



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**EVALUACIÓN DE ABERRACIONES  
CROMOSÓMICAS EN INDIVIDUOS CON  
OLIGOSPERMIA Y POLIESPERMIA  
EMPLEANDO BANDEO GTG**

**TESIS**

para obtener el título de Bióloga

**Presenta**

**Jessica Oliver Gallegos**

**Directora de tesis: Elia Roldán Reyes**

Área terminal: Biología del Desarrollo (Genética)

Línea de investigación: *Citogenética y Mutagénesis*



Ciudad de México

Febrero, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza-UNAM, en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (**UMIEZ**), Laboratorio de *Citogenética y Mutagénesis* (L-2 pp.), bajo la dirección de la **Dra. Elia Roldan Reyes** y el apoyo de **UNAM PAPIIT IN-221919-3**.

## *Agradecimientos*

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Estudios superiores Zaragoza.

A la Dra. Elia Roldán Reyes por darme la oportunidad de aprender y de desarrollarme en el área que más me apasiona, por todas las enseñanzas, el apoyo y paciencia durante mi estancia en el laboratorio y en este trabajo.

Al programa UNAM PAPIIT IN-221919-3 por el apoyo económico.

A mis sinodales Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández, M. en E.S. María Cristina Alvarado Domínguez, Dr. Hugo López Muñoz y Dr. Arturo Eduardo Cano Flores, por sus observaciones que ayudaron a mejorar el presente trabajo.

## **Dedicatorias**

Este trabajo va dedicado a mis padres y mi hermana que me han apoyado durante toda mi trayectoria académica, en especial a mi mamá **Abril Gallegos** por su paciencia, su amor, y por ser la persona que me motiva en los momentos difíciles, además de ser mi ejemplo, por todo el esfuerzo que hace día a día, TE QUIERO MAMÁ.

También va dedicado a mis compañeros de laboratorio, **Axel Díaz** por apoyarme dentro y fuera del laboratorio y por ser mi compañero en los buenos y malos momentos. A **Gabriela Exiga, Alan Ortiz** y **Andrea Aguilar** por brindarme siempre su ayuda y por todos los momentos que compartimos.

Finalmente, a mis amigos de toda la carrera **Yael, Esaú, Fany** y **Diego** que me acompañaron en todo este camino, me brindaron siempre su amistad y que se convirtieron en más que amigos, en familia.

# Índice/contenido

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>i</b>
<b>Lista de figuras y tablas</b> .....	<b>iii</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>v</b>
<b>1.Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1.Cromosomas metafásicos	1
1.2.Eucromatina y heterocromatina	2
1.3.División celular: Mitosis	4
1.4.Aberraciones cromosómicas	6
1.4.1.Aberraciones cromosómicas numéricas	7
1.4.2.Aberraciones cromosómicas estructurales	8
1.5.Cariotipo humano	13
1.6.Técnicas de bandeo	13
1.7.Bandeo G	16
1.8.Espermatogénesis	19
1.9.Espermiograma	22
1.10.Oligozoospermia	25
1.11.Polizoospermia	27
1.12. Antecedentes	29
<b>2. Justificación</b> .....	<b>30</b>
<b>3. Hipótesis</b> .....	<b>30</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>31</b>
4.1.General	31
4.2.Particulares	31
<b>5. Material y método</b> .....	<b>32</b>
5.1.Espermatobioscopía	32
5.2.Cultivo de linfocitos	34
5.3.Bandeo GTG	35
5.4.Análisis estadístico	36
<b>6. Análisis de resultados</b> .....	<b>37</b>
<b>7. Discusión de resultados</b> .....	<b>50</b>

<b>8. Conclusiones</b> .....	<b>60</b>
<b>9. Perspectivas</b> .....	<b>61</b>
<b>10. Referencias</b> .....	<b>62</b>
<b>11. Anexo</b> .....	<b>71</b>
11.1. Participaciones académicas	71

## Lista de Abreviaturas

<b>AC</b>	Aberraciones cromosómicas.
<b>ACN</b>	Aberraciones cromosómicas numéricas.
<b>ACE</b>	Aberraciones cromosómicas estructurales.
<b>ABL1</b>	Protooncogén, codifica proteínas tirosina quinasa, situado en el cromosoma 9.
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico.
<b>ADNasa I</b>	Enzima que cataliza la rotura de los enlaces fosfodiéster en el DNA.
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico.
<b>As</b>	Fragmento Acéntrico.
<b>BCR</b>	Gen situado en el cromosoma 22, se expresa en todos los tejidos.
<b>BCR/ABL</b>	Gen híbrido resultado de una translocación entre los cromosomas 9 y 22.
<b>CAP-C (SMC4) y CAP-E (SMC2)</b>	Heterodímeros de la familia de ATPasas, SMC.
<b>CAT</b>	Prueba de aberraciones cromosómicas (Chromosomal Aberration Test).
<b>CDK1</b>	Ciclina dependiente de quinasas (Cyclin Dependent Kinases).
<b>CENP-C</b>	Proteína centromérica C (Centromeric Protein C)
<b>CENP-E</b>	Proteína centromérica E (Centromeric Protein E)
<b>CGH</b>	Hibridación Genómica Comparativa.
<b>Del</b>	Delección.
<b>Dic</b>	Fragmento Dicéntrico.
<b>Dup</b>	Duplicación.
<b>FISH</b>	Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> .
<b>FSH</b>	Hormona Foliculoestimulante.
<b>GnRH</b>	Hormona Liberadora de Gonadotropina.
<b>GTPasa</b>	Guanosina trifosfatasa, hidroliza moléculas guanosín trifosfato (GTP).
<b>HMGB1</b>	Proteínas de alta movilidad del grupo (High Mobility Group Box).
<b>I</b>	Isocromosoma



<b>IG</b>	Inmunoglobulinas.
<b>Inv</b>	Inversión.
<b>ISCN</b>	Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (International System for Human Cytogenetic Nomenclature).
<b>LMC</b>	Leucemia Mieloide Crónica.
<b>MYC</b>	Familia de protooncogenes.
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>SAC</b>	Punto de control de ensamblaje del huso
<b>ScII</b>	Proteína dos del andamio cromosómico (Scaffold protein II)
<b>SMC</b>	Proteína estabilizadora de microcromosomas (Stability of Microchromosomes).
<b>RhoA</b>	Proteínas pequeñas con actividad enzimática GTPasa, agrupadas en la superfamilia Ras.
<b>T</b>	Translocación.
<b>TOPO II</b>	Topoisomerasa II.
<b>R</b>	Cromosoma en anillo.
<b>Rob</b>	Translocación Robertsoniana.
<b>LH</b>	Hormona Luteinizante.
<b>LHR</b>	Receptor de LH.
<b>LOH</b>	Perdida de Heterocigocidad (Loss of Heterozygosity).

## Lista de figuras y tablas

Figura	Páginas
1. Compactación del ADN y formación de los cromosomas mitóticos (Maeshima y Eltsov, 2007) .....	3
2. A) Ciclo celular y B) etapas de la Mitosis (Miller y Therman, 2001) .....	5
3. Alteraciones Cromosómicas: A) Deleción intersticial, B) Duplicación, C) Inversión paracéntrica y pericéntrica, D) Formación de un cromosoma circular, E) Translocación recíproca, F) Formación de cromosoma dicéntrico, G) Translocación robertsoniana, H) Formación de isocromosomas (Modificado de Oliva, 2004) .....	12
4. Bando GTG (Modificado de Thompson <i>et al.</i> , 2008) .....	18
5. Proceso de espermatogénesis (Dada <i>et al.</i> , 2012) .....	21
6. Tren de Bando GTG.....	35
7. Porcentaje de los valores del color en muestras control, con oligozoospermia y polizoospermia.....	37
8. Porcentaje de los valores de viscosidad en muestras control (normozoospermicos), con oligozoospermia y polizoospermia.....	38
9. Valores de pH en el grupo control, con oligozoospermia y polizoospermia.....	39
10. Resultados del volumen en muestras seminales de controles, oligozoospermia y polizoospermia.....	40
11. Valores citológicos en grupo control, con oligozoospermia y polizoospermia; a) morfología, viabilidad y progresión; Z para proporciones $\alpha=0.05$ , b) densidad; t de Student $*p < 0.05$ .....	42
12. Frecuencia de metafases con cariotipo normal y aberraciones cromosómicas numérica (ACN) y estructurales (ACE) del grupo control, oligozoospermicos y polizoospermico, $X^2/Yates *p < 0.05$ .....	45
13. Microfotografía de metafases con cariotipo normal (46, XY) grupo control, obtenidas en el laboratorio de <i>Citogenética y Mutagénesis</i> , 100X, campo claro, Bando GTG.....	47
14. Microfotografía de metafases de individuos con oligozoospermia. A-B) cariotipo normal, C) Aberración cromosómica numérica (ACN) 47, XY, +21 (flecha roja); D) Aberración cromosómica estructural (ACE) 46, XY, Inv (16)(q), E-F) 46, XY, Dup (5)(p) (flecha roja), obtenidas en el laboratorio de <i>Citogenética y Mutagénesis</i> , 100x, Campo Claro.....	48
15. Microfotografía de Metafases de individuos con polizoospermia. A-D) cariotipo normal; E) Aberración cromosómica numérica (ACN) 45, XY, -12, F) 45, XY, -9, obtenidas en el laboratorio de <i>Citogenética y Mutagénesis</i> , 100x, Campo Claro.....	49

<b>Tabla</b>	<b>Páginas</b>
1. Clasificación de los cromosomas humanos.....	<b>14</b>
2. Valores de referencia (1999) y los nuevos valores (2010) del límite de referencia inferior (LRI) en espermiograma.....	<b>25</b>
3. Tipos de Oligospermia.....	<b>26</b>
4. Antecedentes de estudios de aberraciones cromosómicas en individuos con trastornos reproductivos.....	<b>29</b>
5. Conteo de espermatozoides para hemocitómetro.....	<b>32</b>
6. Factores de conversión.....	<b>33</b>
7. Valores citológicos de la OMS, de individuos normozoospermicos, oligozoospermicos y polizoospermicos.....	<b>41</b>
8. Índice mitótico y frecuencia de aberraciones cromosómicas en individuos con calidad seminal estándar (Grupo control) .....	<b>43</b>
9. Frecuencia de aberraciones cromosómicas en individuos con oligozoospermia y polizoospermia.....	<b>44</b>
10. Frecuencia y porcentaje de aberraciones cromosómicas de individuos control, oligozoospermicos y polizoospermicos.....	<b>45</b>

## RESUMEN

Los trastornos en la reproducción son un problema importante que se asocia a un factor masculino en el 30-50 % de los casos, los cuales pueden ser multifactorial, donde las causas genéticas son predominantes, evidenciadas por la presencia de aberraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales. Las anomalías cromosómicas somáticas son más frecuentes a medida que se observa un recuento de espermatozoides alterado, como en el caso de *oligozoospermia* (<20 millones de espermatozoides por mL de eyaculado) y *polizoospermia* (>200 millones de espermatozoides por mL). El objetivo de este trabajo fue establecer una relación entre oligozoospermia y polizoospermia y la presencia de aberraciones cromosómicas en jóvenes de la zona oriente (FES Zaragoza), utilizando el análisis de bandedo GTG en linfocitos de muestras de sangre periférica completa. Las muestras seminales se analizaron mediante espermatobioscopía directa, utilizando como referencia los valores de la OMS (1999). Se formaron tres grupos, 6 individuos con oligozoospermia, 4 individuos con polizoospermia y 10 con calidad seminal estándar (grupo control). Se aplicó la técnica de Bandedo GTG, se analizaron 30 metafases por individuo utilizando los criterios para análisis de cromosomas (*Internacional System for Human Cytogenetics Nomenclatura*, ISCN) para un total de 600 metafases analizadas. Los resultados mostraron una frecuencia mayor de aberraciones cromosómicas numéricas (aneuploidías) en el grupo con oligozoospermia (10.55 %), así como, en el grupo con polizoospermia (10 %), que involucran principalmente cromosomas autosómicos. Sin embargo, no fue significativo respecto del grupo control (3 %). En el caso de las aberraciones cromosómicas estructurales se presentó una frecuencia significativamente alta en los individuos con oligozoospermia (20.55 % vs 0.33 % del control), con presencia de dos cariotipos alterados en mosaico, el primero [10]46,XY,dup(5)(p), que significa material extra en uno de los cromosomas del par 5; el segundo mosaicismo fue [25]46,XY,Inv(16)(q) que implica cambio en la orientación de un segmento en el cromosoma 16, estos genotipos podrían dar como resultado patrones de expresión génica modificados que se reflejen en una espermatogénesis alterada. Estos resultados concuerdan con otros estudios que reportaron frecuencias altas para aneuploidías e inversiones entre otras alteraciones. Con lo que se concluye que la presencia de las aberraciones cromosómicas estructurales está relacionada directamente con el bajo recuento de espermatozoides en individuos con oligospermia severa; resultando así en una condición más grave que los casos analizados de individuos con polizoospermia.

**Palabras clave:** Aneuploidía, densidad espermática, espermatobioscopía, espermatogénesis, inversión paracéntrica, metafase, mosaicismo.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cromosoma metafásico

El genoma humano consta de hasta 20000–25000 genes incrustados dentro de 3 mil millones de pares de bases ubicados en los 23 pares de cromosomas. Los cromosomas son las estructuras en que se organiza la cromatina nuclear y tienen una expresión dinámica en las distintas fases del ciclo celular, el contenido de genes es variable, aunque está en relación con su tamaño. El número de cromosomas varía según la especie. Sin embargo, es constante dentro de cada una de ellas, así como la estructura de cada cromosoma (Anderson *et al.*, 2011). Un cromosoma eucariótico codifica los genes entre otros elementos funcionales y es una estructura autorreplicativa constituida por una molécula lineal de ácido desoxirribonucleico a la que se asocian proteínas (Shaffer & Tommerup, 2005).

El empaquetamiento de un cromosoma de metafase está mediado por una variedad de proteínas cromosómicas principalmente histonas y no histonas en cantidades aproximadamente iguales. Las histonas son proteínas básicas de bajo peso molecular que tienen una alta afinidad de unión por el ADN. Hay cinco tipos principales llamadas H1, H2A, H2B, H3 y H4. Son de importancia fundamental para empaquetar el ADN en el núcleo celular y regular el despliegue selectivo que permite que cientos y, a veces, miles de genes se expresen (Miller & Therman, 2001).

Los nucleosomas son el componente mejor caracterizado y representan el primer nivel de empaquetamiento, consisten en dos moléculas de H3 y dos de H4 y cada una de las caras consiste en un complejo H2A-H2B. El ADN se enrolla dos veces alrededor de este octámero de histonas para formar un núcleo de nucleosoma que contiene aproximadamente 200 pb. La histona H1 es una histona enlazadora que une a los nucleosomas en una estructura llamada collar de perlas, por su imagen en micrografías electrónicas, o disco de 11 nm. Los nucleosomas a su vez se empaquetan en un orden superior de estructuras llamadas cromatina (Cancemi *et al.*, 2017). La cromatina, una estructura de 30 nm, produce una compactación de ADN seis veces mayor, la cual forma varias asas que se unen a otras por medio de proteínas no histonas que pliegan estos bucles sobre una estructura axial llamada andamio del cromosoma (Panduro, 2016).

El andamio cromosómico se compone principalmente de tres proteínas: Topoisomerasa II (TOPO II), ScII (ATPasa) y HMGB1 (grupo de alta movilidad HMG). Topoisomerasa II, es una proteína predominante de este complejo, disminuye o aumenta la cantidad de superenrollamiento dentro de una sola molécula de ADN retorcida dentro de los bucles que se generan durante los cambios en la condensación de cromatina. TOPO II está involucrada en las etapas finales de la condensación cromosómica y en la descondensación que sigue a la telofase (Miller & Therman, 2001).

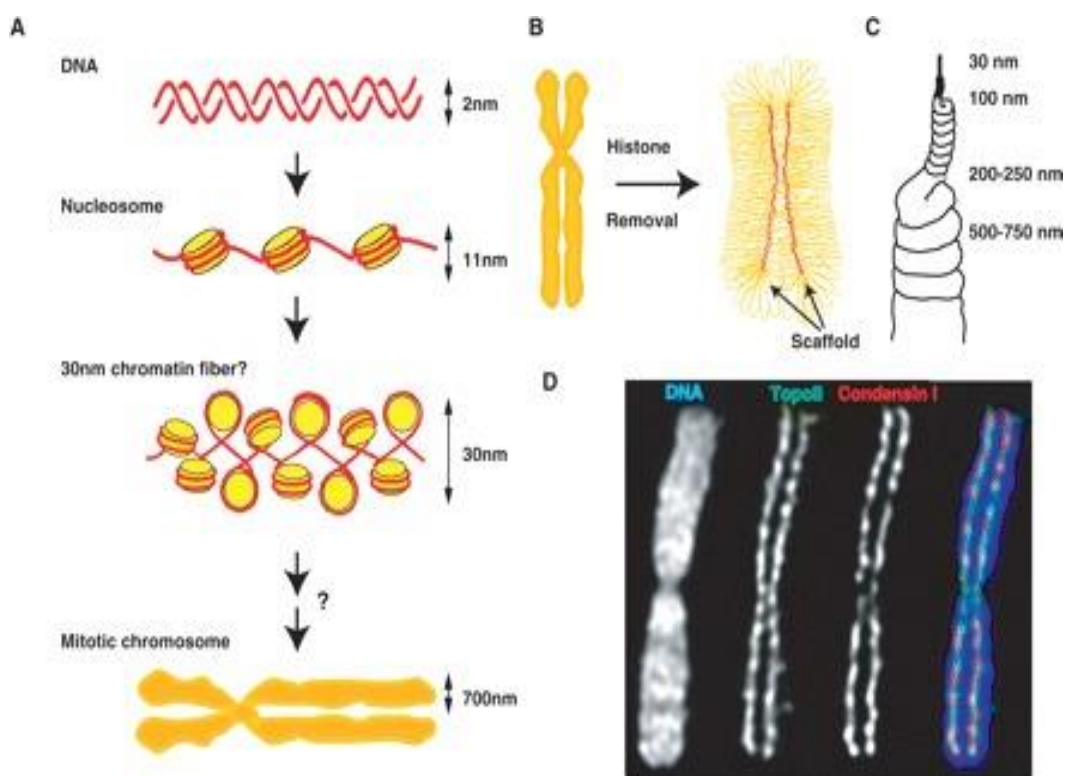
ScII es la segunda proteína más abundante en el andamio cromosómico, pertenece a la familia altamente conservada SMC y forma complejos con TOPO II. ScII parece ser esencial para la condensación de cromosomas mitóticos y para la separación de cromátidas hermanas. La proteína del armazón menos abundante es HMGB1.

Otras proteínas no histónicas menos abundantes que se encuentran asociadas al andamio cromosómico incluyen CENP-C y CENP-E, que son necesarias para la función cinetocórica, las Condensinas formadas por un conjunto de cinco subunidades diferentes, incluido, un heterodímero de CAP-C (SMC4) y CAP-E (SMC2); así como, Cohesinas y Kleisinas, estas intervienen en la unión de las cromátidas, segregando el anclaje de la fibra de cromatina al elemento axial formando bucles. Así las fibras de cromatina de 30 nm se pliegan en fibras de 100, 200 y 250 nm progresivamente para formar los cromosomas mitóticos finales (**ver Figura 1**) (Maeshima & Eltsov, 2008).

## **1.2 Eucromatina y heterocromatina**

De acuerdo con los niveles de compactación del cromosoma se pueden identificar dos regiones con diferencias estructurales, eucromatina transcripcionalmente activa que se encuentra más laxa y heterocromatina silenciosa que se encuentra altamente condensada. La heterocromatina incluye regiones genómicas que pueden teñirse densamente con tintes químicos, están enriquecidas con elementos repetitivos y marcas epigenéticas.

La heterocromatina generalmente se replica más tarde que la eucromatina y protege la integridad del genoma, ya que la eucromatina tiene una conformación más abierta que pone a los genes a disposición de los factores de transcripción, las ARN polimerasas e incluso la ADNasa I, en las regiones activas. Los factores de transcripción no pueden unirse a las secuencias de ADN objetivo en nucleosomas compactos, por lo que no puede tener lugar la transcripción.



**Figura 1.** Compactación del ADN y formación de los cromosomas mitóticos (Maeshima & Eltsov, 2008).

La cromatina altamente condensada que contiene genes inactivos, pero potencialmente activos se llama heterocromatina facultativa. Durante el ciclo celular, se producen cambios marcados en la cromatina o la condensación cromosómica (Liu *et al.*, 2020).

Los cambios epigenéticos abarcan una serie de modificaciones moleculares de ADN o en las colas del extremo amino de cada molécula de histona H3 y H4 íntimamente asociadas con el ADN. La acetilación, la metilación, la ubiquitinación y la fosforilación se han convertido en los principales actores en los mecanismos reguladores epigenéticos, actúan de forma antagónica en la conversión de un estado de cromatina activo a uno inactivo (Cancemi *et al.*, 2017).

