



# 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"

## ESTUDIO DE MICRODELECCIONES PARCIALES DE AZF POR MEDIO DE MLPA EN PACIENTES CON AZOOSPERMIA U OLIGOZOOSPERMIA SEVERA

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:  
ROSA ANGÉLICA ROSALES DE ÁVILA

TUTORES:

MARÍA DEL CARMEN CHIMA GALÁN  
DIVISIÓN DE MEDICINA GENÓMICA

DRA YURITZI SANTILLAN HERNÁNDEZ  
SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA

Ciudad de México, Octubre 2019



Facultad de Medicina





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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: 268.2019**

---

DR. MAURICIO DI SILVIO LÓPEZ

**SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION**

---

DRA. YURITZI SANTILLÁN HERNÁNDEZ

**PROFESOR TITULAR DEL POSGRADO EN GENETICA MÉDICA**

---

DRA MARÍA DEL CARMEN CHIMA GALÁN

**PROFESOR TITULAR DEL POSGRADO EN GÉNETICA MEDIA  
Y ASESOR DE TESIS**

SUSTENTANTE:

---

DRA. ROSA ANGÉLICA ROSALES DE ÁVILA

**SERVICIO DE GENETICA MÉDICA**

**CENTRO MEDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE**

## DEDICATORIA

Esta tesis la quiero dedicar a mis padres, Juanita de Avila Valdez y Adalberto Rosales Caldera, ya que siempre he contado con su infinito apoyo y amor, desde que inicie mis estudios a nivel básico hasta hoy que finalizo mi especialidad en Genética Médica.

Gracias a ustedes nunca me ha faltado nada, han sido mis más grandes maestros y guías. Me enseñaron a ser disciplinada, me dieron toda la confianza para que yo pudiera lograr todo lo que me propusiera. Ustedes creyeron en mí, cuando yo llegue a dudar de mi capacidad. Me enseñaron valores, que hoy en día son invaluable.

No solo eso... me dieron lo mejor que los padres pueden darle a sus hijos, que es crecer en una familia funcional y amorosa, las mejores cosas que ustedes me han dado, son aquellas que no se pueden medir, o decir con palabras, tener un par de padres amorosos, un hogar calentito, comida casera, un hermano, la convivencia, las navidades, los cumpleaños, las bromas, todas esas cosas me hicieron una mejor persona, me hicieron paciente, me hicieron alegre y fuerte, me hicieron amar las cosas sencillas, y tener la frente bien en alto porque sé que ustedes están ahí apoyándome siempre.

Ninguno de mis logros hubiera sido posible, si me hubieran faltado mis grandes pilares. Gracias por su paciencia, por los cuidados, por ser ustedes, y por seguir juntos todos estos años, los admiro, los amo, los respeto, y espero que Dios me los siga guardando muchos años más.

Los ama su hija:

Rosa Angelica Rosales de Avila

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Yuritzí Santillán, porque fue la primera en abrirme las puertas cuando toqué al servicio de Genética Médica del CMN 20 de Noviembre, por creer en mí, aun sin tener un gran currículum, y enseñarme pacientemente genética clínica.

A la Dra. María del Carmen Chima, por ser una gran maestra, por ser súper paciente durante mi primer año, y darme herramientas y conocimientos para que yo me pudiera seguir expandiendo. Gracias por su confianza Dra., gracias por ser aparte de todo una amiga en la que puedo confiar, espero no decepcionarla nunca.

A la Maestra Alicia Cervantes, porque es una excelente maestra, me enseñó todo lo que se de biología molecular, si no hubiera sido tan exigente no hubiera tenido tan grandes progresos, por aclarar todas mis dudas, y por ser un gran ejemplo a seguir.

A la Bióloga Concepción Yerena, porque me enseñó con mucha paciencia citogenética, a ver los cromosomas y sus sutiles diferencias, así como su gran utilidad para el área en la que me desempeño.

Y gracias a todos nuestros pacientes del servicio de Genética Médica, en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, porque obviamente sin ellos, no existiría nuestro servicio, y gracias a sus familias, por darnos la oportunidad de realizar nuestras investigaciones, sin todos ellos no habría oportunidad para seguir aprendiendo.

## ÍNDICE:

RESUMEN	
CAPITULO I	
1.1 Introducción	1
1.2 Antecedentes	1
1.3 Planteamiento del Problema	10
1.4 Justificación	11
1.5 Hipótesis	11
1.6 Objetivos	11
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	13
2.1 Estructura y evolución de los cromosomas sexuales	13
2.2 Cromosoma Y, organización y estructura	14
2.3 Genes en PARS1, PARS2 y NRY	17
2.4 Secuencias Palindrómicas	22
2.5 Causas de la Infertilidad masculina	23
2.6 Causas genéticas de infertilidad	27
2.6.1 Síndrome de Klinefelter	27

2.6.2 Alteraciones Cromosómicas Estructurales	28
2.6.3 Microdeleciones del Cromosoma Y	30
CAPÍTULO III: METODOLOGIA	32
3.1 Materiales y pacientes de estudio	32
3.2 Método para el análisis de microdeleciones del Cromosoma Y	34
3.2.1 Fundamentos de la prueba de <i>MLPA</i>	35
3.2.2 Técnica de <i>MLPA</i>	38
3.2.3 Sondas y regiones utilizadas en el Kit de <i>MLPA</i>	42
3.3 Análisis de Resultados	44
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	47
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS	56
ANEXOS:	62
Aviso de privacidad	63
Consentimiento informado	64
Glosario	67

