



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

MICRODELECCIONES EN LAS REGIONES AZF DEL
CROMOSOMA "Y" EN PACIENTES MEXICANOS
AZOOSPERMICOS Y OLIGOZOOSPERMICOS SEVEROS.

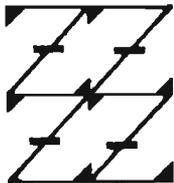
T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIATURA DE LA CARRERA DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO

PRESENTA:

JOSE ISRAEL PONCE MONDRAGON

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN

ENERO 2005

m 342822



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



MICRODELECCIONES EN LAS REGIONES AZF DEL CROMOSOMA "Y" EN
PACIENTES MEXICANOS AZOOSPÉRMICOS Y OLIGOZOOSPÉRMICOS
SEVEROS.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

PRESENTA

JOSE ISRAEL PONCE MONDRAGÓN.

DIRIGIDO POR:

D. en C. HAYDEÉ ROSAS VARGAS

SINODALES

PRESIDENTE Q.B.P. GUSTAVO MIRANDA CONTRERAS

VOCAL D. en C. HAYDEÉ ROSAS VARGAS

SECRETARIO Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ

SUPLENTE M. en C. RAQUEL RETANA UGALDE

SUPLENTE Q.F.B. FRANCISCO JAVIER PARADA GARCÍA

DEDICATORIAS.

GRACIAS A MIS PADRES

Que me han brindado cuidados, amor y comprensión, quienes con sus sabios consejos orientaron mis pasos sin condiciones ni medida. Gracias por guiarme sobre el camino correcto de la vida. Creo ahora entender porque me obligaban a terminar mi tarea antes de salir a jugar, y muchas cosas más que no terminaría de mencionar.

A MI ADORADA ESPOSA MARISOL

Por su gran amor, comprensión y apoyo incondicional que me permite sentir poder lograr lo que me proponga. Gracias por escucharme y por tus consejos. Gracias por ser parte de mi vida.

A MI HIJO IVAN EMILIANO

A quien amo y es el motivo de mi superación día a día. Espero que este trabajo sea un ejemplo para su superación personal en la vida.

A PATY Y ASael, MIS HERMANOS

Por su gran amor comprensión y apoyo incondicional, además de ser mis mejores amigos y por ser la mejor compañía para compartir el mismo techo durante mucho tiempo.

A TODAS LAS PERSONAS A QUIEN ESTIMO

A todas las personas a quien estimo, que para nombrarlas necesitaría hacer otra tesis, a todos mis tíos, primos, cuñados, a mis suegros y a todos mis compañeros y amigos, a todos gracias.

AGRADECIMIENTOS

A LA DRA. HAYDEÉ ROSAS. DIRECTORA DE MI TESIS

Por compartirme parte de su espacio, parte de su conocimiento y dirigir de una manera incomparable éste proyecto. Gracias al invaluable y generoso apoyo e interés para la realización del mismo, así como por haberme hecho sentir en todo momento en casa con su sencillez y generosidad. Gracias

A LA DRA. ROSARIO TAPIA

Gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar y al mismo tiempo de realizar éste trabajo, además de asesorarme en la realización del mismo. Sin su contribución no habría sido posible llevarlo a cabo. Gracias.

AL JURADO DE SINODALES.

Gracias a mis sinodales, Gustavo Miranda Contreras, Roberto Cruz González Meléndez, Raquel Retana Ugalde y Francisco Javier Parada García, que con sus consejos, paciencia, conocimiento y opiniones hicieron posible la conclusión del proyecto de investigación. Además de ser parte de mi formación profesional.

A LA UIMGH, HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO MÉDICO SIGLO XXI, IMSS.

A los doctores, Ramón Coral, Areli Márquez, Ana Claudia Velásquez, Adrian, Manuel, Omar, José Luis, Israel, Javier y a todos los que laboran en esta Unidad de Investigación gracias por compartir conmigo su espacio y conocimientos de una manera incondicional.

A JULIA

Primero mi Maestra, amiga y después mi Jefa, gracias por todo el apoyo brindado incondicionalmente durante todo el tiempo que realice mi tesis. Gracias.

A TODOS MIS PROFESORES DE LA CARRERA.

Que participaron en mi desarrollo profesional durante mi carrera, sin su ayuda y conocimientos no estaría en donde me encuentro ahora.

INDICE

	PAGINA
GLOSARIO	1
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO	6
La infertilidad masculina	6
Microdeleciones en el cromosoma Y	7
Región AZFa	11
Región AZFb	12
Región AZFc	14
Importancia clínica de las microdeleciones	15
Epidemiología y relación fenotipo-genotipo	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
Preguntas de Investigación	19
HIPOTESIS	20
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y METODOS	20
RESULTADOS	24
DISCUSION	29
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFIA	33
ANEXOS	38

TABLAS

No.	TABLA	PAGINA
1	Comparación de las características de los genes AZF-candidatos	12
2	Reacciones pentaplex para AZF	23
3	Alteraciones de pacientes con microdeleciones en AZFa y AZFb	25

FIGURAS

No.	FIGURA	PAGINA
1	Representación esquemática del cromosoma Y	8
2	Representación esquemática del cromosoma Y por bandeo	9
3	Región AZFa de humano y el intervalo Sxrb de ratón	11
4	Estructura del gene RBMY1	13
5	Estructura del gene DAZ	15
6	Diagrama de flujo	22
7	Paciente con deleción en AZFb	26
8	Pacientes con deleción en AZFb y AZFc respectivamente	27
9	Paciente con deleción en AZFc	27
10	Pacientes con deleción en AZFc	28

Glosario.

ADN: Abreviatura de ácido desoxirribonucleico (en inglés deoxyribonucleic acid o DNA). Es la molécula que contiene y transmite la información genética de los organismos. Está formada por dos cadenas complementarias de nucleótidos que se enrollan entre sí formando una doble hélice que se mantiene unida por enlaces de hidrógeno entre bases complementarias. Los cuatro nucleótidos que forman el ADN contienen las bases adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Dado que en el ADN la adenina se empareja sólo con la timina y la citosina sólo con la guanina, cada cadena del ADN puede ser empleada como molde para fabricar su complementaria.

ARN: Molécula formada por un poli-ribonucleótido de longitud variable que contiene Uracilo en vez de Timina. Hay tres tipos: ARN mensajero (ARNm), ARN ribosomal (ARNr) y ARN transferente (ARNt).

Cariotipo: Dotación cromosómica completa de un individuo o una especie, que puede observarse durante la mitosis. El término también se refiere a la presentación gráfica de los cromosomas, ordenados en pares de homólogos y que se puede describir conforme a una nomenclatura convencional.

Célula: unidad estructural y funcional de los seres vivos, generalmente microscópica, con un solo núcleo en el citoplasma. Está aislada del medio externo por la membrana celular.

Centrómero: Región del cromosoma que separa los dos brazos y en la que se unen las dos cromátidas. Es la región de unión a las fibras del huso acromático durante la división celular.

Contig: contigüidad entre 2 secuencias de ADN, creada por ensamblaje de fragmentos cromosómicos vecinos (natural o artificial, como es el caso de los BACs o YACs).

Cromatina: Material formado por ácidos nucleicos y proteínas que se observa en el núcleo de la célula en interface.

Cromosoma: Estructura filamentosa autorreplicativa constituida por cromatina.

Deleción o eliminación: Pérdida de material genético de un cromosoma que puede ir desde la pérdida de un solo nucleotido (deleción puntual) hasta la pérdida de grandes regiones visibles citogenéticamente.

De novo: Literalmente "*de nueva procedencia*", para referirse a algo no heredado.

Dominio: Segmento de un polipéptido o de ADN que tiene propiedades específicas conocidas.

Electroforesis: Es la técnica por la cual mezclas complejas de moléculas como proteínas, ADN o ARN se separan en un campo eléctrico de acuerdo al tamaño y a su carga eléctrica. La electricidad empuja las moléculas a través de los poros de un gel, que es una sustancia firme como la gelatina.

Euromatina: Es la cromatina genéticamente activa, desenrollada en interfase y que se tiñe más intensamente durante la mitosis en la cual adquiere un estado condensado en forma de hélice.

Exón: Porción de una molécula de ADN, que produce aquellas partes del ARN precursor que no son eliminadas durante la transcripción, forman el ARN mensajero y por tanto especifican la estructura primaria del producto de los genes.

Fenotipo: Conjunto de características observables de un organismo o grupo, fruto de la interacción entre su genotipo y el ambiente en que éste se expresa.

FSH: Hormona Folículo Estimulante.

Gen: Unidad de herencia que ocupa una posición concreta en el genoma (locus) y está constituido por una secuencia de ADN que codifica un ARN funcional.

Gen candidato: Gen al que se hace responsable de una enfermedad, tanto por la posición que ocupa en el mapa genómico (candidato posicional) como por las propiedades de la proteína que codifica (candidato funcional).

Genotipo: Conjunto de los alelos de un individuo en uno, varios o todos sus loci.

Heterocromatina: Cromatina transcripcionalmente inactiva que muestra alta condensación durante la interfase y se replica al final de la fase S del ciclo celular (heterocromatina constitutiva). La heterocromatina facultativa está constituida por euromatina que adquiere las características de la heterocromatina en determinados estadios del desarrollo.

Hibridación in situ fluorescente (FISH): Técnica usada para localizar una sonda marcada en una región cromosómica, haciéndola hibridar con el ADN de una preparación de células en interfase o en mitosis.

Mapeo: Término que designa colectivamente los distintos procedimientos (tanto genéticos como físicos) empleados en la construcción de mapas genéticos.

LH: Hormona luteinizante.

Oligonucleótido: Secuencia lineal de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, habitualmente no mayor de 50 nucleótidos.

PACs: Cromosomas artificiales de fagos.

Par de bases: Dos nucleótidos complementarios en una molécula de ADN bicatenario.

Polipéptido: Polímero formado por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

Primer o cebador: Pequeña cadena de nucleótidos a partir de la cual la ADN polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de ADN.

Proteína: Una molécula compuesta por una o más cadenas de aminoácidos. Las proteínas desempeñan una amplia gama de actividades vitales en la célula.

Seudogén: Gen inactivo (no produce un producto proteico) cuya secuencia tiene un alto grado de homología con otro gen funcional que está en un locus distinto. Un seudogén procesado es una copia de otro gen pero que carece de intrones, tiene una pequeña cadena de poliadeninas y está flanqueado por repeticiones cortas; se piensa que proviene de la integración en el genoma de ARN maduro retro transcrito.

STS: Acrónimo inglés de "Sequence-tagged site" (lugar con una secuencia marcada). Fragmento corto (200 a 500 pb) de ADN genómico cuya secuencia es conocida y su posición ha sido determinada en el mapa físico o genético. Esto permite que sean usados como marcadores genéticos en el desarrollo de mapas físicos del genoma humano Southern blot: Una técnica que se utiliza para identificar y localizar secuencias de ADN en una mezcla compleja y que son complementarias a otro fragmento de ADN llamado sonda.

YAC: Acrónimo inglés de "Yeast artificial chromosome" (Cromosoma artificial de levadura). Vector plasmídico de clonaje que contiene en su ADN las secuencias del centrómero, del telómero y la secuencia que controla la replicación autónoma del cromosoma, lo que posibilita el clonaje de fragmentos de hasta tres millones de bases de longitud

RESUMEN.

