

Genética

## Porcentajes de espermatozoides X e Y en muestras de semen de varones con cuatro hijos del mismo sexo

### *Proportion of X-bearing and Y-bearing spermatozoa in males with four children of the same sex*

Aran B<sup>1</sup>, Carrera M<sup>2</sup>, de la Iglesia C<sup>2</sup>, Bellés M<sup>2</sup>, Barri PN<sup>1</sup>, Veiga A<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Servei Medicina de la Reproducció. Departament d'Obstetrícia i Ginecologia.

<sup>2</sup> C.P.C. Centro de Patología Celular. Institut Universitari Dexeus. Barcelona. España

#### **Resumen**

*Objetivo: El objetivo de este estudio es valorar si el hecho de que una pareja tenga varios hijos del mismo sexo podría deberse a una desviación en las frecuencias de los espermatozoides con el cromosoma X o Y.*

*Material y métodos: Se analizan mediante FISH, los espermatozoides de 3 varones normozoospermicos. Dos de ellos son padres de 4 niñas y el otro es padre de 4 niños. Resultados: No se encuentran diferencias significativas entre las frecuencias de espermatozoides con cromosoma X o Y, entre cada uno de los pacientes, ni entre los varones padres de niñas frente al padre de niños.*

*Conclusiones: La desviación en la sex ratio en las tres familias estudiadas no se debe a una diferencia en los porcentajes de espermatozoides con cromosoma X o Y. Podría deberse a una selección espermática en el tracto femenino o en el momento de la fecundación o bien una selección a nivel de implantación y desarrollo embrionario.*

**Palabras clave:** cromosomas sexuales. Hibridación in situ de fluorescencia. Sex ratio.

#### **Summary**

*Objectives: The aim of the study is to analyse if the sex ratio variation in some families could be due to differences in the proportions of X-bearing and Y-bearing spermatozoa.*

*Materials and methods: Spermatozoa of 3 normozoospermic males were analyzed using fluorescence in situ hybridization. Two of them were fathers of 4 daughters and the other was father of 4 sons.*

*Results: No statistical differences were found in the frequencies of X-bearing and Y-bearing sperm between the three males, neither between the fathers of daughters and the father of sons.*

*Conclusions: The sex ratio deviation in the three studied families is not due to differences in the pro-*

---

**Correspondencia:** Dra. Begoña Arán.  
Servei Medicina de la Reproducció. Departament d'Obstetrícia i  
Ginecologia. Institut Universitari Dexeus.  
P<sup>o</sup> Bonanova 89-91.  
08017 Barcelona.  
E Mail: begara@iudexeus.uab.es

*portions of X and Y-bearing sperm. Some possible causes could be a sperm selection in the female tract or at fertilization or a differential implantation and survival rates of embryos.*

**Key words:** sexual chromosomes. Fluorescence in situ hybridization. Sex ratio.

## INTRODUCCION

Las variaciones en la sex ratio de los recién nacidos (normalmente expresada como la proporción de varones o el número de varones por 100 hembras), ha sido motivo de estudio durante años (1). Parece ser que la sex ratio depende de múltiples factores, incluso factores psicológicos (2) y ambientales (3).

Existen variaciones en la sex ratio en las distintas etnias, siendo la de las poblaciones asiáticas la más alta (4) y la de la población negra la más baja (5). Las variaciones intrapoblacionales suelen ser menores y están también relacionadas con múltiples factores como la edad materna (6) o paterna (7, 8) aunque con resultados contradictorios según los autores (9, 10). También se han relacionado las variaciones de la sex ratio con la multiparidad o el orden de nacimiento, con resultados también distintos según los autores (6, 9, 10), e incluso con la estacionalidad (11).

Los mecanismos de estas variaciones no están claros y podrían venir determinados por una alteración de la frecuencia de espermatozoides portadores del cromosoma X o Y, una selección del espermatozoide en el tracto genital femenino, o una implantación diferencial y mayor supervivencia de los embriones de un sexo u otro.