### 1.3 División celular: Mitosis

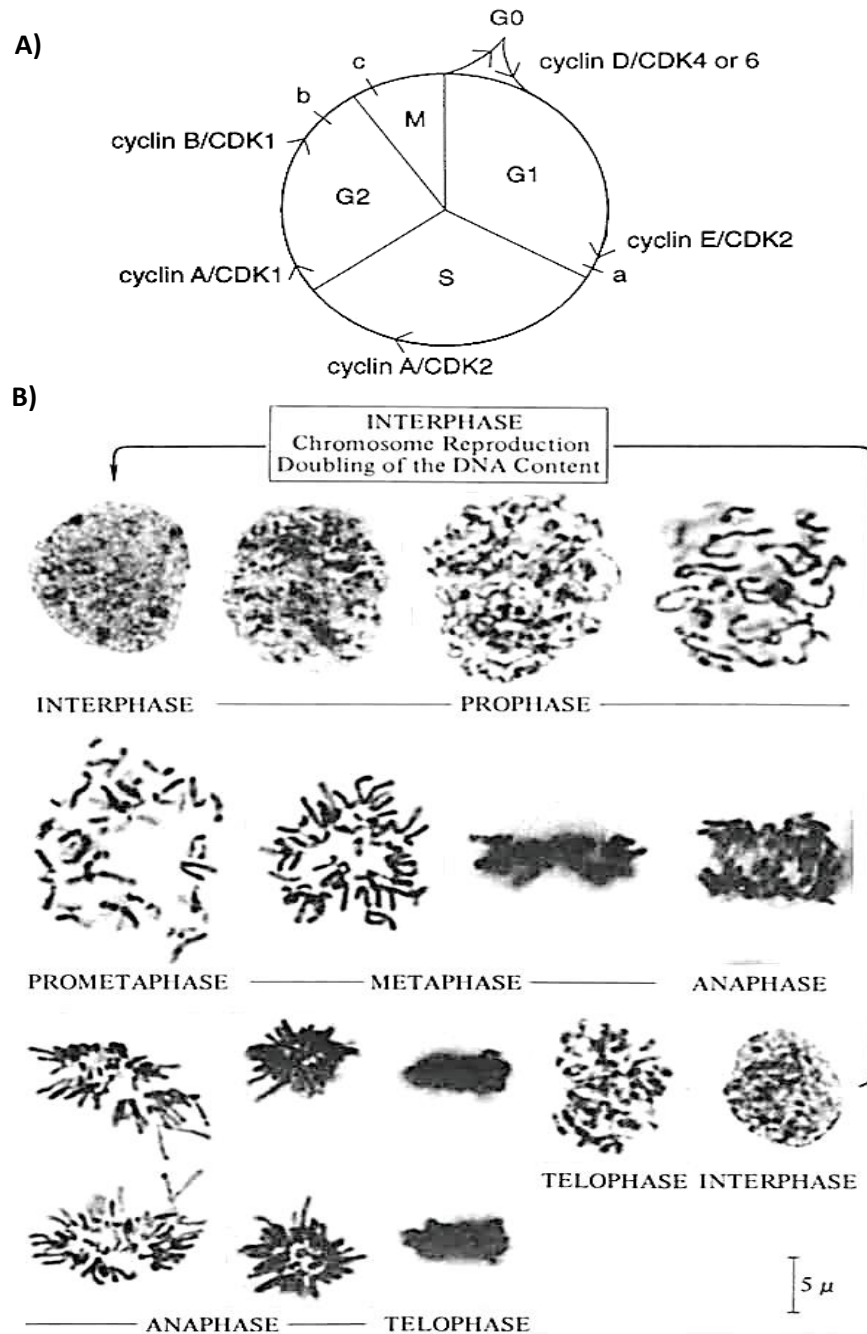
Los cromosomas homólogos de cada par contienen un centrómero con afinidad para unirse a microtúbulos y un telómero en cada uno de sus dos extremos que le permiten mantener su independencia (Shaffer & Tommerup, 2005). Para dividirse, una célula debe primero replicar su genoma. Las dos hebras de ADN se separan y se copia su secuencia complementaria dando lugar a dos cromátidas idénticas que permanecen ligadas por cohesinas, para permitir la distribución equitativa del genoma que tendrá lugar durante la fase de división propiamente dicha, la mitosis (Castro *et al.*, 2003).

La entrada en la mitosis o profase, se inicia mediante la activación del complejo ciclina B1-CDK1 que ocurre en el citoplasma (**ver figura 2A**), seguido por su acumulación nuclear rápida. Se caracteriza por la condensación de cromosomas, el redondeo mitótico para generar células óptimas para el montaje del huso mitótico, pérdida de adherencias entre células- sustrato, la retracción del margen de la célula, un aumento en la presión hidrostática intracelular y la formación de una corteza rígida de actomiosina. Los organelos celulares experimentan rápidos cambios en la organización, forma y número (Vázquez *et al.*, 2011).

Al final de la profase, la envoltura nuclear desaparece, durante la prometafase la red de microtúbulos se reorganiza a partir de la separación de los centrosomas, alrededor de los cuales se congregan los extremos "menos" de los microtúbulos, mientras que los extremos "más" capturan los cromosomas, esto depende tanto de la dinámica de los microtúbulos como de la actividad de las kinesinas. Las cromátidas hermanas de cada cromosoma son capturadas por los microtúbulos, esta captura se produce a través de una estructura de proteína ensamblada en el ADN centromérico de las cromátidas, el cinetocoro; los centriolos son responsables de orientar y posicionar correctamente el huso mitótico.



Múltiples mecanismos garantizan que las endomembranas no interfieran con el montaje del huso, los cromosomas se alinean en la placa ecuatorial: lo que corresponde a la metafase (**ver Figura 2B**). Durante la anafase, las cromátidas hermanas migran a los polos opuestos del huso. La transición metafase / anafase solo ocurre después de la alineación del último cromosoma: solo en esta etapa se rompe la cohesión entre las cromátidas hermanas.



**Figura 2.** A) Ciclo celular y B) etapas de la Mitosis (Miller & Therman, 2001).

Las señales del huso mitótico promueven el ensamblaje del anillo contráctil mediante la activación ecuatorial de la GTPasa, RhoA. Después del correcto posicionamiento y activación de los componentes del anillo contráctil, debe contraerse para dividir la célula en dos. Así, los cromosomas replicados se segregan igualmente (a través de la cariocinesis) en dos núcleos idénticos, cada uno de los cuales se encierra (a través de la citocinesis) en su propio compartimento citoplásmico. El control de la división es bajo la vigilancia de los puestos de control, en el cual las células son arrestadas al final de G2, si se detecta daño del ADN (Taylor & Ehrenreich, 2015). Si la transición M / A tuviera lugar antes de que todos los cromosomas estuvieran conectados a los dos polos del huso, conduciría a una distribución desigual del genoma y a la formación de alteraciones cromosómicas (Castro *et al.*, 2003).

#### **1.4 Aberraciones cromosómicas**

Las aberraciones cromosómicas son cualquier alteración en el juego cromosómico normal, su estudio es cada vez más importante para el diagnóstico y la subclasificación de una enfermedad maligna y, por lo tanto, en la selección del tratamiento adecuado (Mitelman, 2000). Pueden contribuir a la mutagénesis y la carcinogénesis involucrada en la etiología de neoplasias y algunos tumores congénitos, así como en trastornos reproductivos y defectos en el desarrollo que pueden llegar a ser tan graves provocando infertilidad, mortalidad perinatal, letalidad dominante o malformaciones congénitas en la descendencia. El daño en el ADN puede incluso provocar la muerte celular (apoptosis) en la siguiente mitosis o después de esta (Anderson *et al.*, 2011). Los defectos cromosómicos surgen a nivel del cromosoma individual o del conjunto cromosómico y pueden afectar tanto el número como la estructura de los cromosomas.

Una célula diploide normal de humano está formada por 46 cromosomas, un cromosoma dentro de cada par homólogo representa la herencia materna y el otro la herencia paterna. Cuando los eventos de segregación cromosómica proceden incorrectamente, los cromosomas homólogos se separan con desviaciones del número normal (aneuploidía) o como un múltiplo del cariotipo completo (euploidía). Cuando ambas copias de un cromosoma particular se mueven a una célula hija y la otra célula no recibe ninguna, el evento se conoce como no disyunción dando lugar a aberraciones cromosómicas numéricas (ACN) (Vázquez *et al.*, 2011).

### 1.4.1 Aberraciones cromosómicas numéricas

**Euploidía:** Estas alteraciones pueden ser múltiplos exactos del número haploide  $n$  (en humanos diploidía  $2n=46$ , triploidías  $3n=69$  cromosomas, tetraploidías  $4n=92$  cromosomas, etc.). Si el número de veces que se repite la serie haploide es muy elevado se denomina poliploidía; su origen suele residir en una dispermia o un error meiótico. Células endoreduplicadas tienen cromosomas con más de 2 cromátidas hermanas generalmente con estructura normal (Vázquez *et al.*, 2011).

**Aneuploidía:** Los individuos que tienen aumento o pérdida de cromosomas aislados, sin llegar a un juego cromosómico completo, se denominan aneuploides. Las aneuploidías pueden afectar a cualquier par cromosómico y a más de uno. Las células anormales con un cromosoma extra son trisómicas, tetrasómicas:  $46+2$ , pentasómicas:  $46+3$ , etc. Aquellas con un cromosoma perdido se denominan monosomías. Si solo una parte de un cromosoma es añadido o perdido le corresponde el termino de trisomía y monosomía parciales respectivamente (Vázquez *et al.*, 2011).

La trisomía o monosomía de grandes cromosomas conduce a una muerte embrionaria temprana. Sin embargo, algunas aneuploidías permiten la supervivencia, pero es perjudicial para la salud, por ejemplo, la trisomía de los cromosomas más pequeños, como síndrome de Down (trisomía 21), síndrome de Patau (trisomía 13) y síndrome de Edward (trisomía 18). También pueden involucrar cromosomas sexuales, por ejemplo, el síndrome de Klinefelter (KS) representa la anomalía cromosómica sexual humana más encontrada, dado por un cromosoma X adicional ( $47, XXY$ ) (Karimi *et al.*, 2014), el síndrome XXX o de súper hembra, la monosomía del cromosoma sexual (XO) conocida como síndrome de Turner que se caracteriza por estatura baja desproporcionada (DSS) y la displasia mesomélica de Langer (LS) (Oliva *et al.*, 2004). En el cromosoma Y, el síndrome XYY produce un cromosoma Y adicional en la descendencia afectada (Cancemi *et al.*, 2017).

Estas alteraciones pueden surgir en mosaico o no, los mosaicos se producen por fenómenos de no disyunción durante el desarrollo embrionario y dependiendo del momento en que se produce pueden generar viabilidad de las líneas celulares resultantes, cada una de éstas se encontrará en el adulto en una determinada proporción (Shaffer & Tommerup, 2005).

Los mecanismos detrás de la generación de ACN en las células se desconocen en gran medida, aunque su origen suele estar en la no-disyunción o en una anafase lenta (Oliva *et al.*, 2004). También se ha sugerido deficiencia del punto de control del ensamblaje del huso (SAC) u otros mecanismos que controlan la separación de las cromátidas hermanas, además de falla de la citocinesis (Gisselsson *et al.*, 2010). La disfunción de los telómeros también causa un espectro de defectos mitóticos con puentes anafásicos que desencadenan en cambios cromosómicos numéricos y estructurales. La pérdida repetida de cromosomas en una célula diploide puede conducir a grandes alteraciones potencialmente letales en la dosificación de genes (Stewénius *et al.*, 2005).

#### **1.4.2 Aberraciones cromosómicas estructurales**

Los individuos que tienen alterada la información genética por pérdida, ganancia o cambio de posición de segmentos cromosómicos, se conocen como aberraciones cromosómicas de tipo estructural. El daño a los cromosomas individuales consiste en la ruptura de las cromátidas, que resulta en una discontinuidad de ambas cadenas del ADN y en la rotura de un cromosoma, lo que deja al ADN expuesto a ataques nucleolíticos y propenso a la pérdida de material genético. Existen varios tipos de reordenamientos cromosómicos estructurales (Shaffer & Tommerup, 2005):

**Duplicación (dup):** Anomalía estructural que supone la repetición o duplicación de una sección del cromosoma. Atendiendo a su localización se pueden clasificar en: Duplicaciones en tándem cuando el segmento duplicado se encuentra adyacente con el original y duplicaciones desplazadas cuando el segmento duplicado no está adyacente (Martin, 2008). Las duplicaciones pueden clasificarse además en directas (**dir**) cuando la información del segmento duplicado tiene la misma orientación que el original o invertidas (**inv**) aquellas en las que la disposición del segmento duplicado es al revés tomando como referencia el centrómero (**ver Figura 3B**) (Shaffer & Tommerup, 2005).

**Translocación (t):** Las translocaciones se producen por intercambio de segmentos entre dos cromosomas de tal modo que resultan dos cromosomas con un centrómero cada uno. Puede involucrar cromosomas homólogos o no homólogos, si los dos cromosomas que intervienen son a la vez donantes y receptores reciben el nombre de translocación recíproca (**ver Figura 3E**) (Shaffer & Tommerup, 2005), esto permite que el cigoto se desarrolle normalmente, pero cuando forman células

germinales en la meiosis alrededor de la mitad de sus gametos estarán genéticamente desequilibrados, con deficiencias y duplicaciones de material cromosómico, que producen la muerte poco antes o después del nacimiento y malformaciones congénitas, el riesgo está determinado principalmente por las características de los cromosomas involucrados y las posiciones de los puntos de ruptura (Vázquez *et al.*, 2011).

Un caso especial se observa en la leucemia mieloide crónica humana (**LMC**), donde una proporción de los casos con esta enfermedad son portadores del "cromosoma Philadelphia (Ph)", un cromosoma derivado de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 con puntos de translocación 9q34 y 22q11.2. Como consecuencia de esta translocación el protooncogén ABL1 (c-ABL) en el cromosoma 9 se une con la región BCR en el cromosoma 22 dando como resultado un gen híbrido BCR/ABL que codifica la posterior transcripción y traducción de una proteína anormal (Mitelman, 2000)

El linfoma de Burkitt es otro ejemplo, se caracterizan tres translocaciones - t 8; 14, -t 8; 22, y t 2; 8 que conducen a la activación del gen MYC, ubicada en la banda 8q24, yuxtaponiendo las secuencias de codificación del gen a una de las inmunoglobulinas (IG) constitutivamente activas, que activa el crecimiento celular descontrolado, este mecanismo parece estar restringido a las malignidades linfáticas (Mitelman, 2000).

**Translocación Robertsoniana (rob):** Un tipo especial de translocación recíproca es la fusión céntrica o robertsoniana, se origina a través de la fusión de dos cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 o 22) de tal forma que los dos brazos cortos y los dos largos quedan juntos (**ver Figura 3G**). Los brazos cortos fusionados (que contienen ADN redundante) generalmente se pierden para que el portador tenga una constitución cromosómica equilibrada con 45 cromosomas. Cuando los cromosomas se emparejan durante la meiosis, lo hacen como trivalentes, y los gametos resultantes pueden ser normales y aneuploides lo que resulta en embriones monosómicos o trisómicos (Martin, 2008). Los embriones monosómicos mueren temprano, pero los embriones trisómicos, pueden sobrevivir hasta el nacimiento o más allá. Si el cromosoma 21 está involucrado en la translocación, puede formar una trisomía por translocación y producir un síndrome de Down o síndrome de Patau para el cromosoma 13 (Vázquez *et al.*, 2011).

**Anillo (r):** Los cromosomas en anillo pueden derivar de uno o más de un cromosoma, consiste en la pérdida de dos segmentos cromosómicos (una doble deleción terminal) que incluyen ambos telómeros, pérdida de los fragmentos distales y la unión posterior de los extremos libres formándose un cromosoma circular (Oliva *et al.*, 2004). El cromosoma en anillo puede llevar varios centrómeros, o no presentar centrómero (anillo acéntrico) (**ver Figura 3D**).

**Deleción (del):** Es la pérdida de un segmento de cromosoma y de la información genética que en él se contiene, puede ser de dos tipos, si el segmento perdido incluye un telómero se llaman terminales, si la pérdida es de un segmento no terminal (no incluye telómero) se llama intersticial. En la siguiente división celular, es probable que se pierda el segmento no unido de material cromosómico, las grandes eliminaciones pueden contribuir a la letalidad dominante (**ver Figura 3A**) (Shaffer & Tommerup, 2005).

**Inversión (inv):** Una inversión se produce cuando se da la rotura en dos puntos del cromosoma y un giro de 180° del segmento central reconstruyéndose el cromosoma con un patrón de bandas modificado. Las inversiones se clasifican en **pericéntricas** si incluyen al centrómero (**ver Figura 3C**) cuando los cortes se producen en ambos lados del centrómero, cuando no incluyen el centrómero se denominan **paracéntricas** (Vázquez *et al.*, 2011). Todos los genes están presentes en el número correcto, pero en un orden diferente lo que provoca dificultades durante el emparejamiento de cromosomas homólogos durante la meiosis, formando una estructura llamada bucle de inversión de emparejamiento, que permite a los cromosomas llevar a cabo la recombinación, lo que puede originar cromosomas con duplicaciones, deficiencias y fragmentos acéntricos o dicéntricos. Las inversiones paracéntricas sólo pueden ser detectados por el uso de procedimientos de bandas. Las inversiones han sido identificadas en el cromosoma 15 [dic (15) (q12 o q13)] al ser tan grande, contiene la región crítica PWS/AS, y está asociado con un fenotipo anormal (Battaglia & Guerrini, 2005).

**Fragmento Dicéntrico (Dic) y Acéntrico (As):** Los intercambios asimétricos surgen cuando uno de los cromosomas porta ambos centrómeros (dicéntrico) mientras que el otro no lleva ninguno (acéntrico) (**ver Figura 3F**). La célula somática o germinal que lleva esta anomalía generalmente muere, por las dificultades de segregación del fragmento dicéntrico o la pérdida del fragmento acéntrico en la división celular. Tal reorganización cromosómica contribuye a la letalidad dominante.

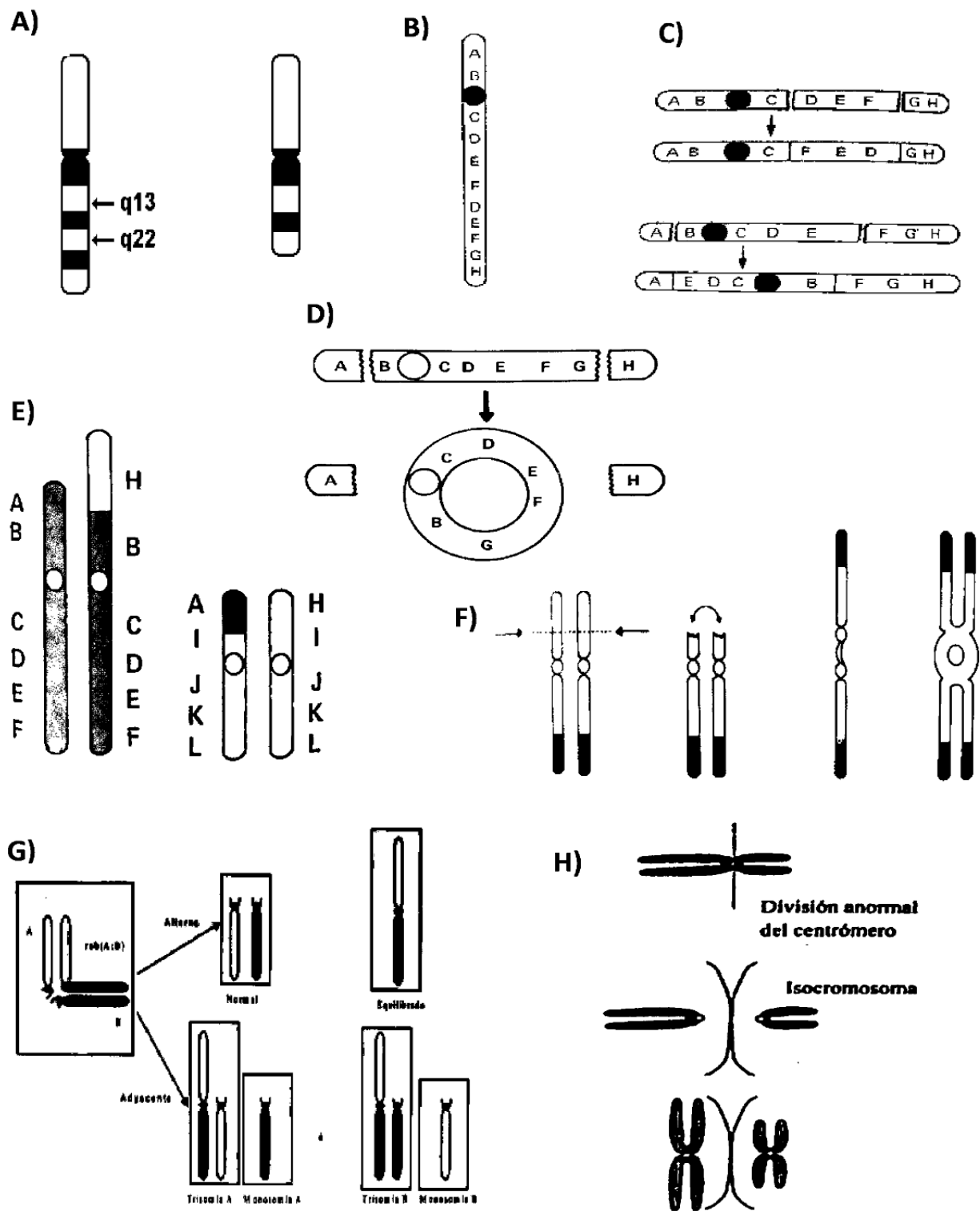
Sin embargo, las células que llevan un fragmento dicéntrico podrían progresar más allá de la mitosis, causando varias interrupciones a través de eventos de **fusión-rotura-puente** (Anderson *et al.*, 2011).

**Isocromosomas (i):** Un Isocromosoma se forma cuando el centrómero en lugar de dividirse longitudinalmente lo hace en forma transversal formándose un isocromosoma de brazos largos y un isocromosoma de brazos cortos (**ver Figura 3H**) (Cancemi *et al.*, 2017).

El origen de las aberraciones estructurales es la exposición a la acción de numerosos agentes ambientales mutágenos que los dañan, pueden ser físicos, como la radiación; químicos, como fármacos y agentes alquilante como los virus, que ocasionan fracturas o rompimientos, los reordenamientos estructurales equilibrados ejercen su acción a través de la desregulación (Mitelman, 2000). Los cromosomas que se rompen en anafase pueden entrar en los ciclos de ruptura-puente-fusión, lo que puede conducir a otras anomalías genéticas, como la eliminación y la amplificación. Más del 80% de todas las aberraciones cromosómicas estructurales en humanos se producen de novo y son de origen paterno (Stewénius *et al.*, 2005).

