

MICRODELECCIONES DE REGIONES AZF DEL CROMOSOMA Y E INFERTILIDAD

Gisela Gonzalez Ruiz¹
Carlos Silvera Arredondo²
Jesús Fernando Vasquez Rengifo³

RESUMEN

Objetivo: estudio realizado durante los años 2009 y 2010 en las ciudades de Barranquilla y Sincelejo, tuvo como fin determinar las microdeleciones de regiones AZF, del cromosoma Y, en hombres infértiles, **Materiales y Métodos:** estudio realizado con una muestra de 33 hombres, seleccionados de las consultas especializadas; previa confirmación de infertilidad mediante estudios de espermogramas. Se analizaron 17 STSs, de las diferentes regiones de azoospermia, además del gen SRY el DS271 y Kaly. Para el análisis se efectuó extracción de ADN de sangre periférica, mediante el protocolo de Bio-mol, PCR multiplex máster mix de promega y corrido electroforético en gel de agarosa al 4%, se visualizaron las imágenes a través de foto documentador. **Resultados:** los hallazgos arrojaron un 3,03% de microdeleciones del cromosoma Y en los STSs: SY242, (DAZ) SY208 (DAZ), SY254 (DAZ), SY255 (DAZ) y SY157 (DYS240), comprometiendo toda la región AZFc para los STSs estudiados. **Conclusiones:** Se determinó microdelección de la región AZFc, del cromosoma Y en una proporción de 3.03%, con evidente ausencia de los genes de controles internos, se presentan las bandas estudiadas para los juegos de iniciadores máster D y E confirmando la reproducibilidad del producto obtenido por PCR. Paciente con presencia

de locus SRY, antecedentes de azoospermia secretora, varicocele izquierdo, órganos sexuales normales, biopsia testicular con 80% de ausencia de células germinales y 20% sin maduración. La proporción de casos se ubica en el intervalo encontrada en diversos estudios a nivel mundial.

Palabras clave: Microdelección, cromosoma Y, Azoospermia, oligozoospermia, gen DAZ (Fuente: DeCS, BIREME).

AZF REGION MICRODELETION OF CHROMOSOME Y AND INFERTILITY

ABSTRACT

Objective: Study carried out between the years 2009 and 2010 in the cities of Barranquilla and Sincelejo that has as main objective to determine the microdeletions in the DAZ region of the Y chromosome in infertile men. **Materials and Methods:** study was developed with a sample of 33 men, selected in specialized consultation, previous confirmation of infertility through spermograms studies. Seventeen STSs were analyzed from different azoospermia regions in addition to the SRY, the DS271 and the Kaly gene. DNA extraction from peripheral blood through Bio-mol protocol, PCR multiplex master

¹ Enfermera, Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas, Coordinadora investigaciones del programa de Enfermería, Universidad Cooperativa de Colombia, sede Santa Marta, Colombia, troncal de occidente, sector mamatoco. Correo electrónico: Gisela.gonzalezr@campusucc.edu.co, Gisela.1060@gmail.com. Teléfono: 3003221132.

² Médico MsC en genética, coordinador del grupo de investigación en genética. Universidad del norte de Barranquilla: correo electrónico: csilvera@uninorte.edu.co.

³ Médico, MsC, PhD en genética, coordinador grupo investigación en salud sexual y reproductiva, División salud, Universidad del Norte, Barranquilla. Correo electrónico: fvasquez@uninorte.edu.co. Teléfono 3509285

mix of Promega and electrophoresis in agarose gel 4% was performed for data analysis and the images were visualized through photo-documenter. **Results:** Findings showed 3.03% microdeletions in Y chromosome in STSs: SY242 (DAZ) SY208 (DAZ), SY254 (DAZ), SY255 (DAZ) and SY157 (DYS240), compromising the whole AZFc region in the STSs studied. **Conclusions:** was determined microdeletion of AZFc region of Y chromosome in a proportion of 3.03%, with evident absence in the genes of the internal control, the bands studied for the set

of the master indicators D and E are presented, confirming reproducibility of the product obtained through PCR. Patients with presence of locus SRY, secretory azoospermia, left varicocele, normal sexual organs, testicular biopsy with absence 80% of germ cells and 20% without maturation. The proportion of cases located in the range found in various studies globally.

Key words: Microdeletion, Y chromosome, azoospermia, oligozoospermia and DAZ gene (Fuente: DeCS, BIREME).

INTRODUCCIÓN

La infertilidad, definida por la organización mundial de la salud como: "La incapacidad de completar un embarazo después de un tiempo razonable de relaciones sexuales, sin medidas anticonceptivas"¹, se presenta en 60 a 80 millones de parejas² y el 50% de los casos aproximadamente está asociada a factores masculinos³. Esta investigación amplia nuevos horizontes en el conocimiento de la infertilidad originada por microdeleciones del cromosoma Y; teniendo en cuenta que la afección se presenta en el 10% - 15% de las parejas⁴. Actualmente múltiples estudios han avanzado en análisis de las causas de infertilidad masculina^{4,5}. Los factores genéticos aportan el 5% (Teppa, 2004), se manifiestan fenotípicamente con mala calidad seminal⁶ y en algunos casos por azoospermia no obstructiva y oligozoospermia severa, comprobadas a través de pruebas de semen y biopsias testiculares. Las piedras angulares de la investigación andrológica continúa siendo la historia clínica, el examen físico y el espermograma, la evaluación endocrina se realiza en todos los hombres con parámetros seminales anormales o con alteraciones clínicas de baja androgenización, si se presenta un hipogonadismo hipergonadotrópico es conveniente realizar un cariotipo.⁷ Específicamente el Cromosoma Y sufrió degradación de su contenido génico, quizá como consecuencia de mantener los genes

específicos de diferenciación masculina RBM, contiene unos 60 millones de pares de bases y sus genes determinan la espermatogénesis⁸; se estructura por las zona eucromatínica (Yp) y la zona heterocromatínica (Yq) que no recombina durante la meiosis y donde se ubican las regiones de azoospermia AZF: Está dividida en cuatro subregiones AZFa, AZFb, Proximal AZFc/AZFd y AZFc⁹ la delección de una subregión puede originar alteraciones como azoospermia no obstructiva u oligozoosperma severa⁹

