

# Determinación de deleciones en el cromosoma Y en hombres infértiles candidatos a técnicas de reproducción asistida

Elkin Lucena Q M.D., PhD.<sup>1</sup>, Clara Esteban Pérez MSc.<sup>1</sup>, Marijo Kent First PhD.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Biogenética Molecular Reproductiva. Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad. CECOLFES. Bogotá D.C., Colombia.

<sup>2</sup> Universidad de Wisconsin y Corporación PROMEGA Madison E.U.

Recibido: 08-06-2004; Aceptado: 15-09-2004

## Resumen

El compromiso espermático severo en el hombre infértil, puede ser el resultado de la presencia de deleciones en el cromosoma Y en la región AZFc (*Factor de azoospermia región c*). En este estudio se caracterizaron 97 hombres con infertilidad con una frecuencia del 6% para la presencia de deleciones en la población estudiada. De estos hombres positivos para deleción en la región Yq (AZFc), nacieron tres niños mediante el uso de inyección intracitoplasmática (ICSI) que heredaron la mutación en el cromosoma Y, fundamentando la importancia de crear un programa de tamizaje para detectar la presencia de deleción en este cromosoma en la población de hombres infértiles candidatos para técnica de fertilización asistida (ART) mediante ICSI.

**Palabras claves:** hombres infértiles, deleción, Zona Yq, fertilización asistida, inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

## Abstract

Determination of microdeletion in chromosome Y in infertile men, candidates to assisted reproduction techniques Intracytoplasmic spermatozoid Injection.

Severe spermatoc damage in infertile man can be the result of presence of deletion in chromosome Y and in AFZc region (Zoosperm factor Zone C). This study was made in 97 men with infertility and a frequency of 6% to the presence of deletion in the studied population. Of those men positive to deletion in Zone Yq (AZFc) were born three children by using intracytoplasmic injection (ICSI), whom inherited mutation in chromosome Y, it established the importance to create a sifting program to detect the presence of deletion in this chromosome infertile men population, candidates to Assisted Reproduction Technique treatments (ART) by ICSI.

**Key Words:** Infertile man, deletion, Zone Yq, sifting, assisted fertilization, intracytoplasmic spermatozoid injection.

## Introducción

Los estudios genéticos actuales se realizan para la detección y el análisis de la información genética a nivel molecular, estos permiten detectar las causas de enfermedades o desórdenes que padecen las personas.

La búsqueda de tal información la lideran grandes grupos de investigadores, Proyecto Genoma Humano entre otros, los cuales han identificado y secuenciado los genes presentes en los cromosomas, entre ellos el cromosoma Y motivo del presente estudio (1).

La infertilidad ocurre en un 15 a 20% de las parejas, representando el factor masculino más del 50% de todos estos casos. Aunque la relación causal entre las deleciones del cromosoma Y y una función testicular disminuida es pobremente entendida, el tamizaje para las deleciones en el cromosoma Y se ha comenzado a utilizar ampliamente en la evaluación de infertilidad masculina permitiendo dilucidar su etiología y pronóstico (1).

El análisis de la secuencia de genes específicos en el cromosoma Y que codifican para algún desorden es importante, ya que establece el grado de alteración del DNA para la aparición de la enfermedad y permite la implementación de técnicas diagnósticas y en un futuro desarrollar terapia génica (2).

Cuatro diferentes *loci* han sido mapeados en el cromosoma Y, estos regulan la espermatogénesis y se conocen como *factor de azoospermia* (regiones AZF a, b, c y d), deleciones en estas regiones afectan genes candidatos como DAZ, RBMY, USP9Y y DBY originando testiculopatía severa en el hombre infértil (2-11).

Estudios actuales se orientan a encontrar la relación entre deleciones en el cromosoma Y con las alteraciones en la espermatogénesis. Actualmente a más de 4800 hombres infértiles se les ha realizado tamizaje para deleciones en este cromosoma las cuales determinan las posibles causas de los fenotipos de *azoospermia no obstructiva* y *oligozoospermia severa* que involucran en el mayor de los casos la región AZFc en la cual se localiza la familia del gen DAZ (4,12-15).

Su expresión se da a nivel de tejido testicular y se sabe que éste codifica para proteínas de enlace de RNA (9,15). Así mismo, posee influencia sobre el destino de la célula espermatogónica, bloqueando o facilitando la diferenciación celular, la cual altera la expresión de proteínas que se encargan de la diferenciación post-meiótica de esta célula gamética (2,3,9).

Las técnicas moleculares como la *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR), permiten identificar

deleciones no detectadas mediante el estudio de cariotipo. El avance de la biología molecular con el mapeo del cromosoma Y, hoy puede ser un diagnóstico de rutina en todos los hombres infértiles. El tamizaje de deleciones en Yq, provee a las parejas información básica para someterse a tratamientos mediante ART, éste permite determinar el riesgo de que la siguiente generación masculina herede las deleciones que afectarán su fertilidad futura (16,17).

El presente estudio utilizó PCR para la evaluación de deleciones en regiones específicas de AZF en Yq en pacientes infértiles con cariotipo normal, fundamentando la utilización de este análisis como un método eficaz para la detección de uno de los orígenes de la infertilidad asociado con desórdenes genéticos (2,6,7,18-22).

## Materiales y métodos

*Selección de pacientes:* este estudio analizó un total de 97 pacientes atendidos en la unidad de fertilización asistida del Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad CECOLFES, los cuales fueron incluidos en el estudio por presentar deficiente cantidad y calidad espermática. Antes de realizar el ICSI, los pacientes fueron sometidos a exámenes andrológicos. Se prestó especial atención a los antecedentes médicos que los pacientes referían como *hipogonadismo*, *criptorquidismo*, *varicocele*, *cirugías del tracto genitourinario*, *agenesia de conductos deferentes*, *atrofia testicular*, *orquitis*, *prolactinoma*, *hiperprolactinemia*, *cáncer testicular*, quimioterapia y medicaciones.

Este estudio siguió las recomendaciones y fue aprobado por el comité de bioética de CECOLFES. Se incluyeron un total de 30 hombres sanos fértiles y 10 muestras de mujeres normales como controles positivos y negativos respectivamente, los hombres utilizados como control presentaban parámetros seminales, citogenéticos y moleculares normales, además de tener fertilidad comprobada.

*Análisis seminal:* en todos los pacientes el sémen fue examinado bajo los parámetros establecidos por las guías de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en términos de volumen, conteo espermático, movilidad espermática rápida progresiva y morfología. Los hombres *azoospermicos* fueron confirmados mediante dos análisis diferentes de sémen en un intervalo de dos semanas seguidos por un periodo de abstinencia sexual de tres días.