Estudios previos han analizado la proporción de espermatozoides X e Y, en muestras de semen de donantes. Algunos autores muestran un mayor número de espermatozoides X (12, 13) y otros un porcentaje mayor de espermatozoides Y (14). Estudios más recientes no encuentran diferencias en la ratio de los espermatozoides (15, 16). Bibbins y cols. (17) presentan un mayor porcentaje de espermatozoides X en un varón padre de sólo niñas, mientras que Irving y cols. (18) no encuentran diferencias en la sex ratio de los espermatozoides de varones con hijos del mismo sexo. Bowman y cols. (19) no encuentran una variación de la relación X:Y esperada (11), en los espermatozoides analizados mediante hibridación "in situ" de fluorescencia (FISH), de un paciente tras realizar 4 ciclos de FIV con diagnóstico preimplantacional con un número de embriones de sexo masculino significativamente mayor al número de embriones de sexo femenino.

En este estudio se analiza, mediante FISH, la fre-

cuencia de espermatozoides portadores del cromosoma X o Y en tres varones con cuatro hijos del mismo sexo, con el fin de valorar si la causa de la desviación de la sex ratio en estas familias es una mayor frecuencia de espermatozoides portadores del cromosoma X o Y en cada caso.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de semen de tres voluntarios normozoospermicos, con cuatro descendientes del mismo sexo cada uno. Las muestras fueron procesadas y evaluadas mediante hibridación "in situ" de fluorescencia (FISH) sin disponerse de información sobre las mismas.

Se procedió a la centrifugación de las muestras de semen con medio de cultivo (Gamete-100, Scandinavian IVF Science, AB Goteborg), durante 10 min. a 1500 r.p.m. Tras la extracción del sobrenadante, se efectuó la fijación de las muestras en solución fijadora de Carnoy fría (metanol: ácido acético, 3:1) y nueva centrifugación (10 min. a 1500 r.p.m.), tras la cual se repitió el proceso de fijación. Finalmente, el botón celular se resuspendió aproximadamente en 0,5 ml. de solución fijadora. En este punto la suspensión celular en fijador se guardó a -20°C o bien se procedió a la extensión de preparaciones celulares en portaobjetos, las cuales fueron a su vez guardadas a -20°C o se procedió inmediatamente al tratamiento de las mismas para FISH.

Los portaobjetos fueron lavados durante 5 min. en 2x SSC y a continuación se deshidrataron en una batería de alcoholes, procediéndose posteriormente a la descondensación de los núcleos de los espermatozoides. Dicha descondensación se realizó incubando los portaobjetos en una solución de DDT 5mM/ Triton X-100 al 1% a 37°C en baño María durante 15-30 min. Tras dicha incubación, los portaobjetos fueron examinados en un microscopio de contraste de fases, para evidenciar que efectivamente había tenido lugar la descondensación nuclear. A continuación, los portaobjetos fueron lavados de nuevo en 2x SSC durante 5 min. y deshidratados otra vez en una batería de alcoholes. Tras secado a Tª ambiente de los mismos, se procedió inmediatamente a realizar la hibridación (FISH).

Para la FISH se utilizó una sonda centromérica

del cromosoma X, la cual reconoce la banda cromosómica Xp11.1-q11.1 (locus DXZ1), marcada directamente con SpectrumGreen (CEP X, SpectrumGreen, Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) y una sonda que reconoce la secuencia de ADN satélite III de la región cromosómica Yq12 (locus DYZ1) del cromosoma Y, marcada directamente con SpectrumOrange (CEP Y, SpectrumOrange, Vysis Inc.). El protocolo de incubación y detección de la FISH se realizó según las recomendaciones de la casa comercial.

Los portaobjetos fueron analizados en un microscopio de fluorescencia Olympus BX50, equipado con un filtro individual para FITC, un filtro doble para FITC/Texas Red, y un filtro triple para DAPI / FITC/Texas Red. Únicamente aquellos núcleos con evidencias inequívocas (morfología oval y/o presencia de cola) de tratarse de núcleos descondensados de espermatozoides fueron evaluados. Los núcleos fueron analizados para la presencia de dos señales verdes (XX) o de una señal verde y una señal roja (XY), evaluándose 10000 espermatozoides por muestra por tres observadores diferentes.

## RESULTADOS

Los tres varones estudiados presentaban normozoospermia con una concentración espermática media de 94,3 M/ml. La concentración media de espermatozoides móviles fue de 43,8M/ml (46,1 %). Los parámetros espermáticos se muestran en la Tabla 1.

