

Caracterización citogenética molecular de las células germinales masculinas en la azoospermia secretora: parada de la maduración

M. Sousa^{a,d}, N. Cremades^c, C. Alves^a, M.S. Fernandes^a, J. Silva^{a,b} y A. Barros^{a,b}

^aDepartment of Genetics. Faculty of Medicine. Universidad de Porto. Porto. Portugal.

^bCentre for Reproductive Genetics Alberto Barros. Porto. Portugal.

^cUnidad de Reproducción. Servicio de Ginecología y Obstetricia. Hospital General Universitario de Alicante. Alicante. España.

^dLab Cell Biology. Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar. Universidad de Porto. Porto. Portugal.

RESUMEN

Cerca de una tercera parte de los pacientes con azoospermia no obstructiva presentan parada de la maduración (MA, *maturation arrest*). Queda por evaluar por qué algunos casos exhiben unas pocas células germinales que escapan al bloqueo meiótico y forman espermatozoides (MA incompleta) mientras otros presentan una MA completa en la meiosis (MA completa). En este estudio comparamos ambas situaciones por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de los cromosomas sexuales (X, Y) y autosómicos (7, 18) en poblaciones puras de los distintos estadios de células germinales. Se aislaron por micromanipulación células de Sertoli, espermatoцитos primarios, espermatoцитos secundarios, espermátidas redondas y elongadas de biopsias en fresco de 7 pacientes con azoospermia obstructiva (controles) y 20 pacientes con MA (9 MA completa, 11 MA incompleta). En todos los casos, los pacientes presentaron cariotipo y desarrollo de los caracteres sexuales secundarios normales, ausencia de endocrinopatías y microdeleciones en Yq11.2. La MA incompleta se caracterizó por cifras incrementadas de aneuploidías en las células de Sertoli, disminución en el emparejamiento de los cromosomas homólogos en la meiosis I y una incidencia incrementada de aneuploidías en los espermatoцитos secundarios, sugiriendo que puede ser debido a deficiencias en el ensamblaje del complejo sinaptonémico. Por el contrario, la MA completa se asoció con cifras incrementadas de aneuploidías en los espermatoцитos primarios, originadas en las divisiones mitóticas de la espermatogonia, y emparejamiento normal, sugiriendo que la MA meiótica puede ser debida a deficiencias en el sistema de reparación del ADN.

Palabras clave: Humano. Biopsia testicular. Parada de la maduración. FISH.

ABSTRACT

Characterization of male germ cells in secretory azoospermia by molecular cytology: maturation arrest

About one third of non-obstructive azoospermic cases are due to maturation arrest (MA). The question of why some cases have a few germ cells that escape the meiotic block and form spermatozoa (incomplete MA) whereas others completely arrest at meiosis (complete MA) remains to be determined. In the present study we compared both situations through FISH analysis of sex (X, Y) and autosomal (7, 18) chromosomes in pure populations of stage-specific germ cells. Sertoli cells, primary spermatocytes, secondary spermatocytes, round spermatids and elongated spermatids were isolated by micromanipulation from fresh testicular biopsies of 7 patients with obstructive azoospermia (controls) and 20 patients with MA (9 complete MA, 11 incomplete MA). All the patients had normal secondary sexual development and karyotypes, and absence of endocrine disorders and Yq11.2 microdeletions. Incomplete MA was characterized by increased levels of aneuploidy in Sertoli cells, decreased homologue pairing at meiosis I and an increased incidence of aneuploidy in secondary spermatocytes, thus suggesting that it may be caused by deficiencies in synaptonemal complex assembly. In contrast, complete MA was associated with increased levels of aneuploidy in primary spermatocytes, arising during mitotic divisions of spermatogonia, and normal pairing, thus suggesting that meiotic arrest might be due to deficiencies in mismatch DNA repair.

Key words: Human. Testicle biopsy. Maturation arrest. FISH.

Este trabajo fue parcialmente apoyado por FCT (Sapiens 43462/01, 36363/99; 42812/01, 35231/99; UMIB).

Correspondencia: Nieves Cremades.

Unidad de Reproducción. Servicio de Ginecología y Obstetricia. Hospital General Universitario de Alicante.

Maestro Alonso, 109. 03010 Alicante. España.

Correo electrónico: cremades_nie@gva.es

INTRODUCCIÓN

La espermatogonia representa la población *stem cell* diploide del testículo (46 cromosomas, 2N-ADN). Después de una fase proliferativa mitótica, se transforman en espermátocitos primarios leptoteno diploides, los cuales concluyen una replicación de ADN (46 cromosomas, 4N-ADN). Después de esto, entran en una larga profase meiótica que se caracteriza por el alineamiento de los cromosomas homólogos, ensamblaje del complejo sinaptonémico y emparejamiento de los homólogos (sinapsis) en cigoteno, recombinación recíproca (rotura de la cadena de ADN, intercambio de segmentos de ADN entre cromátidas homólogas y reparación del ADN) en el estadio de paquíteno, y formación del quiasma en el estadio de diplotene (quiasma son los puntos de los homólogos que permanecen adherentes después de la recombinación). Después de estos pasos, los espermátocitos primarios entran en la primera división meiótica, por la cual el quiasma conduce la segregación de los homólogos a polos opuestos del huso. El producto de la primera división meiótica son los espermátocitos secundarios (23 cromosomas, 2N-ADN). Éstos no replican el ADN e inmediatamente entran en la segunda división meiótica, en donde las cromátidas hermanas (de cada homólogo) se segregan a polos opuestos. La segunda división meiótica da lugar a las espermátides redondas, las primeras células germinales haploides (23 cromosomas, 1N-ADN). A partir de este estadio no se producen más divisiones celulares y las espermátides redondas se diferencian progresivamente hasta espermatozoide maduro¹⁻⁴.

