



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA ÚNICO DE ESPECIALIDADES MÉDICAS
ESPECIALIDAD EN GENÉTICA MÉDICA

INSTITUTO DE SEGURIDAD SOCIAL Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS
TRABAJADORES DEL ESTADO
CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"

**ALTERACIONES GENÉTICAS, CARACTERÍSTICAS
CLÍNICAS Y SEMINALES EN PACIENTES CON
AZOOSPERMIA NO OBSTRUCTIVA Y OLIGOZOOSPERMIA.**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:
RAUL EDUARDO PIÑA AGUILAR

TUTORES:
MARÍA DEL CARMEN CHIMA GALÁN
DIVISIÓN DE MEDICINA GENÓMICA

JESÚS DANIEL MORENO GARCÍA
SERVICIO DE REPRODUCCIÓN HUMANA

CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE", ISSSTE



MÉXICO, D.F., NOVIEMBRE DE 2013





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).

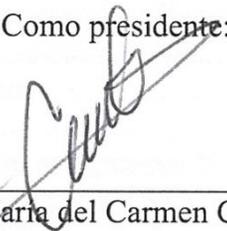
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Registro de Protocolo de Investigación: 217.2012

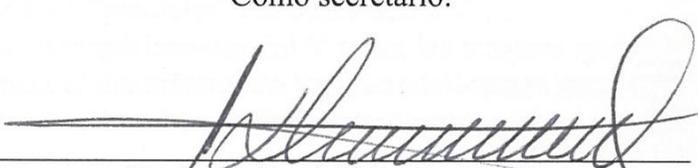
Autorización de tesis


Dr. Aurea A. Erazo Valle Solís*Subdirectora de Enseñanza e Investigación
Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE***Presentó Examen de Tesis, con el siguiente sínodo:**

Como presidente:


M. en. C. María del Carmen Chima Galán*División de Medicina Genómica
Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE*

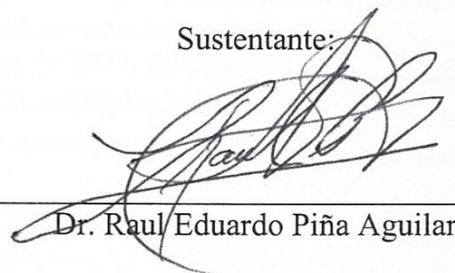
Como secretario:


Dr. Jesús Daniel Moreno García*Servicio de Reproducción Humana
Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE*

Como vocal:


Dra. Yuritzi Santillán Hernández*Servicio de Genética Médica
Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE*

Sustentante:

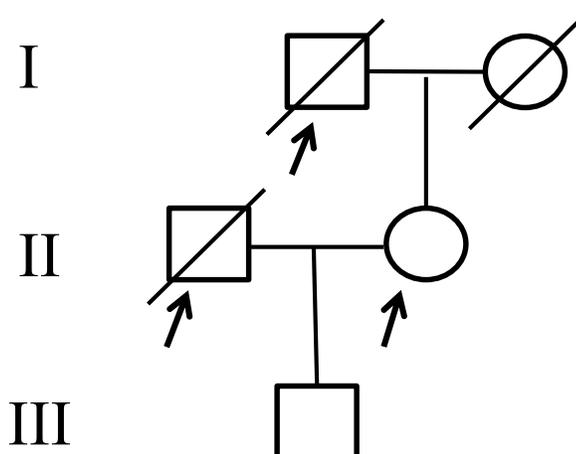

Dr. Raul Eduardo Piña Aguilar

ÍNDICE

Dedicatorias.....	5
Agradecimientos.....	6
I. Introducción	
Subfertilidad masculina.....	7
Azoospermia.....	7
Análisis seminal.....	9
Causas genéticas de infertilidad masculina.....	10
Anormalidades de los cromosomas sexuales.....	10
Alteraciones cromosómicas estructurales relacionadas con infertilidad masculina.....	11
Translocaciones cromosómicas balanceadas.....	11
Translocaciones Robertsonianas.....	12
Inversiones cromosómicas.....	13
Contribución de alteraciones del cromosoma Y en la infertilidad masculina.....	13
La estructura del cromosoma Y en casos de azoospermia.....	13
Mutaciones en las regiones del Factor de Azoospermia (AZF).....	14
Región AZFa.....	16
Región AZFb.....	17
Región AZFc.....	18
Microdeleciones “parciales” del cromosoma Y.....	19
Impacto de las microdeleciones del Y sobre las técnicas de reproducción asistida.....	21
Lineamientos para el diagnóstico de las microdeleciones del cromosoma Y.....	21
Estudios genéticos en hombres infértiles mexicanos.....	23
II. Planteamiento del problema.....	26
III. Justificación.....	27
IV. Objetivos	
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos.....	28
V. Material y métodos	
Diseño del estudio.....	29
Criterios de inclusión.....	29
Criterios de exclusión.....	30
Criterios de eliminación.....	30
Metodología para el análisis de microdeleciones del cromosoma Y	
Técnica de extracción de DNA de linfocitos de sangre periférica.....	30
Realización de la PCR múltiplex para detección de microdeleciones del cromosoma Y de acuerdo a los lineamientos de la EAA/EMQN.....	31

VI. Resultados	
Estandarización del análisis de las microdeleciones del cromosomas Y.....	34
Pacientes incluidos en el estudio.....	34
Calidad seminal.....	35
Características hormonales.....	36
Características genéticas.....	37
Estudio del caso del paciente 2.....	39
Estudio del caso del paciente 9.....	41
VII. Discusión y	
Conclusiones.....	44
Paciente con inversión del cromosoma 11.....	44
Ausencia de alteraciones cromosómicas y microdeleciones del	
cromosoma Y en el paciente 9.....	46
Implicaciones futuras del estudio.....	47
Conclusiones.....	48
VIII. Referencias bibliográficas.....	49
IX. Anexos.	
Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado.....	54

DEDICATORIAS



A Don **Alfonso Aguilar Montalvo**, mi abuelo, por ser por quien comenzó la historia y cultivo en nuestra familia la vida a donde quiero llegar. Gracias abuelo, espero algún día cabalgemos juntos arriando ganado si me gano el cielo.

A mi padre, **Raúl Piña Novelo**, que aunque hace mucho te nos fuiste y no pudiste presenciar nada de mi carrera como médico, sé que verme graduado de una especialidad médica te enorgullecería mucho.

A mi madre, QFB **Violeta Aguilar Gamboa** por transmitirme ese 50% de genoma que me hace lo que soy, del que me enorgullezco tanto y el que me ayuda a continuar a donde quiero ir. Gracias mamá por estar conmigo siempre.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Yuritzí Santillán-Hernández, por abrirme las puertas del ISSSTE, por aguantarme, por creer finalmente en mí y por permitirme que llegara a amar la clínica y la Genética Médica.

Al Dr. Jesús Moreno-García, por creer y confiar en mí, por permitirme ser parte de su equipo y por hacerme finalmente su hijo adoptivo para surcar los retorcidos caminos de la Reproducción humana y el diagnóstico genético preimplantacional.

A la Dra. María del Carmen Chima por sus enseñanzas y por ayudarme en explorar y desarrollar la genética reproductiva en el ISSSTE.

A la Biol. Concepción Yarena de Vega, por cuidarme como un hijo y darme su apoyo incondicional. Por todas sus enseñanzas citogenéticas y por reforzar mi amor y respeto por los cromosomas.

A la Biol. Cecilia Sánchez Guerrero por todas sus enseñanzas al microscopio, por permitirme pasar por el mundo de los bandeos cromosómicos y por su amistad a toda prueba.

Al Biol. Miguel A. Regalado, los médicos adscritos y los residentes del Servicio de Reproducción Humana por todas sus enseñanzas y experiencias en el mundo de la infertilidad.

A todo el personal del Laboratorio de Genética y de Genómica del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” y del Servicio de Genética del Hospital “Conde de la Valenciana” de quien he aprendido lo más difícil de la Genética: el laboratorio.

A cada uno de los pacientes y sus familias que durante la residencia me enseñaron, me hicieron parte de sus vidas y me dejan claro que la Genética Médica es el único lugar donde yo podía ser un clínico.

I. Introducción

Subfertilidad masculina.

La infertilidad se define como la falla para concebir después de un año de relaciones sexuales no protegidas. Este es un problema de salud a nivel global, que afecta al menos una de cada 6 parejas. El factor masculino en la infertilidad se relaciona con la presencia de alteraciones en el eyaculado, como oligozoospermia, azoospermia, alteraciones en la morfología o movilidad de los espermatozoides.

El factor masculino como la causa única de infertilidad está presente en por lo menos 30% de las parejas y en 39% de los casos están presentes factores masculinos y femeninos (Tournaye y Cohlen, 2012).

En la mayoría de los hombres la producción espermática (espermaca) comienza en la pubertad, típicamente entre los 13 y 15 años de edad. Una vez que la espermatogénesis comienza, la evidencia sugiere que en la mayoría de los hombres esta continúa ininterrumpidamente hasta la muerte. Típicamente el eyaculado de un hombre fértil puede contener varios millones de espermatozoides por mililitro, aunque esto es altamente variable en y entre los individuos. La producción espermática dura aproximadamente 72 días y es consecuencia de la actividad mitótica y meiótica. Por tanto la producción espermática es un proceso complejo, que desde el inicio hasta su etapa del transporte de los espermatozoides a los conductos eyaculadores puede llevar 3 meses (Tournaye y Cohlen, 2012).

Azoospermia

La meiosis, la producción y el empaquetamiento de las células desde la etapa de espermatogonias al espermatozoide en los testículos son críticos, ya que si estos procesos no ocurren adecuadamente las células germinales están disminuidas o ausentes en el eyaculado y consecuentemente se genera infertilidad. Específicamente el número total de espermatozoides en el eyaculado está influenciado por la producción espermática testicular, la integridad de los conductos deferentes y eyaculador, la presencia de eyaculación retrograda y la duración de la abstinencia. Por tanto el no encontrar espermatozoides en un eyaculado puede estar relacionado con afectaciones a diversos niveles (Aziz, 2013).

La definición formal de azoospermia es la ausencia de espermatozoides en el sedimento de una muestra centrifugada (WHO *et al.*, 2010). La prevalencia de muestras azoospermicas es hasta de 1 a 2% en la población de hombres adultos y de 5 a 59% en los hombres infértiles (Aziz, 2013).

Las causas de la azospermia, se consideran en tres categorías principales: las pretesticulares, las testiculares y las post-testiculares. Las causas pretesticulares son las alteraciones endocrinas que afectan la espermatogénesis como son: el hipogonadismo hipogonadotrópico (incluyendo el espectro del Síndrome de Kallman, que es de etiología genética), la hiperprolactinemia, y la resistencia a los andrógenos (Cocuzza *et al.* 2013).

Entre las causas testiculares se encuentran los desórdenes intrínsecos que afectan la espermatogénesis, estas se denominan en conjunto como fallas testiculares primarias. La patología testicular puede estar asociada a un daño testicular inducido por un varicocele, testículos no descendidos, torsión testicular, orquitis, efectos gonadotóxicos de medicamentos, causas genéticas y un causas idiopáticas. La falla testicular primaria asociada a azoospermia, se le ha denominado comúnmente azoospermia no-obstrucciona (Cocuzza *et al.*, 2013). Este tipo de falla testicular es la que es principalmente susceptible de manejo con técnicas de reproducción asistida como la inyección intracitoplásmica de esperma (ICSI). Sin embargo, previo a estos procedimientos se debe tratar de determinar en la medida de lo posible la etiología exacta, para pronosticar la tasa de éxito de recuperación de los espermatozoides o adecuar las metodologías para la recuperación de estos (Cocuzza *et al.*, 2013).

Las causas post-testiculares incluyen la obstrucción del sistema de ductos del tracto reproductivo masculino o la disfunción eyaculatoria (Cocuzza *et al.*, 2013). Entre las primeras se encuentran la ausencia congénita de vasos deferentes (*congenital bilateral absence of the vas deferens: CBAVD*), que se presentan en cerca de 1% de los hombres infértiles y en cerca de 6% de los casos de azoospermia obstructiva, la etiología de esta entidad son las mutaciones en el gen *CFTR*, el causante de la fibrosis quística (OMIM# 219700). La CBAVD está presente en la mayoría de los varones con fibrosis quística pero también puede presentarse de manera aislada y constituir un espectro muy leve de fibrosis quística, en esta entidad los testículos y la espermatogénesis son normales (Yu *et al.*, 2012). Otras causas post-testiculares son la obstrucción iatrogénica de vasos causada por una reparación de hernia, la obstrucción a nivel del epidídimo que puede estar presente como parte del Síndrome de Young (OMIM # 279000) que se manifiesta con la triada clásica de sinusitis crónica, bronquiectasias y azoospermia obstructiva (Hughes *et al.*, 1986) y del cual aún no se conoce la etiología, y la obstrucción del ducto eyaculatorio por compresiones extrínsecas como los quistes Mullerianos o Wolfianos o los cálculos en las vesículas seminales. Entre los desórdenes eyaculatorios la principal entidad asociada a azoospermia es la eyaculación retrógrada, que tiene etiología anatómica, neurogénica, farmacológica o idiopática (Cocuzza *et al.*, 2013).

Las causas pre-testiculares y post-testiculares de azoospermia son comúnmente tratables, lo que permite restaurar la fertilidad en la mayoría de los pacientes con estas alteraciones. Contrariamente, los desórdenes testiculares son irreversibles y el éxito de las intervenciones terapéuticas son significativamente menores (Cocuzza *et al.*, 2013), a pesar de ser en los que más se aplican las técnicas de reproducción asistida. En estos desórdenes testiculares la etiología genética es una de las causas detectables más frecuentes.

Las guías de la Asociación Americana de Medicina Reproductiva (American Society for Reproductive Medicine: ASRM) para el abordaje diagnóstico del varón infértil (Practice Committee of ASRM, 2012) y del manejo del varón con azoospermia (Practice Committee of ASRM and SMRU, 2008) incluyen como componente esencial de la evaluación de la contribución genética, como son el estudio de las alteraciones cromosómicas determinadas mediante el cariotipo y la búsqueda de microdeleciones del cromosoma Y.

Análisis seminal.

La espermatobioscopia es el pilar del diagnóstico del factor masculino en parejas infértiles, ya que esta permite evaluar básicamente la producción espermática del testículo y el volumen de fluido contribuido por las glándulas accesorias. Este análisis de laboratorio se realiza de acuerdo a los lineamientos propuestos por la Organización Mundial de la Salud, en su última versión del 2010 (WHO, 2010), donde se proponen evaluar varios parámetros como son la concentración espermática, la morfología de los espermatozoides y la movilidad.

Estos parámetros morfofuncionales básicos son utilizados tradicionalmente para clasificar a los pacientes y tomar decisiones clínicas al respecto de la aplicación de técnicas de reproducción asistida; sin embargo estos parámetros no correlacionan perfectamente con las tasas de fertilización, desarrollo embrionario o embarazos.

Por tanto se han propuesto técnicas más complejas que permite ampliar el análisis seminal básico (De Jonge, 2012). Una de las más importantes actualmente, es la determinación de la fragmentación del DNA espermático. El análisis de fragmentación del DNA es un área de intensa investigación clínica andrológica desde los años 90s. Esta cada vez toma más importancia en la clínica ya que existen reportes de diferencias entre las tasas de fertilización por inseminación o fertilización *in vitro* cuando existe fragmentación de DNA de los espermatozoides empleados. Sin embargo, aún no existe un consenso de la metodología más adecuada para evaluar este tipo de alteraciones (De Jonge, 2012).

Existen varias metodologías para determinar la fragmentación de espermatozoides entre las que se encuentra el ensayo Cometa, el ensayo de dispersión de la cromatina (sperm chromatin dispersion, SCD), el TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase TdT-mediated nick-end labelling), y el SSCA (Sperm Chromatin Structure Assay) (De Jonge, 2012; The Practice Committee of ASRM, 2013). El ensayo más empleado en México es el SCD, comercialmente conocido como Halopserm®, el que se basa en determinar el grado de la compactación y empaquetamiento de la cromatina, visualizado el halo que genera la cromatina alrededor del esperma después de un tratamiento ácido, lo que permite detectar de manera indirecta la fragmentación de DNA (De Jonge 2012; The Practice Committee of ASRM, 2013)

El manual de la OMS, aun considerada el análisis de la fragmentación de DNA espermática como un procedimiento de investigación y aun no se establece como útil para el análisis seminal básico (WHO, 2010). La ASRM en sus últimas guías de práctica clínica considera que el daño en DNA espermático es más común en hombres infértiles que en controles y puede contribuir a un pobre desenlace reproductivo. No obstante, indica que los métodos actuales para valorar la integridad del DNA espermático no son confiables para predecir el resultados de los tratamientos de reproducción asistida por lo que no considera deba ser utilizado clínicamente de manera rutinaria (The Practice Committee of ASRM, 2013)

Otras técnicas de análisis seminal como la valoración del stress oxidativo, la determinación de anexina V como marcador de apoptosis, la selección de esperma por ácido hialuronico y otros marcadores aún están en desarrollo experimental con un limitada valoración de su eficacia

clínica y no se encuentran disponibles de manera rutinaria (Henkel *et al.*, 2012). Por tanto, a pesar de sus limitaciones en estandarización, en predecir el potencial reproductivo del varón o determinar claramente una etiología de la infertilidad, la espermatobioscopia continúa siendo el estándar de oro para el diagnóstico y la valoración de la infertilidad masculina.

Causas genéticas de infertilidad masculina.

Como se ha mencionado previamente, la contribución de la genética a la etiología de la infertilidad masculina es un tema bien conocido y los lineamientos de diagnóstico del hombre infértil (The Practice Committee of ASRM, 2012) recomiendan la realización de estudios específicos para el diagnóstico de esta la infertilidad por esta etiología. Existe revisiones detalladas sobre la realización de pruebas genéticas en los hombres infértiles (McLachlan y O'Bryan, 2010) y en los azoospermicos (Hamada, *et al.*, 2013).

Las alteraciones genéticas de relevancia clínica descritas se presentan a dos niveles principalmente: las alteraciones cromosómicas (anormalidades en los cromosomas sexuales y estructurales como translocaciones e inversiones) y las alteraciones a nivel estructural del cromosoma Y en su región eucromática (microdeleciones del cromosoma Y) (McLachlan y O'Bryan, 2010). En las siguientes secciones se detalla cada una de esta, incluyendo su origen y relevancia clínica.

Anormalidades de los cromosomas sexuales.

Las anormalidades numéricas de los cromosomas sexuales en los hombres son una causa relativamente común de infertilidad ya que el síndrome de Klinefelter (47,XXY) y el Síndrome 47,XYY ocurre en aproximadamente 1 a 2 en 1000 nacimiento vivos (Morris *et al.*, 2008). Siendo el Síndrome de Klinefelter la alteración cromosómica más frecuente. Una gran proporción de los hombres con Síndrome de Klinefelter solo son identificados cuando se les realiza valoración por infertilidad. El Síndrome de Klinefelter en su forma sin mosaico corresponde a cerca del 11% de los hombres azoospermicos, mientras que aquellos con las formas en mosaico se pueden manifestar principalmente como oligozoospermia (Harton y Tempest, 2012).

