

Andrología

## **Avances en el conocimiento de la espermatogénesis. Implicaciones clínicas**

### *Advances in the knowledges of spermatogenesis. Clinical implications*

Marina S.  
Instituto de Reproducción CEFER. Barcelona

#### **Resumen**

*Tras una breve introducción histórica se describen los tres componentes principales del testículo adulto: células de Sertoli, epitelio germinal y células de Leydig en el intersticio. Se esboza las principales fases y hechos de la meiosis y los factores endocrinos y genéticos que la regulan. Entre las etiologías de las alteraciones de la espermatogénesis se exponen las alteraciones cromosómicas tanto somáticas como solo germinales. En las alteraciones germinales se comenta y compara el estudio cromosómico efectuado en biopsia testicular y en espermatozoides.*

*Entre las alteraciones genéticas se describen las microdeleciones del Y, las alteraciones genéticas que afectan a la movilidad y a la morfología espermáticas. Se recalca la importancia de un conocimiento profundo de la espermatogénesis y sus alteraciones para diagnosticarlas, tratarlas si la etiología lo permite; valorar si se podrán obtener espermatozoides en caso de azoospermia secretora e informar al paciente del riesgo de transmitir a su descendencia la alteración cromosómica o genética que tuviere.*

**Palabras clave:** Espermatogénesis. Estudio meiotico. FISH en espermatozoide. Microdeleciones del Y

#### **Summary**

*After a brief historical introduction, the three main components of the adult testis are described: the Sertoli cells, the germinal epithelium and the interstitial or Leydig cells. The main phases and events of meiosis are described, as well as the endocrine and genetic factors that regulate it. The etiologies of alterations of spermatogenesis are discussed, including chromosome alterations in somatic cells and those only affecting germ cells. In alterations in germ cells, chromosome studies performed using testicular biopsies and sperm are commented upon and compared.*

*Genetic alterations involving microdeletions of the Y chromosome are described, as well as those affecting sperm motility and morphology. The importance is stressed of the need for in-depth knowledge of spermatogenesis and its alterations so they can be diagnosed and the etiology in question can be treated, if possible. Emphasis is also placed on evaluating whether or not sperm can be obtained in the case of secretory azoospermia and informing the patient of the risk of transmitting any chromosome or genetic alterations to his descendants.*

**Key words:** Spermatogenesis. Meiotic study. FISH in spermatozoa. Y Microdeletions.

---

**Correspondencia:** Dr. Simón Marina  
Instituto de Reproducción CEFER  
Marquesa de Vilallonga, 12- Bajos, despacho, 21  
08017 Barcelona

## INTRODUCCIÓN

Antony Van Leeuwenhoek (632-1723), natural de Delft, (Holanda) en numerosas cartas enviadas a la "Royal Society" de Londres escribió sus observaciones en los rudimentarios microscopios que él mismo se fabricaba. Eran microscopios de una lente iluminada por una lámpara de gas. En una de esas cartas describió los espermatozoides de un eyaculado. Eran los primeros ojos que los escudriñaban. En 1678 estas cartas se publicaron en "Philosophical Transactions" en Londres (1); y en 1722 en "Opera Omnia", en Leyden (2). Van Leeuwenhoek describió el primer caso de esterilidad masculina por azoospermia. Habían de pasar más de dos siglos (en 1841) hasta que Kölliker describiera la espermatogénesis y mostrara que los espermatozoides proceden de células presentes en los túbulos seminíferos. (3)

En 1850 Franz Leydig (4), profesor en Würzburg (Alemania), describió en los espacios intersticiales, entre los túbulos seminíferos, unos grupos de células que actualmente llevan su nombre. Leydig las describió en testículo de diversas especies de mamíferos (rata, gato, cerdo) pero no en humano. Es Kölliker (5) quien en 1854 las describió en el testículo humano. En 1903 Bouin y Ancel (6) aportaron pruebas de que las células de Leydig tenían una función endocrina. En 1958 Wattenberg demostró que dichas células contenían la enzima 3 beta-ol deshidrogenasa (7); y en 1965 Christensen y Manson (8) objetivaron mediante cultivo in vitro cómo la progesterona marcada con C14 se transformaba en testosterona en las células de Leydig y no en los túbulos seminíferos.

En 1865 Enrico Sertoli (9) que había estudiado medicina en Pavía, relacionó las células que llevan su nombre con la producción de espermatozoides. Los tres actores de la producción de espermatozoides, de la espermatogénesis son: 1) las células germinales, cuya división y diferenciación celular va a dar lugar a la formación de espermatozoides; 2) las células de Leydig, en los espacios intertubulares productoras de testosterona, hormona imprescindible para que se produzca la meiosis; y 3) las células de Sertoli en el interior de los túbulos seminíferos, que van a aportar la estructura y el microclima preciso para que la espermatogénesis se desarrolle adecuadamente. Las células germinales, espermatogonias, se dividen activamente, unas 20-25 veces al año. Según la edad del hombre cada espermatozoide es el producto de varios centenares de divisiones celulares. La espermatogénesis normal necesita un ambiente hormonal adecuado, una expresión génica precisa, pobremente conoci-

da; y un apareamiento y distribución cromosómica correctas para dar lugar a gametos funcionantes y en cantidad normal.

## ESBOZO HISTOLÓGICO DEL TESTÍCULO

Las dos estructuras propias del testículo son los túbulos seminíferos y las células de Leydig situadas en los espacios intersticiales entre los túbulos seminíferos.

### Túbulos seminíferos

Los túbulos seminíferos tienen un diámetro de unas 300 micras. La pared que los limita está formada, de dentro afuera, por la membrana basal, fibroblastos y células peritubulares mioideas. En el interior de los túbulos seminíferos se distinguen las células de Sertoli y las células germinales (Fig. 1). Alrededor del túbulo seminífero, en el intersticio, hay células mioideas peritubulares, con capacidad contractil; y fibrocitos.

### Células de Sertoli

Fueron descritas, cuando tenía solo 23 años, por Enrico Sertoli, natural de Sondrio en la Valtellina, cerca de Milán. Sertoli tuvo como compañero a

