

ANALISI CITOGENETICA DE L'ESPERMATOZOIDE D'HOMES NORMALS

Jordi Benet, Anna Genescà, Joaquina Navarro,
Josep Egozcue i Cristina Templado

Dpt. Biologia Cel.lular i Fisiologia, Fac. Medicina,
Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra.

Abstract

Cytogenetic analysis of sperm from normal men

In recent times, the study of human sperm chromosomes has become possible using a heterologous fertilization method in which hamster oocytes and human spermatozoa are used. This technique allows the direct determination of the incidence of chromosome abnormalities present in human sperm. This work describes our results on human sperm chromosomes using the method described by Martin (1983) and modified by us in our laboratory. The cytogenetic study of spermatozoa from three normal males has demonstrated that the mean incidence of chromosome abnormalities was 17.2% (6.9% structural anomalies; 2.0% hyperhaploidy; and 9.5% hypohaploidy). This study was carried out using sperm selected by means of a swim-up method, although this selection based on the motility of the spermatozoa does not involve a selection regarding the incidence of chromosome abnormalities. The high percentage of hypohaploid cells is probably due to technical artifacts (chromosome loss during fixation) or to anaphase lag. If the incidence of aneuploidy is taken as twice the frequency of hyperhaploidy, then the incidence of chromosome abnormalities of this control series was 10.9%. Key words : human sperm chromosomes, chromosomal abnormalities, aneuploidy.

Introducció

L'espècie humana sembla ser l'única que, en comparació amb altres espècies de mamífers estudiades, presenta una elevada taxa d'anomalies cromosòmiques en el cigot (Chandley, 1981; Bond i Chandley, 1983). Aquestes anomalies, que poden haberse produït durant la gametogènesi i la fecundació, són la causa més important de fallades reproductives i se manifesten com esterilitat, baixa fertilitat i un elevat percentatge de mortalitat en el procés reproductiu humà (Bond i Chandley, 1983; Bouè i col., 1985).

Fins fa poc l'estimació més usual de la freqüència de anomalies cromosòmiques en les concepcions, se ha realitzat indirectament. Afortunadament, la disponibilitat de tècniques de fecundació in vitro (FIV) ha permès desenvolupar un mètode per l'estudi cromosòmic directe de l'espermatozoide humà (Rudak i col., 1978; Martin, 1983). Aquest mètode, que inclou una FIV heteròloga humà-hàmsster, se fonamenta en el fet que l'oòcit d'hàmsster pot ser penetrat per espermatozoides humans si, previament, ha estat desprovist de les cobertes oòcitaris (Yanagimachi i col., 1976). A més, el citoplasma de l'oòcit d'hàmsster conté els factors cel·lulars necessaris per la descondensació del nucli espermàtic, formació de pronuclis i posterior condensació dels cromosomes de la dotació haploide masculina (Yanagimachi, 1984 i 1988). Aquest sistema, l'únic que dona una estimació directe de la freqüència de anomalies cromosòmiques en l'espermatozoide humà, ha permès desenvolupar un nou camp: la citogenètica de gametes.