La ausencia de espermatozoides en el eyaculado causada por ineficiencia, deficiencia o ausencia de maduración de las células germinales se denomina azoospermia secretora (o azoospermia no obstructiva). El análisis histopatológico de la azoospermia no obstructiva mostró 3 síndromes principales: síndrome de células de Sertoli (SCOS), parada de la maduración (MA, *maturation arrest*) e hipoplasia (HP o hipoespermatogénesis). Estos síndromes pueden ir acompañados de cambios estromales, que incluyen hipoplasia o hiperplasia de las células de Leydig, esclerosis del tejido conectivo debido a un incremento en la deposición de colágeno, o engrosamiento de la lámina basal. Los 3 síndromes pueden ser idiopáticos, genéticos primarios (aberraciones cromosómicas tales como las trisomías sexuales y autosómicas, translocaciones cromosómicas, microdeleciones en el cromosoma Y, defectos en el proceso de la meiosis) o secundarios a endocrinopatías, enfermedades sistémicas, deficiencias nutricionales (vitamina A, cinc), terapia médica (fármacos, quimioterapia, radiación) y patología específi-

ca testicular⁵ (obstrucción de los conductos excretores, criptorquidia, varicocele, trauma, torsión del cordón, infección, tóxicos testiculares, calor).

El SCOS se caracteriza por la presencia de células de Sertoli, somáticas, nutrientes y de soporte del epitelio seminífero, y ausencia de cualquier tipo de célula germinal. La MA se caracteriza por interrupción en la maduración de las células germinales en cualquier tipo celular germinal, causando oligozoospermia (parada parcial) o azoospermia (parada total). La maduración de las células germinales se divide en 3 procesos principales: proliferación mitótica de la espermatogonia, meiosis y diferenciación de espermátides redondas en espermatozoides. La MA de las células germinales en la meiosis puede tener lugar en la fase de espermátocito primario (deficiencias en el emparejamiento de los homólogos, entrecruzamiento y formación de quiasma; separación prematura de los homólogos; no disyunción de los homólogos en la primera división meiótica) o en la fase de espermátocito secundario (no disyunción de las cromátidas en la segunda división meiótica). La HP se caracteriza por la presencia de todos los estadios de células germinales, cuyo número está disminuido en proporciones similares, desorganización espacial del epitelio seminífero, con desprendimiento de las células germinales, y subsiguiente disminución en la producción de espermatozoides⁵⁻⁷.

Con la introducción de la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI, *intracytoplasmic sperm injection*) se aplicó la biopsia testicular múltiple y bilateral (TESE) para buscar espermatozoides en pacientes en los que, en el análisis histopatológico previo, se diagnosticó ausencia total en la producción de espermatozoides. El motivo fue la suposición de que los pequeños fragmentos utilizados para el diagnóstico podrían no reflejar la situación general del testículo. En nuestra experiencia, la TESE permitió reclasificar la MA en 2 subtipos: los casos que presentan MA completa, caracterizados por una parada completa de la meiosis, y los casos con MA incompleta, en donde podrían encontrarse espermatozoides/espermátides tardías en al menos un fragmento⁸⁻¹⁰.

La infertilidad en varones con cariotipo y características sexuales secundarias normales y ausencia de patologías testiculares, endocrinopatías y microdeleciones en Yq11.2 puede ser debida a deficiencias en la cascada de genes de activación que controlan los procesos meióticos. Los estudios en *knock-out mice* han mostrado que la parada en la meiosis puede ser completa o incompleta, y que estas situaciones habitualmente se asocian con deficiencias en el emparejamiento de los cromosomas homólogos o recombinación recíproca^{3,5,11,12}. La disminución en el emparejamiento se ha

relacionado con defectos en los genes que controlan el ensamblaje del complejo sinaptonémico. Por el contrario, deficiencias en el sistema de reparación del ADN parecen asociarse con el emparejamiento o con la recombinación recíproca. Deficiencias en el emparejamiento de los homólogos producen MA en el espermatocono primario y activan el mecanismo de apoptosis para liberar las células germinales muertas en el ciclo celular. Cuando esta parada no es completa, la ausencia de formación de quiasmas conduce a la no disyunción durante las divisiones celulares y diferenciación del espermatocono con aumento de las cifras de aneuploidía. Deficiencias en el sistema reparador del ADN pueden causar valores disminuidos de formación de quiasmas (dependiente en los episodios de recombinación) y no disyunción (dependiente en la formación del quiasma). El análisis de mutante de ratón ha mostrado que las mutaciones en el gen *Atm* (ataxia telangiectasia mutante) o del gen *Scp3* no interfieren con la proliferación mitótica de la espermatogonia ni con la entrada meiótica del espermatocono, pero provocan una parada en el estado de cigoteno. Esta parada meiótica en el estadio de espermatocono primario fue causada por deficiencias en el requerimiento de proteína para formar el complejo sinaptonémico, con la consiguiente ausencia de emparejamiento entre los pares homólogos (asínapsis). Sin embargo, en mutaciones en *Atm* unas pocas células pueden superar el bloqueo meiótico, mientras que en mutaciones en *Scp3* la parada meiótica es completa en cigoteno¹³⁻¹⁵. Los defectos en los genes del sistema de reparación de ADN también causan una situación heterogénea. Deficiencias en *Pms2* originan pares de cromosomas anormales debido a deficiencias en el ensamblaje del complejo sinaptonémico, y en estos casos unas pocas células pueden superar el bloqueo meiótico y formar espermatozoides maduros¹⁶. Por el contrario, defectos en *Mlh1* interfieren con recombinación recíproca, causando valores reducidos de formación de quiasma y la subsiguiente separación prematura (desínapsis) de los pares de cromosomas homólogos¹⁷.

