/47,XXY male. *Hum Genet* 1996; 97: 171-175.
- Estop AM, Munne S, Cieply KM, Vandermark K, Lamb AN, Fisch H. Meiotic products of a Klinefelter 47,XXY male as determined by sperm fluorescence *in situ* hybridization analysis. *Hum Reprod* 1998; 13: 124-127.
- Hinney B, Guttenbach M, Schmid M, Eugel W, Michelmann HW. Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection with sperm from a man with a 47,XXY Klinefelter's karyotype. *Fertil Steril* 1997; 68: 718-720.
- Saessen C, Coonen E, Van Assche E, Tournaye H, Joris H, Devroey P et al. Preimplantation diagnosis for X and Y normality in embryos from three Klinefelter patients. *Hum Reprod* 1996; 11: 1650-1653.
- Reubinoff BE, Abeliovich D, Werner M, Schenker JG, Safran A, Lewin A. A birth in non-mosaic Klinefelter's syndrome after testicular fine needle aspiration, intracytoplasmic sperm injection and preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 1998; 13: 1887-1892.
- Vendrell JM, García F, Veiga A, Calderón G, Egozcue S, Egozcue J et al. Meiotic abnormalities and spermatogenic parame-

- ters in severe oligoasthenozoospermia. Hum Reprod 1999; 14: 375-378.
22. Vidal F, Moragas M, Català V, Torelló MJ, Santaló J, Calderón G et al. Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent *in situ* hybridization study. Hum Reprod 1993; 8: 1740-1743.
23. Blanco J, Rubio C, Simón C, Egoscue J, Vidal F. Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XXX male assessed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH). Hum Genet 1997; 99: 413-416.
24. Ord T, Patrizio P, Morello E, Balmaceda JP, Asch RH. Mini-Percoll: A new method for semen preparation IVF in severe male factor infertility. Hum Reprod 1990; 5: 987-989.
25. Calderón G, Belil I, Arán B, Veiga A, Gil Y, Boada M et al. Intracytoplasmic sperm injection versus conventional *in vitro* fertilization: first results. Hum Reprod 1995; 10: 2835-2839.
26. Coroleu B, Carreras O, Veiga A, Martell A, Martínez F, Belil I et al. Embryo transfer under ultrasound guidance improves IVF pregnancy rates. Hum Reprod 2000; 15: 616-620.
27. Skakkebaek NE, Philip J, Hammen R. Meiotic chromosomes in Klinefelter's syndrome. Nature 1969; 221: 1075-1076.
28. Kjessler B. Karyotype, meiosis and spermatogenesis in a sample of men attending an infertility clinic. Monogr Hum Genet 1966; 2: 1-92.
29. Laurent C, Papathanassiou Z, Haour B, Cognat M. Etude mitotique et méiotique de 70 cas de stérilité masculine. Andrologie 1973; 5: 193-200.
30. Vidal F, Navarro J, Templado C, Brusadim S, Egoscue J. Synaptonemal complex studies in mosaic 46,XY/47,XXX male. Hum Genet 1984; 66: 306-308.
31. Sarkar R, Marimuthu KM. Association between the degree of mosaicism and the severity of syndrome in Turner mosaics and Klinefelter mosaics 1983; 24: 420-428.
32. Blanco J, Egoscue J, Vidal F. Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47,XXX, mosaic 46,XY/47,XXX and 47,XXX) assessed by FISH. Hum Reprod (en prensa).
33. Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egoscue S, Barri PN et al. Screening for abnormalities of chromosomes X,Y and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an *in vitro* fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. Fertil Steril 1999; 72: 696-701.