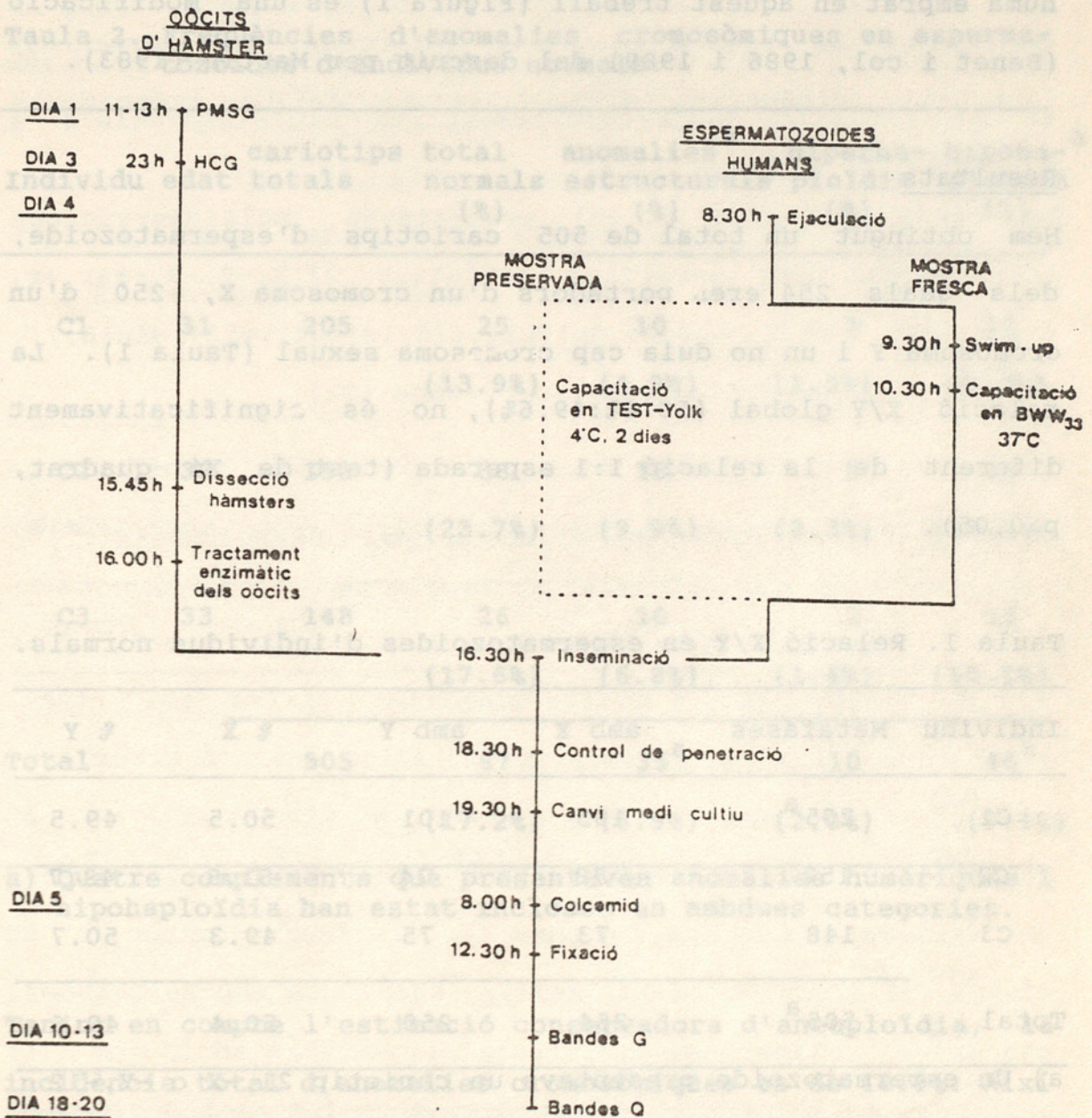


Figura 1. Protocol experimental per l'anàlisi citogenètica de l'espermatozoide humà

Material i mètodes

Les mostres de semen analitzades han estat donades per tres individus normals (C1, C2 i C3) amb cariotip 46,XY.

El mètode per a l'obtenció de cromosomes d'espermatozoide humà emprat en aquest treball (Figura 1) és una modificació (Benet i col, 1986 i 1989) del descrit per Martin (1983).

Resultats

Hem obtingut un total de 505 cariotips d'espermatozoide, dels quals 254 eren portadors d'un cromosoma X, 250 d'un cromosoma Y i un no duia cap cromosoma sexual (Taula 1). La relació X/Y global (50.4%:49.6%), no és significativament diferent de la relació 1:1 esperada (test de χ^2 quadrat, $p > 0,05$).

Taula 1. Relació X/Y en espermatozoides d'individus normals.