Muchos estudios han probado citogenéticamente el proceso meiótico y/o la constitución cromosómica de los espermatozoides en pacientes infértiles con alteración de los parámetros seminales¹⁸⁻²³. Sin embargo, en los pocos estudios sobre azoospermia secretora no se obtuvieron resultados consistentes al observar la etiología específica de la MA²⁴⁻²⁷. Para resolver esta cuestión, comparamos casos de MA completa e incompleta por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sondas para los cromosomas sexuales y para 2 autosomas. Para asegurar una correcta identificación de los diferentes estadios espermatogénicos, se aislaron por micromanipulación poblaciones puras

de células germinales por estadios específicos. Los resultados sugieren que mientras la MA incompleta se relaciona con deficiencias en el emparejamiento de homólogos, la MA completa parece asociarse con aneuploidías en las espermatogonias mitóticas y deficiencias en los episodios de recombinación recíproca que ocurren en la meiosis después del emparejamiento normal de los homólogos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de pacientes

Se seleccionaron como controles los pacientes con azoospermia obstructiva y espermatogénesis conservada ($n = 7$) confirmada por histopatología: 4 con obstrucción inflamatoria del epidídimo, 2 con ausencia congénita bilateral de los vasos deferentes y 1 con ausencia congénita unilateral de los vasos deferentes. Los pacientes con MA en el análisis histopatológico fueron separados en MA completa (parada en el estadio de espermatocono primario; $n = 9$) o MA incompleta (al menos un fragmento con espermátides maduras o espermatozoides; $n = 11$) tras la TESE en el ciclo de tratamiento ICSI. En todos los casos, los pacientes tenían cariotipo normal tras la alta resolución de la bandas GTG de linfocitos de sangre periférica²⁸ y ausencia de microdeleciones en Yq11.2-AZF²⁹. Las células utilizadas para las prácticas fueron las sobrantes en la placa después de la microinyección, de acuerdo con el consentimiento informado del paciente.

Aislamiento y cultivo de las células germinales masculinas

El tejido testicular fue recogido en medio de preparación de esperma (con Tampón, SPM; Medicult, Copenhagen, Dinamarca) y dilacerado con agujas quirúrgicas. El fluido fue lavado con SPM (2×5 min, 1.000 revoluciones/min), incubado (5 min) con 2 ml de tampón de lisis de eritrocitos (155 mmol NH₄Cl, 10 mmol KHCO₃, 2 mmol de ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] en agua; pH 7,2 con KOH; 0,2 μ m filtrado; Sigma, Barcelona, España), lavado como anteriormente, disociado (1 h, 37 °C) con 25 μ g/ml de DNasa y 1.000 U/ml de colagenasa-IV en SPM (0,2 μ m filtrado; Sigma), lavado como antes e incubado (32 °C, 5% CO₂) en medio IVF (Medicult) hasta su utilización¹⁰. Se diluyeron 10 μ l de cada muestra en 60 μ l SPM, y la muestra fue extendida en una placa de cultivo y recubierta con aceite mineral (Medicult). Las células de los distintos estadios fueron selec-

cionadas de acuerdo con los criterios morfológicos descritos previamente^{8,30,31} en un invertoscopio invertido Nikon, equipado con óptica Hoffman y calentado (32 °C), utilizando micromanipuladores Narishige (Nikon, Tokyo, Japón) y micropipetas de 15-20 µm de diámetro (SweMed, Frolunda, Suecia). Las células de cada estadio fueron transferidas a microgotas de 10 µl de SPM y cuidadosamente examinadas para eliminar cualquier célula contaminante o degenerada (fig. 1).

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Las células fueron transferidas por micromanipulación a 3 µl de tampón de lisis (0,01 N HCl/0,1% Tween 20; Sigma) en portas recubiertos de Poly-L-Lysina (Sigma). Tras el aislamiento de los núcleos, los portas fueron secados, lavados (5 min) en agua y Phosphate-Buffered Saline (PBS, Sigma), rápidamente deshidratados (15 s) en una serie de etanol y almacenados (oscuridad, -20 °C) hasta su utilización. Los portas fueron incubados (20 min, 37 °C) con pepsina (100 µg/ml; Sigma), lavados, fijados (4 °C, 10 min) con 4% de paraformaldehído (Bio-Rad, Watford, Inglaterra), lavados y deshidratados. En cada porta se colocaron 10 µl de la mezcla (6 µl de tampón de hibridación, 1 µl de cada sonda centromérica ADN α -satélite, 1 µl de agua; Vysis Inc., Downers Grove, IL, EE.UU.). Las sondas fueron CEP 18 (región 18p11.1-q11.1, *locus* D18Z1; Spectrum Aqua), CEP 7 (región 7p11.1-q11.1, *locus* D7Z1; Violet: 0,5 µl Spectrum Orange + 0,5 µl Spectrum Green) y CEP X (bandas Xp11.1-q11.1, *locus* DXZ1; Spectrum Green)/CEP Y (bandas Yp11.1-q11.1, *locus* DYZ3; Spectrum Orange). Las sondas y el ADN nuclear fueron desnaturalizados (75 °C, 3 min) y después hibridados (37 °C, 4 h, en cámara oscura y humedad). Los lavados posthibridación contenían 60% de formamida (Fluka Chemika, Suiza)/2 × SSC/0,05% Tween 20 (42 °C, 5 min), 2 × SSC (42 °C, 5 min) y 4 × SSC/0,05% Tween 20 (5 min). Después de lavar, los portas fueron deshidratados, secados y montados en 10 µl de Vectashield antifade medium que contenía 1,5 g/ml de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) para neutralizar el núcleo (Vector Laboratories, Burlingame, EE.UU.). La eficacia del proceso de FISH fue probada utilizando cromosomas en metafase e interfase y núcleos interfásicos del cultivo de linfocitos masculinos normales estimulados con fitohemaglutinina (Difco Laboratorios, Detroit, EE.UU.) y cultivados durante 72 h a 37 °C. Se examinaron un total de 100 linfocitos, y el 95% de ellos dieron señales positivas para el número esperado de copias. Las imágenes de FISH fueron recogidas en un microscopio Nikon (Eclipse, E-400) de epifluorescencia adaptado a una