Se considera que las fallas en el diagnóstico del el Síndrome de Klinefelter son en parte debidas al poco conocimiento de la enfermedad y la creencia incorrecta que todos los individuos presentan el fenotipo clásico (talla alta, ginecomastia e hipogonadismo). Sin embargo, ahora es que claro que el Síndrome de Klinefelter tiene un fenotipo altamente variable (Harton y Tempest, 2012). Por otro lado, los individuos con cariotipo 47,XYY son fértiles normalmente pero presentan un incremento en el riesgo de infertilidad comparados con los controles (Harton y Tempest, 2012), ya que esta alteración la presentan 0.26% de los hombres infértiles vs 0.07% de los recién nacidos hombres. La presentación espermática en pacientes con cariotipo 47, XYY puede ser de una falla severa a una aparente normalidad.

Los mecanismos que generan infertilidad asociados al Síndrome de Klinefelter incluyen la potencial falta de un factor de crecimiento testicular, la degeneración prematura de las células germinales primordiales antes de la pubertad y el arresto de la maduración tardía durante la

espermatogénesis en la etapa de espermatocito primario y probablemente también etapas posteriores (Hamada *et al.*, 2013). Sin embargo, se encuentra espermatogénesis residual en hombres con Klinefelter en sus formas con mosaico y sin mosaico. Adicionalmente también se presentan testículos pequeños (1 a 3 mL) de consistencia firme, ginecomastia (40%) y características de hipogonadismo, como escaso vello facial y pobre crecimiento de vello púbico, pérdida de la libido y disfunción eréctil. Niveles bajos de testosterona se observan en cerca de 80% de los hombres 47,XXY, este hallazgo se atribuye al pequeño tamaño testicular que no puede compensar la producción de testosterona a pesar de la hiperplasia de células de Leydig con la que cursan los pacientes (Hamada *et al.*, 2013).

La presencia de un cromosoma sexual adicional en ambos tipos de pacientes, los que presentan Klinefelter y los pacientes con cariotipo 47,XXY, genera un riesgo para presentar aneuploidías de los cromosomas sexuales en al menos 50% de sus espermatozoides. Algunos estudios han analizado las frecuencias de aneuploidías en los espermatozoides de pacientes con mosaico y sin mosaico de Klinefelter, la mayoría encontraron una mayor frecuencia de aneuploidía de cromosomas sexuales comparado con los controles, encontrando para los pacientes sin mosaico un promedio de 6% (rango de 1% a 25%) versus un promedio de 3% (rango de 0 a 7%) en los pacientes con mosaico 46,XY/47,XXY (Tempest, 2011). Para los individuos con cariotipo 47,XXY, los niveles de aneuploidía se reportan mayores que en los hombres con cariotipo normal, pero más bajo que los de los pacientes con Klinefelter con un nivel promedio de 4% (rango de 0.1 a 14%) (Revisado en Tempest, 2011). De estos estudios es claro que algunas células aneuploides pueden ser capaces de iniciar y completar la meiosis resultando en gametos aneuploides. No obstante aparentemente existe un punto de chequeo meiótico que elimina a una gran proporción de los espermatozoides aneuploides.

Alteraciones cromosómicas estructurales relacionadas con infertilidad masculina.

Adicional a la presencia de alteraciones en los cromosomas sexuales, en los hombres infértiles se detectan la presencia de defectos estructurales con una frecuencia de 5 a 10 veces más que varones fértiles (Massart *et al.*, 2012). La formación de bivalentes normales durante la meiosis esta alterada en los pacientes con anormalidades estructurales (principalmente en las translocaciones), llevando a una meiosis anormal y a un arresto de la maduración durante la espermatogénesis. La mayoría de los pacientes con alteraciones estructurales, se presentan con oligozoospermia. Por tanto la frecuencia de translocaciones Robertsonianas, translocaciones recíprocas e inversiones es mayor en los hombres con oligozoospermia comparado con los hombres azoospermicos y los hombres de la población general (Massart et al. 2012).

Translocaciones cromosómicas balanceadas.

Las translocaciones cromosómicas balanceadas involucran la ruptura de dos cromosomas y la reparación anormal de los fragmentos cromosómicos resultando en la transposición de material genético de un cromosoma a otro sin la pérdida de material genético. La mayoría de los portadores de translocaciones balanceadas son fenotípicamente normales, a reserva que los puntos de ruptura de las translocaciones interrumpa un gen importante o vía un efecto de posición. Sin embargo, los portadores de los translocaciones balanceadas (a pesar de ser

fenotípicamente normales en la mayoría de los casos) pueden presentar fertilidad reducida, abortos espontáneos o productos malformados (Harton y Tempest, 2012).

La segregación normal de las translocaciones puede llevar a la duplicación o delección de regiones cromosómicas involucradas en la translocación. La fertilidad reducida en los portadores de translocaciones puede ser en parte el resultado de los requerimientos durante la meiosis para que los cromosomas derivativos en las translocaciones formen una estructura cuadrivalente o trivalente, en las recíprocas y en las Robertsonianas respectivamente, que permita a los cromosomas homólogos aparearse. La formación de cuadrivalentes o trivalentes puede llevar a reducción en la fertilidad, primeramente por implicaciones mecánicas y diferencias en el tiempo requerido formar dicha estructura y segundo como resultado de la no-disyunción de las estructuras que genera propensión a producir gametos desbalanceados (Harton y Tempest, 2012).

La frecuencia de gametos balanceado o no balanceados en una translocación depende del cromosoma involucrado, el tamaño de la región involucrada, la presencia de heterocromatina, la localización de los puntos de ruptura y la probabilidad de eventos de recombinación que ocurren en los segmentos traslocados. La proporción de gametos no balanceados en cada portador de translocaciones balanceadas varía grandemente y refleja el rearrreglo específico involucrado. También se sabe que el nivel de gametos desbalanceados será significativamente mayor al riesgo empírico de tener un recién nacido con cariotipo cromosómico desbalanceado ya que la mayoría, si no es que todos los productos desbalanceados de la segregación, serán abortados espontáneamente o no permitirán el desarrollo temprano (Harton y Tempest, 2012).

Translocaciones Robertsonianas.

Las translocaciones Robertsonianas son las que involucran los cromosomas acrocéntricos, específicamente los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22. En estos casos la translocación resulta de la fusión céntrica de dos cromosomas acrocéntricos. Estas son las aberraciones estructurales más frecuentes en humanos afectando la fertilidad en cerca de 1 en 1000 hombres. A pesar de que los estimados de frecuencia son de 0.8% en los hombres subfértiles, su prevalencia es nueve veces mayor que para la población en general (Esteves, 2013). Existe una correlación entre la frecuencia de bivalentes XY y la asociación de trivalente Robertsonianos presentes durante la etapa de paquíteno de la meiosis, y el daño en las células germinales (Harton y Tempest, 2012), lo que explicaría la infertilidad en pacientes portadores de translocaciones Robertsonianas.

La importancia de la detección de las translocaciones en pacientes infértiles, es el riesgo de tener descendencia con complementos cromosómicos desbalanceados. En el caso de las Robertsonianas existe un riesgo especial adicional representando por las disomías uniparentales que son generadas por un mecanismo denominado “rescate trisómico” durante la primera división del cigoto. Para los cromosomas 14 y 15, las disomías uniparentales maternas y paternas pueden llevar a patología originando enfermedades como el Síndrome de Angelman (OMIM #105830) o el de Prader-Willi (OMIM #176270), a pesar de un cariotipo balanceado. Existen estimaciones adecuadas del riesgo empírico del tener descendencia afectada ya que las translocaciones Robertsonianas involucran poco cromosomas y en la mayoría presentan puntos similares de ruptura (Harton y Tempest, 2012). La frecuencia de gametos desbalanceados varía ampliamente en los reportes de 3% a 36% de espermatozoides desbalanceados (Tempest, 2011),

los que son mucho más altos que el riesgo empírico de tener un concepto con trisomía 13 o 21 (menos de 2%) provenientes del padre.

Inversiones cromosómicas.

Al igual que con las translocaciones cromosómicas, las inversiones pueden causar infertilidad, abortos espontáneos y defectos al nacimiento en los conceptos provenientes de gametos desbalanceados. Durante la meiosis, los cromosomas son forzados a formar estructuras especializadas (asas de inversión) que permiten a los cromosomas homólogos aparearse. La formación de estas asas pueden impactar la fertilidad de igual manera por el efecto mecánico y del tiempo empleado en la formación del asa (Harton y Tempest, 2012). La PCR en espermatozoides individuales de portadores de inversiones, ha demostrado que la recombinación dentro de las asas es reducida, lo que puede llevar a un fallo en la meiosis y generar apoptosis en la célula afectada, lo que se manifiesta finalmente como una cuenta espermática baja. Al igual que en las translocaciones recíprocas, la frecuencia de gametos balanceados depende de los cromosomas involucrados, el tamaño de la región involucrada y la probabilidad de eventos recombinatorios que toman lugar en los segmentos invertidos. Las investigaciones de la producción de gametos no balanceados en portadores de inversiones son muchos menores que en los portadores de translocaciones, sin embargo algunos estudios reportan rangos de espermatozoides desbalanceados del 1% al 54% (Harton y Tempest, 2012).

Contribución de alteraciones del cromosoma Y en la infertilidad masculina.

Aproximadamente del 2 a 3 % de los hombres son infértiles debido a defectos en la función espermática, manifestada principalmente como oligozoospermia (definida previamente como la presencia de menos de 20 millones de espermatozoides por mL de semen) o azoospermia. Tiepolo y Zuffardi (1976) fueron los primeros en identificar que las deleciones en Yq estaban involucradas en infertilidad masculina, cuando analizaron por citogenética clásica leucocitos de hombres con infertilidad idiopática. No obstante, fue hasta la década de los noventa, que los estudios moleculares (Reijo *et al.*, 1995; Vogt *et al.*, 1996; Pryor *et al.*, 1997, Foresta *et al.*, 2001) demostraron que las microdeleciones (deleciones no visible por citogenética convencional) en Yq11 pueden representar el factor etiológico en al menos 10 a 20 % de casos con azoospermia idiopática u oligozoospermia severa.

En un metaanálisis, Foresta *et al.* (2001) revisaron los datos publicados sobre más de 4,800 hombres infértiles que fueron analizados para microdeleciones del cromosoma Y, encontraron que los pacientes con deleciones del cromosoma Y con frecuencia tienen espermatozoides en el eyaculado o dentro del testículo y son por lo tanto, candidatos para técnicas de reproducción asistida. Sin embargo, los autores también notaron que a pesar de que el uso de espermatozoides portadores de deleciones en el cromosoma Y pueden producir embarazos, en tales casos, la anomalía genética invariablemente será transmitida al 100% de los descendientes masculinos.

La estructura del cromosoma Y en pacientes con azoospermia.

El papel del cromosoma Y en la espermatogénesis fue sugerido primeramente, como se mencionó anteriormente, por los estudios de Tiepolo y Zuffardi (1976), quienes realizaron

cariotipo en sangre a 1,170 hombres subfértiles e identificaron 6 individuos azoospermicos con deleciones detectables microscópicamente de Yq distal. En 4 casos en los cuales el padre fue evaluado, en todos el cromosoma Y se encontró intacto. Sobre la base de estas deleciones *de novo* en hombres azoospermicos, Tiepolo y Zuffardi (1976) propusieron la existencia de un gen de espermatogénesis, o “factor de azoospermia” (AZF), en Yq.

Mutaciones en las regiones del Factor de Azoospermia (AZF).

Vogt *et al.* (1996) analizaron a 370 hombres con azoospermia idiopática u oligozoospermia severa para deleciones en 76 loci de Yq11 y descubrieron microdeleciones en 13 pacientes. Tres pacientes mostraron una microdeleción en Yq11 proximal, tres tenían una microdeleción en D13-D16, y 7 tenían una microdeleción en D20-D22. Adicionalmente analizaron biopsias de testículo de los pacientes con deleciones en diferentes regiones de Yq11. Un paciente con una deleción en Yq11 proximal tenía sólo células de Sertoli pero sin células germinales visibles en todos los túbulos de las secciones de testículo. En tres pacientes con una microdeleción a la mitad de Yq11, la histología testicular reveló la detención de espermatogénesis en la etapa de espermatocito; las poblaciones de espermatogonias y espermatocitos eran normales en los túbulos pero ninguna célula germinal post-meiotica pudo ser detectada, lo que indicaba que la disrupción de la espermatogénesis ocurrió antes o durante la meiosis en la etapa de espermatocito. Los resultados del estudios de 5 pacientes con microdeleciones en la región distal de Yq11 sugirieron un defecto en las espermátides post-meióticas o en la maduración del esperma. Como las microdeleciones fueron encontradas en 3 subregiones diferentes de Yq11 que condujeron a la interrupción de espermatogénesis en fases diferentes del proceso, los autores propusieron la presencia de 3 sitios de espermatogénesis en Yq11, que designaron como AZFa, AZFb, y AZFc, que se activan durante una fase diferente del desarrollo de la célula germinal masculina.

Foresta *et al.* (2001), revisaron la literatura sobre datos publicados para microdeleciones de Y. Encontrando en general, que la prevalencia de microdeleciones del cromosoma Y fue del 4% en pacientes oligozoospermicos, 14% en hombres con olizoospermia severa idiopática, 11% en hombres azoospermicos, y 18% en azoospermicos idiopáticos. Los autores notaron que los criterios de selección de los pacientes aparentemente influenciaron substancialmente la prevalencia de las microdeleciones. Por otra parte no encontraron una clara correlación entre el tamaño, la localización de las deleciones y el fenotipo testicular, pero las deleciones más grandes fueron asociadas con el daño testicular más severo.

Foresta *et al.* (2005) propusieron que hombres infértiles pueden tener mayor probabilidad de presentar anomalías genéticas en comparación con hombres fértiles. En este reporte estudiaron 750 hombres con oligozoospermia severa que eran candidatos para inyección intracitoplásmica de esperma (ICSI) y 303 hombres fértiles. Analizaron el cariotipo de sangre periférica, el brazo largo del cromosoma Y para detección de microdeleciones en AZF, mutaciones en el gen de la fibrosis quística (*CFTR*) y en el gen del receptor de andrógenos (*AR*). Se descubrieron un total de 104 anomalías genéticas, correspondiendo a una frecuencia del 13.9%. Aberraciones cromosómicas estuvieron presentes en el 5.6% de hombres infértiles y solamente en el 0.3% de controles, la mayoría de estos casos fueron alteraciones de los cromosomas sexuales. Las microdeleciones de Yq estuvieron presentes en el 6.0% de hombres

infértiles y la mayor frecuencia estuvo relacionada con la región AZFc, mientras que en ninguno de los controles se encontraron estas últimas. Las mutaciones en *CFTR* fueron diagnosticadas en el 1.2% de hombres infértiles y el 1.0% de controles, y las mutaciones en *AR* fueron encontradas en el 1.1% de hombres infértiles y ninguno de los 188 controles.

Posteriormente, durante un período de 10 años, Ferlin *et al.* (2007) estudiaron a 3,073 hombres infértiles italianos, de los cuales 625 tenían azoospermia no obstructiva y 1,372 tenía oligospermia severa, e identificaron microdeleciones del Y en 99 individuos. La prevalencia de microdeleciones fue del 3.2% en hombres infértiles no seleccionados, el 8.3% en hombres con azoospermia no obstructiva, y el 5.5% en hombres con oligozoospermia severa. La mayoría de las deleciones eran del subtipo AZFc b2/b4 y estuvieron asociadas con un fenotipo testicular variable, con espermatozoides presente en el 72% de los casos. Las deleciones completas de AZFa y AZFb (P5/proximal P1) estuvieron asociadas con el síndrome de solo células de Sertoli y alteraciones en la maduración de los espermatozoides, respectivamente. Mientras que deleciones parciales en estas regiones fueron asociadas a un fenotipo menos grave y frecuentemente a la presencia de esperma. No se encontró ninguna microdelección de Yq fue en hombres con más de 5 millones de espermatozoides/mL o en 310 controles.

Actualmente ya existen experiencias importantes a nivel mundial sobre la detección de clínica de microdeleciones del cromosoma Y, como es el caso de experiencias multicéntricas en Alemania (Simoni *et al.*, 2008) y Francia (Aknin-Seifer *et al.*, 2004).

La frecuencia de alteraciones por región específicas de AZF se muestra en la Figura 1. Las aberraciones más comunes son las deleciones en la región AZFc que producen un fenotipo testicular variable y como segundo las de AZFb, siendo las más raras las que involucran la deleciones de varias zonas de AZF simultáneamente.

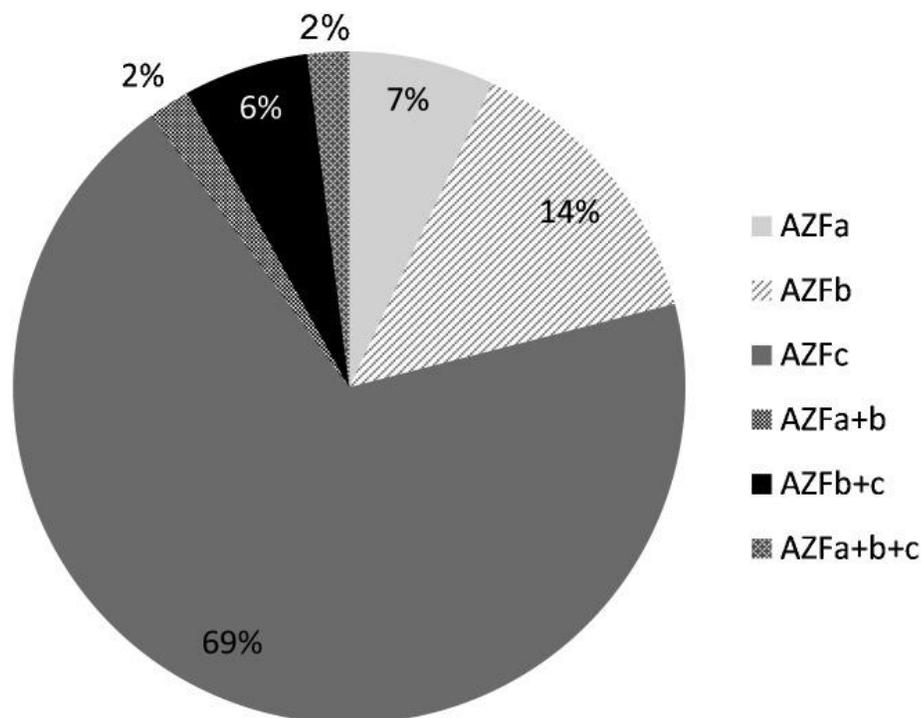


Figura 1. Prevalencia de microdeleciones en la región AZF.

Tomado de: Massart *et al.* 2012

Los tipos de microdeleciones del cromosoma Y y las familias de genes asociados a la región AZF se muestran en la Figura 2 y se resumen en la Tabla 1.

