

# Riesgo Reproductivo en portadores de inversiones pericéntricas: relevancia de la evaluación y asesoramiento genético preconcepcional y prenatal

Martinez, M. <sup>(1)</sup>; Farini V. <sup>(2)</sup>;  
Perandones C. <sup>(3)</sup>; Muhlmann M. <sup>(4)</sup>:

(1) Centro Nacional de Genética Médica (CENAGEM)

(2) Secretaría de Ciencia y Tecnología (SECYT). Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)

(3) Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) y Centro Nacional de Genética Médica (CENAGEM). Halitus Instituto Médico

(4) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)- Universidad Nacional de San Martín (UNSAM). Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)  
E-mail: muhlmann@cnea.gov.ar

pericéntrica inv(9)(p11q13) que consulta por problemas de fertilidad. Estos estudios incluyen: ploidias y evaluación de la compactación cromatínica en espermatozoides y evaluación citogenética molecular de un producto de aborto.

## Introducción

En pacientes varones que consultan por esterilidad y/o infertilidad, la frecuencia de anomalías cromosómicas mayores varía desde un 2,2 hasta un 15%, con una frecuencia promedio del 8,6%, cifra claramente mayor que la encontrada en la población general, que es de 0,6%. Además, existe una estrecha correlación entre frecuencia de anomalías cromosómicas y grado de oligozoospermia.

Específicamente, las inversiones (inv) son rearrreglos estructurales intracromosómicos. La más común es la inversión simple o única. Cuando el segmento invertido incluye el centrómero, la inversión es pericéntrica, si no lo incluye, es paracéntrica. Las inversiones que contienen puntos de ruptura en las regiones heterocromáticas de los cromosomas 1, 9, 16 y cromosoma Y son observadas con una frecuencia del 1 al 2% (1) y consideradas variantes no patológicas. Algunos portadores de inversiones cromosómicas pueden sufrir abortos recurrentes o tener descendencia con anomalía cromosómica, resultado de duplicaciones o deficiencias en un cromosoma recombinante.

Otras inversiones parecen ser transmitidas normalmente y en forma balanceada a través de generaciones. En individuos heterocigotas para inversiones pericéntricas, se considera que el segmento invertido debe involucrar al menos el 30% o un tercio del largo total cromosómico para originar descendencia con cromosoma recombinante. (2) La inversión de la región heterocromática (qh) del cromosoma 9 puede considerarse un polimorfismo normal, no asociado a fenotipos anormales pero con consecuencias clínicas poco claras. Algunos estudios demuestran una asociación directa de la inversión (9)(qh) con infertilidad y abortos a repetición como resultado de una disyunción anormal durante la meiosis. (3) Otros estudios

## Resumen

El estudio citogenético en sangre periférica o cariotipo está indicado en todas aquellas parejas que presentan esterilidad o infertilidad. Dicha indicación se sustenta en que la incidencia de anomalías cromosómicas constitucionales es unas 13 veces superior en la población de pacientes estériles que en la población general.

Si bien el estudio citogenético en sangre periférica es muy informativo, los pacientes con cariotipo normal pueden presentar anomalías de la meiosis, limitadas a la línea germinal (anomalías en el apareamiento de los cromosomas homólogos, desinapsis, asinapsis). Estas anomalías darán lugar a espermatozoides aneuploides, que en caso de fecundación del oocito serán responsables de la formación de embriones inviables o viables pero con riesgo de presentar defectos congénitos al nacimiento. En este contexto, cobran relevancia los estudios que permiten la valoración del proceso meiótico a través del estudio del comportamiento cromosómico durante la primera y la segunda de las divisiones meióticas y aquellos destinados a determinar la regulación de factores epigenéticos en las gametas, como por ejemplo el grado de compactación del ADN espermático.