*Análisis citogenético:* se realizó análisis citogenético de preparaciones de cultivos de linfocitos periféricos. Las técnicas de bandedo (G Y Q) fueron utilizadas y se analizaron más de 20 metafases en cada paciente.

*Diagnostico molecular:* el DNA genómico fue extraído de muestras sanguíneas periféricas con reactivo de purificación de *Promega* (A1120). Los pacientes fueron tamizados con el *Kit* para deleciones del cromosoma Y, por PCR múltiplex de *Promega* (MD1531), para la determinación de presencia o ausencia de los productos de amplificación; múltiplex A (SY254, SY157, SY81, SY130, SY182) múltiplex B (SYPR3, SY127, SY242, SY208), múltiplex C (SY128, SY121, SY145, SY255), múltiplex D (SY133, SY152, SY124) y múltiplex E (SY14, SY134, SY86, SY84).

En el grupo familiar de los pacientes que presentaron deleción se analizaron adicionalmente 16 STS: SY153, SY152, SY1192, SY1206, SY155, SY602, SY242, SY579, SY254, SY639, SY202, SY157, SY1190, SY158, SY1201 y SY160, con el fin de determinar su extensión total, analizando un total de 36 *locus* de importancia para los pacientes positivos.

Solo se incluyeron los ensayos de PCR que tenían productos del tamaño esperado idénticos al del control positivo y no tenían amplificaciones en el control negativo, solo fueron consideradas las deleciones cuando el producto de PCR estaba ausente después de tres amplificaciones en las mismas condiciones.

Los padres e hijos de los pacientes positivos en el análisis molecular del cromosoma Y, fueron también investigados en condiciones idénticas, con el fin de

determinar si estos casos realmente eran deleciones *de novo* o heredadas.

*Análisis estadístico:* se utilizó un diseño prospectivo clínico analítico y se determinaron las frecuencias relativas y absolutas con el fin de establecer las características clínicas y andrológicas, presencia o ausencia de microdeleciones del cromosoma Y, edad y fenotipo testicular de los pacientes estudiados.

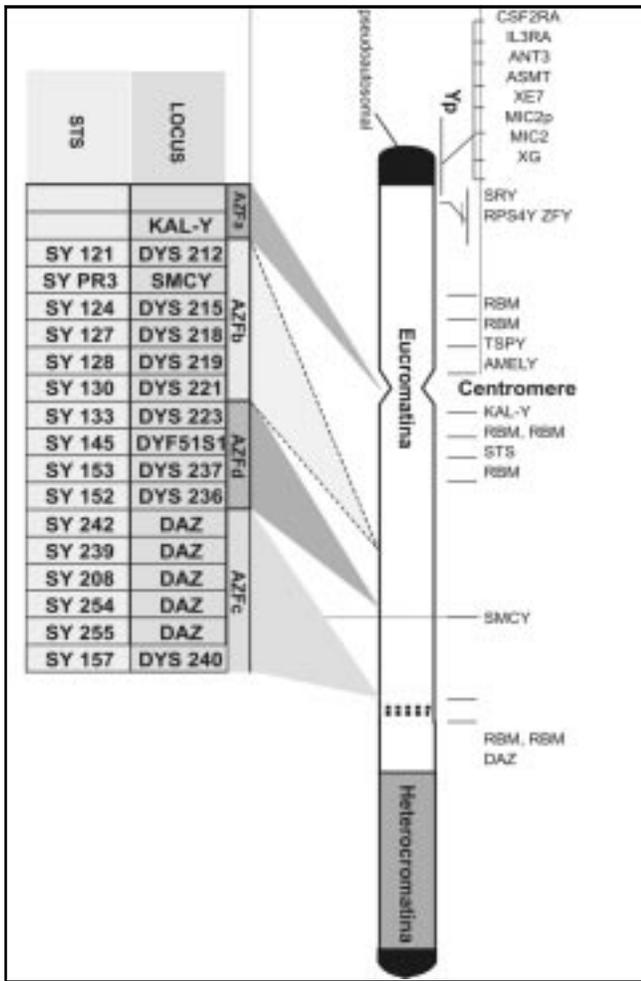
## Resultados

Un grupo de 97 pacientes infértiles que asistieron a CECOLFES, fueron tamizados para deleciones en el cromosoma Y, usando 20 STS localizados en las 4 regiones AZF, 2 de los 97 correspondiente al 2.1% de los hombres tamizados, fueron positivos para la deleción en la región AZFc (Figura 1).

De igual forma, 33 pacientes seleccionados según su concentración de espermatozoides menor ó igual a 5 mill/ml (16 *azoospermicos*, 9 *criptozoospermicos* y 8 *oligozoospermicos severos*), fueron tamizados y se determinó la presencia de deleción en 2 de ellos; fenotípicamente uno de los pacientes presentaba *azoospermia no obstructiva* y el otro *oligozoospermia severa* (Tablas 1 y 2; Figura 2 y 3).

La frecuencia de deleciones en estos pacientes tamizados respecto a su historia andrológica se muestra en la Tabla 3. En el grupo de hombres *azoospermicos* se observó deleción en un paciente con *azoospermia no obstructiva idiopática* y en un paciente con *oligozoospermia severa idiopática*, en ningún paciente con *criptozoospermia* se detectó la deleción.

Se determinó la concentración de espermatozoides aspirados de testículo (TESE) en el paciente *azoospermico*, encontrándose un espermatozoide por cada 8 campos. En el paciente *oligozoospermico severo* se observó una concentración de 1.4 mill/ml espermatozoides en su eyaculado. Se evaluaron otras características del semen en los dos pacientes y se encontró severa reducción de la movilidad y pobre morfología de los espermatozoides, la mayor anomalía detectada fue *cabeza amorfa* (Tabla 4).



**Figura 1.** Esquema del cromosoma Y. Se muestran 20 STS y sus Locus correspondientes, localizados en cada región, AZFa, AZFb, AZFd, AZFc, utilizados para tamizar la presencia de delección en hombres infértiles. La barra de donde nace el segundo cono, de abajo hacia arriba, representa los STS presentes en cada paciente, y la barra punteada indica el intervalo de la delección, definido como STS ausentes.

En la evaluación citogenética de los pacientes analizados, uno presentó anomalía estructural cromosómica, 46,XdelY(q12) con un fenotipo testicular de *teratoastenozoospermia*. En ningún otro paciente se encontró anomalía numérica o estructural que fuera considerada como la causa de la infertilidad del paciente tamizado.