Los donantes A y B son padres de 4 niñas y el donante C es padre de 4 niños.

Los resultados obtenidos al realizar FISH en espermatozoides se presentan en la Tabla 2. En ninguno de los tres casos se ha observado la sex ratio desviada del valor esperado 1:1. No hay diferencias entre la sex ratio de los espermatozoides de los padres de ni-

ñas y la del padre de niños. El porcentaje de espermatozoides portadores del cromosoma X y del cromosoma Y, en el donante A, fue 50,94% y 49,03% respectivamente. En el donante B, la frecuencia de espermatozoides X fue de 48,83% y la de espermatozoides Y de 49,66%, mientras que en el donante C fueron de 49,96% y 49,81% para los cromosomas X e Y respectivamente. No se encuentran diferencias significativas en los porcentajes de espermatozoides portadores del cromosoma X frente al porcentaje de espermatozoides portadores del cromosoma Y en cada uno de los donantes, ni en los padres de niñas frente al varón padre de niños.

## CONCLUSIONES

La identificación y el conteo de los cromosomas sexuales de espermatozoides presenta determinados problemas. La tinción de espermatozoides con quinacrina da lugar a una fluorescencia brillante en la región heterocromática del cromosoma Y, pero esta región puede ser confundida con otras regiones heterocromáticas como la región heterocromática del cromosoma 9.

El uso de ovocitos de hámster desprovistos de zona pelúcida ha sido una técnica muy utilizada para el análisis de cromosomas de espermatozoides humanos (20). Aún así, es una técnica compleja y de difícil valoración cuando más de un espermatozoide penetra en el ovocito. Además, hay que tener en cuenta que puede haber una selección de los espermatozoides basada en su capacidad fecundante.

La hibridación "in situ" de fluorescencia en núcleos de espermatozoides descondensados ha simplificado el análisis de la constitución cromosómica de los mismos (21).

Se han realizado pocos estudios en espermatozoi-

**Tabla 1**  
*Parámetros espermáticos de tres varones normozoospermicos.*

Donante	Vol.	N°sptz/ml	N°sptz mov/ ml.	% sptz.mov	N°sptz +++/ ml.
A	2,8 ml	86,0 M/ml	29,3 M/ml	34,1%	15,1 M/ml
B	3,5 ml	43,5 M/ml	10,5 M/ml	24,1%	14,5 M/ml
C	2,7 ml	153,3 M/ml	91,7 M/ml	59,8 %	51,9 M/ml
X	3 ml	94,3 M/ml	43,8 M/ml	46,4 %	27,1 M/ml

**Tabla 2**

*Frecuencia de espermatozoides portadores del cromosoma X y del cromosoma Y analizados mediante hibridación in-situ de fluorescencia (FISH) en tres varones normozoospermicos.*

Donante	A	B	A+B	C
Descendencia	4H	4H	8H	4V
N° total sptz.	10260	10000	20260	10000
N° sptz. X	5227	4883	10110	4996
% sptz.X	50,94%	48,83%	49,90%	49,96%
N° sptz.Y	5031	4966	9997	4981
% sptz.Y	49,03%	49,66%	49,34%	49,81%
Sex ratio	0,96	1,01	0,99	1,00

n.s.: no significativo

Se han excluido las células que no presentaban una única señal clara.

des de padres de varios hijos del mismo sexo. Dmowski y cols. en 1979 (22) y Bibbins y cols. en 1988 (17), utilizando la tinción de quinacrina, presentan una menor proporción de espermatozoides con cromosoma Y en varones padres de solamente hijas. Irving y cols. (18) analizan los espermatozoides de 19 varones con tres o más hijos todos del mismo sexo mediante FISH. No encuentran diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides con cromosoma X y con cromosoma Y entre el grupo de padres de niños y el de padres de niñas. Nuestros resultados coinciden con los de estos autores ya que tampoco encontramos diferencias entre dichas frecuencias.