La primera evidencia de un gen presente en el cromosoma Y con significado clínico, se originó en la observación hecha en individuos con variantes en el cariotipo que incluyen al cromosoma Y (46,XY, 47,XXY, 47,XYY), que expresan fenotipo de varón, mientras que los individuos con variantes del cariotipo sin cromosoma Y (46,XX; 45,X; 47,XXX) poseen fenotipo femenino. La delección de las *región de azoospermia* (AZF a, b, c y d o proximal AZFb/AZFc)¹⁰ origina las alteraciones² y su origen es actualmente un tema de discusión, puede surgir en etapas meióticas, en fases posteriores a la formación espermática o después de la fertilización. La delección del AZFb fue confirmada usando PCR y pruebas de southern blotting¹¹, confirmando la su presencia en tres generaciones. Estudio de Kats M.G et, al. 2002, Kamischke A, 1999, mostraron la transmisión de la alteración de padres a hijos después de

efectuar ICSI¹². La frecuencia de delección del cromosoma Y, reportadas a nivel mundial es la siguiente: Alemania 3,2% (12/370), 1,3% (19/1470), Suecia 2% (4/192), Países bajos y Bélgica 2,3% (37/1627), Irlanda 3,6% (2/56) y Eslovenia 4,4% (9/226) entre otros (31).¹³

Los primeros en identificar la relación existente entre la alteración y la infertilidad masculina, fueron Tiepolo y Zuffardy en 1976, quienes investigaron a 1160 hombres infértiles detectando delección en el 0.5% de ellos. La delección de genes en cualquiera de las regiones AZF puede conducir a anomalías en la espermatogénesis¹⁴, con subsecuente alteración en la calidad y/o cantidad de espermatozoides, provocando azoospermia u oligozoospermia.¹⁶ Sin embargo; se identificó una zona que al parecer se encuentra en límites de AZFb - AZFc, denominada AZFd o proximal AZFb/AZFc.

Actualmente se ha avanzado en el mapeo del cromosoma Y lo que ha permitido identificar el tamaño y localización de las regiones AZF¹⁷, identificando los genes que conforman las regiones de azoospermia¹⁸. Otro avance logró el mapeo completo del 99% del cromosoma y la secuencia de la región específica masculina del cromosoma (MSY) describiendo tres regiones: Región *X-Tranposed*, Región *X-Degenerate* y región *ampliconic* ¹⁹; todos los genes de esta región se expresan en tejido testicular y solo el VCY y el RBMX poseen homólogos en el cromosoma X. El gen HSFY ubicado en AZFb genera tres tipos de transcripciones diferentes, la primera parece transcribirse en varios tejidos, sin embargo la segunda y la tercera son testículo específicos ²⁰.

Las delecciones de AZFa se asocian al síndrome de Solo Células de Sertoli (SCO)²¹ los genes DBY y USP9Y al parecer regulan la actividad de las espermatogonias²², las delecciones completas del AZFa se presentan en el 9% de los casos, aproximadamente²³. Mientras que en el bloqueo de la maduración detenida en fase de paquiteno está implicada la región AZFb y

la región AZFd, que al parecer se asocian con oligozoospermia o esperma normal en número pero con anomalías morfológicas¹³, se han identificado tres familias de genes en AZFb (RBM, PRY y TTY)²⁴. La mayoría de microdeleciones presentes en el AZFc afectan al gen DAZ, convirtiéndose en el principal candidato causante de azoospermia en pacientes infértiles; un estudio del gen DAZ copia específico se relaciona con oligozoospermia severa y azoospermia no obstructiva, en pacientes con patologías testiculares, demostrando que DAZ/1 y DAZ/2, se asocian con la alteración; de igual forma el fenotipo de testiculopatías severas idiopáticas se da por la falta de expresión del gen DAZ a nivel de estos órganos²⁵. El número de genes DAZ ha sido difícil de determinar pues sus secuencias de nucleótidos son idénticas, cada uno contiene por lo menos siete copias en tandem²⁶. Los diferentes grados de hipoespermatogénesis observados en hombres con delecciones AZF d y c (DAZ), puede ser atribuible al grado de compensación parcial de la delección por la presencia de un gen funcional homólogo autosómico presente en el cromosoma 3²⁷.

El modelo más aproximado para la identificación de las delecciones en diversas regiones (AZF a, b y c), fue publicado en un estudio que encuentra 3 de 11 hombres con STSs, sY105, sY149, pero con ausencia de los STS sY117, sY127 y sY143²⁸. La delección de la región AZFa se asocia con Síndrome de solo células de Sertoli, azoospermia no obstructiva e hipoespermatogénesis severa; las delecciones de la región AZFb con azoospermia no obstructiva, bloqueo espermatogénico meiótico e hipoespermatogénesis; de la región AZFc con azoospermia no obstructiva, oligospermia severa, hipoespermatogénesis, síndrome de solo células de Sertoli y en menor proporción, bloqueo espermatogénico meiótico; las delecciones de AZF a+b, AZF b+c, AZF a+b+c se asocian con azoospermia no obstructiva y síndrome de solo células de Sertoli (SCO)²⁹.

Los genes de AZFb están implicados en la regulación meiótica, los de AZFa en el proceso de

diferenciación celular premeiótica y fase mitótica de la espermatogénesis; mientras que hombres con microdeleciones AZFb-c ó AZFa+b+c, presentan daño espermatogónico severo, yendo desde SCO hasta bloqueo espermatogónico completo³⁰. En las deleciones AZFc B2/B4 existe la posibilidad de contener espermatozoides en el líquido seminal, lo que mejora el pronóstico reproductivo de estos pacientes³¹. La azoospermia ha sido comprobada en estudios en hombres previamente diagnosticados con microdeleción AZF, a, b y b-c, sin embargo las deleciones AZFc, que pueden mostrar presencia de espermatozoides³².