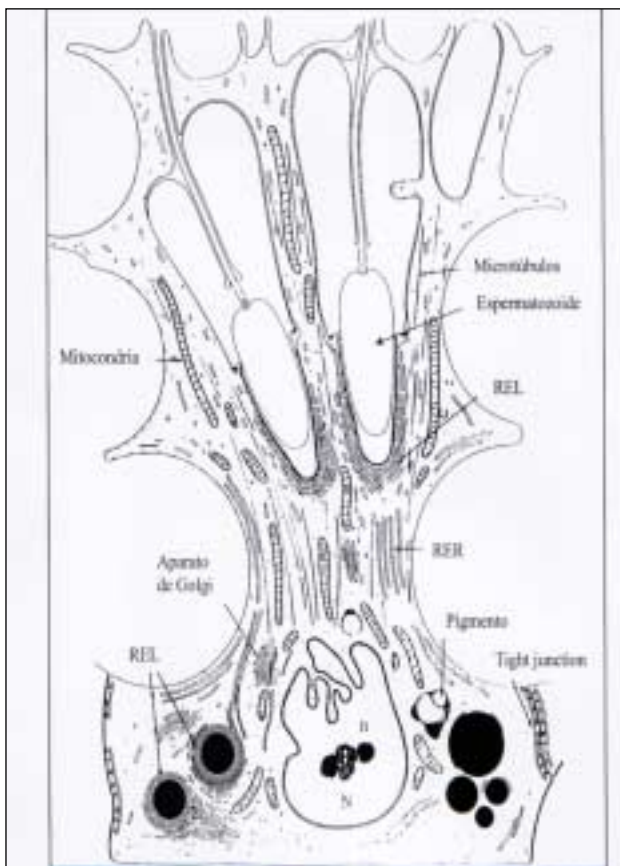


**Figura 1**  
Túbulos seminíferos.

Camillo Golgi. En 1865 (9) Sertoli ya relacionó las células que llevan su nombre con la producción de espermatozoides. Las células de Sertoli son células epiteliales somáticas que proceden de células de la superficie del mesonefros. Estas células proliferan en el embrión de alrededor de 36 días. En el embrión masculino de 8 semanas las células de Sertoli están organizadas en cordones y separadas del intersticio por una membrana basal. En la célula de Sertoli se expresa el gen TDF (Testicular Differentiating Factor) y el gen de la hormona antimülleriana localizado en el cromosoma 19. La influencia de las células de Sertoli en la diferenciación de la gónada en sentido masculino, testicular, es decisiva. En el periodo fetal, las células de Sertoli de manera activa inhiben la espermatogénesis. Al contrario, en la edad adulta, las células de Sertoli estimulan, inducen la espermatogénesis. En el adulto las células de Sertoli están fijadas a la membrana basal del túbulo seminífero. Son

de tipo columnar arborescente y su otro extremo bordea la luz tubular. Presentan múltiples digitaciones que envuelven a las células germinales. Tienen un núcleo indentado y un gran nucleolo (Fig. 2). Las células de Sertoli del testículo adulto no se dividen.

En la zona basal del túbulo seminífero las membranas plasmáticas de las células de Sertoli vecinas forman unas uniones firmes (tight junctions) que impiden el paso de moléculas grandes, hormonas esteroideas e iones al espacio luminal (Fig. 2). El túbulo seminífero queda así dividido en un compartimento basal, entre la membrana basal y las "tight junctions"; y otro luminal, desde las "tight junctions" hasta la luz tubular. (10). Las "tight junctions" forman la base estructural de la barrera hemato-testicular que crea un ambiente endocrino-metabólico especial para que se produzca la espermatogénesis. Las sustancias procedentes de los capilares y células del intersticio no tienen acceso libre al compartimento luminal del túbulo seminífero. Han de entrar a través de la célula de Sertoli. La célula de Sertoli tiene receptores para la FSH y la testosterona pero no para la LH. La acción de la FSH y la testosterona, sintetizada en las células de Leydig, sobre la espermatogénesis es a través de la célula de Sertoli. Las células de Sertoli reciben estímulos endocrinos (FSH) y paracrinicos procedentes de las células de Leydig, de las células mioides peritubulares y de las células germinales (11-13). Las principales se citan algunas de las sustancias sintetizadas por estas células. El lector interesado en la célula de Sertoli puede consultar el libro "The Sertoli Cell" (14).



**Figura 2**

*Célula de Sertoli*

*N: Núcleo; n: nucleolo; REL: retículo endoplásmico liso; RER: retículo endoplásmico rugoso*

### Células germinales

Las células germinales masculinas comprenden las espermatogonias, espermatoцитos I y II, espermátides y espermatozoides. Las espermatogonias proceden de las células germinales primitivas o gonocitos que de la región del saco vitelino emigran a la cresta genital donde proliferan entre las células de Sertoli. Al formarse los cordones seminíferos los gonocitos están en el interior y poco a poco se trasladan hacia la periferia, hacia la membrana basal, dando lugar a las espermatogonias.

### Espermatogénesis

Es el complejo proceso mediante el cual las espermatogonias tras una serie de divisiones y diferenciación celular dan lugar a espermatozoides. Se distinguen tres etapas o fases.

A) Fase espermatogonial. Es la fase proliferativa. La espermatogonia está en contacto con la mem-

**Tabla 1**  
*Funciones de las Células de Sertoli*

- 1.- Mantiene la estructura del túbulo seminífero.
- 2.- Divide el epitelio seminífero en dos compartimentos, basal y luminal, gracias a la formación de las "tight junctions". En el hipogonadismo hipogonadotrófico prepuberal no se forman las "tight junctions" ni por tanto la barrera hemato-testicular.
- 3.- Traslado de las células germinales del compartimento basal al luminal. Para ello se requiere reconocimiento de que la espermatogonia situada en el compartimento basal inicia su maduración a espermatocito; y rotura y reparación de las "tight junctions".
- 4.- Fagocitosis de células germinales degeneradas.
- 5.- Espermiación, es decir liberación de los espermatozoides en la luz del túbulo seminífero.
- 6.- Secreción del fluido del túbulo seminífero que ayuda al transporte espermático desde la luz del túbulo seminífero a los tubos rectos, rete testis, conos eferentes y epidídimo.
- 7.- Aporte de nutrientes a las células germinales como resultado de la barrera hemato-testicular formada por las "tight junctions".
- 8.- Secreción de proteínas y otros productos. Ver tabla 2.

**Tabla 2**  
*Secreción de las Células de Sertoli*

- 1.- Proteínas transportadoras**
  - 1.1 ABP (Androgen Binding Protein) transporta testosterona.
  - 1.2 Transferrina: transporta hierro
  - 1.3 Ceruloplasmina: transporta cobre
  - 1.4 IGF binding protein: transporta Insulin Growth Factor
- 2.- Factores de crecimiento y hormonas**
  - 2.1. IGF-I (Insulin Growth Factor I)
  - 2.2. FGF (Fibroblast Growth Factor)
  - 2.3. TGF alfa y beta (Transforming Growth Factor)
  - 2.4. Inhibina
  - 2.5. Activina
  - 2.6. Hormona antimülleriana
  - 2.7. Estradiol
- 3.- Substratos energéticos**
  - 3.1. Lactato
  - 3.2. Piruvato
- 4.- Otras sustancias**
  - 4.1. Activador del plasminógeno
  - 4.2. Colagenasa tipo IV
  - 4.3. Macroglobulina alfa 2
  - 4.4. Heparina, etc.

brana basal del túbulo seminífero y se divide por mitosis. Se distinguen dos tipos de espermatogonias: la A que permanece en el compartimento basal del túbulo seminífero y la espermatogonia B que pasa, previa rotura de las "tight junctions" al compartimento luminal y se transforma en espermatocito I preleptoténico (Fig. 2).

B) Fase espermatocitaria. Comprende dos divisiones celulares, de espermatocito I a espermatocito II y de este a espermátide. De un espermatocito I que tiene 23 cromosomas bivalentes, es decir con cuatro cromátides cada uno, se forman cuatro espermatozoides. Las divisiones de la etapa espermatocitaria son de tipo reduccional o meióticas. Las células resultantes, las espermátides, tienen una carga cromosómica haploide, solo 23 cromosomas en vez de los 46 cromosomas de las células somáticas.