Individu	Metafases	amb X	amb Y	% X	% Y
C1	205 ^a	103	101	50.5	49.5
C2	152	78	74	51.3	48.7
C3	148	73	75	49.3	50.7
Total	505 ^a	254	250	50.4	49.6

a) Un espermatozoide presentava un cariotip 21,-X o -Y,-12

De aquestes 505 dotacions cariotipades, 31 espermatozoides mostraven anomalies cromosòmiques estructurals, 10 hiperhaploïdia, 42 hipohaploïdia i quatre anomalies cromosòmiques estructurals i hipohaploïdia (Taula 2).

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies estructurals és de 6,9% (35/505), la d'hiperhaploïdia és de 2.0% (10/505) i la d'hipohaploïdia de 9.1% (46/505).

Taula 2. Freqüències d'anomalies cromosòmiques en espermatozoides d'individus normals.

Individu	edat	cariotips total	total normals (%)	anomalies ^a estructurals (%)	hiperhaploïdia (%)	hipohaploïdia ^a (%)
C1	31	205	25 (13.9%)	10 (4.9%)	3 (1.5%)	13 (6.3%)
C2	38	152	36 (23.7%)	15 (9.9%)	5 (3.3%)	18 (11.8%)
C3	33	148	26 (17.6%)	10 (6.8%)	2 (1.4%)	15 (10.1%)
Total		505	87 (17.2%)	35 ^a (6.9%)	10 (2.0%)	46 ^a (9.1%)

a) Quatre complements que presentaven anomalies numèriques i hipohaploïdia han estat inclosos en ambdues categories.

Tenint en compte l'estimació conservadora d'aneuploïdia, la incidència total d'anomalies cromosòmiques es de 10.9%. Així mateix, la freqüència de l'individu C2 (16.4%) és significativament diferent de la del C1 (7.8%) ($p < 0.02$, test Z per proporcions independents) i més gran que la del C3 (4.5%) ($p < 0.04$, test Z per proporcions independents).

Els tipus d'anomalies cromosòmiques estructurals obtinguts són representats a la Taula 3. Els trencaments de cromosoma (csb) (48.6%) i els fragments acèntrics (ace) (32.4%) són les categories més abundants. Altres aberracions, en ordre decreixent de freqüències, són: intercanvi de cromàtides (cte/tri), dicèntrics (dic), delecions (del) i trencaments de cromàtide (ctb).

Dos espermatozoides (0.4%) presentaven multiaberracions estructurals, amb possibles cariotips 23,X,-2,-3,+mar,+r,+3ace (C1) i 23,Y,csb3q21,del5p12,t(3;18)(q21;p13),dic(6;7),csb9p13,dic(17;22)(q25;q12),+mar,+4ace (C3).

Taula 3. Tipus d'anomalies cromosòmiques estructurals ^a, ^b.

	C1	C2	C3	TOTAL
dic	-	-	1	1
del	-	-	1	1
csb	3	11	3	17
ace	4	5	4	13
cte/tri	3	-	1	4
ctb	-	1	-	1
Total	10	17	10	37

- a) dic, dicèntric; del, delecio; csb, trencament de cromosoma; ace, fragment acèntric; cte, intercanvi de cromàtide; tri, trirradial; ctb, trencament de cromàtide.
 b) No han estat inclosos dos complements amb multiaberració.

En els 46 espermatozoides hipohaploïds, la pèrdua afectava tots els cromosomes excepte el 8. Els cromosomes més freqüentment implicats han estat el 21 (14%), el 12 (12%) i el 22 i 17 (9.5% cadascun).

El nombre d'espermatozoides hiperhaploïds, 10, ha estat molt més baix. La distribució de les freqüències d'hipohaploïdia i d'hiperhaploïdia era significativament diferent de la relació 1:1 ($p < 0.05$, $\chi^2 = 26.7$). En els complements hiperhaploïds, tan sols els cromosomes 9, 12, 16, 19, 20, 21 i 22 han estat afectats.