Las microdeleciones en las regiones AZFa-c ubicadas en el brazo largo del cromosoma Y son la causa de aproximadamente 10% al 20% de los casos de infertilidad idiopática masculina, particularmente en los pacientes con azoospermia u oligozoospermia severa. La detección de este tipo de mutaciones es sumamente importante en los candidatos a IVF e ICSI, ya que son mutaciones heredables a la descendencia masculina y por tanto causa de infertilidad en una siguiente generación. **Objetivo.** Determinar la existencia de microdeleciones de las regiones AZF del cromosoma Y en un grupo de pacientes mexicanos con azoospermia y oligozoospermia severa. **Material y Métodos.** Se seleccionó un grupo de 38 pacientes azoospermicos y 12 oligozoospermicos de etiología desconocida. Previo consentimiento informado, se aisló DNA genómico a partir de leucocitos de sangre periférica. El tamizaje de microdeleciones en Y se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR de STS ubicados en las regiones AZF en dos reacciones pentaplex confirmatorias. Los productos de PCR se tipificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. **Resultados.** Del grupo de 50 pacientes analizados, 7 (14%) presentan deleciones en las regiones AZF, de los cuales 5 casos (10%) presentaron deleción de la región AZFc y 2 (4%) en la región AZFb. No se encontraron deleciones en AZFa. **Conclusión.** La incidencia de microdeleciones en pacientes mexicanos con problemas de fertilidad fue de un 14%, presentándose una mayor incidencia en la región AZFc, seguida por la región AZFb, lo cual produce diversas testiculopatias.

INTRODUCCION.

Estudios poblacionales indican que aproximadamente un 15% de las parejas son infértiles, diagnosticándose un factor masculino en un 40% - 50% de los casos. Aunque se observe a partir de este dato que la infertilidad masculina es un problema común, poco se conoce acerca de los posibles factores genéticos que puedan dar lugar a este tipo de patología, salvo en casos asociados a deleciones en el cromosoma Y.

La asociación inicial entre las deleciones del brazo largo del cromosoma Y (Yq) y la infertilidad, fue descubierta mediante la detección de grandes deleciones en cariotipos de hombres con azoospermia por Tiepolo & Zuffardi postulando la existencia de un "factor", localizado en el cromosoma Y, necesario para una espermatogénesis normal. Esta hipótesis recibió un gran soporte experimental y recientemente, con el desarrollo de sitios de secuencia específicos (STS) permitieron la detección de deleciones submicroscópicas no detectables con el análisis citogenético y detectables solo por STS-PCR.

El análisis de microdeleciones del cromosoma Y se ha convertido hoy en día en una herramienta muy importante para el diagnóstico de pacientes infértiles que pretenden someterse a técnicas de reproducción asistida. Este tipo de pruebas empezó a realizarse relativamente hasta hace poco tiempo.

MARCO TEORICO.

LA INFERTILIDAD MASCULINA.

La infertilidad, definida como la incapacidad de concebir después de un año de relaciones sexuales regulares y sin medidas anticonceptivas con la misma pareja⁽¹⁾, es uno de los problemas que afecta alrededor del 15% de los matrimonios. En términos generales la incidencia de infertilidad por factor masculino es de alrededor de un 30 % como factor único, y de 20 % más formando parte de los casos de patología múltiple, por lo que aproximadamente en el 50 % de los casos el hombre es parcialmente responsable de la esterilidad en la pareja. ⁽²⁾ En México alrededor de 600,000 parejas son infértiles, 50% es por causa femenina, 40% por causa masculina y mixta en el 10 %. ⁽³⁾

La etiología de la infertilidad masculina, puede asociarse a padecimientos del eje hipotálamo-hipófisis-testículo y otras endocrinopatías, así como a factores que modifican ampliamente la espermatogénesis (criptorquidia, varicocele, traumatismo testicular y factores ambientales dependientes como el calor). También se asocian a patologías que afectan el transporte de los espermatozoides a través de los conductos sexuales masculinos y otros factores que modifican la conducta sexual (impotencia, disfunción eyaculatoria), y a algunas malformaciones u obstrucciones (hipospadias, ausencia u obstrucción epididimaria, ausencia uni o bilateral de los conductos deferentes), además de padecimientos infecciosos del tracto génito-urinario ⁽³⁻⁴⁾. Otras causas pueden ser farmacológicas o tóxicas. También existen causas generales: las más importantes son las inmunológicas, incluye la orquitis autoinmune, las causas de origen genético, como el síndrome de Klinefelter, síndrome de Down, anorquidia, aplasia de células germinales y el síndrome de células de Sertoli. Por último las de etiología desconocida que incluye los sujetos infértiles en los que es imposible precisar algún factor que justifique la existencia del padecimiento, también conocidos como idiopáticos. ⁽³⁾

Estudios recientes indican que la infertilidad idiopática se debe a causas genéticas ligadas al cromosoma Y, presentándose principalmente en pacientes azoospermicos y oligozoospermicos severos.^(5,6) Dichos estudios han llevado al conocimiento preciso de las zonas del cromosoma Y vitales para el desarrollo anatómico y funcional testicular, en las cuales están ubicados los genes que codifican para factores de transcripción determinantes del desarrollo testicular ZFY (dedos de zinc del cromosoma Y) y SRY (región determinante del sexo en el cromosoma Y), mismos que se expresan durante el desarrollo embrionario.^(7,8) Además de otros genes que codifican para factores de transcripción determinantes para la espermatogénesis.

La espermatogénesis es el proceso de desarrollo y maduración de las células germinales dentro de los túbulos seminíferos hasta obtener espermatozoides maduros; proceso continuo que se lleva a cabo en un promedio de 74 días para la transformación de espermatogonias indiferenciadas a espermatozoides y que requiere la acción de varias hormonas tales como la hormona folículo-estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y la testosterona entre otras; las cuales actúan sobre las células germinales y las células de Sertoli,^(9, 10) por la existencia de una comunicación estrecha entre estas.

Desde el punto de vista clínico, los valores hormonales y volúmenes testiculares en pacientes con deleciones en Y indican severas testiculopatías involucrando solo el sistema espermatogénico. De hecho, los testículos están generalmente reducidos en tamaño cuando las concentraciones de FSH son altas, aún cuando los niveles plasmáticos de testosterona y LH están dentro de lo normal. La mayor parte de los estudios no reportan diferencias significativas en volúmenes testiculares y niveles de FSH entre pacientes afectados por testiculopatías severas con o sin deleciones en Y. Sin embargo, existen estudios que muestran lo contrario, asociando las deleciones en el cromosoma Y con niveles más altos⁽¹¹⁾ y más bajos⁽¹²⁾ de FSH respectivamente por lo que existe controversia al respecto^(11,12). Si realmente existe una diferencia en concentraciones hormonales entre pacientes con deleciones en Y y con pacientes sin deleciones, serían necesarios más estudios para entender los mecanismos responsables de dichas diferencias.

MICRODELECCIONES EN EL CROMOSOMA Y.

Todas las células humanas, excepto los eritrocitos, poseen un núcleo en el cual contienen el material genético (DNA). La mayor parte del material contenido en el núcleo está constituido por cromatina, que consta de DNA y proteínas. Se pueden reconocer dos estados fundamentales de la cromatina, la heterocromatina y la eucromatina, cuya distribución presenta gran dinamismo. La heterocromatina se observa al microscopio como regiones altamente densas y muy teñidas, en estas zonas la cromatina se encuentra altamente condensada, y no presenta actividad transcripcional (no expresa los genes localizados en esos sectores), por lo que se le denomina cromatina afuncional. La eucromatina se observa como regiones menos densas y teñidas, aquí la cromatina se encuentra mucho menos condensada, haciendo posible que ocurra la transcripción de los genes contenidos en esos sectores. El DNA en el núcleo de las células humanas se encuentra arreglado en 46 cromosomas y agrupados en 23 pares, 22 pares de cromosomas autosómicos y 1 par de cromosomas sexuales XX en las mujeres y XY en los hombres. El cromosoma Y consiste de un brazo corto (Yp) y un brazo largo (Yq). Las regiones pseudoautosómicas (PARs), las cuales se aparean con las del cromosoma X durante la meiosis, se localizan a ambos extremos. La región fuera de las PARs, que no es

recombinante se llama región no recombinante del cromosoma Y (NRY). Esta parte consiste de varias secuencias repetidas que pueden ser homólogas a regiones en el cromosoma X o específicas de Y. El Yp y la parte proximal de Yq se encuentran constituidos por eucromatina, mientras la parte distal del brazo largo contiene heterocromatina, y esta región puede variar en longitud constituyendo aproximadamente la mitad o 2/3 partes de Yq (figura 1).

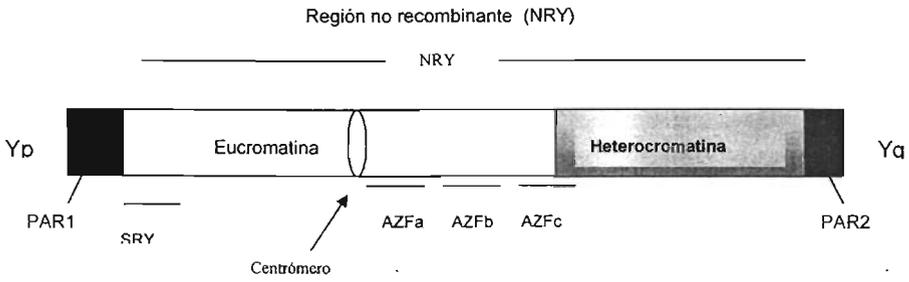


Figura 1. Representación esquemática del cromosoma Y.

El brazo largo del cromosoma Y puede ser dividido citogenéticamente en una región proximal eucromática (Yq11, subdividida en Yq11.1, 11.21, 11.22 y 11.23) y una región distal heterocromática (Yq12), (figura 2a). El mapa de Vergnaud⁽¹³⁾, basándose en el mapeo por hibridación de DNA, divide al cromosoma Y en siete intervalos (figura 2b); el brazo corto y el centrómero contiene los intervalos 1-4, del distal al proximal; la parte eucromática de Yq se representa por los intervalos 5 y 6, proximal a distal; la región heterocromática es definida como el intervalo 7. Sobre estas bases Vollrath⁽¹⁴⁾ más adelante dividió el mapa de siete intervalos en 43 subintervalos, y éste es el mapa usado más comúnmente (figura 2c).