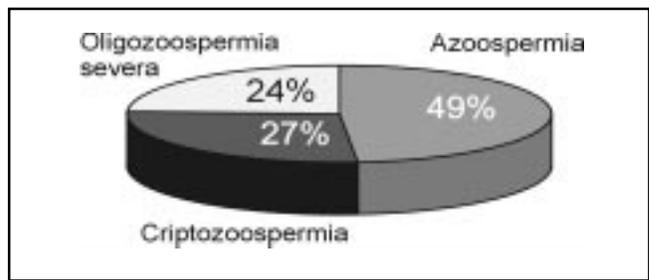
Un esquema de la delección encontrada en estos pacientes se muestra en la Figura 1. Dos pacientes presentaron delección intersticial exclusivamente en la región AZFc y AZFd (AZFc distal), con los siguientes STS ausentes: SY145, SY152, SY242, SY206, SY254, SY255 y SY157, correspondientes a los genes DAZ,

**Tabla 1.** Frecuencia de hombres infértiles de acuerdo a su fenotipo espermático.

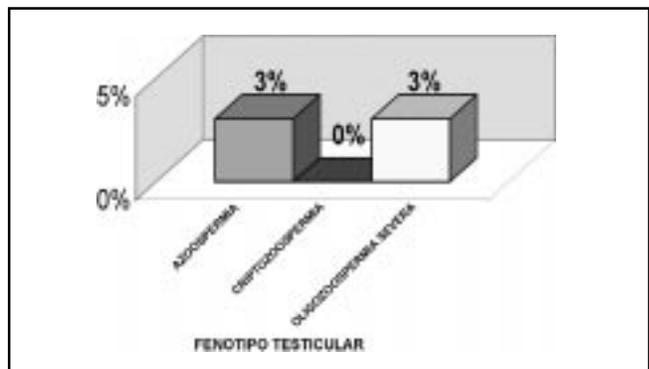
Fenotipo testicular	Frecuencia relativa %	Frecuencia absoluta
Azoospermia	48	16
Criptozoospermia	27	9
Oligozoospermia severa	24	8
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>33</b>

**Tabla 2.** Frecuencia de delección en hombres infértiles de acuerdo a la concentración espermática

Fenotipo testicular	Frecuencia absoluta	% delección	Delección
Azoospermia	16	3	1
Criptozoospermia	9	0	0
Oligozoospermia severa	8	3	1
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>6</b>	<b>2</b>



**Figura 2.** Distribución de frecuencias de hombres infértiles según el fenotipo testicular.



**Figura 3.** Distribución de porcentajes para la presencia de delección en Yq de hombres infértiles según recuento espermático.

RBMY1, RBAY2, BPY2 y CDY. No se encontraron delecciones en AZFa y b en la población tamizada.

De los 97 pacientes con infertilidad, 69 parejas mediante ICSI lograron un embarazo; 39 niños y 31 niñas, las restantes no lograron embarazo. Dentro de las parejas que tuvieron niños se encontraban los dos pacientes con delección intersticial en la región AZFc (gen DAZ) uno de ellos, el paciente identificado como

**Tabla 3.** Hallazgos andrológicos en hombres infértiles tamizados para deleción en Yq, candidatos a ICSI. Nótese la frecuencia de deleciones en los diferentes subgrupos de pacientes analizados en el presente estudio.

Fenotipo	n	Deleción	(%) Deleción
<b>Azoospermicos</b>	16	1	6.25
Varicocele	4	0	
Agnesia	1	0	
Atrofia	2	0	
Prolactinoma	1	0	
Orquitis	1	0	
Idiopática	8	1	12.5
<b>Criptozoospermia</b>	9	0	
Varicocele	2	0	
Prolactinoma	1	0	
Idiopática	7	1	
<b>Oligozoospermia Severa</b>	8	1	12.5
Varicocele	5	0	
Idiopática	3	0	36.3
<b>Oligozoospermia moderada</b>	30	0	
Varicocele	8	0	
Hiperprolactinemia	2	0	
Atrofia testicular	1	0	
Idiopática	19	0	
<b>Normales</b>	30	0	

JAT-6 tuvo un hijo varón nacido mediante ICSI y el paciente identificado como 402 tuvo dos hijos varones (nacimiento gemelar), estos dos pacientes con deleción idéntica no relacionados entre sí fueron evaluados en su historia familiar para dilucidar el origen de la deleción (heredada o mutación *de novo*).

*Familia del paciente 402:* hombre de 38 años, quien no reportaba en su familia hombres con infertilidad, historia andrológica o cáncer. Se tamizó a su padre y a sus dos hijos nacidos por ICSI; el gemelo 1 es sano y hasta hoy no presenta ninguna anomalía y el gemelo 2 presento *hipoplasia ventricular derecha*, lo cual ocasiona después del nacimiento la presencia de crisis convulsivas a causa del defecto cerebral.

Se obtuvo una muestra de sangre del padre del paciente, hombre de 70 años con 4 hijos varones, la

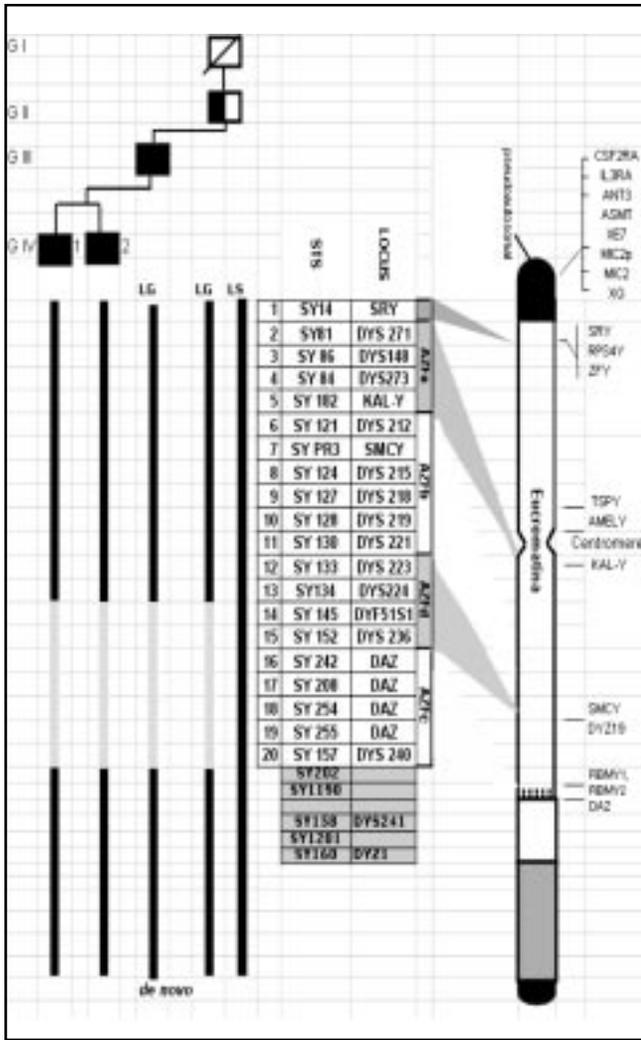
**Tabla 4.** Hallazgos clínico andrológicos, citogenéticos y moleculares de pacientes positivos para deleciones en el cromosoma Y