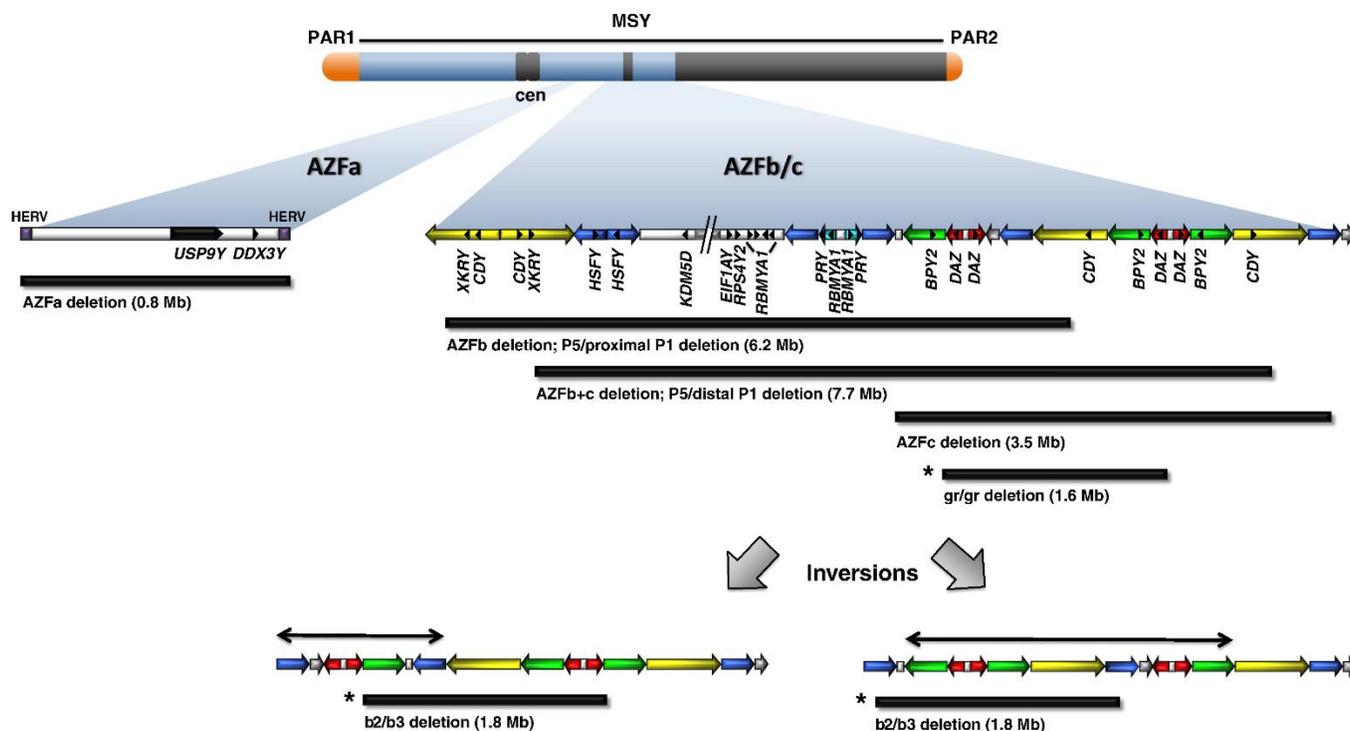


Figura 2. Región AZF con el tipo de microdeleciones, su nomenclatura, tamaño y familias de genes asociados.

Tomado de: Navarro-Costa, 2012

Región AZFa

La región AZFa es la porción más pequeña de AZF y corresponden aproximadamente a 792kb de DNA y fue secuenciada completamente en 1999. Es la porción proximal del intervalo 5, y corresponden a la localización cromosómica ~12.9-13.7 Mb. Esta región está caracterizada, a diferencia de la región AZFb o AZFc, de una estructura sin palíndromes, de una baja frecuencia de deleciones y de DNA de una sola copia. La región está flaqueada por dos elementos de retrovirus endógenos (human endogenous retrovirus: *HERV*), abarcando aproximadamente 10kb y demostrando identidad de secuencia aproximada de 94% que potencia la ocurrencia de rearrreglos mediados por los *HERV*. De acuerdo a esto la deleción completa de AZFa es el resultado de la recombinación homóloga no alélica entre los dos elementos *HERV* (Navarro-Costa et al., 2010).

La región AZFa contiene dos genes expresados de forma constitutiva con homólogos en el cromosoma X que escapan a la inactivación: *USP9Y* (ubiquitin specific peptidase 9) y *DDX3Y* (box polypeptide 2, Y linked). El gen *DDX3Y* (OMIM #400010) es un gen de copia única y

pertenece a la familia de las helicasas de RNA dependientes de ATP con el motivo DEAD box. Esta familia codifica para proteínas que regulan la transcripción, translación y empalme del RNA durante la fase G1 del ciclo celular. El homólogo en el X, *DDX3X*, con 91.7% de identidad se expresa constitutivamente con niveles máximos en el testículo. Se considera que *DDX3Y* es una especialización para las funciones en las etapas premeióticas de desarrollo germinal (Acosta-Navarro *et al.*, 2010).

El gen *USPY9* (OMIM #400005) codifica una proteasa de ubiquitina, perteneciente específicamente a la familia de las peptidasas de cisteína C19. Tiene un 91% de identidad con su homólogo en el X (*USP9X*) lo que sugiere roles semejantes. La expresión de *USPY9* esta restringidas a las espermátides en la línea germinal masculina. La evidencia actual es inconsistente sobre la función de *USPY9* sobre la espermatogénesis ya que aparentemente no es esencial para fertilidad masculina, pero mutaciones puntuales pueden estar asociadas a un arresto espermático, oligozoospermia y astenozoospermia (Hamada *et al.*, 2013). Tomando en cuenta esto se cree que *DDX3Y* es el determinante central del fenotipo testicular generado por las deleciones en AZFa.

La deleción completa de AZFa siempre está asociada con el Síndrome de solo células de Sertoli (Tabla 1) y es un evento raro correspondiendo a menos de 5% de las deleciones de AZF (Figura 1). Pero se estima que cerca del 95% de los casos de Síndrome de solo células de Sertoli están causados por la deleción en AZFa (Hamada *et al.* 2013).

Región AZFb

Actualmente se sabe que la región AZFb tiene un solapamiento con la región AZFc, ya que la porción distal de AZFb forma parte de AZFc (Figura 2), la región en su conjunto corresponde a aproximadamente 6.23 Mb y se encuentran en la región 18.1-24.7 Mb del cromosoma Y. Contiene tres genes de copia única, un arreglo de un satélite repetido DYZ19 y 14 amplicones multicopia. (Navarro-Costa *et al.*, 2010).

Las unidades de transcripción de secuencia única son 5 (Figura 2): *KDM5D* [lysine (K)-specific demethylase 5D], *EIF1AY* (eukaryotic translation initiation factor 1A,Y linked), *RPS4Y2* (ribosomal protein S4, Y linked 2), *TXLNG2P* (taxilin gamma 2, pseudogene) y el *CYORF15B* (Chromosome open reading frame 15b), estos genes aún no se estudian ampliamente y no se sabe si tienen una función directa con la espermatogénesis. Esta región contiene también 7 familias de genes multicopia (Figura 2): *XKRY* (XK, Kell blood group complex subunit-related, Y-linked), *HSHFY* (heat shock transcription factor, Y-linked), *RBMY1A1* (RNA binding motif protein, Y-linked, family 1, member A1), *PRY* (PTPN13-like, Y-linked) *CDY* (chromodomain protein, Y-linked), *BPY2* (basic charge, Y-linked, 2), y *DAZ* (deleted in azoospermia). Varios de estos genes también se localizan en la region AZFc. (Navarro-Costa *et al.*, 2010)

Dos genes codificantes de proteínas son considerados primarios en la función exclusiva de la región AZFb en la espermatogénesis: el gen *RBMY1A1* (OMIM# 400006) y el gen *PRY* (OMIM# 400019). Seis copias de *RBMY1A1* se localizan en la porción distal de AZFb y solo se expresan en células germinales, el gen se transcribe en 4 tipos de RNA específicos en los

testículos que se relacionan con el procesamiento de mRNA, transporte y empalme. Debido a su proximidad con AZFc, ciertas deleciones de AZFc (Figura 2 y Tabla 1) eliminan varias copias de *RBMY1A1*. Dos copias de *PRY* están localizadas en la región AZFb y aparentemente regulan la apoptosis. Se ha observado hipoespermatogénesis, manifestada como una oligoastenozoospermia en un paciente que tenía deletados todos los genes de AZFb excepto *RBMY1A1* y *PRY* (Shi *et al.*, 2011) Contrariamente cuando están deletados *RBMY1A1* y *PRY* la espermatogénesis se encuentra completamente arrestada (Hamada *et al.*, 2013)

El fenotipo testicular de las mutaciones completas de AZFb es de pacientes azoospermicos con un arresto en la maduración de las células germinales (Tabla 1). Este arresto ocurre en la etapa de espermatocono/espermátide, pero en algunos casos raros se ha reportado que se puede completar la espermatogénesis en algunos túbulos. Por tanto la posibilidad de encontrar espermatozoides en los testículos de estos pacientes es extremadamente remota (Navarro-Costa, 2012).

Región AZFc

La región AZFc es uno de los dominios más interesantes del genoma humano, ya que muestra una complejidad estructural y funcional que solo es comparable con el complejo mayor de histocompatibilidad en el cromosoma 6. La secuenciación de esta región implicó un esfuerzo monumental y requirió el desarrollo de nuevas técnicas analíticas. Esta región está compuesta exclusivamente por amplicones, de alta homología intrafamiliar, lo que hace que sea un sustrato para rearrreglos estructurales a larga escala en AZFc (deleciones, duplicaciones e inversiones) (Navarro-Costa *et al.*, 2010).

Aproximadamente el 95% de esta región corresponde a familias de amplicones (Figura 2). La región contiene un palíndromo grande (P1) y uno más pequeño (P2), así como un segmento b2-u3-g1. Siete familias de genes distintas incluyendo 23 genes se encuentran en la región AZFc (Figura 2), así como un arreglo extensivo de pseudogenes. Estas familias incluyen a *PRY* (2 copias), *TTYT* (8 copias), *BPY* (3 copias), *DAZ* (4 copias), *GOLGA2LY*: golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2-like Y linked (2 copias), *CSPG4LYP1*: chondroitin sulfate proteoglycan 4-like, Y-linked pseudogene 1 (2 copias) y *CDY* (dos copias) (Hamada *et al.*, 2013).

Entre los genes codificantes de proteínas más importantes se encuentran *CDY1* (OMIM# 400016) y *CDY2* (OMIM# 400018) que pertenecen a la familia de proteínas con cromodominio y su función está relacionada con la acetilación de histonas para modificación de cromatina. Sin embargo cuando están deletados aparentemente no hay alteraciones en el nivel de hiperacetilación de las espermátides en desarrollo en comparación con hombres con hipoespermatogénesis ya que otras copias, incluidas las de los autosomas lo compensan. Su función más relevante es en la etapa de remplazo de histonas a protaminas en los núcleos de las espermátides (Hamada *et al.*, 2013).

Los genes *DAZ* (OMIM # 400003) son los protagonistas de la función espermática de AZFc ya que están asociados al establecimiento y mantenimiento de la línea germinal masculina. Otros miembros de esta familia de proteínas de unión a RNA son *BOLL* y *DAZL*, pero la familia *DAZ* solo se encuentra en el cromosoma Y, correspondiendo a 4 copias *DAZ1* a *DAZ4*, esto

genera que existan variaciones en el número de copias entre cromosomas Y deletados y no deletados. Estos genes codifican para 4 isoformas de proteínas que se expresan a nivel testicular en las espermatogonias, su formación aparente es orquestar el programa espermatogénico a través de regulación de la traducción de RNA (Navarro-Costa, 2010)

Las deleciones completas de AZFc denominadas b2/b4 (Figura 2) ocurren por recombinación entre los amplicones b2 y b4 de la parte distal de P3 y P1. Esta deleción impacta en aproximadamente 3.5 Mb de la secuencia del Y y remueve todas las copias de *DAZ*, *BPY2* y reduce el número de copias de *CDY*. El fenotipo clínico variable de estas deleciones deja claro que existen una intrincada regulación de los determinante genéticos de AZFc (Navarro-Costa, 2012).

Los hombres con microdeleciones completas AZFc tienen un fenotipo variable seminal y testicular, en los que los niveles de producción espermática varían de azoospermia a oligozoospermia severa (que raramente excede un millón de espermatozoides por mL). Sin embargo la presencia de espermatozoides en el eyaculado es algo frecuente (en 50-60% de los casos). La concepción natural es extremadamente rara debido a la baja cuenta espermática. Este tipo de mutaciones corresponden a cerca del 60% de los pacientes con una microdeleción del cromosoma Y (Figura 1), lo que corresponde a cerca de 1 en 4,000 hombres (Navarro-Costa *et al.*, 2010). Estas deleciones explican 12% de los casos con azoospermia no obstructiva y 6% de los casos con oligozoospermia severa (Hadama *et al.*, 2013).

Microdeleciones “parciales” del cromosoma Y.

Las principales deleciones “parciales” descritas en AZFc se denominan gr/gr, b1/b3 y b2/b3 (Figura 2). La deleción gr/gr (Figura 2) remueve aproximadamente la mitad de la región AZFc (1.6 Mb). La deleción b1/b3 remueve la región proximal de AZFc, incluyendo 2 de las seis copias de *RBMY1A1*, las dos copias funcionales de *PRY*, una de las tres copias de *BPY2* y dos de las cuatro copias de *DAZ*, a pesar de esto se han encontrado deleciones de 1.8 Mb en individuos fértiles normozoospermicos. Finalmente la deleción b2/b3 (Figura 2) remueve cerca de la mitad del región AZFc (1.8 Mb), que corresponde a 12 genes, incluyendo 2 copias de *DAZ* y dos copias de *BPY* (Hamada *et al.*, 2013).

Estas variantes generadas por la estructura repetitiva del cromosoma Y a nivel de la región AZFc (Figura 2) continúan siendo altamente estudiadas y discutidas, con el objetivo de determinar su contribución a la infertilidad masculina. Las más reportadas son las deleciones gr/gr (Figura 1 y Tabla 1), que su rol en falla testicular, especialmente oligozoospermia es controversial ya que esta variante también se encuentra en pacientes sin alteraciones testiculares y prevalencia más elevadas en los pacientes con falla testicular no ha podido ser replicada en todas las poblaciones estudiadas. No obstante un metanálisis reciente de más de 6,000 casos y más de 6,000 controles indica una asociación estadísticamente significativa de las deleciones gr/gr con infertilidad masculina con un grado moderado de heterogeneidad (Stouffs *et al.*, 2011).

Las del tipo b1/b3 no han sido fuertemente asociadas a alteraciones espermáticas (Eloualid *et al.*, 2012, Hamada *et al.*, 2013). Recientemente las del tipo b2/b3 (Tabla 1) han sido claramente asociadas a pacientes con falla testicular (Eloualid *et al.*, 2012).

Tabla 1. Tipos de microdeleciones del Y más frecuentes

Tipo de microdelección	Fenotipo en la línea germinal	Familia de genes afectados	Mecanismo responsable
AZFa	Ausencia completa de células germinales en los testículos	<i>USP9Y</i> y <i>DDX3Y</i>	Recombinación homóloga intracromosómica por las regiones HERV.
AZFb (P5/proximal P1 deletion)	Arresto en la maduración de prácticamente todas las células germinales en desarrollo	<i>XKRY</i> , <i>CDY</i> , <i>HSFY</i> , <i>KDM5D</i> , <i>EIF1AY</i> , <i>RPS4Y2</i> , <i>RBMYL1A1</i> , <i>PRY</i> , <i>BPY2</i> y <i>DAZ</i>	Recombinación homóloga intracromosómica entre los dominios proximales de los palíndromos P5 y P1. Una minoría de las deleciones son causadas por mecanismo de recombinación no-homologa
AZFb+c (P5/distal P1 deletion)	Arresto en la maduración de prácticamente todas las células germinales en desarrollo	Los mismos que en la deleción AZFb. Pero las familias <i>BPY2</i> y <i>DAZ</i> se remueven completamente	Recombinación homóloga intracromosómica entre los dominios proximales de los palíndromos P5 y P1. Una minoría de las deleciones son causadas por mecanismo de recombinación no-homologa
AZFc (b2/b4 deletion)	Producción espermática severamente disminuida por una mezcla de atrofia de células germinales en el testículo	<i>BPY2</i> , <i>DAZ</i> y <i>CDY</i>	Recombinación homóloga intracromosómica entre los amplicones b2 y b4 localizados en la parte distal de los palíndromos P3 y P1 respectivamente
gr/gr (partial AZFc)	Probable factor de riesgo para alteraciones espermáticas en poblaciones asiáticas y europeas	Los mismos que en las deleción de AZFc, pero las tres familias de genes no son eliminadas completamente	Recombinación homóloga intracromosómica entre los amplicones verde y rojo (Figura 2) de la región AZFc.
b2/b3 (partial AZFc)	Factor de riesgo para alteraciones espermáticas en población asiática. Este riesgo puede estar asociada al presencia de duplicaciones en AZFc	Falla espermática no claramente descrita aun.	Recombinación homóloga en un dominio AZFb/c invertido. La identidad de los amplicones involucrados en la inversión varía dependiendo del tipo de inversión.

Modificado de: Navarro-Costa, 2012

Impacto de las microdeleciones del Y sobre la aplicación de las técnicas de reproducción asistida.

A nivel testicular se saben cuáles son los efectos del tipo de microdelección del cromosoma Y, como se describió previamente. Sin embargo, poco se sabe sobre las características morfológicas o funcionales en los espermatozoides de estos pacientes, se ha reportado ocasionalmente la presencia de microdeleciones del Y en DNA espermático en algunos casos de teratozoopermia (Choi *et al.*, 2004; Hellani *et al.*, 2005; van Golde *et al.* 2001). A nivel hormonal y clínico en algunas poblaciones, como la de origen chino se ha reportado un incremento mayor en el niveles de FSH y volumen testicular menor en los pacientes oligozoospermicos severos/azoospermicos que tienen microdeleciones del Y (Chiang *et al.*, 2004)

En reportes previos no se había considerado un desarrollo embrionario disminuido al utilizar espermatozoides de pacientes de microdeleciones del Y en técnicas complejas de reproducción asistida (Kihaila *et al.*, 2004) Recientemente se ha descrito que los pacientes con microdeleciones del Y presenta un porcentaje elevado de anomalías cromosómicas numéricas detectadas por FISH en espermatozoides, en comparación con pacientes oligozoospermicos sin microdeleciones del Y (Mateu *et al.*, 2010). Al usar estos espermatozoides en los embriones no se encontraron diferencias la fertilización o el desarrollo embrionario, excepto en la formación de blastocitos y en el porcentaje de embriones con monosomía del cromosoma X (Mateu *et al.* 2010).

Lineamientos para el diagnóstico de las microdeleciones del cromosoma Y.

Existen lineamientos de laboratorio específicos emitidos por el European Molecular Quality Network (EMQN) y la European Academy of Andrology (EAA), sobre las implicaciones del diagnóstico molecular de las microdeleciones del Y, los marcadores (STSs) y la metodología que se deben emplear. Estas metodologías fueron determinadas en base al conocimiento del mecanismo de producción de las microdeleciones (Simoni *et al.*, 2004).