Existen mecanismos de reparación celular que tratan de subsanar el daño, pero este puede ser tan grave, o los mecanismos de reparación no ser tan eficientes, que el daño no pueda ser reparado o es reparado de forma incorrecta y causar enfermedades (Guizar, 2001). Las aberraciones cromosómicas y su estudio son de gran importancia, varios tipos de cambios citogenéticos pueden detectarse en los cromosomas mediante ensayos citogenéticos in vitro (Grade *et al.*, 2015).

Las técnicas citogenéticas más utilizadas son la prueba de aberraciones cromosómicas (**CAT** por sus siglas en inglés) en células somáticas y germinales cultivadas para observación directa del daño cromosómico durante la metafase, los reordenamientos cromosómicos pueden analizarse utilizando técnicas de bandas cromosómicas, hibridación fluorescente in situ (FISH) (Roldán y López, 2017), CGH de alto rendimiento, pérdida de heterocigosidad (LOH) entre otras (Grade *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Alteraciones Cromosómicas: A) Delección intersticial, B) Duplicación, C) Inversión paracéntrica y pericéntrica, D) Formación de un cromosoma circular, E) Translocación recíproca, F) Formación de cromosoma dicéntrico, G) Translocación robertsoniana, H) Formación de isocromosomas (Modificado de Oliva *et al.*, 2004).



## 1.5 Cariotipo humano

Un esquema convencional de clasificación de los cromosomas humanos fue desarrollado a inicios de 1960. El cariotipo es la constitución cromosómica de un individuo que representa las características citogenéticas de los cromosomas contenidos en un solo núcleo celular (Vázquez *et al.*, 2011) es un estudio de rutina en genética médica, donde los cromosomas son colocados en orden decreciente de acuerdo a su tamaño y posición del centrómero (Specher & Carter, 2005).

De acuerdo a la posición del centrómero, el cromosoma se divide en un brazo corto designado **p** y el brazo largo designado **q**. Un cromosoma con su centrómero en el centro recibe el nombre de **metacéntrico**, un cromosoma con el centrómero justo al final es **telocéntrico**. Los cromosomas telocéntricos no se encuentran normalmente en las células humanas, aquellos cromosomas con un centrómero muy cerca del final y con un brazo p muy corto son **acrocéntricos**, sus brazos cortos suelen ser **satelitales**. El satélite es un pequeño botón de cromatina conectado al resto de la cromátida a través de un tallo delgado muy parecido a una antena, el resto de los cromosomas se clasifican como **submetacéntricos**. Los cromosomas humanos se han ordenado en 7 grupos que se designan con las primeras letras mayúsculas del abecedario (**ver Tabla 1**), la elaboración del cariotipo nos permite detectar diferentes tipos de anomalías y alteraciones en el material genético (Shaffer & Tommerup, 2005).

El análisis de metafases se puede realizar en cualquier tejido con células en división activa, pero la médula ósea se examina con más frecuencia, linfocitos humanos, en particular. Las células se tratan con un compuesto de prueba y se detienen en metafase mediante la administración de colcemida o Colchicina, inhibidores de la tubulina, que despolimerizan el huso mitótico y detienen la célula en esta etapa (Speicher & Carter, 2005).

## 1.6 Técnicas de bandas

El descubrimiento de la técnica de bandas reveló patrones distintivos y reproducibles de bandas transversales a lo largo de los cromosomas en metafase, que permiten identificar todos los cromosomas, el reconocimiento de reordenamientos estructurales y la identificación de los puntos de ruptura (Miller & Therman, 2001). Una banda cromosómica es una manifestación de un dominio de

cromatina parte de un cromosoma que se distingue claramente de sus segmentos adyacentes al aparecer más oscura, los patrones de bandas no solo permiten la identificación de cromosomas normales y anormales, sino que también nos informan sobre aspectos fundamentales de la estructura de la cromatina y la compartimentación del genoma (Acevedo, 2000).

Las bandas han hecho posible la identificación rápida de una enorme gama de anomalías cariotípicas y la construcción de mapas de enlaces genéticos y físicos cada vez más completos (Miller & Therman, 2001). La clasificación y la nomenclatura se basan en el Sistema Internacional de Nomenclatura para la Citogenética Humana (ISCN). El sistema numérico de bandas es necesario para un sistema uniforme de nomenclatura, sus principios se basan en las bandas principales que aparecen desde el centrómero hacia afuera a lo largo de cada brazo cromosómico (Vázquez *et al.*, 2011). El centrómero, telómeros y el punto medio de ciertas bandas son puntos de referencia (Grade *et al.*, 2015).

**Tabla 1. Clasificación de los cromosomas humanos**

<b>GRUPO</b>	<b>CROMOSOMAS</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
<b>Autosomas</b>		
<b>A</b>	1,2,3	Grandes, metacéntricos (cromosomas 1 y 3) Grande submetacéntrico (cromosoma 2).
<b>B</b>	4,5	Grandes, submetacéntricos
<b>C</b>	6,7,8,9,10,11,12	Medianos, submetacéntricos. Este es uno de los grupos más grandes y los cuales presentan mayor dificultad en la identificación de cromosomas individuales sin el uso de técnicas de bandeado.
<b>D</b>	13,14,15	Medianos, acrocéntricos, con satélites y NOR.
<b>E</b>	16,17,18	Pequeños submetacéntricos.
<b>F</b>	19,20	Pequeños, metacéntricos.
<b>G</b>	21,22	Pequeños, acrocéntricos, con satélites y NOR.
<b>Sexuales</b>	<b>X,Y</b>	X- mediano, submetacéntrico. Incluido en el grupo C, ya que se asemeja a los cromosomas más largos de este grupo. Y- pequeño, acrocéntrico incluido en el grupo G, sin satélites.

---

**NOR:** Región organizadora del nucléolo (Modificado de Shaffer & Tommerup, 2005).

Los métodos de bandas cromosómicas se basan en teñir cromosomas con un tinte o en el ensayo de una función particular. Las bandas que muestran tinción fuerte se conocen como bandas positivas; las que se tiñen débilmente son bandas negativas. Sin embargo, los patrones de tinción no son en blanco y negro, diferentes bandas se tiñen a diferentes intensidades (Bickmore, 2001).

**Bandeo Q:** Caspersson y sus colegas en 1970, desarrollaron un fluorocromo de unión al ADN con especificidad de base; el agente alquilante de guanina mostaza quinacrina, al observarlo con un microscopio de fluorescencia mostró bandas de diferente intensidad fluorescente, llamadas bandas Q (Acevedo, 2000). La quinacrina se intercala entre pares de bases adyacentes en el ADN independientemente de la secuencia. Los pares ricos de bases AT fluorescen intensamente con quinacrina, mientras que los ricos en pares de bases GC apagan la fluorescencia (Miller & Therman, 2001).

**Bandeo R:** La banda inversa, o banda R, fue descubierta por Dutrillaux y Lejeune en 1971, su técnica implica el pretratamiento con álcali caliente (80-90 °C) y la tinción posterior con Giemsa o el fluorocromo naranja de acridina, este método desnaturaliza preferentemente el ADN rico en AT y tiñe las regiones ricas en GC desnaturalizadas (Miller & Therman, 2001). El patrón de bandas R es el reverso al patrón de bandas Q o G, las bandas que son intensas en las bandas R son débiles en las bandas Q o G, y viceversa.

**Bandeo T:** Las bandas T son una modificación de la banda R, identifican un subconjunto de bandas R, que tiñen más intensamente empleando un tratamiento térmico más severo que identifica las bandas R más ricas en GC, tiñe principalmente las regiones cercanas a los extremos de muchos cromosomas en los telómeros, de ahí su nombre (Bickmore, 2001).

**Bandeo C:** Fue descubierto por accidente cuando las extensiones de cromosomas se calentaron para desnaturalizar el ADN para hibridación in situ. El bandeo C tiñe regiones muy ricas en heterocromatina (centrómero). Los cromosomas se tratan brevemente con ácido clorhídrico (HCl) y luego con una base como hidróxido de bario, Ba (HO)<sub>2</sub>, antes de teñirlos con Giemsa. Variaciones

extremas en los tamaños de bandas C no afectan el fenotipo, ya que el bandeo C tiñe heterocromatina constitutiva que no contiene genes y no transcribe (Miller & Therman, 2001).

**Bandas de alta resolución y replicación:** Los cromosomas profásicos y prometafásicos son mucho más largos que los cromosomas metafásicos, estas bandas de alta resolución pueden aumentar el número de bandas visibles a 850-1250. Los usos más importantes son el reconocimiento de cambios estructurales sutiles.

El método más común de bandas para la identificación de cromosomas (cariotipo) es el bandeo G (Bickmore, 2001).

## 1.7 Bando G

El bandeo G se descubrió por accidente durante los intentos de mejorar la banda C, en la década de 1970 las bandas Giemsa desplazaron rápidamente las bandas de Quinacrina. El bandeo G permite estudiar cada uno de los 46 cromosomas presentes en la célula considerando el patrón de bandas característico de cada cromosoma, para visualizar rearrreglos genómicos (Acevedo, 2000). Los cromosomas son pretratados con una solución salina a 60°C, o con una proteasa, como la **Tripsina**, y se tiñen con **Giemsa** o una tinción de cromatina comparable donde el ADN y proteínas interactúan con los componentes del colorante Giemsa, la Tiazina y Eosina, este método tiñe las regiones ricas en AT , lo que resulta en una serie de bandas e interbandas, que permiten, junto a la morfología general de cada cromosoma, su rápida identificación (Shaffer & Tommerup, 2005). Las técnicas de bandas de Tripsina-Giemsa (TG), requieren un cierto envejecimiento de las laminillas para obtener resultados óptimos (Speicher & Carter, 2005).

La mejora en la resolución de los análisis de cromosomas por bandas reveló en 1973, 13 años después de su descubrimiento inicial, que el cromosoma Filadelfia no fue el resultado de una eliminación en el cromosoma 22, sino de una translocación entre los cromosomas 9 y 22. Las bandas G producen esencialmente la misma información que las bandas Q, las bandas que fluorescen intensamente con quinacrina tiñen intensamente con Giemsa, mientras que las regiones Q-opacas son G-claras.

Cada método tiene sus ventajas, principalmente, las bandas G son permanentes y, por lo tanto, más adecuadas que las bandas Q evanescente para el trabajo de rutina (Shaffer & Tommerup, 2005).

El bandeo G, sugiere que existen variaciones tanto cualitativas como cuantitativas en la interacción del ADN y las proteínas a lo largo de los cromosomas en metafase. Las bandas oscuras contienen ADN rico en bases A-T son regiones de heterocromatina, la cual se encuentra más compactada y donde los procesos de síntesis y replicación se llevan a cabo en baja proporción, pobres en genes constitutivos que replica tardíamente; las bandas claras contienen ADN rico en G-C que replica tempranamente, son regiones de eucromatina la cual tiene una conformación más abierta debido a que se llevan a cabo una gran cantidad de procesos y tienen muchos genes constitutivos (**ver Figura 4**). Las bandas G contienen principalmente los isochores L1 y L2 (ricos en AT) y casi la mitad de los genes específicos de tejido. La histona H1 es más abundante en las bandas G que en las bandas R y está enriquecida en nucleosomas que contienen ADN metilado (Miller & Therman, 2001).

La resolución del bandeo G depende del grado de condensación, una resolución de 350 bandas corresponde a los cromosomas tardíos en la metafase. También se han producido ideogramas de alta resolución (aproximadamente 1250-2000 bandas) en la profase media. Una banda cromosómica de resolución de 2000 bandas puede contener 1,5 Mb de ADN, mientras que una resolución de 300 bandas contendrá 7-10 Mb de ADN. Un citogenetista experto puede detectar una alteración de 5–10 Mb de ADN dependiendo de su ubicación. Los ideogramas de cromosomas con banda G se usan como referencia estándar para bandas de cromosomas. Las bandas G generalmente se representan en negro y las bandas R en blanco y, están numeradas consecutivamente lejos del centrómero en los brazos cortos (p) y largos (q) ((Bickmore, 2001).

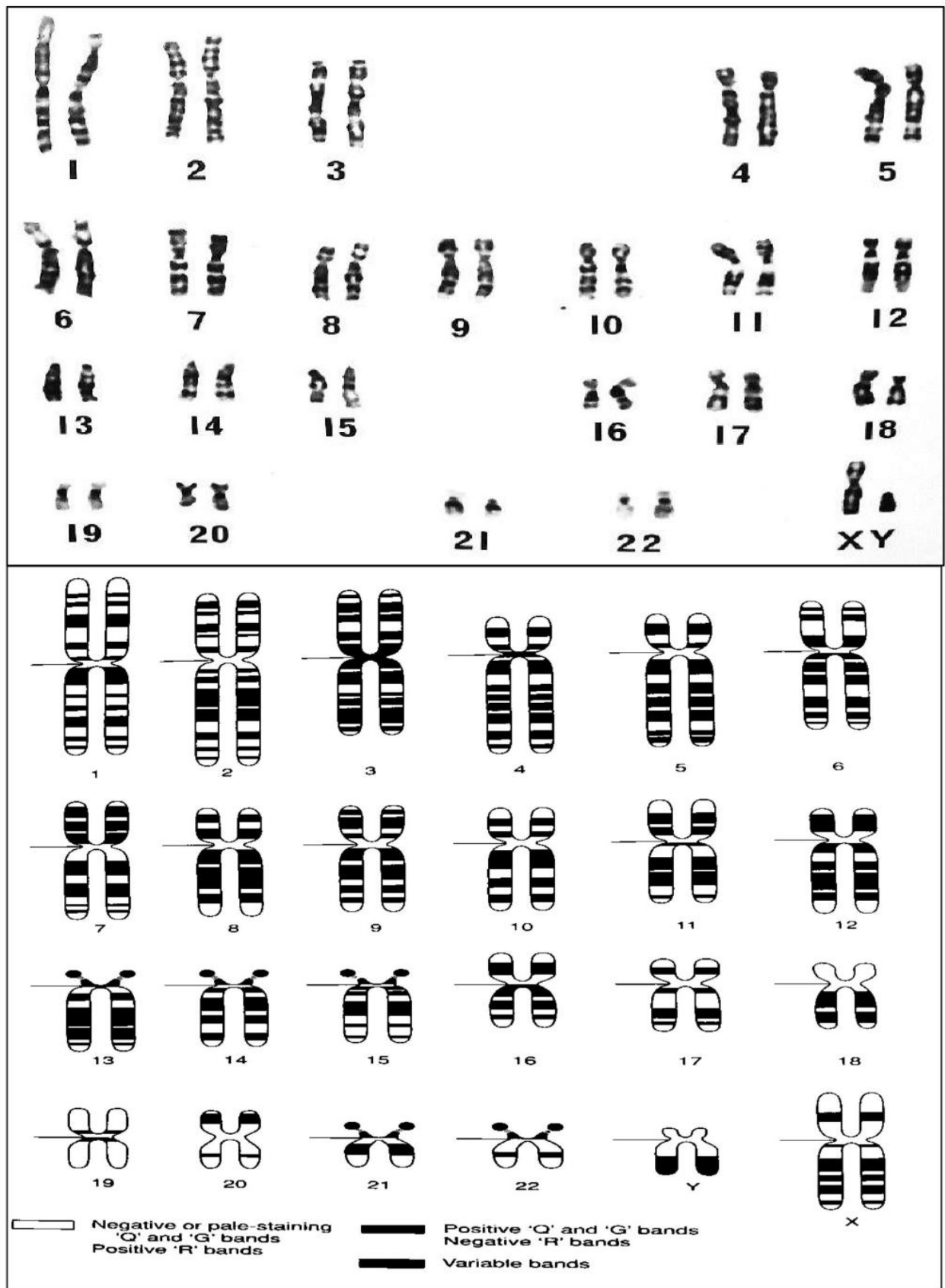


Figura 4. Bando GTG (Modificado de Wojciech *et al.*,2008).

## 1.8 Espermatogénesis

Las aberraciones cromosómicas constitucionales contribuyen a la infertilidad y al aborto espontáneo repetido que conduce a la falla reproductiva en las parejas. Estas aberraciones pueden no mostrar manifestaciones clínicas obvias y permanecer sin ser detectadas a través de múltiples generaciones. Sin embargo, la infertilidad o la pérdida de embarazo espontánea recurrente, y/o las aberraciones genotípicas/fenotípicas pueden manifestarse en la progeie durante la espermatogénesis (Gada *et al.*, 2012).

El desarrollo sexual masculino humano depende de las funciones coordinadas de varios órganos a lo largo del eje del tracto reproductivo hipotálamo-pituitario-gonadal. La regulación neuroendocrina por la liberación episódica de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), actúa de manera hipofisiotrófica para impulsar a la hipófisis anterior a secretar FSH y LH de manera pulsátil. La FSH, estimula las células de Sertoli y la LH se une a las células de Leydig por el receptor LH (LHR), para secretar andrógenos que actúan a través de receptores en las células de Sertoli (Bak *et al.*, 2010).

La espermatogénesis humana es el proceso por el cual se producen los espermatozoides, tiene una duración aproximada de 60- 75 días y depende de la acción coordinada de miles de genes específicos de los testículos para completar satisfactoriamente la meiosis. Ocurre en la periferia de los tubos seminíferos, la primera célula es una célula troncal derivada de las células germinales primordiales, denominada espermatogonia tipo A1, que a través de una división mitótica da origen a otra espermatogonia de tipo A1 y a una A2. A esta etapa le siguen las espermatogonias tipo A3 y A4. Las espermatogonias tipo A4 pueden seguir tres diferentes destinos: a) dar origen a otra espermatogonia tipo A4; b) desaparecer al entrar en apoptosis, o c) diferenciarse al primer tipo de célula precursora comprometida a convertirse en **espermatozoide** (Wojciech *et al.*, 2008).

Este último precursor se denomina espermatogonia tipo B y puede dividirse mitóticamente y diferenciarse en un espermatozocito primario que aún posee 46 cromosomas, estos entran en la primera división meiótica dando como resultado espermatozocitos secundarios que, de forma inmediata, entran en la segunda división meiótica o división reductiva en la que no hay fase S dando origen a células haploides denominadas espermátidas (Dada *et al.*, 2012). En las espermátidas redondas haploides, se

produce una remodelación nuclear global, dando lugar a espermátidas alargadas, las cuales también experimentan eventos de maduración durante el proceso de Espermiogénesis, que afectan más tarde la motilidad y capacidad de fertilización de los espermatozoides maduros (Yatsenko *et al.*, 2013). Durante la espermiogénesis, se distinguen cuatro etapas principales (**ver Figura 5**):

**Fase de Golgi:** Es la fase donde el aparato de Golgi migra cerca del núcleo y desprende vesículas para dar paso a la formación del Acrosoma. Comienza la formación del flagelo mediante la migración de un par de centriolos (Olivera *et al.*, 2006).

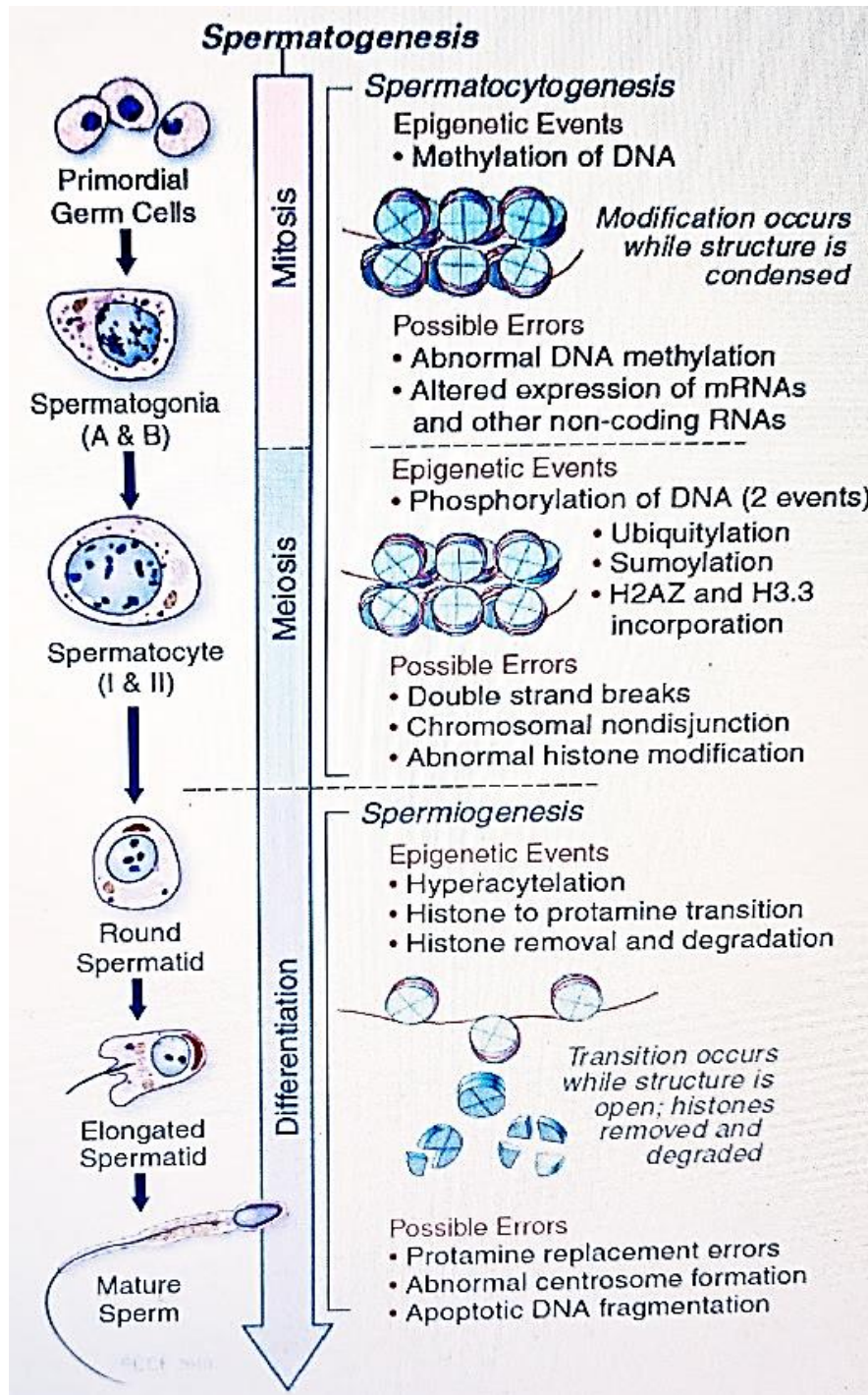
**Fase del Capuchón:** La vesícula acrosomal se aplana formando la capucha. También se da la sustitución de histonas por protaminas lo que da como resultado una mayor compactación del material genético y por consecuencia del núcleo, evitando la transcripción y la replicación dependiente de las modificaciones transcripcionales (Zamudio *et al.*, 2008). La incorporación de protaminas es importante para la formación de espermatozoides, la calidad del semen y proporciona seguridad al genoma (Dada *et al.*, 2012).

