

ORIGINALES

Utilidad de la FISH en espermatozoides como análisis complementario de rutina en un laboratorio de andrología

Rocío Núñez Calonge, Susana Cortés Gallego, Marta Gago García, Enrique Olaya Vila, Patricia López Domínguez y Pedro Caballero Peregrín

Unidad de Reproducción. Clínica Tambre. Madrid. España.

RESUMEN

Introducción: El estudio de aneuploidías en los cromosomas de núcleos espermáticos previamente fijados y decondensados por técnicas de fluorescencia con hibridación in situ (FISH), ha demostrado ser de gran utilidad en el estudio del contenido cromosómico espermático. Por otra parte, los resultados derivados de los estudios realizados en individuos infértiles con cariotipo normal han puesto de manifiesto incrementos en la frecuencia de producción de espermatozoides aneuploides y diploides.

En este trabajo se han analizado retrospectivamente nuestros resultados de FISH en espermatozoides en pacientes con cariotipo normal y riesgo de anomalías cromosómicas debido los siguientes factores: aborto de repetición, fallos repetidos de implantación después de ICSI y factor masculino severo. Los objetivos de este estudio son: *a)* analizar la relación entre cualquiera de estas indicaciones previas y un incremento de espermatozoides aneuploides o diploides; *b)* ya que algunas de las parejas incluidas en el estudio han realizado varios ciclos de microinyecciones espermáticas (ICSI), conocer el efecto de las anomalías cromosómicas en la tasa de fecundación, división, implantación y abortos, y *c)* conocer si la realización de FISH en espermatozoides para estas indicaciones puede emplearse como test de rutina en un laboratorio de andrología.

Material y métodos: En el estudio se han incluido 158 varones con cariotipo normal, a los que se les ha realizado estudio de FISH en espermatozoides durante el año 2007 para estudio de aneuploidías y diploidías para los cromosomas 13, 14, 15, 18, 20, 21, 22, X e Y mediante sondas específicas. Las indicaciones para la realización de FISH fueron: 112 pacientes con fallos previos de fertilización in vitro (FIV), 26 con factor masculino y 20 con abortos de repetición. También se estudió, de forma retrospectiva, los resultados de los ciclos de ICSI antes de realizar el FISH: tasa de fecundación, división y calidad embrionaria.

Resultados: El porcentaje de muestras de semen con incremento estadísticamente significativo de espermatozoides con aneuploidías ha

ABSTRACT

Usefulness of FISH in sperm as a complementary routine analysis in the andrology laboratory

Introduction: Fluorescent in situ hybridization (FISH) in decondensed sperm nuclei has proven to be a good method for determining the chromosome content of spermatozoa. Even among infertile men with a normal karyotype, there is a considerable frequency of chromosomal abnormalities limited to the germ line.

In the present study, we have retrospectively analysed our FISH results on spermatozoa in a series of patients with normal karyotypes who have a risk of sperm chromosomal abnormalities due to several factors such as, recurrent spontaneous miscarriages, repeated implantation failures after ICSI and male factor. The objectives of the study were: *a)* to investigate whether these indications were actually associated with an increased incidence of sperm aneuploidy and diploidy; *b)* to examine the correlation between sperm chromosomal abnormalities on ICSI outcome in terms of fertilization, cleavage and embryo quality; and *c)* to find out if sperm FISH analysis could be used as a routine test in the andrology laboratory.

Material and methods: Sperm aneuploidy and diploidy rates for chromosomes 13, 14, 15, 18, 20, 21, 22, X and Y were evaluated in 158 patients with normal karyotypes using specific probes. Indications for sperm FISH analysis were: recurrent miscarriages of unknown aetiology (n = 20), repeated implantation failures after ICSI (n = 112) and male factor (n = 26). We also retrospectively analysed ICSI outcome (fertilization rate, cleavage and embryo quality) before FISH analysis.