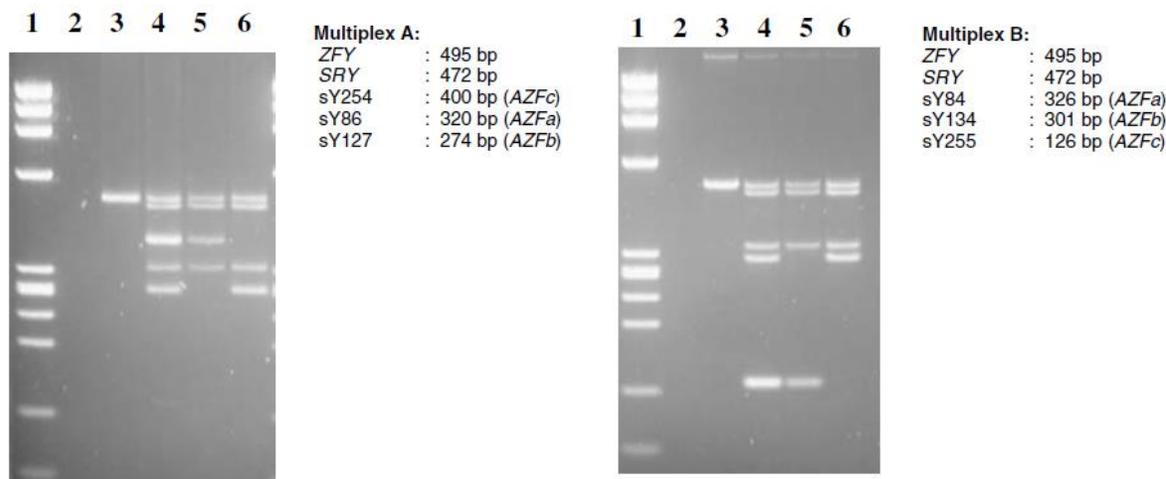


Figura 3. Ejemplos de reacciones multiplex según los lineamientos de la EEA/EMQN demostrando los STS empleados. En ambas multiplex, carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: agua, carril 3: DNA de mujer, carril 4: DNA de un hombre normal, carril 5: DNA de un paciente con delección AZFb (P5/proximal P1), carril 6: DNA de un paciente con delección AZFc (b2/b4).

Tomado de: Simoni et al. 2004

Los expressed sequence tags (STSs) que deben ser utilizados son para la zona AZFa son: sY84, sY86, para la zona AZFb: sY127, sY134 y para la zona AZFc: sY254, sY255 (Figura 3 y 4), que en general detectan 95% de las mutaciones de relevancia clínica (Simoni *et al.* 2004).

El diagnóstico a nivel de laboratorio se lleva a cabo realizando dos PCR múltiplex (Figura 3) que contiene dos STS de control (uno localizado en cromosomas X y Y: *ZFY* y el otro específico del cromosoma Y: *SRY*). En cada reacción se analizan 3 marcadores STS de los 6 recomendados (Figura 3). Esta técnica es robusta y relativamente sencilla, ya que el diagnóstico se basa en la presencia o ausencia del marcador. Debido a que los hombres al tener solo un cromosoma Y, las deleciones llevan a un fallo en la amplificación del STS en la PCR y permiten detectar la presencia de microdeleciones (Simoni *et al.*, 2004).

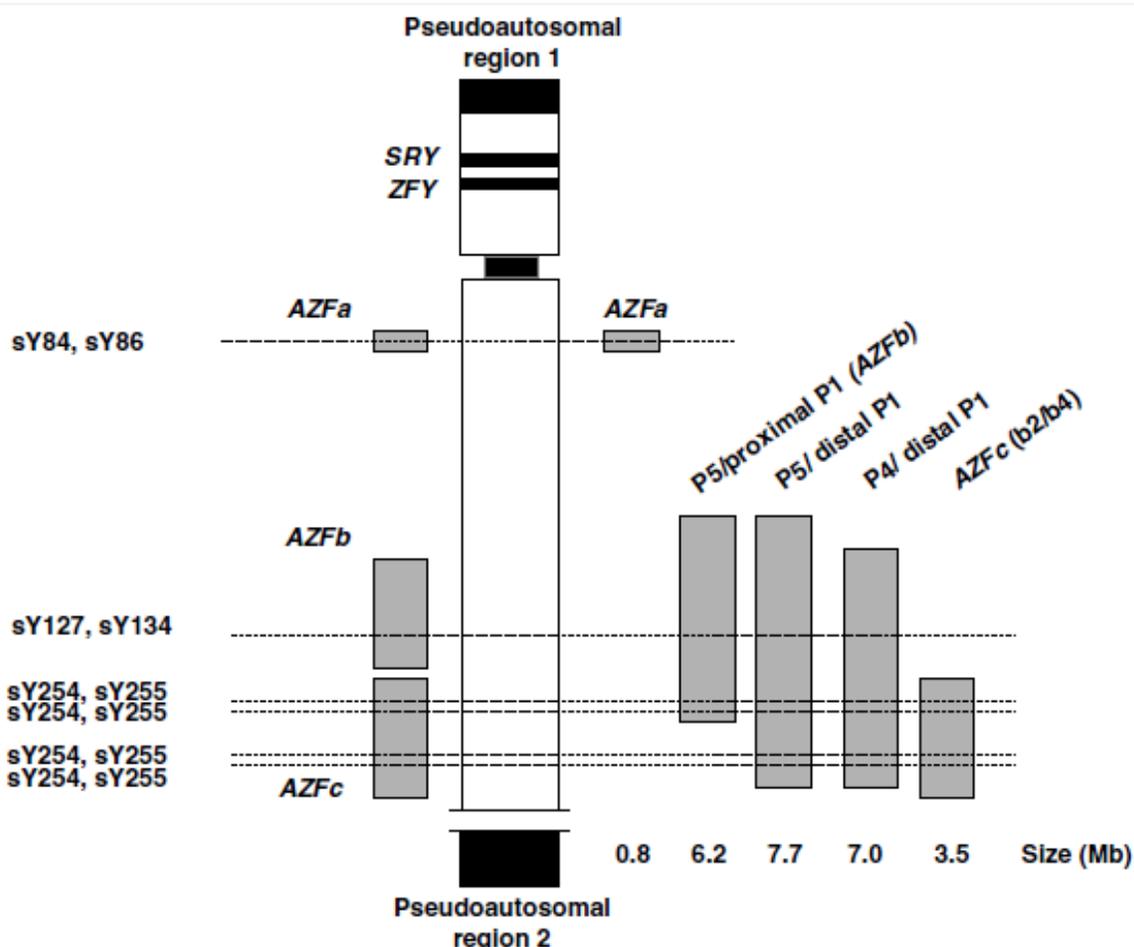


Figura 4. **Marcadores empleados para el diagnóstico de las microdeleciones del cromosoma Y según la EEA/EMQN.** Se muestran la localización en AZFc y el tipo de microdeleción.

Tomado de: Simoni *et al.* 2004

Los laboratorios que se dediquen al diagnóstico molecular de microdeleciones del cromosoma Y en un contexto clínico deben seguir estos lineamientos, lo que permite ser certeros en el diagnóstico integral y en el consecuente asesoramiento genético.

Estudios genéticos en hombres infértiles mexicanos.

Las variantes genéticas asociadas a infertilidad masculina en pacientes mexicanos ha sido revisadas recientemente (Piña-Aguilar *et al.* 2013). Los estudios reportados incluyen estudios citogenéticos, de microdeleciones del Y y del número de repetidos CAG en el receptor de andrógenos y se resumen en la Tabla 2.

Se tienen reportes del estudio cromosómico de hombres infértiles en México desde los años 80 (Tabla 2). Rivas *et al.* (1987) en Guadalajara estudiaron a 163 pacientes azoospermicos encontrando alteraciones cromosómicas en 23.3% (38/163) de los pacientes estudiados, siendo la alteración más frecuente el cariotipo: 47,XXY (31/38), seguido de otras alteraciones que involucraban principalmente cromosomas sexuales: varón 46,XX; 46,X,del(Y)(q11); 46,X,r(Y); 46,XY,inv(1)(p35q21.3)mat; y 46,Y,t(X;3)(q26;q13.2)mat. (Rivas *et al.*, 1987). En otros reportes más recientes, en el norte del país, Cortes-Gutiérrez *et al.* (2004) estudiaron 326 hombres infértiles (204 con oligozoospermia, 87 con azoospermia y 35 con normozoospermia) encontrando alteraciones cromosómicas en cinco pacientes con oligozoospermia [dos pacientes: 47,XXY, dos pacientes: 47,XY,inv(14) y uno 46,XY,t(16p;1p)] y dos con azoospermia [46,XY,t(5q;q14) y 45,XY,t(13q;14q)]. También se encontró un incremento en los polimorfismos de la heterocromatina y de los satélites en oligozoospermicos y azoospermicos respecto a normozoospermicos. Siendo para la heterocromatina del 13.7% en los oligozoospermicos, 21.8% en los azoospermicos y de 5.7% en los normales. En el incremento de tamaño de satélites fue de 7.3% en oligozoospermicos, 8% en los azoospermicos mientras que solo de 2.8% en los normales (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2004). Posteriormente, Meza-Espinoza *et al.* (2006) estudiaron 227 pacientes azoospermicos, encontrando que 18.9% (43 casos) presentaban un cariotipo anormal, siendo el más frecuente 47,XXY en 35 sujetos (que corresponden al 15.4% del total de estudiados) y en 6 casos se encontraron alteraciones estructurales: 2 translocaciones Robertsonianas [(45,XY,t(13;22)(p11;p11) y (45,XY,t(13;15)(p11;p11)] y tres mosaicos que involucraban cromosomas sexuales [mos45,X/46,X,idic(Y)(q11)] (Meza-Espinoza *et al.* 2006).

Otro grupo estudió pacientes con oligozoospermia severa y azoospermia que acudieron a clínica de infertilidad en búsqueda de tratamiento con técnicas de reproducción asistida de alta complejidad y se encontró que 11% (9/82) presentaban alteraciones cromosómicas (Martínez-Garza *et al.*, 2008). Ocho de las nueve aberraciones fueron detectadas en los pacientes azoospermicos, siendo 5 pacientes 47,XXY, uno 47,XYY; uno 46,XY,Yq- y otro 46,XY,inv(9). Solo un paciente con oligozoospermia severa presentaba cariotipo anormal:46,XY,t(1;15)Lq(12;q25) (Martínez-Garza *et al.*, 2008). Otro estudio realizado parejas infértiles provenientes del centro del país, encontró que en el grupo de pacientes con falla reproductiva por factor masculino severo un cariotipo alterado en 34 (14.8%) de los hombres (Romero-Tovar *et al.*, 2009). La presencia de alteraciones cromosómicas es sin duda la variante más estudiada en hombres mexicanos infértiles.

Pese los reportes previos a nivel global, la prevalencia de microdeleciones del cromosoma Y en México es pobremente estudiada. En nuestro país existen varios laboratorios asociados a clínicas de reproducción asistida, principalmente privados, que ofrecen el estudio de las microdeleciones del cromosoma Y como parte del estudio del hombre infértil; pero lamentablemente solamente existe un artículo ha detallado la presencia de alteraciones cromosómicas en pacientes con infertilidad de causa masculina (Martínez-Garza *et al.*, 2008) y otro en hombres de parejas con aborto recurrente (Piña-Aguilar *et al.*, 2012). Martínez-Garza *et al.* (2008) analizaron 82 pacientes infértiles con oligozoospermia y azoospermia, encontrando que 11% presentaban alteraciones cromosómicas y 12.2% microdeleciones del cromosoma Y. Estas últimas presentándose en 12% de los pacientes azoospermicos y 14.3% de los pacientes con oligozoospermia severa. Hasta ahora no se conocen la prevalencia de estas microdeleciones parciales (gr/gr) y b2/b3 en población mexicana.

En lo que respecta a la azoospermia obstructiva. El estudio de la patogenia molecular de la fibrosis quística en nuestro país ha reportado la presencia de 46 mutaciones diferentes y se ha propuesto que México es uno de los países con un espectro amplio de mutaciones de *CTFR* comparado a lo reportado a nivel mundial. (Chávez-Saldaña *et al.*, 2010). Específicamente en el caso de la ausencia congénita de vasos deferentes, recientemente se reportó el estudio de 16 pacientes con CAVD y 33 casos de pacientes con azoospermia idiopática, encontrando las mutaciones: p.F508del, p.G85E, p.D1152H y p.W1089* en 3 pacientes con CBAVD (18.8%) y concluyendo que el polimorfismo IVS8-Tn no está involucrado en la etiología de CBAVD en población mexicana (Saldaña-Álvarez *et al.* 2012). En los pacientes con azoospermia estudiados no se encontró ninguna de las 9 mutaciones de *CTFR* analizadas. (Saldaña-Álvarez *et al.* 2012) Otro reporte previo tampoco encontró ninguna de las 35 mutaciones estudiadas del gen de fibrosis quística ni el polimorfismo IVS8-Tn en pacientes azoospermicos (Martínez-Garza *et al.*, 2008).

El estudio original (La Spada *et al.*, 1991) que exploró la etiología de la enfermedad de Kennedy utilizando análisis de ligamiento, incluyó una familia mexicana y encontró al gen *AR* como candidato. Martínez-Garza *et al.* (2008) estudiaron el número de repetidos del exón 1 del *AR* en pacientes mexicanos con oligozoospermia y azoospermia, encontrando que no existían diferencias en el número de CAG respecto a los controles, siendo 20 el promedio del número de repetidos para la población estudiada. También se ha publicado un resumen con la descripción de una familia mexicana afectada con enfermedad de Kennedy con 8 varones afectados, que presentaron 52 repetidos de CAG en el receptor de andrógenos (Monarres-Alvarado *et al.*, 2006) (Tabla 2).

Tabla 2. Estudios que reportan variantes genéticas en hombres infértiles mexicanos

Cromosómicas			
Pacientes	Prueba genética	Hallazgos	Autor
163 pacientes azoospermicos	Cariotipo en sangre periférica	38/163(23.3%)	Rivas <i>et al.</i> 1987
326 hombres infértiles	Cariotipo en sangre periférica	5/326 (1.5%)	Cortes-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2004
227 pacientes azoospermicos	Cariotipo en sangre periférica	43/227(18.29%)	Meza-Espinosa <i>et al.</i> 2008
82 pacientes con oligozoospermia severa y azoospermia	Cariotipo en sangre periférica	9/82(11%)	Martínez-Garza <i>et al.</i> 2008
Hombres con factor masculino severo en parejas infértiles	Cariotipo en sangre periférica	34/229(14.8%)	Romero-Tovar <i>et al.</i> , 2009
Microdelecciones del Y			
Pacientes oligozoospermicos y azoospermicos	Búsqueda de microdelecciones del Y según lineamientos de la EAA/EMQN	82(12%)	Martínez-Garza <i>et al.</i> , 2008
Variantes del gen Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)			
28 pacientes azoospermicos	Búsqueda de 35 mutaciones en gel <i>CFTR</i>	0/28 (0%)	Martínez-Garza <i>et al.</i> , 2008
16 pacientes con ausencia congénita de vasos deferentes y 33 pacientes con azoospermia idiopática	Búsqueda de 9 mutaciones del gen <i>CFTR</i>	CAVD: 3/16 (18.8%) Azoospermicos: 0/33 (0%)	Saldaña-Alvarez <i>et al.</i> , 2012
Expandidos CAG del receptor de andrógenos (AR)			
Familia mexicana con enfermedad de Kennedy	Secuenciación del exón 1 de <i>AR</i>	8 varones afectados con 52 repetidos de CAG	Monarres-Alvarado <i>et al.</i> , 2006
65 pacientes con infertilidad idiopática	PCR y electroforesis para detección de tamaño del expandido en el exón 1 de <i>AR</i>	Sin diferencias en el número de repetidos CAG entre hombres oligozoospermicos siendo la media de 20 repetidos	Martínez-Garza <i>et al.</i> , 2008

Tomado de: Piña-Aguilar *et al.*, 2013

II. Planteamiento del problema

El Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSSTE es el centro de referencia a nivel nacional para todos los derechohabientes con infertilidad que requieren un procedimiento de reproducción asistida de alta complejidad como parte de su tratamiento.

Como parte de un protocolo integral de manejo, todas las parejas infértiles referidas al Servicio de Reproducción son valoradas por el Servicio de Genética. Es por ello que considerando que aproximadamente el 50% de las parejas tienen una causa masculina de infertilidad, es importante conocer las características clínicas, seminales, hormonales y genéticas de los hombres infértiles con alteraciones espermáticas, la causa más importante de infertilidad masculina.

Hasta ahora la evaluación genética en nuestro Centro Médico solo había incluido el cariotipo en sangre periférica. A través del presente estudio se plantea conocer las características a varios niveles de los hombres azoospermicos/oligozoospermicos y ampliar su estudio genético para incluir las microdeleciones del cromosoma Y, estudio que no se dispone a nivel institucional.

La incorporación de estas técnicas en el contexto puede permitir un asesoramiento genético más adecuado ya que en el Servicio de Reproducción se realizan procedimientos como inyección intracitoplásmica de esperma con biopsia testicular que implica un riesgo incrementando de transmisión de alteraciones genéticas.

III. Justificación

Las alteraciones cromosómicas, son una de las causas que explica aproximadamente el 20% de los casos de infertilidad masculina. Su estudio es indispensable para poder dar un asesoramiento genético y un pronóstico reproductivo adecuado. Por lo que detectar la presencia de alteraciones cromosómicas en pacientes masculinos infértiles es una práctica obligada en el estudio del hombre infértil. En el presente estudio se planteó conocer la presencia de dichas alteraciones en la población de pacientes infértiles que se atienden en el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSSTE y las características clínicas o seminales/testiculares presentes en estos.

Las microdeleciones del cromosoma Y, son la segunda causa genética de infertilidad masculina. Se considera que están presentes en 15% de los pacientes con azoospermia y 5% de los pacientes con oligozoospermia severa. Normalmente los pacientes con microdeleciones del cromosoma Y son infértiles, sin embargo el advenimiento de técnicas de reproducción asistida (como la fertilización *in vitro* y el ICSI) puede permitir que estos pacientes tengan descendencia. Desde la perspectiva genética esto es un riesgo importante para la descendencia, ya que el padre portador de una microdelección del cromosoma Y la transferiría al 100% de sus hijos varones, los cuales serán infértiles también. Es por ello que el presente estudio permitió implementar el diagnóstico molecular de las microdeleciones del cromosoma Y en nuestro Centro y beneficiara en un futuro directamente a los pacientes que se someten a técnicas de reproducción asistida por causa masculina.

En conjunto este estudio repercute directamente en el tratamiento de los pacientes con infertilidad que son derechohabientes del ISSSTE y convierte al Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” en pionero en el país en la aplicación de técnicas de diagnóstico molecular completo para pacientes con infertilidad masculina.

IV. Objetivos

Objetivo general

Describir las alteraciones genéticas (cromosómicas y microdeleciones del cromosoma Y), características clínicas y seminales en pacientes infértiles azoospermicos no obstructivos y oligozoospermicos atendidos en el ISSSTE, con el fin de poder brindar en un futuro un tratamiento y asesoramiento genético más adecuado.

Objetivos específicos.