Discussió

La freqüència d'hipohaploïdia en el nostre estudi era quatre vegades superior a la d'hiperhaploïdia. Aquest increment pot ésser degut a un efecte artefactual de la tècnica, especialment durant el procés de fixació (Templado i col, 1988). Per evitar introduir errors en el càlcul de la freqüència d'aneuploïdia hem considerat aquesta com el doble de la freqüència d'hiperhaploïdia. Introduint aquesta correcció, la freqüència mitjana d'anomalies cromosòmiques en el nostre estudi (10.9%) està compresa en l'interval de freqüències que han trobat altres autors (5.0%-13.7%) (Taula 4). No hi ha diferències significatives entre la nostra freqüència d'anomalies cromosòmiques (10.9%) i les descrites en les tres sèries més grans (9.2%, 13.7% i 10.3%) (Brandriff i col, 1986; Kamiguchi i Mikamo, 1986; Martin i col, 1987) però sí amb la freqüència (6.7%) descrita per Pellestor (1988) (test z per proporcions independents,

$p > 0.05$). Tot i així, no es pot descartar que les pèrdues anafàsiques puguin augmentar la proporció d'hipohaploïdies. Ford i Lester (1982) van descriure un fenomen de desplaçament cromosòmic en la placa metafàsica que provocaria pèrdues de cromosomes. Basant-se en aquest i posteriors estudis, Ford (1987) ha proposat el desplaçament cromosòmic com un dels orígens d'aneuploïdia.

La nostra freqüència d'anomalies cromosòmiques presenta variacions significatives entre individus. Altres autors (Martin i col, 1983 i 1987; Brandriff i col, 1985, Kamiguchi i Mikamo, 1986) també han trobat diferències significatives entre donadors. Recentment, a partir dels resultats de la sèrie més àmplia, Martin i col (1987) han proposat que l'interval del 95% de confiança per els valors de freqüències d'anomalies cromosòmiques individuals, seria de 0% a 22.4%. Així doncs, les variacions entre els valors mitjans, observats en diferents laboratoris, podrien ésser degudes, en gran part, a les variacions inter-individuals.

En el nostre estudi, tots els grups del cariotip humà han estat involucrats en hipohaploïdies, però la distribució no ha estat homogènia. Els grups E, F i G són els únics que presenten valors d'hipohaploïdia superiors als esperats considerant que tots els cromosomes tenen la mateixa probabilitat de sofrir hipohaploïdia. Els cromosomes més freqüents en els espermatozoids nul·lisòmics eren: el 21 (14%), 12(12%), 17(9.5%) i 22(9.5%). Segons el model de desplaçament cromosòmic, (Ford, 1987) els cromosomes petits (grups E, F i G) són els que presenten més risc de sofrir

Taula 4. Estudi cromosòmic de l'espermatzoide en 7 sèries d'individus normals

Referència	nº individus	mitjana edat	nº cario tips	relació X%:Y	anomalies estructur. (%)	hiperhaploidies (%)	hipohaploidies (%)	Total espermatozoides amb anomalies (%)
Rudak et al, 1978	1	?	60	57:43	1(1.7)	1(1.7)	2(3.3)	3(5.0)
Brandriff et al, 1985	11	32.9	2486	50:50	190(7.7)	18(0.7)	23(0.9)	226(9.2)
Kamiguchi i Mikamo, 1986 ^a	4	?	1091	53:47	142(13.0)	5(0.5)	5(0.5)	150(13.7)
Martin et al, 1987	30	34.7	1582	53:47	98(6.2)	22(1.4)	55(3.5)	163(10.3)
Jenderny and Röhrborn, 1987	6	?	129	52:48	8(6.2)	1(0.8)	1(0.8)	9(7.0)
Pellestor, 1988	5	26.6	521	48:52	6(1.2)	9(1.7)	21(4.0)	35(6.7)
Aquest treball	3	34	505	50:50	35(6.9)	10(2.0)	46(9.1)	87(17.2)(10.9) ^b

a) estudi sense bandes.

b) considerant l'estimació conservadora d'aneuploidia.

pèrdues anafàsiques. L'elevat percentatge d'hipohaploïdia, en comparació al d'hiperhaploïdia, obtingut en aquest estudi, podria ésser el resultat no sols d'artefactes produïts en el procés de fixació sino de pèrdues anafàsiques, originades per desplaçament cromosòmic.