En este trabajo, presentamos los resultados de los estudios realizados en un portador de la inversión

excluyen cualquier asociación pero sugieren que inv(9)(qh) podría interferir en la correcta segregación de los cromosomas no involucrados en el rearreglo durante la meiosis, generando un incremento de aneuploidías en gametas. Los posibles mecanismos han sido revistos por Antón et.al. (4) Numerosos reportes han documentado un exceso de variantes cromosómicas, especialmente del cromosoma 9 con inv (9) y 9qh+, en parejas con fallas reproductivas, sin embargo, varios estudios realizados mediante análisis del cariotipo espermático humano en busca de posibles aneuploidías en individuos portadores de inversión, no han mostrado efectos intercromosómicos. (5,6,7) Independientemente de la segregación cromosómica, existe un parámetro que influye directamente en el desarrollo del embrión. Este parámetro es el estado de compactación de la cromatina, que se puede encontrar alterado por factores diversos. Durante la espermatogénesis, el 85% de las histonas de la cromatina espermática son reemplazadas por pequeñas proteínas de carácter básico (protaminas) ricas en residuos cisteína. La alta estabilidad necesaria para el transporte y la integridad del material genético espermático está dada por la fuerte unión entre estos residuos mediante puentes disulfuro. El estado de condensación cromatínica espermática puede verse alterada por varios factores y un alto porcentaje de mala condensación ha sido correlacionado con una reducida habilidad fecundante.(8) Luego de las aneuploidías, la condensación prematura de cromosomas que se produce frecuentemente en espermatozoides mal compactados es la segunda causa de fallas en la fertilización.(9) La utilización de cromomicina A3 permite analizar anomalías de la cromatina espermática. El reemplazo de histonas por protaminas juega un rol importante en la condensación cromatínica, formación del núcleo y la morfología de la cabeza espermática y se evidencia una importante correlación entre el déficit de protaminas y la tasa de fertilización, lo que sugiere que éste defecto formaría parte en la ocurrencia de condensación cromosómica prematura espermática, fallas de fertilización y arresto embrionario.

### Materiales, métodos y resultados:

Se realiza el estudio en un hombre sano de 34 años que consultó por esterilidad primaria luego de 2 años y medio de intento de embarazo.

#### I) Cariotipo y FISH

Dado que los parámetros espermáticos en dos espermogramas sucesivos dieron normales, se solicitó un cariotipo, cuyo resultado fue: 46,XY, inv (9)(p11;q13). La confirmación del mismo se observa en la Figura 1.



Figura 1: Confirmación con FISH (Fluorescence in situ Hybridization) de la inversión pericéntrica. Sonda centromérica: espectro verde, sonda del alpha satélite: espectro rojo.

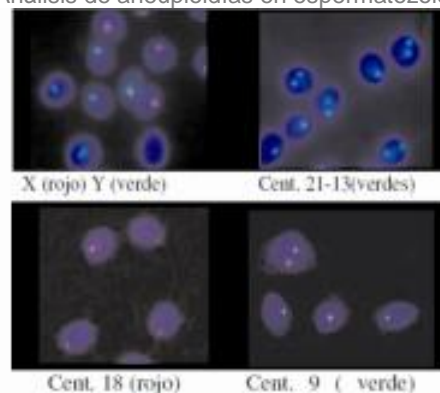
El cariotipo de su pareja arrojó un resultado normal de una mujer sana de 35 años con cariotipo 46, XX. Para determinar la frecuencia de posibles aneuploidías espermáticas se solicitó la evaluación espermática mediante FISH. Asimismo, por fracaso de implantación y abortos repetidos se solicitó el Test de descondensación cromatínica mediante Cromomicina.

#### II) Determinación de aneusomías en espermatozoides

Se realizó FISH en semen utilizando sondas centroméricas para cromosomas 9, 18,13- 21 y X y sonda satélite III para el cromosoma Y.

