



Universidad de Oviedo

---

# **Influencia del FISH alterado en espermatozoides en las Técnicas de Reproducción Asistida**

---

**Master Universitario en Biología y Tecnología de la  
Reproducción**

**Autor: Patricia Bárcena Sánchez**

**Tutor: Teresa Ganzabal Areso**

**Junio 2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

---

*Me gustaría dar mi más sincero agradecimiento en primer lugar a mi tutora de prácticas y trabajo fin de master, la Doctora Teresa Ganzabal por proporcionarme los datos para que la realización de este trabajo fuese posible, así como por los consejos que me brindó durante mi estancia en su laboratorio, la entrevista que me consiguió en la Universidad del País Vasco y el trato próximo que he recibido por su parte, haciendo que me sintiese una más del equipo durante la realización de mis prácticas.*

*También quisiera agradecer a todo el equipo de Quirón, su colaboración y paciencia durante mi estancia con ellos, especialmente a Bea y a Silvia, por el tiempo invertido en mí, sus explicaciones y su amabilidad.*

*A Fernando Graña por ayudarme con la parte estadística del trabajo.*

*A Ramani por crear un hogar durante mi estancia en Bilbao.*

*A mis compañeros de master, por hacer del primer cuatrimestre un período ameno y llevadero.*

*A todos los profesores que formaron parte del master, por transmitirme sus conocimientos y conseguir que me sintiese profundamente interesada por el campo de la reproducción.*

*A mi amiga Rosana por soportar con mucha paciencia mi ausencia durante los largos períodos de “enclaustramiento” estudiando.*

*A mi novio Adrián, por su apoyo constante, por ser mi paño de lágrimas y por animarme todos los días.*

*A mi maravillosa familia, abuelas, hermano, padres, que hicieron que todo esto fuera posible, por su apoyo incondicional, por confiar en mí siempre, siempre y siempre, por darme la oportunidad más grande que se le pueda dar a una persona, la de estudiar lo que más le gusta.*

*A mis abuelos y demás familia que ya no están aquí, por el cariño y comprensión que me ofrecieron durante toda su vida.*

*A mi abuelo Ángel por ser todo un ejemplo, por ser mi fuente de inspiración y por la fuerza que me sigue dando desde ahí arriba para seguir luchando por lo que más quiero.*

*A la Biología, la más grande, por ser mi pasión y mi obsesión. Porque sin ti, no sería yo.*

## ÍNDICE

---

<b>I. Introducción.....</b>	<b>2</b>
<b>II. Hipótesis y objetivos.....</b>	<b>5</b>
<b>III. Material y métodos.....</b>	<b>7</b>
<b>III.1 Pacientes.....</b>	<b>7</b>
<b>III.2 Hibridación in-situ por fluorescencia.....</b>	<b>7</b>
<b>III.3 Interpretación de los resultados.....</b>	<b>10</b>
<b>III.4 Estadística.....</b>	<b>10</b>
<b>IV. Resultados.....</b>	<b>11</b>
<b>IV.1 Relación entre los distintos parámetros seminales         entre sí.....</b>	<b>11</b>
<b>IV.2 Análisis de los resultados de FISH.....</b>	<b>13</b>
<b>IV.3 Relación entre la alteración del FISH y         el número de parámetros seminales alterados.....</b>	<b>14</b>
<b>IV.4 Relación entre los parámetros seminales y el cromosoma 22.....</b>	<b>15</b>
<b>IV.5 Relación entre los parámetros seminales y el resultado de FISH.....</b>	<b>16</b>
<b>IV.6 Relación entre los parámetros seminales y el número de cromosomas         alterados.....</b>	<b>18</b>
<b>IV.7 Relación cambio de técnica y gestación.....</b>	<b>20</b>
<b>V. Discusión.....</b>	<b>23</b>
<b>VI. Conclusiones.....</b>	<b>27</b>
<b>VII. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>28</b>

## **I.INTRODUCCIÓN**

---

La infertilidad masculina es una causa relativamente común que afecta al 6% de los varones en edad reproductiva (Templado et al., 2013). Es sabido que las anomalías cromosómicas en los espermatozoides están estrechamente relacionadas con la infertilidad del varón (Núñez et al., 2008). El 1% de los espermatozoides en el eyaculado de un hombre normal, son aneuploides y esa cifra aumenta considerablemente cuando se trata de un varón que presenta problemas de fertilidad (Martínez et al., 2013). Por otra parte, entre el 7 y el 14% de los espermatozoides, presentan anomalías estructurales (Sun et al., 2006).

Existen diversas causas por las cuales los espermatozoides pueden presentar aneuploidías, tales como son los fallos en la segregación de los cromosomas (por fenómenos de no-disyunción, anafase lag o fallos en los puntos de control celulares que evitan que se eliminen las células “inviabiles”) y la alteración de DNA independiente de los procesos replicativos (Templado et al., 2013).

De entre todos los mecanismos, los responsables mayoritariamente de la generación de células aneuploides, son la no-disyunción de cromosomas aquiasmáticos y la prematura separación de cromátidas hermanas (Uroz et al., 2012). Esta última se debe a una mala orientación de los univalentes durante la meiosis I mientras que la “verdadera” no-disyunción consiste en la migración conjunta de las dos cromátidas hermanas al mismo polo durante la meiosis II (Kouznetsova et al., 2007). La no-disyunción mitótica en las espermatogonias también conduce a disomías sexuales (Mateizel et al., 2002).

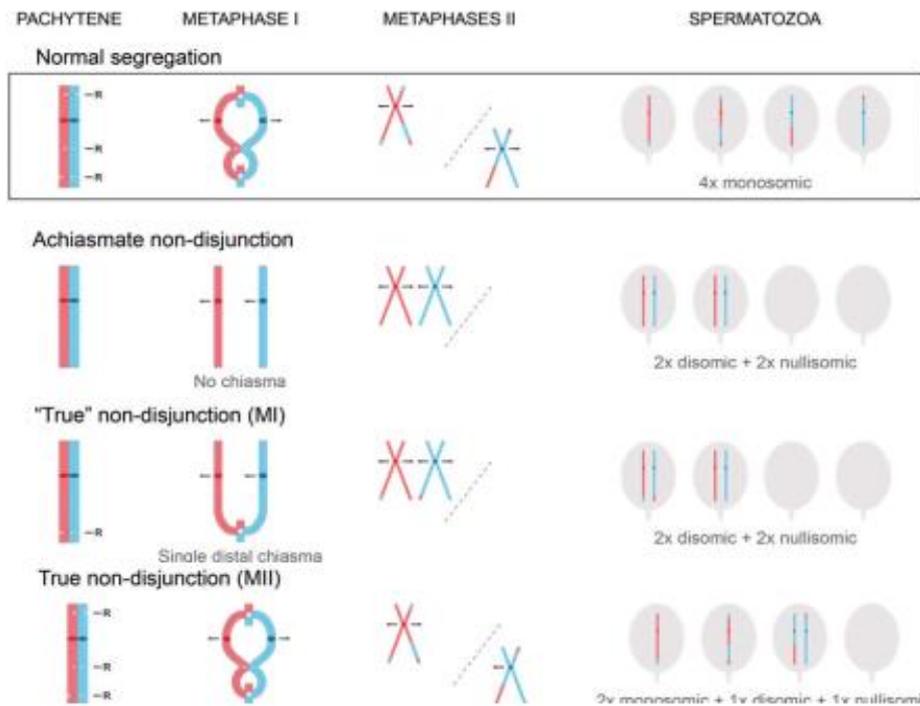


Imagen 1. Tomada de Templado, et al. Human reproduction. 2013; 19 (10): 634-643.

Se sabe que las alteraciones durante el proceso de recombinación traen como consecuencia la generación de gametos aneuploides (Sun et al., 2008)

Para poder estudiar estas anomalías cromosómicas presentes en los espermatozoides, se utiliza la técnica FISH (Hibridación *in situ* Fluorescente), técnica que se lleva utilizando desde los años 90.

Esta técnica sirve como herramienta para aconsejar y ayudar a las parejas, sobre todo en el caso de que hayan sufrido fracasos sucesivos al someterse a técnicas de reproducción asistida (Ramamamy et al., 2014). Gracias a ella podrán tomar decisiones en el ámbito de las técnicas que se utilizarán en el proceso reproductivo como pueden ser proceder a realizar DGP (Diagnóstico Genético Preimplantacional) o pasar a utilizar semen de donante (Hwang et al., 2010).