Results: The incidence of sperm samples with a significant increase in aneuploidy was 26.5%. Oligoasthenoteratozoospermia patients: 30.7%, implantation failures: 21.4% and recurrent miscarriages: 50%. There was a total of 35.7% of patients with male factor and implantation failure with abnormal FISH results and 66.6% with male factor and recurrent miscarriages. There were no signifi-

Correspondencia: Dra. R. Núñez Calonge.
Unidad de Reproducción. Clínica Tambre.
Tambre, 8. 28002 Madrid. España.
Correo electrónico: rocio@clinicatambre.com

sido del 26,5%. De éstos, el 21,4% eran fallos de FIV, 30,7% factor masculino y 50% abortos de repetición. En los casos diagnosticados como fallo de FIV con factor masculino se encontraron anomalías en un 35,7%. En los casos de aborto de repetición con factor masculino las anomalías se encontraron en un 66,6%. No hubo diferencias en las tasas de fecundación, división y calidad embrionaria en los ciclos previos de ICSI con semen normal o alterado.

Conclusiones: El porcentaje de varones con anomalías cromosómicas encontrado, sobre todo si se suma el factor masculino con fallo de FIV, revelan la idoneidad de realizar esta técnica en los casos indicados.

Palabras clave: Espermatozoide. Aneuploidías espermáticas. FISH. Infertilidad masculina.

INTRODUCCIÓN

La infertilidad masculina y las anomalías cromosómicas están estrechamente relacionadas. Desde hace tiempo se sabe que son mucho más frecuentes las anomalías cromosómicas en varones infértilles que en la población general¹⁻³. Incluso entre varones con cariotipo normal, hay una frecuencia considerable de anomalías cromosómicas limitadas a la línea germinal como consecuencia de no disyunción en la meiosis. Se ha encontrado una correlación inversa entre calidad de semen y tasas de aneuploidías^{4,5}, aunque se han publicado resultados contradictorios respecto a la relación entre aneuploidías espermáticas y defectos específicos del espermatozoide⁶⁻⁸.

La primera publicación que relacionó el incremento de aneuploidías e infertilidad masculina fue en 1995 por Moosani et al¹, los cuales utilizaron ovocitos humanos y de hámster y FISH (hibridación in situ por fluorescencia) para demostrar una frecuencia del 3,1% (cromosomas 1, 12 y X/Y) en espermatozoides de varones infértilles frente al 0,84% en los controles.

La FISH es una técnica de análisis citogenético que se basa en la utilización de segmentos específicos de ADN (sondas) marcadas con distintos fluorocromos que, al unirse a las secuencias complementarias, permite identificar los cromosomas de los espermatozoides. Determina la dotación cromosómica, expresando el porcentaje de espermatozoides que presenta aneuploidías o disomías.

El análisis de las aneuploidías en cromosomas espermáticos por medio de FISH es de gran interés por varias razones. Se ha estimado que alrededor del 60% de los abortos espontáneos del primer trimestre se produce por anomalías cromosómicas⁹, la mayoría de las cuales son como resultado de no disyunción durante la gametogénesis. Aunque la mayoría son de origen ma-

terno, estudios moleculares han comprobado que el 8-12% de los abortos con trisomía 13, 18 y 21 son de origen paterno¹⁰. Utilizando como análisis la FISH, se ha comprobado un incremento en la incidencia de las disomías de los cromosomas sexuales en abortos de repetición cuando se compara con los controles¹¹.

Otro aspecto importante se refiere a como la aneuploidía espermática puede afectar los resultados de microinyección espermática (ICSI) en pacientes infériles. Esto es de particular importancia, teniendo en cuenta que la microinyección de un espermatozoide aneuploide en un ovocito euploide puede generar descendencia aneuploide o aborto. De hecho, se ha encontrado una mayor incidencia de aneuploidías en los cromosomas sexuales y anomalías estructurales de novo en cariotipos prenatales después de ICSI comparándolos con los de la población general, que podría atribuirse a las características de los varones infértilles tratados¹². En un reciente trabajo, Nicopoullos et al¹³ presentaron el primer estudio prospectivo con 56 pacientes infériles sometidos a ICSI en el que concluyeron que la presencia de aneuploidía espermática es un factor pronóstico negativo en el éxito de la técnica, independiente de otras variables como la edad materna.