Para llevar a cabo el estudio de FISH se utilizó el protocolo de descondensación espermática con DTT según descrito en la literatura. (10) Los análisis se realizaron con un microscopio fluorescente OLYMPUS BX51 con filtros adecuados para los colores de los fluorocromos utilizados. Las imágenes fueron capturadas con una cámara Olympus DP70. (Figura 2)

Figura 2: Análisis de aneuploidías en espermatozoides.



Se realizó el scoring de aproximadamente 500 núcleos espermáticos de acuerdo con las recomendaciones publicadas (10) incluyendo señales FISH bien definidas y excluyendo las señales de bordes indefinidos o de espermatozoides descondensados obteniéndose para cada serie, los siguientes resultados:

Cromosomas	X/Y	21/13	18	9
Aneusómico (%)	1.2	1.1	1.1	0.6
Normal (%)	98.8	98.9	98.9	99.4

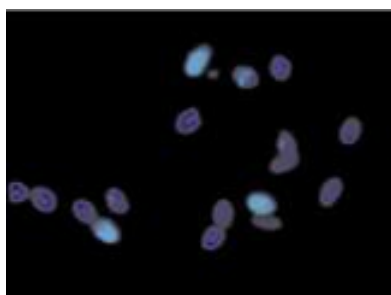


La tasa de aneuploidía para el complemento cromosómico completo, fue calculada utilizando la fórmula matemática (10) que utiliza la media geométrica del resultado de los espermatozoides evaluados para estimar los espermatozoides normales para todos los cromosomas (evaluados y no evaluados). Arrojando un resultado de espermatozoides normales de 80,4 %.

### III) Determinación de la compactación cromatínica en espermatozoides:

En resumen, este estudio se basa en la penetración diferenciada de dos colorantes de DNA. (Figura 3)

Figura 3: Ejemplo de la tinción Cromomicina DAPI.



- DAPI: Di AminoPhenil Indol, con fluorescencia azul
- CA: Cromomicina A3. Con fluorescencia amarilla.

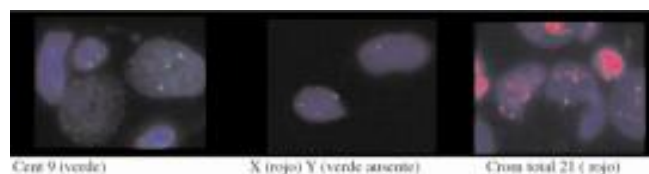
Esta última solamente penetra en caso de mala compactación espermática. Los valores normales para pacientes fértiles están por debajo de 30%. En el caso que nos concierne, el valor fue de 6,5%.

### IV) Estudio de material de aborto

Durante la realización de estos estudios, la pareja logra concebir naturalmente, interrumpiéndose la gesta espontáneamente. Para obtener información acerca de las causas de detección de la gesta, se realizó un estudio citogenético sobre material de aborto, utilizando las mismas sondas que para el estudio de espermatozoides.

Una alícuota de fijación en 3:1 metanol:ácido acético fue extendida en un portaobjeto con el fin de obtener un preparado de células no superpuestas. Se prepararon las distintas sondas y se las utilizó por separado. (Figura 4)

Figura 4: Resultado del FISH sobre producto de aborto



El análisis de 100 células con cada sonda demostró que existía un mosaicismo diploide-triploide en una proporción de 50 %.

### Discusión

En el humano, el concepto de “efecto intercromosómico” fue postulado por Lejeune. (11) Casos de trisomía 21 y aneuploidía de cromosomas sexuales, han sido reportados en asociación con inversiones cromosómicas, translocaciones recíprocas y translocaciones robertsonianas. (12) La ocurrencia de este fenómeno continúa siendo poco clara en mamíferos, por la dificultad de obtener datos experimentales y directos en gametas. Con el advenimiento de la citogenética molecular, FISH ha probado su eficiencia en núcleos espermáticos como en otros tipos de células y tejidos. (13) El análisis cromosómico en espermatozoides de varones infértiles ha mostrado que estos pacientes presentan una alta variabilidad en el comportamiento de la segregación cromosómica durante la meiosis. (14) La región centromérica contiene DNA alfoide, y la región pericentromérica contiene secuencias satélite III DNA clásicas y satélite \_ DNA. Los puntos de ruptura pueden ocurrir dentro de estas regiones dando lugar a cuatro tipos de inversiones pericéntricas, originando una variedad de heteromorfismos de oscura significancia clínica. (15)