## RESUMEN

En México y el mundo alrededor del 10-15% de las parejas son infértiles. La mitad tiene un origen en el factor masculino, de las cuales las causas endocrinológicas, criptorquidia, tumores testiculares, infecciones y alteraciones genéticas se han identificado como causas de infertilidad. De las causas genéticas, las microdeleciones del cromosoma Y constituyen la segunda causa más común de infertilidad masculina. Tres regiones del brazo largo del cromosoma Y contienen los genes específicos para la correcta espermatogénesis, y se encuentran deletados hasta en el 10-18% de los pacientes con azoospermia u oligozoospermia severa. Estas deleciones suelen encontrarse en la región "factor de la azoospermia" AZF y están agrupadas en tres regiones: AZFa, AZFb y AZFc. Las microdeleciones se presentan en 1 de 4000 varones en la población general, pero su incidencia aumenta en la población masculina infértil. La deleción de la región AZFc es la más comúnmente deletada, constituyendo aproximadamente el 60% de todas las microdeleciones, seguida de AZFb con un 9% y AZFa con un 3%.

El objetivo del presente estudio fue establecer la presencia de deleciones parciales de AZF por MLPA en pacientes con azoospermia no obstructiva u oligospermia severa, referidos a la consulta Genética Médica por infertilidad.

Se obtuvieron los datos clínicos y de laboratorio (espermatobioscopias) del expediente médico de los pacientes. Para estudiar las microdeleciones parciales de AZF, se obtuvo DNA de leucocitos en sangre periférica, el cual se analizó mediante MLPA (amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación) utilizando el kit de sondas SALSA MLPA P360-A1 de acuerdo con las instrucciones de MRC- Holland.

Al analizar los datos obtenidos de la gráfica de MLPA del paciente 7, encontramos que existen 7 sondas ausentes, 4 de los cuales corresponden a los fragmentos 166nt, 178nt, 373nt, y 418nt, todos corresponden a diferentes exones del gen **BPY2**. Dicho paciente se realizó 2 espermatobioscopias, en la primera se documentó un conteo espermático en oligozoospermia moderada (8.1 millones) que posteriormente avanzó a oligozoospermia severa (66mil), además de los espermatozoides encontrados se reportaron con aztenozoospermia o necrozoospermia.

**Palabras clave:** MLPA, Azoospermia, oligozoospermia, esterilidad, microdeleciones, cromosoma Y

# **CAPITULO I**

## **1.1 INTRODUCCIÓN**

En la evolución de los organismos, la reproducción sexual, ha permitido crear un rápido intercambio genético, y con ello incrementar de manera exponencial la variación, dentro de una especie, y ésta a su vez aumentar la capacidad de adaptación y supervivencia de dichos organismos.

En los humanos, la determinación del sexo, está dada por la presencia de los cromosomas sexuales, XX para las mujeres y XY para los varones. El cromosoma Y, es el cromosoma más pequeño y se puede decir que es un cromosoma “impar”, ya que no es completamente homólogo a su contraparte el X, por lo que dicha característica, ha hecho que a lo largo de la historia este cromosoma haya ido perdiendo parte de su material genético.

Dentro del cromosoma Y, encontramos genes que son específicos para la determinación del sexo, la maduración de los órganos sexuales, y la correcta espermatogénesis. Nuestro conocimiento acerca de la distribución de nuestro material genético, así como su función han ido en expansión en los últimos años gracias a las nuevas tecnologías de biología molecular. El presente estudio trata de identificar la causa de esterilidad masculina de origen genético y contribuir a la construcción de nuevos conocimientos del tema, y que la reproducción humana, básicamente es el futuro de todos como especie.