Un estudio efectuado en 46 pacientes con infertilidad masculina idiopática, 30 azoospermicos y 16 oligozoospermicos analizan 18 STSs, localizados en Yq (AZFa, b, c y d), cariotipo analizado con la técnica de bandeó G, comprobando microdeleciones en 3 casos en las regiones AZF a, b y c respectivamente³³. Uno de los investigadores que más ha profundizado en estudios de microdeleciones es Carlo Foresta de la Universidad de Padova Italia, quien caracterizó clínica y molecular las deleciones del cromosoma Y en 3.073 hombres infértiles durante (1996 - 2005), identificando 99 casos con microdeleciones, contribuyeron al resultado 3,2% hombres no seleccionados, 8,3% con azoospermia no obstructiva y 5,5% con oligozoospermia severa (menos de 5 millones de espermatozoides por ml),³¹

Otras patologías testiculares se han estudiado, sin que se hayan identificado asociación con microdeleción del cromosoma Y. Sin embargo, la criptorquidia parece estar relacionadas con deleciones AZF³⁴. Los ensayos de PCR han sido utilizados para descartar microdeleciones, se estandarizó la prueba para la amplificación de 16 marcadores en hombres fértiles; se han propuestos nuevos métodos para la identificación molecular de deleciones del cromosoma Y con técnicas de bajo costo y adecuada efectividad³⁵. Las técnicas de hibridación de PCR, para analizar los AZF a y b fueron utilizadas en

76 pacientes que presentaron deleción del Yq usando 18 STS y dos pruebas de DNA³⁶.

Los pacientes con azoospermia pueden recurrir a técnicas de reproducción asistida a través de donantes, mientras, que en casos con oligozoospermia severa pueden recuperarse espermatozoides para técnicas de reproducción asistida, inseminación artificial e ICSI.³⁷ ofreciendo una nueva oportunidad de reproducción a través del uso de la crío conservación de espermia³⁸

MATERIALES Y MÉTODOS

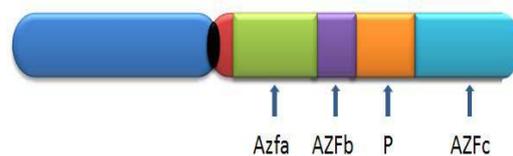
Estudio descriptivo de corte transversal que buscó determinar la prevalencia y tipos de microdeleciones del cromosoma Y en hombres infértiles en una muestra de 33 hombres con diagnóstico previo de infertilidad, muestra seleccionada no probabilísticamente y atendidos en los Centros de atención de fertilidad y consultorios urológicos de las ciudades de Barranquilla y Sincelejo, previo consentimiento informado respetando los criterios éticos establecidos en la resolución 008430 de 1993 y que cumplieran con criterios de selección como: Azoospermia no obstructiva y oligozoospermia (menos de 12 mill/ml), que no presentaran patologías comprobadas como causa primaria de infertilidad. Los métodos utilizados fueron realizados en dos oportunidades buscando con ello corroborar fidelidad en los hallazgos: *Extracción de muestra de sangre periférica:* 5 ml colectados en tubo con EDTA *Extracción de DNA,* mediante protocolo de aislamiento de ADN en sangre del laboratorio Mo-Bio, realizado en cabina de flujo laminar para preservar la integridad y limpieza del producto. A 330 µl de sangre, se le agregó 900 µl de solución de cloruro de amonio, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó por 15 segundos a 13.000 revoluciones por minuto, luego de descartar el sobrenadante, se resuspendió en vórtex durante 5 segundos, al pellet obtenido se le agregaron 300 µl de

detergente, para luego adicionar 1.5 µl de RNase, se agregó 100 µl de acetato de amonio, una vez precipitadas las proteínas, se mezcló durante 15 seg, se centrifugó durante 3 minutos a 13000 rpm, luego de transferir el sobrenadante a otro tubo (conteniendo el ADN), se agregó 300 µl de isopropanol, homogenizada la solución, se centrifugó para luego descartar el sobrenadante y obtener las moléculas de ADN, las que se sometieron a lavado con 300 µl de etanol, se centrifugó durante 30 segundos a 13.000 rpm, se descartó el sobrenadante, por último se adicionó la solución tris para separar las moléculas de ADN, producto final que fue incubado a 65°C, durante 40 minutos. **Cuantificación de ADN:** se utilizó espectrofotómetro modelo Biomate 3, marca thermoelectrón como cuantificador de ADN, se procedió a obtener la cantidad necesaria para llevar a cabo los procedimientos de PCR, cuantificación realizada en dos oportunidades respondiendo al procedimiento de nueva extracción de ADN. **PCR MULTIPLEX:** partiendo del protocolo Promega (casa comercial Promega Corporation), que recomienda una cantidad de 10ng/µl de ADN diluido en agua, hasta lograr una dilución de 5 µl por reacción, o sea, un total de 25 µl, de tal forma que pueda luego, dividirse para las cinco reacciones, la cantidad de dilución de ADN, se pasó a la preparación de las diluciones de reactivos o juegos de iniciadores para las PCR múltiplex (A, B, C, D, y E, con 20 µl de máster y 0,2 µl de Taq polimerasa por muestra) o sea, siete tubos en total incluyendo control positivo y control negativo; se agregó la cantidad resultante a cada tubo que contenía la dilución de ADN, luego se procedió a procesar en el termociclador, Icyler, marca Bio-Rad, previa configuración del programa para microdeleciones del cromosoma Y; por último, se procedió a procesar las muestras en el equipo, para obtener los STS (*sequence target sites*) determinadas por el kit así: **AZFa:** SY8 = DYS273, SY85= DYS148, SY18= KALY; **AZFb:** SY121= DYS212, SYPR3= SMCY, SY124= DY215, SY127= DYS218, SY128= DYS219, SY130= DYS221, SY133 = DYS223, SY134= DYS224; **PROXIMAL AZFc/AZFd:**

SY14= DYF51s1, SY152=DYS236; **AZFc:** SY242= DAZ, SY208 = DAZ, SY254 (DAZ), SY255= DAZ, SY157= DYS240. El protocolo del termociclador, fue el siguiente: 94°C por 2 minutos, 94°C por un minuto, 57°C por 30 segundos; 72°C por 5 minutos a 35 ciclos, luego 72°C por 5 minutos y 4°C finales, para un total de tiempo de 2,6 horas de amplificación de productos de ADN, que incluye proceso de desnaturalización y extensión final. **Corrido electroforético en gel de agarosa:** para el corrido electroforético en gel de agarosa se usó gel al 4%, probados los resultados iniciales, se procedió a reducir la concentración al 3,5%; se le adicionó bromuro de etidio, sustancia que debido a sus propiedades fluorescentes, cuando se expone a la luz ultravioleta permite la visualización de los productos de PCR al intercalarse con las cadenas de ADN; luego se polimerizó en soporte sellado durante 30 minutos, se trasladó a la cámara de corrido electroforético, donde se hizo la siembra de 10ml de muestra de ADN, adicionando a cada una 5 l de tampón de carga como colorante, que hace que la muestra sea fácil de visualizar, se conectaron los electrodos a la fuente de poder y se efectuó el corrido a 80 voltios durante 1, 5 horas. **Visualización de bandas génicas:** mediante bio documentador, modelo Biodoc-it, marca Bio Rad, se consideró la muestra positiva cuando el producto amplificado, de acuerdo al peso molecular, estuvo presente y negativa cuando el producto esperado estuvo ausente.