Ameil et al. (16) halló un número incrementado de disomía 9 en esperma de un portador de inversión 9. Algunos autores han observado un riesgo incrementado de descendencia con trisomía 21 en portadores de inv(9) conteniendo una región heterocromática amplificada (9qh+). (17) Estos hallazgos contradicen la hipótesis de que las regiones heterocromáticas no participan en el crossing over. Han sido reportadas varias anomalías en individuos con inversión pericéntrica del 9 y ha sido asociada con abortos a repetición en varias familias. Varios estudios en series de parejas no seleccionadas, han fallado en la demostración de una relación entre inv(9) y aborto recurrente. Por otra parte, de treinta y tres familias con inv(9) estudiadas por Teo en 1995 (18), doce familias presentaban problemas de subfertilidad.

Colls et al. (7) investigaron semen de un hombre con inv(9)(p11q13), y las células espermáticas, disómicas para el cromosoma 9 y 21, no fueron más frecuentes que en los varones con cariotipo normal. Estos investigadores concluyeron que inv(9)(p11q13) no causaría defectos en la espermatogénesis.

Según los estudios realizados en nuestro análisis, el paciente no tendría un riesgo aumentado de descendencia anormal o aborto. No se ha observado aumentada la proporción de espermatozoides anormales para el cromosoma invertido ni para el resto de los cromosomas estudiados. Tampoco se ha observado efecto intercromosómico, ni anomalías de compactación de la cromatina espermática.

Sin embargo, el hallazgo de una mixoploidía en el material de aborto puede estar indicando un problema no identificado aún. El concepto de mixoploidía alude a la coexistencia de una población celular diploide normal y otra con tres o más múltiplos del set cromosómico haploide. En

este caso, la línea celular anormal presentaba 69 cromosomas. Los mosaicismos diploide/triploide son extraordinariamente infrecuentes y las manifestaciones clínicas pueden ser menos severas que aquellas asociadas a las triploidías completas. El mecanismo biológico postulado para explicar la ocurrencia de esta anomalía es el proceso de doble fertilización, el cual además ha sido sustentado por estudios de polimorfismos de ADN en los casos previamente reportados. (19)

Dado que, sin embargo, los pacientes tienen historia de infertilidad, con los elementos de juicio utilizados no podemos afirmar que la causa de sus problemas reproductivos es la inversión del portador, sino otra causa hasta ahora desconocida. De utilizar una técnica de reproducción asistida, se recomendaría realizar un diagnóstico genético de preimplantación, (20) con lo que se podría estudiar directamente la frecuencias de alteraciones en los embriones obtenidos.

Sólo la evaluación sistemática de los pacientes portadores de inv(9)(p11q13) permitirá el adecuado establecimiento de riesgos en cada caso y la realización del asesoramiento genético pertinente.

Agradecimientos: SECYT: PICTR 2002-00121

#### Referencias:

1-Kaiser, P. Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics. [Review]. *Human Genetics*. 68(1):1-47, 1984.

2-Morel F, Laudier B, Guerif, et al Meiotic Segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in situ hybridization. *Human Reproduction* 22; 136-141, 2007.

3-Collodel, G. Moretti, E. Capitani, S. Piomboni, P. Anichini, C. Estenoz, M. Baccetti, B. TEM, FISH and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia*. 8(4):122-7, 2006.

4-Anton E. Blanco J. Egozcue J. Vidal F. Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. [Review]. *Cytogenetic & Genome Research*. 111(3-4):297-304, 2005.