## **1.2 ANTECEDENTES**

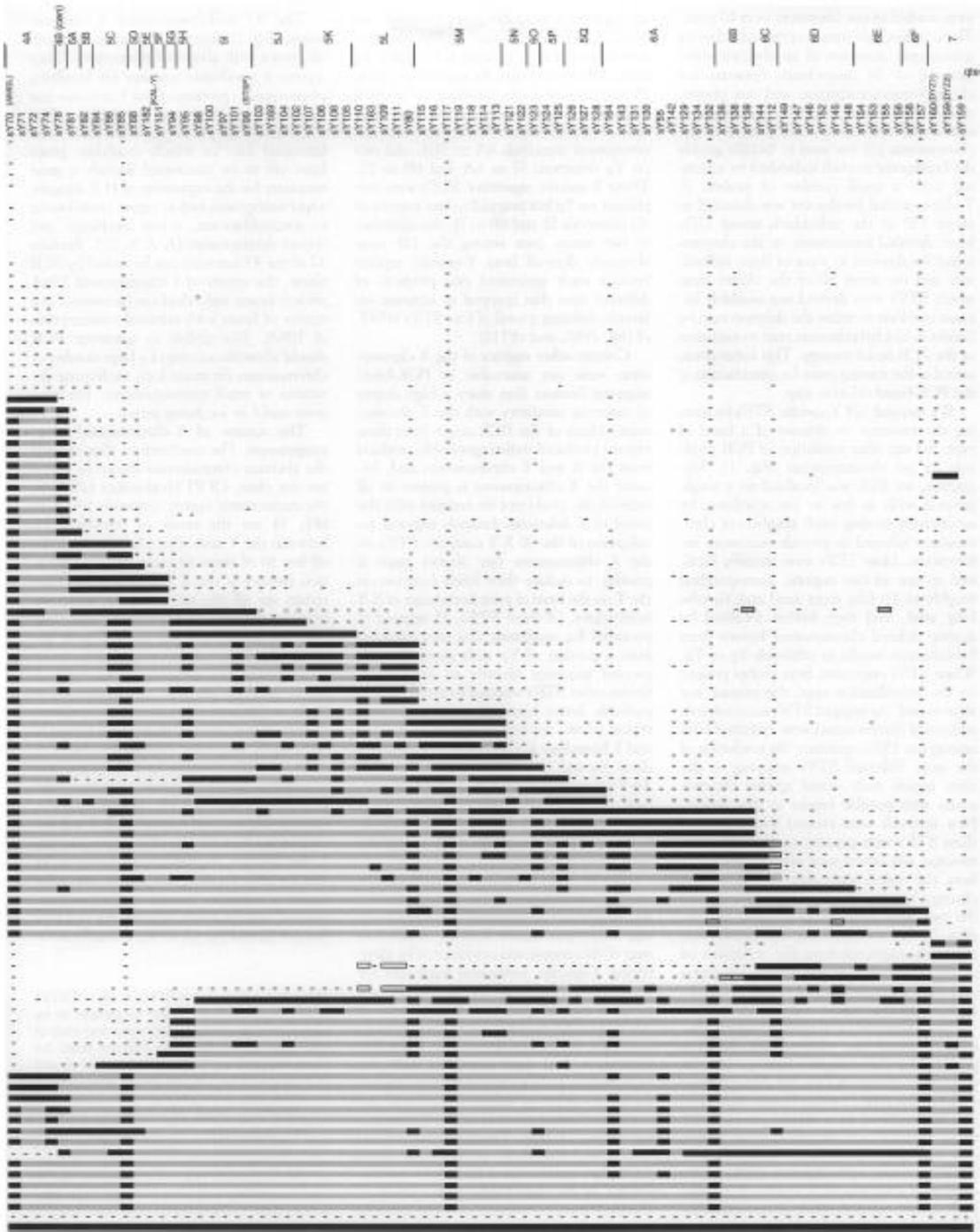
Tiepolo y Zuffardi fueron los primeros en establecer la asociación entre azoospermia y deleciones microscópicas del brazo largo del cromosoma Y en 1976 (1). Durante su estudio que abarco 1170 hombres subfértiles, con anomalías óseas, (por lo que se les había indicado estudio de cariotipo) encontraron 6 pacientes que habían perdido la porción distal del brazo largo (Yq12 porción heterocromática) y que abarcaba una pequeña parte en Yq11. Todos los pacientes presentaron un fenotipo masculino normal y azoospermia.

Hacia 1896, Gilles Vergnaud y colaboradores, 10 años posteriores a la primera asociación entre deleciones del brazo largo del cromosoma Y y la falla espermatogénica, publicaron un artículo que mapeaba el cromosoma Y, basado en las secuencias deletadas, mediante hibridación de DNA. Este mapeo fue muy interesante ya que los pacientes estudiados fueron 27 individuos (19 hombres XX, dos hermafroditas XX, y 6 hombres con anomalías detectables por cariotipo), cada uno de los cuales portaba una porción simple y continua de un cromosoma Y. Los resultados permitieron organizar el primer mapa del cromosoma Y dividiéndolo en 7 regiones, las primeras 3 ubicadas en el brazo corto Yp, la región 4 al centrómero y las regiones 5, 6 y 7 ubicadas en Yq entre el centrómero y la región heterocromática de Y. (2)

Los primeros casos de microdeleciones Y e infertilidad masculina se comunicaron en 1992 (3). En este estudio realizado por Vogt y colaboradores, se propusieron identificar la causa de infertilidad en hombres con azoospermia y cariotipos reportados como normales, bajo la hipótesis de que debía haber una alteración submicroscópica en la región asociada a la azoospermia (AZF) previamente reportada por Tiepolo y Zuffardi. Dichas deleciones debían abarcar entre 1 y 2Mb haciendo imposible su detección mediante el cariotipo. Se diseñaron entonces 29 sondas específicas de Y, y se analizaron 19 pacientes masculinos con diagnóstico de oligozoospermia o azoospermia. El resultado final fue la detección de 2 pacientes con deleciones. Curiosamente estos pacientes no compartían la misma deleción, uno de ellos presentaba una deleción más proximal al centrómero mientras que el segundo presentaba una deleción más distal al mismo. En ese momento se postuló que probablemente ambas deleciones abarcaban o incluían una parte del gen de AZF (en ese momento aún se creía que se trataba de un solo gen).

Durante ese mismo año, se realizó un esfuerzo por mapear el locus de AZF. El cromosoma Y, por ser impar y no sufrir recombinación durante la meiosis, (además de ser un cromosoma pequeño) fue el candidato perfecto para intentar ordenar su secuencia de DNA. En octubre de 1992, se publica un mapa preliminar de las regiones STS del cromosoma Y, en la revista Science (4) **Figura 1**. Dicho