RESULTADOS

REGIONES CROMOSOMA Y

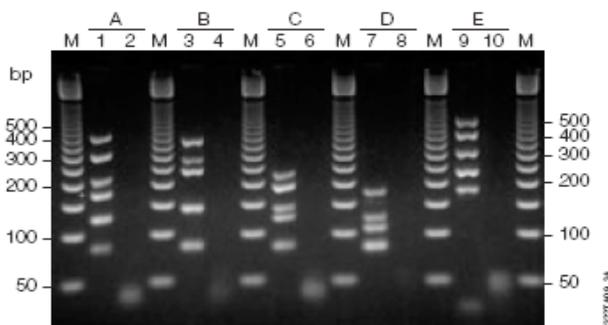


Fuente: Diseñadas para el estudio, 2010

Figura 1: Ubicación de las Regiones Azf del Cromosoma Y

Haciendo uso de los métodos descritos, se llegó a los resultados de los diferentes STSs estudiados para microdeleciones del cromosoma Y, para mayor claridad presentamos la estructura del cromosoma en estudio. Los genes analizados, mediante PCR multiplex, contenidos en cada STSs, por cada Multiplex máster mix A (DAZ, DYS240, DYS271, DYS221, KAL-Y, y control interno SMCX); Multiplex máster mix B (SMCY, DYS218, DAZ2 Y DAZ3, y control interno

SMCX); Multiplex máster mix C (DYS219, DYS212, DYF51S1, DAZ4 Y control interno SMCX); Multiplex máster mix D (DYS223, DYS236, DYS215, y control interno SMCX) y Multiplex máster mix E (SRY, DYS224, DYS148, DYS273 y control interno ZFX/ZFY) . De acuerdo a conteo espermático, el 54,54% de los casos estudiados presentaron azoospermia y el 45,45% oligozoospermia (menos de 12 millones de espermatozoides por ml).

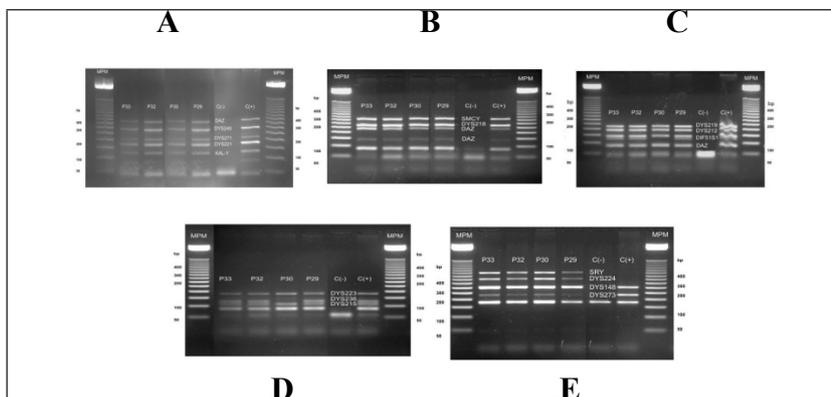


Fuente: Protocolo Promega, sistema de detección deleciones cromosoma Y, versión 2, 2008

Figura N° 2: Productos de Amplificación PCR Multiplex A, B, C, D, Y E Microdelección Del Cromosoma Y

El producto de PCR Multiplex de los diferentes juegos de iniciadores, A, B, C, D y E, del kit, utilizados para el procesamiento de las muestras de ADN muestran (M) marcador de peso molecular desde 500 a 50 pares de bases; (1) control positivo y (2) control negativo. Los hallazgos del presente estudio revelaron que

el 94,97% de los casos analizados fue normal para estudio de microdeleciones del cromosoma Y, en las diferentes regiones AZF a, b, c y proximal AZFc/AZFd, solo el 3,03% resultó con microdelección de los genes de la familia DAZ y DYS240, significando una deleción para todos los genes estudiados en la región AZFc.

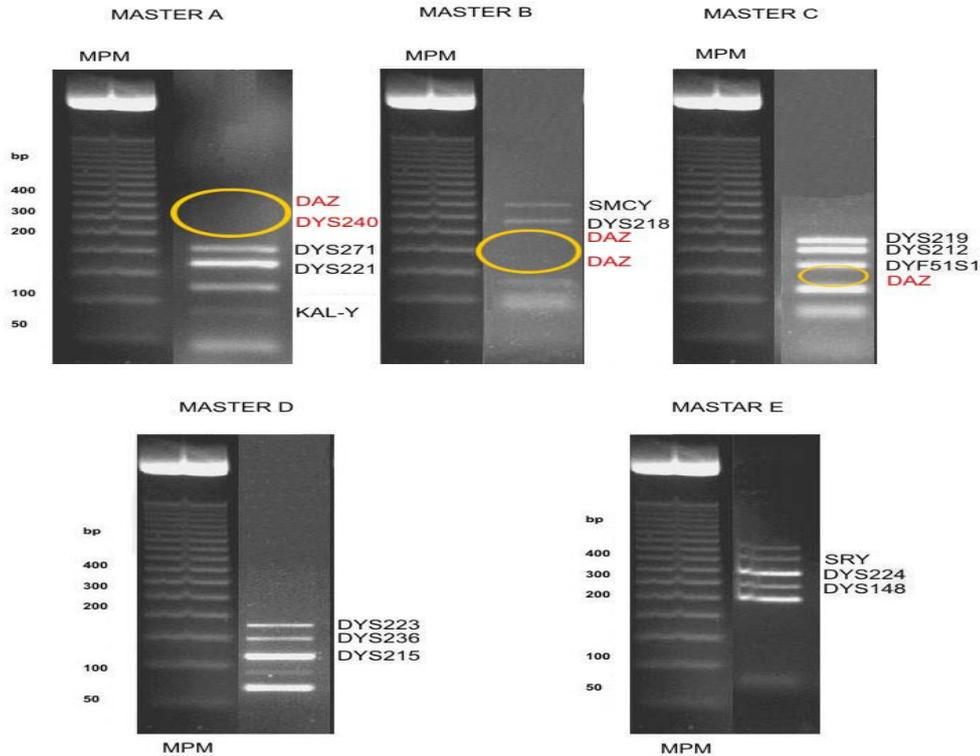


Fuente: Fotografías productos del estudio

Figura N° 3: Producto Amplificación PCR Multiplex de los Casos de Infertilidad 29 -30-32 Y 33

En los casos 1 al 30, 32 y 33, se observó presencia de todas las bandas génicas de acuerdo a los STSs estudiados, tanto para máster A, B, C, D y

E, ubicándose en la categoría de negativo para microdelección del cromosoma Y.