**Fase Acrosomal:** La espermátide gira de tal forma que el acrosoma queda en dirección de la membrana basal. Se depositan gránulos en el acrosoma, el citoplasma se desplaza hacia la base de la cabeza y se localiza por debajo de la unión núcleo-axonema; las mitocondrias se agrupan alrededor de la parte cercana al núcleo, formando parte de la pieza media. Uno de los centriolos pasa a formar la pieza media (Olivera *et al.*, 2006).

**Fase de Maduración:** En esta etapa se desarrollan las características finales, se adquiere la forma característica del espermatozoide y se elimina el citoplasma por desplazamiento hacia la pieza terminal de la cola originando la gota citoplasmática (Olivera *et al.*, 2006). El proceso de maduración termina con la espermiación, o liberación de los espermatozoides a la luz del tubo seminífero, posteriormente a los ductos eferentes y de ahí al epidídimo en cuya cola se almacenan. En los testículos, los espermatozoides son inmóviles o móviles in situ y no fecundantes (Poirot y Cherruau, 2005).



De cada espermatogonia tipo B se forman ocho espermatozoides con 23 cromosomas. El factor morfológico tipo BMP8b, es el factor maestro que inicia la espermatogénesis. La espermatogénesis humana es una serie compleja vulnerable a la acumulación de errores que podrían afectar todo el proceso (Barrios & Méndez, 2014).



**Figura. 5.** Proceso de espermatogénesis (Dada *et al.*, 2012).

La regulación epigenética del ADN a través del empaque nuclear en el esperma está relacionada con la función del esperma maduro. Tanto el complejo camino de la producción de esperma como el delicado equilibrio de los factores epigenéticos y genéticos durante la maduración de los espermatozoides contribuyen a la formación de un esperma maduro con la capacidad de fertilizar un ovocito y contribuir al desarrollo del embrión. Un defecto en cualquier paso puede manifestarse como infertilidad masculina. Los factores metabólicos, exposiciones ambientales, factores nutricionales, químicos y físicos tienen el potencial de alterar la expresión génica que pueden influir en los patrones de acetilación de histonas y metilación del ADN, dos marcas epigenéticas principales y, por lo tanto, producir espermiogénesis defectuosa, esterilidad masculina, mala calidad del semen, mayor daño en el ADN y disminución de la fertilidad (Dada *et al.*, 2012).

## **1.9 Espermiograma**

El semen es un líquido que contiene en suspensión a los espermatozoides, de los testículos, los espermatozoides son evacuados hacia el epidídimo y son almacenados en la cola del epidídimo. En el momento de la eyaculación, el líquido del epidídimo es expulsado por el conducto deferente que acaba en la ampolla deferente, después pasa por los conductos eyaculadores hasta la uretra prostática. Luego, en un segundo tiempo, al contraerse las vesículas seminales, se descarga su secreción en los conductos eyaculadores. En total, el volumen de esperma representa el 5% de la secreción epididimaria, el 30% es de secreción prostática y el 65% la secreción de las vesículas seminales. El plasma seminal es un medio rico y complejo, sirve a la vez de vehículo y de medio nutritivo y protector de los espermatozoides (Poirot y Cherruau, 2005).

El sistema reproductor masculino ha sido y sigue siendo atacado por químicos ambientales. La disminución de la calidad del esperma y la creciente prevalencia de anomalías genito-urinarias del llamado 'síndrome de disgenesia testicular, causado por exposición a altos niveles de químicos disruptores endocrinos, pueden tener consecuencias que incluyen la espermatogénesis. Las enfermedades sistémicas, los factores externos (como las drogas, el estilo de vida, etc.) o una combinación de estos también dan como resultado la subfertilidad masculina. La función defectuosa de los espermatozoides se ha identificado recientemente como la causa definida más frecuente de subfertilidad humana (Aitken *et al.*, 1989).

Los marcadores de la calidad del semen son medidas indirectas de la fecundidad de la pareja. El análisis del semen o también llamado seminograma o espermatobioscopia directa, es la prueba clínica más importante para diagnosticar trastornos reproductivos (te Velde & Bonde, 2013). La OMS estableció los parámetros básicos que se deben tomar en cuenta para realizar un estudio de muestras de semen y de espermatozoides (**ver Tabla 2**), el cual incluye un análisis macroscópico que comprende:

La **licuefacción** consiste en hacer la muestra más manejable para su análisis, una muestra licúa en aproximadamente 15-20 minutos a temperatura ambiente; la **viscosidad**, evalúa el modo en que el esperma gotea por efecto de la gravedad, el **volumen** del eyaculado normal se encuentra entre 1.5 y 6 mL. El **color** de un eyaculado normal es un aspecto blanco opalescente, ligeramente amarillento, finalmente el **pH** normal es de 7.2-8.0 (WHO, 2010).

Los parámetros microscópicos constan de la **motilidad**; este estudio es a la vez cuantitativo (estimación del porcentaje de espermatozoides móviles) y cualitativo (tipo de movimiento de los espermatozoides). Los móviles progresivos deben superar el 32% y según su tipo de movimiento se clasifican en: rápidos y progresivos (a), lentos y progresivos (b), móviles en el sitio (c) o inmóviles (d).

En la lectura de la movilidad de los espermatozoides es importante observar si existe aglutinación de espermatozoides, que son agrupaciones de espermatozoides unidos, que pueden tener un origen inmunológico (Poirot y Cherruau, 2005).

La **morfología** en un Espermiograma debe ser igual o más del 4% de espermatozoides normales. Si se encuentra por debajo de este valor se denomina Teratozoospermia. Las anomalías pueden ser en:

Cabeza: cabeza alargada, macrocéfalo, microcéfalo, múltiple, anomalías de la base, anomalía del acrosoma;

Pieza intermedia: presencia de un resto citoplasmático, pieza delgada y angulación;

Flagelo: ausente, corto, de calibre irregular, enrollado o múltiple.

La morfología anormal de los espermatozoides, un indicador de la producción o maduración alterada de los espermatozoides, también se correlaciona directamente con la calidad fecundadora. Por ejemplo, la ausencia de acrosoma en los espermatozoides es responsable de esterilidad (WHO, 2010).

La **concentración de células redondas** se evalúa ya que el eyaculado contiene siempre otras células además de los espermatozoides, células de la línea germinal y leucocitos, llamadas células redondas, si la concentración de leucocitos es superior a 1 millón por mL de muestra (Leucospermia) puede indicar una infección genitourinaria.

La **vitalidad** se expresa en porcentaje de espermatozoides vivos y debe superar el 58%. Se hace con la ayuda de un colorante vital que penetra las células muertas, pero no las células vivas. Para los espermatozoides, la tinción más utilizada es eosina-nigrosina, los espermatozoides rosados son los muertos, los vivos permanecen blancos (transparentes). Una disminución de la vitalidad, Necrozoospermia, se encuentra en las infecciones espermáticas o tiene causas tóxicas (Poirot y Cherruau 2005).

La **densidad** o concentración de espermatozoides se mide con la ayuda de un hemocitómetro, una muestra de esperma se diluye a un determinado título, en una solución que tiene también por objeto inmovilizar los espermatozoides. La dilución elegida está en relación con y adaptada a una primera evaluación del número de espermatozoides cuando se mide la movilidad, la medida de la concentración espermática indicará el estado de la espermatogénesis (Arenas *et al.*, 2009).

La concentración de espermatozoides se considera normal si el número de espermatozoides es superior a 20 millones de espermatozoides por mL de volumen eyaculado, e inferior a 200 millones por mL. Entre los problemas asociados con la concentración de espermatozoides, la oligozoospermia, es el recuento inferior a 20 millones/mL y en los casos más severos la Criptoospermia menos de 100,000 espermatozoides/mL. Si la concentración es superior a 200 millones/mL se habla de polizoospermia. La azoospermia es la ausencia de espermatozoides en el eyaculado (Simon *et al.*, 2011), y puede ser excretora con espermatogénesis normal pero obstaculizada en los conductos seminales, o secretora con defecto de espermatogénesis (Poirot y Cherruau, 2005). La disminución

del recuento de espermatozoides es un diagnóstico común y representa aproximadamente la mitad de todos los casos de infertilidad masculina (WHO, 2010).

**Tabla 2. Valores de referencia (1999) y los nuevos valores (2010) del Límite de Referencia Inferior (LRI) en espermiograma.**

<b>PARÁMETRO</b>	<b>1999, 4<sup>TA</sup> EDICIÓN</b>	<b>2010, 5<sup>TA</sup> EDICIÓN</b>
	<b>Valor de referencia</b>	<b>Límite inferior de referencia, LRI</b>
Licuefacción	Total a los 60 min	Total a los 60 min
pH	7.2-7.8	≥7.2
Volumen (mL)	2.0	1,5 (1.4- 1.7)
<b>Concentración espermática (x10<sup>6</sup>/mL)</b>	<b>20</b>	<b>15</b>
<b>Concentración total (x10<sup>6</sup>/ eyaculado)</b>	<b>40</b>	<b>39 (33-46)</b>
Motilidad total (%)	No detallada	40 (38-42)
Motilidad progresiva (%)	50	32 (31-34)
Viabilidad (%)	75	58 (55-63)
<b>Formas normales</b>	<b>15</b>	<b>4 (3-4)</b>
Leucocitos (x10 <sup>6</sup> /mL)	<1	<1

Entre paréntesis se muestra el intervalo de confianza del 95% (Modificado de Sarabia y Munuce, 2011).

### **1.10 Oligozoospermia**

La oligozoospermia es una deficiencia de semen común, las causas pueden ser múltiples, pero a menudo son de etiología desconocida, ya que las causas más comúnmente conocidas como infección, varicocele, toxicidad testicular, enfermedad reciente, endocrinopatía, autoinmunidad o trauma no siempre pueden identificarse en casos de oligospermia utilizando los criterios de diagnóstico disponibles. La mayor parte de las causas obstructivas son diagnosticadas por la bioquímica seminal y las causas secretoras por un estudio hormonal.

La etiología infecciosa es frecuente con la presencia de leucocitos, obstrucción unilateral y prostatitis. Hasta la fecha, se han identificado pocos defectos genéticos que causen esta afección. La oligospermia se puede clasificar en 3 grados según su gravedad: oligospermia leve, moderada y severa (**ver Tabla 3**) (Yatsenko *et al.*, 2013).

**Tabla 3. Tipos de Oligospermia**

<b>Nivel de oligospermia</b>	<b>Células (x10<sup>6</sup>/mL)</b>
Leve	$14 \leq 5$
Moderada	$4 \leq 1$
Severa	$< 1$

(Modificado de OMS, 2001).

La oligozoospermia grave se refiere a menos de 1 millón de espermatozoides/mL que implican una alteración de la espermatogénesis, en la oligozoospermia leve o moderada, algunos espermatozoides son funcionalmente normales. Una de las vías interrumpidas es la ubiquitinación de proteínas y la apoptosis celular, un posible gen candidato para la oligozoospermia severa en el hombre es *UBE2B*.

La oligozoospermia se asocia con una mayor frecuencia de anomalías cromosómicas de los espermatozoides (Martin *et al.*, 2003), los defectos genéticos más comunes son anomalías cromosómicas estructurales y numéricas que se diagnostican en hasta 10% de hombres con recuentos de espermatozoides inferiores a 5 millones/mL (Yatsenko *et al.*, 2013).

### 1.11 Polizoospermia

La polizoospermia es la presencia de más de 200 millones de espermatozoides por mL. Puede ser causa de esterilidad, una fertilidad reducida y mayores tasas de aborto espontáneo, ya que una concentración tan elevada de espermatozoides podría dificultar el movimiento progresivo de los mismos (Schill & Feifel, 1984). En muchos casos se asocia a una disminución del volumen del eyaculado, también a una insuficiente cantidad de fructuosa segregada por las vesículas seminales para poder mantener la motilidad (Arenas *et al.*, 2009).

En comparación con los hombres normozoospermicos, la actividad total de acrosina espermática disminuye considerablemente (-59,1 %), lo que indica un defecto funcional del potencial proteolítico del acrosoma espermático, donde la mayoría de los espermatozoides de los hombres polizoospermicos no experimentan la reacción acrosómica *in vitro*, esto hace que los espermatozoides sean incapaces de penetrar las inversiones externas del ovocito resultando en la reducción de la fertilidad (Töpfer-Petersen *et al.*, 1987).

Se han encontrado pacientes con recuentos de espermatozoides extremadamente altos (que van desde 650 millones/mL a 1.75 mil millones/mL), que tienen mala motilidad espermática asociada y mala migración espermática en las pruebas poscoitales, aunque los espermatozoides parecen morfológicamente normales (Adamopoulos, 2000).

Los trastornos en la concentración espermática se asocian con causas anatómicas (criptorquidia, hipospadias), endocrinas (hipogonadismo hipogonadotrópico) infecciosas (parotiditis postpuberal, enfermedades de transmisión sexual), nutricionales, traumáticas (consecuencia de cirugía inguinoescrotal), disfunciones sexuales; trastornos inmunológicos, lesiones neurológicas, factores ambientales como ciertos medicamentos, así como el tabaquismo, el estrés y el consumo de alcohol y otras drogas, también pueden involucrar trastornos de la espermatogénesis de origen genético.

Las causas genéticas se manifiestan en los pacientes afectados produciendo pocos o ningún espermatozoide o espermatozoides en número normal pero no fecundadores (WHO, 2010).

La cantidad de daño del ADN y el empaquetamiento anormal de cromatina son significativamente mayor en infértiles y pueden tener anormalidades en uno o varios parámetros del semen, con un recuento disminuido de espermatozoides, motilidad y morfología o en los tres parámetros principales (oligoasthenoteratozoospermia) (Dada *et al.*, 2012). A pesar de que se han hecho evaluaciones de variantes genéticas y de muchos genes candidatos potenciales que se han propuesto como causas de una reducción severa en el recuento de espermatozoides que afectan directamente a la espermatogénesis o la función de los espermatozoides. Aun no se ha identificado la base genética de los defectos en la espermatogénesis humana (Mitchell *et al.*, 2017).

Esto se debe en parte a que la espermatogénesis es un proceso altamente sofisticado que involucra vías moleculares complejas que requieren cientos de genes que son vulnerables a la acumulación de defectos tales como errores meióticos que podrían afectar todo el proceso espermatogénico. Además, considerando la participación no solo de genes espermatogénicos, sino también de sus elementos reguladores, es necesario comprender la compleja base genética de la infertilidad masculina (Song *et al.*, 2016).



## 1.12 Antecedentes

**Tabla 4. Antecedentes de estudios de aberraciones cromosómicas en individuos con trastornos reproductivos.**

<b>Tamaño de muestra</b>	<b>Alteraciones</b>	<b>Autores, año</b>
2196 hombres en un período de 3 años en Francia incluidos en los programas de ICSI	183 cariotipos aberrantes, lo que corresponde a una frecuencia de AC del 6.1 % (134/2196). 1.23 % (n = 27) para translocaciones recíprocas, 0.82 % (n = 18) para translocaciones robertsonianas, 0.13 % (n = 3) para inversiones, 3.32 % (n = 73) para aberraciones numéricas sexuales, el 0.40 % (n = 9) tenía una anomalía del cromosoma Y.	Gekas <i>et al.</i> , 2001
326 hombres infértiles: 204 con oligozoospermia, 87 con azoospermia y 35 con normozoospermia.	5 pacientes con oligozoospermia; 2 pacientes con 47,XXY, 2 pacientes con 47,XY,inv(14), 1 paciente con 46,XY,t(16p;1p).	Cortés-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2004
82 pacientes con oligozoospermia severa y azoospermia	9 de 82 (11 %) parejas presentaron aberraciones cromosómicas.	Martínez-Garza <i>et al.</i> , 2008
28 hombres con trastornos de la fertilidad	55.22 % de los pacientes presentó 47, XXY, 20.83 % con mosaicismo de igual fórmula cromosómica, 12.51 % de estos pacientes presentan AC estructurales, específicamente translocaciones e inversiones.	Pimentel <i>et al.</i> , 2011
2000 parejas de etnia India con insuficiencia reproductiva	110 (2.78 %) parejas con aberraciones cromosómicas, estructurales en 88 casos, 56 casos translocaciones recíprocas, 16 casos translocaciones Robertsonianas, 8 casos inversiones, 3 casos deleciones, 5 casos cromosomas derivados y 23 casos AC numéricas.	Gada <i>et al.</i> , 2012
115 portadores de translocaciones del noreste de China	5,9 % de los portadores varones tenían azoospermia, 43.1 % oligozoospermia, La translocación del cromosoma 5 más común fue t(4,5), observada en 13 pacientes.	Zhang <i>et al.</i> , 2018

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Los trastornos en la reproducción masculina son un problema importante que afecta hasta al 15% de las parejas en edad reproductiva, el 30-50% por un factor masculino. Aunque estos trastornos son multifactoriales, las causas genéticas son predominantes en al menos el 5% de los casos (Martín, 2008), directamente relacionado con la presencia de aberraciones cromosómicas. Cuando estas alteraciones coexisten en las células germinales pueden transmitirse a los gametos y a la descendencia. La mala calidad del semen es un factor que contribuye y de acuerdo con la OMS (2010) va a la alta en los últimos años, a pesar de que se han propuesto variantes genéticas que afectan directamente a la espermatogénesis o la función de los espermatozoides como causas de una reducción en el recuento de espermatozoides, el 15% de las parejas quedan con un diagnóstico idiopático (Song *et al.*, 2016) y mecanismos que aún no están claros, por lo tanto, identificar la base genética en individuos jóvenes con problemas de densidad espermática, como la polizoospermia y oligozoospermia, significa un avance importante en la reproducción masculina que requiere evaluación y seguimiento.

## **3. HIPÓTESIS**

Las anomalías cromosómicas somáticas se asocian a casos de trastornos en la reproducción masculina, las cuales son más frecuentes a medida que se ve alterado el recuento de espermatozoides, afectando la concentración espermática, por lo tanto, al ser una condición fuertemente asociada a la presencia de aberraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales, se espera un aumento de las frecuencias en los grupos de individuos con oligozoospermia y polizoospermia.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Establecer relación entre la presencia de aberraciones cromosómicas numéricas y/o estructurales utilizando bandeado GTG en linfocitos de sangre periférica de jóvenes estudiantes de la FES Zaragoza con recuentos de densidad espermática no estándar (oligozoospermia y polizoospermia).

### **4.2 Objetivos Particulares**

Evaluar la calidad seminal de jóvenes estudiantes de la FES Zaragoza, que cumplan con los criterios de inclusión, para conformar los grupos de trabajo (control, con oligozoospermia y polizoospermia).

Evaluar el índice mitótico en los cultivos de linfocitos, para observar el comportamiento de división celular de las muestras.

Analizar las AC numéricas y estructurales en metafases de individuos control, con oligozoospermia y polizoospermia.

Determinar si hay relación entre los problemas en la densidad espermática y la presencia o incremento de ACE y ACN analizadas.

## 5. MATERIAL Y MÉTODO

### 5.1 Espermatobioscopia

Para el presente estudio se analizaron muestras seminales mediante espermatobioscopia directa en individuos con edad de 18 a 29 años, estudiantes de la Fes Zaragoza, con tres a cinco días de abstinencia sexual y sin enfermedades diagnosticadas, todos los donantes firmaron un consentimiento informado, posterior a esto llenaron un cuestionario de tamizaje con preguntas generales de salud, antecedentes de enfermedad crónica o medicación, hábitos y estilo de vida.

La muestra se obtuvo por automasturbación en un frasco nuevo, estéril y desechable, se incubaron por 45 min a 37 °C para licuar, una vez transcurrido este tiempo se evaluaron los parámetros fisicoquímicos (macroscópicos/semicualitativos) color, olor, pH, viscosidad y volumen según las directrices de la OMS (1999). Después la muestra se colocó en crioviales de 1.5 mL y se evaluaron los parámetros citológicos (microscópicos/cuantitativos) concentración de espermatozoides, porcentaje de: espermatozoides móviles totales, de morfología y, de espermatozoides vivos por tinción vital.

**Densidad:** Se tomaron 10 µL de semen homogeneizado y se mezclaron con 10 µL de H<sub>2</sub>O destilada en un eppendorff, esta mezcla se colocó en un hemocitómetro cubriendo las dos cámaras para realizar la lectura de ambas en un microscopio de contraste a 40x, de acuerdo a la **tabla 5**.

**Tabla 5. Conteo de espermatozoides para hemocitómetro.**

Número de espermatozoides/cuadrícula central	Número de cuadros grandes a contar
<10 espermatozoides	Todos (25)
10-40 espermatozoides	10
>40 espermatozoides	5

Se calculó el promedio de los conteos de ambas cámaras del hemocitometro. El promedio se dividió entre el factor de conversión que se obtuvo de acuerdo con la dilución usada y los cuadros evaluados (**ver Tabla 6**). El resultado se multiplicó por  $10^6$  para obtener el valor de la densidad por mL. Finalmente, para obtener la cuenta espermática total por eyaculado, se multiplicó la densidad/ mL por el volumen total de la muestra.

**Tabla 6. Factores de conversión**

Dilución	Número de cuadros grandes contados		
Semen: diluyente	25	10	5
1+9	10	4	2
1+19	5	2	1

**Viabilidad:** Se tomaron 10  $\mu$ L de semen homogeneizado con una micropipeta y se mezclaron con 10  $\mu$ L de eosina al 0.5 %, se dejó reposar por 2 minutos y se colocó una gota en un portaobjetos limpio, se observaron al microscopio a 40x y se realizaron dos conteos de 200 células donde las células teñidas se cuentan como células muertas y las que no se teñieron se contaron como vivas.