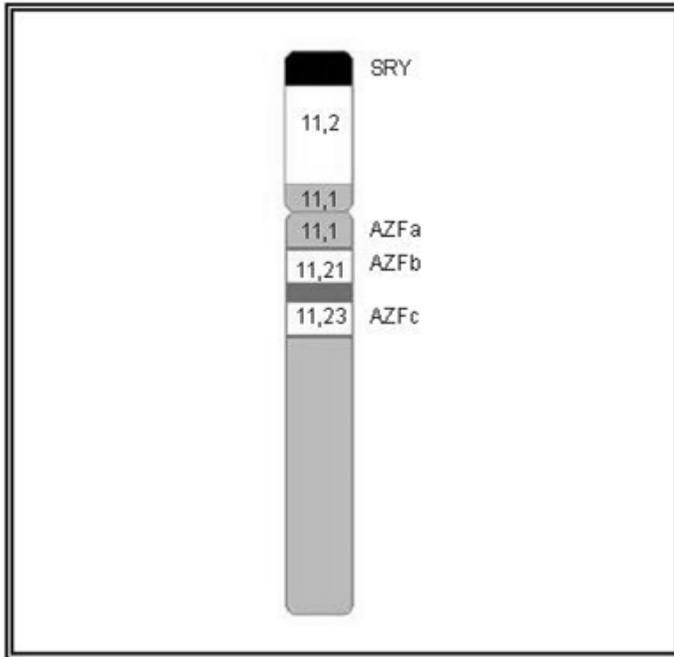
mapa sentó las bases para la comparación de la estructura del cromosoma Y con otras especies (importancia evolutiva), su divergencia con el cromosoma X, permitir el estudio de la diversidad de los cromosomas Y entre las poblaciones y finalmente elucidar los mecanismos por los cuales los cromosomas Y anormales son generados.



**Figura 1:** Imagen de cómo se construyó el mapa genético del cromosoma Y, mediante sondas STS amplificadas por PCR. Recuperado de: Vollrath, D., Foote, S., Hilton, A., Brown, L. G., Beer-Romero, P., Bogan, J. S., & Page, D. C. (1992). The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science*, 258(5079), 52-59.

Hacia 1996 Vogt et al. Analizaron 370 pacientes con diagnóstico de azoospermia idiopática y oligozoospermia severa para deleciones en 76 loci del brazo largo del cromosoma Y, y encontraron microdeleciones en 13 pacientes, 3 de los cuales tenían una deleción proximal, 3 en la región media y 7 adicionales en la región más distal del cromosoma Y. Además de esto, se analizaron las biopsias testiculares de los pacientes.

Un paciente con deleción proximal tenía síndrome de sólo células de Sertoli, sin células germinales en ninguno de sus túbulos seminíferos. En los tres pacientes con la deleción media de Yq11, la histología en la biopsia testicular mostró una detención en la maduración de las espermátides en la etapa de espermatoocito. Había espermatoogonias, pero ninguna célula postmeiótica pudo ser detectada. Los resultados de la biopsia de los 5 pacientes que mostraron deleciones distales de Yq11, sugirieron defectos en la espermatogénesis postmeiótica, o durante la maduración del esperma. Como los pacientes presentaron microdeleciones en 3 subregiones diferentes, los pacientes presentaron fenotipos espermáticos diferentes con interrupción en la maduración en puntos diferentes de la espermatogénesis. En este momento, las diferentes regiones fueron asignadas como AZFa, AZFb, y AZFc.(5) **figura 2.**



**Figura 2:** Esquema representativo del cromosoma Y mostrando las regiones AZFa, AZFb, y AZFc. Modificado de: Meza-Vázquez, H.E., Rosas-Vargas, H., Vite-Velázquez, E.J., & Alba-Mayans, A.G. de. (2007). Aportación de un caso. Paciente con varicocele y oligozoospermia, con microdeleción en cromosoma Y: AZFb+c. *Actas Urológicas Españolas*, 31(3), 285-288.

Foresta y cols. Publicaron en el año 2001, una revisión de las publicaciones realizadas hasta ese momento, más de 4,800 pacientes habían sido estudiados y publicados. Las deleciones eran más frecuentemente encontradas en pacientes con azoospermia que con oligozoospermia severa. Las deleciones más frecuentemente reportadas eran en la región de AZFc, incluyendo a los genes de la familia DAZ (en este momento ya se habían vinculado algunos genes a la falla en la maduración espermática como *DAZ*, *RBMY*, *USP9Y* y *DBY*). En este año se reportó que la prevalencia de las microdeleciones de Y, era del 4% en los pacientes oligozoospermicos, del 14% en hombres con oligozoospermia severa y del 18% en pacientes con azoospermia idiopática. (6). Los criterios de selección entonces, podían influir sustancialmente en la prevalencia de las microdeleciones. La región conocida y secuenciada del cromosoma Y en ese momento era de un 40%.y la mitad habían sido mapeados físicamente. Junto con este mapa de secuencias se habían generado 300 STS, las cuales son secuencias conocidas de DNA genómico que pueden amplificarse por PCR. Se habían identificado alrededor de 30 genes y familias de genes, los cuales clasificaron en 3 grandes grupos:

1. **Genes pseudoautosómicos:** son secuencias idénticas en los cromosomas X y Y con pocas excepciones se expresan en diferentes tejidos.
2. **Genes ubicados dentro de las regiones no homologas X-Y en la porción no recombinante. (*USP9Y, DBY Y UTY*)** estos genes tienen homólogos en el cromosoma X que codifican para proteínas con muy alta identidad de aminoácidos. Estos genes se expresan de forma omnipresente, aunque algunos tienen transcripciones testi-específicas, además de transcripciones ubicuas.
3. **Familias de genes específicas de Y (*DAZ, CDY y TSPY*).** Estos son genes multicopia ampliamente distribuidos en el cromosoma Y, o agrupados dentro de una pequeña región y se expresan sólo en testículo.

En esta revisión no encontraron una clara correlación entre el tamaño, la localización de las deleciones y el fenotipo testicular, pero encontraron que las deleciones más grandes estaban asociadas con un daño testicular más severo.