La alteración en la sex ratio, al menos en las familias presentadas, no fue debida a una alteración en el porcentaje de espermatozoides X o Y. Si no fue debida únicamente a la casualidad, podría deberse a otros factores como una selección del espermatozoide en el tracto genital femenino o en el momento de la fecundación (19). Shettles (23) propuso que el espermatozoide X tendría un núcleo mayor que el del espermatozoide Y y, por lo tanto, se mueve más lento aunque tiene una vida más larga. También podría existir una selección en la implantación y desarrollo embrionario.

## BIBLIOGRAFIA

1. **James W.H.:** The human sex ratio. Part 1: a review of the literature. Hum.Biol, 1987 59, 721-752.
2. **James W.H.:** What stabilizes the sex ratio? Ann Hum Genet, 1995, 59:243-249.
3. **Parazzini F, La Vecchia C, Levi F, Franceschi S.:**

Trends in male:female ratio among newborn infants in 29 countries from five continents. Hum Reprod, 1998, 13, 1394-1396.

4. **James WH.:**The sex ratio of Oriental births. Ann Hum Biol, 1985, 12, 485-487.
5. **James WH.:**The sex ratio of Black births. Ann Hum Biol, 1984, 11, 3940.
6. **Juntunen K S T, Kvist A P, and Kaupila A J I.:** A shift from a male to a female majority in newborns with the increasing age of grand grand multiparous women. Hum Reprod, 1997, 12, 2321 -2323.
7. **Ruder A.:** Paternal-age and birth-order effect on the human secondary sex ratio. Am J Hum Genet, 1985, 37, 362-372.
8. **Jacobsen R, Moller H and Engholm G.:** Fertility rates in Denmark in relation to sexes of preceding children in the family Hum Reprod, 1999, 14, 1127-1130.
9. **Almagor M, Schwed P and Yaffe H.:** Male to female ratio in newborns of gran grand multiparous women. Hum Reprod, 1998, 13, 2323-2324.
10. **Jacobsen R, Moller H and Mouritsen A.:** Natural variation in the human sex ratio. Hum Reprod, 1999, 14, 3120-3125.
11. **James WH.:** Genetic and non-genetics determinants of the human sex ratio at birth. Hum Reprod, 1996, 11, 939-940.
12. **Martin RH, Balkan W, Burns K, Rademaker AW, Lin CC, Rudd NL.:** The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa. Hum Genet, 1983, 63, 305-309.
13. **Bean B.:** Progenitive sex ratio among functioning sperm cells (letter). Am J Hum Genet, 1990, 47, 351-353.
14. **Quinlivan WLG, Sullivan H.:** The ratios and separation of X and Y spermatozoa in human semen. Fertil Steril, 1974, 25: 315-318.

15. **Van Kooij RJ, von Ost BA.:** Determination of sex ratio of spermatozoa with a deoxyribonucleic acid-probe and quinacrine staining: A comparison. *Fertil Steril*, 1992, 58: 384-386.
16. **Han TL, Ford JH, Webb GC, Flaherty SP, Correll C, Matthews CD.:** Simultaneous detection of X- and Y-bearing human sperm by double fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev*, 1993, 34: 308-313.
17. **Bibbins PE, Lipshulk LI, Ward JB, Legator MS.:** Fluorescent body distribution in spermatozoa in the male with exclusively female offspring. *Fertil Steril*, 1988, 49: 670-675.
18. **Irving J, Bittles A, Peverall J, Murch A, Matson P.:** The ratio of X- and Y-bearing sperm in ejaculates of men with three or more children of the same sex. *J Assist Reprod Genet*, 1999, 16: 492-494.
19. **Bowman M, De Boer K, Cullinan R, Catt J and Jansen R.:** Do alterations in the sex ratio occur at fertilization?. A case report using fluorescent in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet*, 1998, 15, 320-322.
20. **Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi R.:** Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature*, 1978, 274, 911-913.
21. **Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD.:** Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridisation. *Mol Hum Reprod*, 1997, 585-598.
22. **Dmowski WP, Gaynor L, Rao R, Lawrence M, Scommegna A.:** Use of albumin gradients for X and Y sperm separation and clinical experience with male sex preselection. *Fertil Steril*, 1979, 31: 52-57.
23. **Shettles LB.:** Human spermatozoan shapes in relation to sex ratios. *Fertil Steril*, 1961, 12:502-508.