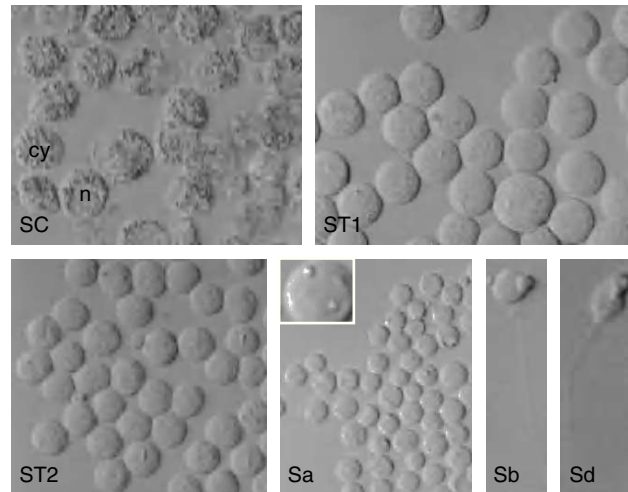


Figura 1. Células del epitelio seminífero por estadios después del aislamiento por micromanipulación (microscopio invertido de Hoffman). Células de Sertoli (SC) que muestran las gotas de lípidos en el citoplasma (cy) y la región nuclear clara (n). ST1: *pool* de espermatocitos primarios; ST2: espermatocitos secundarios; Sa: espermátides redondas tempranas; Sb: espermátides elongándose; Sd: espermátides elongadas.

cámara CCD y un software apropiado (Cytovision Ultra, Aplicado a la Imagen Internacional, Sunderland, Reino Unido).

Criterios de emparejamiento

Las señales generadas por FISH se clasificaron como: no emparejadas, cuando los límites de las 2 señales estaban separados por más del diámetro de una de las señales; alineados, cuando los límites de las 2 señales estaban separados por menos del diámetro de una de las señales pero sin contacto; emparejados, cuando los límites de las dos señales contactaban o se fusionaban en una gran señal³². Esta clasificación se estableció tras aplicar el FISH a un cromosoma autosómico y a células germinales premeióticas identificadas por el estadio diploide y la localización en las secciones de parafina. Debido a que los criterios pueden no asegurar la correcta identificación de las células germinales, en este estudio hemos utilizado poblaciones celulares germinales aisladas y localización simultánea por FISH color-4 de los 2 cromosomas sexuales y de dos autosomas diferentes. Los resultados muestran que el emparejamiento de todos los cromosomas en los espermatocitos primarios es raro, y que en los casos de emparejamiento la mayoría es asíncrono, p. ej., ocurre en algunos pero no en todos los cromosomas a la vez (emparejamiento parcial). Debido a este hallazgo, hemos clasificado como emparejados todas

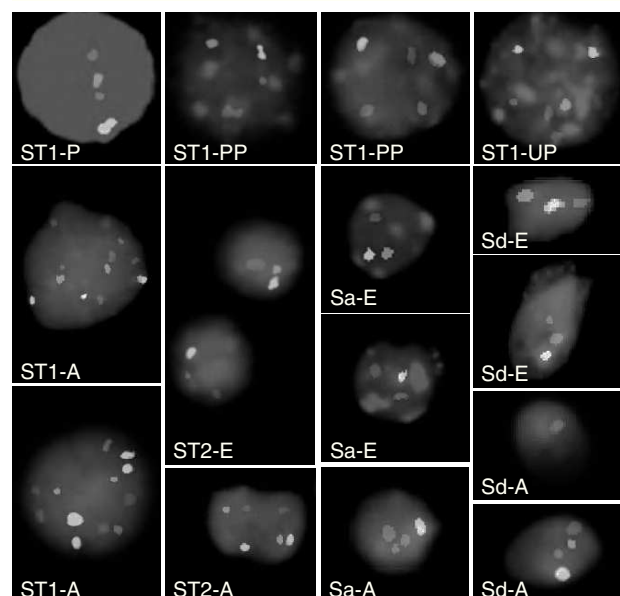


Figura 2. Hibridación *in situ* fluorescente con sondas para los cromosomas X, Y, 7 y 18. ST1: espermatoцитos primarios; ST2: espermatoцитos secundarios; Sa: espermátides redondas; Sd: espermátides elongadas; P: homólogos emparejados; PP: homólogos parcialmente emparejados; UP: homólogos no emparejados; E: núcleo euploide; A: núcleo aneuploide.

las situaciones (emparejamiento + emparejamiento parcial) donde el emparejamiento o alineamiento alcanza al menos a un homólogo (fig. 2).