5-Martin, R H. Cytogenetic analysis of sperm from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv (3) (p25q21). *American Journal of Human Genetics*. 48(5):856-61, 1991.

6-Navarro, J. Benet, J. Martorell, M R. Templado, C. Egozcue, J. Segregation analysis in a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 7 (p13;q36) by sperm chromosome studies. *American Journal of Human Genetics*. 53(1):214-9, 1993.

7-Colls, P.; Blanco, J.; Martínez – Pasarell, O.; Vidal, F.; Egozcue, J.; Marquez, C.; Guitart, M.; Templado, C. Chromosome segregation in a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(9)(p11q13), analyzed by using sperm karyotyping and two-colour fluorescent in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet* 99:761-765. 1997

8-Agarwal A, Said TM, Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male fertility. *Human reproduction Update* 9,331-345. 2003

9-Schmiady H. Tandler-Schneider A. Kantenich H. Premature chromosome condensation of the sperm nucleus after intracytoplasmic sperm injection. [Journal Article] *Human Reproduction*. 11(10):2239-45, 1996

10-Coco R, Gallo A, Muhlmann M, Garrido D, Estudio preconcepcional en un heterocigota de translocación t(1;4)(p32;q25). Análisis de segregación y aneuploidía por FISH doble y triple color. *J Brasileiro Reprod Assist* 4:51-59. 2000

11-Lejeune J : Autosomal disorders. *Pediatrics* 32:326-337 .1963

12-Serra A. Brahe C. Millington-Ward A. Neri G. Tedeschi B. Tassone F. Bova R. Pericentric inversion of chromosome 9: prevalence in 300 Down syndrome families and molecular studies of nondisjunction. [Journal Article]. *Research Support, Non-U.S. Gov't* *American Journal of Medical Genetics - Supplement*. 7:162-8, 1990.

13-Mühlmann, M., Molecular cytogenetics in metaphase and interphase cells for cancer and genetic research, diagnosis and prognosis. Application in tissue sections and cell suspensions. *Genet. Mol. Res.* 1 (2): 117-127. 2002

14-Moosani N. Pattinson HA. Carter MD. Cox DM. Rademaker AW. Martin RH. Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertility & Sterility*. 64(4):811-7, 1995.

15-Verma RS. Luke S. Brennan JP. Mathews T. Conte RA. Macera MJ. Molecular topography of the secondary constriction region (qh) of human chromosome 9 with an unusual euchromatic band. *American Journal of Human Genetics*. 52:981-6, 1993.

16-Amiel, A.; Sandos -Albertini, F.; Fejgin, M.; Sharony, R.; Diucman, R.; Bartoov, B. Interchromosomal effect leading to and increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv9) and Cheterochromatin. *J Hum Genet* 46:245–250. 2001.

17-Serra A. Neri G. Trisomy 21: conference report and 1990 update. [Review] [119 refs] [Journal Article. Review] *American Journal of Medical Genetics - Supplement*. 7:11-9, 1990.

18- Teo SH, Tan M, Knight L, Yeo SH Ngl. Pericentric inversion 9-incidence and clinical significance. *Ann Acad Med Singapore* 24:302-403, 1995

19-Perandones, C.; Cerretini, R.; Bozzo, W.; Bañares, V.; Alba, L.; Sala, A.; Pivetta, O.; Corach, D.; Mühlmann-Diaz, M. Diploid-Triploid mosaicism in chorionic villus sampling (CVS): clinical significance and prenatal assessment. *BioMedicina* 1:425-428. 1998

20-Mühlmann, M.; Laudicina, A.; Perandones, C.; Bertolino, M.; Marazzi, A.; Quintans, C.; Donaldson, M.; Bozzo, W.; Pasqualini, S., Uses and limitations of two molecular cytogenetic techniques for the study of arrested embryos obtained through assisted reproduction technology. *Genet. Mol. Res.* 4: 143-152 .2005