- a) Estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa múltiplex para la detección de microdeleciones del cromosoma Y usando los lineamientos de la European Academy of Andrology/European Molecular Quality Network.
- b) Obtener la información necesaria para el estudio como es historia clínica completa, evaluación clínica y estudios de laboratorio (incluyendo cariotipo con bandas G) a los pacientes seleccionados.
- c) Describir las características presentes entre pacientes infértiles con alteraciones en cariotipo y con microdeleciones del Y, así como características clínicas y seminales/testiculares (fenotipo testicular, características espermáticas).

V. Material y Métodos

Diseño del estudio.

El presente estudio es un estudio descriptivo del tipo de series de casos, donde se incluyeron a los pacientes consecutivos enviados por oligozoospermia y azoospermia al Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” manejados por el Servicio de Reproducción Humana.

A los hombres dentro del protocolo de manejo de la pareja infértil se les realiza de manera rutinaria los siguientes estudios que son relevantes para el presente estudio:

- a) Examen físico detallado, incluyendo determinación de volumen testicular y características sexuales secundarias.
- b) Espermatobioscopia directa.
- c) Determinación de biometría hemática, química sanguínea con perfil de lípidos y perfil hepático.
- d) Determinación de panel de anticuerpos contra virus de la hepatitis B y C, virus de la inmunodeficiencia humana y perfil TORCH.
- e) Realización de espermocultivo y determinación de infección por *Chlamydia* y *Mycoplasma*.
- e) Determinación de perfil tiroideo.
- f) Determinación de hormonas: FSH, LH, testosterona y prolactina.
- g) Ultrasonido testicular
- i) En los pacientes azoospermicos también se realiza una biopsia testicular diagnóstica/terapéutica.
- h) Consulta por el servicio de Genética Médica y cariotipo de sangre periférica con bandas GTG con un nivel de resolución de por lo menos 450 bandas.

Para propósitos de inclusión en el estudio se utilizaron las siguientes definiciones, de acuerdo a los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud de 1999 (WHO, 2009), para poder hacerlos comparativos con los resultados publicados previamente en la literatura médica internacional:

Paciente oligozoospermico: Paciente con eyaculado con una concentración menor a 20 millones de espermatozoides/mL o con una concentración menor a 40 millones en el eyaculado total.

Paciente azoospermico: Paciente con eyaculado sin espermatozoides después de centrifugado del eyaculado.

Criterios de inclusión.

Pacientes con oligozoospermia o azoospermia confirmada en este Centro Médico de acuerdo a los criterios mencionados previamente.

El protocolo del presente estudio está aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” con número de folio 724 y tiene registro ante el ISSSTE con número: 217.2012. Todos los pacientes incluidos en el estudio aceptaron participar

y firmaron un consentimiento informado (Anexo 1) antes de que se les tomara la muestra de sangre.

Criterios de exclusión.

Se excluyeron a los pacientes en los que durante la evaluación se documentaron las siguientes condiciones:

1. Exposición a contaminantes ambientales, conocidos que afecten a la reproducción (entre los que se encuentran rayos X, pesticidas u organofosforados, metales pesados).
2. Diabetes mellitus.
3. Hepatitis B o C
4. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
5. Varicocele importante (grado 3 y 4)
6. Presencia de infección por Chlamydia.
7. Cáncer testicular u otra patología oncológica que en su tratamiento incluyera quimioterapia y/o radioterapia previa.
8. Pacientes con datos que apoyen azoospermia obstructiva.

Criterios de eliminación.

Se eliminaron pacientes que no completaron el protocolo completo de estudio o que en cualquier momento no quieran continuar siendo parte del estudio.

Dentro de los pacientes en los que se hayan realizado estos estudios iniciales, se seleccionaran los pacientes que incorporados en el presente estudio, en quienes se les realizó la determinación de microdeleciones del cromosoma Y, usando los criterios validados por la EAA y el EMQN (Simoni *et al.*, 2004) y cariotipo en sangre periférica usando la técnica de bandas GTG en quienes no se hubiera realizado previamente como parte de su manejo.

Metodología para el análisis de microdeleciones del cromosoma Y.

Técnica de extracción de DNA de linfocitos de sangre periférica.

El procedimiento de extracción de DNA se realizó en dos fases, la primera incluyó los siguientes pasos:

1. Se tomaron 500 µl de sangre total anticoagulada con EDTA y se depositaron en un microtubo de 1.5 ml
2. Se adicionaron 500 µl de solución de lisis de eritrocitos (cloruro de amonio, EDTA, bicarbonato de sodio) y se mezcló en el vórtex
3. Se incubó 30 min a 4 grados C
4. Se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min y se decantó el sobrenadante
5. Se lavó con 1 ml de solución de lisis y se mezcló en el vórtex
6. Se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min y se decantó el sobrenadante
7. Se adicionó 1 ml de solución salina y se mezcló en el vórtex.
8. Se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min y se decantó el sobrenadante

9. Se resuspendió el botón en 570 μ l de NaCl 5.0 mM y se mezcló en el vórtex.
10. Se adicionaron 40 μ l de SDS al 10% v/v y se mezcló en el vórtex por 5 min.
11. Se adicionaron 200 μ L de NaCl saturado y se mezcló en el vórtex.
12. Se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min
13. Se recuperó la fase líquida.
14. Se adicionaron 600 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 49:1 y se mezcló en el vórtex por 2 min.
15. Se centrifugó a 14,000 rpm por 6 min
16. Se transfirió la fase superior del tubo a un frasco estéril conteniendo 5 ml de etanol absoluto frío (-20 grados C)
17. Se almacenó toda la noche a -20 grados C dentro del congelador.

La segunda fase del procedimiento incluyó:

1. Tomar con la micropipeta cuidadosamente el DNA flotante dentro del etanol y transferirlo a un microtubo de 0.5 ml que contiene 400 μ l de etanol al 70-75% v/v.
2. Se centrifugó a 14,000 rpm por 6 min y se decantó el etanol
3. Se dejó secar el DNA dentro del tubo a temperatura ambiente.
4. Posteriormente se resuspendió el botón de DNA con agua libre de DNAsas de acuerdo al tamaño del botón.

Por último se cuantificó la concentración del DNA por espectrofotometría UV usando un espectrofotómetro Nanodrop® (Thermo Scientific) y tomando la razón 260/280 como calidad de la extracción del DNA. Adicionalmente la integridad del DNA se verificó en un gel de agarosa al 1%.

Realización de la PCR múltiplex para detección de microdeleciones del cromosoma Y de acuerdo a los lineamientos de la EAA/EMQN (Simoni et al., 2004).

Las secuencias de oligonucleótido en dirección 5'-3' empleadas en este ensayo son las siguientes:

ZFY-F	ACCRCTGTA CTGACTGTGATTACAC
ZFY-R	GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT
SRY-F	GAATATTCCCGCTCTCCGGA
SRY-R	GCTGGTGCTCCATTCTTGAG
sY84F	AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT
sY84R	GCCTACTACCTGGAGGCTTC
sY86F	GTGACACACAGACTATGCTTC
sY86R	ACACACAGAGGGACAACCCT
sY127F	GGCTCACAAACGAAAAGAAA
sY127R	CTGCAGGCAGTAATAAGGGA
sY134F	GTCTGCCTCACCATAAAACG
sY134R	ACCACTGCCAAAACCTTCAA
sY254F	GGGTGTTACCAGAAGGCAAA
sY254R	GAACCGTATCTACCAAAGCAGC
sY255F	GTTACAGGATTCGGCGTGAT
sY255R	CTCGTCATGTGCAGCCAC

Se preparó un stock de oligos a una concentración de 200 μ M/ μ l y posteriormente se prepararon alícuotas de cada oligos a una concentración de 2 μ M/ μ l (1 μ l del stock + 99 μ l de agua).

Posteriormente se prepararon 2 mezclas de oligonucleótidos al 10x (20 μ l de cada alícuota de *oligo* a 2 μ M/ μ l, para 20 reacciones), una para cada reacción multiplex:

Oligos del Mix A:

ZFY F	ZFY R
SRY F	SRY R
sY254 F	s254 R
sY86 F	sY86 R
sY127 F	sY127 R

Oligos del Mix B:

ZFY F	ZFY R
SRY F	SRY R
sY84 F	sY84 R
sY184 F	sY184 R
sY255 F	sY255 R

Los componentes de PCR para la reacción multiplex A fueron:

Componente	1x	3x
H ₂ O	14.2 μ l	42.6 μ l
Buffer (10x)	2.5 μ l (1x)	7.5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	1 μ l (2mM)	3 μ l
dNTP's (10mM)	1 μ l (0.2 mM)	3 μ l
Primers Mix A (2 μ M c/u)	5 μ l	15 μ l
Taq (5U/ μ l)	0.3 (1.5U)	0.9 μ l
DNA (100ng/ μ l)	1 μ l	---
Volumen final	25 μ l	24 μ l para c/tubo

Los componentes de PCR para la reacción multiplex B fueron:

Componente	1x	3x
H ₂ O	14.2 μ l	42.6 μ l
Buffer (10x)	2.5 μ l (1x)	7.5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	1 μ l (2mM)	3 μ l
dNTP's (10mM)	1 μ l (0.2 mM)	3 μ l
Primers Mix B (2 μ M c/u)	5 μ l	15 μ l
Taq (5U/ μ l)	0.3 (1.5U)	0.9 μ l
DNA (100ng/ μ l)	1 μ l	---
Volumen final	25 μ l	24 μ l para c/tubo

Como recomiendan los lineamientos de la EAA/EMQN (Simoni *et al.*, 2004) con cada muestra del paciente a estudiar, se incluyó un control negativo de una mujer con cariotipo 46,XX corroborado y un control positivo, que corresponde el DNA de un hombre con hijos y cariotipo en sangre periférica 46,XY.

El programa para amplificación de DNA empleado en el termociclador (MyCycler®, Biorad) se muestra en la Figura 5.

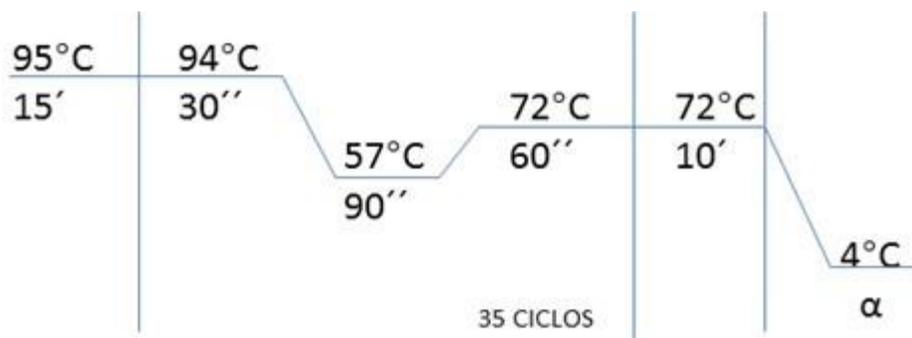


Figura 5. Programa de amplificación utilizado en las dos reacciones de PCR

Para la visualización de los amplicones, se prepararon geles de agarosa al 3% w/v (uno para cada multiplex) empleado 40 mL de buffer TAE al 0.5x v/v (Promega) + 1.2 g de agarosa grado biología molecular (Promega).

En el primer pozo de cada gel se colocó 1 µl de marcador de peso molecular de 100pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen) + 2 µl del buffer de carga.

En el pozo 2 se colocó 3 µl del blanco + 2 µl de buffer de carga y en los pozos 3 y 4, de cada gel (uno para multiplex A y otro para la B) se coloca 5 µl de la PCR de los controles negativo y positivo + 2 µl de buffer de carga.

Se corrió la electroforesis a 60 volts durante 3 horas. Posteriormente se observó la amplificación de cada uno de los STSs del cromosoma Y en el transiluminador de rayos UV.

Los resultados de amplificación/ausencia de STS se interpretaron de acuerdo a los lineamientos de la EEA/EMQN (Figuras 3 y 4)

años se realiza ciclo de ICSI con biopsia testicular encontrando espermatozoides sin movilidad en el laboratorio de embriología, que se utilizaron para ICSI, obteniendo fertilización y desarrollo embrionario culminando en el nacimiento de una niña, actualmente sana. Por lo que este caso se podría tratar de un proceso obstructivo o un daño testicular por el antecedente de orquidopexia, eliminándose del estudio.

El 21% de los pacientes (4) tenían infertilidad secundaria todos con un oligozoospermia severa y solo uno con moderada. Esto es un hallazgo interesante ya que se esperaría infertilidad primaria en la mayoría de los casos.

Calidad seminal.

De los 19 pacientes incluidos en el estudio 5 pacientes tenían azoospermia (26%), un paciente presentaba criptozoospermia (5%) y 13 pacientes (68%) correspondieron a oligozoospermia. Aunque se empleó el criterio de 1999 de la OMS de 20 millones/mL (WHO, 2009) como criterio de inclusión todos los pacientes estudiados presentaron <15 millones que corresponde al criterio actual de la OMS (WHO, 2010). En la Tabla 3 se muestran los valores seminales de los pacientes y su diagnóstico seminal. Adicionalmente en cuatro pacientes (pacientes 3, 4, 15 y 22) presentaron hipoespermia de acuerdo a los criterios de la OMS, siendo en el paciente 4 muy marcada con volumen de 0.2 mL.

Tabla 3. Edad, tipo de infertilidad y características seminales de los pacientes incluidos en el estudio.

Paciente ID	Edad	Tipo de infertilidad	Volumen	pH	Concentración total x 10 ⁶	Concentración 10 ⁶ /mL	% vivos	% Inmóviles	Diagnóstico seminal
1	38	Primaria	4.6	8.0	23.00	5	60	55	Oligozoospermia
2	38	Primaria	3.7	7.5	7.4	2	70	70	Oligozoospermia
3	40	Primaria	1.2	9.0	0	0	0	0	Azoospermia
4	32	Primaria	0.2	8.0	0.4	2	60	50	Oligozoospermia Hipoespermia
5	42	Secundaria	4.8	8.0	24.0	5	70	40	Oligozoospermia
6	41	Primaria	4.1	7.0	20.5	5	80	65	Oligozoospermia
8	33	Primaria	7.6	8.0	45.599	6	80	70	Oligozoospermia
9	40	Primaria	2.3	2.9	0	0	0	0	Azoospermia
10	42	Secundaria	3.3	7.5	33	10	80	35	Oligozoospermia
11	39	Primaria	3.2	7.5	0	0	0	0	Azoospermia
12	55	Secundaria	2.5	8.0	5	2	50	50	Oligozoospermia
14	41	Primaria	3.3	8.0	26.4	8	90	50	Oligozoospermia
15	41	Primaria	5.0	7.5	20	4	75	50	Oligozoospermia
16	32	Primaria	1.3	8.0	16.899	13	70	0	Oligozoospermia
17	38	Secundaria	2.1	8.0	12.599	6	70	85	Oligozoospermia
19	47	Primaria	2.0	8.3	0	0	0	0	Azoospermia
21	39	Primaria	2.5	9.1	70 espermatozoides después de centrifugado	<1	-	50 spz	Criptozoospermia
22	38	Primaria	1.3	8.5	0	0	0	0	Azoospermia
23	30	Primaria	3.8	8	3.8	1	90	80	Oligozoospermia

Dentro de las biopsias testiculares realizadas en el hospital a los pacientes azoospermicos, solamente el paciente 11 cuenta con biopsia que indicó al ser valorado por el Laboratorio de Reproducción la presencia de espermatozoides inmóviles y la valoración anatomopatológica de la biopsia testicular indico hipoespermatogénesis (oligozoospermia).

Está pendiente aún la realización de biopsia testicular por parte del Servicio de Reproducción en dos pacientes, uno con criptozoospermia y el otro azoospermia: los pacientes 21 22, que fueron de los últimos pacientes en ser incorporados al estudio. Pero en los que ya se dispone el estudio molecular, que descarta la presencia microdeleciones de AZFa o AZFb, lo que harían nulo el pronóstico de encontrar espermatozoides en la biopsia testicular.

Características hormonales.

Los resultados de los pacientes en relación a sus características hormonales se presentan en la Tabla 4. Un hallazgo importante es que 5 pacientes (26%) tuvieron niveles de FSH mayores a 10 UI/L, lo que podría indicar datos de una falla testicular. Tres correspondieron a pacientes con azoospermia pero 2 con oligozoospermia. Esto sugiere que en algunos casos de oligozoospermia el proceso que lleva a la pobre producción espermática es paulatino y podría manifestarse inicialmente con una oligozoospermia con FSH elevada.

El nivel de testosterona considerado como normal en el laboratorio de hormonas del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” es de 9.28 a 59.6 nmol/L, por tanto utilizando 9.2 como valor inferior de corte, dos pacientes (10%) presentaban hipogonadismo, el paciente 4 que tenía nivel de testosterona de 6.69 con FSH de 6.18 y el paciente 10 con testosterona de 7.70, FSH de 4.40 que se consideraría hipogonadismo normogonadotrópico. En ninguno de los pacientes hubo manifestaciones clínicas de hipogonadismo.

En lo que respecta a las demás hormonas estudiadas, solamente el paciente 3 que presentaba azoospermia tuvo niveles de TSH mayores a 5 mUI/L que correspondería un hipotiroidismo subclínico, ya que el paciente no tenía manifestaciones clínicas.

Utilizando como valores normales de prolactina un nivel sérico de 21.2 a 424.0 mUI/L, ningún paciente presento hiperprolactinemia. Considerando como nivel de corte para el estradiol en hombres de 40 pg/mL (147 pmol/L), solamente los individuos 16 y 19 presentaban un nivel ligeramente alto de estradiol.

Por tanto la hiperprolactinemia, niveles elevados de estradiol, o hipotiroidismo subclínico parecieran no ser hallazgos importantes en la población estudiada. Descartando que alteraciones endocrinológicas de la hipófisis o la aromatización periférica de esteroides sean la principal causa de las alteraciones en la concentración espermática encontradas en los pacientes.

Tabla 4. Niveles séricos de hormonas esteroides, prolactina TSH de los pacientes incluidos en el estudio.

Paciente ID	Edad	Diagnóstico seminal	FSH UI/L	LH UI/L	Testosterona nmol/L	Estradiol pmol/L	Prolactina mUI/L	TSH mUI/L
1	38	Oligozoospermia	9.91	3.05	14.9	119	190	1.9
2	38	Oligozoospermia	4.02	3.96	11.2	<73.4	392	1.65
3	40	Azoospermia	11.6	3.80	13.1	124	246	6.13
4	32	Oligozoospermia Hipoespermia	6.18	4.92	6.69	88.1	424	1.11
5	42	Oligozoospermia	3.4	2.7	12.0	<73.4	275	2.3
6	41	Oligozoospermia	2.86	1.62	11.6	101	90.9	2.79
8	33	Oligozoospermia	9	4	10.1	<73.4	424	3.67
9	40	Azoospermia	19.4	0.10	9.5	<73.4	160	2.7
10	42	Oligozoospermia	4.40	1.10	7.70	139	168	1.42
11	39	Azoospermia	1.95	1.03	10.5	109	189	2.86
12	55	Oligozoospermia	13.4	9.2	13.1	113	177	2.0
14	41	Oligozoospermia	7.63	2.32	9.64	118	354	2.31
15	41	Oligozoospermia	3.03	1.93	13.8	107	112	2.07
16	32	Oligozoospermia	4.58	1.54	16.3	151	187	3.56
17	38	Oligozoospermia	3.4	2.55	18.0	<73.4	180	1.54
19	47	Azoospermia	8.67	3.83	11.4	152	250	1.70
21	39	Criptozoospermia	5.0	4.9	11.3	<73.4	250	2.1
22	38	Azoospermia	14.2	6.08	10.6	94.3	206	2.53
23	30	Oligozoospermia	14.1	4.69	12.5	<73.4	270	1.9

Características genéticas.