Durante la meiosis, además de la reducción cromosómica a la mitad, se produce el "crossing-over" o intercambio génico entre los cromosomas homólogos heredados del padre y de la madre. El intercambio génico tiene lugar durante la fase paquítenica de la profase I. En la fase anterior, la de zigotene, se produce el apareamiento de cromosomas homólogos de una forma muy precisa gracias a una estructura, los complejos sinapteinémicos que permiten el intercambio de genes alelos. La rotura del DNA y su reparación son aspectos importantes dentro del proceso meiótico. En la profase I se distinguen por este orden los estadios de leptotene, zigotene, paquítena, diplotene (se separan los cromosomas) y diacinesis. Se continúa con la metafase I, etc. La meiosis, en síntesis, permite que se mantengan de generación en generación el número de cromosomas de la especie pues los gametos, masculino y femenino, aportan cada uno 23 cromosomas, la mitad de los cromosomas de la especie humana. El intercambio génico, que ocurre durante la profase I, produce diversidad génica en la descendencia respecto a los progenitores.

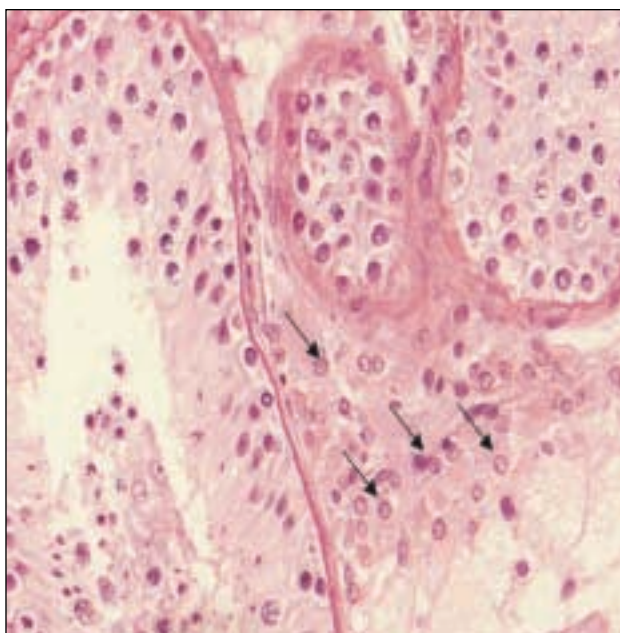
C) Fase espermiogénica. En esta fase no hay división celular, solo diferenciación celular. El espermátide, célula redonda, contiene 23 cromosomas; es por tanto haploide. Procede de la división celular del espermatocito II y se transforma en espermatozoide. Los cambios más evidentes son la transformación del aparato de Golgi en acrosoma, la elongación del núcleo pasando de redondo a elíptico; el desarrollo del flagelo espermático a partir del centriolo distal; y la eliminación del citoplasma. A ello hay que añadir

dir la condensación de la cromatina, cambios metabólicos y la localización de las mitocondrias alrededor de la parte proximal del flagelo, formando “la pieza intermedia”.

D) Espermiación. Es la liberación de los espermatozoides de su relación con la célula de Sertoli, quedando libres en la luz del túbulo seminífero para poder ser transportados a través de los tubos rectos, rete testis y conos eferentes hasta el epidídimo donde adquirirán la movilidad traslativa.

### Células de Leydig

La célula de Leydig está localizada entre los túbulos seminíferos, en el intersticio testicular. Forma grupos y están cerca de vaso sanguíneos. Tienen forma poligonal y un volumen de unas tres micras cúbicas. Entre células de Leydig vecinas se observan “gap junctions” y desmosomas rudimentarios. Todas las células de Leydig suponen menos del 10% del volumen testicular. Las células de Leydig maduras no se dividen. El núcleo es redondeado y habitualmente único (Fig. 3). El nucleolo es prominente y suele ser único. El retículo endoplásmico liso (SER: Smooth Endoplasmic Reticulum) es muy abundante como corresponde a una célula con actividad esteroidogénica. Las mitocondrias leydigianas son también prominentes; están en conexión con el SER y presentan “cres-



**Figura 3**

*Células de Leydig. Las flechas señalan los núcleos*

tas tubulares”. El contenido de gotas lipídicas es pobre y se considera que son la fuente de precursores para la biosíntesis androgénica. El pigmento lipofuscina se considera es una forma semidegradada de lípidos. Las células de Leydig humanas contienen cristales de Reinke; fueron descritos hace más de cien años. Son visibles al microscopio óptico y están formados por material proteináceo. Tienen forma de rombo, barra o cuña. Están formados por filamentos cuya sección transversal es prismática hexagonal. Los cristaloides de Reinke son casi exclusivos de la especie humana. No se observan en el testículo fetal y su función se desconoce. Los andrógenos sintetizados en las células de Leydig salen del testículo a través de los vasos linfáticos y sanguíneos y de los túbulos seminíferos. En el intersticio también se encuentran fibroblastos y células sanguíneas como linfocitos, macrófagos, células plasmáticas, monocitos y mastocitos. Hay asimismo vasos sanguíneos y linfáticos. Véase el libro “The Leydig Cell” (15).

### DEPENDENCIA HORMONAL DE LA ESPERMATOGÉNESIS

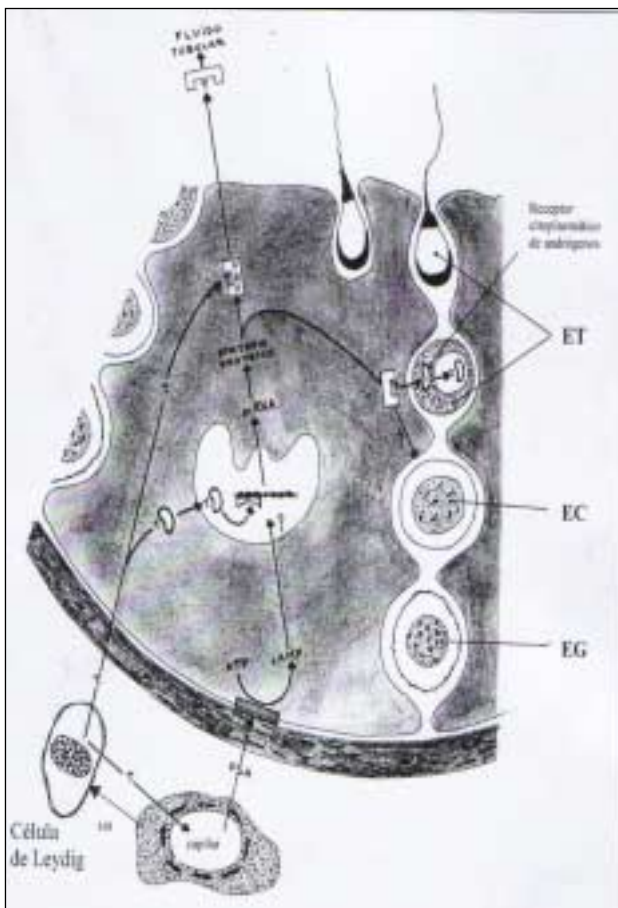
El complejo proceso espermatogénico, aquí solo esbozado, que se desarrolla en el túbulo seminífero principalmente en su compartimento luminal, requiere entre otros factores una alta concentración de testosterona. La espermatogénesis y sobre todo la meiosis es testosterona dependiente (Fig. 4). La concentración de testosterona en el túbulo seminífero es 100 veces mayor que en sangre periférica (16). Esta elevada concentración se alcanza porque los grupos de células de Leydig, donde se sintetiza la testosterona, están próximos a los túbulos seminíferos; y la testosterona se difunde a la célula de Sertoli además de a los vasos sanguíneos y linfáticos (Fig. 4).