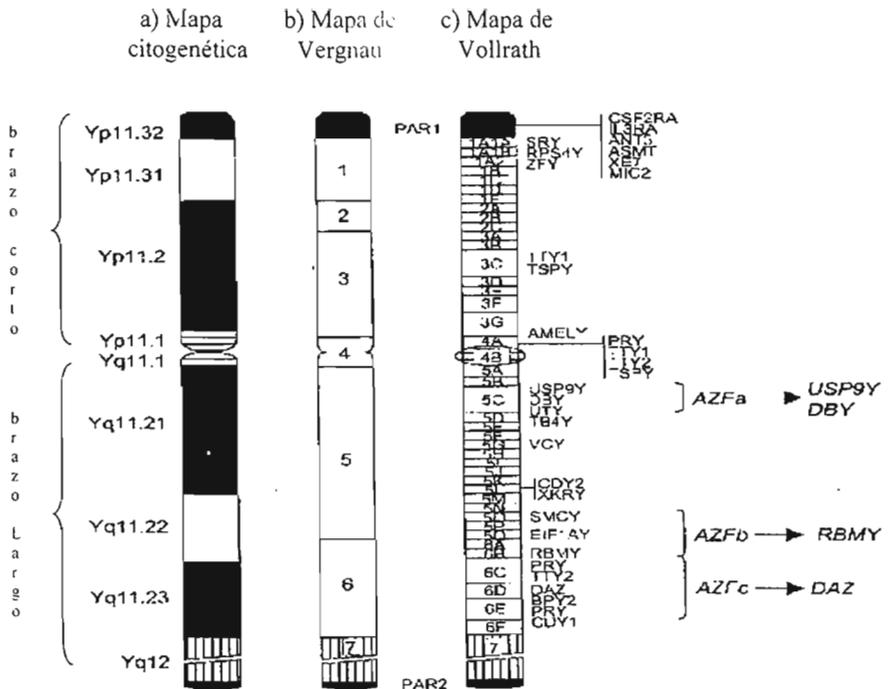


Figura 2. Representación esquemática del cromosoma Y. a) Bando cromosómico por tinción de Giemsa. b) los siete intervalos del mapa de Vergnaud del cromosoma Y. c) el mapa de 43 intervalos del cromosoma Y. A la derecha están representados la lista de genes mapeados en el cromosoma Y, la localización de las regiones AZF y los correspondientes genes candidatos.⁽¹⁴⁾

Se han encontrado más de 300 sitios de secuencia específicos (STSs). Los STSs son secuencias conocidas de DNA genómico que pueden ser amplificadas por PCR. Estos STSs pueden ser específicos de un gene o pueden abarcar regiones anónimas de los cromosomas, y se usan para buscar deleciones.

Muchos genes del cromosoma Y han sido identificados recientemente. Yen⁽¹⁵⁾, clasificó estos genes en tres grupos sobre las bases de su localización en el cromosoma Y, en su número de copias y en su patrón de expresión:

- 1) Genes pseudoautosómicos, tales como ASMTL, MIC2 y IL9R, sus secuencias son idénticas en los cromosomas Y y X, con pocas excepciones, se expresan en diferentes tejidos.

- 2) Genes localizados dentro de regiones homólogas de X-Y en la NRY (como USP9Y, DBY y UTY): estos tienen homologías en la codificación de proteínas del cromosoma X con una alta identidad de aminoácidos. Estos genes se expresan ubicuamente, lo que incluye su expresión en testículo.
- 3) Familias de genes específicas de Y (como DAZ, CDY y TSPY): estos son multicopias de genes, distribuidos ampliamente sobre el cromosoma Y o en grupos dentro de una región pequeña, y que se expresan solamente en los testículos. Una excepción a esta clasificación es el SRY, el gene que determina el desarrollo testicular; es específico de Y, se encuentra en una sola copia y tiene un patrón diferente de expresión, limitado a la cresta genital-fetal y a células de Sertoli en adultos y células germinales.^{13,14}

La asociación inicial entre las deleciones del brazo largo del cromosoma Y (Yq) y la infertilidad, fue descubierta mediante la detección de grandes deleciones en cariotipos de hombres con azoospermia por Tiepolo & Zuffardi⁽¹⁶⁾. En este primer estudio se examinó el cariotipo de 1,170 hombres con problemas de fertilidad en quienes se identificaron grandes deleciones de la parte adyacente eucromática (Yq11) e incluso de la región heterocromática entera (Yq12) y postularon la existencia de un "factor", localizado en el cromosoma Y, necesario para una espermatogénesis normal (figura 2). En dos casos demostraron que los padres de los pacientes con deleciones tienen un cromosoma Y normal, indicando que estas mutaciones ocurrieron *de novo*. Más tarde este factor fue nombrado *Factor de Azoospermia* (AZF). Esta hipótesis recibió un gran soporte experimental y recientemente, con el desarrollo de sitios de secuencia específicos (STS) y utilizando cromosomas artificiales de levadura (YACs), permitieron la detección de deleciones submicroscópicas intersticiales no visibles con el análisis citogenético y detectables solo por STS-PCR o por hibridación por Southern-blot. Tales deleciones fueron llamadas microdeleciones.⁽¹⁷⁾

Reijo y colaboradores en 1996 demostraron que estas microdeleciones también están presentes en el cromosoma Y de hombres oligozoospermicos, e identificaron el gene DAZ (*Deleted in Azoospermia*), el cual es necesario para que se lleve a cabo una función testicular normal⁽¹⁸⁾.

Más tarde Vogt y cols. definieron tres subregiones, AZFa, b y c (figuras 1 y 2). AZFa está localizada en la porción proximal del intervalo 5 (subintervalo 5C), AZFb se expande de la porción distal del intervalo 5 a la porción final proximal del intervalo 6 (subintervalos 5O-6B), y AZFc se localiza en la parte distal del intervalo 6 (subintervalos 6C-6E)⁽¹⁹⁾. Varios genes localizados en las regiones AZF se expresan en los testículos y pueden, por lo tanto, ser vistos como genes candidatos para participar en la espermatogénesis. De cualquier manera, solamente unos pocos genes pueden actualmente ser considerados responsables para el fenotipo AZF. El primer gene candidato fue aislado en 1993 de una región que corresponde a AZFb denominado RBMY. Dos años más tarde el segundo gene candidato fue aislado de la región AZFc y fue denominado

como DAZ (ausente en azoospermia). Ambos genes han sido bien estudiados a nivel molecular y en términos de deleciones en pacientes infértiles⁽²⁰⁾.

AZFa.

Los datos más recientes sugieren que esta región contiene tres genes, los cuales pudieran ser los responsables para el fenotipo de infertilidad asociado a AZFa, debido a que en pacientes con deleción en AZFa les causa un daño espermatogénico severo, similar a lo que le pasa a ratones con deleción en el intervalo Δ Sxr^b del brazo corto del cromosoma Y⁽²¹⁾, debido a la homología con la región AZFa de humano (Fig. 3).

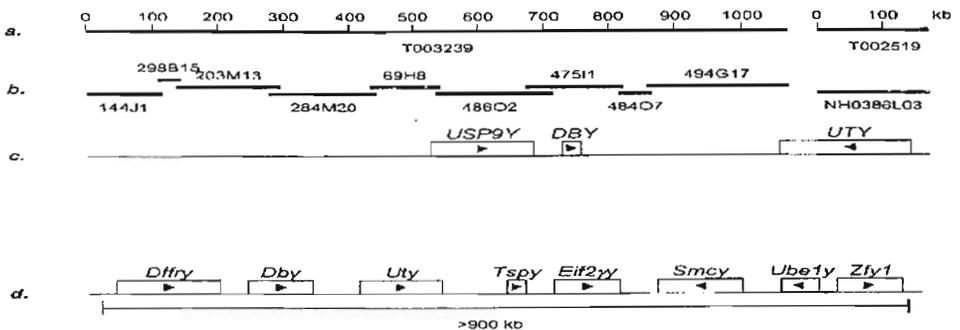


Figura 3. La región AZFa de humano (c) y el intervalo Sxr b de ratón (d). a) La región AZFa está incluida en 2 segmentos del cromosoma Y no-sobrepuestos, conteniendo más de 1.2Mb. b) Diez clones de YACs y PACs sobrepuestos cubren la región AZFa. c) Localización de los tres genes en AZFa de humano, USP9Y, DBY, y UTY, con respecto a los clones. Las flechas indican la orientación 5' - 3' de los genes. Note que el UTY no se incluye completamente en la secuencia de los clones y no obstante la estructura genómica completa de este gene es aún desconocida. d) Mapa de transcripción del intervalo Sxr b de ratón (más de 900 kb), mostrando la homología con el intervalo AZFa del humano: El número que esta debajo de los clones y los segmentos representan los números de acceso al banco de genes.⁽⁴⁶⁾

El primer gene que se identificó en AZFa fue el gene homólogo a DFFRY (*Drosophila fat facets related Y*)⁽²²⁾, el cual se renombró a USP9Y (ubiquitin-specific proteasa 9, Y chromosome), demostrando que está ausente en pacientes infértiles. Este gene difiere substancialmente de otros genes que se consideran candidatos para AZF como lo son el gene DAZ y el gene RBMY; ya que el USP9Y no codifica para una proteína de unión a ARN. Al parecer funciona como una ubiquitina hidrolasa C-terminal, además de que tiene un gene homólogo en X el cual se expresa ubícuamente en un amplio rango de tejidos, en lugar de ser específico de testículo^(22,23) (Tabla 1). El USP9Y ocupa menos de la mitad del intervalo AZFa⁽²⁴⁾, y la mayoría de los hombres infértiles con deleción en AZFa muestran la ausencia total del intervalo que comprende a USP9Y, lo cual hace suponer que otros genes en AZFa, solos o en combinación

con USP9Y, pueden ser los responsables del daño espermatogénico observado en pacientes con deleción en AZFa. Dichos genes tienen homólogos en X y son el gene DBY (dead box on the Y), el gene UTY (ubiquitous TPR motif on Y)^(21,23,24) y una nueva secuencia llamada AZFaT1⁽²⁴⁾. Estudios sobre pacientes con deleciones claramente limitadas a AZFa sugieren que la ausencia de USP9Y, AZRaT1 o ambas causa infertilidad masculina y que la pérdida adicional de DBY puede hacer empeorar el fenotipo⁽²⁴⁾.

Aunque el gene DBY se expresa ubícuamente y se encuentra más frecuentemente delecionado que USP9Y, su rol en la espermatogénesis humana es hasta ahora desconocido, aunque la homología de éste con la proteína PL10 de ratón, la cual es específica de testículos y se expresa solamente en células germinales, hace pensar que tiene una significativa importancia en la espermatogénesis humana⁽²⁵⁾.

Tabla 1. Comparación de las características de los genes AZF-candidatos, DAZ, RBMY, USP9Y, y DBY⁽⁴⁸⁾

	DAZ	RBMY	USP9Y	DBY
Localización	Yq (AZFc)	Yp y Yq	Yq (AZFa)	Yq (AZFa)
Organización de los genes	Familia de genes (agrupados)	Copias funcionales en AZFb Familia de genes (20-50 genes y pseudogenes, organizados al menos en 6 subfamilias)	Simple gene	Simple Gene
Estructura de los genes	16 Exones (incluyendo múltiples copias del exón 7) DAZ repetidos (cada uno de 72 pb) en número y orden variables	12 Exones Cajas SRGY (cada una de 111 pb)	46 exones	17 exones
Expresión	Testículo-específica (células germinales)	Testículo-específica (espermatoгония, espermatoцитos, espermátides)	Ubícuamente	Ubícuamente y transcripciones testículo-específicas
Proteínas	De unión a ARN	De unión a ARN	Ubiquitin hidrolasa del antígeno H-Y	Helicasa- ARN

AZFb

La región AZFb abarca aproximadamente los subintervalos 5M-6B, sin embargo los límites precisos varían entre diferentes sujetos y de acuerdo a la metodología utilizada; así, podemos encontrar microdeleciones que pueden remover partes de AZFb, incluir una parte de la región AZFc e incluso remover a AZFb por completo, de tal forma que la extensión de la deleción afectará debido a que se pueden remover uno o varios genes dependiendo del tamaño de la deleción.

Dos genes han sido identificados en los subintervalos 6O-6E, el gene EIF1AY (factor de iniciación-traducción isoforma 1A en el cromosoma Y) y el gene RBMY (motivo de unión al ARN en el cromosoma Y). El EIF1AY codifica un factor de iniciación de la traducción esencial y su rol en la espermatogénesis es

completamente desconocido, ya que no se han reportado microdeleciones que remuevan específicamente a este gene, sin embargo debido a su expresión ubicua hace suponer que por sí mismo puede contribuir al fenotipo AZFb⁽²⁶⁾.