El FISH es un ensayo citogenético que estima la frecuencia de anomalías cromosómicas numéricas, es decir la frecuencia de aneuploidías (Egozcue et al., 2003). Se trata de la técnica más rápida, sofisticada, precisa y el test de mayor confianza que permite evaluar la aneuploidía en cromosomas sexuales y autosómicos, en núcleos espermáticos de varones infértiles y parejas que presenten abortos recurrentes sin explicación aparente. En clínica es una herramienta de screening que se utiliza para dar consejo a toda

aquellas parejas que presenten factor masculino, para informarles sobre las elecciones que tienen en el campo de la reproducción (Ramasamy et al., 2014)

Los beneficios de esta técnica frente a otras utilizadas anteriormente son que permite el estudio de miles de células en un periodo de tiempo relativamente corto y que para la detección de los cromosomas utiliza sondas altamente específicas (Egozcue et al., 1997)

Por otra parte, la técnica presenta limitaciones como no presentar una eficiencia de hibridación de las sondas del 100%, por lo que muchos de los resultados considerados nulisómicos, no lo son y por otra parte, solo se pueden estudiar los segmentos específicos sobre los que se hibrida la sonda (Hwang et al., 2010). Al aplicarse sobre espermatozoides que se encuentran en interfase, no se pueden detectar las anomalías estructurales. Además al ser la cabeza espermática tan pequeña, no se pueden analizar en general más de 3 cromosomas diferentes por cabeza espermática (Gianaroli et al., 2005)

En cuanto a los aspectos técnicos del FISH, se demostró que no existe diferencia entre analizar 5.000 y 10.000 espermatozoides para que los resultados sean fiables (Carrell et al., 2008) y por otra parte, no existen diferencias en la precisión de los resultados obtenidos cuando el recuento celular se realiza de forma manual o automática, agilizándose notablemente el proceso en el segundo de los casos (Perry et al., 2011; Martínez et al., 2013)

El 50% de los abortos tienen una constitución cromosómica anormal (Vicari et al., 2003) y aproximadamente el 0,2% de los nacimientos vivos son niños aneuploides, perteneciendo la mayor parte de estas aneuploidías a los cromosomas 13, 18, 21, X e Y (únicas aneuploidías compatibles con la vida) (Templado et al., 2011). Las aneuploidías gonosómicas tienen origen paterno (100% en 47 XYY, 70-80% en nulisomía X0 y 50% en 47 XXY), mientras que las aneuploidías autosómicas tienen origen materno principalmente (Sloter et al., 2000), solo entre el 5 y 10% poseen origen paterno (Vendrell et al., 2014).

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

Dado que es sobradamente conocido que aquellos varones que manifiestan anomalías en los parámetros seminales presentan dificultades para concebir, manifestándose estas como problemas de fecundación, problemas a lo largo del desarrollo embrionario, fallos de implantación, abortos de repetición y demás, en este estudio se plantean dos hipótesis. La primera de ellas plantea que debería existir una relación entre la calidad del semen valorada en función de los distintos parámetros seminales (concentración, motilidad y morfología espermáticas) y la tasa de aneuploidías presentes en los espermatozoides de estos varones, mientras que la segunda hipótesis plantea que deberían existir diferencias en el resultado de los ciclos de reproducción asistida realizados antes y después del análisis de espermatozoides por FISH, valorados estos como gestación negativa o positiva, resultando favorables aquellos realizados después del análisis y demostrando por tanto, la eficacia de la técnica como herramienta para ayudar en la toma de decisiones.

El estudio se divide en varias partes:

El objetivo de la primera parte del mismo consistirá en valorar si existe alguna relación entre los distintos parámetros seminales estudiados (concentración, motilidad y morfología) entre sí.

Para la segunda parte, el objetivo consistirá en determinar cuáles son los cromosomas que más frecuentemente aparecen alterados en los individuos a los que se les aconseja FISH y en qué proporciones lo hacen.

A continuación se estudiará si existe alguna relación entre los principales cromosomas afectados y los parámetros seminales.

Por otra parte se intentará buscar si existe una relación entre el resultado de FISH y la concentración espermática de la muestra, la motilidad y la morfología espermáticas obtenidas.

Seguidamente, se pretenderá determinar la existencia de relación entre el número de cromosomas alterados por individuo y los parámetros concentración, motilidad y morfología espermáticas.

Para concluir, la última parte del estudio estará dirigida a demostrar la utilidad de la técnica FISH valorando si existe una variación significativa entre el resultado de los ciclos realizados antes y después del diagnóstico.

### **III. MATERIAL Y METODOLOGÍAS**

---

#### **III.1 Pacientes**

Se trata de un estudio retrospectivo en el que se han incluido 79 varones con cariotipo normal (46 XY) de la Unidad de Reproducción Asistida Quirón Bilbao, a los que se les ha realizado un FISH de espermatozoides durante los años 2012 a 2015 para el estudio de aneuploidías (disomías y diploidías) para nueve cromosomas (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y) mediante el uso de sondas específicas.

Las indicaciones para la realización del FISH fueron:

a) fallos en las técnicas de reproducción asistida (n=36); b) abortos de repetición (n=22); c) baja calidad embrionaria (n=11) d) baja tasa de fecundación (n=10), e) baja tasa de implantación (más de 3 ciclos de ICSI sin gestación) y f) factor masculino severo (Oligoastenoteratozoospermia severa) definición según OMS (Organización Mundial de la Salud).

Las muestras de semen se evaluaron de acuerdo a los criterios de la OMS, considerándose oligozoospermia (<15 millones de espermatozoides por mililitro), astenozoospermia (suma de espermatozoides con movilidad progresiva A+B<32%) y teratozoospermia (morfología <4%.)

Se consideran anómalos aquellos resultados en los que se observa un incremento estadísticamente significativo en cualquiera de los parámetros estudiados (disomía y diploidía) cuando se comparan con un grupo control.

#### **III.2 Hibridación in situ por fluorescencia**

Las muestras fueron recogidas en un recipiente estéril tras masturbación, debiendo de haber mantenido los sujetos, una abstinencia de entre 2 y 3 días. Inmediatamente tras la recogida, se mantuvieron las muestras a una temperatura de 37 °C durante 30 minutos con objeto de valorar la licuefacción. Posteriormente se analizaron los distintos

parámetros seminales, destacando entre ellos la concentración, la motilidad y la morfología, siguiendo los actuales criterios de la OMS (concentración 15 millones/ml; motilidad 32% morfología 4% de acuerdo a los criterios de Kruger de 1988). Esta valoración se realizó de forma manual, contando un mínimo de 200 espermatozoides por paciente, empleando un microscopio Nikon (Nikon Company, Tokio, Japón) y utilizando un objetivo de 100X con aceite de inmersión.

Para enviar las muestras de semen al laboratorio donde se les realizó la técnica FISH (Sistemas genómicos<sup>®</sup>, Valencia, España), se les debió de realizar un gradiente de densidad previamente a cada una de ellas. El gradiente estuvo constituido por dos fases, una de 45% y otra de 90 % que se prepararon utilizando el medio (Puresperm<sup>®</sup> 100, Nidacon International, Suecia) diluido en medio IVF<sup>TM</sup>, (Vitrolife, Kungsbacka, Suecia). Se colocó la muestra seminal en la parte superior, haciéndola descender lentamente por la pared del tubo de ensayo para evitar que se rompiera el gradiente y se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos, en una centrífuga de rotor basculante (Selecta<sup>®</sup> modelo centronic-bl II). El pellet, es decir, el REM (recuperación de espermatozoides móviles) fue resuspendido en 2 ml de medio de cultivo IVF<sup>TM</sup> y se centrifugó de nuevo a 1700 rpm durante 5 minutos. Una vez concluida la fase de centrifugación, se retiró el sobrenadante y se dejó un volumen de 0.5 ml que se entregó al laboratorio de análisis genéticos. En ese volumen debe de haber una concentración de espermatozoides de al menos 500.000 espermatozoides por mililitro para que se pueda realizar la técnica, lo cual se verificó cargando la cámara Makler (Selfi Medical Instruments, Israel) con 10 microlitros y realizando el conteo.

Una vez llegadas las muestras al laboratorio de análisis genéticos, se les realizó la fijación y descondensación espermática, seguida de la hibridación con sondas de ADN, lectura y estadística de las mismas.

Las muestras de semen fueron lavadas en una mezcla de tampón fosfato (PBS; Gibco; Life Technologies, Madrid, España) con un 0.1% de polivinil alcohol (PVA; Sigma-Aldrich, Madrid, España), se fijaron en solución Carnoy (metanol/ ácido acético, 3:1; Merck, Madrid, España) y se secaron al aire libre. Para la permeabilización de la membrana espermática y la descondensación nuclear, se lavaron las muestras fijadas en 2x SSC (citrato de sodio estándar) (Gibco) durante 3 minutos, se deshidrataron pasándolas por unas soluciones de etanol al 70%, 90% y 100% de forma progresiva permaneciendo 1 minuto en cada una de ellas, se secaron al aire y se incubaron en una

solución 5mmolar de ditiotreitól con 0.1% de Triton X-100 (Sigma- Aldrich) durante 15 minutos a 37 °C. Se lavaron los portas dos veces en SSC, se deshidrataron durante 1 minuto y se dejaron secar al aire.