Sin embargo, a pesar de la relación que hay entre infertilidad masculina y características genéticas de los espermatozoides, se plantea el problema de cómo puede traducirse este hecho en la práctica diaria del laboratorio de andrología y en el estudio diagnóstico del varón infértil. Por ello, en este trabajo se han analizado retrospectivamente nuestros resultados de FISH en espermatozoides en pacientes con cariotipo normal y riesgo de anomalías cromosómicas debidas los siguientes factores: aborto de repetición, fallos repetidos de implantación después de ICSI y factor masculino severo. Los objetivos de este estudio son: *a)* analizar la relación entre cualquiera de estas indicaciones previas y

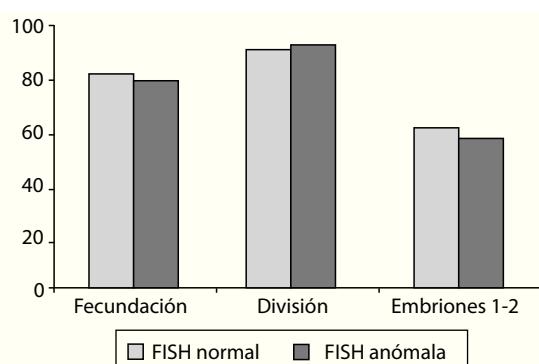


Figura 1. Tasa de fecundación, división y calidad embrionaria (embriones de grados 1 y 2) comparada en los grupos de varones con hibridación in situ por fluorescencia (FISH) normal frente a los que obtuvieron resultado anómalo para alguno de los cromosomas estudiados en los ciclos previos de microinyección espermática (ICSI). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

un incremento de espermatozoides aneuploides o diploides; *b*) ya que algunas de las parejas incluidas en el estudio han realizado varios ciclos de ICSI, conocer el efecto de las anomalías cromosómicas en la tasa de fecundación, división, implantación y abortos, y *c*) conocer si la realización de FISH en espermatozoides para estas indicaciones puede emplearse como test de rutina en un laboratorio de andrología.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

En este trabajo se han incluido 158 varones de la Clínica Tambre, con cariotipo normal (46 XY), a los que se les ha realizado estudio de FISH en espermatozoides durante el año 2007 para el estudio de aneuploidías y diploidías de los cromosomas 13, 14, 15, 18, 20, 21, 22, X e Y, mediante sondas específicas.

Las indicaciones para la realización de FISH fueron: *a*) aborto de repetición de etiología desconocida después de estudio de esta patología ($n = 20$); *b*) factor masculino severo ($n = 26$), y *c*) fallo de implantación (más de 3 ciclos de ICSI sin gestación) ($n = 112$).

Las muestras de semen se evaluaron de acuerdo con los criterios de la OMS¹⁴. Se consideró factor masculino severo los casos de OAT severa (< 5 millones espermatozoides/m; $< 40\%$ movilidad; $> 70\%$ espermatozoides anómalos morfológicamente).

Los resultados individuales de FISH se consideraron como anómalos cuando se observó un incremento estadísticamente significativo en cualquiera de los parámetros analizados (grado de disomía para los cromosomas 13, 14, 15, 18, 20, 21, 22, X e Y, y grado

total de diploidía), cuando se comparó con el grupo control.

Los pacientes diagnosticados como fallo de implantación ($n = 112$), habían realizado un total de 340 ciclos de ICSI previos al estudio de FISH. La tasa de fecundación, división y calidad embrionaria se comparó en los grupos de varones con FISH normal frente a los que obtuvieron resultado anómalo para alguno de los cromosomas estudiados.

Hibridación in situ por fluorescencia en espermatozoides

Para la realización del FISH en espermatozoides, cada muestra de semen se centriugó con medio Sperm prep (Medicult, Copenhague, Dinamarca), y el sedimento se fijó con metanol/ácido acético (3:1).

Las muestras de semen fijadas se enviaron a Repro- genetics Spain, S.A. donde se realizó la recondensación y desnaturización del ADN, la hibridación con sondas de ADN, y la lectura y estadística.