El reduït nombre de cèl.lules hiperhaploides (10) trobades en aquest estudi, no permet de fer una anàlisi en profunditat, d'aquest fenomen; tan sols assenyalarem que entre els espermatozoides hiperhaploids hi ha diplosomies pels cromosomes 21, 16, i 9, tots els implicats amb trisomies viables o no, molt freqüents en l'espècie humana. En aquest treball, coincidint amb la majoria d'autors (veure Taula 4 i revisió Benet i col, 1987), les anomalies cromosòmiques estructurals (6.9%) són més freqüents que les hiperhaploïdies (2.0%) i que l'estimació conservadora d'aneuploïdies (4.0%).

Les anomalies estructurals més freqüents en cada individu són trencaments de cromosoma (csb) i fragments acèntrics (ace). Si agrupem csb i ace, aquesta categoria abasta un 81.0% de totes les anomalies estructurals, mentre que categories estructurals estables, (p.e. translocacions) presenten percentatges molt reduïts. Això, també és d'aquest ordre en tots els estudis descrits fins ara (Martin i col, 1983 i 1987); Brandriff i col, 1985 i 1988; Kamiguchi i Mikamo, 1986; Jenderny i Röhrborn, 1987; Pellestor, 1988).

La presència d'espermatozoides amb multiaberracions estructurals ha estat observada en la nostra sèrie i en dues més. La seva freqüència és relativament baixa: 0,39% (2/505)

en el nostre estudi, 0,19% (3/1582) en el de Martin i col. (1987) i 0.26% (13/5000) en el de Brandriff i col. (1988); però més elevada que la trobada en limfòcits, 0.023% (24/102.170), (Awa i Neel, 1986). Aquests autors han considerat aquest tipus de cèl.lules com indicadors de dany cromosòmic espontani. L'elevada freqüència d'espermatozoides amb multiaberracions podria ésser el reflex de què la freqüència d'anomalies estructurals és, en general, més elevada en cromosomes d'espermatozoide que en limfòcits (Brandriff i col, 1988).

En la nostre sèrie, la proporció d'espermatozoides portadors del cromosoma X i portadors del cromosoma Y (204:201) no difereix significativament de la relació teòrica esperada (1:1), encara que el nombre de portadors d'X és lleugerament superior. Aquestes dades coincideixen amb la majoria d'autors (Brandriff i col, 1985; Kamiguchi i Mikamo, 1986; Jenderny i Röhrborn, 1987; Martin i col, 1987). Unicament Pellestor (1988) ha trobat una proporció més elevada però no significativa d'espermatozoides portadors d'Y (52%Y, 272/520) (taula 4).

Fins ara, totes les sèries en individus normals, han estat fetes amb espermatozoides no seleccionats, a excepció de la sèrie japonesa (Kamiguchi i Mikamo, 1986), però la comparació dels seus resultats citogenètics amb altres sèries es difícil de fer, ja que també han modificat substancialment la resta de la tècnica (ionòfor A23187, medi TC199,). Donat que el nostre protocol no és essencialment diferent al de Martin i col (1987) ni al de Brandriff i col