Para la hibridación in situ fluorescente se utilizaron sondas alfa satélite para el estudio de los centrómeros de los cromosomas 16q11.2 y 18p11.1-q11.1 marcada con fluorocromo Aqua, Xp11.1-q11.1 y 17p11.1-q11.1 con fluorocromo Green e

Yp11.1-q11.1 y 15p11.1-q11.1 con fluorocromo Orange; y sondas de secuencia única para la identificación de los loci 13q14 y 22q11 con fluorocromo Green y 21q22.13-q22.2 con fluorocromo Orange.

Se descondensó el DNA espermático sometiénolo a una temperatura de 75°C durante 4 minutos e hibridándolo a 37 °C durante 4 horas. Posteriormente se realizaron unos lavados post-hibridación para retirar las sondas de DNA no hibridadas.

El análisis de fluorescencia se realizó utilizando el microscopio de fluorescencia modelo 72 (Zeiss, Alemania) conectado a los filtros del sistema Metafer-MetaCyte® de MetaSystems® (Metasystems International, Alemania).

Las células que mostraron dotaciones genéticas anormales fueron reanalizadas manualmente por un técnico experto que aplicó los criterios de clasificación que se citan a continuación: la eficiencia de hibridación de las sondas debe de ser superior al 95%, los núcleos deben de estar intactos, deben de ser de tamaños similares, claramente localizados y no encontrarse solapados; las señales deben de mostrar una intensidad similar y no mostrarse fragmentadas. Se consideraron disómicas aquellas células que mostraron dos señales claras y definidas para un cromosoma y diploides las que presentaban una doble señal para todos los cromosomas estudiados.

El análisis estadístico de los resultados se realizó comparando los valores de las muestras, con los valores promedio de aneuploidías de una población control (donantes de semen con fertilidad probada, cariotipo, espermiograma y serología normales según los criterios de la OMS), utilizando el test no paramétrico de interferencia estadística Wilcoxon Rank Sum con un nivel de confianza del 99,9%.

Para cada paciente se determinó la incidencia de disomías y diploidías de los cromosomas 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y, así como la proporción de cromosomas sexuales en espermatozoides haploides.

### **III.3 Interpretación de los resultados**

Un espermatozoide haploide contiene 23 cromosomas. En este caso se utilizaron sondas centroméricas para los cromosomas 15, 16, 17, 18, X e Y, y sondas región específicas de secuencia única para los cromosomas 13, 21 y 22. Se consideraron normales aquellos espermatozoides que mostraron una señal única para cada uno de los cromosomas analizados. Las sondas que detectan loci específicos no proporcionan información acerca de todo el cromosoma.

### **III.4 Estadística**

Para el análisis estadístico de los datos, se utilizó el programa informático SPSS para Windows, versión 20.0 (IBM, España). Se utilizó el test  $\chi^2$  para buscar relación entre los distintos parámetros seminales y para compararlos con los resultados del análisis por FISH, asumiendo un nivel de confianza del 95%, así como para comparar la proporción de gestación positiva o negativa tras haber realizado la técnica FISH. Se utilizó el test U de Mann-Whitney de comparación de medias independientes, para buscar relación entre el número de cromosomas afectados y los parámetros seminales concentración, motilidad y morfología espermáticas, para comparar los parámetros seminales con los valores de aneuploidía presentados para el cromosoma 22 y para comparar el número total de cromosomas afectados, con los parámetros seminales.

Para las gráficas y tablas se utilizó el programa Excel (Office 2013, Microsoft)

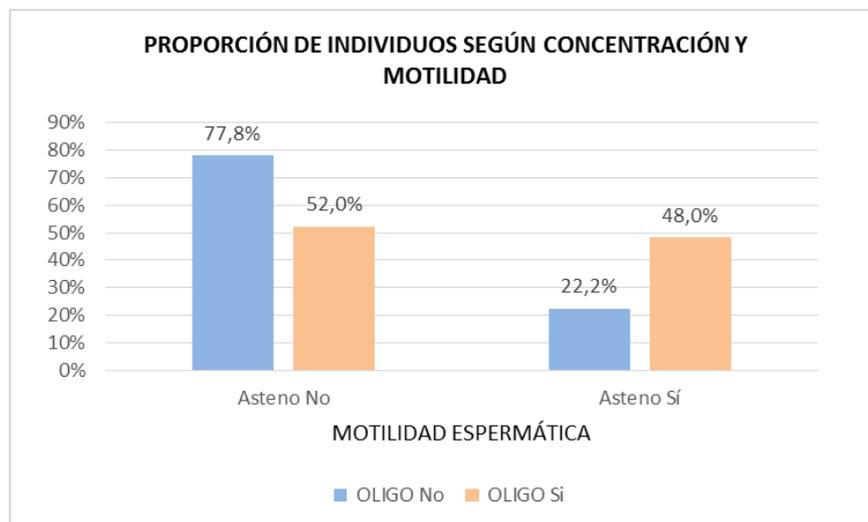
## IV. RESULTADOS:

### IV.1 Relación entre los distintos parámetros seminales entre sí

Los resultados correspondientes a la primera parte del estudio donde se pretende valorar si existe relación entre la presencia de uno o varios parámetros seminales alterados entre sí, se muestran a continuación.

Se utilizó el test  $\chi^2$  para llevar a cabo las valoraciones.

En la imagen 1 se muestra la relación entre concentración espermática y motilidad, valoradas sobre los 79 individuos de estudio.

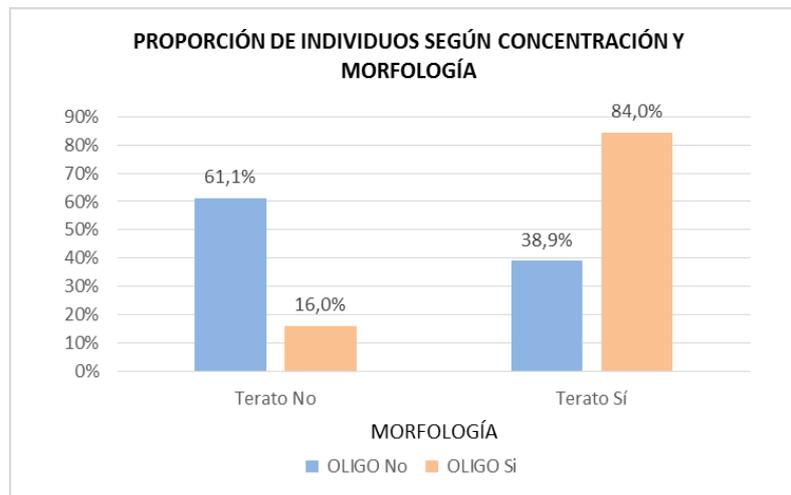


(Imagen 1. Proporción de individuos que muestran oligozoospermia, astenozoospermia, ambas simultáneamente y ninguna de ellas)

De entre los individuos que mostraron su concentración alterada (oligozoospermia) (n=25) el 48% también presentó problemas en la motilidad (astenozoospermia), mientras que el 52% no los mostró.

Con respecto a los sujetos que presentaron una concentración espermática normal (n=54), el 77,8% también manifestaron normalidad en su motilidad, mientras que el 22,2% presentaron una motilidad disminuida (astenozoospermia) obteniendo un resultado estadísticamente significativo para la interacción entre estas dos variables ( $p=0,034 < 0,05$ )

Los resultados obtenidos cuando se valoró la concentración y la morfología espermáticas se representan en la imagen 2.

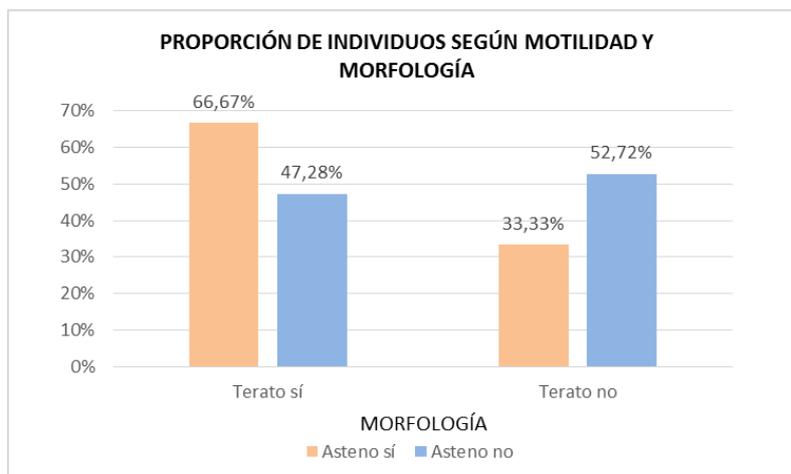


(Imagen 2: proporción de individuos que muestran oligozoospermia, teratozoospermia, ambas a la vez y ninguna de ellas)

Del total de individuos con oligozoospermia (n=25), el 84% también manifestaron alteración en la morfología espermática (teratozoospermia).