La familia del gene RBMY1 puede representar el fenotipo AZFb, lo cual se sustenta por su expresión específica de células germinales y su homología con el gene Rbm de ratón (figura 4) cuya mutación causa detención en la maduración espermática⁽²⁶⁾. Las proteínas del RBMY (figura 4) contienen un dominio de unión al ARN del tipo RRM (motivo de reconocimiento de ARN), así como diversos dominios SRGY, denominados así por la presencia de serina-arginina-glicina-tirosina en su secuencia^(27,28).

Sin embargo, se han encontrado deleciones en AZFb que no remueven éste gene,^(29,30,31) lo cual hace pensar la participación de otros genes tales como el gene SMCY, y el ya mencionado EIF1AY, aunque su rol en el proceso de la espermatogénesis es desconocido⁽³²⁾.

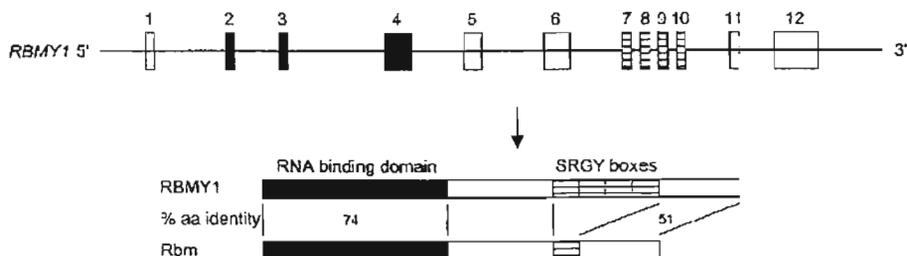


Fig. 4. Estructura genómica del gene RBMY1 y proteínas relacionadas. Los exones 2-4 (negro) codifican un dominio de unión a RNA, cada uno de los exones 7-10 (111 bp) codifica para una sola caja SRGY de 37aa. La identidad del aminoácido entre RBMY1 y el Rbm de ratón se muestra en la parte de debajo de la figura.⁽⁴⁶⁾

AZFc

En un intento por correlacionar defectos espermatogénicos severos con la frecuencia y consistencia de microdeleciones ocurridas de novo en el cromosoma Y, Reijo y colaboradores⁽³³⁾ identificaron y clonaron un nuevo gene de la región AZFc (porción distal del intervalo 6), mostrando que está ausente en hombres con azoospermia. Este gene fue nombrado DAZ (ausente en azoospermia) el cual se pensaba que era una sola copia, sin embargo ahora esta claro que este es un miembro de una familia de multigenes con más de una copia en el cromosoma Y, agrupados en la región AZFc⁽³⁴⁻³⁶⁾, por lo que fue renombrado como la familia del gene DAZ. El número exacto de genes en la familia es aún desconocido, aunque al menos tres copias han sido identificadas por Southern Blot y por mapeo de restricción^(36,37); y siete copias pudieron observarse por hibridación fluorescente in situ (FISH)⁽³⁸⁾ las cuales representan ya sea genes activos o pseudogenes.

La estructura del gene DAZ es algo similar a la del RBMY (figura 5). El gene DAZ codifica una proteína con un solo dominio de unión al RNA conteniendo una secuencia repetida internamente de 24 aa. El transcrito del gene DAZ al parecer contiene al menos 16 exones y su tamaño aproximado es de 42 Kb.⁽³⁹⁾

Como el RBMY, el DAZ se transcribe y traduce solamente en células germinales masculinas^(40,41), aunque existen discrepancias entre los resultados del grupo de Page⁽⁴⁰⁾ (expresión principalmente en espermatogonias) y del grupo de Vogt (detección de proteínas DAZ en espermátidas tardías y en la cola del espermatozoide)⁽⁴²⁾.

Aunque el gene DAZ no es el único gene presente en AZFc (Yq distal, intervalo 6), su alta prevalencia de deleciones en hombres infértiles lo hace el mejor candidato para AZFc. Esto se refuerza por la alta homología del DAZ con un gene de infertilidad masculina de *Drosophila* cuya mutación causa detención en la maduración espermática.^(43,44)

Diferentes genes al DAZ han sido encontrados en esta región⁽⁴⁵⁾: CDY1(cromodominio Y1), BPY2(proteína básica Y2), PRY(PTA-BL relacionado a Y), y TTY2(transcripción en testículos Y2), son algunos de éstos genes, aunque la función de éstos es desconocida. Estos genes comparten características similares: tienen múltiples copias en el cromosoma Y, solamente se expresan en testículos, y son específicas de Y⁽⁴⁵⁾. En particular, dos genes PRY y TTY2 se han identificado en la parte proximal de AZFc por mapeo de restricción, y probablemente no están involucrados en la disrupción espermatogénica observada en pacientes con deleción limitada a DAZ. CDY1 puede ser considerado un gene candidato de AZFc, pero las deleciones que remueven éste gene, específicamente deberán ser identificadas en pacientes para confirmar ésta hipótesis.

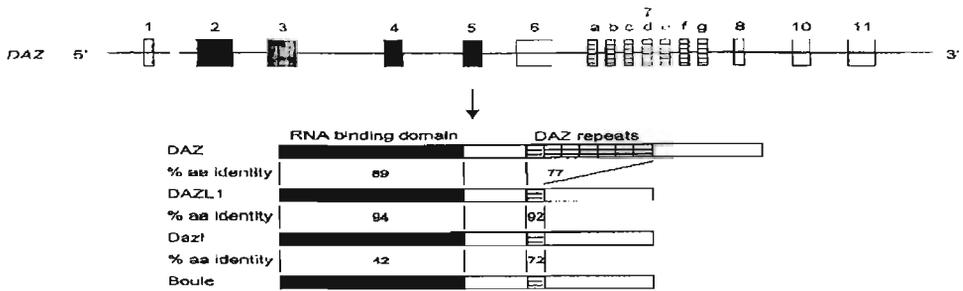


Fig. 5. Estructura genómica del gene DAZ y proteínas relacionadas. Los exones 2-5 codifican para una proteína con un dominio de unión al RNA, cada uno de los exones 7a-7g (72pb) codifican para un solo gene DAZ repetido de 24 aa (rayado). La identidad en el nivel del aminoácido entre el DAZ, el DAZL1 autosómico de humano, el Dazl de ratón, y el de *Drosophila boule* se muestra en la parte baja de la figura.⁽⁴⁶⁾

En la tabla 1 se describen las características de los genes candidatos para AZF de cada una de las regiones (AZFa, b, y c).

IMPORTANCIA CLÍNICA DE LAS MICRODELECCIONES DEL CROMOSOMA "Y".

El reciente progreso en biología molecular y el mapeo del cromosoma Y han permitido el análisis de microdelecciones en el cromosoma Y en pacientes infértiles como un estudio diagnóstico de rutina en países desarrollados.

El crecimiento explosivo de técnicas de reproducción asistida y, en particular, la inyección intracitoplasmática (ICSI) ha contribuido al desarrollo de tales investigaciones. El estudio de las microdelecciones en el cromosoma Y es particularmente importante debido a la potencial transmisión de anomalías genéticas a la progenie, ya que estas técnicas pasan por alto los mecanismos fisiológicos relacionados a la fertilización.

El ICSI consiste en la introducción de un espermatozoide dentro del oocito para lograr la fertilización y embarazo cuando el número de espermatozoides en el eyaculado es muy bajo o es nulo. En el último de los casos el ICSI puede realizarse usando espermatozoides obtenidos de epidídimo o extraídos directamente de tejido testicular. Al usar ICSI existe una mayor posibilidad de transmisión de anomalías genéticas a la progenie que con otras formas de reproducción asistida debido a que esto pasa por alto todos los mecanismos fisiológicos relacionados con la fertilización, lo cual necesita de espermatozoides con motilidad normal para que obtengan una capacitación normal, una reacción acrosomal normal y comenzar todos los mecanismos requeridos para la penetración del oocito.⁽⁴⁶⁾

Las microdelecciones también pueden transmitirse vía fertilización in vitro (FIV), ya que se ha demostrado que los espermatozoides de sujetos

oligozoospermicos, que tienen una deleción en Yq, pueden fertilizar oocitos in vitro⁽⁴⁷⁾, sugiriendo que los espermatozoides que tienen una deleción poseen todas las características requeridas para regular la capacitación, la reacción acrosomal, y la habilidad para penetrar y fertilizar el oocito.

Epidemiología y relación fenotipo-genotipo:

La relativa prevalencia de deleciones en las regiones AZFa, b, y c en hombres infértiles varían de acuerdo con los criterios utilizados por cada investigador, sin embargo las deleciones más frecuentemente encontradas involucran la región AZFc que incluye al gene DAZ en un 59.6% de los casos, las deleciones de la región AZFb incluyendo el gene RBMY en un 15.8%, son menos frecuentes, y sólo el 4.9% de los casos se relacionan con el intervalo AZFa. Las deleciones que involucran dos o tres regiones en AZF se observan en un 13.6% de los pacientes, mientras en un 6% de los casos las deleciones están localizadas en regiones no sobrepuestas en los intervalos AZF. Estos datos sugieren una mayor incidencia de deleciones en el gene DAZ con respecto a los otros genes candidatos para AZF⁽⁴⁶⁾.

Los fenotipos asociados con deleción son variados, y en general no hay una correlación clara entre la localización de las deleciones (AZFa, b o c) y el fenotipo clínico. Aunque se han reportado un estudio con diferentes fenotipos en asociación con cada una de las tres regiones delecionadas⁽⁴⁸⁾. La literatura muestra que las deleciones en AZFc pueden estar asociadas con azoospermia en un 54% de los casos y oligozoospermia severa en un 46%. La histología testicular puede variar de sólo-células de Sertoli a detención en la maduración espermática e incluso hipoespermatogénesis. Por lo tanto la ausencia del gene DAZ, aparentemente, es insuficiente para determinar la pérdida completa de la línea espermática, pero al parecer es suficiente para producir una reducción en el número de estas células o una alteración de sus procesos de maduración. Es posible que el daño testicular causado por deleciones en el DAZ sea progresivo y que pacientes oligozoospermicos con esta deleción puedan llegar a ser más tarde azoospermicos. Alternativamente, pequeñas diferencias en la extensión de las deleciones en DAZ aparentemente idénticas pueden explicar este fenotipo variable, pero ninguna de estas hipótesis han sido bien demostradas.