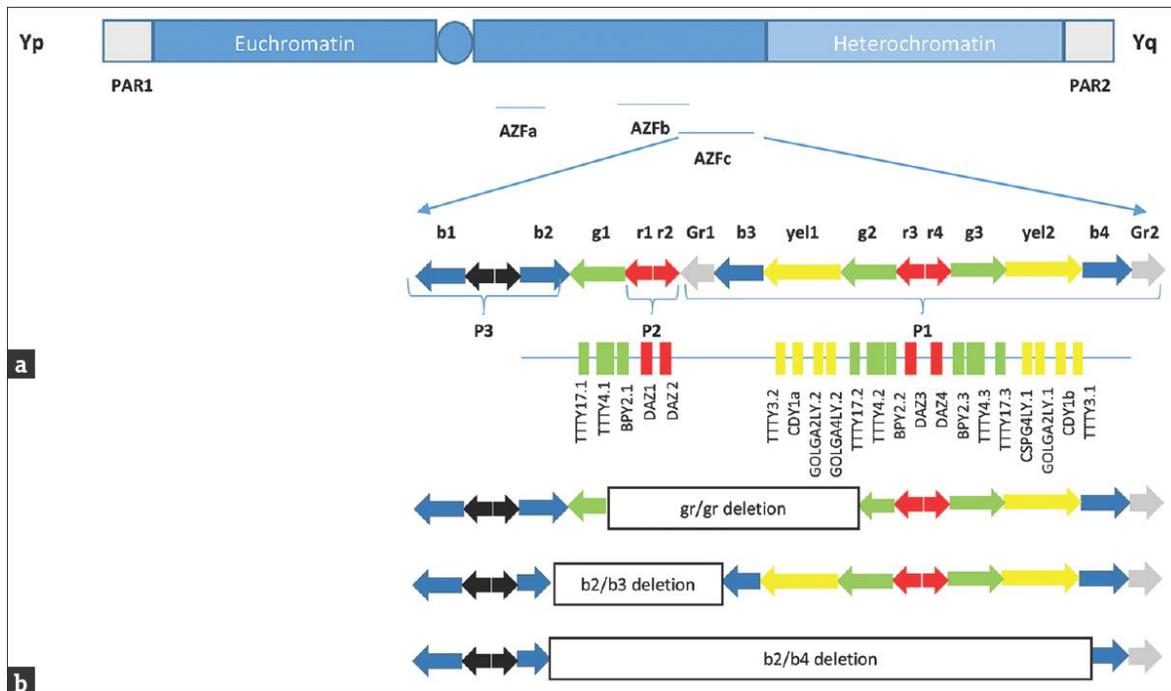
En el 2005 estos mismos autores (Foresta y cols), propusieron que los hombres infértiles, pueden tener mayores probabilidades de presentar anomalías genéticas en comparación con los hombres fértiles. En este reporte estudiaron 750 hombres con oligozoospermia severa que eran candidatos a técnicas de reproducción asistida (inyección intracitoplasmática de esperma ICSI) y 303 hombres fértiles. A estos pacientes se les realizó cariotipo en sangre periférica, detección de microdeleciones del brazo largo del cromosoma Y, detección de mutaciones en el gen de la fibrosis quística (CFTR) y en el gen del receptor de andrógenos. En este estudio descubrieron un total de 104 anomalías genéticas, correspondiendo a una frecuencia del 13.9%. Las aberraciones cromosómicas estuvieron presentes en un 5.6% de hombres infértiles y solamente en el 0.3% de los controles. La mayoría de estos casos fueron alteraciones en los cromosomas sexuales. Las microdeleciones de Yq estuvieron presentes en el 6% de los hombres infértiles y la mayor frecuencia estuvo relacionada con la región de AZFc, mientras

que en ninguno de los controles se encontraron deleciones. Las mutaciones en el gen *CFTR* fueron diagnosticadas en el 1.2% de hombres infértiles y en el 1% de los controles, y las mutaciones en el receptor de andrógenos (*AR*) se encontraron en el 1.1% de los hombres infértiles pero en ninguno de los 188 controles. (7)

En el 2007 Yi, Wen Lin y cols., caracterizaron la región de AZF en la población china Han, para lo cual incluyeron muestras de DNA de 142 hombres infértiles con oligospermia y 107 controles fértiles. El método de estudio fue por medio de PCR múltiplex. El rastreo inicial identifico 81 individuos con duplicaciones/deleciones en AZFc. Ellos reportaron que ninguno de los pacientes tenía la deleción de AZFc, consistente con la prevalencia previamente reportada de 1 en cada 4,000 hombres, encontraron además que la supresión gr/gr (subregión proximal de AZFc que abarca 1.6Mb y que contiene 2 copias de genes DAZ) estaba presente en un total de 32 sujetos (5.5%). La deleción b2/b3 (Subregión de AZFc que abarca 1.8Mb) (**figura 3**) fue reportada en un total de 23 individuos (4%). Ellos reportaron la duplicación parcial de AZFc como un factor de riesgo para la infertilidad masculina, aproximadamente el 14% de la población presentaba deleciones y duplicaciones en AZFc, siendo la deleción gr/gr la más común, en esta población no se observaron diferencias en las frecuencias de estos dos tipos de deleción entre los sujetos infértiles y los controles, lo que planteaba que no era un factor de riesgo para la infertilidad en la población Taiwanese Han. Por otra parte si asociaron la duplicación parcial de AZFc a un mayor riesgo de falla espermatogénica en dicha población. (8)