Por otra parte, del total de individuos que mostraron una concentración espermática normal (n=54), el 61,1% también mostraron una morfología normal, obteniéndose un resultado estadísticamente significativo para la interacción entre variables ( $p = 0 < 0,05$ )

Los resultados obtenidos cuando se valoró la relación entre la motilidad y la morfología espermáticas se muestran en la imagen 3.



(Imagen 3: proporción de individuos que mostraron teratozoospermia, astenozoospermia, ambas a la vez y ninguno)

Entre los individuos que mostraron alterada su motilidad (astenozoospermia) (n=24), el 66,67% también presentó alterada la morfología (teratozoospermia), mientras que el 33,33% restante manifestó una morfología normal.

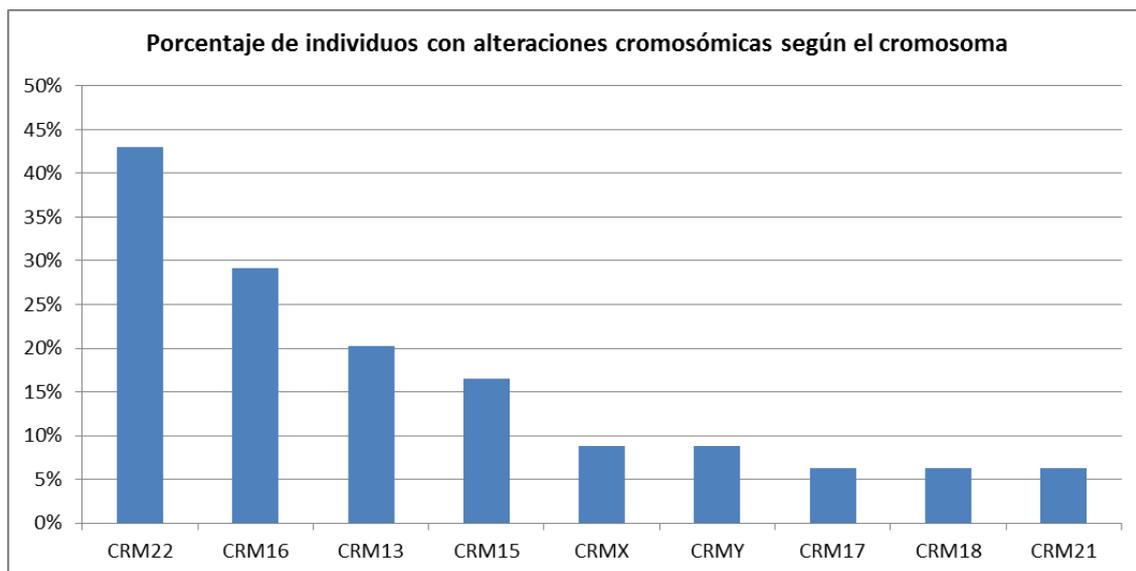
Entre los sujetos que presentaron una motilidad normal (n=55), el 47,28% mostró alterada la morfología, mientras que el 52,72% restante, no presentó alterado ninguno de los dos parámetros, no encontrándose significación estadística entre las dos variables de estudio ( $p=0,144 >0,05$ )

#### **IV.2 Análisis de los resultados de FISH**

Los resultados correspondientes a la segunda parte del estudio se muestran a continuación:

De los 79 sujetos analizados, 66 presentaron una tasa de aneuploidía superior a la media poblacional normal, para alguno de los 9 cromosomas analizados.

En la imagen 4 se muestra la proporción de individuos afectados para cada tipo de cromosoma sobre el total de individuos.



(Imagen 4)

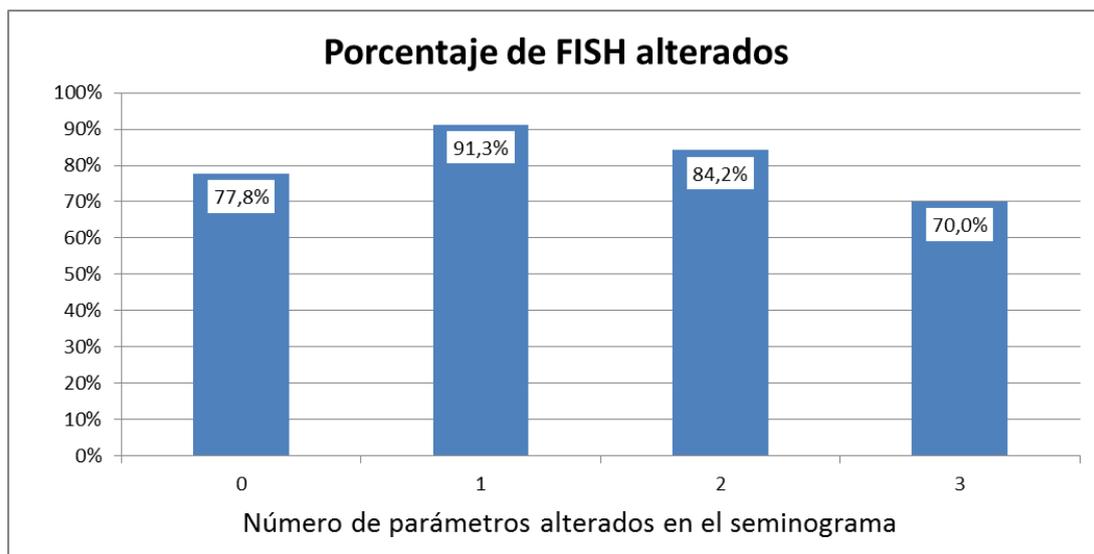
El cromosoma que aparece alterado en mayor proporción es el 22, mostrándose alterado en el 43,4% de los casos (aparece alterado en 34 de los 79 varones), seguido de: cromosoma 16 (29,11%), cromosoma 13 (20,25%), cromosoma 15 (16,46%), cromosomas sexuales X e Y (8,86% de representación cada uno) y los cromosomas 17, 18 y 21 representando cada uno de ellos un 6,33% sobre el total de individuos estudiados.

A continuación en la tabla 1, se representa el número de individuos afectados para cada cromosoma, los valores máximos y mínimos de porcentaje de aneuploidías obtenidos para cada cromosoma, así como la media de cada uno y la desviación típica.

Estadísticos descriptivos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
CRM13	16	2,4	7,3	4,731	1,4032
CRM15	13	1,1	7,2	3,408	1,9103
CRM16	23	3,0	18,4	6,713	3,6406
CRM17	5	1,5	5,0	2,760	1,6288
CRM18	5	1,4	4,6	2,920	1,3461
CRM21	5	,6	4,8	2,580	1,8254
CRM22	34	1,0	28,0	6,685	5,8586
CRMX	7	,8	4,4	2,300	1,2728
CRMY	7	,8	4,4	2,300	1,2728
DIPLOIDIA13.21	10	1,9	8,2	3,550	1,9484
DIPLOIDIA15.17	10	,1	5,2	2,010	1,4746
DIPLOIDIA16.22	7	1,3	3,6	2,400	,7234
DIPLOIDIA18.X.Y	8	,1	4,4	2,763	1,2432
N válido (según lista)	0				

(Tabla 1)

**IV.3 Relación entre la alteración del FISH y el número de parámetros seminales afectados:**



(Imagen 5)

En la imagen 5 se observan los porcentajes de alteración de FISH en los individuos, según el número de parámetros seminales que presenten alterados.

Los individuos que presentan valores dentro de la normalidad para los tres parámetros de estudio, muestran un 77,8% de alteración en el FISH; los individuos que presentan uno de los parámetros alterados muestran un 91,3% de alteración en el FISH; aquellos individuos que presentan dos parámetros seminales alterados, muestran un FISH anómalo en el 84,2% de los casos y los pacientes oligoastenoteratozoospermicos manifiestan un 70% de alteración en el FISH.

**IV.4 Relación entre los parámetros seminales y el cromosoma 22**

Para determinar si existe relación entre los distintos parámetros seminales y el nivel de alteración del cromosoma 22, se utilizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney, aceptándose un nivel de confianza del 95%.