Estadística

Las señales de FISH fueron registradas por 2 citogenetistas independientes en un procedimiento doble ciego (no se dio información del tipo de azoospermia secretora ni del tipo de células analizadas). Se utilizó el *test* de la χ^2 para comparar la significancia entre los dos grupos.

RESULTADOS

En este estudio, la FISH se realizó utilizando 2 sondas para los cromosomas sexuales (X, Y) y 2 sondas para los cromosomas autosómicos (7, 18). En total, 4.512 células se caracterizaron citogenéticamente por estadíos específicos después de ser aisladas por micromanipulación de biopsias testiculares en fresco durante el tratamiento de TESE-ICSI de varones infértiles con espermatogénesis conservada (controles: azoospermia obstructiva; n = 7), MA incompleta (n = 11) y MA completa (n = 9). Las aneuploidías y el emparejamiento de los homólogos fue cuantificada en 863 células de Sertoli, 1.720 espermatoцитos primarios, 755 esper-

TABLA 1. Análisis de FISH de las células germinales en azoospermia obstructiva (grupo control)

Tipo de célula	N	% Euploides	% Aneuploides
Células de Sertoli	345	91	9 ^a
Espermatoцитos I	225	96,4	3,6 ^b
Emparejados		45,6 ^c	
No emparejados		54,4	
Espermatoцитos II	444	97,7	2,3 ^d
Femenino/masculino		1,4	
Espermátides redondas	418	89	11
Femenino/masculino		1,2	
Espermátides elongadas	442	93,4	6,6
Femenino/masculino		1,3 ^c	

^ap < 0,01 a MA incompleta.

^bp < 0,01 a MA completa.

^cp < 0,01 a MA incompleta.

^dp < 0,01 a MA incompleta.

^ep < 0,01 (femenino frente a masculino).

TABLA 2. Análisis FISH de células germinales en parada de la maduración (MA) incompleta

Tipo de célula	N	% Euploides	% Aneuploides
Células de Sertoli	290	80,7	19,3 ^a
Espermatoцитos I	502	94,6	5,4 ^b
Emparejados		29,5 ^c	
No emparejados		70,5	
Espermatoцитos II	311	91	9 ^d
Femenino/masculino		0,9	
Espermátides redondas	135	87,4	12,6
Femenino/masculino		1,0	
Espermátides elongadas	179	92,7	7,3
Femenino/masculino		1,4 ^c	

^ap < 0,01 a controles y MA completa.

^bp < 0,05 a MA completa.

^cp < 0,01 a controles y MA completa.

^dp < 0,01 a controles.

^ep < 0,05 (femenino frente a masculino).

TABLA 3. Análisis de FISH de células germinales en parada de la maduración (MA) completa

Tipo de célula	N	% Euploides	% Aneuploides
Células de Sertoli	228	92,5	7,5 ^a
Espermatoцитos I	993	91,8	8,2 ^b
Emparejados		49,7 ^c	
No emparejados		50,3	

^ap < 0,01 a MA incompleta.

^bp < 0,01 a controles; p < 0,05 a MA incompleta.

^cp < 0,01 a MA incompleta.

matocitos secundarios, 553 espermátides redondas y 621 espermátides elongadas (tablas 1 a 3) (fig. 2).

Las aneuploidías encontradas en las células de Sertoli fueron 31/345 (9%) en los controles, 17/228 (7,5%) en la MA completa y 56/290 (19,3%) en los casos de MA incompleta, y sólo fueron significativamente superiores en los casos de MA incompleta.

En los espermatoцитos primarios se encontraron aneuploidías en 8/225 (3,6%) de los controles, en

27/502 (5,4%) de los casos de MA incompleta y en 82/993 (8,2%) de los casos de MA completa, con un incremento significativo sólo en relación con la MA completa. Se encontró emparejamiento de los cromosomas homólogos en los espermátocitos primarios en 99/217 (45,6%) de los controles, un valor similar al encontrado en la MA completa (453/912, 49,7%). Por el contrario, en la MA incompleta (140/475, 29,5%) el emparejamiento de los homólogos fue significativamente menor.

Para los espermátocitos secundarios, se encontraron aneuploidías en 10/444 (2,3%) de los controles, habiendo un incremento significativo en la tasa de aneuploidías en la MA incompleta (9/311, 9%). En relación con las redondas (controles: 46/418, 11%; MA incompleta: 17/135, 12,6%) o espermátides elongándose y elongadas (controles: 29/442, 6,6%; MA incompleta: 13/179, 7,3%), no se encontraron diferencias significativas en las tasas de aneuploidía entre los controles y los casos de MA incompleta. Aunque no se pueden imaginar causas específicas, el análisis de los espermátocitos secundarios, espermátides redondas y elongadas reveló una diferencia significativa entre el porcentaje de los sexos femenino y masculino en las células germinales, tanto en controles como en casos de MA incompleta, con un ligero predominio del tipo femenino.

DISCUSIÓN

La azoospermia secretora (azoospermia no obstructiva) es la principal causa de infertilidad masculina. El análisis histopatológico en estos casos reveló 3 síndromes principales: células de Sertoli (SCOS), parada de la maduración (MA) e hipoplasia (HP). Con la aplicación del ICSI, se realizó la biopsia testicular bilateral y múltiple (TESE) para averiguar si se podían encontrar espermatozoides en el SCOS y MA, teniendo en cuenta que la biopsia simple tomada para histopatología podría no reflejar la situación global del testículo. Los ciclos de TESE-ICSI han demostrado que en algunos casos de SCOS y MA (SCOS incompleto o casos de MA incompleta) se puede encontrar al menos un fragmento con espermatozoides¹⁰.