La recondensación de los núcleos espermáticos se realizó incubando los portas en DTT (1,4 ditrioteritol) (5 mmol/l) y formamida 5 min a 73 °C, y la hibridación de la siguiente forma: se realizaron 4 hibridaciones en cada caso, sobre 4 portaobjetos diferentes, utilizando las siguientes combinaciones de sondas:

– FISH de 3 colores con sondas específicas para los cromosomas X (Xp11.1-q11.1, DXZ1), Y (Yp11.1-q11.1, DYZ3) y 18 (18p11.1-q11.1, D18Z1).

– FISH de 2 colores con una sonda específica de *locus* para el cromosoma 13 (13q14, RB1) y 21 (21q22.13-21q22.2, D2S259, D21S341, D21S342).

– FISH de 2 colores con una sonda específica de *locus* para el cromosoma 22 (22q11.2, bcr) y una sonda específica del cromosoma 20 (20q13.2, D20S183, ZNF217, 188T).

– FISH de dos colores con una sonda específica para el brazo q de cromosomas 14 (14qter, D14S1419) y 15 (15qter, RH54179).

Para cada paciente se determinó la incidencia de disomías para los cromosomas 13, 14, 15, 18, 20, 21, 22, X e Y, la incidencia de espermatozoides diploides y la proporción de espermatozoides portadores de los cromosomas X e Y.

Interpretación de los resultados

Un espermatozoide haploide contiene 23 cromosomas. Este test informa de la presencia de regiones específicas para los cromosomas 13, 14, 15, 18, 20, 21, 22, X e Y.

Un espermatozoide haploide debe presentar una señal de hibridación para cada uno de los autosomas más una señal para los cromosomas X e Y.

– *Genotipos anormales.* Cualquier combinación diferente a la de una señal de hibridación para cada uno de los cromosomas analizados.

– *Individuos de riesgo incrementado.* Los que presenten un incremento significativo ($p < 0,05$) para al menos una de las anomalías analizadas.

Las sondas utilizadas en este estudio detectan regiones específicas o *loci* en los cromosomas y, por tanto, no proporcionan información acerca de todo el cromosoma.

Se estima que el porcentaje de espermatozoides aneuploides de una población control es del 6%, mientras que para los cromosomas 13, 14, 15, 18, 20, 21, 22, X e Y es del 1,13%.

Estadística

El estudio estadístico se realizó utilizando el *software* SPSS versión 11.5. El test de Fisher para analizar variables nominales en forma de tablas de frecuencia y mediante el estudio multivarianza, utilizando para ello la prueba *t* de Student para muestras independientes, con un intervalo de confianza del 95%.

Para comparar los resultados de fecundación, división, gestación, implantación y abortos tras ICSI se utilizó el test de Fisher. Se consideró $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

El porcentaje total de muestras de semen analizadas con incremento estadísticamente significativo de espermatozoides con aneuploidías ha sido del 26,5% ($n = 42$).

De acuerdo con la indicación para la realización del FISH (tabla 1), los resultados eran anómalos en 8 de 26 varones con factor masculino severo (30,7%), 24 de 112 con fallo de implantación (21,4%) y 10 de 20 de los diagnosticados de aborto de repetición (50%).

Los pacientes diagnosticados como fallo de implantación se subdividieron en 2 grupos: pacientes que han realizado varios ciclos de ICSI sin gestación, y pacientes que han realizado ciclos con donación de ovocitos sin gestación. En el primer grupo, de 88 varones, 20 presentaban FISH alterado (22,7%), frente a 4 casos de FISH alterado de 24 en el segundo grupo (16,6%) (tabla 2).

La mayor incidencia de anomalías cromosómicas se encontró en el subgrupo de pacientes con aborto de repetición sin causa conocida, en el cual había un aumento significativo de la tasa de disomía para los cromosomas sexuales ($p < 0,001$), cromosoma 18 ($p < 0,005$) y cromosoma 21 ($p < 0,0002$), así como la tasa de diploidía ($p < 0,0001$), cuando se compara con los controles.

Si aislamos los casos diagnosticados de fallo de implantación en los que hay además un factor masculino severo ($n = 28$), nos encontramos con 10 casos de FISH anómalo (35,7%). En el grupo de aborto de repetición con factor masculino severo ($n = 6$) hallamos 4 casos con alteraciones cromosómicas (66,6%) (tabla 3).