Paciente/características	JAT 6	402
<b>Clinicas</b>		
Edad	48	38
Volumen testicular	15/15	20/25
FSH IU/L	18.7	8.2
LH IU/L	5.1	3.1
Testosterona ng/ml	2.3	3.8
<b>Andrológicas</b>		
Rto espermático	TESE 1/8 campos	1.4 milimil
Volumen	ND	6ml
pH	ND	8
Movilidad	27	0
	48%	100%
Anormalidad predominante	Cabeza amorfa	Cabeza amorfa
Fenotipo testicular	Azoospermia	Oligozoospermia
<b>Genéticas</b>		
Cariotipo	46,XY	46,XY
Microdeleciones cromosoma Y	positiva	positiva
Regiones delecionadas	AZFd-AZFc (DAZ)	AZFd-AZFc (DAZ)

cual fue negativa para la deleción. Al analizar la muestra de semen, se le encontró una deleción idéntica a la del paciente, lo que indicaba que el paciente heredó la deleción en Yq de su padre y que esta era de línea germinal y no de línea somática, confirmando la presencia de mosaico de línea para la deleción.

De igual forma se analizaron muestras de sangre de los hijos gemelos nacidos mediante ICSI y se encontró que ambos portaban la deleción idéntica a la de su padre y su abuelo (Figura 4).

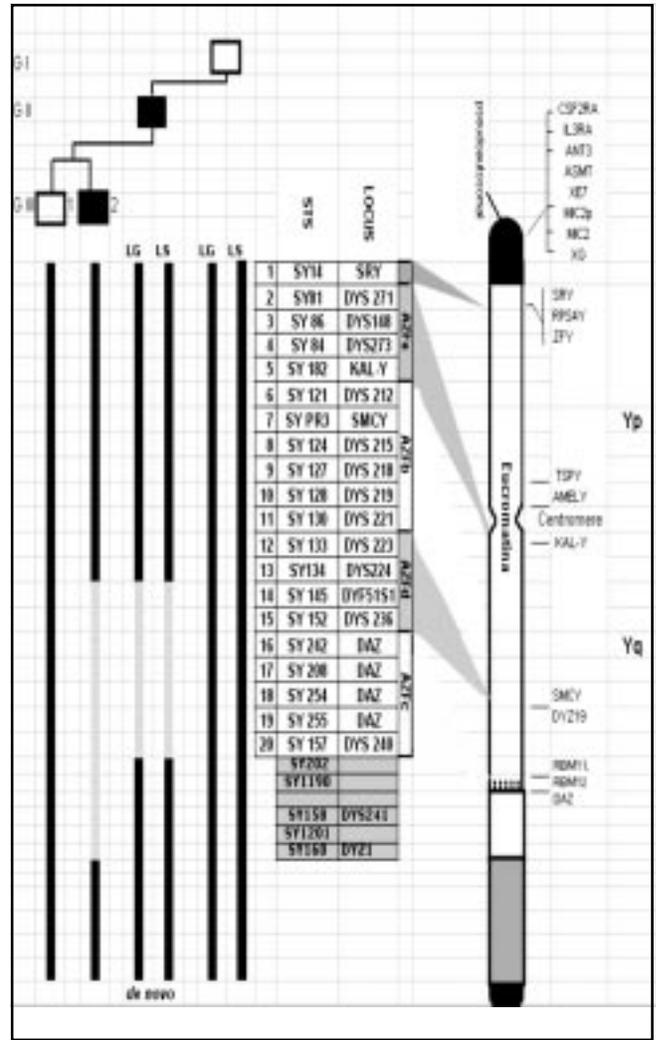
Esta familia en tres generaciones sucesivas, presenta la misma deleción, esto provee evidencia de que una deleción en Yq puede originar diferentes fenotipos testiculares en cada individuo infértil de un mismo núcleo familiar (19,20), por ejemplo, el padre del paciente tuvo una aparente fertilidad normal, que al pasar el tiempo se deterioro por procesos externos relacionados con ambiente y envejecimiento, que llevaron a un fenotipo testicular severo (17,18). Muy posiblemente el bisabuelo fallecido heredó a su hijo la inestabilidad en el cromosoma Y. La deleción franca se observó en los gemelos nacidos mediante ICSI en la



**Figura 4.** Cromosoma Y de la familia del paciente 402 (G III), su padre (G II) y sus dos hijos (G IV) concebidos por ICSI. La barra en de color oscuro presentada al lado izquierdo, representa los STS presentes en cada hombre analizado, la barra clara indica el intervalo de la deleción, definido como STS ausentes. El padre del paciente (G II) presenta deleción en línea germinal (LG). Este heredó a su hijo (G III) la deleción en AZFc. El paciente es tamizado en línea somática (LS) en la cual se confirma la deleción, por ART - ICSI logra concebir dos niños (G IV 1 y 2) los cuales heredaron la deleción idéntica a la de su abuelo (G II) y a la de su padre (G III).

cuarta generación, la cual comprometerá la fertilidad de estos niños (Figura 4).

*Familia del paciente JAT-6:* hombre de 48 años, quien no reportaba familiares hombres con infertilidad, historia andrológica o cáncer. Se tamizó a su padre y a sus dos hijos, uno nacido cuando tenía 20 años y otro nacido por ICSI a la edad de 48 años (Figura 5). Este paciente hace 28 años tuvo fertilidad normal y hoy presenta deleción y un fenotipo testicular severo, por lo



**Figura 5.** Cromosoma Y, de la familia del paciente JAT-6 (G II), su padre (G I) y sus dos hijos (G III). Un hijo nació cuando el paciente tenía 20 años (G III 1) y otro nació vía ICSI a la edad de 48 años (G III 2). La barra oscura del lado izquierdo de la gráfica, representa los STS presentes en cada hombre analizado, la barra clara indica el intervalo de la deleción, definido como STS ausentes. El padre del paciente (G I) no presentó deleción ni en línea germinal (LG), ni en línea somática (LS). El paciente en estudio presenta deleción de novo en las líneas celulares somática y germinal. El hijo nacido vía ICSI (G III 2) hereda la deleción del padre presentando expansión de la misma hacia la parte terminal de AZFc. (G III 2) presenta el mismo punto de ruptura en AZFd (SY 145) pero su deleción se expande hasta AZF terminal (SY 160) en la región de heterocromatina del cromosoma Y. Los STS y locus demarcados en el cuadro representan marcadores extras estudiados en esta familia para lograr mapear el punto de ruptura terminal de la deleción presente en este niño.

cual recurrió a técnicas de ART; los espermatozoides utilizados para el ICSI fueron obtenidos por TESE. En el estudio familiar su padre no presentaba deleción en línea somática ni germinal, a diferencia del paciente quien presentó deleción en AZFc (Gen DAZ), con lo cual se

comprueba la presencia de una delección de *nov*.