**Progresión:** Se colocaron 10  $\mu$ L de semen homogenizado y se mezclaron con 10  $\mu$ L de solución isotónica. Se resuspendió la muestra y se colocó una gota en un portaobjetos limpio, se observó al microscopio a 40x y se realizaron dos conteos de 200 células evaluando el movimiento rápido, lento, *in situ*, y los espermatozoides sin movimiento.

**Morfología:** Se tomaron 10  $\mu$ L de semen homogenizado y 10  $\mu$ L de paraformaldehído, se colocó una gota en un portaobjetos, se hicieron dos conteos de 200 células evaluando defectos en la cabeza, pieza media y flagelo en orden decreciente de prioridad. A la par del análisis de la morfología se

evaluaron las células redondas (**CR**) en conteos independientes y se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\mathbf{CR = (n/400) D}$$

donde:

**n** = suma de células redondas observadas en los dos conteos.

**D** = densidad espermática por mL.

Ambas lecturas se realizaron en un microscopio de contraste de fases a 40x.

## **5.2 Cultivo de linfocitos de sangre periférica para obtención de cromosomas metafásicos.**

### **Siembra de linfocitos:**

A todos los donadores se les tomó una muestra de 3 mL de sangre periférica con una jeringa previamente heparinizada (Pissa México), posteriormente se colocaron 10 gotas de muestra en tubos de cultivo estériles, con 5 mL de medio de cultivo RPMI1640 (Sigma-Aldrich, USA) se estimularon con 1 mL de fitohemaglutinina (agente mitótico, Sigma-Aldrich, USA) y se usó 1 mL de Gentamicina (antibiótico) (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, USA) todo el procedimiento se realizó en condiciones estériles. Los cultivos se incubaron por 48 horas a 37°C, media hora antes de cumplirse las 48 horas se les agregó 150 µL de Colcemida (Gibco KaryoMAX, USA).

### **Cosecha:**

Una vez transcurridas las 48 hrs de cultivo, se les adicionó solución hipotónica KCl (Baker México) (0.075 M) previamente incubada a 37°C y se mantuvieron en baño maría durante 40 min. Para la fijación se usaron 5 mL en cada tubo de solución de Carnoy 3:1 (metanol: ácido acético glacial, frío, V/V) (Merck, Alemania), durante 10 min, la muestra se centrifugó y se retiró el sobrenadante, este paso se repitió 3 veces hasta obtener el botón celular, por último, la muestra se goteo en portaobjetos fríos y se observaron al microscopio en contraste de fases 20 y 40x, para establecer la calidad de las preparaciones.

### 5.3 Bando GTG

El análisis Citogenético de **bandas G** convencional se realizó en laminillas con cromosomas en metafase que se sometieron a tratamiento con Tripsina/EDTA (Gibco Alemania) (0.05 %) con pH 7.0 durante 30 segundos, después se colocaron en una caja Coplin de enjuague seguida de otra de hidratación con Buffer Gürr (Gibco Alemania) (pH 6.8) por 5 minutos en cada una, posteriormente se tiñeron con Giemsa (Sigma USA) (38 mL de buffer Sorensen: 12 mL de Giemsa) durante 3 minutos, y finalmente se hizo un enjuague con agua corriente y agua destilada (**ver Figura 6**), y se observaron en un microscopio de campo claro a 100x.

Se analizaron 30 metafases por individuo, se contabilizaron las metafases que tuvieran un buen contraste de bandas y cumplieran con el criterio de análisis de cromosomas. La nomenclatura del cariotipo se describió de acuerdo con el Sistema Internacional para la Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN2009). El nivel de resolución del análisis cromosómico fue de 400 a 550 niveles de banda y se registraron en las hojas de detección.



Figura 6. Tren de Bando GTG

## 5.4 Análisis Estadístico

Para la calidad seminal se usó una prueba “t” de Student y Z de proporciones para validar los individuos con oligozoospermia y polizoospermia en relación con el grupo control y con los parámetros seminales estándares establecidos por la OMS (1999).

En el análisis estadístico de aberraciones cromosómicas, se aplicó  $X^2$  con corrección de Yates (Chi-cuadrada-Y), para evaluar las diferencias en la frecuencia de ACN y ACE entre los hombres con oligozoospermia, polizoospermia y los controles.

Por último, para estimar la relación entre las AC (numéricas y/o estructurales) y la densidad espermática (oligospérmicos y polispermicos) se realizó análisis de varianza seguida de Tukey (ANOVA-TUKEY). Los datos con  $p < 0.05$  se establecerán como significativos.

<b>Parámetro</b>	<b>Prueba estadística</b>
<b>Calidad seminal valores macroscópicos</b> (%, media $\pm$ error estándar)	
<i>Morfología</i> <i>Viabilidad</i> <i>Progresión</i>	<i>Z de proporciones</i>
<i>Densidad espermática</i>	<i>“t” de Student</i>
<i>Aberraciones cromosómicas</i>	<i>Chi-cuadrada-Y</i>
<i>Aberraciones cromosómicas/ Densidad espermática</i>	<i>Análisis de varianza (ANOVA-TUKEY).</i>

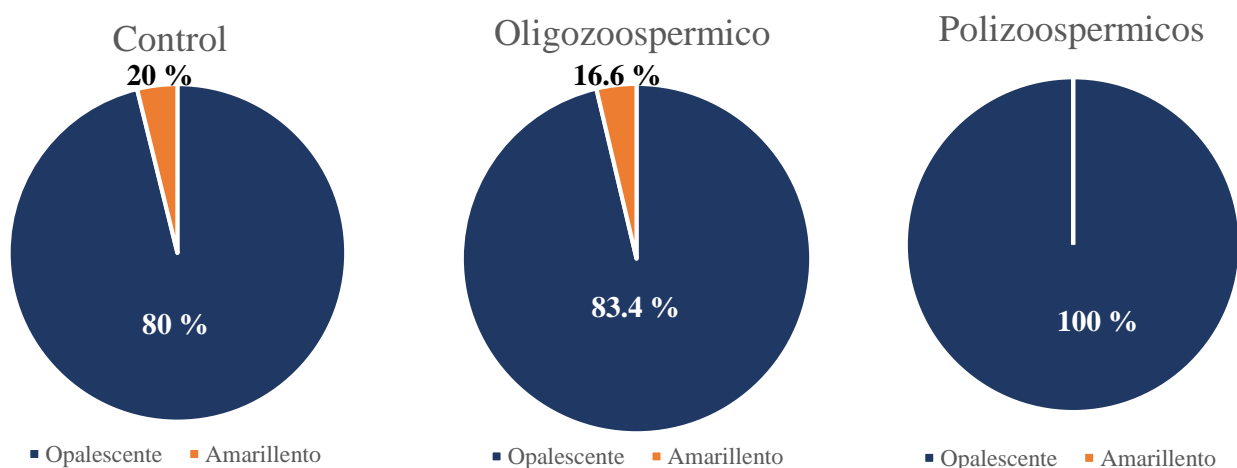


## 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se analizaron las muestras seminales de estudiantes de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, que cumplían con los criterios de inclusión, del total de estas muestras se seleccionaron 10 individuos con valores seminales dentro de los parámetros estándar establecidos por la OMS (1999), para formar el grupo control, 6 individuos que presentaban una densidad menor a los 20 millones por mL conformaron el grupo con oligozoospermia y se encontraron 4 individuos con una densidad mayor a 200 millones por mL para formar el grupo con polizoospermia. Todas las muestras cumplieron con el tiempo establecido de licuefacción de 45 min. Los valores seminales macroscópicos (color, olor, viscosidad, pH y volumen) obtenidos en las espermatobioscopias para el grupo con normozoospermia, oligozoospermia y polizoospermia, se presentan a continuación:

### Color:

El **color** se evaluó como opalescente o amarillento, un color opalescente en la muestra es considerado como normal de acuerdo a la OMS, en el grupo control como en el grupo de oligozoospermia se obtuvo un porcentaje mayor de muestras con color opalescente con 80% y 83.4% respectivamente, en comparación con un pequeño porcentaje de coloración amarillenta (**ver Figura 7**). En el grupo con polizoospermia el color opalescente se observó en todas las muestras, una coloración amarillenta puede tener varias causas desde periodos largos de abstinencia, como la presencia de leucocitos en la muestra que indicarían alguna infección urogenital, en algunos casos también se puede asociar al estilo de vida como el consumo de sustancias nocivas, la dieta o deshidratación.



**Figura 7.** Porcentaje de los valores del color en muestras control, con oligozoospermia y polizoospermia.

### Viscosidad:

Para observar la **viscosidad** se tomó la muestra con una pipeta serológica y se dejó caer en el recipiente para evaluar la forma en que el esperma gotea por efecto de la gravedad, ya sea, en gota o hilo. Una viscosidad en gota se considera normal. Si la forma del goteo es en hilo se considera anormal cuando el filamento es más grande de 2 cm o si la muestra no gotea, ya que puede interferir con la determinación de la motilidad y la concentración de espermatozoides. Los tres grupos presentaron un mayor porcentaje de muestras con viscosidad en gota con un 60 %, 66.6 % y 100 % respectivamente (ver Figura 8).

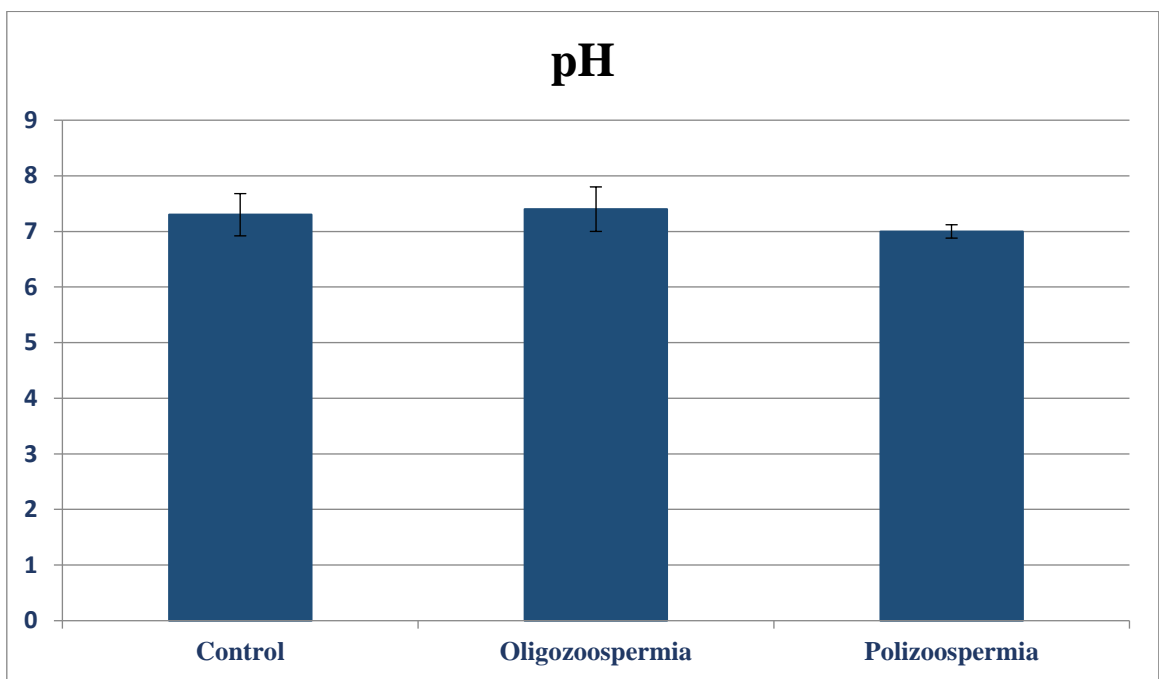


**Figura 8.** Porcentaje de los valores de viscosidad en muestras control (normozoospermicos), con oligozoospermia y polizoospermia.

### pH:

El **pH** se evaluó con ayuda de un potenciómetro, considerándose como estándar un pH entre 7.0-8.0. Un pH inferior a 7 sugiere una agenesia vesículo-deferente y un pH superior a 8 puede hacer referencia a un problema de la próstata. La media del pH en polizoospermicos fue de 7, seguido por el grupo control con 7.3 y por último el grupo con oligozoospermia con 7.4, los tres grupos se encontraron dentro del pH estándar establecido por la OMS (1999) (ver Figura 9).

PARÁMETRO	CONTROL/OMS Media±EE	OLIGOZOOSPERMIA Media±EE	POLIZOOSPERMIA Media±EE
pH	7.3± 0.38	7.4± 0.4	7± 0.12

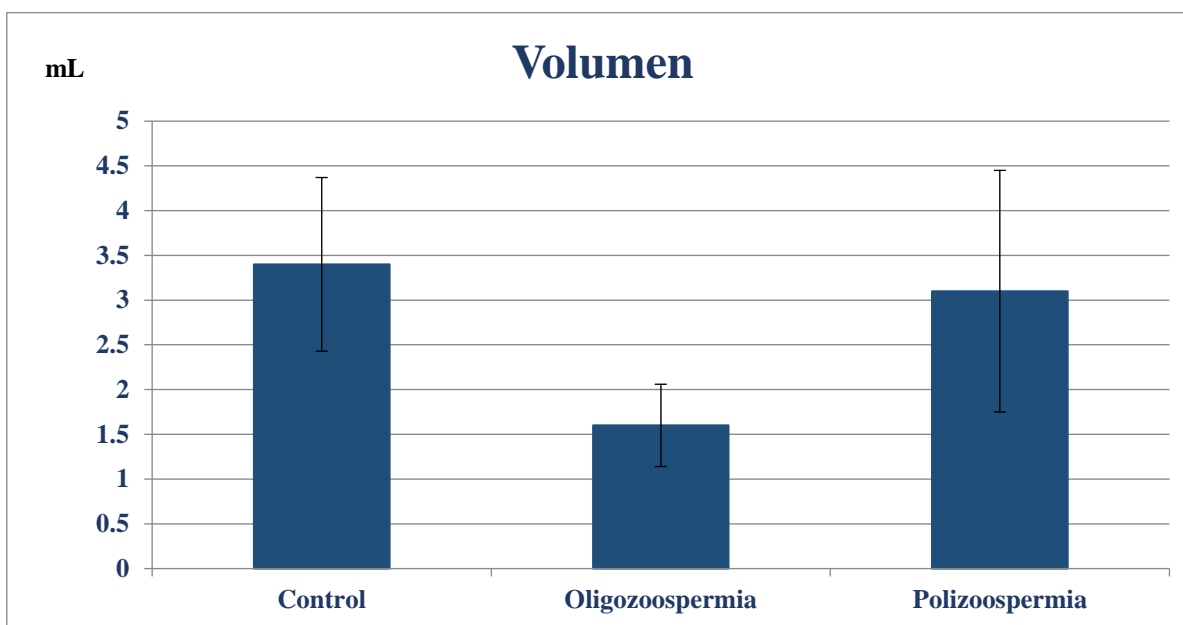


**Figura 9.** Valores de pH en el grupo control, con oligozoospermia y polizoospermia.

## Volumen

El **volumen** se midió con ayuda de una pipeta serológica, el volumen más pequeño se observó en oligozoospermicos con una media de 1.6 mL y el grupo con polizoospermia presento 3.1 mL. El volumen más alto lo tuvo el grupo control con 3.4 mL. El volumen medio normal de una muestra debe encontrarse entre 2 y 6 mL. Un eyaculado de gran volumen evoca la posibilidad de un varicocele. Un volumen inferior a 2 mL podría deberse a una eyaculación incompleta, una infección de la vía seminal, una agenesia epidídimo deferente o una eyaculación retrógrada parcial. El grupo con polizoospermia se encuentra dentro del estándar, el grupo con oligozoospermia presenta una disminución respecto del grupo control y de lo establecido por la OMS (**ver Figura 10**).

PARÁMETRO	CONTROL/OMS Media±EE	OLIGOZOOSPERMIA Media±EE	POLIZOOSPERMIA Media±EE
VOLUMEN (mL)	3.4± 1.97	1.6± 0.46	3.1± 1.35



**Figura 10.** Resultados del volumen en muestras seminales de controles, oligozoospermia y polizoospermia.

En la **tabla 7** los valores citológicos obtenidos (densidad, morfología, viabilidad y progresión) para los tres grupos se presentan en media ( $\pm$  error estándar). Los resultados de densidad, en el grupo con polizoospermia tuvieron un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) con  $325.60 \times 10^6$  cel/mL, así como, una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en el grupo con oligozoospermia con  $9.77 \times 10^6$  cel/mL, respecto del grupo control con  $89.18 \times 10^6$  cel/mL y del valor establecido por la OMS (1999). La densidad más baja que se observó dentro de los grupos fue de  $1.45 \times 10^6$  cel/mL en el donador NN- 324, que representaría un caso de oligozoospermia clasificado como grave, por otro lado, la densidad más alta se observó en el individuo NN-300 con  $414 \times 10^6$  cel/ mL.

**Tabla 7. Valores citológicos de la OMS, de individuos normozoospermicos, oligozoospermicos y polizoospermicos.**

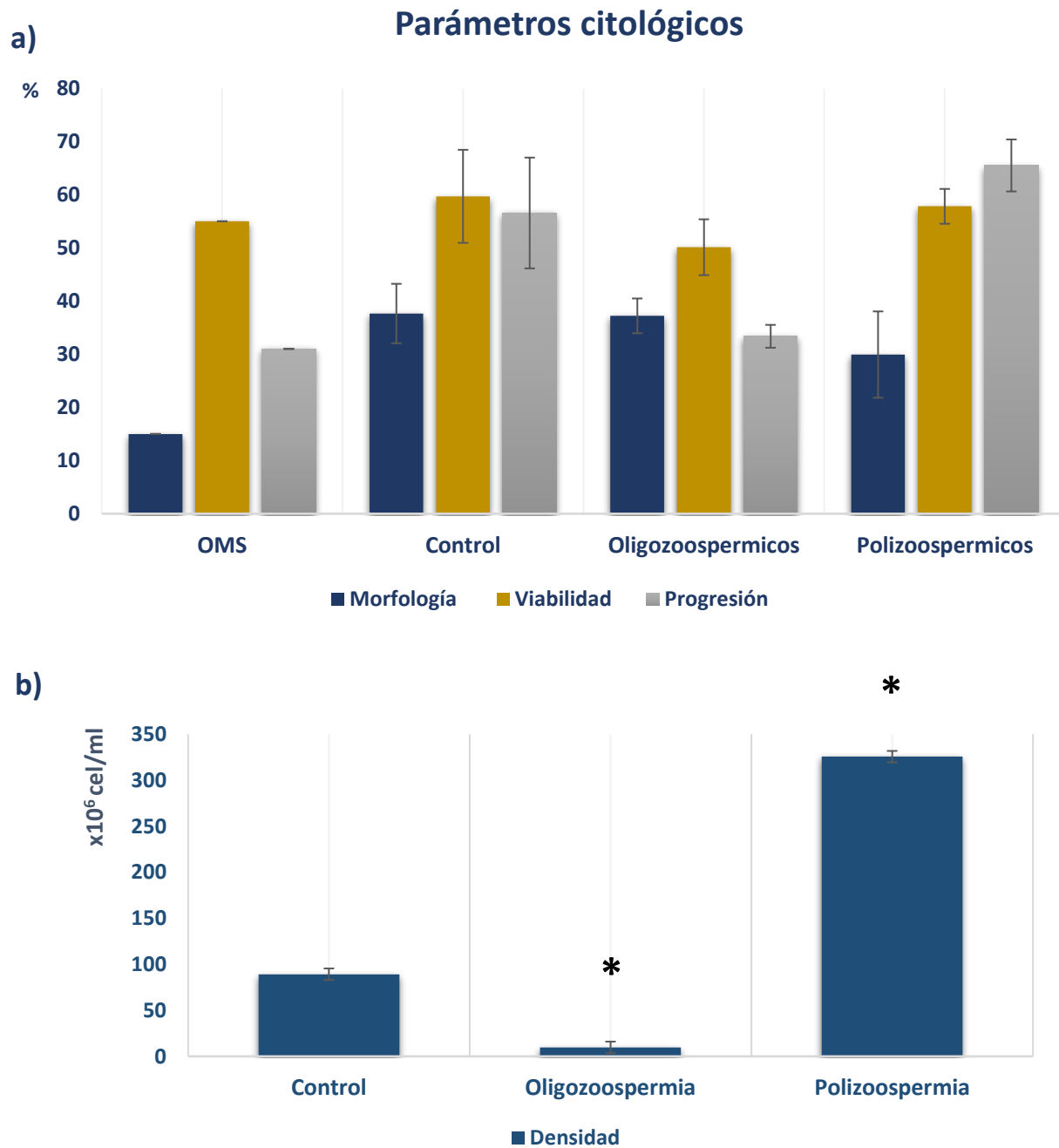
<i>Grupo</i>	<b>OMS 1999</b>	<b>Controles (X±EE)</b>	<b>Oligozoospermico (X±EE)</b>	<b>Polizoospermico (X±EE)</b>
<b>N</b>	-	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>4</b>
<b><sup>a</sup>Densidad (x10<sup>6</sup>cel/mL)</b>	<b>20-200</b>	<b>89.18±6.27</b>	<b>9.77±7.53*</b>	<b>325.60±3.20*</b>
<b><sup>b</sup>Morfología (%)</b>	15	37.65±5.59	37.21±3.27	29.93±8.12
<b><sup>b</sup>Viabilidad (%)</b>	55-63	59.69±8.75	50.12±5.25	57.81±3.28
<b><sup>b</sup>Progresión (%)</b>	31-34	56.56± 10.42	33.37±2.15	65.50±4.89

EE: error estándar, N: tamaño de la muestra

<sup>a</sup>t de Student \*p< 0.05.

<sup>b</sup>Z para proporciones \* α=0.05.