Las deleciones en AZFa y en AZFb causan azoospermia en dos terceras partes de todos los casos, más raramente oligozoospermia severa. De cualquier manera, el fenotipo asociado con tales deleciones, al parecer es más severa que las observadas en pacientes con deleciones en AZFc, aunque en algunos casos las deleciones en AZFb pueden estar asociados con oligozoospermia moderada. La histología testicular de pacientes con deleción en AZFa con azoospermia siempre muestran solo células de Sertoli, aunque en pacientes con oligozoospermia severa se ha observado hipoespermatogénesis. El análisis de la región AZFa muestra que la pérdida de DBY puede estar asociado con el síndrome de solo células de Sertoli e hipoespermatogénesis severa, sugiriendo

que este gene puede regular las primeras fases del proceso espermatogénico o la actividad del tallo celular^(48,49). Los pacientes con deleción en AZFb pueden tener más defectos variables, y en aproximadamente la mitad de los casos se observa arresto espermatogénico. Las variadas alteraciones espermatogénicas observadas en pacientes AZFb pueden indicar funciones múltiples de RBMY durante la espermatogénesis o, alternativamente, otros genes localizados en esta región pueden actuar en combinación a RBMY y que su presencia o ausencia modulan este fenotipo. Las variables fenotípicas observadas en pacientes con deleciones en AZFb y AZFc pueden explicarse por diferentes hipótesis:

1. Diferentes extensiones de la deleción: Las deleciones pueden remover completamente a AZFb o AZFc o pueden estar disminuidos, extendiendo, por ejemplo, solo un gene o clases de genes o pocos marcadores STS. Por lo que las grandes deleciones pueden estar asociadas con un fenotipo más severo.
2. El rol de genes homólogos y antecedentes genéticos: Cada uno de los genes candidatos para AZF tiene homólogos en el cromosoma X (DBX, USP9X, RBMX) o autosomas (DAZL1), como muchos otros genes tienen en el cromosoma Y (ej. , EIF1AY tiene un homólogo en el cromosoma X, y CDY tiene un homólogo en el cromosoma 6). Aunque no existe evidencia directa de un rol de estos genes en la espermatogénesis, su status puede modificar la expresión fenotípica de pacientes con deleción en Y. Esto es particularmente sugestivo para DAZL1/DAZ, ya que el DAZL1 se expresa exclusivamente en las gónadas y puede, por lo tanto, actuar sinérgicamente en combinación con el DAZ durante la espermatogénesis. Sin embargo, los antecedentes genéticos pueden modular el efecto fenotípico de una deleción dada, y la ausencia de un gene AZF puede ser compensada diferentemente por otros genes de la familia.
3. La progresión de la falla espermatogénica: Se ha sugerido que las microdeleciones en Yq pueden dar como resultado un empeoramiento progresivo de la producción de espermas⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾, y que hombres oligozoospermicos pueden resultar azoospermicos con el tiempo. Esta es una hipótesis intrigante que si se confirma tendrá consecuencias pronósticas y preventivas importantes, ya que la criopreservación de espermatozoides podría evitarse para técnicas tales como ICSI, en un futuro.

Del análisis de la literatura la única correlación clara que ha sido encontrada es con grandes deleciones que involucran más de un locus AZF. Estas deleciones están asociadas con el fenotipo más severo, y es ejemplificado por invariables resultados de azoospermia y solo células de Sertoli en pacientes con deleciones de AZFa-c. Tales deleciones probablemente muestran los efectos adicionales de cada gene.

Vogt y colaboradores en 1991 estudiaron a 401 pacientes con deleciones en Y, 136 hombres relacionados (padres y hermanos) se analizaron, y en un 95% de

los casos (394/401) no se encontraron microdeleciones⁽⁴⁸⁾. En otros siete casos una deleción se encontró tanto en padres como hijos infértiles^(52,53). En algunos casos la deleción involucra marcadores STS subsecuentes polimorfismos, pero en otras descripciones en el padre se detectó que tenía una deleción clínicamente relevante de tamaño aparentemente idéntica a la del hijo⁽⁵⁴⁾. Estos resultados demuestran que tales deleciones no-polimórficas pueden ser pasadas de padres a hijos. En más casos, estas trasmisiones ocurren naturalmente involucrando la región AZFc, y esto fue confirmado por un reciente estudio que reporta una deleción idéntica en AZFc, incluyendo el DAZ, en cuatro hermanos infértiles y su padre⁽⁵⁰⁾. El padre resultó azoospermico en el tiempo del análisis, pero evidentemente poseía algún grado de fertilidad cuando él engendró, sugiriendo que la pérdida de células germinales causada por deleciones en DAZ pudo ser progresiva a través de los años. No obstante la mayor parte de las deleciones en Yq se originan *de novo*⁽⁵⁵⁾.

Hasta hace pocos años todos los análisis de la región AZF fueron sólo para propósitos experimentales; sin embargo con el descubrimiento del gene DAZ, la descripción de las tres regiones discretas del AZF y la difusión de la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se busca hoy en día, que sea un análisis de rutina en pacientes con problemas de infertilidad, especialmente en aquellos pacientes candidatos para técnicas de reproducción asistida, tales como fecundación in vitro (FIV) y especialmente en inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), debido a que diferentes estudios han reportado las mismas microdeleciones en padres e hijos que han recurrido a dichas técnicas de reproducción asistida, lo cual sugiere que son heredables.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido a que en México no existen datos de pacientes con problemas de infertilidad que alberguen microdeleciones en el cromosoma Y, es importante estudiarlos, abarcando los factores que conllevan a la azoospermia y oligozoospermia severa de origen desconocido ya que no hay criterios absolutos o lineamientos que indiquen que pacientes son candidatos para un análisis molecular.

A pesar de la amplia difusión de ICSI en el mundo en años recientes, los posibles riesgos que pueden generarse de su uso indiscriminado no habían sido considerados sino hasta recientemente. De tal manera que a todos aquellos pacientes que sean candidatos para ICSI o FIV., y que obviamente presentan anomalías en la espermatogénesis, se les debe analizar previamente la presencia de microdeleciones o algún otro tipo de mutación genética, ya que dichas deleciones son transmitidas a los hijos de los padres que utilizan algún tipo de reproducción asistida; ^(50,51) y de esa manera buscar alternativas para que la prole no vaya a presentar el mismo problema.

Además de ello, la alta incidencia de infertilidad por factor masculino observada en la actualidad obliga a realizar un análisis andrológico completo, una evaluación básica del semen para dar un diagnóstico preciso.

Con los adelantos en el campo de la genética, y en específico con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se puede demostrar la existencia de microdeleciones en regiones muy precisas del cromosoma Y, y en especial en las regiones AZF (AZFa, b, y c) en pacientes con azoospermia y oligozoospermia.

Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente se plantean las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Cuál será la incidencia de microdeleciones en pacientes mexicanos azoospermicos y oligozoospermicos?
- Existirá una relación entre los niveles de FSH, alteraciones de tipo andrológico y la presencia de microdeleciones en la región AZF del cromosoma Y.
- ¿ El estudio de microdeleciones servirá como parámetro para pacientes que requieran de alguna técnica de reproducción asistida?

HIPÓTESIS:

- La región AZF alberga tres regiones importantes para la espermatogénesis normal AZFa, AZFb y AZFc, las deleciones en cualquiera de las regiones de AZF tendrá como resultado un daño testicular el cual se reflejara en el fenotipo testicular mostrado en un grupo de pacientes mexicanos azoospermicos y oligozoospermicos severos.
- Se espera una mayor incidencia de deleciones en la región AZFc, seguidas de las deleciones en AZFb y por último las deleciones en AZFa.

OBJETIVOS:

Objetivo general: Determinar la existencia de microdeleciones de las regiones AZFa, AZFb y AZFc del cromosoma Y en un grupo de pacientes mexicanos con azoospermia y oligozoospermia severa.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar la existencia de microdeleciones en el cromosoma Y de un grupo de paciente infértiles masculinos.
- 2) Establecer una relación entre la existencia de microdeleciones en las regiones AZF del cromosoma "Y" y las características clínicas de un grupo de pacientes con problemas de fertilidad.

MATERIAL Y METODOS.

TIPO DE ESTUDIO:

- Observacional, prolectivo, transversal, descriptivo.

POBLACIÓN:

- Pacientes masculinos mexicanos azoospermicos y oligozoospermicos severos idiopáticos entre 25 – 50 años de edad.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Pacientes que tengan el diagnóstico de azoospermia y oligospermia severa y cuenten con historia clínica detallada, y exámenes de laboratorio.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Todos aquellos pacientes azoospermicos u oligozoospermicos que no cuenten con una historia clínica detallada ni estudios de laboratorio o cuya etiología haya sido determinada.

VARIABLES:

Dependientes: Microdeleciones del cromosoma Y en las regiones AZFa, AZFb y AZFc.

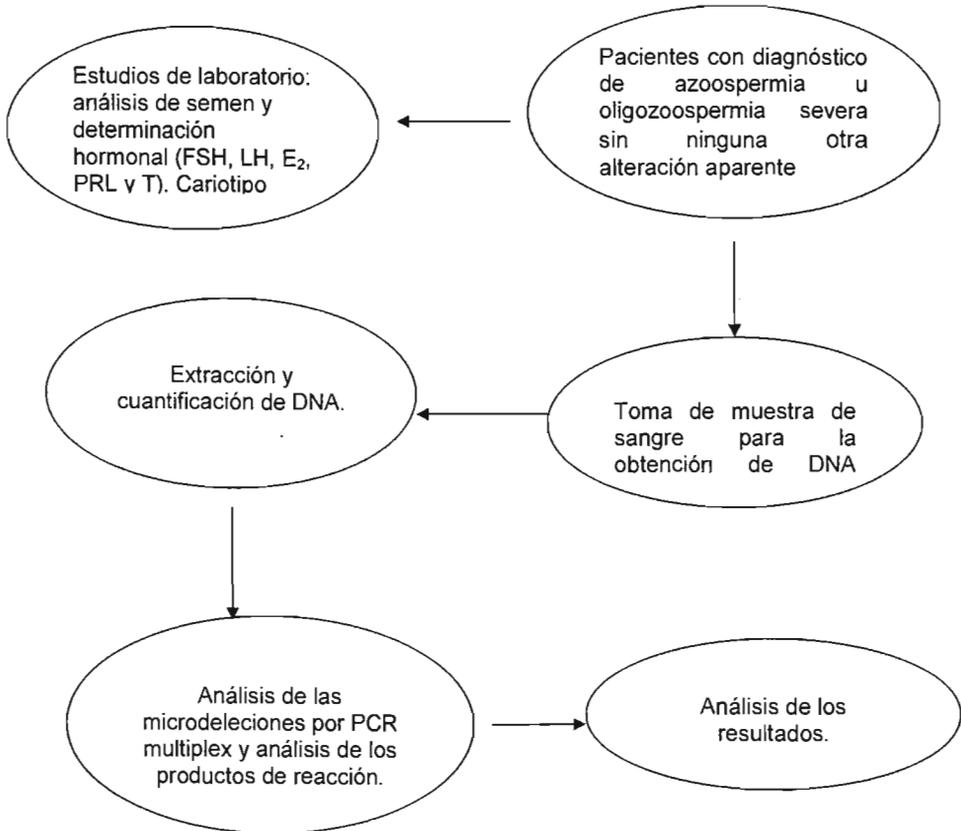
Independientes: Pacientes con infertilidad y cuyo diagnóstico sea azoospermia u oligozoospermia severa.

SELECCIÓN DE PACIENTES:

Los pacientes se seleccionaron de la consulta de Andrología del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Se seleccionaron todos los pacientes que se encontraron con el diagnóstico de azoospermia y/u oligozoospermia severa sin ninguna otra alteración aparente, de acuerdo con su historia clínica detallada y sus estudios de laboratorio.

Los estudios de laboratorio que se realizaron a todos los pacientes fueron: un análisis de semen completo siguiendo los lineamientos de la OMS⁽⁴⁾ (1999) y criterios estrictos de Kruger (ver anexo 1), un cariotipo y un análisis hormonal (determinación sérica de hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), prolactina (PRL), estradiol (E₂) y testosterona (T)). Se citaron a los pacientes para que acudieran a una toma de muestra de sangre para su estudio. Se obtuvo el DNA de las muestras y se realizó el PCR multiplex (siguiendo los lineamientos de la European Molecular Genetics Quality Network) de las regiones del AZF revelando los productos por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Se analizaron las microdeleciones existentes y se prosigió con el análisis de los resultados.