Los resultados de los estudios genéticos: cariotipo en sangre periférica y detección de microdeleciones del cromosoma Y se presentan en la Tabla 5.

De los 19 pacientes estudiados, ningún paciente presentó microdeleciones del cromosoma Y según los lineamientos de la EEA/EMQN.

Un paciente (5% del total de pacientes) con oligozoospermia severa actualmente y antecedente de azoospermia presentó un cariotipo alterado: una inversión del cromosoma 11. Considerando al paciente dentro del grupo de los azoospermicos, ya que tuvo el antecedente de azoospermia, la presencia de un paciente con alteración cromosómica representaría el 17% de los pacientes azoospermicos, lo que sería lo esperado para este grupo.

Las características de este paciente se detallan independiente en la sección *Estudio de caso del paciente 2*.

Tabla 4. Resultados de los estudios genéticos de los pacientes incluidos en el estudio.

Paciente ID	Edad	Diagnóstico seminal	Cariotipo en sangre periférica	Microdeleciones del Y (EAA/EMQN)
1	38	Oligozoospermia	46,XY	Ausentes
2	38	Oligozoospermia	46,XY,inv(11)(p15q13)	Ausentes
3	40	Azoospermia	46,XY	Ausentes
4	32	Oligozoospermia Hipoespermia	46,XY	Ausentes
5	42	Oligozoospermia	46,XY	Ausentes
6	41	Oligozoospermia	46,XY	Ausentes
8	33	Oligozoospermia	46,XY	Ausentes
9	40	Azoospermia	46,XY	Ausentes
10	42	Oligozoospermia	46,XY	Ausentes
11	39	Azoospermia	46,XY	Ausentes
12	55	Oligozoospermia	46,XY	Ausentes
14	41	Oligozoospermia	46,XY	Ausentes
15	41	Oligozoospermia	46,XY	Ausentes
16	32	Oligozoospermia	46,XY	Ausentes
17	38	Oligozoospermia	46,XY	Ausentes
19	47	Azoospermia	46,XY	Ausentes
21	39	Criptoospermia	46,XY	Ausentes
22	38	Azoospermia	46,XY	Ausentes
23	30	Oligozoospermia	46,XY	Ausentes

Estudio de caso del paciente 2.

Paciente de 38 años proveniente de Uruapan, Michoacán, enviado a nuestro hospital por oligozoospermia severa e infertilidad primaria. No tiene antecedentes de consanguinidad ni casos de infertilidad o abortos en la familia. Sin antecedente de cáncer, exposición a químicos ambientales, tabaquismo de 4 a 5 cigarrillos al día y alcoholismo ocasional.

A los 23 años se había unido con su pareja, intentando tener familia. Tenía antecedente de biopsia testicular, realizada a los 25 años con diagnóstico de arresto espermatocítico, con detención de espermatogénesis aparentemente normal. La espermatogénesis detenida en espermatocito primario con algunas espermátides escasas. Se le indicó tratamiento con citrato de clomifeno por un año y gonadotropina coriónica humana por 3 meses, donde posteriormente se encontraron espermatozoides en la espermatobioscopia.

En la primera espermatobioscopia realizada en el hospital con volumen de 2.4 mL, pH 8.0, con presencia de azoospermia, con FSH: 2.8 mUI/L, LH: 2.33 mUI/L, prolactina 15.9 ng/mL, estradiol 19.83 pg/ml, testosterona 9.67 nmol/L. Al examen físico con obesidad, con tejido adiposo en ambas mamas sin ginecomastia, vello abundante en todo el cuerpo, a nivel púbico de características androgénicas, pene de características normales, con testículos derecho de 5x3x2 cms e izquierdo de 5x3x2 cms de consistencia normal, se palpan epidídimos y deferentes de características normales.

En ultrasonido testicular externo donde se encuentra varicocele bilateral grado I, con testículos de características normales. Se inicia manejo con FSH y tamoxifeno. Se envía a Genética donde se realiza cariotipo en sangre periférica encontrándose un cariotipo: 46,XY,inv(11)(p15q13).

A los 32 años se realiza cirugía para corrección de varicocele por Urología con hallazgo de varicocele derecho grado II y varicocele izquierdo grado I, realizando varicolectomía bilateral. Se toma simultáneamente biopsia testicular derecha para Laboratorio de Reproducción y Patología, encontrándose espermatozoides los cuales se congelan para futuro procedimiento. El reporte de patología indicó detención de la maduración y atrofia moderada.

Se insiste en pérdida de peso. Dos años después de varicolectomía, se mantiene sin recurrencia de varicocele pero sin mejoría en cuenta espermáticas. Por lo que se decide tratamiento con letrozol 5 mg cada 24 horas y congelación de muestras. Espermatobioscopia una semana antes de iniciar con manejo con letrozol: volumen 1.5 mL con concentración 5 millones/mL, abundantes células redondas, con motilidad: A=0%, B=4% C=8%. También se realizó análisis de fragmentación de DNA espermático por el test de dispersión de la cromatina (Halosperm®, Halotech) en eyaculado completo con fragmentación de 67% (normal hasta 20%). Espermatobioscopia posterior a 4 meses de tratamiento con letrozol con volumen de 3.1 mL con concentración 9 millones/mL con abundantes células redondas, se congelan muestras para realización posterior de ICSI.

Como parte del presente estudio se repite cariotipo para realización de bandas Q, encontrando cromosoma Y de características normales con bandas Q y el cariotipo en 30 células

se confirma como una inversión del cromosoma 11 (Figura 7). Se realiza estudio de microdeleciones del cromosoma Y, sin encontrar ausencia de STSs (Figura 8).

Se realizó nuevo asesoramiento genético a la pareja con base a resultados de estudios genéticos y los riesgo que implica la alteración cromosómica encontrada y la pareja quiere intentar embarazo vía FIV/ICSI, por lo que están en espera de realización de ciclo de FIV/ICSI con las muestras congeladas.

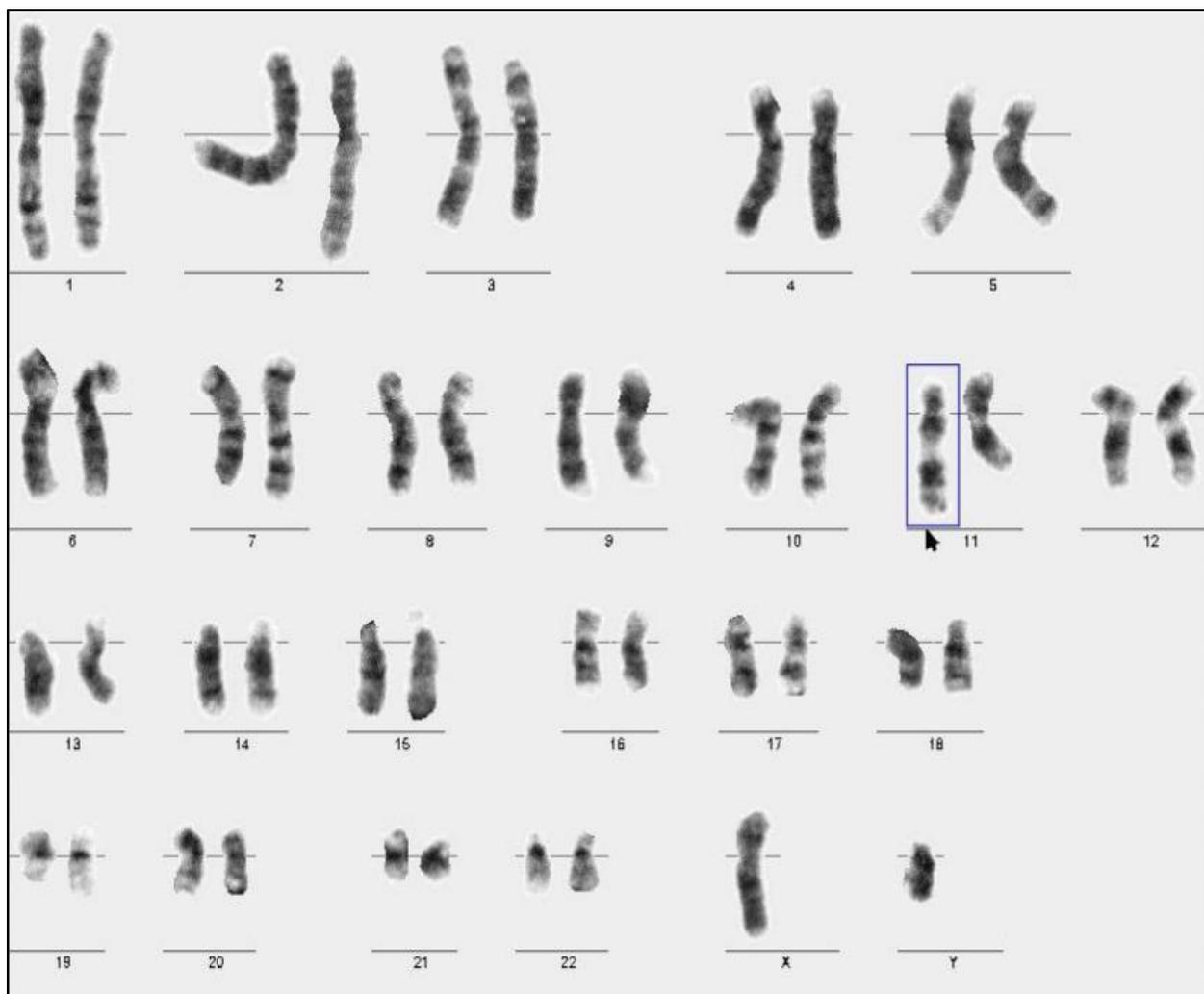


Figura 7. **Cariotipo en sangre periférica del paciente 2.** Demostrando una inversión pericéntrica en el cromosoma 11 (flecha), con cariotipo: 46,XY,inv(11)(p15q13) [30].

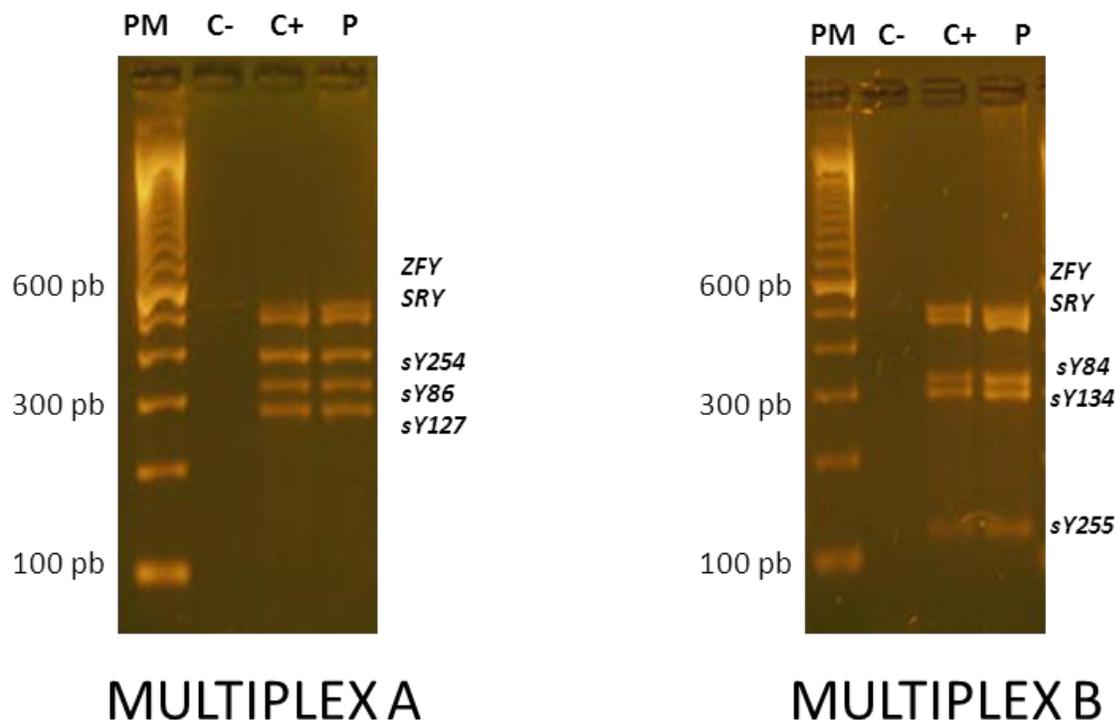


Figura 8. Estudio de microdeleciones según la EAA/EMQN del paciente 2. Izquierda. Multiplex A. Derecha. Multiplex B. Donde no se encontró la presencia de microdeleciones.

Estudio del caso del paciente 9.

Paciente de 40 años, originario de Veracruz, Veracruz enviado a nuestro Centro Médico a los 39 años por azoospermia e infertilidad primaria con deseo de embarazo 3 años previo al envió.

No tiene antecedentes de consanguinidad ni casos de infertilidad o abortos en la familia. Sin antecedente de cáncer, exposición a químicos ambientales. Niega tabaquismo y alcoholismo ocasional. Antecedente de apendicetomía a los 13 años y cirugía correctiva de estrabismo a los 13 y 17 años.

Al examen físico, con sobrepeso, sin ginecomastia, desproporción de segmentos, genitales con pene de características normales testículos pequeños de consistencia ligeramente endurecida. Con estudios previos de espermatobioscopía que indicaban azoospermia y FSH de 28 mUI/L. En nuestro hospital con FSH: 19.4 mUI/L, LH: 0.10 mUI/mL, testosterona: 9.5 nmol/L (límitrofe), se considera un probable hipogonadismo hipergonadotrópico a descartar Síndrome de Klinefelter, se programa para biopsia testicular y se envía a Genética para valoración de hipogonadismo hipergonadotrópico.

En la biopsia testicular, se biopsia testículo izquierdo y se envía al Laboratorio de Reproducción, encontrándose túbulos seminíferos, sin espermatozoides maduros ni espermatogonias. Se informa al paciente que se requiere nueva sección de tejido testicular para patología y nueva búsqueda de espermatozoide pero el paciente no acepta. El tejido macerado

valorado se envía al Laboratorio de Genética para siembra y realización de cariotipo en tejido testicular.

El cariotipo en sangre periférica es: 46,XY[30] (Figura 9), descartando el Síndrome de Klinefelter. En bandeado con bandas Q indica un cromosoma Y de características normales. Después de dos semanas de cultivo, se cosechan las células testiculares para realización de cariotipo con bandas GTG siendo este: 46,XY[30] (Figura 10), descartando un mosaico que involucre cromosomas sexuales a nivel testicular.

El estudio de las microdeleciones del cromosoma Y, descarta la presencia de estas (Figura 11). El paciente aún no ha regresado a nuestro Centro Medico para realizar asesoramiento completo en base a los resultados del estudio y proponer nueva biopsia testicular en ambos testículos para poder confirmar por patología si se trata de un Síndrome de solo células de Sertoli.

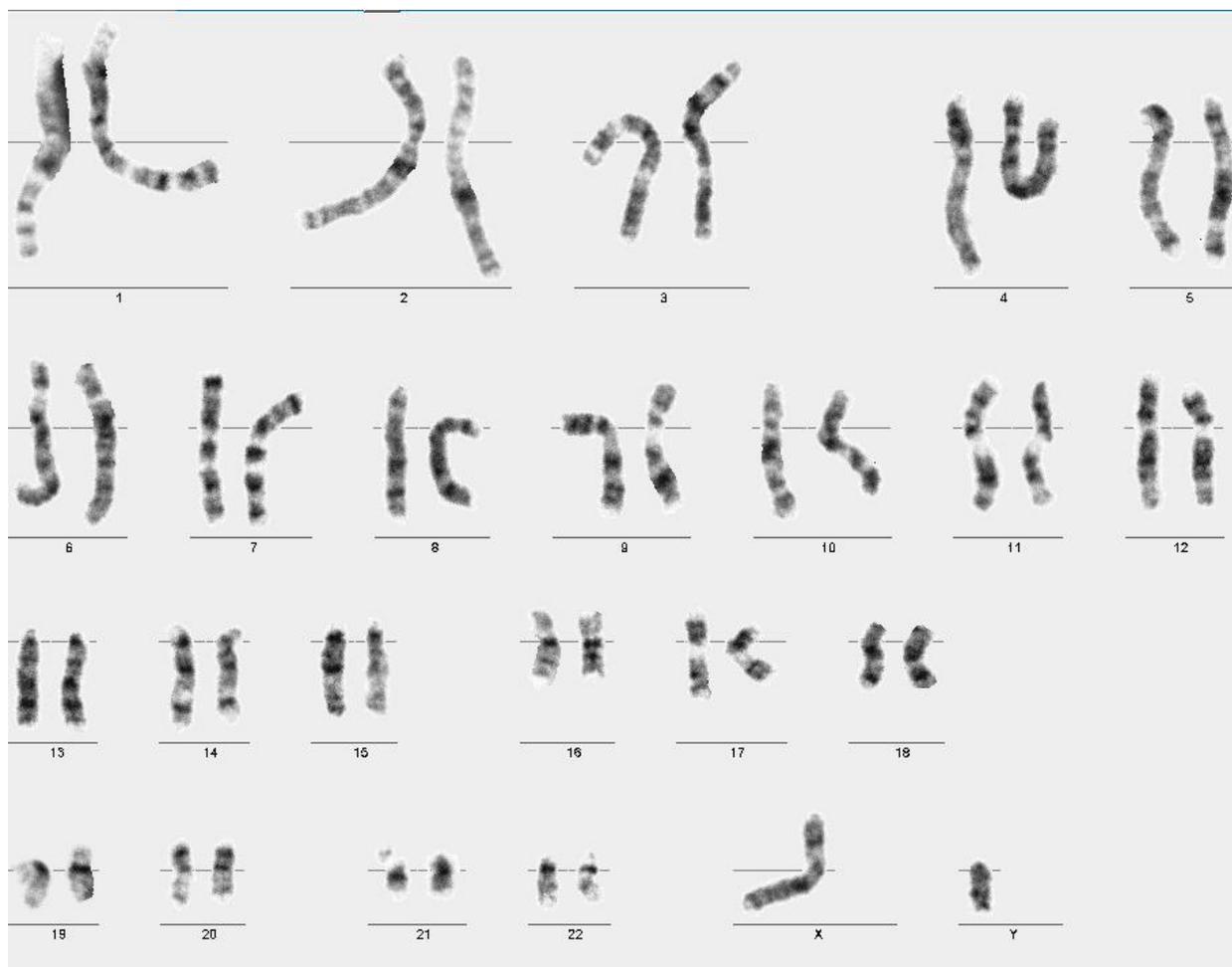


Figura 9. Cariotipo en sangre periférica del paciente 9. Demostrando un cariotipo: 46,XY[30].