Por el mismo año de 2007 Ferlin y colaboradores, estudiaron a un total de 3073 hombres infértiles italianos de los cuales 625 tenía azoospermia no obstructiva y 1,372 tenía oligozoospermia severa e identificaron microdeleciones en Yq11 en 99 individuos. La prevalencia de las microdeleciones fue de 3.2% en hombres infértiles. 8.3% en hombres con oligozoospermia, y en 5.5% en pacientes con oligozoospermia severa. La mayoría de las deleciones eran del tipo AZFc b2/b4 (b2/b4 es una subregión de AZFc que abarca 3.5Mb) (**figura 3**) y estuvieron asociadas a un fenotipo espermático muy variable, con espermatogénesis residual en un 72% de los casos. Una vez más las deleciones más proximales en AZFa y

AZFb estuvieron asociadas con el síndrome de solo células de Sertoli y alteración en la maduración de los espermatoцитos respectivamente. Mientras que las deleciones parciales en estas regiones fueron asociadas a un fenotipo menos grave y frecuentemente a la presencia de espermatoцитos, no se encontró ninguna deleción en los hombres con un conteo de más de 5 millones de espermatoцитos por mililitro en los 310 controles. (9)



**Figura 3:** Representación esquemática de las deleciones en la subregión de AZFc, gr/gr, b2/b3, y b2/b4. Recuperado de Journal of Reproductive Science en; [http://www.jhrsonline.org/viewimage.asp?img=JHumReprodSci\\_2017\\_10\\_4\\_256\\_223277\\_f1](http://www.jhrsonline.org/viewimage.asp?img=JHumReprodSci_2017_10_4_256_223277_f1)

En el 2013 Krauz C. y cols., publican en la revista *Andrology* Directrices para el diagnóstico de microdeleciones cromosómicas (10), ellos reportan que el 80% de las deleciones son reportadas en la región de AZFc, seguido en orden de frecuencia de AZFb con un 1-5% y AZFa con una frecuencia del 0.5 al 4%. Dado que hay una gran variabilidad en la detección de microdeleciones no recomiendan la detección de deleciones específicas de genes aislados en el diagnóstico de rutina, este debe ser siempre realizado con un panel amplio de sondas para una mejor oportunidad de detección. También recalcan que el diagnóstico de deleciones completas de AZFb

o AZFc implica que hay una nula posibilidad de encontrar espermatozoides. Solo los pacientes con microdeleciones parciales de AZFc (que son las más frecuentes) tienen la posibilidad de tener espermatogénesis residual e incluso en casos raros, pueden transmitirse de forma natural a los hijos varones. En estos casos hay un 50% de probabilidades de recuperar espermatozoides y niños pueden ser concebidos mediante técnicas de reproducción asistida como son la inyección intracitoplasmática de esperma. Ellos establecen también mediante la revisión de la literatura, cuales son las características que deben poseer los pacientes para ser candidatos a un cribado molecular.

- a. No se han identificado deleciones en varones normospermicos, por lo que hay una clara causa-efecto con la insuficiencia espermatogénica.
- b. La frecuencia de las microdeleciones se encuentra en varones azospermicos (8-12%) seguida de los oligozoospermicos severos (3-7%)
- c. Las deleciones son extremadamente raras en varones con >5 millones de espermatozoides/ml.
- d. La presencia de cualquier diagnostico acompañado de azoospermia u oligozoospermia severa debe ser una indicación para la prueba de AZF

También establecen las contraindicaciones para la prueba:

- No está indicado realizar el tamizaje de deleciones en pacientes con anomalías cromosómicas
- No está indicado en pacientes con diagnóstico de azoospermia obstructiva o hipogonadismo hipogonadotrópico.

Y finalmente el asesoramiento genético en estos pacientes, (en aquellos con deleciones parciales en AZF) es obligatorio para proporcionar el riesgo de concebir un hijo con espermatogénesis alterada. Dicho asesoramiento genético también es relevante para otros miembros masculinos de la familia, ya que la literatura ha revelado la transmisión de este tipo de deleciones.

En conclusión, la especificidad y la correlación genotipo/fenotipo descrita anteriormente confieren al análisis de las deleciones Y, un valor diagnóstico y pronóstico para los pacientes con infertilidad. Se sabe que los pacientes que presentan deleciones de la región AZFa, tienen un fenotipo más severo, fallo espermatogénico, y síndrome de sólo células de Sertoli, (azoospermicos). Las deleciones de la región AZFb y AZFbc, pueden resultar en un síndrome de sólo células de Sertoli, o arresto espermatogénico, resultando en azoospermia. Por último, las deleciones de la región AZFc producen un fenotipo menos severo con espermatogénesis residual, los individuos portadores pueden tener oligozoospermia moderada a severa, e incluso pueden llegar a transmitir naturalmente el defecto a su descendencia, y debido a que las deleciones en AZFc son las más frecuentes y conservan espermatogénesis residual, los pacientes portadores pueden ser candidatos a técnicas de reproducción asistida.

### **1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Muchas parejas con problemas de infertilidad solicitan, ser valorados por el servicio de Reproducción Humana, para establecer las causas de su infertilidad y buscar opciones de tratamiento.

En México, del 10 al 15% de las parejas son infértiles, 50% tienen causas masculinas identificables, alrededor del 30% de estas permanecen con un diagnóstico "idiopático"(11). Dentro de las causas identificables, las genéticas se encuentran en alrededor de 3.4% de los pacientes, pero estas incrementan su frecuencia en pacientes con azoospermia, hasta en un 17%. Dentro de las causas "idiopáticas" puede haber un alto porcentaje de pacientes subdiagnosticados, con microdeleciones del cromosoma Y, ya que la técnica de PCR actualmente empleada sólo permite reconocer dos STS de cada una de las regiones AZFa, AZFb y AZFc, en cambio la técnica de *MLPA* tiene 44 sondas de la región de AZF, lo que permite identificar deleciones parciales.