El hijo nacido hace 28 años tiene un cromosoma Yq intacto, pero el hijo nacido mediante ICSI se le encontró una delección en AZFc con el mismo punto de ruptura del padre pero expandida hacia la parte terminal del cromosoma. Se evaluaron otros STS terminales en Yq, para lograr detectar la extensión de la delección y se encontró que abarcaba desde AZFd (STS-SY145) hasta AZFc terminal (STS-SY160) en la *región heterocromática* de Yq (Figura 5).

## Discusión

En el estudio se reporta el logro de un programa de tamizaje para detectar la presencia de delecciones en el cromosoma Yq en una población de pacientes candidatos para ART-ICSI.

Diversos estudios han reportado una variedad de frecuencias de delecciones desde el 1% (21) hasta del 55.5% (22), con una media de 12% de pacientes con *azoospermia no obstructiva* y 6% de pacientes con *oligozoospermia severa* (2, 4, 10, 13, 23-26).

Hasta la fecha se han tamizado miles de hombres infértiles utilizando protocolos en los cuales se emplean de 1 a 150 STS. La tasa de detección de las delecciones varía de acuerdo al número y la selección de STS y de criterios clínicos de inclusión de los pacientes, por ejemplo, la frecuencia reportada más alta se estableció en un estudio con solo hombres *azoospermicos* y las más bajas en un grupo de pacientes infértiles (21,22).

En el estudio se incluyeron pacientes con etiologías andrológicas conocidas, para evaluar la presencia de delecciones. La infertilidad idiopática se determinó en un 67%; en el 33% restante se detectó infertilidad no idiopática. Dentro de los pacientes con infertilidad no idiopática el 61% presentaba *varicocele* y en el 39% se observó *atrofia testicular*, *hiperprolactinemia*, *criptorquidia*, *agenesia de conductos deferentes*,

*prolactinoma y orquitis* (Tabla 5 y 6, Figura 6 y 7). Los pacientes portadores de la delección Yq presentan *infertilidad idiopática* (Tabla 7).

La frecuencia de delección analizada en este estudio en el grupo de pacientes *azoospermicos* fue de 6.25%; en *oligozoospermicos severos* fue de 12.5% y no se encontraron delecciones en pacientes *criptozoospermicos* (Tabla 8). Estos porcentajes están por debajo de frecuencias reportadas en anteriores investigaciones como: Kobayashi, 1994; Reijo, 1995; Najmabadi, 1996; Stuppia, 1996; Foresta, 1997,1998; Kent First, 1999; Ferlin, 1999; Masato, 2001, (3,10,12,13, 23,27,28) pero son comparables con los resultados de Reijo, 1996; Sarah, 1997; Pryor, 1997; Girardi, 1997; Grimaldi, 1998; Reliman, 1999; Krauz, 1999; David, 2000; Corine, 2000; Krauz, 2001; Jan, 2002; Dohle, 2002; Dates, 2002 (4,19,25,29-38) (Tabla 9).

Brandell, 1998 (39) describe que todo paciente infértil sin espermatozoides en su eyaculado antes fue fértil y tuvo un recuento espermático normal. En nuestro tamizaje el paciente JAT-6 previamente fue *normozoospermico*, pasó por *oligozoospermia severa* y, después de algunos años, llegó a ser *azoospermico*. Los hombres infértiles positivos para delección presentan histológicamente en tejido testicular resultados que varían desde *hipospermatogenesis* hasta arresto completo de la maduración y *síndrome de solo célula de sertoli*.

El 50 a 75% de las *azoospermias* no tienen causa conocida (25), se ha descrito que el 30% de los hombres con *azoospermia idiopática* tienen delecciones del cromosoma Y (2,4,9,12,13,25,40). Sin embargo, la transmisión vertical de una delección que involucra el gen DAZ, desde padre a hijo ha sido informada solo en pocos casos (2,12,25).

En este estudio se reporta una familia que presenta delección del gen DAZ durante tres generaciones en línea directa. Esto provee evidencia de que una delección en Yq puede originar una expresión fenotípica variable en los diferentes individuos analizados dentro de un mismo núcleo familiar (4,30,41), lo que es

**Tabla 5.** Análisis de frecuencia de hombres infértiles según su etiología.

Etiología	Frecuencia relativa %	Frecuencia absoluta
Idiopática	67	65
No idiopática	33	32
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>97</b>

**Tabla 6.** Distribución de frecuencias de hallazgos andrológicos responsables de las causas no idiopáticas para la infertilidad masculina.

No idiopática	Frecuencia relativa %	Frecuencia absoluta
Varicocele	59	19
Alopecia	9	3
Hiperprolactinemia	6	2
Criptorquidia	6	2
Miscelánea	19	6
<b>Total</b>	<b>100%</b>	<b>32</b>

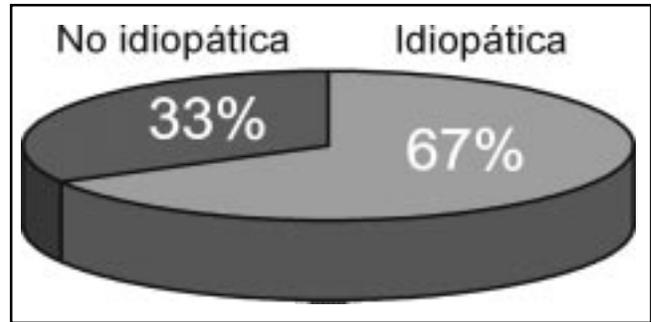
**Tabla 7.** Número de pacientes infértiles con deleción respecto a la etiología

	Deleción	No deleción	Total
Idiopática	2	63	65
No idiopática	0	32	32
<b>TOTAL</b>	<b>2</b>	<b>95</b>	<b>97</b>

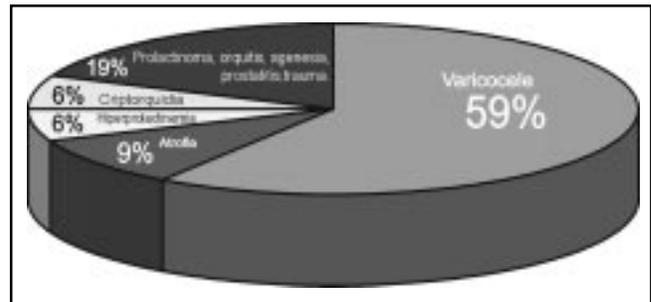
**Tabla 8.** Resultado de hombres infértiles tamizados para deleción en Yq.