En la célula sertoliana la pequeña molécula de testosterona se une a la proteína transportadora, ABP, sintetizada por la citada célula. Se consigue así una elevada concentración de testosterona intratubular gracias a un doble mecanismo: producción de testosterona cerca de los túbulos, en las células de Leydig estimuladas por la LH; y por la síntesis de ABP por la célula de Sertoli estimulada por la FSH. No se han detectado receptores para la LH en la célula de Sertoli ni en las células germinales. Receptores para FSH tienen la célula de Sertoli y las espermatogonias. La acción de la FSH sobre estas no se conoce. La célula de Leydig carece de receptores para la FSH. El estradiol testicular es sintetizado en la célula de Sertoli que utiliza como sustrato la testosterona pro-

ducida en la célula de Leydig. A su vez el estradiol sale al espacio intersticial y contribuye a la regulación de la actividad leydigiana. Hay una regulación paracrina entre célula de Leydig y de Sertoli, sin olvidar la célula peritubular, no bien conocida y con escasa utilidad para la clínica práctica humana.

## GENES Y ESPERMATOGÉNESIS

La mayoría de genes que rigen el complejo proceso de la espermatogénesis se desconocen. Lo poco conocido suele deberse a situaciones patológicas debidas a la ausencia de un gen o de un fragmento de cromosoma. El cromosoma Y, exclusivo del varón, supone el 2% del componente cromosómico. Es acrocéntrico y tiene unos 60 millones de pares de bases. Presenta una zona eucromática que comprende los brazos cortos, el centrómero y una zona de los brazos largos vecina al centrómero. La mayor parte de los



**Figura 4**

*Acción de la testosterona sobre la espermatogénesis*

brazos largos es heterocromática y no recombina durante la meiosis. El extremo de los brazos cortos recombina con el cromosoma X; se forma un quiasma, necesario para la segregación normal de los cromosomas X e Y durante la meiosis.

El gen SF-1 (Steroidogenic Factor) interviene en la diferenciación de las células mesenquimales del mesonefros en células de Leydig. El gen SF-1 y el gen del tumor de Wilms son indispensables para la formación de la cresta gonadal (17-19).

En los brazos cortos del Y se localiza el gen SRY (Sex-determining Region) antes denominado TDF. Este gen, regulado por los genes SF-1 y el gen del tumor de Wilms, inducen la diferenciación de las células de Sertoli y la formación de los cordones testiculares que darán lugar a los túbulos seminíferos. En la región eucromática de los brazos largos del cromosoma Y se encuentra la zona denominada región del Factor de Azoospermia (AZF). Es una región grande, de megabases (Mb), y se divide en cuatro zonas: AZFa, AZFb, AZFc y AZFd. En la región AZF se han identificado genes que intervienen en la regulación de la espermatogénesis. Son los genes RBMY (20); DBY (21); USP9Y (22); y DAZ (Deleted in Azoospermia).

### El gen DAZ

El gen DAZ, localizado en la zona AZFc (Yq11.23) es el mejor conocido. Abarca 3,5 Mb y contiene siete familias de genes que se consideran involucradas en la espermatogénesis. Una de estas familias está constituida por cuatro genes, dos grupos de dos (23). El número de copias de este gen oscila de un hombre a otro entre tres y siete (23). Se han descrito los genes DAZ1, DAZ2, DAZ3 y DAZ4, (24.) Se expresan solo en las células germinales; en espermatogonias y espermatocitos (25); y en espermátides y cola del espermatozoide (26).

### Otros genes DAZ

Además del grupo de genes DAZ situados en el cromosoma Y se ha detectado gen DAZ-LIKE o DAZL localizado en los brazos cortos del cromosoma 3 (3p25). De este gen derivó el gen DAZ del Y (27). En el cromosoma 2 se ha detectado otro gen de la familia DAZ, denominado BOULE. Es evolutivamente más antiguo (se ha detectado en insectos). Se expresa y regula en la meiosis (28). Los genes DAZ y DAZL se expresan en las células madre germinales y en las espermatogonias (29).

## ALTERACIONES DE LA ESPERMATOGÉNESIS

Las alteraciones de la espermatogénesis son debidas a múltiples causas; las principales se resumen en la tabla 3. Los aspectos endocrinológicos de la espermatogénesis y sus implicaciones clínicas las hemos tratado recientemente (30). Nos vamos a referir a las etiologías cromosómicas y genéticas.

**Tabla 3**  
*Alteraciones de la espermatogénesis*

### 1.- HIPOGONADIMOS HIPOGONADOTRÓFICOS

#### A) CONGÉNITOS

- 1.- Síndrome de Kallmann
- 2.- Hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático
- 3.- Déficit aislado de LH (eunucos fértiles) o síndrome de Pasqualini a).
- 4.- Déficit aislado de FSH a)
- 5.- Hipogonadismo asociado a síndromes malformativos: S. de Prader-Willi; de Laurence-Moon-Bield; etc. Estos pacientes no consultan por esterilidad

**a) estos déficits son de origen hipotalámico y se pueden considerar subgrupos del hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático. Son poco frecuentes.**

#### B) ADQUIRIDOS

- 5.- Tumores de la región hipotalámica; craneofaringioma, disgerminoma, glioma, etc.
- 6.- Tumores hipofisarios
- 7.- Hemocromatosis
- 8.- Silla turca vacía
- 9.- Infecciones: toxoplasmosis cerebral, etc.
- 10.- Hemorragias y traumatismos
- 11.- Hipofisectomía

### 2.- HIPOGONADIMOS HIPERGONADOTRÓFICOS

#### A) CONGÉNITOS

- 1.- Anorquía
- 2.- Criptorquidia bilateral
- 3.- Alteraciones cromosómicas
- 4.- Microdeleciones del Y
- 5.- Síndrome de Reifstein
- 6.- Distrofia miotónica de Steinert

#### B) ADQUIRIDOS

- 1.- Orquiectomía bilateral
- 2.- Torsión testicular bilateral
- 3.- Orquitis bilateral
- 4.- Radioterapia
- 5.- Quimioterapia
- 6.- Traumatismo