Los resultados se muestran a continuación:

OLIGOZOOSPERMIA		N	Rango promedio
CROMOSOMA 22	NO	54	42,87
	SÍ	25	33,80
	Total	79	

(Tabla 2)

La tabla 2 recoge el número de individuos oligozoospermicos que no presentaron afectado el cromosoma 22 y el número de individuos oligozoospermicos que lo mostraron alterado. También se recogen los valores de rango promedio entre los dos grupos. Se obtuvo una  $p= 0,07 > 0,05$ , con lo que el resultado es no significativo.

ASTENOZOOSPERMIA		N	Rango promedio
CROMOSOMA 22	NO	55	39,44
	SÍ	24	41,29
	Total	79	

(Tabla 3)

En la tabla 3 se recogen los datos correspondientes al número de varones astenozoospermicos que presentaron alterado el cromosoma 22, así como el número de astenozoospermicos que presentaron un valor de aneuploidía para el cromosoma 22, dentro del valor considerado normal para la población general. También se muestran los

valores de rango promedio para ambos grupos. Se encontró una  $p=0,714 > 0,05$ , con lo que su valor no es estadísticamente significativo.

TERATOZOOSPERMIA		N	Rango promedio
CROMOSOMA 22	NO	37	43,22
	SÍ	42	37,17
	Total	79	

(Tabla 4)

En la tabla 4 se representa el número de individuos teratozoospermicos que presentaron alteración en el cromosoma 22, así como los individuos teratozoospermicos que obtuvieron un valor normal. También se muestra el rango promedio para ambos grupos.

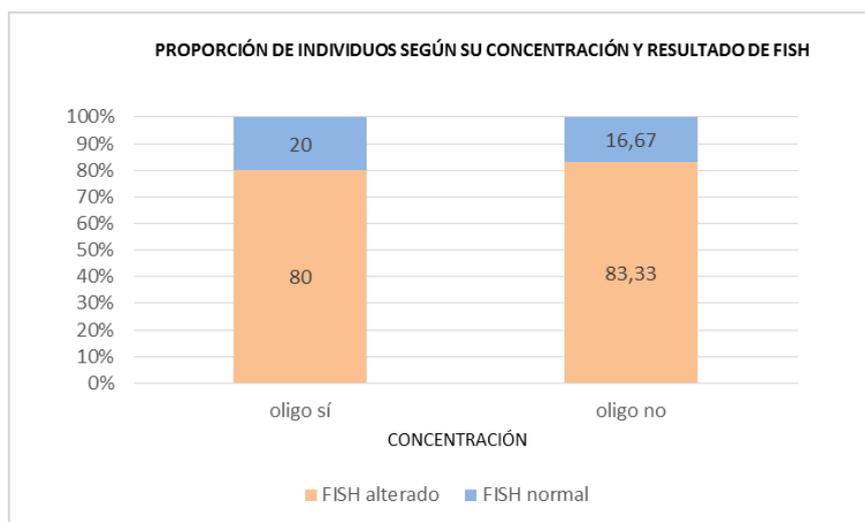
Se obtuvo una  $p= 0,195 > 0,05$ , por lo que no existe significación estadística entre ambos parámetros.

#### IV.5 Relación entre los parámetros seminales y el resultado de FISH

Los resultados correspondientes a la tercera parte del estudio donde se busca relacionar el resultado de FISH con los parámetros seminales concentración, motilidad y morfología, se describen a continuación.

Para el análisis estadístico se utilizó el test  $\chi^2$ , asumiendo un nivel de confianza del 95%.

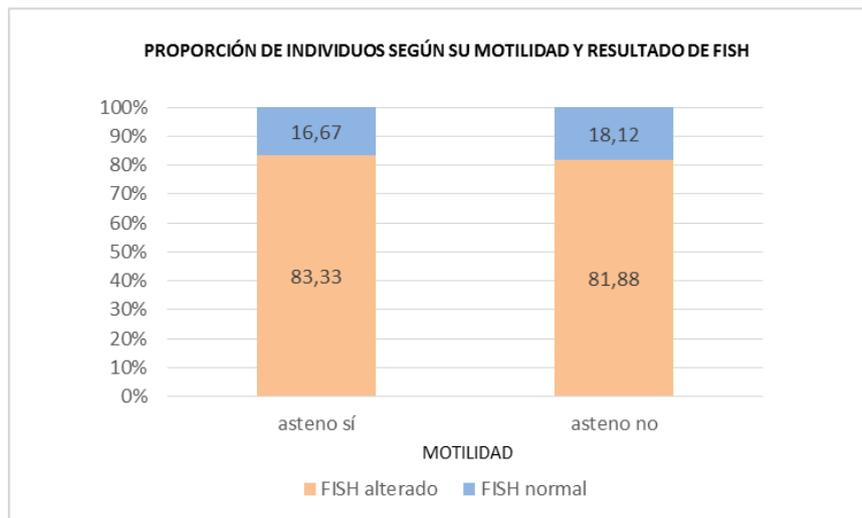
En la imagen 6 se muestra la relación entre el resultado de FISH y la concentración seminal.



(Imagen 6)

Entre los pacientes oligozoospermicos (n=25), el 80% mostró un resultado de FISH alterado mientras que el 20% obtuvo un resultado normal. Entre los pacientes que presentaron una concentración espermática normal (n=54), el 83,33% obtuvo un resultado de FISH alterado, mientras que el 16,67% restante obtuvo un valor normal. No se obtuvo significación estadística entre ambas variables ( $p= 0,757 > 0,05$ )

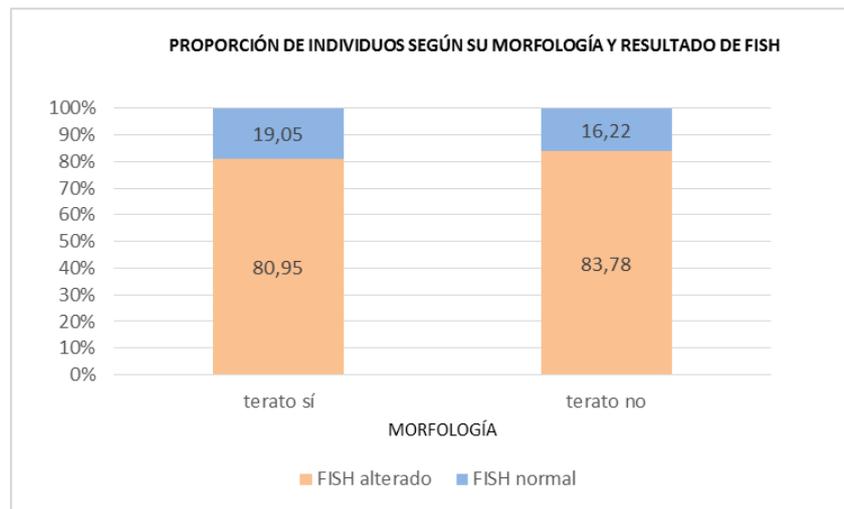
En la imagen 7 se muestra la relación entre el resultado de FISH y la motilidad seminal.



(Imagen 7)

Entre los pacientes que presentaron astenozoospermia(n=24), el 83,33% demostró tener un resultado de FISH alterado, mientras que el 16,67% obtuvo un resultado de FISH normal, por otra parte, el 81,8% de los varones cuyo seminograma mostró una motilidad normal (n=55), mostraron un resultado de FISH alterado, mientras que el 18,12% mostró un resultado de FISH normal. No se obtuvo significación estadística entre ambas variables ( $p=1>0,05$ ).

En la imagen 8 se muestra la proporción de individuos sobre los que se relaciona el resultado de FISH con la morfología espermática.