Fuente: Fotografías productos del estudio

Figura N° 4: Producto de Amplificación PCR Multiplex para el Caso de Infertilidad 31, 2010

Es evidente la ausencia de los genes de la familia DAZ, los STSs ausentes fueron SY254, SY157, SY242, SY208, SY255 y SY152, señalados en los círculos amarillos, mostrando delección completa de AZFc, todos ellos a partir del máster A, B y C. Con presencia de locus SRY y positividad en los controles internos, confirmando de esa forma la reproducibilidad del producto obtenido por PCR. Se presentan todas las bandas estudiadas para los juegos de iniciadores máster D y E. El caso reportado es un paciente de 100 kgs de

peso, 178 cms de estatura, con antecedentes de azoospermia secretora, varicocele izquierdo sometido a procedimiento quirúrgico en el 2004, al examen físico se encuentra órganos sexuales normales, tamaño de pene normal, testículos de buen tamaño, consistencia, ubicación escrotal y epidídimo normal, presencia de vasos deferentes, ausencia de hidrocele, a la biopsia testicular túbulos seminíferos con ausencia 80% de células germinales y 20% sin maduración.

Para mayor ilustración se presenta el multiplex máster Mix A B y C, se observa de derecha a izquierda Columna 1: (Marcador de peso molecular) Columna 2: (Control positivo) Columna 3: (control negativo), Columna 4: (caso N° 29), Columna 5: (Caso N° 30), columna 6: (Caso N° 31), columna 7: (caso N° 32) y columna 8 (caso N° 33). Se evidencia en cada uno de los máster que en el caso N° 31 están ausentes: en A (las dos primeras bandas génicas, correspondientes a DAZ¹ y DYS240, de los STS DYS254 y DYS157 respectivamente), en máster B (la tercera y cuarta bandas génicas, correspondiente a DAZ2 y DAZ3 de los STS SY242 y SY208 respectivamente) y el máster C (la cuarta banda génica correspondiente DYS232 del STS DY152) concluyendo claramente microdelección, de cinco (5) bandas génicas en el caso 31. Es importante anotar que el caso reportado consultó por infertilidad, presentando azoospermia no obstructiva y la ausencia de cinco STSs sugiere que a mayor pérdida de genes DAZ mayor compromiso de la espermatogénesis, arriesgando el futuro reproductivo del paciente. Además, el paciente presenta varicocele de testículo izquierdo, órganos sexuales normales en tamaño, consistencia, ubicación, y vasos deferentes. A la biopsia testicular túbulos seminíferos con ausencia de células germinales en un 80% y células germinales sin maduración en un 20%.

DISCUSIÓN

A través de estudios de mapeos del gen SRY del cromosoma Y se descubrió la presencia de varios genes distribuidos en las denominadas regiones de azoospermia. Las deleciones del AZFc, que contiene el gen DAZ es más frecuente observarla en fenotipos relacionados con hipoespermatoogénesis que en Síndrome de Solo Células de Sertoli (SCO). Esto sugiere que su delección no es suficiente para ocasionar la pérdida completa de la espermatogénesis. La pérdida de la región AZFb está relacionada con cambios en el fenotipo testicular, aparentemente,

con menor compromiso de la espermatogénesis y la ausencia del gen DFFRY del AZFa se asocia con un compromiso mayor del fenotipo testicular²²

La frecuencia de microdelección encontrada en el presente estudio fue de 3.03% correspondiente a un caso del total de población analizada. Fernández Salgado en el 2006, presentó la estadística de otros resultados a nivel mundial, reportando una frecuencia de deleciones en: Alemania 3,2% (12/370), 1,3% (19/1470), Suecia 2% (4/192), Países bajos y Bélgica 2,3% (37/1627), Irlanda 3,6% (2/56) y Eslovenia 4,4% (9/226) entre otros (31)¹³Tiepolo y Zuffardy en 1976, al investigar a 1160 hombres infértiles, a los que se realizó cariotipo, logró detectar la delección de los diferentes AZF, en el 0.5%, de los casos. Las deleciones completas del AZFa fueron presentadas por Kamp C, Hullen K, Fernández S en el 2001, con una prevalencia del 9% aproximadamente²³

Mientras que en 180 pacientes infértiles, afectados con síndrome de solo células de sertoli (SCO) la prevalencia de deleciones fue del 34,5% y 24,7% respectivamente. Las deleciones en AZFc comprometieron al gen DAZ en 17 pacientes de 40 (42,5%). 61,9% de 21 pacientes con hipoespermatoogénesis y 21% de 19 con síndrome de solo células de sertoli(SCO),las deleciones que involucró al gen RBM fue de 5% y la delección del Gen DFFRY se presentó en el 12,5% de los 40 pacientes²⁴.

Carlo Foresta en el 2007 identificó 99 casos de infertilidad, de un total de 3073 hombres diagnosticados previamente con infertilidad, 3,2% sin criterios específicos de inclusión, el 8,3% con azoospermia no obstructiva y el 5,5% con oligozoospermia severa³¹. Aun moviéndose en los valores estadísticos reportados, las diferencias entre números de casos, puede estar relacionada con factores de diversas índole, tales como tamaño muestral, fenómenos de variabilidad genética, factores ambientales, ocupacionales y biológicos del entorno. Los

estudios de investigación que aplicaron criterios precisos de inclusión de pacientes (azoospermicos, oligozoospermicos), muestran mayor prevalencia de alteraciones relacionadas con microdelección del cromosoma Y.