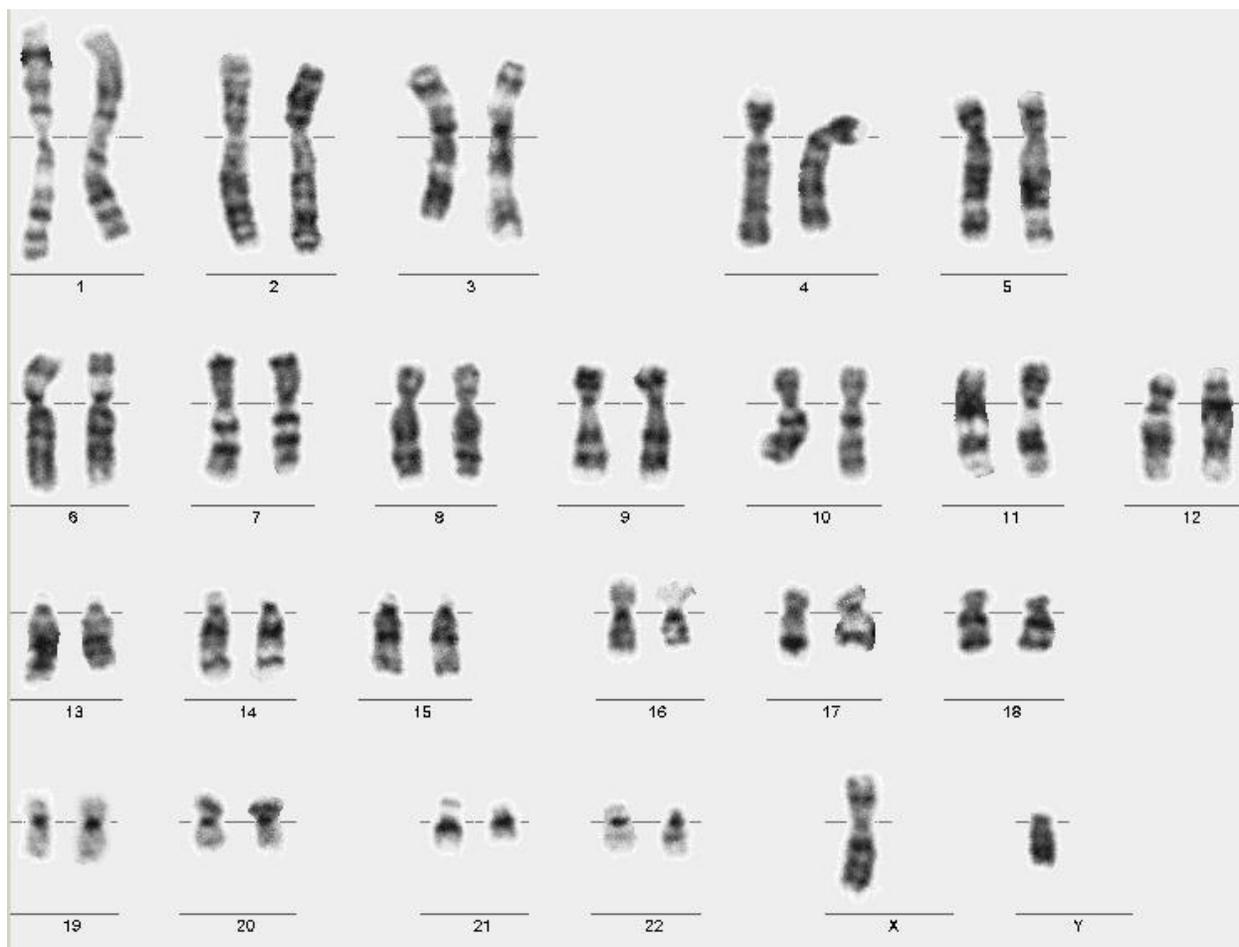


Figura 10. Cariotipo en tejido testicular del paciente 9. Demostrando un cariotipo: 46,XY[30].

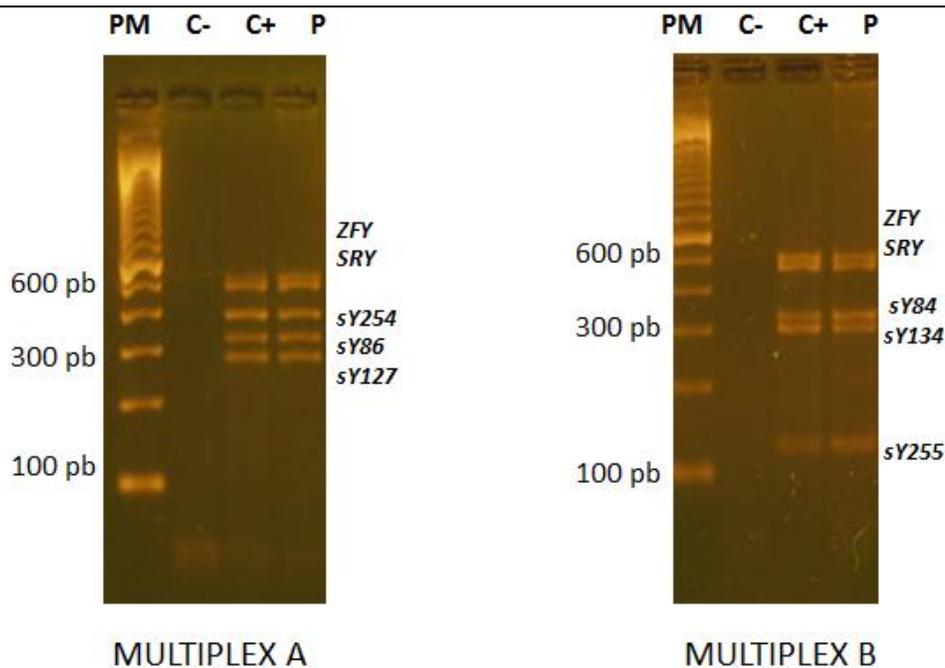


Figura 11. Estudio de microdeleciones del cromosoma Y según la EAA/EMQN del paciente 2. Izquierda. Multiplex A. Derecha. Multiplex B. Donde no se encontró la presencia de microdeleciones.

VII. Discusión y Conclusiones.

En el presente estudio en lo que respecta a las características genéticas no se encontraron microdeleciones del cromosoma Y, la única alteración genética que se encontró fue un paciente con inversión del cromosoma 11, que corresponden al 17% de los pacientes azoospermicos del estudio, un valor que está dentro de lo esperado y similar a lo encontrado en otros reportes de pacientes mexicanos (Meza-Espinoza *et al.*, 2008, Martínez-Garza *et al.*, 2008).

Estos resultados con baja proporción de pacientes con alteraciones son esperables dado el bajo número del total pacientes estudiados (19 pacientes). Y a que la mayoría no fueron pacientes con oligozoospermia severa o azoospermicos, solamente 6 pacientes (31%) correspondieron a este grupo. Los estudios más grandes sobre microdeleciones (como el de Foresta *et al.* 2001) han establecido que las microdeleciones del cromosoma Y están presentando cuando la concentración espermática es menor de 5 millones/mL, por lo que nuestro grupo de pacientes dentro de esta categoría es mínimo y esa podría ser la causa principal de no haber encontrado ningún paciente con microdeleciones del cromosoma Y. En un futuro se requiere continuar el estudio de microdeleciones para incluir más pacientes y conocer la verdadera prevalencia de estas en la población de pacientes del ISSSTE.

En lo que respecta a hallazgos clínicos, solamente el paciente 9 presentó testículos pequeños y de consistencia firme, asociado a niveles elevados de FSH, lo que sugiriera un posible caso de Síndrome de Klinefelter, diagnóstico que se descartó al realizar estudios genéticos (ver estudio de caso paciente 9 y figuras 9 y 10). Estos hallazgos en conjunto confirman que la mayoría de los pacientes con infertilidad masculina, no tienen datos clínicos que claramente soporte una etiología genética.

Otros hallazgos interesantes, fue la presencia de 4 pacientes (21%) con hipoespermia y que 5 pacientes (26%) presentaron niveles elevados de FSH, sugiriendo estos últimos una disfunción testicular franca. Estos resultados soportan la búsqueda constante de alteraciones a nivel de laboratorio en hombres infértiles y demuestran la heterogeneidad de los pacientes cuando solo se seleccionan por los hallazgos de la espermatobioscopia, como en el presente estudio.

Paciente con inversión del cromosoma 11.

Las inversiones son alteraciones estructurales cromosómicas en las que un evento de doble ruptura cromosómica permite que un segmento cromosómico intercalar rote y se invierta. Se dividen en pericéntricas que son las inversiones que incluyen el centrómero y las paracéntricas que no incluyen el centrómero. Las inversiones son una alteración cromosómica relativamente rara con una frecuencia entre 0.12% a 0.7% las pericéntricas y 0.1% a 0.5% las paracéntricas (Gardner *et al.*, 2011).

Las inversiones pericéntricas como la encontrada en el paciente 2, llevan a la producción de gametos no balanceados posterior a la meiosis y consecuentemente patología reproductiva. El desbalance cromosómico es resultado de la formación de cromosomas recombinantes que se produce por la formación de un asa invertida en la meiosis (Anton *et al.*, 2005), lo que lleva a la recombinación de la cromátide cromosoma homólogo normal y la cromátide del cromosoma

invertido, generando una duplicación del segmento distal del brazo corto y una delección del segmento distal del brazo largo y viceversa.

Sin embargo la inversión del cromosoma 11 del paciente no explica fácilmente el cuadro de oligozoospermia severa/azoospermia ya que los fallos en la meiosis asociados a defectos en recombinación se producen principalmente cuando involucran cromosomas sexuales. Es por ello que realizamos también el estudio de microdeleciones del cromosoma Y en el paciente (Figura 8), las que resultaron ausentes. Se han reportado pocos casos de inversiones pericéntricas que generen azoospermia, en el cromosoma 1 (Rivera *et al.*, 1984, Batanian y Hulten, 1987; Meschede *et al.*, 1994) y una inversión del cromosoma 12, inv(12)(p12q12) en un paciente de Túnez con azoospermia que en la biopsia testicular el fenotipo era compatible con un Síndrome de solo células de Sertoli (Ghorbel *et al.*, 2013). También existe un reporte de oligozoospermia moderada e infertilidad en un paciente con una inversión del cromosoma 1: inv(1)(p22q42) (Chantot-Bastaraud *et al.*, 2007).

La etiología en el caso de la inversión del cromosoma 1 ha sido relacionado con rupturas que involucran genes relacionados en la espermatogénesis (Bache *et al.*, 2004), también se ha demostrado al estudiar los complejos sinaptonémicos por microscopía electrónica una posible generación de asinapsis o desinapsis precoz entre el segmento invertido y otros homólogos (Batanian y Hulten, 1987) y que la inv(1) se asocia al cuerpo XY, en los cuales la recombinación de XY está ausente en una manera desproporcional, sugiriendo que algunos portadores de inversiones pueden presentar una recombinación global alterado y una recombinación alterada y considerando también que la asinapsis o la formación de un asa de inversión pueden ser los responsables de un fallo en la espermatogénesis (Kirkpatrick *et al.*, 2012). Para las inversiones de los demás cromosomas se desconoce los fenómenos moleculares que podrían condicionar la falla testicular. Hasta ahora se ha propuesto que las células espermatogénicas son más vulnerables al punto de control de paquíteno y que la interacción autosoma-cuerpo sexual está presente casi siempre en la meiosis, lo que con lleva que los hombres con anomalías estructurales como translocaciones e inversiones sean más susceptibles a la infertilidad (Kurahashi *et al.*, 2012). Por tanto aunque no se puede descartar que en el paciente 2 exista otra causa genética como una mutación en un gen no estudiado o que la alteración del cromosoma 11 se trate de un rearrreglo cromosómico complejo (Kim *et al.*, 2011; Pellestor *et al.*, 2011) que no se puede detectar por citogenética clásica, la evidencia disponible apunta que la inversión inv(11)(p15q13) es la causante de la falla testicular.

El paciente 2 será sometido a un procedimiento de FIV/ICSI, por tanto el asesoramiento genético sobre el riesgo de generar gametos desbalanceados y si los productos de estos espermatozoides serán viables es complejo. El primer punto a considerar es que en la literatura se ha reportado el nacimiento de un niño con un recombinante del cromosoma 11 (Ishii *et al.*, 1997). Segundo, en general la producción de gametos recombinantes depende del tamaño del segmento invertido, ya que si este corresponde a más del 50% de la longitud total del cromosoma el riesgo de generar recombinante es mayor (Gardner *et al.*, 2011). En el paciente 2 el tamaño de la inversión corresponde a aproximadamente al 44% de la longitud total del cromosoma 11, por lo que estaría en un riesgo intermedio. Existen algunos reportes del estudio de espermatozoides para determinar la presencia de recombinantes (revisado en Anton *et al.*, 2007; Morel *et al.*,

2007), pero no se disponen estudios específicos de portadores de inversiones pericéntricas del cromosoma 11 para poder ofrecer un asesoramiento genético en base de datos empíricos.

En lo que respecta a la posibilidad de diagnosticar la segregación de cromosomas recombinantes se ha reportado el diagnóstico genético preimplantacional para hombres portadores de una inversión recíproca (Escudero *et al.*, 2001), Recientemente se ha incorporado el uso de microarreglos para el diagnóstico de los productos desbalanceados (Alfarawati *et al.* 2011). También se ha reportado el estudio por FISH en espermias y blastómeras en un caso de inv(5)(p15.3q11.2) (Bernicot *et al.*, 2010).

Aunque en nuestro Centro Médico Nacional disponemos de un protocolo de diagnóstico genético preimplantacional con FISH, metodológicamente al no contar con sondas de FISH para el cromosoma 11 y estas no estar disponibles de manera comercial no es factible para nosotros realizar el estudio de FISH en esperma o tener un diagnóstico certero de las duplicaciones/deleciones de los cromosomas recombinantes de manera preimplantacional. Por lo que en la pareja la única opción diagnóstica es en caso de lograr el embarazo una biopsia de vellosidades coriales/amniocentesis para determinar el cariotipo del producto y la presencia de un cromosoma 11 recombinante. Lo cual también genera un dilema de asesoramiento y ético sobre que fenotipo podría tener el producto y la posibilidad de interrumpir el embarazo.

Ausencia de alteraciones cromosómicas y microdeleciones del cromosoma Y en el paciente 9.

El paciente 9 según los niveles de FSH presenta una falla testicular franca, aunque no presentaba datos clínicos de hipogonadismo, considerando que el nivel de testosterona se encontraba limítrofe se consideró por el Servicio de Reproducción la posibilidad de un hipogonadismo hipergonadotrópico a descartar un Síndrome de Klinefelter. A la valoración genética al no tener datos clínicos compatibles con el Síndrome de Klinefelter se consideró mayormente un posible mosaico o la presencia de microdeleciones de AZF en el cromosoma Y como etiología.

Al realizar el estudio de cariotipo en sangre periférica y tejido testicular se descarta la alteración 47,XXY o un mosaico de esta. Tampoco se encontraron microdeleciones del cromosoma Y, descartando las principales causas genéticas de azoospermia. Lamentablemente no se pudo tener una valoración anatomopatológica del testículo para confirmar la presencia de un Síndrome de solo células de Sertoli, que es lo que sugieren los hallazgos del Laboratorio de Reproducción.

No se puede descartar que la ausencia de espermatozoides y probablemente de espermatogonias pueda ser de causa genética, ya que recientemente se han descrito nuevos genes asociados al síndrome de solo células de Sertoli, como las mutaciones homocigotas en el gen *ETV5* (O'Bryan *et al.*, 2012) y *NANOS1* (Kusz-Zamelczyk *et al.*, 2013). Ambos genes están relacionados con el desarrollo de células germinales primordiales y tienen homólogos en *Drosophila*, en la que la falta de expresión genera una ausencia de células germinales. Sin embargo se han descrito muy pocas familias con estas mutaciones y aun no existen otros

artículos que repliquen los resultados, para conocer qué tan frecuentes son estas mutaciones como etiología de la ausencia de células germinales.

Con la información disponible hasta el momento el paciente tiene relativamente un buen pronóstico desde la perspectiva genética, ya que se han descartado las dos causas genéticas principales de azoospermia, lo que justificaría intentar nuevamente la biopsia testicular para confirmar el diagnóstico de síndrome de solo células de Sertoli.

También estos hallazgos tienen implicaciones desde la perspectiva de manejo por el servicio de Reproducción ya que para maximizar la posibilidad de encontrar espermatozoides en el siguiente procedimiento está indicado, intentar la extracción espermática por microdissección testicular o micro-TESE (microdissection testicular sperm extraction). Esta técnica usa el apoyo de un microscopio quirúrgico para que vía un aumento de 15-25x se localicen los túbulos seminíferos “dilatados” que se asocian a la presencia de espermatozoides (Dabaja y Schlegel, 2013). La evidencia indica que el micro-TESE es el procedimiento más exitoso para obtener espermatozoides en casos de azoospermia no obstructiva (Dabaja y Schlegel, 2013, Esteves *et al.*, 2011). Aunque si se confirmara el diagnóstico del Síndrome de solo células de Sertoli haría prácticamente imposible encontrar espermatozoides en la biopsia como en el caso de las deleciones de AZFa; sin embargo en el síndrome de solo células de Sertoli tipo II (incluido en OMIM# 400042) existen algunas células germinales y podría tener utilidad realizar un micro-TESE.

Este caso ejemplifica la importancia del estudio integral del paciente ya que las alteraciones clínicas, seminales y hormonales inicial sugerían una posible patología cromosómica y el realizar los estudios genéticos descartó estas alteraciones. Estos hallazgos, también son importantes para el pronóstico reproductivo del paciente ya que en caso de ser un solo Síndrome de células de Sertoli, la pareja es candidata a donación de semen o adopción.

Implicaciones futuras del estudio.

El presente estudio desde el enfoque genético se puede considerar como un estudio inicial que demuestra la importancia del estudio genético en pacientes infértiles que serán sometidos a procedimientos de reproducción asistida. Por lo cual es necesario que este estudio continúe para poder incrementar el número de pacientes estudiados y poder finalmente hacer un análisis comparativo ente las características de los pacientes de los pacientes con alteraciones cromosómicas o microdeleciones del Y respecto a los que no presentan alteración.

Desde la perspectiva de laboratorio, el siguiente paso es incorporar el estudio de las microdeleciones parciales del cromosoma Y que hasta hora es controversial su impacto en la espermatogénesis y en las que su frecuencia depende del grupo étnico, pero ha demostrado tener relevancia clínica en los metanálisis o los hallazgos han sido replicados en varias poblaciones. Las principales son las deleciones gr/gr (Stouffs *et al.*, 2011) que aún no se han estudiado en población mexicana por lo que se desconoce su frecuencia, pero se asocian principalmente a una oligozospermia leve a moderada y la deleciones b2/b3 (Lu *et al.*, 2009; Eloualid, *et al.*, 2012) que también se asocian a falla testicular severa.

Conclusiones.

El hallazgo principal del presente estudio es la falla espermática severa que se asocia a una inversión pericéntrica del cromosoma 11.