(Imagen 8)

Entre los individuos teratozoospermicos (n=42), el 80,95% presentó un resultado de FISH alterado, mientras que el 19,05% mostró un resultado normal. Por otra parte entre los individuos que presentaron una morfología normal (n=37), el 83,78% obtuvieron un resultado de FISH alterado, mientras que el 16,22% restante, tuvo un resultado de FISH negativo. No se obtuvo significación estadística entre ambas variables ( $p= 0,777 > 0,05$ )

#### IV.6 Relación entre los parámetros seminales y el número de cromosomas alterados

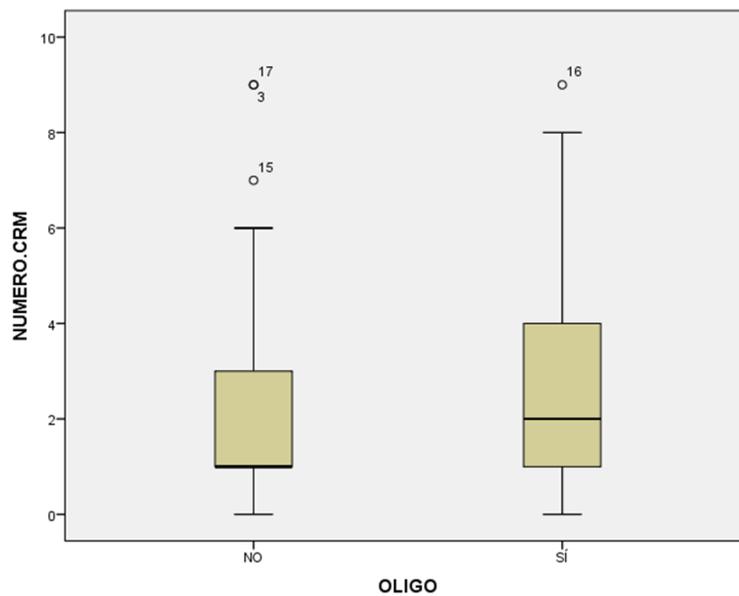
Para determinar si existe relación entre el número de cromosomas alterados para cada individuo y cada uno de los tres parámetros seminales valorados como concentración, motilidad y morfología por separado, se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov para valorar la normalidad de cada una de las muestras, observándose una  $p < 0,05$  en los tres grupos, lo que indica que no siguen una distribución normal. Posteriormente se aplicó el test no paramétrico U de Mann-Whitney, considerando significativa una  $p < 0,05$  para valorar la posible interferencia.

OLIGOZOOSPERMIA		N	Rango promedio
NUMERO CROMOSOMAS	NO	54	38,22
	SÍ	25	43,84
	Total	79	

(Tabla 5)

En la tabla 5 se representa el número de individuos oligozoospermicos que no presentan ningún cromosoma alterado, respecto al número de individuos oligozoospermicos que sí

lo manifiestan, así como el rango promedio obtenido para cada uno de ellos. No se encontró significación estadística ( $p = 0,292 > 0,05$ )



(Imagen 9)

En la imagen 9 se muestra un diagrama de caja en el que se representa qué distribución presentan los dos grupos de individuos (oligozoospermicos y no oligozoospermicos) con respecto al número de cromosomas alterados. Se observa que la mediana en el grupo de los oligozoospermicos es de 2 cromosomas alterados, mientras que en el grupo de no oligozoospermicos es de 1. Ambas muestras presentan una asimetría positiva observándose en el grupo de los oligozoospermicos, la existencia de una mayor proporción de individuos con cromosomas alterados en sus espermatozoides.

Con respecto a la relación entre el número de cromosomas afectados y la motilidad, se muestran los resultados en la tabla 6.

ASTENOZOOSPERMIA		N	Rango promedio
NUMERO CROMOSOMAS	NO	55	40,26
	Sí	24	39,40
	Total	79	

(Tabla 6)

Se muestra el número de individuos astenozoospermicos que no presenta ningún cromosoma afectado, respecto al número de astenozoospermicos que presenta cromosomas afectados, así como el rango promedio para cada uno de los grupos.

No se encontró significación estadística ( $p=0,872 > 0,05$ )

Los resultados obtenidos al estudiar la relación entre el número de cromosomas afectados y la morfología, quedan resumidos en la tabla 7, donde se muestra el número de individuos con teratozoospermia que no presentan ningún cromosoma alterado, respecto al grupo de individuos con teratozoospermia, que presentan afectación en sus cromosomas. También se muestra el rango promedio para cada uno de los dos grupos.

No se encontró significación estadística ( $p=0,736 > 0,05$ )

TERATOZOOSPERMIA		N	Rango promedio
NUMERO CROMOSOMAS	NO	37	39,11
	SÍ	42	40,79
	Total	79	

(Tabla 7)

A continuación, la tabla 8 representa una matriz de afinidad entre cromosomas alterados y parámetros seminales:

	CRM13	CRM15	CRM16	CRM17	CRM18	CRM21	CRM22	CRMX	CRMY	Diploidias	Promedio
Oligo	2,18	1,86	2,46	0,73	0,84	0,74	2,10	0,70	0,70	1,50	1,38
Asteno	1,08	1,91	2,67	0,50	0,82	0,62	4,01	1,04	1,04	1,22	1,49
Terato	1,36	1,85	2,21	0,60	0,79	0,58	2,74	0,85	0,85	1,37	1,32

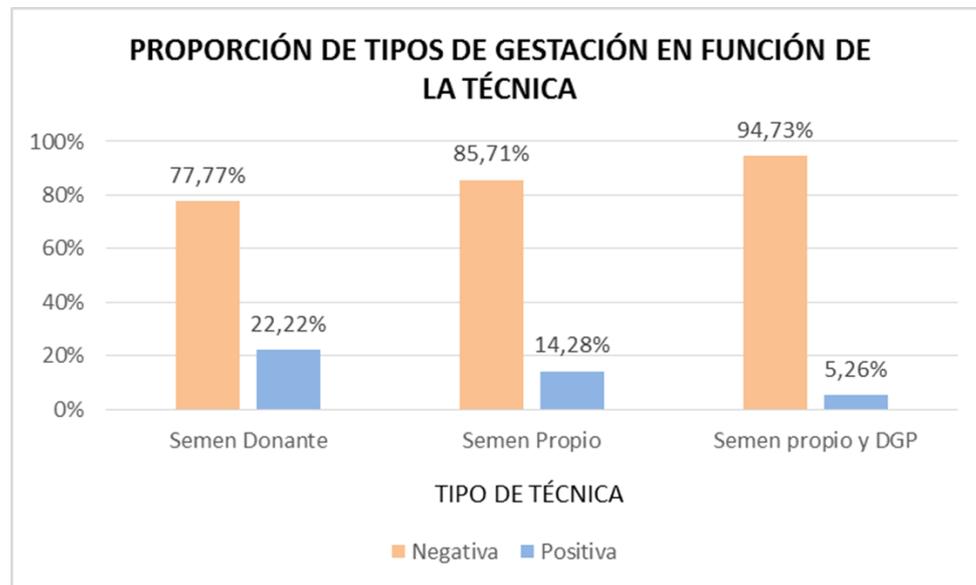
(Tabla8)

En esta matriz se visualizan los valores más bajos en color verde, los intermedios en amarillo y lo más elevados en color rojo. Los colores entre las columnas son similares excepto entre los cromosomas 22, X e Y, donde se observan diferencias notables.

#### **IV.7 Relación cambio de técnica y gestación**

Se valoró si existe algún tipo de relación entre el cambio de técnica que se utilizó para realizar los ciclos tras la valoración de los espermatozoides por FISH (utilización de semen propio, utilización de semen propio junto con realización de DGP y utilización de semen de donante) y los resultados de cada uno de ellos, valorados como gestación positiva o gestación negativa, sobre 59 pacientes. Para realizar el estudio estadístico, se utilizó el test  $\chi^2$  de contingencia, aceptando un nivel de confianza del 95%.

Los resultados se muestran a continuación:



(Imagen 10)

La imagen 10 muestra la proporción de los resultados de gestación (positiva o negativa) para cada uno de los tres grupos (parejas que pasaron a utilizar semen de donante, parejas que continuaron utilizando el semen conyugal y parejas que decidieron utilizar el semen conyugal para posteriormente realizar DGP sobre los embriones de día 3).

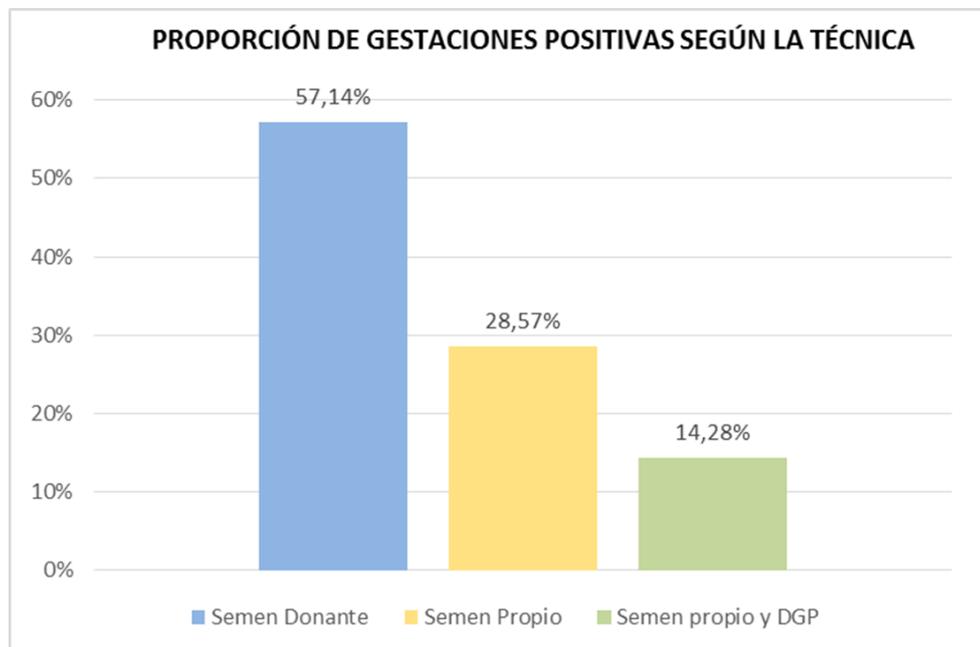
Entre las parejas que utilizaron semen de donante (n=18), se observó un 77,77% de gestación negativa, mientras que el 22,22% de las gestaciones fueron positivas (embarazo evolutivo).