La deleción de la región AZFc, del caso positivo para microdelección en el presente estudio, corresponde a los STSs, SY254, SY157, SY242, SY208, SY255 y SY152, para una deleción completa del AZFc resultado compatible con otros estudios, donde se encontró compromiso de genes de la "familia DAZ", como es el caso de Tessari A, 2004 quien encuentra deleciones de los genes RBM y DFFRY, y genes de la familia DAZ;²³. Al analizar 39 pacientes con síndrome de solo células de sertoli (SCO), de igual forma el fenotipo de testiculopatías severas idiopáticas, fue relacionado con ausencia de expresión del gen DAZ²⁵, mientras que Saut Noemie en el 2000, concluyó que además del gen DAZ, en las deleciones del AFZc participan los genes BPY2 y el CDY1. Otro estudio llevado a cabo en poblaciones de origen étnico chino, se identificaron 6 casos de deleciones del cromosoma Y, específicamente en AZFc, incluyendo al gen DAZ. Presencia de microdelección del gen DAZ en pacientes con oligozoospermia o azoospermia no obstructiva¹⁷. La ausencia de STS sY117, sY127 y sY143, en 7 pacientes evidenció resultados que indicaron deleciones en las regiones AZFb y C, con ausencia de sY117, sY127, sY143, el último hombre tenía los STS de los siete anteriores menos el sY117²⁴. La deleción del gen DAZ del AZFc, fue encontrada con mayor frecuencia en pacientes con hipoespermatogénesis que en pacientes con SCO, lo que sugiere que la deleción en este gen no es suficiente para causar una completa pérdida de la espermatogénesis²². Es mayor la frecuencia de microdeleciones en pacientes azoospermicos que en oligozoospermicos severos, comprometiendo la región AZFc en el loci de la familia del DAZ³¹

Un estudio sobre evolución del cromosoma Y, estableció que en los haplogrupos se presentan

diferentes haplotipos para el gen DAZ³⁹, cuyos genes son afectados posiblemente por poseer un número variable de copias²⁶. Se cree que el gen DAZ tuvo su origen en el DAZL, conocido inicialmente como DAZLA logrando su transformación evolutiva desde los primates antepasados hace más de 20.000 mil años como producto de un fenómeno de cuello de botella provocado en los glaciares.²¹ El gen DAZ pertenece a una familia de genes presentes en copias casi idénticas, sin que se tenga un claro conocimiento del número de copias que posee²⁸. Un estudio propuesto por René Reijo, 2000 analizó la presencia de la proteína del gen DAZ y GAZL en dos especies de mamíferos encontrando 9 repeticiones en tandem para el gen DAZ, sin que se haya proporcionado evidencia de que el número de copias sea exacto para hombres diferentes⁴⁰, aunque se ha descrito que la relación entre fenotipo testicular y la presencia de microdeleciones de AZFc en infertilidad, pueda deberse a un mayor número de genes en esta región⁹ la identificación de los haplotipos de este gen resulta de gran interés para el avance de las investigaciones en microdelección del cromosoma Y, como factor causal de infertilidad.³⁹ Otros estudios como los desarrollados por Kamischke Gromoll en el 1999, Ferlin A en el 1999, Ferras C en el 2004, identificaron deleciones de genes de la familia DAZ, los resultados de dichos estudios han hecho un gran aportes al estudio de la infertilidad masculina.

El paciente aportado en este estudio con microdelección de la región AFZc, es Azoospermico; alteración observada en hombres con presencia de deleciones en el brazo largo del cromosoma Y¹⁴, obedeciendo a las diferentes factores de azoospermia, o regiones AZF a, b y c y la región proximal AZFc/AZFd y, no solo en casos del AZFc. Las microdeleciones en pacientes con azoospermia se presenta en una proporción de 5% al 10% de los casos, proporción mayor que en oligozoospermia (2% - 5%).²² Moro E. identificó una microdelección en un paciente con oligozoospermia severa y

hipoespermatogénesis, resultados confrontados con los obtenidos en un hermano fértil, en quien se observó el grupo de genes, lo que permitió diagnosticar la presencia de la microdelección de gen DAZ de *novo*⁴¹, microdelección que puede presentarse en hombres con espermatogénesis normal⁴². Otros estudios han demostrado la microdelección de genes del AZFb, heredada de padres a hijos¹¹.

La microdelección puede presentarse en pacientes con patologías concomitantes, como criptorquidia y varicocele, sin que se haya determinado asociación. Se sugiere por tanto, que los casos de azoospermia que presenten patologías adyacentes, puedan considerarse candidatos para estudios de microdeleciones⁴³ y que la presencia de varicocele, probablemente esté asociado a la microdelección. En pacientes con microdeleciones AZFc se ha recuperado espermatozoides por diferentes métodos, 75% por TESE y 45% por biopsia, mientras que las microdelecionados en AZFa, AZFb y AZFb + C, no permitieron recuperarse espermatozoides.³² El caso aquí estudiado mostró en la biopsia testicular túbulos seminíferos con ausencia de células germinales en un 80% y células germinales sin maduración en un 20%.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las conclusiones enunciadas, nos permite identificar factores que pueden ser tenidos en cuenta para el manejo diagnóstico de la infertilidad masculina, en la población Caribe Colombiana: Se confirmó una prevalencia de 3.03% en una muestra poblacional de 33 hombres con diagnóstico previo de infertilidad, el 54,5% azoospermico y el 45,5 oligozoospermico. Las microdeleciones se presentan con una frecuencia variada entre poblaciones, a pesar de encontrarse en los intervalos estadísticos mostrados en otros estudios; la variabilidad puede estar relacionada con diversos factores, como diferenciación en grupos poblacionales, características genéticas,

factores ambientales, laborales y biológicos; o por factores propios del desarrollo del estudio, como criterios de inclusión, tamaño de la muestra, entre otros.

Los genes con microdelección pertenecen a la "Familia DAZ", ubicados en la región AZFc, todos los STSs de esta región incluidos en el estudio, estuvieron ausentes, confirmando que los genes de la familia "DAZ", son los más comprometidos en la población estudiada. La prueba escogida para determinar la microdelección del cromosoma Y (Kit de PCR multiplex), mostró efectividad y reproducibilidad en los hallazgos, confirmado mediante la presencia de los controles internos en cada uno de los juegos de iniciadores.