(1985) i no hi ha diferències significatives entre els seus resultats citogenètics i els nostres, podem dir que una selecció per motilitat dels espermatozoides no comporta selecció ni en anomalies cromosòmiques ni en la relació X/Y (Benet i col 1988). Martin i Rademaker (1988), indiquen que no hi ha correlació entre el percentatge de formes anormals que presenta una mostra de semen i la seva freqüència d'anomalies cromosòmiques, obtinguda mitjançant el sistema hàmsster-humà. Així doncs, en individus normals, les anomalies cromosòmiques d'espermatozoide difícilment comporten canvis detectables en les característiques fenotípiques tradicionalment analitzades en un seminograma. Coneixer fins a quin punt les anomalies cromosòmiques observades en aquest sistema poden originar mermes en el procés reproductiu humà, és una qüestió que de moment es manté oberta. Espermatozoides amb anomalies numèriques poden comportar la formació d'embrions amb aneuploïdia, la majoria dels quals no són viables; en aquest sentit, es sap que en avortaments s'han detectat anomalies numèriques per tots els cromosomes humans (Chandley, 1987). L'alta freqüència de anomalies estructurals observada en espermatozoides podria explicar en gran part, l'elevada taxa de mortalitat descrita en les primeres setmanes del embarç (Boué i col., 1985), així com l'elevat percentatge de pèrdues pre-implantacionals causades per anomalies cromosòmiques, que ha estat suggerit per interpretar el reduït èxit en la implantació de embrions en programes de FIV (Edwards, 1986; Plachot y col., 1988).

Agraïments

Aquest treball ha estat realitzat amb l'ajut econòmic del Ministerio de Educación y Ciencia (DGICYT, projecte nº BG86-0522).

Bibliografia

AWA AA, NEEL JV (1986). Cytogenetic "rogue" cells: What is their frequency, origin and evolutionary significance?. Proc. Natl. Acad. Sci USA 83:1021-1025.

BENET J, GENESCA A, NAVARRO J, EGOZCUE J, TEMPLADO C (1986). G-banding of human sperm chromosomes. Human. Genet. 73, 181-182.

BENET J, GENESCA A, NAVARRO J, TEMPLADO C (1987). Cytogenetic studies in human spermatozoa. In: Egozcue J. (vol. ed). Cellular Aspects of In Vitro Fertilization. Cell Biology Reviews (vol 13). Springer International-University of the Basque Country. Berlin. Bilbao pp. 44-55.

BENET J, GENESCA A, NAVARRO J, EGOZCUE J, TEMPLADO C (1988). Chromosomal abnormalities in motile human sperm from normal men. Hum Reprod 3:105 (suppl 1)

BENET J, FUSTER C, GENESCA A, NAVARRO J, MIRO R, EGOZCUE J, and TEMPLADO C (1989). Expression of fragile sites in human sperm and lymphocyte chromosomes. Hum. Genet 81:239-242.

BOND DJ, CHANDLEY AC (1983). Aneuploidy. Oxford monographs on medical Genetics. Oxford University Press. Oxford.

BOUE A, GROOP A, BOUE J (1985). Cytogenetics of pregnancy wastage. In: H. Harris and K. Hirschhorn (eds) Advances in Human Genetics, 14. Plenum Press. New York. pp. 1-57.

BRANDRIFF B, GORDON L, ASHWORTH L, WATCHMAKER G, MOORE II D, WYROBEK AJ, CARRANO A V (1985). Chromosomes of human sperm: variability among normal individuals. Hum. Genet. 70:18-24.

BRANDRIFF B, GORDON LA, MOORE II D, CARRANO AV (1988). An analysis of structural aberrations in human sperm chromosomes. Cytogenet. Cell Genet. 47:29-36.

CHANDLEY AC (1981). The origin of chromosomal aberrations in man and their potential for survival and reproduction in the adult human population. Ann. Genet., 24:5-11.

CHANDLEY AC (1987) Aneuploidy: An Overview. In: Sandberg AA, Aneuploidy. Part A: Incidence and Etiology. Alan R. Liss, Inc. New York pp. 1-8.

EDWARDS RG (1986). Causes of early embryonic loss in human pregnancy. Hum. Reprod. 1:185-198.

FORD JH (1987). Chromosome displacement hypothesis. In: Sandberg AA. Aneuploidy. Part A: Incidence and Etiology. Alan R. Liss, Inc. New York. pp. 287-248.