## ALTERACIONES CROMOSÓMICAS DE LA ESPERMATOGÉNESIS

Entre las anomalías cromosómicas detectadas en espermatocitos hemos de distinguir las debidas a alteraciones del cariotipo mitótico y las limitadas a la espermatogénesis, es decir con cariotipo mitótico normal. Las alteraciones cromosómicas mitóticas con repercusión meiótica mejor conocidas se recogen en la tabla 4. Vamos a comentar las limitadas a la espermatogénesis, es decir con cariotipo normal. Las alteraciones cromosómicas meióticas limitadas a la línea germinal, con cariotipo normal, constituye uno de los grandes capítulos de la andrología peor conocidos y con frecuencia no se diagnostican. El estudio meiótico se debe hacer en muestra de parénquima testicular obtenido mediante biopsia preferiblemente a cielo abierto. El estudio se efectúa sobre espermatocitos I y II. Es frecuente que no se observen células en metafase II dada la brevedad de esta fase, respecto a la profase I y metafase I. Las células que están en profase I

**Tabla 4**  
*Anomalías mitóticas con repercusión meiótica*

### 1.- Aneuploidías gonosómicas

- 47, XXY
- 47, XYY
- 47, XXY / 46, XY
- 46, XX (varón)
- 45, XO / 46, XY

### 2.- Alteraciones estructurales gonosómicas

- 2.1. Inversión pericéntrica del Y
- 2.2. Y dicéntrico
- 2.3. Y en anillo
- 2.4. X frágil

### 3.- Translocaciones recíprocas gono-autosómicas

- 3.1. Translocación X - autosoma
- 3.2. Translocación Y - autosoma.

### 4.- Alteraciones autosómicas

#### 4.1. Translocaciones

- Robertsonianas (la más frecuente es la 13; 14).
- Recíprocas

#### 4.2. Inversiones

- Pericéntricas
- Paracéntricas

#### 4.3. Deleciones

### 5.- Cromosoma extra marcador

- (47, XY + mar) o en anillo

permiten valorar si el apareamiento cromosómico es normal o anormal y el estudio de células en metafase I aporta información sobre la separación correcta o no de los cromosomas. Alteraciones cromosómicas de la segunda división meiótica se pueden detectar solo si la muestra estudiada contiene espermatoцитos II. El estudio meiótico en semen, en espermatoцитos descamados y eyaculados, puede dar resultados falsos positivos y falsos negativos. Es preferible hacer el estudio en muestra de biopsia testicular. La resume las alteraciones cromosómicas solo meióticas (31). Las anomalías más frecuentes son los bloqueos madurativos principalmente en espermatoцитo I; le sigue en frecuencia las desinapsis. Las anomalías de apareamiento en profase I generalmente se observan en casos de bloqueo o desinapsis. En los casos de univalentes autosómicos de pequeño tamaño en metafase I se ha demostrado, al estudiar los complejos sinaptonémicos, que presentan anomalías sinápticas (32).

Las repercusiones de anomalías cromosómicas en las células de espermatogénesis pueden ser 1) bloqueo completo de la espermatogénesis que producirá azoospermia. 2) bloqueo incompleto de la espermatogénesis con espermatozoides euploides. Hay en estos casos dos líneas celulares, mosaicismo, unas con anomalías cromosómicas bloquean la espermatogénesis; y otras sin anomalías cromosómicas dan lugar a gametos euploides, normales. El paciente tendrá recuento espermático total (RET) bajo pero los espermatozoides que eyacule serán euploides. 3) alteración cromosómica meiótica que produce en unas células bloqueo y en otras da lugar a espermatozoides aneuploides (hiperhaploides, hipohaploides o diploides). 4) No hay bloqueo espermatogénico. Los pacientes tienen RET normal, incluso elevado (polizospermia) pero con espermatozoides aneuploides. La movilidad

y morfología espermáticas suelen estar alteradas pero no necesariamente. En estos casos la espermatogénesis no está cuantitativamente afectada pero los gametos producidos no son euploides. La información aportada por el seminograma convencional no permite descartar con seguridad en ningún caso la posible existencia de anomalías cromosómicas meióticas.

En dos estudios en hombres infértiles y estériles la incidencia de anomalías solo meióticas fue del 4,3% (33) y del 7,7% (34). En pacientes con oligoastenozoospermia severa se detectaron anomalías sinápticas en el 17,5% (35).

## ESTUDIO CROMOSÓMICO EN ESPERMATOZOIDES

Desde hace más de una década se vienen publicando trabajos sobre el uso de la técnica de FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) en núcleos espermáticos previamente fijados y descondensados con DTT (dithiotreitol). Los trabajos publicados suelen ser sobre un número pequeño de casos y correlacionados con los tres parámetros básicos del seminograma convencional, recuento, movilidad, y morfología. En el Instituto CEFER estamos utilizando el estudio de cromosomas en espermatozoides mediante FISH como un estudio de aplicación clínica habitual. Las sondas fluorescentes utilizadas son de dos tipos, sondas centroméricas para los cromosomas X, Y, y 18; y sondas específicas de loci para los cromosomas 13 y 21. Las indicaciones básicas de la FISH en espermatozoides han sido oligoastenozoospermia, abortos de repetición; baja tasa de fecundación ( $\leq 50\%$ ) y fallo de implantación (no gestación tras transferencia de (10 embriones). El porcentaje de muestras de semen con incremento estadísticamente significativo de espermatozoides con aneuploidias ha sido del 14% (36). En un grupo de estos pacientes hicimos estudio de cromosomas meióticos en biopsia testicular y observamos que en más del 50% de casos en que el FISH era normal se detectaban alteraciones meióticas en la biopsia de testículo (37). La explicación de esta discordancia puede ser que en el estudio meiótico se observan los 24 cromosomas y en el de FISH solo se estudian cinco. Otra explicación posible es que las células meióticas con alteraciones cromosómicas no progresan hasta espermatozoide y por ello el FISH en estos casos resulta normal. En todos los casos, excepto en uno, siempre que la técnica de FISH ha mostrado alteraciones cromosómicas en espermatozoides, se han observado anomalías cromosómicas en la meiosis. En el único caso con FISH alte-

**Tabla 5**

*Anomalía cromosómicas limitadas a la meiosis*

- |  |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Bloqueo madurativo</li> <li>2.- Anomalías de apareamiento en profase I</li> <li>3.- Desinapsis (a)             <ol style="list-style-type: none"> <li>3.1. completa y total b)</li> <li>3.2. completa y parcial c)</li> <li>3.3. de algunos cromosomas bivalentes</li> </ol> </li> <li>4.- Univalentes autosómicos de pequeño tamaño en metafase I.</li> </ol> <hr/> <ol style="list-style-type: none"> <li>a) Clasificación de Templado (1981) (31)</li> <li>b) Afecta a todos los cromosomas y a todas las células</li> <li>c) Afecta a todos los cromosomas pero no a todas las células</li> </ol> |
|--|

rado y estudio meiótico normal no se vieron células en metafase II. Podría ser una alteración de la segunda división meiótica, no observada en el estudio meiótico. Las tasas de aneuploidias espermáticas son más elevadas en pacientes con oligoastenoteratozoospermia (38-41). En la actualidad consideramos que la técnica de FISH en espermatozoides y el estudio cromosómico en biopsia testicular son estudios complementarios, no excluyentes.