Para la morfología el porcentaje de formas normales en el grupo control, con oligozoospermia y polizoospermia se encontraron por encima del 15%, mínimo establecido como normal por la OMS (1999); con 37.65 %, 37.21 % y 29.93 % respectivamente. La viabilidad de igual forma presentó medias arriba de los valores de referencia. Por último, los resultados de los valores de progresión en el grupo control y con polizoospermia fueron normales, en el grupo con oligozoospermia se encontró una disminución de la progresión, sin embargo, al aplicar la prueba Z para proporciones con un nivel de significancia del 95 %, no se observó diferencias significativas entre grupos.



**Figura 11.** Valores citológicos en grupo control, con oligozoospermia y polizoospermia; a) morfología, viabilidad y progresión; Z para proporciones  $\alpha=0.05$ , b) densidad; t de Student  $*p < 0.05$ .

### Índice mitótico y Aberraciones cromosómicas

En el grupo control, el índice mitótico (IM) tuvo una media de 1.9. En el análisis Citogenético de Bando GTG se analizaron 30 metafases por individuo con un total de 300 metafases en el grupo control, con presencia de aberraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales, así como metafases con un cariotipo normal. Las muestras NL-8, NL-104, NL-228, y NL- 239 presentaron ACN, con monosomías del cromosoma 10, 15, 12, 21 y 13 y las trisomías de los cromosomas 17, 14 y 13. El individuo NL-237 fue el único individuo con ACN (aneuploidía del cromosoma 12) y ACE, que implica la delección del cromosoma 2 en el brazo p. Las muestras restantes presentaron un cariotipo normal en todas las metafases analizadas (ver Tabla 10) (ver Figura 13).

**Tabla 8. Índice mitótico y frecuencia de aberraciones cromosómicas en individuos con calidad seminal estándar (Grupo control).**

Individuo (control)	IM (%)	Cariotipo normal Frecuencia/ (%)	ACN Frecuencia/ (%)	ACE Frecuencia/ (%)	Total de metafases
NL-8	2.3	29	(1) 45,XY,-10	-	30
NL-104	2.3	29	(1) 45,XY,-21	-	30
NL-228	2.5	25	(1) 45,XY,-15 (1) 45,XY,-20 (1) 45,Y,+17 (1) 47,XY,+14 (1) 47,XY,+13	-	30
NL-237	2.0	28	(1) 44,XY,-2,-12	(1)46,XY,Del(2)(p)	30
NL-238	0.6	30	-	-	30
NL-239	1.3	29	(1) 45,XY,-13	-	30
NL-243	1.4	30	-	-	30
NL-257	1.9	30	-	-	30
NL-268	1.9	30	-	-	30
NL-327	3.0	30	-	-	30
TOTAL	-	<b>290 (96.66)</b>	<b>9 (3)</b>	<b>1(0.33)</b>	-
X± EE	1.9±0.7	29±1.5	0.9±1.4	0.1±0.3	

NL: calidad seminal estándar, ACN: Aberraciones cromosómicas numéricas, ACE: Aberraciones cromosómicas estructurales, EE: error estándar.

**Tabla 9. Frecuencia de aberraciones cromosómicas en individuos con oligozoospermia y polizoospermia.**

Grupo	Individuo	IM (%)	Cariotipo normal Frecuencia/ (%)	ACN Frecuencia/ (%)	ACE Frecuencia/ (%)	Total de metafases
<b>Oligozoospermicos</b>	<b>NN-271</b>	0.9	22	(1) 45,XY,-12 (2) 45,XY,-16 (2)44,XY,-10, -15 (1)45,XY,-15, -18	(2)46,XY,Del( 2)(p)	30
	<b>NN-280</b>	1.1	27	(2) 45, XY, -15 (1) 45, XY, -12	-	30
	<b>NN-282</b>	0.5	3.0	(1) 45,XY,-16 (1)44,XY, -15,-18	(25)46,XY,Inv(16)(q)	30
	<b>NN-285</b>	0.9	24	(2) 45, XY, -16 (2) 45, XY, -12 (2) 45, XY, +21	-	30
	<b>NN-292</b>	1.9	28	(1) 45,XY,-12 (1) 45,XY,-15	-	30
	<b>NN-324</b>	4.0	20	-	(10)46, XY,dup (5)(p)	30
<b>TOTAL X± EE</b>		<b>1.5± 1.2</b>	<b>124 (68.88)</b> 20.6±9.1	<b>19 (10.55)</b> 3.1±2.4	<b>37 (20.55)</b> 6.1±10.0	<b>180</b>
<b>Polizoospermicos</b>	<b>NN-244</b>	2.3	26	(1) 45, XY, -22 (1) 45, XY, -12 (2) 45, XY, -9	-	30
	<b>NN-247</b>	1.4	30	-	-	30
	<b>NN-261</b>	1.0	30	-	-	30
	<b>NN-300</b>	1.0	22	(1) 45,XY,-22 (2) 45,XY,-20 (1) 45,XY,-9 (1) 44,XY,-9,-15 (1) 44,XY,-17,-12 (2) 44,XY,-10,-16	-	30
	<b>TOTAL X± EE</b>		<b>1.4±0.6</b>	<b>108(90)</b> 27±2.5	<b>12 (10)</b> 3±3.8	<b>0 (0)</b> 0±0

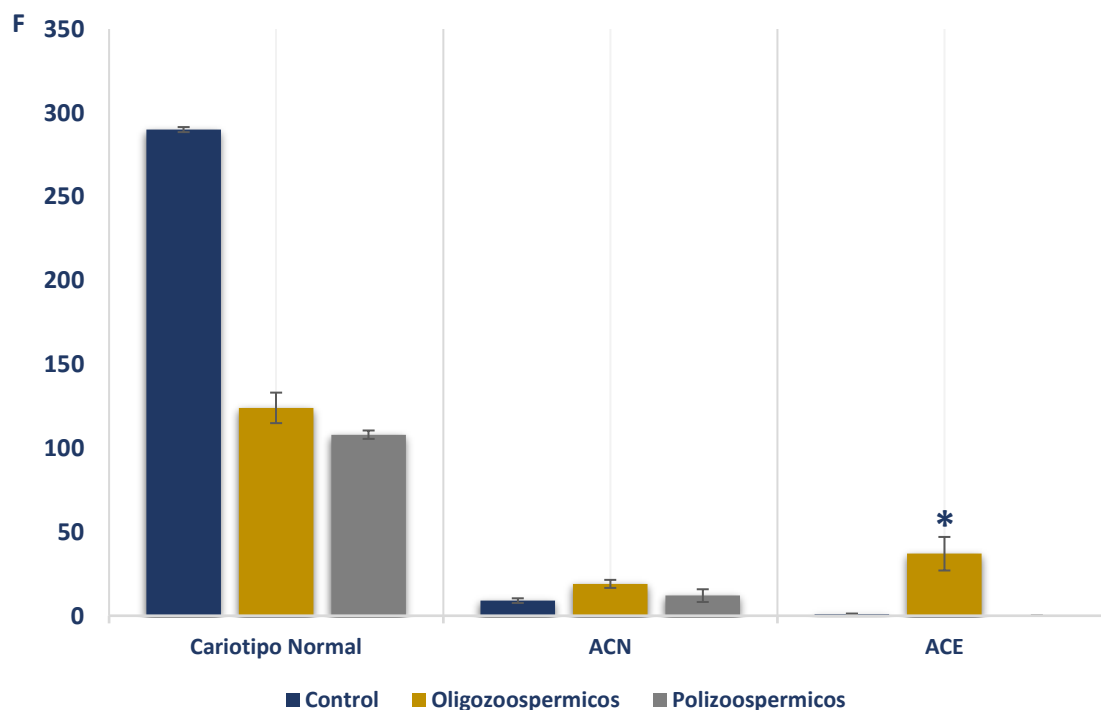
NN: calidad seminal no estándar, ACN: Aberraciones cromosómicas numéricas, ACE: Aberraciones cromosómicas estructurales, IM: Índice mitótico, EE: error estándar.



**Tabla 10. Frecuencia y porcentaje de aberraciones cromosómicas de individuos control, oligozoospermicos y polizoospermicos.**

Calidad Espermática (Grupos)	IM (%)	Cariotipo normal Frecuencia (%)	ACN Frecuencia (%)	ACE Frecuencia (%)	Total de metafases
Control	1.9	290 (96.66)	9.0 (3.00)	1.0 (0.33)	300
Oligozoospermicos	1.5	124 (68.88)	19 (10.55)	37 (20.55) *	180
Polizoospermicos	1.4	108 (90.00)	12 (10.0)	0.0 (0.0)	120
<b>TOTAL X ± EE</b>	- 1.6±0.2	<b>522(87)</b> 174±100.7	<b>40(6.66)</b> 13.33±5.1	<b>38(6.33)</b> 12.66±21.07	<b>600</b> -

IM: Índice Mitótico, ACN: Aberraciones cromosómicas numéricas, ACE: Aberraciones cromosómicas estructurales. EE: error estándar,  $X^2$ /Yates \* $p < 0.05$ .



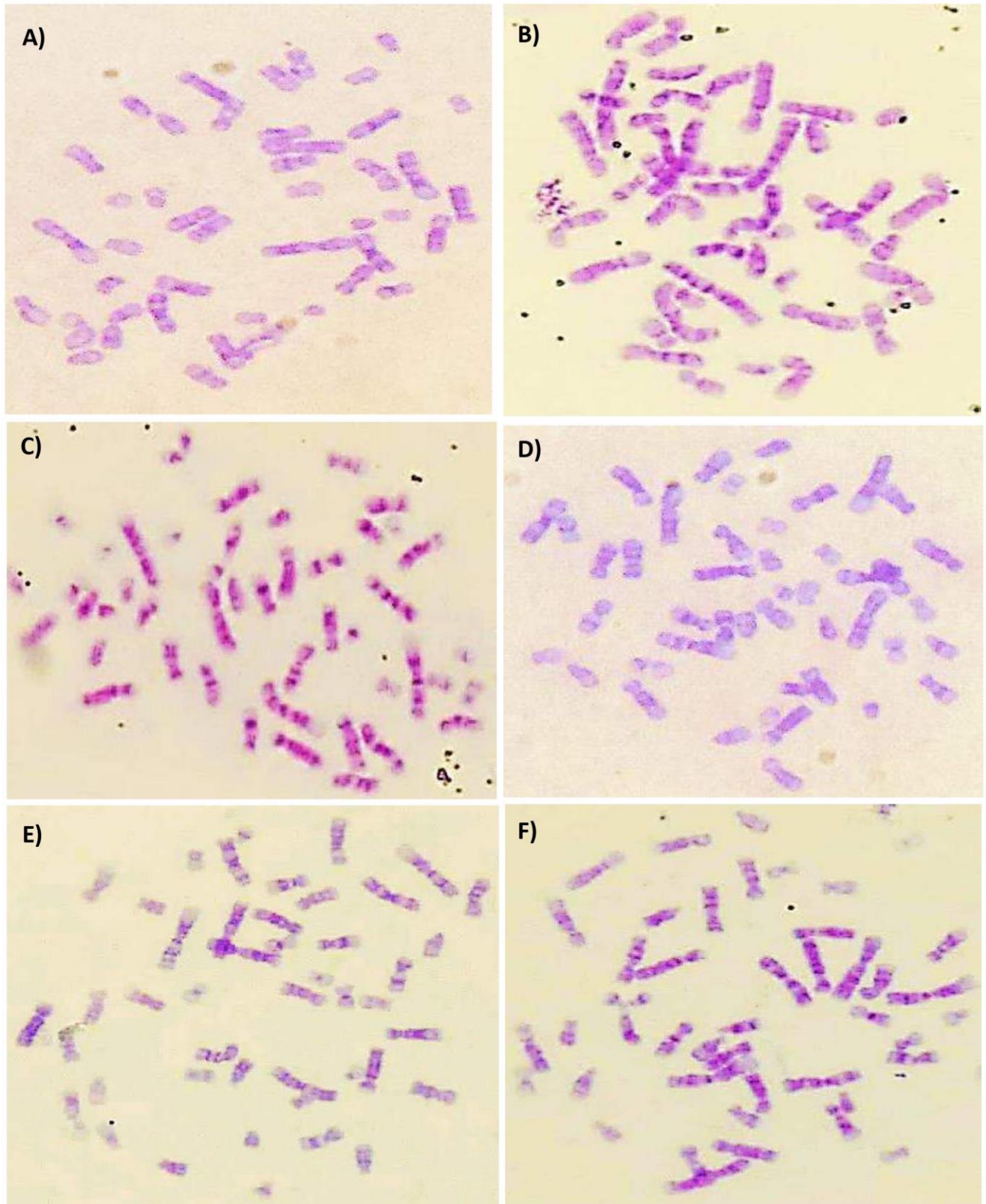
**Figura 12.** Frecuencia de metafases con cariotipo normal y aberraciones cromosómicas numérica (ACN) y estructurales (ACE) del grupo control, oligozoospermicos y polizoospermico,  $X^2$ /Yates \* $p < 0.05$ .

La **tabla 9** presenta el índice mitótico y frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales para el grupo con oligozoospermia y polizoospermia. En el grupo de oligozoospermicos se obtuvo un índice mitótico con media de 1.5. Se observaron aneuploidías de cromosomas autosómicos, en 5 de 6 muestras (**ver Figura 14C**). En el individuo NN- 271, NN- 282 y NN-324 se encontraron además aberraciones estructurales; [2]46,XY,Del(2)(p), [25]46,XY,Inv(16)(q) (**ver Figura 14D**) y [10]46, XY,dup (5)(p) (**ver Figura 14E-F**), respectivamente.

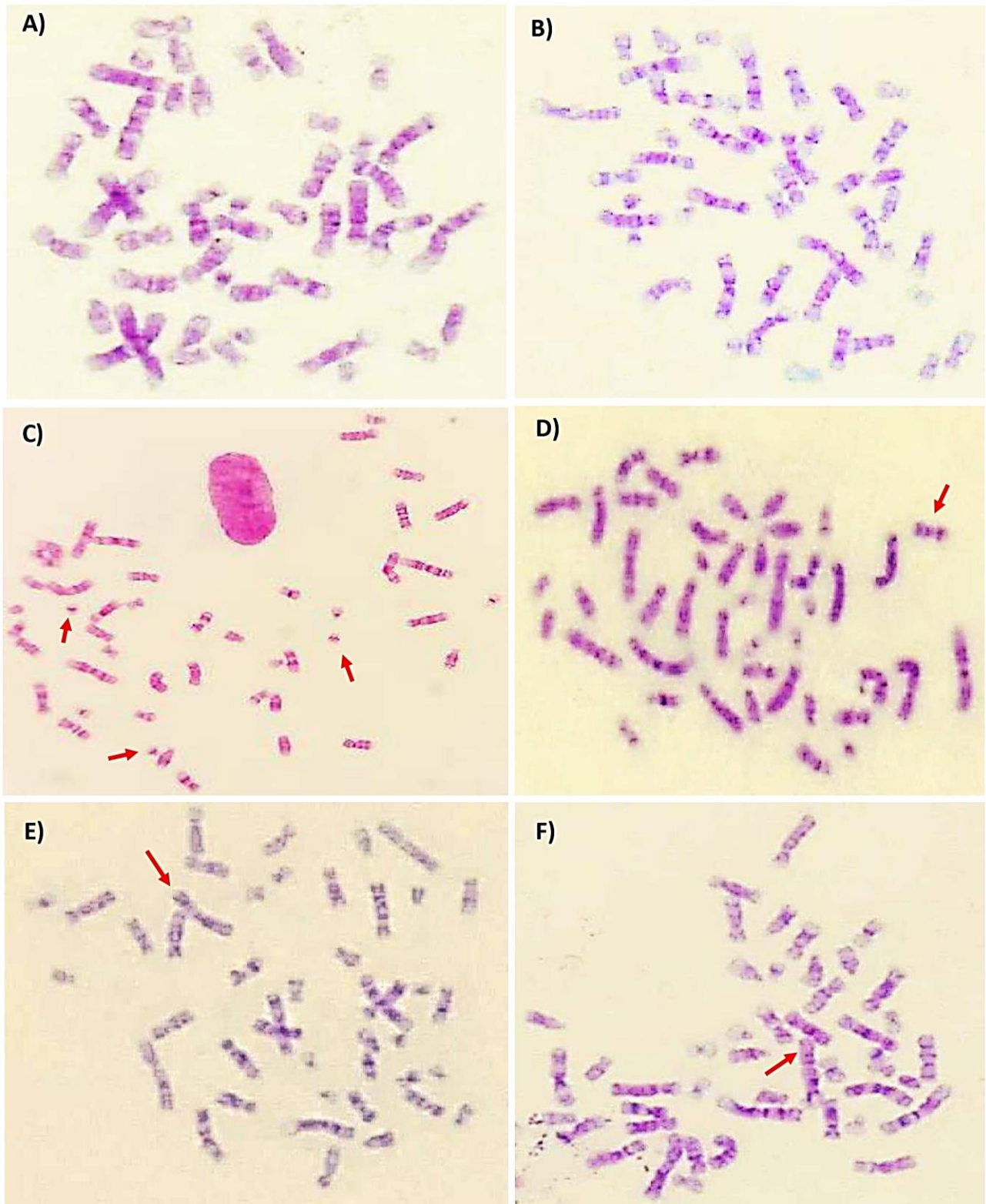
En el grupo con polizoospermia, el índice mitótico máximo fue de 1.4 y el mínimo de 1, con media de 1.4. No se encontraron ACE, solo ACN en dos muestras con presencia de aneuploidías de cromosomas autosómicos (**ver Figura 15E-F**), el resto de las muestras presentaron cariotipo normal en todas las metafases analizadas (**ver Figura 15A-D**).

En la **tabla 10** se resumen los valores de índice mitótico, frecuencia y porcentaje de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales para los tres grupos. El índice mitótico no presenta diferencias significativas en los grupos con oligozoospermia y polizoospermia, respecto del grupo control, lo que refleja que no hubo diferencias en el comportamiento de división de los cultivos celulares.

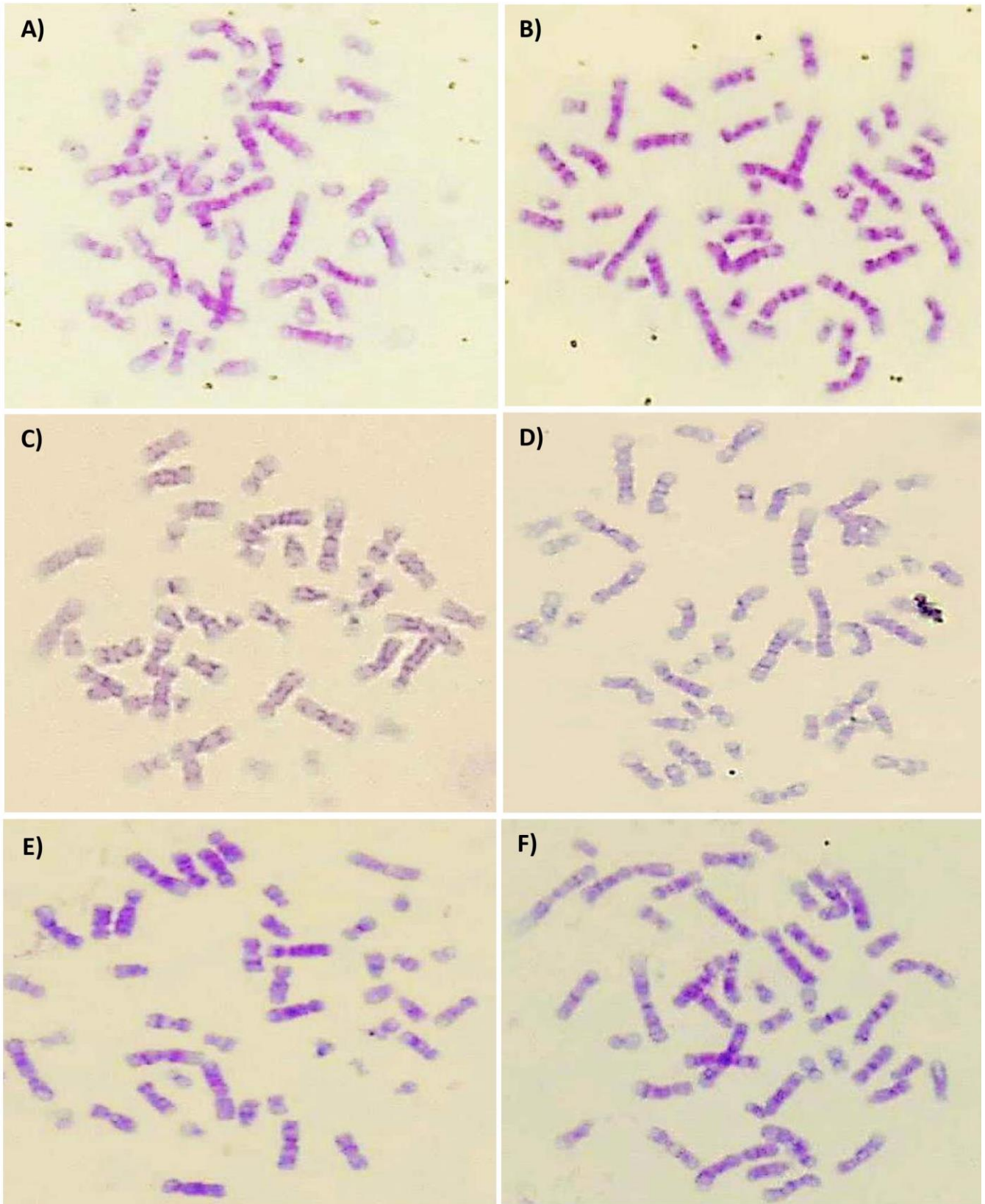
Referente a la frecuencia de aberraciones cromosómicas se observa un mayor porcentaje de cariotipo normal (46, XY) en los tres grupos (**ver Figura 12**), además tuvimos presencia de aberraciones cromosómicas numéricas tanto en individuos con oligozoospermia, polizoospermia y en el grupo control. Sin embargo, al ser analizados con prueba  $X^2$  con corrección de Yates con  $p < 0.05$ , no se observaron diferencias significativas. En el caso de las aberraciones cromosómicas estructurales se encontró un aumento significativo de la frecuencia en el grupo con oligozoospermia, con 37 metafases con cariotipo anormal que representan el 20.55% del total de las metafases analizadas en este grupo, en contraste con el grupo control con una única metafase con alteración estructural.