Figura 6. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.



Pacientes

Se seleccionaron 50 pacientes azoospermicos u oligozoospermicos severos (OMS 1999) cuya etiología en su padecimiento fuera de origen desconocido y que contaran con una historia clínica detallada, en la cual refirieran los siguientes parámetros: hormonales (estradiol, hormona folículo estimulante, luteinizante, prolactina y testosterona), volúmenes testiculares, antecedentes andrológicos, histología testicular y edad. A cada paciente se le solicitó aprobación para participar en el protocolo a través de una carta de consentimiento informado para el estudio de microdeleciones en la cual estuvieron de acuerdo.

TÉCNICAS:

Extracción de DNA genómico por el método de sales hipertónicas.

El DNA genómico fue aislado de leucocitos en sangre periférica, utilizando el método de sales hipertónicas. La sangre fue recolectada (5mL) en tubos con EDTA. Las muestras de sangre se centrifugaron a 2500 rpm por 10-15 minutos, se recuperó la capa que contiene a los leucocitos realizando lavados con solución de lisis RCLB hasta que queden limpios. La pastilla se resuspendió con 180 μ L de NaCl 5mM, posteriormente se adicionaron 90 μ L de SDS al 10%, dejando incubar 5 minutos a temperatura ambiente, se adicionaron 616 μ L de NaCl saturado y se homogenizó perfectamente, se incubaron 5 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 15rpm por 15min, se recuperó el sobrenadante y se volvió a centrifugar recuperando el sobrenadante, al cual se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el DNA; se dejaron reposar por 5 minutos y se retiró el sobrenadante. A la pastilla resultante de DNA se le realizaron 2 o 3 lavados con etanol al 70% centrifugando a 15Krpm por 3 min en cada lavado. Por último se retiró el etanol restante y se hidrató la pastilla con agua inyectable.

El DNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro U.V. a una longitud de onda de 260nm ajustando la concentración a 200 ng/ μ L, y se analizó su integridad mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% al mismo tiempo que se verificó su concentración.

Tamizaje de microdeleciones en las regiones AZF.

La búsqueda de microdeleciones en las regiones AZF se realizó por PCR multiplex de acuerdo con los lineamientos de la "European Molecular Genetics Quality Network" (EMQN)⁽⁵⁶⁾. Se utilizaron dos reacciones multiplex (mezcla "A" y mezcla "B") para el análisis de las tres regiones de AZF en el cromosoma Y, las cuales se muestran en la tabla2:

Tabla 2. Reacciones pentaplex para AZF.

Gene/Región	MEZCLA "A" STS	Tamaño de producto PCR	Gene	MEZCLA "B" STS	Tamaño de producto PCR
ZFY/ZFX		495pb	ZFY/ZFX		495pb
SRY		472pb	SRY		472pb
AZF c	sY254	400pb	AZFa	sY86	326pb
AZFa	sY84	320pb	AZFb	sy134	301pb
AZFb	SY127	274pb	AZFc	sY255	126pb

pb= pares de bases

En cada una de las mezclas se amplificaron un STS diferente para AZFa,b,c, por lo que son confirmatorias una de la otra. La amplificación simultánea de un fragmento de SRY y ZFY, que se ubican en el brazo corto del cromosoma Y, sirvió como control positivo de la reacción. En cada reacción se incluyó un DNA control de un varón fértil y de una mujer, de quien se esperaba amplificar únicamente ZFX.

Se utilizó 1 μ L de muestra de DNA genómico, con una concentración de 200ng/ μ L, de cada paciente. Se preparó un stock para cada mezcla. La mezcla A y B de cada tubo contenía: 0.25 μ L de taq 5U/ μ L, 0.65 μ L de dNTPs 10mM, 2.5 μ L de Buffer-PCR 10X, 1.5 μ L de MgCl₂ 15mM, 0.5 μ L de cada cebador 10pmol/ μ L, excepto los sY127 y sY86 de los que se colocaron 1 μ L de cada uno a su respectiva mezcla, y agua destilada y estéril suficiente para tener un volumen final de 25 μ L para cada reacción. En el caso de la mezcla "B" se adicionaron 0.6 μ L de DMSO al 10% ajustando el volumen final a 25 μ L.

Condiciones de reacción

Los ensayos de PCR se llevaron a cabo en un termociclador BIOMETRA. Se comenzó con una desnaturalización inicial mantenida por 5 minutos a 95°C, seguida por 25 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de acoplamiento a 55°C y 4 minutos de alargamiento a 72°C, finalizando con un alargamiento final de 5 minutos a 72°C ligado a una temperatura de mantenimiento de 4°C por tiempo indefinido. Los productos del PCR multiplex se corrieron por electroforesis en geles de agarosa al 2% utilizando bromuro de etidio como revelador.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 50 pacientes con infertilidad primaria con un rango de edad de entre 25 y 44 años para el análisis molecular de microdeleciones en el cromosoma Y; 38 pacientes con azoospermia (76%) y 12 pacientes con oligozoospermia severa (24%). La alteración más frecuente en la mayoría de los pacientes fue la de volumen testicular en el cual un 60% de los pacientes tiene un volumen testicular menor a 20mL, seguida de alteraciones hormonales la más frecuente es la FSH elevada (mayor de 7mUI/mL) la cual se presenta en un 49% de los casos (ver anexo 2). En el caso de la histología testicular solo se contó con 16 biopsias de las cuales 2 muestran sólo células de Sertoli, 1 con solo células de Sertoli pero con espermatogénesis focal, y todas las demás muestran hipoespermatogénesis (severa o leve), daño testicular evolutivo con detención en la maduración y atrofia testicular. En cuanto a antecedentes andrológicos un 24% de los pacientes presentó varicocele, un 6% presento criptorquidia y 6% presentó testículos hipotróficos. El 16% de los pacientes presentan hipogonadismo hipergonadotrófico y sólo un paciente mostró hipogonadismo hipogonadotrófico.

De los pacientes analizados 7 de ellos presentan deleciones en la región AZF (14%); 5 en la región AZFc (10%) y 2 en la región AZFb (4%). De los pacientes con deleción en AZFc dos presentan azoospermia y tres oligozoospermia severa. Los dos pacientes con deleción en AZFb presentan azoospermia. La histología testicular de pacientes con deleción en AZFc muestra hipoespermatogénesis severa, en los casos de azoospermia e hipoespermatogénesis leve en los casos de oligozoospermia (Tabla 3). La histología testicular de un paciente con deleción en AZFb muestra sólo células de Sertoli además de tener un volumen testicular bajo de 4mL(tabla 3). Tres de los pacientes con deleción en AZFc tienen la hormona fólculo estimulante (FSH) elevada, con valores mayores de 10mUI/mL como se muestra en la tabla 3 de resultados.

Tabla 3. Alteraciones de pacientes con microdeleciones en AZFb y AZFc.

DELECIÓN	EDAD (años)	DX	FSH (mUI/mL)	T (ng/mL)	VOL. TEST. (ml)	HISTOLOGIA TESTICULAR
AZFb	33	Azoospermia	ND	ND	12	ND
AZFb	35	Azoospermia	2.1	180	4	Sólo células de Sertoli
AZFc	33	Azoospermia	10.2	340	16	Hipoespermatogénesis severa
AZFc	37	Oligozoospermia	5.6	506	17	Hipoespermatogénesis leve
AZFc	40	Oligozoospermia	6.9	364	16	Hipoespermatogénesis leve
AZFc	30	Azoospermia	10.1	332	25	Hipoespermatogénesis severa
AZFc	29	Oligozoospermia	10.4	1550	25	ND

ND= no determinado

Los resultados del PCR multiplex de los pacientes en que se encontraron deleciones en AZFb, se muestran en las figuras 7 y 8, mientras que los resultados de aquellos con deleciones en AZFc se muestran en las figuras 9 y 10.

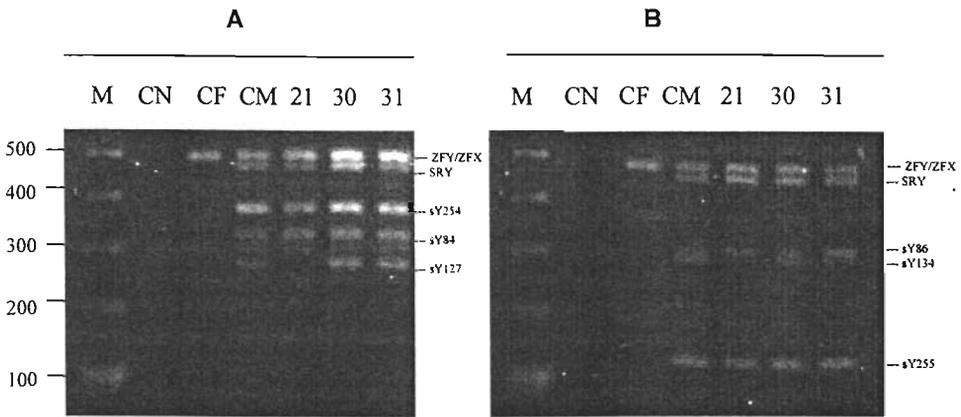


Figura 7. Paciente 21 con deleción en AZFb sY127 (274pb) y sY134 (301pb) para la mezcla A y B respectivamente. Pacientes 30 y 31 sin deleciones. M= marcador de peso molecular, CN= control de PCR negativo sin DNA, CF= control DNA femenino, CM= control DNA masculino, 21,30 y 31= pacientes infértiles.

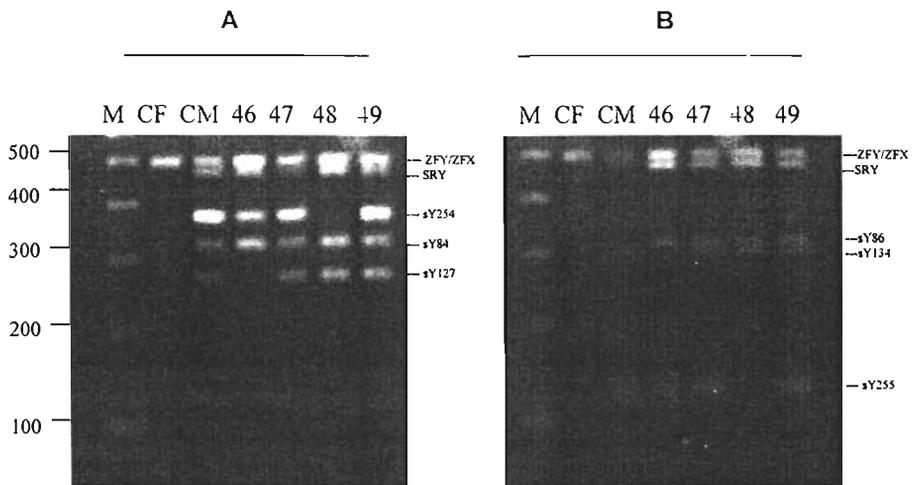


Figura 8. Paciente 46 con delección en AZFb sY127 (274pb) y sY134 (301pb) para la mezcla A y B respectivamente. Paciente 48 con delción en AZFc sY254 (400pb) y sY255 (126pb) para la mezcla A y B respectivamente. . M= marcador de peso molecular, CN= control de PCR negativo sin DNA, CF= control DNA femenino, CM= control DNA masculino, 46 y 48= pacientes infértiles.