## ALTERACIONES GENÉTICAS Y ESPERMATOGÉNESIS

No vamos a comentar la patología genética causante de diferentes tipos de intersexualidad pues el motivo de consulta y la problemática diagnóstica en este colectivo de pacientes es distinta a la observada en los pacientes estériles. No nos vamos a referir a las enfermedades genéticas que alteran en primer término la síntesis hormonal (síndrome de Kallmann); los receptores hormonales o las enzimas necesarias para la acción hormonal. Tampoco vamos a tratar de alteraciones genéticas que afectan a la vía seminal provocando alteraciones del desarrollo de los conductos de Wolff como es el caso de la fibrosis quística pero que no parecen alterar la espermatogénesis. Nos vamos a referir a las alteraciones genéticas limitadas o que afectan de manera clara a la espermatogénesis.

### Deleciones del cromosoma Y

Las microdeleciones del brazo largo del cromosoma Y (Yp) son causa de alteración de la espermatogénesis produciendo desde oligozoospermia severa a azoospermia que requieren como tratamiento aplicar la FIV con ICSI y, en los casos de azoospermia, TESE (Testicular Sperm Extraction). La prevalencia de microdeleciones del Y en pacientes citados es del 10 al 15% (42-44) con tendencia a ser mayor cuanto menor sea el recuento espermático. Las microdeleciones varían unas de otras en extensión y en localización y hay que distinguirlas de alteración génica, deleción o mutación de un gen. La región del Yp más frecuentemente afectada es la AZFc (60%), seguida de la AZFb (16%) y de la AZFa (5%). En el 14% de casos la microdeleción afecta a dos o tres de las regiones citadas; y en el 5% de pacientes la microdeleción afecta a regiones externas a la AZF (45). La microdeleción de las tres regiones AZFa, b, y c se acompaña invariablemente de azoospermia y al hacer TESE no se encuentran espermatozoides (44). En las microdeleciones que no afectan a todas las regiones el pacien-

te puede presentar oligozoospermia o azoospermia y al hacer TESE (en las azoospermias) se puede encontrar o no espermatozoides (46). La detección de la deleción puntual de USP9Y en la región AZFa, parece predecir que se encontrarán espermatozoides en el TESE (47). La mayoría de deleciones de la zona AZFc afecta a todos los genes y suelen ser de novo. La deleción de solo dos genes también afecta a la espermatogénesis (48). Se han descrito microdeleciones de AZFc heredadas (49, 50). La microdeleción de la región AZFd afecta menos al recuento espermático y suele producir teratozoospermia (51). Las microdeleciones del Yp no se relacionan con volumen testicular, datos hormonales, criptorquidia, varicocele o que la esterilidad sea idiopática o no. Se debe investigar las microdeleciones del Y en todo paciente con recuento espermático inferior cinco millones/ml (45). Las microdeleciones del Y se han asociado con la monosomía gonosómica (45, XO) en mosaico (52). Esta asociación señala un nuevo mecanismo de producción del síndrome de Turner, (45, XO); y alerta sobre el potencial riesgo de que la descendencia de hombres con microdeleción del Y presenten las anomalías observadas en pacientes con 45, XO/46,XY, como ambigüedad genital.

### ALTERACIONES GENÉTICAS QUE AFECTAN A LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA

Son pacientes estériles con recuentos espermáticos normales, morfología espermática conservada pero con movilidad espermática nula o casi nula. La inmovilidad espermática es debida a alteración de las estructuras espermáticas de las que depende la movilidad del gameto. Entre estas se han de citar: a) ausencia de mitocondrias. Es debido a patología del citoesqueleto responsable, durante la espermiogénesis, del desplazamiento de dichas organelas hasta formar la vaina mitocondrial espermática. b) alteraciones de la vaina externa de la cola espermática y/o las fibras densas externas. Recientemente se ha descrito el gen *Oppo 1* que se expresa exclusivamente en testículo y espermatozoide. Este gen está localizado en el cromosoma 17. La proteína del gen *Oppo 1* se ha localizado en las fibras densas externas que intervienen en el batido del flagelo (53). c) falta de uno o los dos microtúbulos en el interior del axonema; es decir, ausencia del par central de microtúbulos del axonema. Se conoce como fórmula 9 + 1 o 9 + 0 dado que el axonema normal está formado por 9 pares de microtúbulos (polímeros de la proteína tubulina) periféricos y un par central de microtúbulos (fórmula 9 +

2). d) ausencia de uno o dos de los brazos de dineína de los dobletes periféricos de los microtúbulos axonémicos. Estas alteraciones pueden presentarse también en los cilios bronquiales y de los senos paranasales. Si se acompaña de situs inversus constituye el síndrome de Kartagener.

Estas alteraciones precisan para su diagnóstico correcto de estudio espermático con microscopio electrónico de transmisión (54). La etiología genética se deduce por su incidencia familiar pero no se conoce el gen afectado, ni su localización ni se puede objetivar su ausencia o mutación. Ver revisión de Zamboni, (55).

### **ALTERACIÓN GENÉTICA QUE AFECTA A LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA**

El acrosoma derivado del aparato de Golgi es una organela que cubre a modo de capuchón los 2/3 anteriores del núcleo espermático. Contiene entre otras enzimas la acrosina. Esta enzima es necesaria, junto con el movimiento hiperactivo del flagelo obtenido en el proceso de capacitación, para labrar un túnel en la zona pelúcida del ovocito por el que colarse en el espacio perivitelino. El acrososoma es una estructura espermática imprescindible para, en una fecundación normal, no mediante ICSI, penetrar en el ovocito. La agenesia del acrososoma se presenta afectando a todos los espermatozoides. El número y movilidad espermáticos suelen ser normales. Los espermatozoides al carecer de acrososoma muestran cabezas redondas en vez de elípticas. Se denomina este defecto como espongioloospermia o globozoospermia o espermatozoides con cabeza redonda. Se ha descrito incidencia familiar. Puede presentarse hipoplasia acrosómica. Es una entidad poco frecuente (<1% de pacientes estériles). La tasa de gestación obtenida al hacer ICSI con estos espermatozoides es baja. Se ha atribuido a que estos espermatozoides además de ausencia de acrosoma presentan aneuploidias (56-59). La aneuploidia más frecuente afecta a los gonosomas. También se ha descrito disomía del cromosoma 15 (58). En ratones con globozoospermia se ha observado alteración de un gen (60).

### **COMENTARIOS FINALES**

Los conocimientos de la espermatogénesis y de las etiopatogénias que la alteran es de suma importancia para indicar la pauta terapéutica adecuada a cada paciente. Las cuestiones que se plantean al andrólogo ante un paciente que consulta por esterilidad son en síntesis cuatro.

**1ª) El paciente ¿es fértil?** Un seminograma normal en sus parámetros básicos (volumen, recuento, movilidad y morfología espermáticas) tiene una alta correlación con la fertilidad pero se ha de resaltar que semen “normal” y semen “fértil” no son sinónimos. Un semen “normal” según los parámetros puede presentar alteraciones no detectadas en el seminograma convencional y carecer de capacidad para fecundar a un ovocito y dar lugar al nacimiento de un niño sano. A su vez un semen “anormal” puede producir gestación. Según los datos clínicos recogidos en la anamnesis y exploración física, el seminograma normal será suficiente; o se precisará efectuar estudios cromosómicos en espermatozoides (técnica de FISH) y en biopsia testicular además del cariotipo y estudio hormonal cuando el RET es bajo; doppler de venas espermáticas, etc.. La alteración seminal puede ser debida asimismo a patología de la vía seminal o alteración del proceso eyaculatorio; y no a alteración de la espermatogénesis. En pacientes con oligoastenoospermia severa se ha de investigar la posible presencia de microdeleciones del cromosoma Y.