**Figura 13.** Microfotografía de metafases con cariotipo normal (46, XY) del grupo control, *Citogenética y Mutagénesis*, 100X, campo claro, Bando GTG.



**Figura 14.** Microfotografía de metafases de individuos con oligozoospermia. A-B) cariotipo normal, C) Aberración cromosómica numérica (ACN) 47, XY, +21 (flecha roja); D) Aberración cromosómica estructural (ACE) 46, XY, Inv (16)(q), E-F) 46, XY, Dup (5)(p) (flecha roja), *Citogenética y Mutagénesis*, 100x, Campo Claro.



**Figura 15.** Microfotografía de Metafasas de individuos con polizoospermia. A-D) cariotipo normal; E) Aberración cromosómica numérica (ACN) 45, XY, -12, F) 45, XY, -9, obtenidas en el laboratorio de *Citogenética y Mutagénesis*, 100x, Campo Claro.

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La calidad anormal del semen es un factor contribuyente en aproximadamente la mitad de las parejas con trastornos reproductivos. En este trabajo, el análisis de espermatobioscopía directa, no presentó diferencias significativas en los parámetros fisicoquímicos, los datos se encontraron dentro de los estándares establecidos por la OMS (1999). Esto se puede respaldar con la información obtenida de los cuestionarios de tamizaje, con historia de los donantes para excluir antecedentes de orquitis, criptorquidia, varicocele y obstrucción de los conductos deferentes. Los donadores tampoco tenían antecedentes de enfermedad crónica o medicación, no habían recibido tratamiento de radioterapia o quimioterapia, y no presentaban enfermedades relacionadas con una condición endocrino-urinaria; así como, tampoco eran fumadores frecuentes, y no reportaron ningún otro factor que se relacionara con la disminución de la calidad seminal.

Las tres características del análisis del semen ampliamente aceptadas para medir la fecundidad masculina son la concentración de espermatozoides, la motilidad y la morfología de los espermatozoides (te Velde & Bonde, 2013). La viabilidad espermática refleja la proporción de espermatozoides que están "vivos", se observa con ayuda de un colorante vital, ya que las membranas plasmáticas dañadas permiten la entrada de ciertos colorantes. Una disminución en este parámetro se conoce como necrozoospermia y puede deberse a infecciones espermáticas o a causas tóxicas. En nuestros resultados el grupo control y el grupo con polizoospermia reportaron resultados dentro de los parámetros estándares, en el grupo de oligozoospermicos la viabilidad tuvo una ligera disminución, aunque no resulta significativa, esto podría deberse a que la vitalidad de los espermatozoides es un factor muy importante para predecir el curso natural de la oligozoospermia severa, ya que el porcentaje de espermatozoides no vitales aumenta con el grado de oligozoospermia (Zamudio *et al.*, 2008).

En la progresión espermática una disminución del porcentaje de espermatozoides móviles se conoce como astenozoospermia, puede sugerir una infección del espermatozoides o una disquinesia flagelar. Otras alteraciones del movimiento son los espermatozoides con trayectoria rectilínea por ausencia del movimiento lateral de la cabeza o espermatozoides hipermóviles, evocadores de una infección por micoplasma. Para nuestros tres grupos los resultados estaban dentro de lo establecido por la OMS (1999), en el caso del grupo con oligozoospermia se observa una disminución, sin embargo, no se han reportado estudios donde se relacione con la disminución o aumento de la densidad espermática,

por lo que puede deberse a que es una prueba más sensible al juicio subjetivo, a pesar de las precauciones que se puedan tomar para normalizarla, las variaciones intra e interindividuales pueden existir.

La morfología es considerada junto con la densidad los parámetros determinantes en relación a la genética del individuo, la morfología anormal de los espermatozoides, es un indicador de la producción o maduración alterada de los espermatozoides, también se asocia con una capacidad de fertilización reducida. Algunos ejemplos son la cabeza alargada, macrocéfalo, microcéfalo, anomalía del acrosoma; presencia de un resto citoplasmático en la pieza intermedia; flagelo ausente, corto, enrollado o múltiple.

La morfología puede verse afectada por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno, las cuales alteran el balance entre las moléculas oxidantes y las defensas antioxidantes celulares, desencadenando procesos relacionados con estrés oxidativo, como la peroxidación lipídica y el daño en la cromatina espermática, además se ha asociado con una estructura alterada del ADN espermático y fragmentación de la cromatina. La alteración en la compactación del ADN espermático se ha atribuido a un recambio anormal de histonas por protaminas en la maduración de los espermatozoides (Ou *et al.*, 2017). Las principales causas de aparición de una morfología anómala son el varicocele, alteraciones citogenéticas y las gonadotoxinas (alcohol y nicotina principalmente). El aumento de formas anormales se le conoce como Teratozoospermia.

Los resultados obtenidos de los donadores tanto control, como el grupo con oligozoospermia y polizoospermia se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la OMS y no se observó diferencias significativas entre grupos con la prueba Z para proporciones. Esto es importante en el bandeado GTG ya que podemos descartar que la presencia de aberraciones cromosómicas en las muestras se relacione solo con daño durante la espermiogénesis, sino que el daño pudo darse desde niveles más basales.

La densidad espermática es considerada una medida para monitorear el potencial reproductivo masculino y fue el parámetro con mayor importancia dentro de nuestro trabajo, porque se buscó

individuos que tuvieran alguna alteración en la concentración de espermatozoides. Esto nos permitió relacionar directamente el análisis citogenético y las aberraciones observadas con alteraciones en la densidad espermática y descartar un problema anatómico- fisiológico con ayuda, además, de los cuestionarios de tamizaje, más los resultados estándares de los parámetros fisicoquímicos y de morfología, viabilidad y progresión.

Las alteraciones en la densidad espermática son la oligozoospermia con un recuento inferior a 20 millones/mL y si es superior a 200 millones/mL, se habla de polizoospermia. La azoospermia es la ausencia de espermatozoides en el eyaculado, incluso después de una centrifugación. Los trastornos en la densidad pueden ser multifactoriales, por ejemplo, consecuencia de un aumento de la temperatura testicular o del incremento de productos tóxicos, como radicales libres; distintas condiciones y problemas físicos, como defectos congénitos (criptorquidia, hipospadias); diferentes tipos de enfermedades (patologías urológicas, de transmisión sexual, genéticas, etc.); exposición a productos químicos, o el estilo de vida causan generalmente un bajo recuento espermático y una baja calidad seminal. También es importante la presencia de aglutinados, que son aquellas agrupaciones de algunos espermatozoides, paradójicamente hipermóviles, unidos ya sea por la cabeza, por la pieza intermedia, el flagelo o de modo mixto. Cuando los aglutinados de espermatozoides son numerosos se pueden correlacionar con polizoospermia o problemas inmunológicos. Los factores genéticos son predominantes en la etiología de la polizoospermia y la oligozoospermia grave, las pruebas genéticas presentan anomalías cromosómicas somáticas en el 7-10% de los hombres con recuentos de espermatozoides inferiores a 5 millones / mL.

Nuestros resultados presentaron diferencias significativas en el grupo con oligozoospermia donde la media fue de 9.77 millones por mililitro lo que se encuentra por debajo de los 15 millones por mililitro establecidos como estándar por la OMS, el grupo con polizoospermia presentó una media de 325.60 millones por mililitro donde el máximo establecido por la OMS es de 200 millones por mililitro, estos resultados respecto del grupo control fueron significativos, lo cual era importante para poder observar diferencias en la frecuencia de aberraciones entre el grupo control, oligozoospermicos y polizoospermicos, la presencia de estas aberraciones nos habla de alteraciones que pueden afectar procesos de proliferación o muerte celular, que se reflejan en el aumento o disminución de células que llegan a término respectivamente.



Posterior a esto se analizó el índice mitótico (IM), el cual refleja el porcentaje de células que se dividieron durante los cultivos celulares al estimular con fitohemaglutinina, ya que el número de linfocitos que se dividen en un momento dado es muy bajo. El valor más bajo posible es 1.0, que solo se puede obtener si todas las células no se dividen; sin embargo, si todas las células viables completan una división celular, entonces el valor es 2.0. El valor es mayor que 2.0 si una proporción sustancial de las células ha completado más de una división nuclear (Champion *et al.*, 2017), el IM es muy utilizado como biomarcador de un buen porcentaje de división en un cultivo celular, en el presente estudio los resultados de las medias de nuestros tres grupos se encontraron por encima de 1.0 lo que nos indica que las células, reaccionaron al mitógeno y tuvieron un buen índice de división, completando al menos un ciclo, importante en nuestros cultivos ya que se requería un buen número de metafases para poder realizar el cariotipado, sin embargo, buscábamos que las células no completaran más ciclos para evitar que las alteraciones, si existían, fueran reparadas por los mecanismos propios de la célula.

El bandeo G nos brinda una amplia información acerca del espectro de aneuploidías y cambios estructurales presentes en las células. La sensibilidad de la técnica oscila entre el 5-10 % dependiendo de la cantidad de metafases analizadas (Speicher & Carter, 2005). Las anomalías citogenéticas (tanto somáticas como meióticas) son una causa importante de infertilidad masculina, por esto la indicación de un cariotipo sigue siendo la primera prueba genética tras un análisis de esperma anormal, ya que permite la detección del síndrome de Klinefelter, que representa, la causa genética más frecuente de infertilidad, la detección de translocaciones balanceadas o recíprocas, que se encuentran aproximadamente 10 veces más frecuentemente en hombres infértiles que en la población general, alteraciones que se han demostrado sin ambigüedades como causas genéticas frecuentes de infertilidad masculina no obstructiva. Sin embargo, incluso después de un estudio diagnóstico completo, muchos casos siguen teniendo una etiología desconocida (Gekas *et al.*, 2001).

En el grupo control se observaron alteraciones cromosómicas numéricas como aneuploidías, esto se debe a que no existen basales de 0 dentro de una población, existe un porcentaje de anomalías cromosómicas somáticas aproximadamente del 0.6 %- 0.15 % en la población masculina en general, sin mayores implicaciones, pues se toleran hasta un cierto nivel mínimo no dañino relacionado con el estilo de vida humano, los hábitos alimentarios; así como, las consecuencias ambientales y la exposición a sustancias tóxicas.

Además, en células cultivadas forzadas a permanecer en plano al entrar en la mitosis, la dispersión de los cromosomas en un área mayor y el limitado alcance de los microtúbulos astrales obstaculiza la captura eficiente de los cromosomas. Esto aumenta la probabilidad de divisiones de células multipolares y aneuploides (Champion et al., 2017). También se observó la presencia de una delección del cromosoma 3 en una de las muestras, esto podría explicarse como un evento azaroso dentro de la población celular ya que no se encontró en más metafases por lo que no puede ser considerado como un **mosaico**. Solo las anomalías numéricas presentes en más de dos células se consideraron mosaicos de acuerdo a Gekas y colaboradores (2001).

El grupo con oligozoospermia, fue el grupo con mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales, otros autores por ejemplo Zhang y colaboradores en 2018 y Martínez-Garza y colaboradores en el 2008 (**ver tabla 4**) reportan un incremento en la presencia de aberraciones cromosómicas. Sin embargo, los cariotipos más comunes fueron el síndrome de Klinefelter y la presencia de translocaciones recíprocas, las cuales no estuvieron presentes en este estudio. Otros autores como Cortés-Gutiérrez y colaboradores en 2004 (**ver tabla 4**) presentan además de otros cariotipos, la presencia de inversiones, como las observadas en nuestros resultados. En este grupo como en el de individuos con polizoospermia se utilizó la prueba Chi-cuadrada con corrección de Yates, para evaluar las diferencias en las distribuciones de frecuencia de cada grupo con alteración en la densidad respecto del grupo control. Se sabe que la incidencia de las aberraciones cromosómicas de acuerdo con lo observado en otros trabajos está inversamente relacionada con el recuento de espermatozoides, es decir, una densidad menor (< 20 millones), reflejaría un incremento en la frecuencia de alteraciones cromosómicas, lo cual concuerda con nuestros resultados, donde la mayor presencia de aberraciones cromosómicas se observó en individuos con oligozoospermia.

En el caso de aberraciones cromosómicas numéricas en oligozoospermicos se encontraron solo aneuploidías con ganancia o pérdida de cromosomas autosómicos, en hombres con problemas de infertilidad las aneuploidías alcanzan valores más altos de lo normal, que varían entre el 2 % y el 14 %. Los mecanismos detrás de la generación de aneuploidías se desconocen en gran medida, aunque su origen suele estar en la **no-disyunción** o en una anafase lenta (Oliva et al., 2004). La oligozoospermia severa observada en nuestros donantes puede indicar más perturbaciones durante el emparejamiento meiótico, la pérdida posterior de células germinales y la producción de espermatozoides aneuploides. Si la recombinación se reduce o está ausente para estos cromosomas, pueden ser

particularmente susceptibles a la no disyunción. Un incremento de aneuploidías tiene consecuencias definitivas sobre el genoma del espermatozoide, ya que la espermatogénesis humana es una serie compleja de eventos muy delicados vulnerables a la acumulación de errores afectando todo el proceso espermatogénico, lo que da como resultado una espermatogénesis deteriorada y por ende oligozoospermia.

Otras causas son el fracaso en el redondeo mitótico o las limitaciones mecánicas que perjudican la morfología del huso mitótico, la segregación de cromosomas y la progresión mitótica. Además de la falla de la citocinesis que conduce a segregación asimétrica capaz de volver a entrar en mitosis y formar nuevos clones. Se ha sugerido que la deficiencia del punto de control del ensamblaje del huso (SAC) (Spindle Assembly Checkpoint) u otros mecanismos clave que controlan la separación de las cromátidas hermanas (es decir, no disyunción) podrían promover, una tasa continuamente elevada de ganancia y pérdida concurrente de cromosomas, en la metafase. Una combinación de multipolaridad del huso y citocinesis fallida, son los mecanismos más probables (Gisselsson *et al.*, 2010).

En los individuos con oligozoospermia, además se observó un aumento significativo en los mosaicismos de aberraciones estructurales, en primer lugar, la duplicación de uno de los cromosomas del par 5, en el brazo *p*, el tipo de duplicación de acuerdo a la clasificación de la ISCN se encuentra dentro de las duplicaciones directas y el punto de inserción se encuentra en el mismo brazo cromosómico que el segmento original por lo que se clasifica como **homobraquial**. Referente a las duplicaciones en individuos con oligozoospermia se encuentran pocas referencias; sin embargo, hay datos que relacionan el cromosoma 5 con **genes** importantes relacionados con la infertilidad masculina. Por ejemplo, Zhang y colaboradores en 2018 reportaron que en el cromosoma 5 se encuentra *Camk4* (que codifica la proteína quinasa IV dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina) en la región 5q22.1, que se expresa en espermátidas y se asocia con la cromatina. Además, el gen *Spink13* (que codifica el inhibidor de la serina proteasa), mapeado en el cromosoma 5 en 5q32, está asociado con la maduración de los espermatozoides. Finalmente, en sus resultados también se mostró que el punto de ruptura en 5p13 estaba relacionado con la espermatogénesis deteriorada, este último dato es comparable con nuestros resultados, ya que al igual que ellos la alteración se observó en el brazo *p*, sin embargo, en sus resultados hubo pérdida de material y en los nuestros ganancia. La importancia de la duplicación dependerá además de la severidad y la magnitud del defecto del cromosoma involucrado.

Esto sugiere que podría existir una relación en el incremento de estas alteraciones con la disminución de la cuenta espermática, ya que podrían estar afectando procesos tan importantes como la **Apoptosis**. Por ejemplo, algunas vías como la ubiquitinación de proteínas y la Apoptosis celular incrementada pueden dar como resultado la pérdida de células germinales. Un posible gen candidato para la oligozoospermia severa es *UBE2B*. El gen codifica la enzima conjugadora de ubiquitina 2B, su ausencia o delección en ratones macho, causa una interrupción meiótica espermatogénica que podría significar un aumento de la apoptosis, y reflejarse en infertilidad. Además, juega un papel dinámico en la reorganización de la cromatina en células germinales meióticas y posmeióticas y, es más activo durante la espermiogénesis. También se ha reportado que las deficiencias en el semen muestran una alteración grave de la expresión de la vía ubiquitina-proteosoma (Yatsenko *et al.*, 2013). Esto apoya nuestros resultados, ya que se esperaría que una alteración con un fuerte impacto negativo dominante sobre la fertilidad masculina sería rápidamente eliminada de la población gracias a los puntos de control (check point), principales mecanismos mediante los cuales una célula puede reparar el daño del ADN, ya sea deteniendo activamente el ciclo celular o induciendo la apoptosis.

Entre algunas teorías de generación de aberraciones cromosómicas estructurales están los mutágenos que pueden producir la rotura de cromosomas, aunque aún no se comprende completamente, las lesiones de ADN producirán la rotura de un cromosoma como consecuencia de su interferencia con el proceso normal de replicación de ADN. Cuando existe material extra o las rupturas cromosómicas se vuelven a unir en un orden diferente al original, como en el caso de nuestro segundo mosaicismo, la reorganización cromosómica es la consecuencia. Entre estos defectos las anomalías cromosómicas ocurren más frecuentemente como deleciones, duplicaciones o mosaicos de baja expresión citogenética.

El segundo genotipo en mosaico presente, fue la inversión paracéntrica en uno de los cromosomas del par 16 en el brazo **q**, en 25 metafases, con lo que se podría esperar que el cambio en la orientación de ese segmento del cromosoma afecte patrones de expresión génica ya sea por un cambio regulatorio que causa una mayor producción de una proteína normal o al crear una plantilla de genes alterados cualitativamente que codifica un producto proteico anormal dependiendo de los genes involucrados, lo que llevaría a trastornos en la espermatogénesis, que al estar regulada por miles de genes es susceptible a errores.

Los portadores de translocaciones e inversiones a menudo son infértiles, con perfiles de esperma alterados (Piña *et al.*, 2013). Las inversiones paracéntricas rara vez se informan, ya que solo pueden detectarse mediante el uso de procedimientos de bandas. Algunos investigadores han sugerido que las inversiones paracéntricas en el hombre son generalmente inofensivas, ya que los individuos estudiados, no mostraron cromosomas recombinantes en el esperma; por análisis FISH (Roldán y López, 2017), solo el 1% de los espermatozoides eran recombinantes, con cromosomas dicéntricos y excéntricos. Por lo tanto, el riesgo de inversiones paracéntricas parece ser pequeño (2 %- 3 %), lo que sugiere que no se formó un bucle de inversión o que el cruce se suprimió dentro del bucle; sin embargo, se han observado cromosomas recombinantes en recién nacidos, y se estima que el riesgo de recombinantes viables es del 3.8 % (Martin, 2008), lo cual podría causar un gran impacto en la descendencia al producir gametos aberrantes, ya que en este tipo de inversión, si se produce un solo cruce dentro del bucle de inversión de emparejamiento, la mitad de los gametos son normales, un cuarto son acéntrico (y se perdería) y el otro cuarto serían dicéntricos (lo que podría conducir a una ruptura entre los centrómeros y el desequilibrio de cromosomas). Además de esto, las aberraciones estructurales pueden afectar las modificaciones en las histonas (Metilación y acetilación del extremo N de las histonas H3 y H4) algunas que se expresan específicamente en células germinales que se podría relacionar con la condición de oligozoospermia.

Ambos genotipos están presentes en mosaico, algunos estudios han mostrado correlación directa entre la tasa de mosaicismo gonosómico en las células somáticas y la fertilidad (Karimi *et al.*, 2014). En raras ocasiones, se pueden encontrar mosaicos de múltiples líneas, en nuestro trabajo, las inversiones y duplicaciones, se observaron en 25 y 10 metafases respectivamente, por lo que se consideran como mosaicismos de bajo nivel, lo cual implica riesgo para el individuo y su descendencia, sin embargo, si las células no se presentaran en mosaico, en conjunto con líneas celulares con un genotipo normal, el impacto sería aún mayor.

Las inversiones que producen cromosomas recombinantes son, en general, grandes inversiones que abarcan más de la mitad de la longitud del cromosoma, pero está claro que los riesgos dependen de la inversión individual (Martin, 2008), el cromosoma 16 es un cromosoma perteneciente al grupo F que corresponde a cromosomas pequeños, además la región involucrada es una región mayoritariamente de heterocromatina que representa genes con baja replicación o que no se están replicando por lo cual se entiende que no tenga implicaciones y no muestre características fenotípicas, sin embargo, sí se observó disminución en su cuenta espermática.

Referente a otros estudios, los resultados para aberraciones cromosómicas numéricas oscilan entre 2.20 y 8.00 %, nuestros resultados para este tipo de aberraciones en el grupo con oligozoospermia como polizoospermia se encuentran con un porcentaje de frecuencia baja también (10.55 y 10.0 % respectivamente). Para aberraciones cromosómicas estructurales tenemos el ejemplo de Pimentel y colaboradores (2011), que realizaron un estudio en un grupo que comprendía trastornos reproductivos donde se incluyeron la infertilidad o esterilidad, los trastornos de la gametogénesis masculina y las fallas reproductivas. Ellos encontraron un 12.51 % significativo en aberraciones cromosómicas estructurales, específicamente translocaciones e inversiones, lo que es comparable con el porcentaje que obtuvimos en el grupo con oligozoospermia con 20.55%, también con presencia de inversiones. Lo cual también establece una asociación entre la inversión autosómica y la infertilidad en los hombres. También es importante el hecho de que más del 80% de todas las aberraciones cromosómicas estructurales en humanos se producen de *novo* y son de origen paterno (Hirsh, 2003).