Nos propusimos investigar si entre los pacientes con resultados negativos para microdeleciones del cromosoma Y previamente estudiados con PCR múltiplex, son portadores de microdeleciones parciales, para correlacionar los hallazgos con el fenotipo del paciente.

#### **1.4 JUSTIFICACION**

Cada una de las diferentes deleciones de la región Yq11 presentan un fenotipo diferente, determinar si un paciente es portador de una microdelección, permite establecer un pronóstico reproductivo, delimitar que pacientes son candidatos a técnicas de reproducción asistida, y otorgar un asesoramiento genético para aquellos candidatos portadores de microdeleciones, ya que invariablemente serán heredadas a toda la descendencia masculina.

#### **1.5 HIPOTESIS**

Las microdeleciones parciales de la región de AZF en el cromosoma Y, son causa de azoospermia, oligozoospermia severa, e infertilidad y pueden ser identificadas mediante la técnica de *MLPA*.

#### **1.6 OBJETIVOS**

##### **Objetivo general:**

- ✓ Identificar microdeleciones parciales de AZF, en pacientes con azoospermia no obstructiva u oligozoospermia severa, a través de la técnica de *MLPA* (amplificación múltiple de sondas ligadas).

##### **Objetivos específicos:**

- ✓ Identificar deleciones parciales de AZF en pacientes con azoospermia u oligozoospermia severa a través de *MLPA*

- ✓ Establecer la correlación entre los datos clínicos encontrados y el estatus reproductivo del paciente.
- ✓ Correlacionar resultados moleculares y características morfológicas de los espermatozoides
- ✓ Informar de los resultados del estudio a los pacientes, así como otorgar su asesoramiento genético para que con base en la información otorgada, sean capaces de tomar una decisión informada.

## **CAPITULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 ESTRUCTURA Y EVOLUCION DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES**

Los cromosomas sexuales humanos X y Y, provienen de dos autosomas ancestros homólogos entre sí, como ocurre en prácticamente todas las especies. En algunos reptiles, anfibios y peces, por ejemplo, la determinación del sexo está dada por el ambiente, como la temperatura a la que son incubados los huevos (12) Cuando un autosoma adquiere una mutación para la determinación del sexo, se “suspende” la recombinación de dicha región incluidas las secuencias flanqueantes a la misma, (13) lo que causa una herencia específica del sexo, que no depende de factores externos.

De hecho se requieren dos mutaciones para que los sexos separados evolucionen a partir del hermafroditismo, una que suprima la fertilidad masculina, y otro que suprima la infertilidad femenina (14). La falta de recombinación a lo largo del tiempo, entre los cromosomas X y Y, ocasiona que los genes antagónicos sexuales se vayan acumulando y los cromosomas sexuales diverjan entre sí, haciendo que cada uno gane genes específicos del sexo. (13), esto es ventajoso ya que de esta manera los genes determinantes del sexo, y de las funciones específicas se irán heredando juntos.

Conforme el tiempo pasa y las generaciones avanzan, uno de los cromosomas sexuales, en nuestro caso el cromosoma Y, va perdiendo los genes homólogos que tenía con el cromosoma X; lo que conduce a su acortamiento, y al acúmulo de mutaciones deletéreas. Los cromosomas X por su parte, en las hembras de mamíferos, siempre tiene un homólogo con quien recombinar, por lo que no sufren dicho acortamiento. Recordemos que el mecanismo de recombinación entre autosomas homólogos es un mecanismo de reparación, y no solo sirve para generar variabilidad (15).

Aunque en mamíferos no se suprime la recombinación del todo, ya que existe una pequeña parte en la porción subtelomérica en los cromosomas sexuales denominada PAR (de Pseudoautosomical Region) (16) donde sí se lleva a cabo la recombinación, representa solo una mínima parte del conjunto, el resto del material genético se queda sin recombinar, lo que lleva a un inevitable acortamiento, y esto conduce a una expresión génica desigual entre hombres y mujeres. La solución que la evolución nos ofrece es la inactivación de uno de los cromosomas sexuales en el sexo homocigoto (en nuestro caso las hembras XX) (17) La compensación de dosis es un fenómeno común que ocurre en los mamíferos, pero es parcial en las aves y en algunas serpientes. (18)