En la tabla 4 se muestra la evolución de los 42 casos con resultado de FISH alterado. No se consiguió ningún embarazo evolutivo excepto con técnicas de diagnóstico genético preimplantacional o banco de semen.

Los 112 pacientes con diagnóstico de fallo de implantación realizaron previamente antes del estudio de FISH un total de 340 ciclos (ICSI o donación de ovocitos). La tasa de fecundación, división y calidad embrionaria se comparó en los grupos de varones con FISH normal frente a los que obtuvieron resultado anómalo para alguno de los cromosomas estudiados (fig. 1). No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros estudiados.

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha incrementado el número de trabajos publicados en los que se utiliza el FISH de núcleos espermáticos decondensados para analizar la incidencia de aneuploidías en los varones infériles cromosómicamente normales^{3,15}. Parece que no hay discusión en el hecho de que hay una relación directamente proporcional entre el riesgo de aneuploidía y la calidad de semen, sobre todo en casos de OAT severa, confirmándose la hipótesis de una etiología genética en la infertilidad de estos pacientes¹⁵. Ya que los varones con OAT severa son los candidatos más frecuentes para ICSI, el estudio de FISH de espermatozoides parecería indicado como una prueba más de rutina con la que orientar a estos pacientes. Para poder conocer cuál es la casuística real dentro de una unidad de reproducción primero se ha seleccionado a los varones a los que se les solicita el estudio de FISH, en función del diagnóstico. En primer lugar, se ha realizado en los varones con factor masculino severo, posteriormente en los varones cuyas parejas han tenido más de 3 abortos sin causa explicable después

TABLA 1. Número de casos y frecuencia de alteraciones cromosómicas en función de las indicaciones de la hibridación in situ por fluorescencia (FISH)

	Número total de casos	Número de casos anómalos	Porcentaje
Factor masculino severo	26	8	30,7
Fallo de implantación	112	24	21,4
Aborto de repetición	20	10	50

TABLA 2. Número de casos y frecuencia de alteraciones cromosómicas en función de las indicaciones de la hibridación in situ por fluorescencia (FISH): fallo de microinyección espermática (ICSI) o fallo de donación de ovocitos

	Número total de casos	Número de casos anómalos	Porcentaje
Fallo de ICSI	88	20	22,7
Fallo de donación ovocitos	24	4	16,6

TABLA 3. Número de casos y frecuencia de alteraciones cromosómicas en los casos diagnosticados previamente como fallo de implantación y aborto de repetición que presentan además factor masculino severo

	Número total de casos	Número de casos anómalos	Porcentaje
Fallo de implantación	28	10	35,7
Aborto de repetición	6	4	66,6

TABLA 4. Evolución de los 42 casos con resultado de la hibridación in situ por fluorescencia (FISH) alterado

Evolución	Número de casos	Número de gestaciones	Número de abortos
DGP	16	7	1
ICSI	5	2	2
Embarazo espontáneo	2	2	2
Semen donante	8	7	0
Abandonos	11	—	—

DGP: diagnóstico genético preimplantacional; ICSI: microinyección espermática.

del estudio pertinente y, en tercer lugar, varones que han realizado más de 3 ciclos de ICSI o donación de ovocitos sin gestación. De esta forma, se han estudiado un total de 158 varones. La incidencia de varones con FISH alterado que se encontró fue del 30,7%, cifra que ya de por sí justifica el estudio. Si además del factor masculino severo nos encontramos con que han realizado varios ciclos de ICSI sin conseguir gestación, el porcentaje se eleva al 35,7% de los varones con una frecuencia de aneuploidías mayor de la estimada como normal.

Respecto a la contribución espermática al aborto de repetición sin causa explicable, es obvio que depende de la frecuencia y características cromosómicas anómalas de los espermatozoides producidos. A pesar del bajo número de casos en nuestro estudio se ha encontrado que esta contribución es del 50%, aumentando al 66,6% si además hay un factor masculino severo.