Las aberraciones en el grupo con polizoospermia fueron menores, los trabajos existentes reportan que no se encontraron diferencias significativas en la motilidad de los espermatozoides, que la morfología es normal y que la capacidad de fertilización de los espermatozoides no se ve afectada. Referente a estudios sobre alteraciones cromosómicas en polizoospermicos no se encuentran reportados en los últimos años; sin embargo, los trabajos en la literatura mencionan que no se encontraron diferencias significativas, como los trabajos de Glezerman y colaboradores (1982) y Wiland & Kurpisz (1997). Los hombres polizoospermicos que estudiamos tampoco mostraron diferencias en otros valores de la espermatobioscopia, ni en la presencia de aberraciones cromosómicas. Esto nos refleja un impacto menor a la genética del individuo con base a los trabajos reportados y lo observado en nuestros resultados en individuos con oligozoospermia.

Sin embargo, a pesar de estos resultados, es importante más estudios dirigidos a la polizoospermia, ya que aun los hombres con un cariotipo somático normal aún pueden presentar una línea celular anormal en el tejido germinal (testículos). Estos hombres se denominan "mosaicos germinales" y es difícil descubrirlos. De acuerdo a la literatura, estudios han revelado que del 1–17 % de los hombres infértiles son mosaicos germinales, por lo que esto sigue siendo un riesgo después de un resultado de cariotipo normal, pero los riesgos para la descendencia anormal serían inferiores a los de las personas sin mosaico (Martin, 2008). Puede deberse a que los espermatozoides testiculares son más vulnerables al daño del ADN debido al hecho de que las protaminas de la cromatina espermática no están

completamente entrecruzadas por enlaces disulfuro hasta que los espermatozoides atraviesan el epidídimo (Soares *et al.*, 2012).

Estudios previos han reportado daño del ADN inducido por el estrés oxidativo, parecen tener un importante papel las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que pueden producir daños en el ADN directa o indirectamente (González-Bustamante *et al.*, 2017). De hecho, se encontró que los hombres infértiles con oligozoospermia tenían parámetros oxidantes significativamente más altos en el semen que los hombres fértiles. El aumento de los niveles de ROS en estos sujetos se ha asociado con factores ambientales y de estilo de vida, edad avanzada, obesidad, infección y otras enfermedades (Esteves *et al.*, 2015).

Con la información sobre la oligozoospermia como la condición más fuertemente asociada con una mayor frecuencia de anomalías cromosómicas de los espermatozoides (Martin *et al.*, 2003), los estudios como lo reportado por Martínez-Garza y colaboradores en el 2008, así como estudios en el norte de México por Cortés-Gutiérrez y colaboradores en el 2004, con frecuencias altas para aneuploidías e inversiones entre otras alteraciones, y lo observado en nuestras muestras podemos hablar de una relación inversamente proporcional entre la incidencia de las aberraciones cromosómicas y el recuento de espermatozoides, principalmente en individuos con oligospermia severa, es decir, aumento de la frecuencia de aberraciones y disminución de la cuenta espermática, debido a daños durante la espermatogénesis, que podría implicar dificultades en la reproducción, así mismo resultando la oligozoospermia en una condición más grave que los casos analizados de polizoospermia.

Creemos que futuras investigaciones en la oligozoospermia y la polizoospermia podrían ayudar a entender ambas patologías y sus interacciones genéticas. Investigaciones recientes han permitido identificar muchos más genes involucrados en la espermatogénesis, y sus mecanismos de acción. La mayoría de las investigaciones en la infertilidad masculina se enfocan principalmente en el cromosoma Y, por ser el cromosoma más relacionado a la infertilidad masculina, sin embargo, varios estudios demuestran que no es el único cromosoma con genes implicados en la espermatogénesis, si no que existen muchos otros que pueden encontrarse en los cromosomas autosómicos.

## 8. CONCLUSIONES

Se analizaron espermatobioscopías de alumnos de la **FES Zaragoza**, de las cuales la mayoría presentaron una calidad seminal estándar, seguidos por los individuos con oligozoospermia y, finalmente los individuos con polizoospermia, con muy baja frecuencia.

El **índice mitótico (IM)** no mostró cambios significativos en los grupos, lo que significa que la división mitótica (proliferación) no se relacionó con alteraciones en la cuenta espermática o la presencia de **AC**.

Las **ACN** mostraron una tendencia a aumentar en el grupo con oligozoospermia y polizoospermia; sin embargo, no fue significativa.

El grupo con **oligozoospermia** presento un incremento significativo de **ACE**, que refleja una relación inversa entre la presencia de aberraciones cromosómicas estructurales y la disminución en el número de espermatozoides por mL.

Los problemas en la densidad espermática están relacionados principalmente, con la presencia y el incremento de células con aberraciones cromosómicas estructurales (**ACE**).

Es de gran importancia continuar con el estudio de **AC**, mediante el análisis cromosómico convencional y combinarlo con métodos de *Biología Molecular* para obtener un análisis de mayor resolución para reordenamientos complejos, ya que estas alteraciones cromosómicas coexisten en las células germinales y pueden transmitirse a los gametos y a la descendencia; en algunos casos pueden llevar a un arresto en la gametogénesis o al desarrollo de gametos con alteraciones cromosómicas no balanceadas.



## 9. PERSPECTIVAS

- Un estudio de FISH multicolor (*hibridación in situ fluorescente*) sería importante en aquellos individuos con oligozoospermia que presentaron alteraciones importantes como las aberraciones estructurales, lo que nos permitiría obtener una información más detallada, enfocado en las regiones cromosómicas involucradas en la alteración de acuerdo con los resultados obtenidos con el bandeado GTG.
- Además, realizar una prueba de microdeleciones del cromosoma Y, para observar si esta alteración está presente en las muestras, ya que es uno de los principales cromosomas relacionados con fallas reproductivas masculinas, que podrían estar escapando al método de bandas debido al nivel de resolución.
- Realizar un análisis de epigenética que nos arroje más información acerca de los genes implicados en las regiones alteradas, y de qué forma están siendo modificados, ya sea por metilación o acetilación de histonas o por la interacción entre genes modificados, que podrían dar como resultado alteraciones en el proceso de espermatogénesis.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, S. (2000). Seguimiento citogenético e hibridación in situ (FISH) en la enfermedad mínima residual. Simposio Internacional. Nuevas perspectivas en oncología. 60 (2). 87-90.
- Adamopoulos, D. A. (2000). Present and future therapeutic strategies for idiopathic oligozoospermia. *International Journal of Andrology*, 23(6), 320–331.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2000.00258.x>
- Aitken, R. J., Clarkson, J. S., Hargreave, T. B., Irvine, D. S., & Wu, F. C. (1989). Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *Journal of Andrology*, 10(3), 214–220.  
<https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1989.tb00091.x>
- Anderson D., Baumgartner A., & Cemeli E. (2011). *Cytogenetics. Genetic Toxicology, Oncogenesis, Developmental and Reproductive Toxicology*. John Wiley & Sons: 1-27.
- Arenas, B. J., Lletget, B. C. & Milán, P. F. (2009). *Fundamentos de reproducción*. España.: Editorial Médica Panamericana. 50-73.
- Bak, C. W., Song, S.-H., Yoon, T. K., Lim, J. J., Shin, T. E., & Sung, S. (2010). Natural course of idiopathic oligozoospermia: comparison of mild, moderate and severe forms: Different fates of oligozoospermia. *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association*, 17(11), 937–943. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2010.02628.x>
- Barrios Martínez, A., & Méndez Rosado, L. A. (2014). Enfoque de los principales factores causales en los trastornos reproductivos. *Revista cubana de obstetricia y ginecología*, 40(2), 246–257.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-600X2014000200011&script=sci\\_abstract](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-600X2014000200011&script=sci_abstract)

- Battaglia, A., & Guerrini, R. (2005). Chromosomal disorders associated with epilepsy. *Epileptic Disorders: International Epilepsy Journal with Videotape*, 7(3), 181–192.
- Bickmore, W. A. (2001). Karyotype Analysis and Chromosome Banding. En eLS. Wiley. 1-7  
<https://doi.org/10.1038/npg.els.0001160>
- Cancemi, D., Iannuzzi, A., Perucatti, A., Montano, L., Capozzi, O., Spampanato, C., Ventruto, M. L., Urciuoli, M., Iannuzzi, L., & Ventruto, V. (2017). Duplication of Yq- and proximal Yp-arms with deletion of almost all PAR1 (including SHOX) in a young man with non-obstructive azoospermia, short stature and skeletal defects. *Journal of Applied Genetics*, 58(4), 481–486.  
<https://doi.org/10.1007/s13353-017-0412-7>
- Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T., & Labbé, J.-C. (2003). Mitosis under control. *Medicine sciences*, 19(3), 309–317. <https://doi.org/10.1051/medsci/2003193309>
- Champion, L., Linder, M. I., & Kutay, U. (2017). Cellular Reorganization during Mitotic Entry. *Trends in cell biology*, 27(1), 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.07.004>
- Cortés-Gutiérrez, E. I., Cerda-Flores, R. M., Dávila-Rodríguez, M. I., Hernández-Herrera, R., Vargas-Villarreal, J., & Leal-Garza, C. H. (2004). Chromosomal abnormalities and polymorphisms in Mexican infertile men. *Archives of Andrology*, 50(4), 261–265.  
<https://doi.org/10.1080/01485010490448750>
- Dada, R., Kumar, M., Jesudasan, R., Fernández, J. L., Gosálvez, J., & Agarwal, A. (2012). Epigenetics and its role in male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(3), 213–223. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9715-0>

- Dutrillaux, B., Couturier, J., Richer, C. L., & Viegas-Péquignot, E. (1976). Sequence of DNA replication in 277 R- and Q-bands of human chromosomes using a BrdU treatment. *Chromosoma*, 58(1), 51–61. <https://doi.org/10.1007/bf00293440>
- Esteves, S. C., Sánchez-Martín, F., Sánchez-Martín, P., Schneider, D. T., & Gosálvez, J. (2015). Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. *Fertility and Sterility*, 104(6), 1398–1405. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.028>
- Gada S., Desai, K., Shewale, L., Ranjan, P. & Saranath, D. (2012). Chromosomal aberrations in 2000 couples of Indian ethnicity with reproductive failure. *Reproductive Biomedicine Online* , 25 (2), 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.04.004>
- Gekas, J., Thepot, F., Turleau, C., Siffroi, J. P., Dadoune, J. P., Briault, S., Rio, M., Bourouillou, G., Carré-Pigeon, F., Wasels, R., Benzacken, B., & Association des Cytogeneticiens de Langue Francaise. (2001). Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 16(1), 82–90. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.1.82>
- Gisselsson, D., Jin, Y., Lindgren, D., Persson, J., Gisselsson, L., Hanks, S., Sehic, D., Mengelbier, L. H., Øra, I., Rahman, N., Mertens, F., Mitelman, F., & Mandahl, N. (2010). Generation of trisomies in cancer cells by multipolar mitosis and incomplete cytokinesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(47), 20489–20493. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006829107>

- Glezerman, M., Bernstein, D., Zakut, C., Misgav, N., & Insler, V. (1982). Polyzoospermia: a definite pathologic entity. *Fertility and Sterility*, 38(5), 605–608. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)46642-2](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)46642-2)
- González-Bustamante LO, Retana-Ugalde R, y Roldán-Reyes E. (2017). Capacidad antioxidante, lipoperoxidación y calidad seminal de individuos jóvenes clínicamente sanos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 4(4). 2334-2501.
- Grade, M., Difilippantonio, M. J., & Camps, J. (2015). Patterns of chromosomal aberrations in solid tumors. *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer*, 200, 115–142. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20291-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20291-4_6)
- Guizar, J.J. (2001). *Genética clínica: diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias* (3ra. ed.). México D.F.: El manual moderno 72-87, 294-318.
- Hirsh, A. (2003). Male subfertility. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 327(7416), 669–672. <https://doi.org/10.1136/bmj.327.7416.669>
- Karimi, H., Sabbaghian, M., Haratian, K., Vaziri Nasab, H., Farrahi, F., Moradi, S. Z., Tavakolzadeh, T., Beheshti, Z., Gourabi, H., & Meybodi, A. M. (2014). A rare case of Klinefelter syndrome patient with quintuple mosaic karyotype, diagnosed by GTG-banding and FISH. *International Journal of Fertility & Sterility*, 8(2), 221–224.
- Liu, J., Ali, M., & Zhou, Q. (2020). Establishment and evolution of heterochromatin: Establishment and evolution of heterochromatin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1476(1), 59–77. <https://doi.org/10.1111/nyas.14303>

- Maeshima, K., & Eltsov, M. (2008). Packaging the genome: the structure of mitotic chromosomes. *The Journal of Biochemistry*, *143*(2), 145–153. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm214>
- Martin, R. H. (2008). Cytogenetic determinants of male fertility. *Human Reproduction Update*, *14*(4), 379–390. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn017>
- Martin, Renée H., Rademaker, A. W., Greene, C., Ko, E., Hoang, T., Barclay, L., & Chernos, J. (2003). A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. *Biology of Reproduction*, *69*(2), 535–539. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.015149>
- Martínez-Garza S. G., Gallegos-Rivas M. C., Vargas-Maciel M., & Rubio-Rubio J. M. (2008). Genetic screening in infertile Mexican men: chromosomal abnormalities, Y chromosome deletions, and androgen receptor CAG repeat length. *Journal Andrology*, *29*, 654-660.
- Miller O. & Therman E. (2001). *Human chromosomes* (4ta. Ed.). New Yor.; Springe-Verlag.
- Mitchell, M. J., Metzler-Guillemain, C., Toure, A., Coutton, C., Arnoult, C., & Ray, P. F. (2017). Single gene defects leading to sperm quantitative anomalies: Single gene defects leading to sperm quantitative anomalies. *Clinical Genetics*, *91*(2), 208–216. <https://doi.org/10.1111/cge.12900>
- Mitelman, F. (2000). Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutation Research*, *462*(2–3), 247–253. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(00\)00006-5](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(00)00006-5)
- OMS (2001). *Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical* (4ta. Ed.). Editorial Medica Panamericana.
- Oliva R., Ballesta F., Oriola J. y Claria J. (2004). *Genética médica* (3ª edición.). España.: Universidad de Barcelona. 71: 119-183.

- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*, 19(4), 426–436. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-06902006000400008](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902006000400008)
- Ou, H. D., Phan, S., Deerinck, T. J., Thor, A., Ellisman, M. H., & O’Shea, C. C. (2017). ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic, *Science* (Nueva York, NY), 357(6349). <https://doi.org/10.1126/science.aag0025>
- Panduro A. (2016). *Biología molecular en la clínica*. (2da. Ed.). México.: Mc Graw Hill. 320-343.
- Pimentel Benítez, H. I., Martín Cuesta, N., García Borrego, A., Gómez Benítez, Z., Angulo Cebada, E., & Iglesias Carnot, H. E. (2011). Trastornos de la fertilidad y aberraciones cromosómicas asociadas. *Archivo médico Camagüey*, 15(5), 791–801. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-02552011000500003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552011000500003)
- Piña A.R., Chima G.M., Yerena N., Regalado H. M., Sánchez G. C., García O. L., Santillán H. Y., y Moreno G. J. (2013). Variantes genéticas asociadas con infertilidad masculina en pacientes mexicanos. *Ginecology Obstetrica*. 81. 245-258.
- Poirot C., y Cherruau B. (2005). Infertilidad masculina Aspectos clínicos e investigaciones biológicas. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 39(2): 225-241.
- Roldán R.E. y López G.A. (2017). Alteraciones cromosómicas espermáticas en pacientes con linfoma de Hodgkin Tratados con quimioterapia ABVD. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 4(5). 84-91.
- Sarabia, L. y Munuce, MJ (2011). Nuevos valores para el espermiograma OMS 2010. *Revista Médica de Chile*, 139 (4), 548–549. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872011000400020>

- Schill, W. B., & Feifel, M. (1984). Low acrosin activity in polyzoospermia. *Andrologia*, 16(6), 589–591. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1984.tb00418.x>
- Shaffer, L. G., & Tommerup N. (2005). *ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature* Basilea.: Karger.
- Simon, L., Lutton, D., McManus, J., & Lewis, S. E. M. (2011). Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertility and Sterility*, 95(2), 652–657. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.08.019>
- Soares, A. R., Costa, P., Silva, J., Sousa, M., Barros, A., & Fernandes, S. (2012). AZFb microdeletions and oligozoospermia--which mechanisms? *Fertility and Sterility*, 97(4), 858–863. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.01.099>
- Song, S.-H., Chiba, K., Ramasamy, R., & Lamb, D. J. (2016). Recent advances in the genetics of testicular failure. *Asian Journal of Andrology*, 18(3), 350–355. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.178857>
- Speicher, M. R., & Carter, N. P. (2005). The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews. Genetics*, 6(10), 782–792. <https://doi.org/10.1038/nrg1692>
- Stewénus, Y., Gorunova, L., Jonson, T., Larsson, N., Höglund, M., Mandahl, N., Mertens, F., Mitelman, F., & Gisselsson, D. (2005). Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(15), 5541–5546. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408454102>



- Taylor, M. B., & Ehrenreich, I. M. (2015). Transcriptional derepression uncovers cryptic higher-order genetic interactions. *PLoS Genetics*, *11*(10), <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005606>
- te Velde, E. R., & Bonde, J. P. (2013). Misconceptions about falling sperm counts and fertility in Europe. *Asian Journal of Andrology*, *15*(2), 195–198.
- Töpfer-Petersen, E., Völcker, C., Heissler, E., & Schill, W. B. (1987). Absence of acrosome reaction in polyzoospermia. *Andrologia*, *19 Spec No*, 225–228. <https://doi.org/10.1038/aja.2012.122in> <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1987.tb02336.x>
- Vázquez, C., Martín, A., de Silóniz, M. I., & Serrano, S. (2011). Técnicas básicas de Microbiología. Observación de bacterias. *REDUCA (Biología)*, *3*(5), 15-38. <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/819>
- Wiland, E., & Kurpisz, M. (1997). Chromosomal anomalies as a predisposing factor for male infertility. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, *35*(2), 55–62.
- Wojciech P., Gordon I. K. y Michael H. R. (2008). *Histología, Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular* (5ta Ed.). Argentina.: Panamericana. 789-804.
- World Health Organization. (2010). “WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen” (5ta. Ed.) Cambridge.: Cambridge University.
- Yatsenko, A. N., Georgiadis, A. P., Murthy, L. J., Lamb, D. J., & Matzuk, M. M. (2013). UBE2B mRNA alterations are associated with severe oligozoospermia in infertile men. *Molecular Human Reproduction*, *19*(6), 388–394. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat008>
- Zamudio, N. M., Chong, S., & O’Bryan, M. K. (2008). Epigenetic regulation in male germ cells. *Reproduction*, *136*(2), 131–146. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0576>

Zhang, H.-G., Wang, R.-X., Pan, Y., Zhang, H., Li, L.-L., Zhu, H.-B., & Liu, R.-Z. (2018). A report of nine cases and review of the literature of infertile men carrying balanced translocations involving chromosome 5. *Molecular Cytogenetics*, *11* (10). <https://doi.org/10.1186/s13039-018-0360-x>

## 11. ANEXO I

### 11.1. Participaciones Académicas

<b>Foros académicos donde se dieron a conocer los resultados derivados del presente trabajo.</b>
XVIII Foro de Investigación Escolar en Biología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
12° Congreso de Investigación de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
XXIV Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud, UAM Iztapalapa.
XLIV Congreso Nacional de Genética Humana Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Mx.
XX Reunión Internacional de Ciencias Médicas, León, Guanajuato.
Asesorías en el Programa de Jóvenes hacia la investigación, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



**UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**



## Constancia

Que otorga la  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES ZARAGOZA  
a través de la Unidad de  
Formación Integral

A Jessica Oliver Gallegos, Elia Roldán Reyes

Por la presentación de trabajo: Aberraciones cromosómicas en individuos con baja calidad seminal. En el Marco del XVIII Foro de Investigación Escolar en Biología del 10 al 12 de agosto del año en curso.

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad de México, noviembre de 2016.

**Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez**  
Director





**UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**



## Constancia

Que otorga la  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES ZARAGOZA  
a través de la Unidad de  
Formación Integral

A Jessica Oliver Gallegos

Por su participación como **Asistente** a la Semana Nacional de Ciencia y Tecnología, organizada por la Carrera de QFB y el Grupo de Divulgación Científica Atomic ZAR, del 3 al 6 de noviembre del año del curso.

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**

México D.F., diciembre de 2015.

**Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez**

Director

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
y  
EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD



Otorgan la presente

*Constancia*

a:

Oliver Gallegos Jessica y Roldán Reyes Elia

Por la presentación del trabajo:

Evaluación de aberraciones cromosómicas en individuos con oligospermia y poliespermia empleando bandeó GTG

en el XXIV Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud

Celebrado los días 30 de Septiembre al 04 de Octubre del 2019

Dr. José Luis Gómez Olivares  
Jefe del Dpto. de Ciencias de la Salud

Mema E. López Díaz  
Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero  
Coordinadora

Dra. Elsa Cervantes Ríos  
Coordinadora



# XLIV CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA HUMANA



Universidad Autónoma de Chiapas  
Asociación Mexicana de Genética Humana A.C.

Otorgan la presente:

## CONSTANCIA

a

**JESSICA OLIVER GALLEGOS**

Por haber participado como:

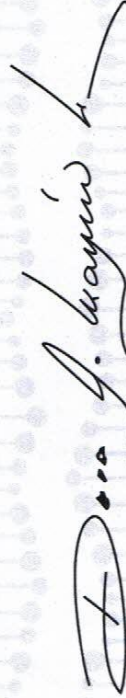
**ASISTENTE**

En el XLIV Congreso Nacional de Genética Humana "El Impacto de la Genética y Genómica en las Enfermedades Neurológicas y del Neurodesarrollo", en modalidad presencial, con una duración de 18.5 horas de actividades académicas, otorgado del 13 al 16 de noviembre de 2019; evento realizado en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

"POR LA CONCIENCIA DE LA NECESIDAD DE SERVIR"



**Dra. Leticia del Carmen Flores Alfaro**  
Secretaria Académica  
Universidad Autónoma de Chiapas



**Dra. en C. Dora Gilda Mayén Molina**  
Presidenta

Asociación Mexicana de Genética Humana A.C.