Con respecto a las parejas que decidieron seguir utilizando semen conyugal (n=14), el 14,28% de ellas obtuvieron un resultado positivo, mientras que el 85,71% restante obtuvieron un resultado negativo.

Finalmente, entre las parejas que utilizaron semen conyugal para posteriormente hacer DGP al embrión (n=19), el 5,26% obtuvo gestación, mientras que el 94,73% obtuvo un resultado negativo.

Tras el análisis de  $\chi^2$ , se obtuvo una  $p= 0,325 > 0,05$ , por lo tanto, no se obtuvo significación estadística.

Cuando se analizó la proporción de gestación positiva en función de si se cambiaba el origen del gameto o si se hacía DGP, se encontró esto:



(Imagen 11)

En la imagen 11 se muestra qué proporción de éxito, entendido como gestación positiva, se corresponde para cada uno de los tres grupos de pacientes.

Se observa cómo aquellas parejas que pasan a utilizar semen de donante representan un 57,14% del total de gestaciones positivas, mientras que los que continúan utilizando semen conyugal sin aplicar otra técnica representan el 28,57%. Finalmente el grupo que utiliza semen propio junto con el análisis de embriones por DGP, representa un 14,28% del éxito total.

## **V. DISCUSIÓN**

---

El FISH para el estudio de espermatozoides es una técnica que se lleva utilizando durante casi dos décadas, especialmente en el caso de aquellas parejas que presentan problemas durante sus ciclos de reproducción asistida. Antes de realizar la técnica, se estudia la calidad seminal del varón valorada en función de distintos parámetros, entre los que destacan el análisis de la concentración, motilidad y morfología espermáticas, siendo estos los principales parámetros que se estudian para valorar la infertilidad (Martínez et al., 2000). La primera parte de este estudio consistió en valorar si existe relación entre estos parámetros seminales entre sí. Tras realizar los estudios estadísticos, se puede concluir que existe relación entre la concentración y la motilidad espermáticas, así como que existe relación entre la concentración y la morfología espermáticas, mientras que se puede determinar que no existe ninguna relación entre la motilidad espermática y la morfología (Rubio et al., 2001).

En cuanto a la segunda parte del estudio, se han escrito numerosas publicaciones sobre la utilización del FISH para el análisis de las aneuploidías espermáticas, aunque a día de hoy no todos los cromosomas han sido estudiados (Vegetti et al., 2000)

Dado que al analizar el porcentaje de alteración de FISH entre el total de individuos (categorizados como individuos con uno, dos, tres o ningún parámetro seminal alterado), se observó que aquellos que presentan los tres parámetros seminales dentro de la normalidad, manifiestan un porcentaje de alteración de FISH mayor que aquellos que presentan los tres parámetros alterados, no se consideró el uso de un control para realizar la estadística del estudio.

En cuanto a la proporción de cromosomas afectados, se sabe que aproximadamente el 1% de los espermatozoides encontrados en el eyaculado de un hombre normal son aneuploides y que esta tasa aumenta considerablemente cuando nos referimos a hombres subfértiles o estériles (Martínez et al., 2013), como los de la muestra de estudio, en la que encontramos una afectación del cromosoma 22 muy notable y mayoritaria, hecho que concuerda con múltiples estudios realizados previamente

(Egozcue et al., 2003). Se cree que este cromosoma es más susceptible de sufrir fenómenos de no-disyunción ya que presenta una reducida tasa de recombinación (Egozcue et al., 1997), mostrando una frecuencia de aneuploidía que supera en 2 o 3 veces la de los autosomas, que representan el 0,13% del total de aneuploidías en la población general (Egozcue et al., 2003) siendo por tanto, uno de los cromosomas más implicados en las disomías (Templado et al., 2013).

Las aneuploidías en los cromosomas sexuales X e Y son las más frecuentes junto con las del cromosoma 21. La tasa de aneuploidías gonosómicas representa el 0,37% en la población general (Egozcue et al., 2003). Se deben a la presencia de univalentes en metafase I. Además, estos cromosomas presentan regiones de apareamiento muy pequeñas, estableciéndose tan solo un quiasma terminal en profase I (Templado et al., 2013).

En lo que respecta a los cromosomas 18 y 21, es sabido que presentan tasas de aneuploidías particularmente elevadas, representando un porcentaje importante de anomalías numéricas en muchos de los estudios realizados a día de hoy (Collodel et al., 2007; Sun et al., 2008; Sánchez-Castro et al., 2009), a diferencia de los hallazgos de este estudio, donde tan solo representan un 6,33% del total de aneuploidías detectadas.

Dado que el cromosoma que más afectación mostró fue el 22, representando un 43,4% sobre el total de pacientes estudiados, se intentó demostrar la existencia de relación entre la alteración del mismo y la presencia de una concentración, motilidad y morfología espermáticas anómalas por separado, obteniendo un resultado estadísticamente no significativo, por lo que se concluye que no están relacionados, aunque en el caso de la concentración espermática, la falta de significación se debe a la poca potencia del estudio.

Existen muchos resultados publicados sobre individuos infértiles que han demostrado que los hombres con los parámetros alterados muestran una incidencia incrementada de aneuploidía comparados con la población normal (Martin et al., 2003; Sánchez-Castro et al., 2009), por lo que en este estudio se intentó demostrar la relación entre la presencia de los parámetros seminales concentración, motilidad y morfología espermáticas alteradas, con el resultado anómalo de FISH de los pacientes.

En cuanto a la relación entre concentración espermática disminuida (oligozoospermia) y la elevada tasa de aneuploidías, existen numerosos estudios que confirman la existencia

de una sólida relación entre estos dos rasgos (Pang et al., 1999; Vegetti et al., 2000; Calogero et al., 2001; Celik-Ozenci et al., 2004; Schmid et al., 2004; Perry et al., 2011; McAuliffe et al., 2012; Templado et al., 2013; Vendrell et al., 2014).

Los resultados de este estudio determinaron que no existe ningún tipo de relación entre ambos parámetros, al igual que lo determinaron otros estudios (Collodel et al., 2007; Nicopoullos et al., 2008, Ramasamy et al., 2015).

En lo que respecta a la relación entre la motilidad espermática alterada (astenozoospermia) y la presencia de un resultado anómalo de FISH, existen varios estudios que confirman la relación entre ambos parámetros (Pang et al., 1999; Collodel et al., 2007; Hwang et al., 2010; Mc Auliffe et al., 2012), mientras que otros estudios concuerdan con los resultados obtenidos en este, donde no se encuentra significación estadística entre el parámetro seminal motilidad y el resultado alterado de FISH (Vegetti et al., 2000; Perry et al., 2011; Templado et al., 2013; Vendrell et al., 2014; Ramasamy et al., 2015).

Con respecto a la relación entre morfología espermática alterada (teratozoospermia) y el resultado de FISH anómalo, en este estudio no se ha encontrado una relación entre ambos parámetros, lo que se encuentra en concordancia con otros múltiples estudios (Morel et al., 2004; Perry et al., 2011; Templado et al., 2013; Vendrell et al., 2014).

Sin embargo, existen publicaciones en que se afirma la existencia de relación entre ambos parámetros, ya sea valorando la morfología espermática en general o buscando relación específica entre determinadas morfologías espermáticas y el resultado alterado de FISH (Pang et al., 1999; Vegetti et al., 2000; Viville et al., 2000; Calogero et al., 2001; Templado et al., 2002; Vicari et al., 2003; Sun et al., 2006; Collodel et al., 2007; McAuliffe et al., 2010; Ramasamy et al., 2015).

Cuando se hacen los análisis estadísticos para determinar la posible relación entre el número de cromosomas afectados por cada individuo y los parámetros seminales concentración, motilidad y morfología, no se encuentra significación estadística en ninguno de los tres casos, concluyendo por tanto, que no existe relación entre ellos, aunque es necesario comentar que en el caso de la concentración, la falta de significación podría deberse a que el estudio no posea la suficiente potencia ya que se obtiene un valor muy próximo a la significación estadística.