Por otra parte, en nuestro estudio el resultado de ICSI se analizó retrospectivamente en 340 ciclos de parejas que no quedaron gestantes, cuya constitución cromosómica se analizó posteriormente por FISH. Se comprueba que no hay diferencias en las tasas de fecundación, porcentaje de embriones divididos y calidad de éstos entre varones con FISH normal y alterado. Estos resultados concuerdan con los publicados en un interesante trabajo en el que se analiza el porcentaje de aneuploidías en espermatozoides utilizados para ICSI que consiguen gestación en el ciclo o no¹³. En este trabajo se confirma el papel potencial de las aneuploidías espermáticas como factor predictivo de éxito en ICSI, sin haber diferencias entre los parámetros antes comentados (fecundación, división y calidad embrionaria) en los 2 grupos. Sin embargo, en este trabajo se analizaron 56 pacientes, frente a los 340 ciclos que se han incluido en nuestro estudio.

Es importante resaltar que de los 42 casos en los que se encontró aumentada la frecuencia de anomalías cromosómicas, 5 parejas decidieron realizar otro ciclo de ICSI con sus propios espermatozoides, de las cuales 2 quedaron gestantes, pero las gestaciones finalizaron en aborto espontáneo. Las únicas parejas que han conseguido un embarazo evolutivo emplearon diagnóstico genético preimplantacional (6 de 16) o semen de donante (7 de 8).

CONCLUSIONES

En conclusión, nuestro análisis confirma que un cariotipo normal no excluye la presencia de anomalías cromosómicas en pacientes incluidos en programa de ICSI. La baja calidad de semen representa por sí sola un factor de riesgo independiente asociado con aumento de anomalías cromosómicas, así como la presencia previa de abortos de repetición. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar el riesgo y el aumento de aneuploidías en casos de varones infértilles con características seminales normales en parejas con fallo de implantación.

Pensamos que el estudio de rutina de aneuploidías en el semen de varones con estos diagnósticos previos puede ser de gran ayuda a la hora de valorar la posibilidad de gestación y la técnica de reproducción asistida más adecuada.

Bibliografía

1. Moosani N, Pattinson HA, Carter MD, Cox DM, Rademaker AW, Martin RH. Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril*. 1995;64:811-7.
2. Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, et al. Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in Vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril*. 1999;72: 696-701.
3. Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, et al. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescente in-situ hybridisation in infertile men. *Hum Reprod*. 2000;15: 351-65.
4. Bernardini L, Gianaroli L, Fortini D, Conte N, Magli C, Cavanini S, et al. Frequency of hyper-, hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile men. *Hum Reprod*. 2000;15:2165-72.
5. Ushijima C, Kumasako Y, Kihale PE, Hirotsuru K, Utsunomiya T. Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence in-situ hybridisation. *Hum Reprod*. 2000;15:1107-11.
6. Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod*. 2001;16:2084-92.
7. Rubio C, Rodrigo L, Gil-Salom M, Mateu E, Mercader A, Buendia P, et al. Sperm chromosomal abnormalities and PGD: relationship with sperm parameters. *Hum Reprod*. 2005;20: i190.
8. Nicopoullos JDM, Ramsay JWA, Almeida P, Gilling-Smith. The genetic analysis of sperm in the subfertile male: a predictor of clinical outcome? *BJU Int*. 2007;93 Suppl 4:39.
9. Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, et al. Human aneuploidy: incidence, origin and etiology. *Environ Mol Mutagen*. 1996;28:167-75.
10. Nicolaïdis P, Petersen MB. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod*. 1998;13:313-9.
11. Rubio C, Simon C, Blanco J, Vidal F, Mínguez Y, Egozcue J, et al. Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet*. 1999;16:253-8.
12. Bonduelle M, Van Assche E, Joris H II, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, et al. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod*. 2002;17: 2600-14.
13. Nicopoullos JD, Gilling-Smith C, Almeida P, Homa S, Nice L, Tempest H, et al. The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? *Hum Reprod*. 2007;22:1-11.
14. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1992.
15. Egozcue SJ, Blanco Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, et al. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update*. 2000;6:93-105