La azoospermia secretora genética primaria puede ser debida a aberraciones cromosómicas^{28,33}. En otros casos ha sido atribuida a microdeleciones en la región AZF localizada en Yq11.2. En estos últimos casos, las microdeleciones que abarcan la subregión más proximal AZFa se asociaron con SCOS³⁵, la MA fue correlacionada con microdeleciones en la subregión central de la AZFb^{36,37}, mientras que la oligozoospermia y la HP parecieron estar asociadas con microdeleciones

que afectan a la subregión más distal AZFc²⁹. Sin embargo, y alternativamente, se ha sugerido que las microdeleciones individuales en AZFc implicadas en la secuencia DAZ son propensas a desarrollar una lesión intratesticular en la diferenciación de espermátida causando oligozoospermia, y que este defecto puede además evolucionar con el tiempo causando HP, MA e incluso SCOS²⁹.

En el caso de MA, los estudios de ratón mutados han apuntado otras causas genéticas^{3,5,12-17}. La relación con anomalías del emparejamiento de los cromosomas (sinapsis) conduce a una parada meiótica y eliminación de los espermátocitos primarios bloqueados (apoptosis), así como la formación de espermatozoides aneuploides debido a errores de no disyunción. Asimismo, el emparejamiento normal y defectos en la recombinación recíproca causan parada meiótica debido a los niveles disminuidos de formación de quiasmas, separación precoz de homólogos/cromátidas o segregación anormal (no disyunción) de cromosoma/cromátida. Son pocos los estudios citogenéticos que se han realizado en espermátocitos primarios de varones azoospermicos con MA. En un estudio, un varón con características secundarias sexuales normales y MA incompleta presentó un emparejamiento normal pero un fallo en la formación de quiasmas²⁴. Por el contrario, se encontró emparejamiento anormal de cromosomas meióticos en biopsias testiculares de pacientes varones infértiles con causas variables de disfunción de la espermatogénesis²⁵. Sin embargo, el tipo variado de pacientes estudiados no es capaz de atribuir este hallazgo a los casos de MA. Un estudio más reciente, en el que se utilizaron secciones de parafina de muestras de testículos extraídas de pacientes azoospermicos durante el TESE-ICSI, comparó las aneuploidías sexuales entre pacientes controles con azoospermia obstructiva (OAZ) y espermatogénesis conservada, la HP y la MA incompleta y completa²⁶. En OAZ, las aneuploidías sexuales se encontraron en un 2,9% de las células germinales premeióticas y en 26,2% de células germinales haploides, mientras que en la HP y en la MA incompleta y completa estos valores variaron entre el 9,9, el 9,1 y el 12,8% para las células germinales premeióticas y el 30,6, el 34,4 y el 26,2% para las células germinales haploides, respectivamente. Sin embargo, las células germinales haploides no habían sido detectadas en los casos de MA completa, mientras en la MA incompleta y la HP las células germinales haploides estudiadas incluían tanto espermátocitos secundarios como espermátides, lo cual hace difícil cualquier comparación estadística. Por el contrario, el reanálisis de estos datos en relación con las células germinales diploides (espermátocitos primarios) mostró que hay un incremento de

aneuploidías en la HP (9,9%), la MA incompleta (9,1%) y la MA completa (12,8%) en relación con los controles (2,9%).

Sólo un estudio citogenético ha sido realizado en espermatoцитos primarios de varones azoospermicos que presentaban MA genética primaria, cariotipos normales y ausencia de microdeleciones en Yq11.2-AZF. El análisis de los cromosomas meióticos se realizó después de la extensión de células espermatoгенéticas recogidas durante TESE-ICSI²⁷. Los datos mostraron que el emparejamiento de los cromosomas sexuales en la MA completa disminuyó (23%) en relación con la HP (73%) y la OAZ (84%), y lo mismo ocurrió con emparejamiento de los cromosomas autosómicos (CEP 18) (60, 91 y 95%, respectivamente).

Para comparar mejor los *backgrounds* genéticos de los casos de MA completa e incompleta, se seleccionaron 27 pacientes azoospermicos con cariotipo normal y ausencia de microdeleciones en Yq11.2-AZF (a, b, c). De éstos, 7 fueron utilizados como controles (OAZ), 9 tenían MA completa y 11 MA incompleta, como se confirmó tras TESE-ICSI. Para asegurar que la identificación de las células fuese correcta, las células germinales fueron aisladas por micromanipulación por estadio de acuerdo con los criterios morfológicos descritos^{8,31,38,39} y analizados por FISH 4-color simultáneo utilizando sondas centroméricas para los 2 cromosomas sexuales (X, Y) y para 2 cromosomas autosómicos diferentes (7, 18). Los datos mostraron que los casos de MA completa e incompleta difieren en su *background* genético tanto en la aneuploidía de las células germinales premeióticas como en el emparejamiento de los homólogos meióticos en los espermatoцитos primarios.

Específicamente, la MA incompleta se caracterizó por valores incrementados de aneuploidías en las células de Sertoli (19,3% frente al 9% en controles) y disminución del emparejamiento de los homólogos en espermatoцитos primarios (29,5% frente al 45,6% en controles). Las aneuploidías en las células de Sertoli se describen aquí por primera vez, y su incidencia incrementada en casos de MA incompleta sugiere un mecanismo general genético que favorece la disrupción del epitelio seminífero. Los bajos niveles de formación de espermátides tardías en estos casos de MA incompleta están, pues, relacionados con la parada meiótica inducida por una disminución del emparejamiento de los homólogos, lo cual se debe probablemente a deficiencias en el ensamblaje del complejo sinaptonémico. Por otro lado, las cifras incrementadas de aneuploidías encontradas en los espermatoцитos secundarios (9% frente al 2,3% en controles) se explican por disminución del emparejamiento de los homólogos a favor de la no disyunción. Además, como la incidencia de aneuploi-

días en las espermátides elongadas (7,3%) no difiere de los controles (6,6%), postulamos un nuevo mecanismo de regulación por el cual las aneuploidías de los espermatoцитos secundarios y de las espermátides redondas (12,6% frente al 11% en controles) son preferentemente reducidos en el testículo durante la diferenciación a espermatozoide.