Fenotípicamente, la azoospermia no obstructiva está relacionada con la delección de genes de la familia DAZ. Sin embargo, su presencia también ha sido determinada en pacientes sin microdeleciones del cromosoma Y, corroborando que está presente por causas diversas. Es necesario continuar identificando nuevos casos, en hombres con diagnóstico previo de infertilidad a través de espermograma, (oligozoospermicos y azoospermicos), de esa manera, se evita dilatar los tiempos en el diagnóstico y pronósticos de la alteración, llegando a toma de decisiones concretas para cada caso específico. Continuar con investigaciones en esta misma línea nos permite aclarar y establecer diagnósticos precisos por microdelección del cromosoma Y. Hacer el seguimiento y búsqueda, en las líneas paternas y horizontales de casos reportados, para determinar origen de *Novo* o heredado y de acuerdo a los resultados, establecer relación con los factores ambientales, laborales y/o biológicos, como primera aproximación en el origen de las alteraciones. Orientar el consejo genético de la pareja que le permita analizar las diversas técnicas de reproducción artificial hacía su futuro reproductivo. La fertilización *in vitro* y la transferencia de embriones, así como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, son técnicas de reproducción asistida recomendadas en casos de infertilidad

masculina por alteraciones severas en la cuenta espermática,⁴² opciones que pueden ser analizadas para el caso en mención.

Identificados por el estado del arte y por los hallazgos del presente estudio, el grado de compromiso de genes de la familia DAZ, en la infertilidad masculina, lleva a proponer el diseño de métodos sencillos y bajo costo, tipo

tamizaje, que pueda brindarnos información de los casos posibles, para luego ser analizados a través de técnicas más costosas, de tal forma que aumente la cobertura probables de casos y de esa forma llegar a todo tipo de población. Lo que contribuiría a la determinación de la causa básica de infertilidad testicular, proyectando un mejor panorama en su diagnóstico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BrugoS, Chillick C, Kopleman S. Definición y causas de la Infertilidad. [en línea] Centro de estudios de ginecología y Reproducción. (2003). [consultado 2010 junio 5]. Disponible en: http://www.fecolsog.org/userfiles/file/revista/Revista_Vol54No4_Octubre_Diciembre2003/v54n4a03.PDF
2. Organización Mundial de la Salud OMS. Estrategias de Salud sexual y Reproductiva. [en línea] [citado 2004]. Disponible en URL: http://www.msps.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/pdf/equidad/13modulo_12.pdf
3. Poirot C, Cherruau B. Infertilidad masculina, Aspectos Clínicos e investigaciones Biológicas. Acta bioquímica latinoamericana [en línea]. 2005 [consultado 2010 abril 5]. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v39n2/v39n2a10.pdf>
4. Lucena E, Esteban C, Kent M. Determinación de deleciones en el cromosoma Y en hombres infértiles Candidatos a técnicas de reproducción asistida. Universidad Colegio mayor de Cundinamarca. Revista Nova Bogotá [en línea] 2004. [consultado 2011 abril 4]. Disponible en: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/artorig1_2.pdf
5. Peschka B, Leygraft J, Van K, Montac M, Hartmann B, Schubert R, et al. Tipe y frecuency of chromosoma aberration in 781 couple sundergoing intracytoplasmic sperm sujecion. revisitreproductionhuman.1999
6. Martínez M. Factor masculino y calidad embrionaria, "Ponencia" Centro Gutemberg. Revista iberoamericana e fertilidad. [en línea] 2004. [consultado 2009 septiembre]. Disponible en: www.editorialmedica.com/archivos/.../Congre%20SEF02.Ponencias2.pdf
7. Teppa-garran A. Palacios A. Evaluación actual de la infertilidad masculina. Invest. clín [en línea] 2004 [citado 2012 Jul 17]. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S053551332004000400008&lng=es.
8. Margaret I, Delbridge, Jennifer A, Marsahl G. Mammalian Y chromosome evolutions and thy male-specific- functions Y-chromosome-borne genes. Journal de reproducción y fertilidad, Dpto. de Bioquímica y genética Universidad de Bundora. 1999
9. Vogt ph, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hischmann P, Kiesewetter F et al. Human y chromosome azospermia factors (azf) mapped to different region Yq11, section de genetic e infertility molecular. University de Heidelberg Alemania. 2003
10. Marina S. Actitud ante el paciente azospermico. Revista Iberoamericana de fertilidad. [en línea] 2002 [citado 2012 julio 17]. Disponible en: <http://www.revistafertilidad.org/RecursosWEB/fertilidad/Congre%20SEF02-Ponencias2.pdf>
11. Rolf c, Gromool J, Simoni M, Nieschlag E. Natural Transmissionof a partial AZFb deletions of the chromosome Over Three generations. Humana, reproduction. 2002. 17 (2267 -2271)
12. Kamischke A, Gromoll J, Simoni M y otros. Transmission of Chromosomal deletions involving the deleted in azospermia (DAZ) and chromodomain (CDY1) genes from father to son through intracytoplasmatic sperm injection. Human reproduction. 1991 14 (2):2320- 2322
13. Fernández E, Álvarez F, Borja L, et al. Frecuencia de microdeleciones del cromosoma Y en hombres venezolanos con infertilidad idiopática. Invest. Clinic [en línea]. 2006; [citado el 2010 noviembre 11]. Disponible en: <http://revistas.luz.edu.ve/index.php/ic/article/view/2701/2617>
14. Vogt P. Human chromosome deletion in Yq11, AZF candidates and male infertility history and update, actualización, Molecular human reproductions, Germany. 1998;50(4): 739-744
15. Simoni M. Molecular diagnosis of Y chromosome microdeletion in Europe: State-of-theart and quality control. Institute of reproductive medicine of the University Munster. 2000;402-409
16. Tapia S, Rojas J. Semiología del análisis del semen. Boletín del Colegio mayor de Urología. 2003. [citado 2011 noviembre 11]. Disponible en: http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=13392&id_seccion=1587&id_ejemplar=1936&id_revista=104