Con respecto a la matriz de afinidades elaborada para valorar la posible relación entre los distintos cromosomas alterados y los parámetros seminales, se observa cómo parece no existir ninguna diferencia entre ellos, a excepción del parámetro astenozoospermia con los cromosomas 22, X e Y, donde parece manifestarse una influencia.

Finalmente, en la última parte del estudio, se pretendió valorar la utilidad de la técnica no solo como herramienta diagnóstica para el varón, sino como medio para ayudar a la pareja en la toma de decisiones importantes en lo que concierne a la reproducción, como pueden ser pasar a utilizar semen de donante, adopción, o en aquellos casos en que persistan en la utilización del semen del varón y que este posea un índice alto de aneuploidía, se podrá recurrir al DGP para seleccionar el embrión que posea una constitución cromosómica adecuada, de forma que indirectamente, el FISH contribuirá a elevar las tasas de embarazo (Ramasamy et al.,2014).

Cuando se analizó la relación entre el resultado de los ciclos realizados antes y después de aplicar la técnica, no se observaron diferencias significativas, quizá debido a que no haya un número excesivo de datos (el estudio estadístico nos aporta un resultado orientativo, ya que no se cumplieron todos los criterios para aceptar el resultado de forma sólida), pero sí se observa que la mayor proporción de resultados positivos se corresponden con aquellas parejas que tomaron la decisión de cambiar el origen del semen, pasando a utilizar gametos de un donante, lo que indica que el resultado negativo de los ciclos realizados antes del FISH, eran debidas al gameto masculino.

## **VI. CONCLUSIONES**

---

En lo que respecta a la relación entre los distintos parámetros seminales entre sí, en este estudio se ha encontrado relación entre la concentración y la motilidad espermáticas, así como entre la concentración y la morfología.

Por otra parte, en este estudio no se ha encontrado relación entre los parámetros seminales y la alteración o no del FISH. Esto no quiere decir, que dicha relación no exista, pero apunta a que en caso de existir, no debe de ser muy intensa. Debe de tenerse en cuenta que si una relación entre variables no es muy intensa, puede quedar enmascarada por el efecto del azar, dependiendo del tipo de estudio.

En lo que concierne a la parte final del estudio donde se pretende buscar una relación entre el resultado de los ciclos antes y después de la realización del FISH, tampoco se ha encontrado una relación significativa, lo cual no indica necesariamente que no la haya, sino que podría deberse con gran probabilidad a una falta de potencia del mismo.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Romeo R, Rappazzo G. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum Reprod.* 2001; 16 (6): 1172-1179.

Carrell, DT. The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises, *J Androl.* 2008; 29 (2):124-133.

Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P et al. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. 2004; 19 (9): 2052-2059.

Collodel G, Capitani S, Baccetti B, Pammolli A, Moretti E. Sperm aneuploidies and low progressive motility. 2007; 22 (7): 1893-1898.

Egozcue J, Blanco J, Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod.* 1997; 3(5):441-452.

Egozcue J, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Sarrate Z, Vidal F. Genetic Analysis of Sperm and Implications of Severe Male Infertility. *Plac.* 2003; 24 (4):62-65.

Gianaroli L, Magli MC, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, Menchini GF, et al. Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum.Reprod.* 2005; 20 (8):2140-2152.

Hwang K, Weedin JW, Lamb DJ. The use of fluorescent in situ hybridization in male infertility. *Adv Urol.* 2010; 2 (4): 157-169.

Kouznetsova A, Lister L, Nordenskjold M, Herbert M, Hoog C. Bi-orientation of achiasmatic chromosomes in meiosis I oocytes contributes to aneuploidy in mice. *Nat Genet.* 2007; 39 (12):966-968.

Martin RH, Greene C, Rademaker AW, Ko E, Chernos J. Analysis of aneuploidy in spermatozoa from testicular biopsies from men with nonobstructive azoospermia. *J Androl.* 2003; 24 (1): 100-103.

Martínez C, Azcárate M, Pascual P, Aritzeta JM, López-Urrutia A. Sperm motility index: a quick screening parameter from sperm quality analyser-IIB to rule out oligo- and asthenozoospermia in male fertility study. *Hum Reprod.* 2000; 15 (8): 1727-1733.

Martínez G, Gillois P, Le Mitouard M, Borye R, Esquerré-Lamare C, Satre. FISH and tips: a large scale analysis of automated versus manual scoring for sperm aneuploidy detection. *Bas Clinic And.* 2013; 23(13):201-209.

Mateizel I, Verheuen G, Van Assche E, Tournaye H, Liebaers I, Van Steriteghem A. FISH analysis of chromosome X, Y and 18 abnormalities in testicular sperm from azoospermic patients. Hum Reprod. 2002; 17 (9): 2249-2257.

McAuliffe ME, Williams PL, Korrick SA, Dadd R, Perry MJ. The association between sperm sex chromosome disomy and semen concentration, motility and morphology. Hum.Reprod. 2012; 27 (10):2918-2926.

Morel F, Douet-Guilbert N, Moerman A, Duban B, Marchetti C, Delobel B et al. Chromosome aneuploidy in the spermatozoa of two men with globozoospermia. 2004; 10(11): 835-838.

Nicopoulos JDM, Gilling-Smith C, Almeida PA, 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. 2008; 23 (2): 240-250.

Núñez R, Cortés S, Gago M, Olaya E, López P, Caballero P. Utilidad de la FISH en espermatozoides como análisis complementario de rutina en un laboratorio de andrología. Rev Int Androl. 2008; 6(3): 180-185.

Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA et al. Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1999; 14 (5): 1266-1273.

Perry MJ, Chen X, McAuliffe ME, Maity A, Deloid GM. Semi-automated scoring of triple-probe FISH in human sperm: methods and further validation. 2011. Cytom A; 79 (8): 661-666.

Ramasamy R, Besada S, Lamb DJ. Fluorescent in situ hybridization of human sperm- diagnostics, indications, and therapeutic implications. Fertil.Steril. 2014; 102(6):1534-1539.

Ramasamy R, Scovell JM, Kovac JR, Cook PJ, Lamb DJ, Lipshultz LI. Fluorescence in-situ hybridization detects increased sperm aneuploidy in men with recurrent pregnancy loss. 2015; 103(4): 906-909.

Rubio C, Gil-Salom M, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, Remohí J et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. Hum Reprod. 2001; 16 (10): 2084-2092.

Sánchez-Castro M, Jiménez-Macedo AR, Sandalinas M, Blanco J. Prognostic value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis over PGD. Hum.Reprod. 2009; 24 (16): 1516-1521.

Schmid TE, Brinkkworth MH, Hill F, Slotter E, Kamischke A, Marchetti F. Detection of structural and numerical chromosomal abnormalities by ACM-FISH analysis in sperm of oligozoospermic infertility patients. *Hum Reprod.* 2004; 19(6): 1395-1400.

Slotter ED, Lowe X, Moore DH, Nath J, Wyrobek AJ. Multicolor FISH analysis of chromosomal breaks, duplications, deletions, and numerical abnormalities in the sperm of healthy men. *Am J Hum Genet.* 2000; 67 (12): 862-872.

Sun F, Ko E, Martin RH. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology?. *Reprod Biol Endoc.* 2006; 4 (1): 1477-1482.

Sun F, Mikhaail-Philips M, Oliver-Bonet M, Rademaker A, Turek P, Martin RH. The relationship between meiotic recombination in human spermatocytes and aneuploidy in sperm. *Hum Reprod.* 2008; 23 (8):1691-1697.

Templado C, Uroz L, Estop A. New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2013; 19 (10):634-643.

Uroz L, Templado C. Meiotic non-disjunction mechanisms in human fertile males. *Hum Reprod.* 2012; 27 (18):1518–1524.

Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi, MM, Bonduelle M et al. Between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod.* 2000; 15 (2): 351-365.

Vendrell X, Ferrer M, García-Mengual E, Muñoz P, Triviño JC, Calatayud C. Correlation between aneuploidy, apoptotic markers and DNA fragmentation in spermatozoa from normozoospermic patients. *Reprod Biomed.* 2014; 28 (1): 492-502.

Vicari E, De Palma A, Burrello N, Longo G, Grazioso C, Barone N, et al. Absolute polymorphic teratozoospermia in patients with oligo-asthenozoospermia is associated with an elevated sperm aneuploidy rate. *J Androl.* 2003; 24 (4): 598-603.

Viville S, Mollard R, Bach ML, Falquet C, Gerlinger P, Warter S. Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies?. *Hum Reprod.* 2000; 15 (12): 2563-2566.