**2º) Si se concluye que la alteración de la espermatogénesis es la causa de la esterilidad conyugal o contribuye a ella, ¿tiene tratamiento?**

En los pacientes con déficit gonadotrófico está indicado un tratamiento sustitutivo. La eliminación de un factor tóxico para la espermatogénesis es otra medida a considerar. La cirugía del varicocele puede plantearse sobre todo en un hombre joven, con pareja joven, ausencia de otras patologías, testículo izquierdo hipotrófico, varicocele bilateral y alteración seminal, habitualmente con oligoastenoospermia mas o menos severa. En más de un tercio de pacientes se desconoce la causa de la alteración seminal y la mayoría de pacientes con alteración de la espermatogénesis carecen de tratamiento si descartamos la reproducción asistida. Un porcentaje importante de pacientes presentan anomalías cromosómicas somáticas o limitadas a la meiosis, o microdeleciones del Y; anomalías que no se diagnostican si no se practican los estudios citogenéticos y genéticos pertinentes. Se vislumbra que estamos diagnosticando solo un pequeño grupo de las alteraciones espermatogénicas debidas a genopatías.

**3º) Ante un paciente con alteración de la espermatogénesis de causa desconocida o sin tratamiento (criptorquidia, secuelas de infección, alteraciones cromosómicas, etc.) ¿es posible hacer FIV con ICSI?**

Esta cuestión se plantea en pacientes diagnosticados de azoospermia secretora. ¿Encontraremos espermatozoides al hacer TESE? En pacientes con azoos-

permia secretora incluso en pacientes con síndrome de Klinefelter pueden existir focos de túbulos seminíferos con espermatogénesis conservada. Los pocos espermatozoides producidos son fagocitados a nivel epididimario y no llegan a verse en el eyaculado. No hay ningún parámetro clínico ni analítico, en la mayoría de casos, que permita asegurar que al efectuar TESE se van a encontrar espermatozoides. No se ha observado correlación segura con el volumen testicular, cariotipo ni nivel alto de FSH o muy bajo de inhibina B. La ausencia del gen DAZ en sus regiones a, b y c permite predecir que no se encontrarán espermatozoides al hacer TESE. La biopsia testicular previa es, sin ser seguro, el parámetro más fidedigno para predecir el resultado del TESE. La “ disección testicular” abriendo la mitad de la albugínea y observando con microscopio operatorio los túbulos seminíferos está permitiendo identificar los que tienen espermatogénesis activa y su exéresis para poder efectuar ICSI. Con esta técnica invasiva se están obteniendo espermatozoides para ICSI en más del 70% de casos (61).

#### 4º) ¿Está indicado hacer diagnóstico genético preimplantatorio (DGP)?

En alteraciones cromosómicas mitóticas, principalmente translocaciones, el DGP está indicado. En los frecuentes casos de alteraciones cromosómicas limitadas a la meiosis (con cariotipo normal) la indicación de DGP se está abriendo camino para no transferir embriones aneuploides. El sexado embrionario en pacientes afectos microdeleciones del cromosoma Y evitaría la transmisión de la microdelección a los hijos varones. La gran utilidad del seminograma convencional para valorar la fertilidad de un hombre no se cuestionable. Pero se ha de resaltar la limitación de la información obtenida con dicho análisis. Desdeñar la utilísima información obtenida en la anamnesis y exploración física conduce con frecuencia a un mal enfoque terapéutico. La andrología actual exige, cuando está indicado, efectuar cariotipo, FISH en espermatozoides, estudio meiótico en biopsia testicular, estudio de la región AZF del cromosoma Y junto al estudio hormonal pertinente, doppler, etc. Estos análisis permitirán conocer la causa de la alteración de la espermatogénesis y la indicación terapéutica adecuada en cada caso. Considerar que el paciente es el semen y no el hombre es un grave error.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. **Ford B.J.:** The Leeuwenhoek Legacy. Biopress and Farrand Press. Bristol (1991)
2. **Leeuwenhoek A.:** van Opera Omnia. Lugundi Batavorum (Leyden) (1722)
3. **Joel C.A.:** Historical survey of research on spermatozoa from antiquity to the present. In: Fertility Disturbances in Men and Women (Joel, C.A., editor), pp: 3-47. Karger. Basilea (1971)
4. **Leydig F.:** Zur Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane und Anldrüsen der Säugethiere. Z. Wiss. Zool 1850; 2:1-57
5. **Kölliker A.:** Mikroskopische Anatomie oder Gewebelehre des Menschen (vol. 2) Leipzig: Wilhelm Engelmann (1854)
6. **Boui, P., Ancel P.:** Recherches sur les cellules interstitielles du testicule des mammifères. Arch. de Zoöl. Exp. et Gén 1903; 1: 437-523
7. **Wattenberg LW.:** Microscopic histochemical demonstration of steroid-3(-ol) dehydrogenase in tissue sections. J. Histochem. Cytochem 1958; 6:225-232
8. **Christensen A K, Mason N R.:** Comparative ability of seminiferous tubules and interstitial tissue of rat testes to synthesize androgens from progesterone-4-14C in vitro. Endocrinology 1965; 76:646-656
9. **Sertoli E.:** Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano. Morgagni 1865; 7:31-40
10. **Byers S, Pelletier RM, Suarez-Quian C.:** Sertoli cell junctions and the seminiferous epithelium barrier. In: The Sertoli cell. L.D. Russell, M.D. Griswold, (editors) Clearwater, Fla, Cache River Press. (1993)
11. **Jegou B, Sharpe RM.:** Paracrine mechanisms in testicular control. In: The molecular biology of the male reproductive system, (de Kretser DM, editor). Academic Press. New York (1993)
12. **Whaley P.D. et al.:** Role of specific response elements of the c-fos promoter and involvement of intermediate transcription factor (s) in the induction of Sertoli cell differentiation (transferrin promoter activation) by the testicular paracrine factor pmods. Endocrinology 1995;136: 3046
13. **Skinner MK.:** Cell-cell interactions in the testis. Endocr. Rev 1991; 12:45
14. **Russell LD, Griswold MD(editors).:** The Sertoli Cell. Cache River Press, Clearwater, Fla (1993)
15. **Payne AH, Hardy MP, Russell L.D. (editors).:** The Leydig Cell. Cache River Press. Vienna IL. USA (1996)
16. **Morse HC, Horike N, Rowley MJ, Heller C.G.:** Testosterone concentrations in testes of normal men. Effects of testosterone propionate administration. J. Clin. Endocrinol. Metab 1973; 37:882-886
17. **Luo X, Ikeda Y, Parker KL.:** A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and sexual differentiation. Cell 1994; 77: 481-490
18. **Nomura M, Bartsch S, Nawate H, Omura T, Morohashi.:** An E box element is required for the expression of the ad4bp gene, a mammalian homologue of ftz f 1 gene, which is essential for adrenal and gonadal development J. Biol. Chem 1995; 270: 7453-7461