En varones fértiles, la incidencia de aneuploidías en espermatozoides es < 0,5%, comparado con una frecuencia de 0,7% de anomalías en la población general neonatal. Por el contrario, se encontró un incremento en la incidencia de aneuploidías en los espermatozoides en varones infértiles (2-14%), cerca del 2% en casos con anomalías mixtas de semen, 5% en oligozoospermia (en terato y astenozoospermia se han obtenido resultados no concluyentes) y 14% en azoospermia. Los valores incrementados de aneuploidías en espermatozoides de pacientes infértiles se han relacionado con la incidencia incrementada de anomalías cromosómicas (1%) en niños concebidos por ICSI²³. Estas observaciones muestran que no hay diferencias significativas entre la incidencia de aneuploidía en las espermátides tardías, controles (6,6%) y MA incompleta (7,3%), lo que puede explicarse por el hecho de que en la azoospermia sólo unos pocos cientos de gametos son accesibles para el análisis de FISH, mientras que en las muestras de semen se estudian cerca de 1.000-10.000 espermatozoides por muestra. Alternativamente, los resultados podrían ser explicados si se asume que en pacientes con azoospermia obstructiva y espermatogénesis conservada también se observa una incidencia incrementada de aneuploidías en los gametos.

Por el contrario, la MA completa se caracterizó por emparejamiento normal (49,7%) y valores incrementados de aneuploidías en espermatoцитos primarios (8,2% frente al 5,4% en MA incompleta y 3,6% en controles). Estos resultados sugieren un incremento en los errores de la no disyunción durante la proliferación mitótica de la espermatogonia, así como un incremento de las anomalías durante los acontecimientos postsinápticos, tales como recombinación y formación de quiasmas probablemente mediados por deficiencias en el sistema de reparación del ADN. En cualquier caso, ambos sucesos favorecen una parada meiótica completa e identifican un *background* genético diferente en comparación con los casos de MA incompleta.

Estos resultados abren la discusión de la tasa de emparejamiento normal de los homólogos cigoteno en la espermatogénesis humana normal. El análisis citogenético y el de FISH determinaron que la mayoría de las espermatogonias (86-91%) y espermatoцитos leptoteno (96%) tienen homólogos no emparejados, y

que la mayoría de los espermatoцитos cigoteno (72%) y paquitenos (100%) muestran homólogos emparejados^{14,27}. Sin embargo, nuestras observaciones mostraron que en OAZ con espermatogénesis conservada, el emparejamiento normal tiene lugar en cerca del 45,6% de los espermatoцитos primarios. Otra observación llamativa fue que en la mayoría de las células el emparejamiento de los homólogos fue asincrónico (parcial) entre los diferentes cromosomas. Aunque tales diferencias podrían deberse a la presencia de un gran número de espermatogonias y espermatoцитos leptoteno contaminantes en el *pool* de espermatoцитos primarios seleccionado para este estudio, creemos que éste no es el caso, ya que en una muestra de testículo la mayoría de las células germinales premeióticas diploides son espermatoцитos primarios en el estadio de paquitenos, que presentan un diámetro mayor. Así pues, las diferencias encontradas aquí se pueden deber a un examen más refinado. Primero, hemos seleccionado cuidadosamente las células por micromanipulación, mientras que otros estudios han utilizado secciones de parafina o extensiones en portas, y hemos distinguido los espermatoцитos primarios paquitenos por su localización o criterios de diploidía. Segundo, hemos utilizado FISH 4-color simultáneo con sondas para los 2 cromosomas sexuales y 2 autosomas diferentes, mientras que otros estudios han utilizado sondas de cromosomas sexuales o/y una sonda autosómica simple.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los Dres. C. Oliveira, J.M. Teixeira da Silva, Profs. J. Beires, N. Montenegro (Ginecología) y Dr. L. Ferrás (Urología) por el trabajo clínico, al Dr. P. Viana por la asistencia técnica al laboratorio de FIV, y a los Dres. C. Ferrás, J. Marques, F. Carvalho y S. Fernandes por el cribado del cromosoma Y.