Nro. Pacientes	Fenotipo	Recuento espermático	Frecuencia DAZ	%
16	Azoospermia	0 millones / ml	1/16	6.25
9	Criptozoospermia	< 1 millón / ml	0/9	0
8	Oligozoospermia severa	1-5 millones / ml	1/8	12.5

clínicamente significativo, ya que la presencia de una deleción no es absolutamente un marcador para infertilidad y puede estar asociado con aparente fertilidad que en la segunda o tercera etapa de la vida y puede conducir al desarrollo de un fenotipo testicular severo como *azoospermia no obstructiva* (42,43).



**Figura 6.** Distribución de frecuencias de la etiología responsable de la infertilidad en 97 hombres tamizados para deleciones en el cromosoma Y.



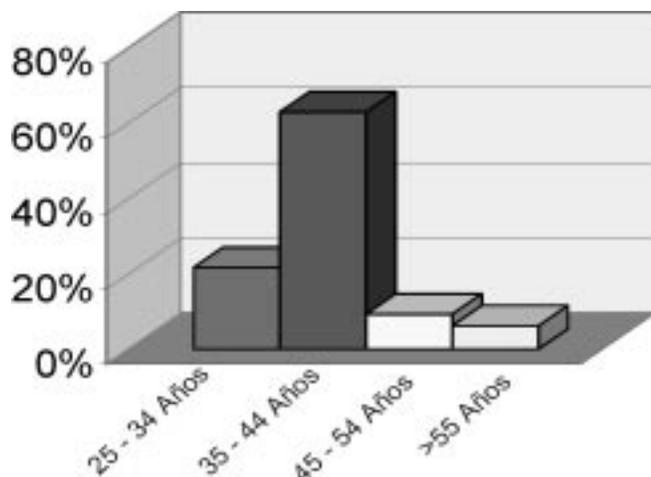
**Figura 7.** Distribución porcentual de diferentes hallazgos clínicos andrológicos responsables de la infertilidad no idiopática en la población de estudio.

Las deleciones intersticiales pueden ocurrir durante la *meiosis* por un empaquetamiento defectuoso del DNA en la *espermioogénesis*. El patrón de deleción en el cromosoma Y que se ha observado parece ser reproducible en gran cantidad de pacientes, en este se han detectado una alta frecuencia de elementos repetitivos de secuencias en *tandem* que generan una inestabilidad cromosómica significativa (12).

Durante el intercambio de *cromátides hermanas* en *meiosis*, pueden ocurrir deleciones de regiones específicas en Y, tales como AZFb o AZFc, que limitan con las regiones de alta repetitividad, generándose el fenómeno de la pérdida constante de genes o familias de genes importantes para la espermatogénesis. Esto es importante puesto que ratifica la hipótesis de que las deleciones *de novo* en regiones del cromosoma Yq, son frecuentes en hombres con fenotipos testiculares severos que comprometen la inestabilidad del genoma en las siguientes generaciones (2,4,12,13,25).

**Tabla 9.** Datos relevantes de diferentes investigaciones para el tamizaje de microdelecciones en cromosoma Y, con diferentes criterios de selección y métodos de análisis: (AF: análisis de frecuencia relativa y absoluta; ANOVA: análisis de varianza) Datos Negrilla: resultados similares al presente estudio.

REFERENCIA	AZOOSPERMIA	OLIGOZOOSPERMIA	NORMOZOOSPERMICO	IDIOPATICA	NO IDIOPATICA	FRECUENCIA DELECCION %	# STS	ESTADISTICA
Tierpo, 1976	6					0.6		
Kobayashi, 1994	63	*	*	*	*	15	*	AF
Raio, 1995	89	*	90	*	*	13	*	AF
<b>Rello, 1996</b>	*	35	*	*	*	5	*	AF
Najmabadi, 1998	50	10	18	*	*	20	*	AF
Qureshi, 1996	100	*	*	*	*	8	*	AF
Stuppia, 1996	19	14	10	*	*	21	*	AF
Vogt, 1996	370	*	*	*	*	3	*	AF
<b>Sarah, 1997</b>	108	52	*	*	*	7	36	AF
<b>Pryor, 1997</b>	46	72	102	102	*	7	85	AF
Vareb, 1997	43	28	55	*	*	11.6	6	AF
Simon, 1997	74	94	86	*	*	4	*	AF
<b>Girardi, 1997</b>	106	32	*	*	*	6	*	AF
Kriemer, 1997	19	111	*	*	*	0	*	AF
Foresta, 1987	16	22	10	*	*	37	*	AF
<b>Grimaldi, 1998</b>	60	7	*	*	*	7.5	18	AF
Foresta, 1986	59	0	35	18		55	29	ANOVA
Kerl First, 1989	278	*	820	*	*	20.5	136	TEST FISHER
Ferlin, 1989	55	85	100	*	*	42.5	38	AF
Seifer, 1989	21	/32	35	34	7	11.7	12	AF
<b>Kleinman, 1999</b>	105	28	32	*	*	6	20	AF
<b>Krauz, 1999</b>	63	35	*	48	85	7	*	AF
Krauz, 1999	134	*	*	*	*	4.7	6	AF
Lisbet, 2000	229	*	*	*	*	4	27	AF
<b>David C, 2000</b>	86	*	*	*	*	6.9	22	AF
<b>Corina, 2000</b>	20	27	*	*	*	5.5	12	AF
Friel, 2001	56	*	50	56	22	3.6	22	AF
Masato, 2001	89	*	20	*	*	25.9	28	AF
<b>Krauz, 2001</b>	138	107	100	*	*	7.8	20	AF
Peterfin, 2002	92	134	125	*	*	8.6	42	TEST FISHER
<b>Jan W, 2002</b>	25	84	*	*	*	5	11	TEST FISHER
<b>Dohle, 2002</b>	37	113	20	85	65	5.3	7	AF
Uries, 2002	57	*	56	*	*	10.5	3	AF
<b>Dates, 2002</b>	42	*	*	*	*	5.9	8	X2 TEST T



**Figura 8.** Distribución de frecuencias de acuerdo a la edad de hombres infértiles tamizados en el presente estudio.

Dichas regiones inestables, conocidas como *palindrómicas* tiene alto riesgo de expansión de la deleción durante la *embriogénesis* temprana, resultando en un mosaico de línea germinal y somática. Si la deleción en Yq es en una región inestable, se heredaría a la siguiente generación por línea germinal, lo que generara infertilidad en el hijo y posible expansión de la deleción. El impacto en el fenotipo es dependiente de la extensión de la mutación y el momento en que ocurre la mutación en el desarrollo (44-46).