19. **Marx J.:** Snaring the genes that divide the sexes for mammals. *Science* 1195; 269: 1824-1825
20. **Elliott DJ.:** RBMY genes and AZFb deletions. *J. Endocrinol. Invest* 2000; 23: 652-658
21. **Foresta C, Ferlin A, Moro E.:** Deletion and expression analysis of AZFa-genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum. Mol. Genet* 2000;9: 1161-1169
22. **Sun C, Skaletsky H, Birren B et al.:** An azoospermic men with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nature Genet* 1999; 23: 429-432
23. **Saxena R, de Vries J.W, Repping S. et al.:** Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. *Genomics* 2000; 67: 256-267
24. **Fernández S, Huellen K, Goncalves J. et al.:** High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol. Hum. Reprod* 2002; 8:286-298
25. **Reijo RA, Dorfman M, Slee R. et al.:** DAZ family protein exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice. *Biol. Reprod* 2000; 63: 1490-1496
26. **Haberman B, Mi HF, Edelmann A. et al.:** DAZ (Deleted in Azoospermia) genes encode proteins located in human late spermatids and in sperm tails. *Hum. Reprod* 1998; 13: 363-369
27. **Seboun E, Barbaux S, Bourgeron T. et al.:** Gene sequence, localization, and evolutionary conservation of DAZLA, a candidate male sterility gene. *Genomics* 1997; 41: 227-235
28. **Xu EY, Lee DF, Klebes, A. et al.:** Human Boule gene rescues meiotic defects in infertile flies. *Hum. Mol. Genet* 2003; 12: 169-175.
29. **Xu EY, Moore FL, Pera RA. et al.:** A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 2001; 98: 7414-7419
30. **Marina S.:** Endocrinología del Testículo. *ASEBIR* 2003; 8: 38-48
31. **Templado C.:** Estudios meióticos en la infertilidad masculina (Thesis) Fac Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona (1981)
32. **Vidal F, templado C, Navarro J. et al.:** Meiotic and synaptonemal complex studies in 45 subfertile males. *Hum. Genet* 1982; 60: 301-304
33. **Egozgue J, Templado C, Vidal F. et al.:** Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum. Genet* 1983; 65: 185-188
34. **De Braekeleer M, Dao T.:** -N. Cytogenetic studies in male infertility. *Hum. Reprod* 1991; 6: 245-250
35. **Vendrell JM, García F, Veiga A. et al.:** Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Hum. Reprod* 1999; 14: 375-378
36. **Fernández S, Marina F, Alcolea R. et al.:** Estudio cromosómico de espermatozoides mediante FISH. En: XI Congreso Nacional de Andrología 2003; pp 143-144. Málaga
37. **Marina S, Fernández S, Arnedo N. et al.:** Estudio de cromosomas meióticos y FISH en espermatozoides. En: XI Congreso Nacional de Andrología 2003; pp 145-146. Málaga
38. **Shi Q, Martin R.H.:** Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction* 2001; 121: 665 - 666
39. **Calogero AE, De Palma A, Grazioso C. et al.:** Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum. Reprod* 2001; 16: 1172-1179
40. **Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R. et al.:** Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum. Reprod* 2002; 17: 1292 - 1298
41. **Lee MS, Tsao HM, Wu HM. et al.:** Correlations between sperm apoptosis and aneuploidy. *Hum. Reprod* 2002; 17, (Abstract book 1): 112 - 113
42. **Hargreave T.:** Understanding the Y chromosome. *Lancet* 1999; 354: 1746-1747
43. **Foresta C, Ferlin A, Moro E et al.:** Y chromosome. *Lancet* 2000; 355: 234-235
44. **Ma K, Mallidis C, Bhasin S.:** The role of Y chromosome deletions in male infertility. *Eur. J. Endocrinol* 2000; 142: 418-430
45. **Forest C, Moro E, Ferlin A. et al.:** Prognostic value of Y deletion analysis. The role or current methods. *Hum. Reprod* 2001; 16: 1543-1547
46. **Silber SJ, Alagappan R, Brown L G. et al.:** Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. *Hum. Reprod* 1998; 13: 3332-3337
47. **Foresta C, Moro E, Rossi A. et al.:** Role of AZFa candidate genes in male infertility. *J. Endocrinol. Invest* 2000; 23: 646-651
48. **Fernandes S, Huellen K, Goncalves J. et al.:** High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol. Hum. Reprod* 2002; 8: 286-298
49. **Kleiman SE, Yorgev L, Gamzu R. et al.:** Three generation Evaluation of Y chromosome Microdeletion. *J. Androl* 1999; 20: 394-398
50. **Gianotten J, Hoffer MJV, De Vries J.W.A. et al.:** Partial DAZ deletions in a family with five infertile brothers. *Fertil. Steril. Male factor* 2003; 79 (supl. 3): 1652-1655
51. **Kent-First M, Muallem A, Shultz J.:** Defining regions of the Y chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd)

- by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol. Reprod. Dev* 1999; 53: 27-41
52. **Siffroni J.P, Le Bourhis C, Krausz C. et al.:** Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. *Hum. Reprod* 2000; 15: 2559-2562
53. **Kitamura K, Miyagawa Y, Iguchi N. et al.:** Molecular cloning and characterization of the human orthologue of the oppo 1 gene encoding a sperm tail protein. *Hum. Reprod* 2003; 9: 237-243
54. **Marina S, Franco J, Fontarnau R. et al.:** The value of electron microscopy in the study of sperm morphology. In: *Perspectives in andrology*. (Serio, M., editor) 1989; pp. 399-406 Serono Symposia. Vol. 53 Raven. Press. New York
55. **Zamboni L.:** Sperm Ultrastructural Pathology and Infertility. In: *Pathology of Infertility*. pp. 353-379 (Gondos, B. and Riddick, D.H., editors). Thieme Medical Publishers, New York (1987)
56. **Carrell D, Emery B, Liu L. et al.:** Characterization of aneuploidy rates, protamine levels, ultrastructure, and functional ability of round-headed sperm from two siblings and implications for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril* 1999; 71: 511-516
57. **Viville S, Mollard R, Bach M. et al.:** Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies? *Hum. Reprod* 2000; 15: 2563-2566
58. **Carrell D, Wilcox A, Udoff L. et al.:** Chromosome 15 aneuploidy in the sperm and conceptus of a sibling with variable familial expression of round-headed sperm syndrome. *Fertil. Steril* 2001; 76: 1258-1260
59. **Zeyneloglu H, Baltaci V, Duran H. et al.:** Achievement of pregnancy in globozoospermia with Y chromosome microdeletion after ICSI. *Hum. Reprod* 2002; 17: 1833-1836
60. **Kang-Decker N, Mantchev G, Juneja S. et al.:** Lack of acrosome formation in Hrb-deficient mice. *Science* 2001; 294: 1531-1533
61. **Schleges P, Veeck L, Palermo GD. et al.:** Success of sperm retrieval in azoospermic men with cryptorchidism or Klinefelter's syndrome. *Hum. Reprod* 2003; 18 (supl. 1): 211-212.