Bibliografía

- McKim KS, Hawley RS. Chromosomal control of meiotic cell division. *Science*. 1995;270:1595-601.
- Kleckner N. Meiosis: How could it work? *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:8167-74.
- Roeder GS. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Development*. 1997;11:2600-21.
- Champion MD, Hawley RS. Playing for half the deck: the molecular biology of meiosis. *Nature Cell Biol Nature Med (Fertil Supl)*. 2002;4:s50-6.
- Verhoeven G. Maturation arrest in spermatogenesis. En: Ombelet W, Bosmans E, Vandeput H, Vereecken A, Renier M, Hoomans E, editors. *Modern ART in the 2000: andrology in the nineties. Proceedings of Organon International Symposium on Male Infertility and Assisted reproduction* (Genk, Belgium). Studies in ProFertility Series, vol 8, NY and London: Parthenon Publishing Group Inc; 1998. p. 191-204.
- Soderstrom KO, Suominen J. Histopathology and ultrastructure of meiotic arrest in human spermatogenesis. *Arch Pathol Lab Med*. 1980;104:476-82.
- Martin-du-Pan RC, Campana A. Physiopathology of spermatogenic arrest. *Fertil Steril*. 1993;60:937-46.
- Sousa M, Barros A, Tesarik J. Current problems with spermatid conception. *Hum Reprod*. 1998;13:255-8.
- Sousa M, Barros A, Takahashi K, Oliveira C, Silva J, Tesarik J. Clinical efficacy of spermatid conception. Analysis using a new spermatid classification scheme. *Hum Reprod*. 1999;14:1279-86.
- Sousa M, Cremades N, Silva J, Oliveira C, Teixeira da Silva J, Viana P, et al. Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. *Hum Reprod*. 2002b;17:1800-10.
- Nudell D, Castillo M, Turek PJ, Pera RR. Increased frequency of mutations in DNA from infertile men with meiotic arrest. *Hum Reprod*. 2000;15:1289-94.
- Escalier D. Impact of genetic engineering on the understanding of spermatogenesis. *Hum Reprod Update*. 2001;7:191-210.
- Barlow C, Liyanage M, Moens PB, Tarsounas M, Nagashima K, Brown K, et al. Atm deficiency results in severe meiotic disruption as early as leptotema of prophase I. *Development*. 1998;125:4007-17.
- Scherthan H, Jerratsch M, Dhar S, Wang YA, Goff SP, Pandita TK. Meiotic telomere distribution and Sertoli cell nuclear architecture are altered in Atm- and Atm-p53-deficient mice. *Mol Cellular Biol*. 2000;20:7773-83.
- Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Hoog C. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis and male fertility. *Molecular Cell*. 2000;5:73-83.
- Baker SM, Bronner CE, Zhang L, Plug AW, Robatzek M, Warren G, et al. Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell*. 1995;82:309-19.
- Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, et al. Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing-over. *Nature Genetics*. 1996;13:336-42.
- Templado C, Vidal F, Marina S, Pomerol JM, Egozcue J. A new meiotic mutation: desynapsis of individual bivalents. *Hum Genetics*. 1981;59:345-8.
- 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 Genetics*. 1983;65:185-8.
- Egozcue S, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, et al. Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenoazoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *J Assisted Reprod Genetics*. 2000;17:307-9.
- Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, et al. Screening for abnormalities of chromosomes X, Y and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men included in an IVE-ICSI program. *Fertil Steril*. 1999;72:696-701.
- Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Calderon G, Egozcue S, Egozcue J, et al. Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenoazoospermia. *Hum Reprod*. 1999;14:375-8.
- Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human spermatozoa. FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction*. 2001;121:655-66.
- Pearson PL, Ellis JD, Evans HJ. A gross reduction in chiasma formation during meiotic prophase and a defective DNA repair mechanism associated with a case of human infertility. *Cytogenetics*. 1970;9:460-7.
- Lange R, Krause W, Engel W. Analyses of meiotic chromosomes in testicular biopsies of infertile patients. *Hum Reprod*. 1997;12:2154-8.
- Huang WJ, Lam DJ, Kim ED, De Lara J, Lin WW, Lipshultz LI, et al. Germ-cell non-disjunction in testes biopsies of men with idiopathic infertility. *Am J Hum Genetics*. 1999;64:1638-45.
- Yogev L, Gamzu R, Kleiman S, Botchan A, Hauser R, Yavetz H. Evaluation of meiotic impairment of azoospermic men by fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril*. 2000;74:228-33.
- Alves C, Carvalho F, Cremades N, Sousa M, Barros A. Unique (Y;13) translocation in a male with oligozoospermia. Cytogenetic and molecular studies. *Eur J Hum Genetics*. 2002;10:467-74.

29. Fernandes S, Huellen K, Gonçalves J, Dukal H, Zeisler J, De Meyts ER, et al. High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod.* 2002;8:286-98.
30. Holstein AF, Roosen-Runge EC. *Atlas of Human Spermatogenesis.* Berlin: Grosse Verlag; 1981.
31. Sousa M, Cremades N, Alves C, Silva J, Barros A. Developmental potential of human spermatogenic cells cocultured with Sertoli cells. *Hum Reprod.* 2002a;17:161-72.
32. Scherthan H, Weich S, Schwegler H, Harle M, Cremer T. Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol.* 1996;134:1109-25.
33. Alves C, Sousa M, Silva J, Barros A. Preimplantation genetic diagnosis using FISH for carriers of Robertsonian translocations: the portuguese experience. *Prenatal Diagnosis.* 2002a; 22:1153-62.
34. Vogt PH. Human Y chromosome function in male germ cell development. *Advances Developmental Biology.* 1996;4:191-257.
35. Kamp C, Huellen K, Fernandes S, Sousa M, Schlegel PN, Mielnik A, et al. High deletion frequency of the complete AZFa sequence occurs only in men with Sertoli-cell-only-syndrome. *Mol Hum Reprod.* 2001;7:987-94.
36. Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Van der Veen S, Oates RD, et al. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genetics.* 2002;71:906-22.
37. Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapiccola B, Foresta C. The human Y chromosome azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure and deletion analysis in infertile men. *J Med Genetics.* 2003;40:18-24.
38. Cremades N, Bernabeu R, Barros A, Sousa M. In vitro maturation of round spermatids using coculture on Vero cells. *Hum Reprod.* 1999;14:1287-93.
39. Cremades N, Sousa M, Bernabeu R, Barros A. Developmental potential of elongating and elongated spermatids obtained after in-vitro maturation of isolated round spermatids. *Hum Reprod.* 2001;16:1938-44.