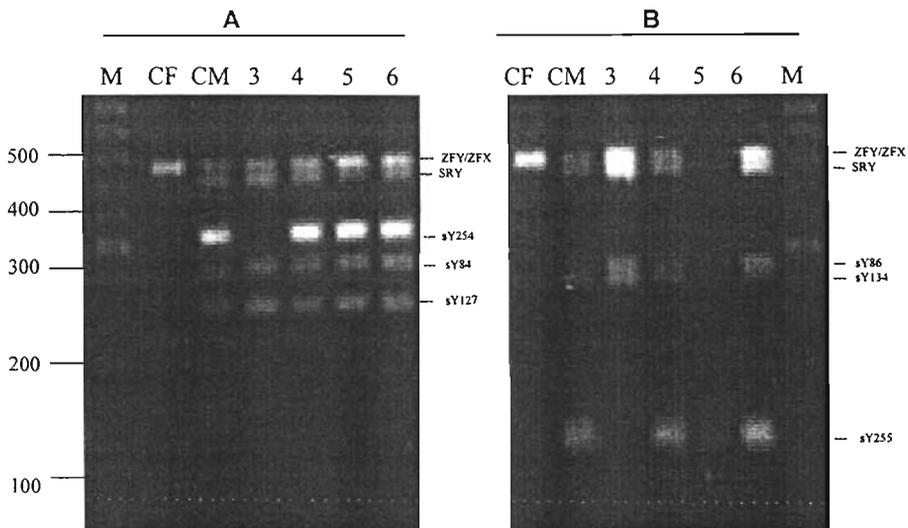


Figura 9. Paciente 3 con micodelección en AZFc, sY254 y sY255 respectivamente los cuales flanquean la región donde se encuentra el gene DAZ. . M= marcador de peso molecular, CN= control de PCR negativo sin DNA, CF= control DNA femenino, CM= control DNA masculino, 3= paciente infértil.

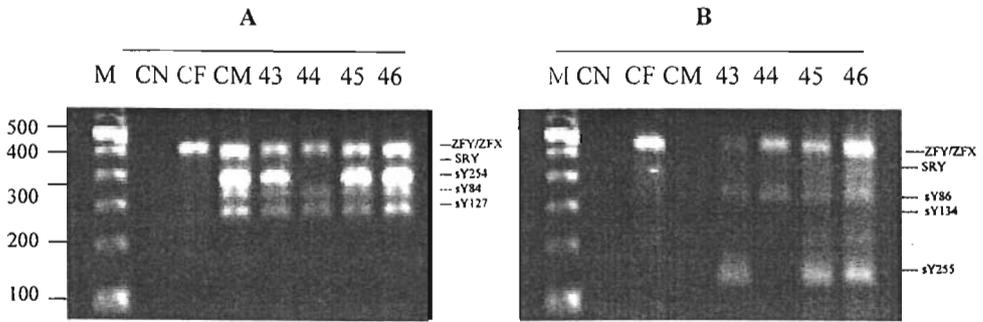


Figura 10. Paciente 44 con microdelección en AZFc, sY254 y sY255 respectivamente. M= marcador de peso molecular, CN= control de PCR negativo sin DNA, CF= control DNA femenino, CM= control DNA masculino, 44= paciente infértil.

DISCUSION.

En el presente estudio analizamos las microdeleciones en un grupo de 50 pacientes mexicanos con problemas de fertilidad con diagnóstico de azoospermia y oligozoospermia severa de origen idiopático, para determinar la incidencia, importancia y repercusión de las mismas en los pacientes, ya que ellos pueden ser candidatos para técnicas de reproducción asistida.

Se analizaron 2 STS's diferentes para cada región AZF, los cuales son los más representativos y adecuados para el estudio inicial de deleciones en el cromosoma Y de acuerdo con los lineamientos de laboratorio para el diagnóstico molecular de microdeleciones en el cromosoma Y formulado por la European Molecular Genetics Quality Network (EMQN)⁵⁶, ya que con el set de primers propuesto se detectan más del 90% de las deleciones que ocurren en las tres regiones de AZF, esto de acuerdo a la alta frecuencia de deleciones encontradas con este panel de STS's en diferentes estudios. Cabe mencionar que cada set de primers de PCR puede analizarse en reacciones duplex o por multiplex-PCR. Aunque el formato multiplex es más útil puesto que distingue un resultado negativo de una falla técnica a través del uso de un control interno, lo cual se logró adicionando un control de PCR apropiado en el diagnóstico de AZF el cual es el gene ZFX/ZFY. El gene ZFX/ZFY se eligió debido a que con el mismo par de primers es posible amplificar un mismo fragmento tanto de DNA de hombres como de mujeres, respectivamente.

En general la alteración más frecuente que se presentó en nuestro grupo de estudio fue el volumen testicular, el cual, en un 60% de los casos fue menor de 19mL (el normal debe ser > 20mL), lo cual refleja el daño testicular presentado por los pacientes, sin embargo el volumen testicular puede estar alterado por varios factores, y no precisamente por presentar microdeleciones, y una de las principales causas se debe a alteraciones en las hormonas gonadotropinas y principalmente la FSH. La FSH se encontró elevada (mayor de 7mUI/mL) en un 49% de los casos.

La hormona foliculo estimulante esta elevada en cuatro de los siete casos (57%) de microdeleciones, teniendo todas sus demás hormonas normales, lo cual sugiere una participación de esta hormona en el fenotipo mostrado por los pacientes con microdeleciones, debido a que todos los demás pacientes negativos para microdeleciones tuvieron sus valores de FSH normales. Varios estudios han reportado microdeleciones con FSH elevada, sin embargo no se han asociado a ningún mecanismo de deleción, sino más bien a un defecto testicular primario en la función espermática^{11,33}.

Se encontró una incidencia de microdeleciones del 14% de los casos estudiados. La deleción en la región AZFc fue la más frecuente 10%, en la región AZFb fue del 4%, mientras que en AZFa no se encontró ningún caso. Estos datos muestran una mayor prevalencia de microdeleciones en la región AZFc, donde se encuentra el gene DAZ, con respecto a las otras dos regiones

comprendidos dentro de AZF. Aunque la relativa prevalencia de deleciones en las regiones AZFb y AZFc en hombres infértiles varían de acuerdo con los criterios de selección de pacientes y selección del método utilizado por cada investigador. De esta manera las deleciones más frecuentemente encontradas involucran la región AZFc en un rango que va de un 15% hasta un 59.6% de los casos seguida de la región AZFb con un rango del 10% al 15.8% y sólo del 2.3% al 4.9% de los casos se relacionan con el intervalo AZFa.¹⁶

La prevalencia de microdeleciones encontrada en Yq es muy similar a la reportada por otros estudios^{48,50,52} a pesar de que se analizaron un menor número de muestras (n=50) aunado a que en nuestro estudio los pacientes se seleccionaron de acuerdo con su historia clínica, diagnóstico de laboratorio y análisis hormonal, a comparación de otros estudios que se seleccionan principalmente con el fenotipo presentado en la histología testicular y niveles hormonales, con lo cual se tiene una mayor restricción en la definición de los grupos. En el estudio nos encontramos inclusive que no todos los pacientes cuentan con biopsias testiculares. No existen antecedentes de microdeleciones en la población mexicana por lo que la variabilidad étnica no es un factor determinante ya que el porcentaje encontrado de microdeleciones se encuentra dentro del rango en acorde con otros estudios realizados en diferentes razas.

Las deleciones en AZFc (10%) se asociaron principalmente a oligozoospermia severa (<5 millones de espermatozoides/mL) en un 60% de los casos y a azoospermia en un 40%. Lo cual refleja que la deleción del gene DAZ (AZFc) no siempre se presenta en pacientes azoospermicos, pues varios estudios han reportado que la perdida parcial de las copias del gene DAZ puede conllevar a oligozoospermia progresiva hasta llegar a azoospermia, debido a la baja transcripción del gene y a que existen múltiples copias polimórficas del mismo gene.

Por el contrario las dos deleciones encontradas en AZFb (4%) fueron en pacientes azoospermicos lo cual refleja que los pacientes con deleciones en AZFb presentan un daño testicular más severo que los pacientes con deleciones en AZFc, aunque las deleciones en esta última son las más frecuentes. Lo anterior se refuerza con lo encontrado en la histología testicular, ya que los pacientes con deleción en AZFc muestran en su histología hipoespermatogénesis severa en los casos de azoospermia e hipoespermatogénesis leve en los casos de oligozoospermia, en comparación con la biopsia testicular de uno de los pacientes que presentó microdeleción en AZFb en el cual se muestra solo células de Sertoli, lo cual hace pensar que los productos de los genes que se localizan en AZFc se expresan en líneas germinales más adelantadas que los productos de los genes localizados en AZFb, que quizás se expresen al iniciarse la espermatogénesis, aunque varios autores han reportado la expresión de los productos de los genes en las líneas germinales y al parecer los productos del gene RBMY(AZFb)^{29,30,31} se expresan

en espermatogonias, espermatoцитos y espermátides, y los productos de el gene DAZ(AZFc) en células germinales sin especificar el estadio²⁶.

Hubo pacientes que no presentaron microdeleciones y que sin embargo presentaron un cariotipo 46XYq-, con lo que podrían formularse varias hipótesis, una de las cuales, es que, las deleciones pueden involucrar a STSs diferentes a los ocupados en este estudio, o bien a que la deleción se encuentra fuera de las regiones analizadas o en la misma región pero en diferente lugar y que puede haber más genes en el cromosoma Y que participen en la espermatogénesis y no solo los genes candidatos para AZF. Debido a lo anterior existe la necesidad de utilizar un panel de STSs más representativo diseñados específicamente para amplificar la región delecionada de acuerdo con el cariotipo, al cuadro clínico y principalmente basándose en la histología testicular de cada paciente, lo cual debe estar bien tipificado, aunque con el panel de STS utilizado en este estudio detecta las microdeleciones ocurridas en el 90% de los casos para las regiones AZFa,b y c.⁵⁶

La utilización de técnicas de reproducción asistida, tales como inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y fertilización in vitro (FIV), como única alternativa para lograr una fecundación en pacientes con azoospermia y oligozoospermia y en general pacientes con problemas de fertilidad masculina, hace necesario el análisis de microdeleciones en el cromosoma Y debido a la potente transmisión genética de infertilidad de padres a hijos^{51,54}. En el caso que se presenten microdeleciones podrían adoptar alguna otra alternativa como la utilización de muestras de donador de semen o en su defecto la adopción.

Con éste estudio hemos comprobado que en la población mexicana las microdeleciones en el cromosoma Y es una importante causa de infertilidad masculina y la etiología de origen genético más frecuentemente encontrada. El uso de técnicas moleculares y en particular la búsqueda de microdeleciones en el cromosoma Y, para el diagnóstico de la infertilidad idiopática, debe ser un estudio de rutina en este tipo de países, ya que se ha demostrado que las deleciones son muy frecuentes en dichos pacientes además de ser heredadas de generación en generación.

CONCLUSIONES.

La incidencia de microdeleciones encontradas en pacientes mexicanos con problemas de fertilidad fue de un 14%, presentándose una mayor incidencia en la región AZFc en un 10%, seguida por la región AZFb en un 4%.

Las microdeleciones en AZFb y AZFc producen diversas testiculopatías, que van de hipoespermatogénesis leve o severa en los casos de deleciones en AZFc y sólo células de Sertoli en el caso de AZFb, lo cual refleja un mayor daño cuando hay deleciones en ésta última región.

No se encontraron microdeleciones de la región AZFa en la población de estudio.