FORD JH, LESTER P (1982). Factors affecting the displacement of human chromosomes from the metaphase plate. Cytogenet Cell Genet 33: 327-332.

JENDERNY J, and ROHRBORN G (1987). Chromosome analysis of human sperm. I. First results with a modified method. Hum. Genet. 76:385-388.

KAMIGUCHI Y and MIKAMO K (1986). An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. Am. J. Hum. Genet. 38:724-740.

MARTIN RH (1983). A detailed method for obtaining preparations of human sperm chromosomes. Cytogenet. Cell Genet. 35:252-256.

MARTIN RH, RADEMAKER A, (1988). The relationship between sperm chromosomal abnormalities and sperm morphology in humans. Mutation Research 207:159-164.

MARTIN RH, BALKAN W, BURNS K, RADEMAKER AW, LIN CC, RUDD NL (1983). The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa. Hum. Genet. 63:305-309.

MARTIN RH, RADEMAKER AW, HILDEBRAND K, LONG-SIMPSON L, PETERSON D, YAMAMOTO J (1987). Variation in the frequency and type of sperm chromosomal abnormalities among normal men. Hum. Genet. 77:108-114.

PELLESTOR F (1988). Recherche sur les chromosomes des gametes de l'espece humaine. Tesi doctoral. Université Scientifique i Medicale de Grenoble.

PLACHOT M, VEIGA A, MONTAGUT J, DE GROVEHY J, CALDERON G, LEPRETRE S, JUNCA AM, SANTALO J, CARLES E, MENDELBAUM J, BARRI P, DEGOY J, COHEN J, EGOZCUE J, SABATIER JC, SALAT-BROUX J (1988). Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorders in early life: a multicentric study. Hum Reprod 3:627-635.

RUDAK R, JACOBS PA, YANAGIMACHI R (1978). Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. Nature 274:911-913.

ESTUDIS CITOGÈNÈTICS EN 190 PARELLES AMB HISTÒRIA D'INFERTILITAT

TEMPLADO C, BENET J, GENESCA A, NAVARRO J, CABALLIN MR, MIRO R, EGOZCUE J (1988). Human sperm chromosomes. Hum. Reprod. 3:133-138.

YANAGIMACHI R (1984). Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. Gamete Res. 10:187-232.

YANAGIMACHI R (1988). Mammalian fertilization. In: Knobil E and Neill J et al. The Physiology of Reproduction. Raven Press. New York pp. 135-185.

YANAGIMACHI R, YANAGIMACHI H, ROGERS BJ (1976). The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol. Reprod. 15:471-476.

Cytogenetic studies have been performed in 190 couples with antecedent fetal wastage.

In 12 (6.3%) of these couples one of the partners was a carrier of a balanced chromosomal rearrangement.

The impact of further extensive familial investigation, genetic counseling and the follow-up of prenatal diagnosis are discussed.

Key words: fetal wastage, structural chromosome rearrangement, translocation, inversion, gonosomal aneuploidies.

Introducció

En 1962 Schaid demostrà que els avortaments de repetició poden ésser deguts a una anomalia cromosòmica equilibrada en un portador. Aquesta observació ha estat posteriorment confirmada per molts altres autors.

Dites anomalies equilibrades poden donar lloc a gametes desequilibrades en la meiosi amb conseqüències negatives per a la descendència: els efectes esperats i observats són: esterilitat, avortaments i nens malformats amb anomalies cromosòmiques desequilibrades.

Entre altres aspectes volem que és important arribar a un millor coneixement en aquests tres punts: a) paper que juga l'anomalia cromosòmica en el desenvolupament embrionari i en la supervivència fetal; b) mecanismes meiótics associats a les anomalies estructurals i c) consell genètic molt més afinat.

L'etiologia dels avortaments espontanis pot tenir diverses causes: anomalies uterines, desequilibris endocrins, infeccions i factors genètics. Segons Boué i Boué (1977) el 15% de tots els embarassos acaben