La pérdida total del gen DAZ puede ser asociado con un fenotipo histológico de solo *célula de sertoli* o *arresto de la maduración espermática* (22,25). Los diferentes grados de *hipoespermatogenesis* observados en hombres con deleciones AZFd/c (DAZ) pueden ser atribuibles al grado de compensación parcial de la deleción por la presencia de un gen funcional homólogo *autosómico* presente en el cromosoma 3 (gen DAZLA) (4,47-50).

Las dos familias que se describen en este estudio, de hombres con deleción en AZFc, lograron ser padres vía ICSI. Todos los hijos heredaron el cromosoma Y delecionado de su padre, los genes de la región AZFc aparentemente no afectan morfológicamente el cuerpo, la organogénesis, oncogénesis de células germinales o la fisiología y

**Tabla 10.** Distribución porcentual de edad de hombres infértiles tamizados para deleciones en Yq, candidatos a ICSI.

Edad	Frecuencia relativa %	Frecuencia absoluta
25 - 34 años	22	21
35 - 44 años	63	61
45 - 54 años	9	9
>55 años	6	6
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>97</b>

el metabolismo normal de los fetos. La reciente secuenciación de AZFc ha verificado que las siete unidades de transcripción de los genes del cromosoma Y de esta región, son expresadas únicamente en testículo (9,10,45).

Como tratamiento para la infertilidad por la *azoospermia no obstructiva*, en 1992 se implementa el ICSI y en 1993 los procedimientos conocidos como TESE y MESA (aspiración de espermatozoides del epidídimo y del testículo por microcirugía), lo que significa que los primeros niños nacidos mediante estas técnicas hoy tienen 10 y 11 años respectivamente, aun ninguno ha entrado a la pubertad para poder orientar a la comunidad científica en el grado penetrancia de las deleciones del cromosoma Yq y aun no se conoce cual será su fenotipo testicular y su capacidad reproductiva a largo plazo (43,51,52).

Recientemente una alta frecuencia de hombres jóvenes con baja calidad de semen han sido reportados en el mundo (53-57). En el presente estudio el 62% de los hombres analizados están en el rango de edades de 35 a 44 años y el 23% entre 25 a 34 años (Figura 8; Tabla 10), años atrás el hombre disminuía su fertilidad después de los 60 años, hoy tenemos pacientes a temprana edad con infertilidad, fenotipos testiculares severos y desarrollo de cáncer testicular o seminomas.

Numerosos factores ambientales tales como pesticidas, estrógenos exógenos y metales pesados pueden tener un impacto negativo en la espermatogénesis, pero ninguno de estos factores ha sido formalmente demostrado como responsable del

deterioro en la fertilidad masculina. El envejecimiento y un ambiente deletéreo podrían aumentar la probabilidad de la mutación y también acrecentar el impacto de la misma sobre la espermatogénesis. Es interesante señalar que los hombres que presentan la deleción son hombres entre 45-65 años de edad (20,30), como se observó en el paciente de 48 años identificado como JAT-6.

Con este tamizaje podemos concluir que el uso de amplio número de STS en un grupo seleccionado de hombres infértiles candidatos a ICSI, con mayor riesgo de presentar deleción son aquellos con recuentos de espermatozoides menores de 5 mill/ml (*oligozoospermicos severos, criptozoospermicos y azoospermicos*) con infertilidad idiopática.

Debido a que las deleciones en Yq pueden ser heredadas por niños varones nacidos mediante el uso de ICSI, este tamizaje provee una adecuada consejería para el tratamiento de la pareja infértil, puesto que los niños nacidos de hombres con deleción en Yq pueden heredar la deleción y la inestabilidad de su padre y consecuentemente sufrir en el futuro problemas de subfertilidad e infertilidad.

Se puede predecir el riesgo de que los hijos varones hereden la deleción y la deficiencia *espermatogénica* pero no su severidad, la cual será modificada o modulada por factores genéticos y/o ambientales que podrán expandir o suprimir el efecto deletéreo de la deleción en AZFc de las siguientes generaciones.

## Referencias

- Peterlin B, Kunej T, Sinkovec J, Gligorievska N, Zorn B. Screening for Y chromosome microdeletions in 226 slovenian subfertile men. *Hum Reprod* 2002; 17:17-24.
- Vogt PH. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 933-43.
- Kent-First M, Muallen A, Pryor J, Roberts K, Nolten W. 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.
- Reijo R. Mouse autosomal homolog of DAZ, a candidate male sterility gene in humans, is expressed in male germ cells before and after puberty. *Genomics* 1996;35: 346-52.
- Foresta C, Ferlin A, Moro E, Scandellari C. Y chromosome. *Lancet* 2000; 355:234-5.
- Vollrath D, Foote S, Hilton A. The human Y chromosome: A 43-interval map based on naturally occurring deletion. *Science* 1992; 258:52-9.
- Lahn B, Page D. Functional coherence of the Human Y Chromosome. *Science* 1997; 278: 675-80.
- Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34:119-24.
- Ma K. A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* 1993; 75:1287-95.
- Reijo R. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 1995; 10:383-93.
- Brown RA, Furlong RA, Sargent CA. Characterizations of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the *Sxr* interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Hum Mol Genet* 1998; 7:97-107.
- Kobayashi K, Mizuno K, Hida A, Komaki R, Tomita K, Matsushita I, et al. PCR analysis of the Y chromosome long arm in azoospermic patients: evidence for a second locus required for spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 1994; 3:1965-7.
- Najmabadi H, Huang V, Yeng P, Subbarao MN, Bhasin D, Banaag L, et al. Substantial prevalence of microdeletion on infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence taget site base mapping strategy. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1996; 81:1347-52.
- Saxena R. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet* 1996; 14: 292-9.
- Cooke HJ. A murine homologue of the human DAZ gene is autosomal and expressed only in male and female gonads. *Hum Mol Genet* 1996; 5:513-6.
- Page DC, Silber S, Brown LG. Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility. *Hum Reprod* 1999 14:1722-6.
- Kent-First M, Kol S, Muallen A. Infertility in Intracytoplasmic sperm injection derived sons. *Lancet* 1996; 348: 332.
- Edwards RG, Bishop CE. On the origin and frequency of Y chromosome deletions responsible for severe male infertility. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:549-54.
- Krauz C, Quintana L, Barbaux S, Siffroid FP, Arvis G, Antoine JM, et al. A high frequency of Y chromosomal deletion in males with no idiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3606-12.
- Simoni M. et al. Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in Azoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil Steril* 1997; 67:542-7.
- Van Der Ven K, Montag M, Pesschka B. Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:699-704.
- Foresta C, Ferlin A, Garolla A. High frequency of well defined Y chromosomal deletions in idiopathic sertoli cell only syndrome. *Hum Reprod* 1998; 13:302-7.
- Stuppia L, Calabrese G, Franchi PG, Mingarelli R, Gatta V, Palka G, et al. Widening of a Y-chromosome interval-6 deletion transmitted from a father to his infertile son accounts for an oligozoospermia critical region distal to the RBM1 and DAZ genes. *Am J Hum Genet* 1996; 59:1393-5.
- Qureshi SJ. Polymerase chain reaction screening for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis

- of genetically determined spermatogenic failure in men. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 775-9.
25. Pryor JL, Kenfirst M, Nolten W, Meissner L, Robert KP. Prospective analysis of Y chromosome microdeletions in 200 consecutive male infertility patients. *N Engl J Med* 1997;336: 534-9.
  26. Vereb M, Agulnik AL, Houston JT. Absence of DAZ gene mutations in cases of non-obstructed azoospermia. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:55-9.
  27. Ferlin A, Moro E, Garolla A, Foresta C. Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate gene DAZ, RBM and Dffry. *Hum Reprod* 1999; 14:1710-6.
  28. Fujisawa M, Shirakawa M, Kanzari M, Okada H. Y chromosome microdeletion and phenotype in cytogenetically normal men with idiopathic azoospermia. *Fert Steril* 2001; 76:491-5.
  29. Friel A, Houghton J, Smith T, Nolan S. Molecular detection of Y chromosome microdeletions: an Irish study. *Int J Androl* 1997; 24:31-6.
  30. Girardi SK, Mielnik A, Schlegel PN. Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum Reprod* 1997; 12:1635-41.
  31. Grimaldi P, Scarponi, Rossi P. analysis of Yq microdeletions in infertile males by PCR and DNA hybridization techniques. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:1116-21.
  32. Kleiman SE, Yogev L, Gamzu R. Genetic evaluation of infertile men. *Hum Reprod* 1999; 14:33-8.
  33. David P, Sherman S, Brown L. Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility. *Hum Reprod* 1999; 14:1722-6.
  34. Bourhis C, Siffroi J, McElreavey K, Pierre J. Y chromosome microdeletions and germinal mosaicism in infertile males. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:688-93.
  35. Krauz C, McElreavey K. Y Chromosomal microdeletions in infertile males. *Hum Reprod* 2001; 16:1306-7.
  36. Vries J, Hoffer M, Repping S, Hoovers J. reduced copy number of DAZ genes in subfertile and infertile men. *Fert Steril* 2002; 77:68-74.
  37. Dohle G, Halley D, Hemel J, Ouwel V. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod* 2002;17:13-6.
  38. Bor P, Hindkjaer J, Ingerslev H, Kolvra A. Multiplex PCR for screening of microdeletions on the Y chromosome. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18:291-7.
  39. Brandell R, Mielnick A, Liotta D, Ye Z, Veck L, Palermo G. AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: Preliminary report of a prognostic test. *Hum Rep* 1998; 13:2812-5.
  40. Henegariu O, Hirschamann P, Kilian K. Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnostic for deletions in AZF, a genetic Y factor expressed during spermatogenesis. *Andrology* 1993; 26:97-106.
  41. Kremer JA, Tuerlings J, Meuleman E. Microdeletions of the Y chromosome and cytoplasmic sperm injection: from gene to clinic. *Hum Reprod* 1997;12:687-91.
  42. Mulhall J, Burgess C, Cunningham D, Carson R, Harris D, Oate R. Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with nonobstructive azoospermia: prevalence and predictive factors. *Urology* 1997; 49:91-6.
  43. Silber S, Alagappan R, Brown L, Page D. Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1998;332-7.
  44. Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Wan Der Veen F, et al. Recombination between palindromes P%-P1 on human y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet* 2002; 711:906-22.
  45. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown L, et al. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nature Genet* 2001;29:279-86.
  46. Skaletsky L, Kuroda-Kawaguchi T, Minx P, Cordum H. The male specific region of the human Y chromosome is mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003;423:825-37.
  47. Cooke HJ. A murine homologue of the human DAZ gene is autosomal and expressed only in male and female gonads. *Hum Mol Genet* 1996;5: 513-6.
  48. Kamischke A, Gromoll J, Simoni M, Behre HM. Transmission of a Y Chromosomal deletions involving the deleted in azoospermia (DAZ) and chromodomain (CDY1) Genes from father to son through intracytoplasmic sperm injection: Case report *Hum Reprod* 1999;14: 2330-2.
  49. Lee JH, Lee DR, Yoon SJ, Chai YG, Roh SI, Yoon HS. Expression of DAZ (deleted in azoospermia), DAZL1 (DAZ-like) and protamine-2 in testis and its application for diagnosis of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 827-34.
  50. Shan ZA. SPGY copy homologous to the mouse gene Dazla and the Drosophila gene boule is autosomal and expressed only in the human male gonad. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 2005-11.
  51. Palermo G, Joris J, Devroey P. Pregnancies after intracytoplasmic injection for azoospermic men. *Hum Reprod* 1992;14:741-8.
  52. Van Steirteghem A, Nagy Z, Liu J, Staessen C. et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993;8:1061-6.
  53. Carslen E, Giwercman A, Keiding N, Shakkebaek N. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992; 305:609-13.
  54. Auger J, Kunstmann J, Czyglik J. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 1995;332:281-5.
  55. De Mouzon J, Spira A, Thonneau P, Multigner L. Declining sperm count. *BMJ* 1996; 313:343.
  56. Moller H, Skakkebaek N. Risk of testicular cancer in subfertile men: case control study. *BMJ* 1999;318:559-62.
  57. Bonde J, Erns E, Jense T. Relation between semen quality and fertility: a population based study of 430 first pregnancy planners. *Lancet* 1998; 352: 1172-7.