BIBLIOGRAFIA.

1. Wai YW, Chris M, Johannis M. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertil Steril* 2000; 73: 435-42.
2. Pérez Peña Efraín. Infertilidad, esterilidad y endocrinología de la reproducción. Editorial Salvat, 2ª ed.; México, 1997.
3. Tapia SR. Panorámica del factor masculino. Editor: Efraín Vázquez Benítez: Medicina reproductiva en México, México, 1999.
4. Organización Mundial de la Salud(OMS). Manual de laboratorio para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Madrid, 4ª edición. Editorial Medica Panamericana 2001.
5. Kobayashi K, Mizuno K, Hida A, Komaki R, Tomita K, Matsushita I, Namiki M, Iwamoto T, Tamura S, Minowada S, Nakahori Y, Nakagome Y. PCR analysis of the Y chromosome long arm in azoospermic patients: evidence for a second locus required for spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 1994; 3:1965-67
6. Reijo R, Alagappan R, Patrizio P, Page D. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 1996; 347:1290-93.
7. Berta P, Hawkins J, Sinclair A, Taylor A, Griffiths B, Goodfellow P, Fellous M. Genetics evidences equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 1990; 348: 448-50.
8. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 1990; 346: 245-50.
9. DeRooji DG, Van Dissel-Emiliani F, Van Pelt AM. Regulation of spermatogonial proliferation. In: Robaier B, Ewing LL, eds. Regulation of testicular function signalling molecules and cell-cell communication. *An NY Acad Sci* 1989: 564-68.
10. Dyming RA and Fawcett DW. Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol Reprod* 1971; 4:195-15.
11. Luetjens C.M., Gromoll J., Engelhardt M., von Eckardstein S., Bergmann M., Nieschlag E. and Simoni M. Manifestation of Y-chromosomal deletions in the human testis: a morphometrical and immunohistochemical evaluation. *Hum Reprod*, 2002; 17, No. 9, 2258-66.
12. Peterlin B, Kunej T, Sinkovec J, Gligorievska N, and Zorn, B. Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Hum Reprod*, 2002; 17, No. 1, 17-24.
13. Vergnaud G, Page DC, Simmler MC, Brown L, Rouyer F, Noel B, Botstein D, de la Chapelle A, Weissenbach J. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum Genet* 1986;38:109-24.

14. Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC. The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 1992; 258:52–59.
15. Yen PH. Advances in Y chromosome mapping. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999; 11:275–81.
16. 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.
17. Jones M, Khwaja O, Briggs H, Lambson B, Davey PM, Chalmers J, Zhou C, Walker E, Zhang Y, Todd C, Ferguson-Smith M, Affara N. A set of ninety-seven overlapping yeast artificial chromosome clones spanning the human Y chromosome euchromatin. *Genomics* 1994; 24:266–75.
18. Reijo R, Seligman J, Dinulos MB, Jaffe T, Brown LG, Disteché CM, Page DC. 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.
19. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Kohn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Grone HJ, Jung A, Engel W, Haidl G. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996; 5:933–43.
20. Vogt, P.H. Human chromosome deletion in Yq11 AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod*, 1998;4; 739–44.
21. Mazeyrat S, Saut N, Sargent CA, Grimmond S, Longepied G, Ehrmann IE, Ellis PS, Greenfield A, Affara NA, Mitchell MJ. The mouse Y chromosome interval necessary for spermatogonial proliferation is gene dense with syntenic homology to the human AZFa region. *Hum Mol Genet* 1998; 7:1713–24.
22. Brown GM, Furlong RA, Sargent CA, Erickson RP, Longepied G, Mitchell M, Jones MH, Hargreave TB, Cooke HJ, Affara NA. Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Hum Mol Genet* 1998 ;7:97–107.
23. Lahn BT, Page DC. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 1997; 278:675–80.
24. Sargent CA, Boucher CA, Kirsch S, Brown G, Weiss B, Trundley A, Burgoyne P, Saut N, Durand C, Levy N, Terriou P, Hargreave T, Cooke H, Mitchell M, Rappold GA, Affara NA. The critical region of overlap defining the AZFa male infertility interval of proximal Yq contains three transcribed sequences. *J Med Genet* 1999; 36:670–77.
25. Foresta C, Ferlin A, Moro E. Deletion and expression analysis of AZFa-genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet* 9:1161–69.
26. Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapiccola B, Foresta C. The human Y chromosome's azoospermia factor b. *J Med Genet* 2003; 40: 18-27.

27. Chai NN, Salido EC, Yen PH. Multiple functional copies of the RBM gene family, a spermatogenesis candidate on the human Y chromosome. *Genomics* 1997;45:355–61.
28. Najmabadi H, Chai N, Kapali A, Subbarao MN, Bhasin D, Woodhouse E, Yen P, Bhasin S. Genomic structure of a Y-specific ribonucleic acid binding motif-containing gene: a putative candidate for a subset of male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81: 2159–64.
29. Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, Ross A, Kiesewetter F, Pryor J, McIntyre M, Hargreave TB, Saunders PT, Vogt PH, Chandley AC, Cooke H. Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:3848–53.
30. Elliott DJ, Ma K, Kerr SM, Thakrar R, Speed R, Chandley AC, Cooke H. An RBM homologue maps to the mouse Y chromosome and is expressed in germ cells. *Hum Mol Genet* 1996; 5:869–74.
31. Mahadevaiah SK, Odorisio T, Elliott DJ, Rattigan A, Szot M, Laval SH, Washburn LL, McCarrey JR, Cattanach BM, Lovell-Badge R, Burgoyne PS. Mouse homologues of the human AZF candidate gene RBM are expressed in spermatogonia and spermatids, and map to a Y chromosome deletion interval associated with a high incidence of sperm abnormalities. *Hum Mol Genet* 1998; 7:715–27.
32. Prosser J, Inglis JD, Condie A, Ma K, Kerr S, Thakrar R, Taylor K, Cameron JM, Cooke HJ. Degeneracy in human multicopy RBM (YRRM), a candidate spermatogenesis gene. *Mamm Genome* 1996; 7:835–42.
33. Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, de la Chapelle A, Silber S, Page DC. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 1995; 10:383–93.
34. Glaser B, Yen PH, Schempp W. Fibre-fluorescence *in situ* hybridization unravels apparently seven DAZ genes or pseudogenes clustered within a Y-chromosome region frequently deleted in azoospermic males. *Chrom Res* 1998; 6:481–86
35. Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve MP, Reijo R, Rozen S, Dinulos MB, Disteche CM, Page DC. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet* 1996; 6:292–99.
36. Yen PH. A long-range restriction map of deletion interval 6 of the human Y chromosome: a region frequently deleted in azoospermic males. *Genomics* 1998; 54:5–12.
37. Yen PH, Chai NN, Salido EC. The human DAZ genes, a putative male infertility factor on the Y chromosome, are highly polymorphic in the DAZ repeat regions. *Mamm Genome* 1997; 8:756–59.
38. Reijo R, Dorfman M, Slee R, Renshaw A, Loughlin K, Cooke H, and Page D. DAZ Family Proteins Exist Throughout Male Germ Cell Development

- and Transit from Nucleus to Cytoplasm at Meiosis in Humans and Mice. *Biol Reprod* 2000; 63, 1490-96.
39. Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve MP, Reijo R, Rozen S, Dinulos MB, Disteche CM, Page DC. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet* 1996; 14:292-99.
 40. Menke DB, Mutter GL, Page DC. Expression of DAZ, an azoospermia factor candidate, in human spermatogonia. *Am J Hum Genet* 1997; 60:237-41.
 41. 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.
 42. Habermann B, Mi HF, Edelmann A, Bohring C, Backert IT, Kiesewetter F, Aumuller G, Vogt PH. DAZ (deleted in azoospermia) genes encode proteins located in human late spermatids and in sperm tails. *Hum Reprod* 1998; 13:363-69.
 43. Eberhart CG, Maines JZ, Wasserman SA. Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human deleted in azoospermia. *Nature* 1996; 381:783-85.
 44. Burgoyne PS. Fruit(less) flies provide a clue. *Nature* 1996; 381: 740-1.
 45. Lahn BT, Page DC. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 1997; 278:675-80.
 46. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y Chromosome Microdeletions and Alterations of Spermatogenesis. *Endocrinol Reviews* 22 (2): 226-239.
 47. Rossato M, Ferlin A, Garolla A, Pistorello M, Foresta C. High fertilization rate in conventional *in-vitro* fertilization utilizing spermatozoa from an oligozoospermic subject presenting microdeletions of the Y chromosome long arm. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:473-76.
 48. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Kohn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Grone HJ, Jung A, Engel W, Haidl G. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996; 5:933-43.
 49. Simoni M, Gromoll J, Dworniczak B, Rolf C, Abshagen K, Kamischke A, Carani C, Meschede D, Behre HM, Horst J, Nieschlag E. Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (deleted in azoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil Steril* 1997; 67:542-47.
 50. Chang PL, Sauer MV, Brown S. Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. *Hum Reprod* 1999; 14:2689-94.
 51. 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; 14:1722-26.

52. Kobayashi K, Mizuno K, Hida A, Komaki R, Tomita K, Matsushita I, Namiki M, Iwamoto T, Tamura S, Minowada S, Nakahori Y, Nakagome Y. PCR analysis of the Y chromosome long arm in azoospermic patients: evidence for a second locus required for spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 1994; 3:1965–67.
53. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, VanBergen AH, Nolten WE, Meisner L, Roberts KP. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med* 1997; 336:534–39.
54. Stuppia L, Calabrese G, Franchi PG, Mingarelli R, Gatta V, Palka G, Dallapiccola B. 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; 59:1393–95.
55. 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.
56. Simoni, M., Bakker, M.C., Eurlings, M.C.M. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y chromosomal microdeletions. *Int J Andrology.*, 1999; 22, 292–99.

ANEXO 1.

Tabla 4. Criterios y nomenclatura de la OMS para el análisis de semen.

INDICES DE NORMALIDAD DEL SEMEN (OMS)	
Volumen	≥2 mL
pH	7.2 - 8.0
Motilidad	≥ 50% progresión lineal ("A" + "B") ≥ 25% progresión lineal rápida ("A"
Concentración espermática	≥ 20 x 10 ⁶ espermatozoides/mL
Viabilidad	≥ 75% espermatozoides vivos
Leucocitos	< 1 x 10 ⁶ leucocitos/ Campo
Aglutinación	Negativa
Morfología :	
Criterios Estrictos de Kruger	≥14%espermatozoides con formas normales
Criterios de la OMS	≥ 50% espermatozoides con formas normales
NOMECLATURA DEL ANALISIS DE SEMEN	
Normozoospermia	Eyaculado normal
Oligozoospermia	Concentración <20X10 ⁶ espermatozoides/mL
Astenozoospermia	< 50% espermatozoides "A" + "B" < 25% espermatozoides "A"
Teratozoospermia	< 30% espermatozoides con formas normales < 14% espermatozoides con formas normales
Azoospermia	Ausencia de espermatozoides en el eyaculado
Oligoastenoteratozoospermia	Alteración de las tres variables

ANEXO 2.

Tabla 5. Valores hormonales de referencia

ESTRADIOL	ND - 56	pg/mL
HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE	0.7 - 7.1	mUI/mL
HORMONA LUTEINIZANTE	0.8 - 5.6	mUI/mL
PROLACTINA	2.5 - 17.0	ng/mL
TESTOSTERONA TOTAL	2.7 - 17.3	ng/mL