17. Fernández M, Castilla J. Exposito E. et al. Esterilidad masculina y microdeleciones en el cromosoma Y. *Rev. Diagn Biol.* [online]. 2001, vol. 50, no. 3 [citado 2009-04-02]. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034>
18. Reijo R, Lee T, Alagappan R, Brown L, Rosemberg M. et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat genet*, 1995. 338,339
19. Helen S, Tomoko K. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Biology nature.* [en línea] 2003; [citado 2011 septiembre 23]. Disponible en: <http://www.nature.com/nature/journal/v423/n6942/full/nature01722.html>
20. Tessari E, Salata A, Ferlin L, Bartoloni S, Foresta C. Characterization of HSFY, a novel AZFb gene on the Y chromosome with a possible role in human spermatogenesis. *Molecular human reproduction.* 2004; 10 (4): 253–258
21. Blagosklonova O, Fellman F, Clavequin C, Roux C, Brenson J. AZFa deletions in sertoli cell-only syndrome: a retrospective study, *molecular human reproduction.* 2006; 6 (9): 795–799
22. Ferlín A, Moro E, Garrolla A y Foresta C. Humana male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM, DFFRY, *Humana reproducción.* 1999; 14 (10): 1710 – 1716
23. Kamp C, Hullen K, Fernández M, Schlegel P, Mielnick A. et al. High deletions frequency of the complete AZFa sequence Inmenwithsertoli-cell-only syndrome. *Molecular Humana reproducción.* 2001; 7 (10): 987 – 994
24. Castro A, López P, Johnson C, Sovino H, Martínez C, Vantman B. Microdelección del cromosoma Y en paciente infértil oligozoospermico severo. *Rev. méd. Chile* [periódico en la Internet]. 2000 [citado 2009 Abr 02]. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872000000700011&lng=es
25. Ferras C, Fernández S. Márquez C, Carvahlo F, Alves C, Silva J, et al. Análisis copia-específico de la microdelección de genes de AZF y DAZ en síndrome de la detención de maduración y de célula-solamente de Sertoli. Departamento de la genética, universidad de Porto, Portugal. *Revista reproducción humana.* 2004; 10 (9):755-761.
26. Saxena R. Laura G, Trevor H, Raaji K. Skaletsky H, et al. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was trasnposed, repeatedly amplified and pruned. *Nature genetics.* 1996; 14(3): 292 – 299
27. Mulhall J, Reijo, Alagappan L. Azoospermic men with deletion of the DAZ gene cluster is capable of completing spermatogenesis: fertilization, normal embryonic development and pregnancy occur when retrieved testicular spermatozoa are used for intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* [en línea] 1997; [citado 2011 marzo 1]. Disponible en: <http://content.nejm.org/cgi/medline/pmid;9130751?hits=20&fyear=1997&where=fulltext&tmonth=Dec&searchterm=azoospermic&fmonth=Feb&tyear=2007&searchid=1&FIRSTINDEX=0&resourcetype=HWCI>
28. Sjoerd R, Skaletsky H. et al. Recombination between Palindromes P5 and P1 on the Human Y Chromosome Causes Massive Deletions and Spermatogenic Failure. *Genet.* 2002; 71 (4): 906-922
29. Baza L. Ponencia espermatogénesis e infertilidad. Primer congreso de ALSIVIR. *Rev. Iberoamericana de fertilidad.* 2001; 18(4): 2-7
30. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Chromosome Microdeletions and alterations of Spermatogenesis. University of Padova, Department of Medical and Surgical Sciences, Clinica Médica 3, 35128 Padova. *Endocrine Reviews.* 2001;22(2): 226–239
31. Foresta C, Ferlín A, Barbará C. Cazzadore. Molecular and Clinical Characterization of Y Chromosome Microdeletions in Infertile Men: A 10-Year Experience. *the journal of clinical endocrinology & metabolism Italy.* 2007. 92(3): 762 765
32. Hoppsi C, mielnick A, Goldstein M, Goldstein G, Palermo Z, Rosenwaks Z, Schlegel P. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Human Reproduction.* 2003; 18(8):1660 - 1665

33. Calleja M, Gutiérrez G, Guerra L, Villalobos T, Rojas A, et al. "Determinación de factores Genéticos en infertilidad masculina idiopática". Rev. med. Chile. 2002; 128(2): 1-51
34. Foresta C, Enrrico M, Garolla A, Ferlin A, et al. Y chromosome microdeletions in chistorchidism and idiopathic Infertility. The journal of clinical endocrinology & metabolism Italy.1999; 84: 3660 3665
35. Simoni M, Barkker E, Eurlings M, Matthijs G, Moro E, Müller C, Vogt P. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. Int J Androl. 1999;22(5): 292-299
36. Grimaldi P, Carponi S, Pellegrino R, et al. Analysis of Yq micro deletions infertile males by PCR and DNA hibryzation techniques. Molecular human reproduction. 1998.4 (12): 1116 - 1121
37. Ballescà J, Matorras R, Viscasillas P, Peinado J. Registro de Inseminaciones (IAC-IAD). Sociedad Española de Fertilidad. Rev Iberoamericana de fertilidad. 2004.21(3): 42-43
38. Krauz C, Vaile Pieraccini, Firenze. Andrology Unit, Department of Clinical Physiopathology, Italy. Original no consultado, 2005 pp: 105 - 112 disponible en <http://www.springerlink.com/content/r0327426124461g7>. citado el 19 de marzo de 2009
39. Fernández T, Fernández S, Gonçalves R, Costa P, Ferrás C, Sousa S, Brehm A. *DAZ* gene copies: evidence of Y chromosome evolution. Molecular human reproduction. 2006. 12(8): 519 - 523.
40. Renne R, Dorfman M, Slee R, Renshaw A, Loughlin K, Cooke H, et al. *DAZ* Family Proteins Exist Throughout Male Germ Cell Development and Transit. From Nucleus to Cytoplasm at Meiosis in Humans and Mice¹. Biolohy of reproduction. 2000. 63(5): 1490 - 1496
41. Moro A, Paolo G, Franchi G, Foresta C. Male Infertility Caused by a *de Novo* Partial Deletion of the *DAZ* Cluster on the Y Chromosome. The journal clinical endocrinology and metabolian. 2000. 85(11): 4069-4073
42. Yanet R, Málaga C, Damaris A, Ortiz I, Hernández M, José T, Ruíz A. Detención de la espermatogénesis. Ginecol Obstet Mex. 2005; 73(9) 503
43. Meza H, Rosas H, Vite E, De Alba A. Aportación de un caso: Paciente con varicocele y oligozoospermia, con microdeleción en cromosoma Y: AZFb+c. Actas urológicas Españolas, 2007