VIII. Referencias bibliográficas.

Aknin-Seifer IE, Lejeune H, Touraine RL, Levy R; Societe d'Andrologie de Langue Francaise. Y chromosome microdeletion screening in infertile men in France: a survey of French practice based on 88 IVF centres. *Hum Reprod.* 2004;19(4):788-93.

Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Wells D. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Hum Reprod.* 2011;26(6):1560-74.

Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res.* 2005;111(3-4):297-304.

Anton E, Vidal F, Blanco J. Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum Reprod.* 2007;22(8):2088-92.

Aziz N. The importance of semen analysis in the context of azoospermia. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68 Suppl 1:35-8.

Bache I, Assche EV, Cingoz S, Bugge M, Tümer Z, Hjorth M, Lundsteen C, Lespinasse J, Winther K, Niebuhr A, Kalscheuer V, Liebaers I, Bonduelle M, Tournaye H, Ayuso C, Barbi G, Blennow E, Bourrouillou G, Brondum-Nielsen K, Bruun-Petersen G, Croquette MF, Dahoun S, Dallapiccola B, Davison V, Delobel B, Duba HC, Duprez L, Ferguson-Smith M, Fitzpatrick DR, Grace E, Hansmann I, Hultén M, Jensen PK, Jonveaux P, Kristoffersson U, Lopez-Pajares I, McGowan-Jordan J, Murken J, Orera M, Parkin T, Passarge E, Ramos C, Rasmussen K, Schempp W, Schubert R, Schwinger E, Shabtai F, Smith K, Stallings R, Stefanova M, Tranebjerg L, Turleau C, van der Hagen CB, Vekemans M, Vokac NK, Wagner K, Wahlstrom J, Zelante L, Tommerup N. An excess of chromosome 1 breakpoints in male infertility. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(12):993-1000.

Batanian J, Hulten MA. Electron microscopic investigations of synaptonemal complexes in an infertile human male carrier of a pericentric inversion inv(1)(p32q42). Regular loop formation but defective synapsis including a possible interchromosomal effect. *Hum Genet.* 1987;76(1):81-9.

Bernicot I, Dechanet C, Mace A, Hedon B, Hamamah S, Pellestor F, Anahory T. Predictive value of sperm-FISH analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis (PGD) for a pericentric inversion inv5(p15.3q11.2) carrier. *Hum Reprod.* 2010;25(7):1818-23.

Chantot-Bastarud S, Ravel C, Berthaut I, McElreavey K, Bouchard P, Mandelbaum J, Siffroi JP. Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility. *Mol Hum Reprod.* 2007;13(1):55-9.

Chávez-Saldaña M, Yokoyama E, Lezana JL, Carnevale A, Macías M, Viguera RM, López M, Orozco L. CFTR allelic heterogeneity in Mexican patients with cystic fibrosis: implications for molecular screening. *Rev Invest Clin* 2010;62(6):546-52.

Chiang HS, Yeh SD, Wu CC, Huang BC, Tsai HJ, Fang CL. Clinical and pathological correlation of the microdeletion of Y chromosome for the 30 patients with azoospermia and severe oligoasthenospermia. *Asian J Androl.* 2004;6(4):369-75.

Choi JM, Chung P, Veeck L, Mielnik A, Palermo GD, Schlegel PN. AZF microdeletions of the Y chromosome and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril.* 2004;81(2):337-41.

Cocuzza M, Alvarenga C, Pagani R. The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68 Suppl 1:15-26.

Cortés-Gutiérrez EI, Cerda-Flores RM, Dávila-Rodríguez MI, Hernández-Herrera R, Vargas-Villarreal J, Leal-Garza CH. Chromosomal abnormalities and polymorphisms in Mexican infertile men. *Arch Androl* 2004;50(4):261-5

Dabaja AA, Schlegel PN. Microdissection testicular sperm extraction: an update. *Asian J Androl*. 2013;15(1):35-9.

De Jonge C. Semen analysis: looking for an upgrade in class. *Fertil Steril*. 2012;97(2):260-6.

Eloualid A, Rhaissi H, Reguig A, Bounaceur S, El Houate B, Abidi O, Charif M, Louanjli N, Chadli E, Barakat A, Bashamboo A, McElreavey K, Rouba H. Association of spermatogenic failure with the b2/b3 partial AZFc deletion. *PLoS One*. 2012;7(4):e34902.

Escudero T, Lee M, Stevens J, Sandalinas M, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis of pericentric inversions. *Prenat Diagn*. 2001;21(9):760-6.

Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *Int Braz J Urol*. 2011;37(5):570-83.

Esteves SC. A clinical appraisal of the genetic basis in unexplained male infertility. *J Hum Reprod Sci*. 2013;6(3):176-182.

Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, Lenzi A, Foresta C. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: A 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 762–770.

Foresta C, Garolla A, Bartoloni L, Betella A, Felin A. Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(1):152-6.

Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr. Rev*. 2001;22:226-239.

Ghorbel M, Baklouti-Gargouri S, ElGhazel H, Zribi N, Ben Abdallah F, Cherif M, Fakhfakh F, Saad A, Ammar-Keskes L. Pericentric inversion of chromosome 12 [Inv (12) (p12q12)] associated with idiopathic azoospermia in one infertile Tunisian man. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;432(3):472-4.

Hamada AJ, Esteves SC, Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68 Suppl 1:39-60.

Harton GL, Tempest HG. Chromosomal disorders and male infertility. *Asian J Androl*. 2012;14(1):32-9.

Hellani A, Al-Hassan S, Al-Duraim A, Coskun S. Y chromosome microdeletions: are they implicated in teratozoospermia? *Hum Reprod*. 2005;20(12):3505-9.

Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art--physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl*. 2012;14(2):260-9.

Hughes TM 3rd, Skolnick JL, Belker AM. Young's syndrome: an often unrecognized correctable cause of obstructive azoospermia. *J Urol*. 1987;137(6):1238-40.

Ichioka K, Yoshimura K, Honda T, Takahashi A, Terai A. Paracentric inversion of chromosome 7(q22-31) associated with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril*. 2005;83(2):455-6.

Kihaile PE, Kisanga RE, Aoki K, Kumasako Y, Misumi J, Utsunomiya T. Embryo outcome in Y-chromosome microdeleted infertile males after ICSI. *Mol Reprod Dev*. 2004;68(2):176-81.

Kim JW, Chang EM, Song SH, Park SH, Yoon TK, Shim SH. Complex chromosomal rearrangements in infertile males: complexity of rearrangement affects spermatogenesis. *Fertil Steril*. 2011;95(1):349-52, 352.e1-5

Kirkpatrick G, Chow V, Ma S. Meiotic recombination, synapsis, meiotic inactivation and sperm aneuploidy in a chromosome 1 inversion carrier. *Reprod Biomed Online*. 2012;24(1):91-100.

Kurahashi H, Kogo H, Tsutsumi M, Inagaki H, Ohye T. Failure of homologous synapsis and sex-specific reproduction problems. *Front Genet*. 2012;3:112.

Kusz-Zamelczyk K, Sajek M, Spik A, Glazar R, Jędrzejczak P, Latos-Bieleńska A, Kotecki M, Pawelczyk L, Jaruzelska J. Mutations of NANOS1, a human homologue of the *Drosophila* morphogen, are associated with a lack of germ cells in testes or severe oligo-asthenoteratozoospermia. *J Med Genet*. 2013;50(3):187-93.

La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*. 1991;352(6330):77-9.

Lu C, Zhang J, Li Y, Xia Y, Zhang F, Wu B, Wu W, Ji G, Gu A, Wang S, Jin L, Wang X. The b2/b3 subdeletion shows higher risk of spermatogenic failure and higher frequency of complete AZFc deletion than the gr/gr subdeletion in a Chinese population. *Hum Mol Genet*. 2009;18(6):1122-30.

McLachlan RI, O'Bryan MK. Clinical Review: State of the art for genetic testing of infertile men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(3):1013-24.

Martínez-Garza SG, Gallegos-Rivas MC, Vargas-Maciel M, Rubio-Rubio JM, de Los Monteros-Rodríguez ME, González-Ortega C, Cancino-Villarreal P, de Lara LG, Gutiérrez-Gutiérrez AM. Genetic screening in infertile Mexican men: chromosomal abnormalities, Y chromosome deletions, and androgen receptor CAG repeat length. *J Androl*. 2008;29(6):654-60.

Massart A, Lissens W, Tournaye H, Stouffs K. Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian J Androl*. 2012;14(1):40-8.

Meza-Espinoza JP, Davalos-Rodríguez IP, Rivera-Ramírez H, Perez-Muñoz S, Rivas-Solís F. Chromosomal abnormalities in patients with azoospermia in Western Mexico. *Arch Androl* 2006;52(2):87-90.

Monarres-Alvarado A, Cacho-Díaz B, López-Hernández MA, García-Ramos G., Mutchinick-Baringoltz O. Enfermedad de Kennedy: Estudio clínico y diagnóstico molecular en una familia mexicana con variabilidad fenotípica. *Rev Invest Clin* 2006;58(4):393.

Morel F, Laudier B, Guérif F, Couet ML, Royère D, Roux C, Bresson JL, Amice V, De Braekeleer M, Douet-Guilbert N. Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod*. 2007;22(1):136-41.

Morris JK, Alberman E, Scott C, Jacobs P. Is the prevalence of Klinefelter syndrome increasing? *Eur J Hum Genet*. 2008;16(2):163-70.

Navarro-Costa P, Plancha CE, Gonçalves J. Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:936569.

Navarro-Costa P. Sex, rebellion and decadence: the scandalous evolutionary history of the human Y chromosome. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(12):1851-63.

O'Bryan MK, Grealy A, Stahl PJ, Schlegel PN, McLachlan RI, Jamsai D. Genetic variants in the ETV5 gene in fertile and infertile men with nonobstructive azoospermia associated with Sertoli cell-only syndrome. *Fertil Steril*. 2012;98(4):827-35.e1-3.

Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hédon B, Sarda P. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. *Hum Reprod Update*. 2011 Jul;17(4):476-94.

Piña-Aguilar RE, Martínez-Garza SG, Kohls G, Vargas-Maciél MA, Vazquez de Lara LG, González-Ortega C, Cancino-Villarreal P, Gutiérrez-Gutiérrez AM. Y chromosome microdeletions in Mexican males of couples with idiopathic recurrent pregnancy loss. *J Obstet Gynaecol Res*. 2012;38(6):912-7.

Piña-Aguilar RE, Chima-Galán Mdel C, Yerena-de-vega Mde L, Regalado-Hernández MA, Sánchez-Guerrero C, García-Ortiz L, Santillán-Hernández Y, Moreno-García JD. Variantes genéticas asociadas a infertilidad masculina en pacientes mexicanos. *Ginecol Obstet Mex*. 2013;81(5):245-58.

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Male Reproduction and Urology. Evaluation of the azoospermic male. *Fertil Steril*. 2008;90(5 Suppl):S74-7.

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012;98(2):294-301.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertil Steril*. 2013;99(3):673-7.

Pryor J. L, Kent-First M, Muallem A, Van Bergen A. H, Nolten W. E, Meisner L, Roberts K. P. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *New Eng. J. Med*. 1997; 336:534-539.

Reijo R, Lee T. Y, Salo P, Alagappan R, Brown L. G, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, de la Chapelle A, Silber S, Page D. C. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genet*. 1995;10:383-393.

Rivas F, Garcia-Esquivel L, Diaz M, Rivera H, Cantu JM. Cytogenetic evaluation of 163 azoospermics. *J Genet Hum* 1987;35(4):291-8.

Rivera H, Alvarez-Arratia MC, Moller M, Díaz M, Cantú JM. Familial inv(1)(p3500q21.3) associated with azoospermia. *Hum Genet*. 1984;66(2-3):165-7.

Romero Tovar S, Juárez Espinosa B, Galindo García CG, Mendoza Romo M, Sánchez Usabiaga RA. Prevalencia de alteraciones cromosómicas en pacientes infértiles estudiadas en una clínica de reproducción asistida. *Ginecol Obstet Mex* 2009;77(3):128-35.

Saldaña-Alvarez Y, Jiménez-Morales S, Echevarría-Sánchez M, Jiménez-Ruíz JL, García-Cavazos R, Velázquez-Cruz R, Carnevale A, Orozco L. Molecular Screening of the CFTR Gene in Mexican Patients with Congenital Absence of the Vas Deferens. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012;16(4):292-6.

Shi YC, Cui YX, Zhou YC, Wei L, Jiang HT, Xia XY, Lu HY, Wang HY, Shang XJ, Zhu WM, Li XJ, Huang YF. A rare Y chromosome constitutional rearrangement: a partial AZFb deletion and duplication within chromosome Yp in an infertile man with severe oligoasthenoteratozoospermia. *Int J Androl*. 2011;34(5 Pt1):461-9.

Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl*. 2004;27(4):240-9.

Simoni M, Tüttelmann F, Gromoll J, Nieschlag E. Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Münster experience. *Reprod Biomed Online*. 2008;16(2):289-303.

Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Haentjens P. What about gr/gr deletions and male infertility? Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2011;17(2):197-209.

Tempest HG. Meiotic recombination errors, the origin of sperm aneuploidy and clinical recommendations. *Syst Biol Reprod Med*. 2011;57(1-2):93-101.

Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum. Genet*. 1976;34:119-124.

Tournaye HJ, Cohlen BJ. Management of male-factor infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2012;26(6):769-75.

van Golde RJ, Wetzels AM, de Graaf R, Tuerlings JH, Braat DD, Kremer JA. Decreased fertilization rate and embryo quality after ICSI in oligozoospermic men with microdeletions in the azoospermia factor c region of the Y chromosome. *Hum Reprod*. 2001;16(2):289-92.

Vogt P, Chandley A. C, Hargreave T. B, Keil R, Ma K, Sharkey A. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum. Genet*. 1992;89:491-496.

Yu J, Chen Z, Ni Y, Li Z. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2012;27(1):25-35.

World Health Organization. 2009. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. New York: WHO/Cambridge University Press, 4th ed.

World Health Organization. 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva, Switzerland: WHO publications, 5th ed.

IX. Anexos.

Anexo 1. Carta de Consentimiento Informado.



CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE", ISSSTE

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
PARA INVESTIGACION CIENTIFICA



México, D. F. a _____ de _____ del 201__

Yo, _____ de manera libre y voluntaria DOY MI CONSENTIMIENTO EXPRESO, para participar en el estudio de investigación titulado: "Alteraciones genéticas, características clínicas y seminales en pacientes con azoospermia no obstructiva y oligozoospermia", sin que ello afecte o se relacione con mis derechos o la atención médica que recibo como derechohabiente del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE). También he comprendido que si no participo en este estudio, tampoco afectará los cuidados regulares o mi relación con el ISSSTE, sus médicos u otro personal.

Se me ha informado que dicho estudio ha sido aceptado y aprobado por el Comité de Investigación y el Comité de Ética en Investigación del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE con folio: _____. Este proyecto se llevará a cabo en un periodo aproximado de 3 años. Su objetivo principal es realizar pruebas genéticas (como son el cariotipo y la búsqueda de microdelecciones del cromosoma Y) que permitan relacionar alteraciones a este nivel con la infertilidad, en adición a las pruebas y procedimientos que se emplean de manera rutinaria en el diagnóstico y tratamiento para los pacientes con infertilidad (como serían análisis seminal, determinaciones bioquímicas, búsqueda de agentes infecciosos, estudios de imagen, entre otras). Este conocimiento es urgentemente necesario, ya que actualmente en México existe un número importante de pacientes infértiles, en quienes, especialmente en los hombres, se desconocen las causas o factores relacionados con esta patología.

Para la realización de esta investigación se tomarán 7 mL de sangre del cual se obtendrá el material genético (DNA) para la realización posterior de estudios moleculares. A su vez como parte del diagnóstico y manejo habitual de los pacientes con infertilidad se me hará un interrogatorio completo, obtención de datos clínicos, se me realizarán otros estudios de laboratorio, se obtendrán del expediente información clínica y de otros pruebas realizadas previamente para utilizar en el presente estudio y se me podrán solicitar otras muestras biológicas (como sangre y/o semen).

Se me ha dado conocer que los riesgos relacionados con la toma de muestra para mi participación en estudio, son semejantes a cualquier venopunción habitual. Pueden incluir malestar y/o dolor en el sitio de punción, un hematoma y/o infección por la punción. Normalmente estos son mínimos pero pueden estar presentes.

Las muestras de sangre previo a la extracción del DNA, y posteriormente el DNA obtenido se almacenarán temporalmente en el Laboratorio de Medicina Genómica del C.M.N. "20 de Noviembre", bajo responsabilidad y acceso exclusivo de los investigadores involucrados con este proyecto, por un periodo de 5 años o por un periodo mayor si la muestra aún pudiera ser útil. Las técnicas empleadas para el procesamiento de las células en este estudio impedirán el poder regresar posteriormente la muestra donada.

Mi participación en este estudio es completamente voluntaria. No obtendré un beneficio directo de participar en el estudio pero mi participación puede beneficiar a otros en un futuro, en especial a las parejas mexicanas infértiles. Sin embargo los resultados de las pruebas realizadas, podrían ser de mi interés personal por mi condición de infertilidad, por lo que podre solicitar al investigador responsable que mis resultados de las pruebas realizadas me sean entregados en un periodo de tiempo pertinente. Como todo estudio que involucra el análisis del DNA, este es un procedimiento complejo que en general se considera exacto y confiable, pero excepcionalmente puede haber errores. Estos pueden estar ocasionados por discrepancia en la información clínica y/o limitaciones de la tecnología actual. A su vez el hecho de encontrar una alteración en estos estudios no implica necesariamente que sea la causa de mi enfermedad y pueden existir otros factores involucrados.

Los resultados de esta investigación obtenidos a través de mi participación podrán ser presentados en reuniones de carácter científico o podrán ser plasmados en publicaciones científicas. En cualquiera de los casos no se dará a conocer mi identidad u otro dato que pudiera relacionarme directamente con mi muestra y/o resultados obtenidos.



CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE", ISSSTE
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
PARA INVESTIGACION CIENTIFICA



MI muestra de DNA obtenida podrá ser empleada en otros estudios de Investigación que permitan encontrar otras alteraciones genéticas (cromosómicas o génicas) relacionadas con la infertilidad y/o en el desarrollo, implementación o aplicación de nuevas técnicas de diagnóstico cromosómico o molecular de estas alteraciones.

Acepto: SI: _____ No: _____

Nombre del paciente: _____

Firma: _____

Dirección: _____

Teléfono casa: _____ Teléfono celular: _____

Nombre del Investigador: _____

Firma: _____

Nombre del testigo 1: _____

Firma: _____

Nombre del testigo 2: _____

Firma: _____

En caso de dudas en otro momento o posteriormente requerir información adicional relacionada con el proyecto de investigación, usted puede contactar a uno de los investigadores principales: el Dr. Raul Eduardo Pifa-Aguilar, en el número telefónico: (55) 52005003, en la extensión 14645.

Los aspectos éticos del presente proyecto han sido aprobados por el Comité de Ética en Investigación del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", si usted quisiera discutir sobre estos aspectos se puede contactar con el presidente de dicho comité, el Dr. Abel Archundia, al número telefónico: (55) 52005003, en la extensión 14629.