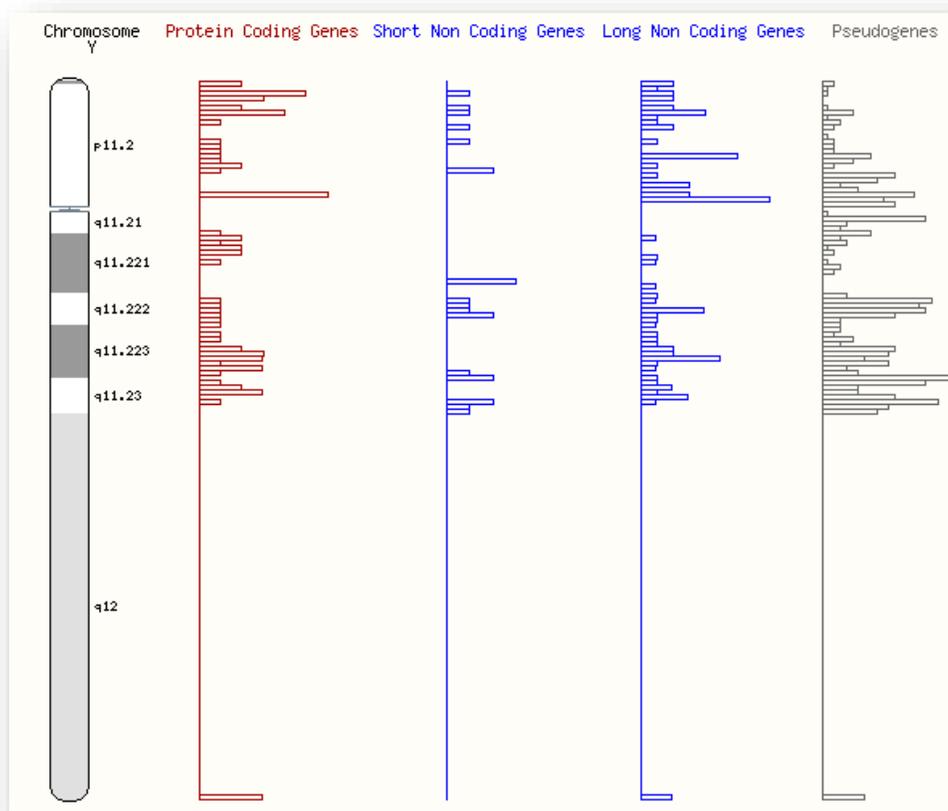
Estos cambios pueden conducir a la desaparición completa del cromosoma Y, y a su vez llevar a la evolución de un nuevo gen determinante del sexo en un autosoma, o a la trasposición de un locus determinante del sexo a un autosoma, o a fusiones entre los autosomas y los cromosomas sexuales existentes (19).

La ausencia de recombinación también resulta deletérea para los genes albergados dentro de la región no recombinante del cromosoma Y (NRY), donde se van acumulando mutaciones, y elementos transponibles los cuales pueden autoreplicarse e insertarse en nuevos sitios. La región no recombinante, se caracteriza por poseer repetidos en tándem, y repetidos palíndricos, lo que la hace susceptible a eventos de recombinación intracromosómica. Una recombinación desigual entre dichas secuencias puede conducir a deleciones, duplicaciones y reordenamientos complejos (20)

## **2.2 CROMOSOMA Y: ORGANIZACIÓN Y ESTRUCTURA**

Dentro del cromosoma Y, existen 57 millones de pares de bases, 65 genes codificantes para proteínas 105 genes no codificantes, 394 pseudogenes, y una gran región heterocromática que no ha sido posible secuenciar (21) (**Figura 4**). Es el cromosoma humano más pequeño y con la menor densidad génica, como se

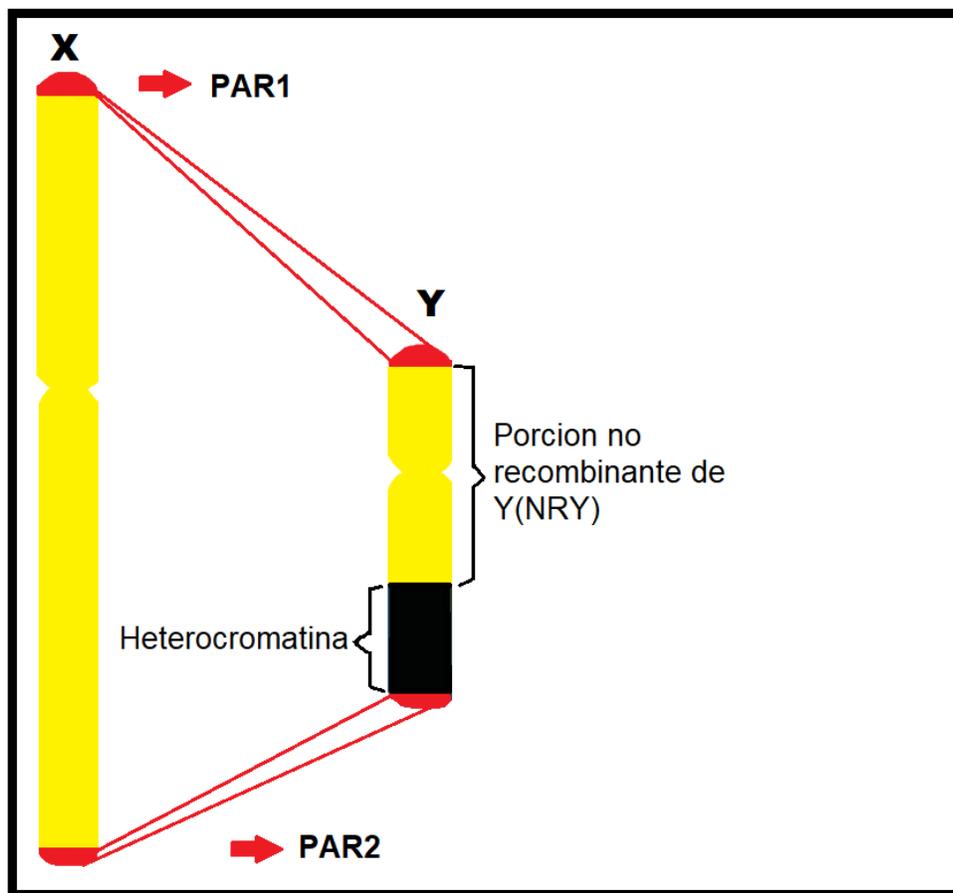
describió en el apartado anterior, no cuenta con un cromosoma homólogo como tal, y se compone (además de genes) de una gran cantidad de secuencias repetidas. A gran escala muestra polimorfismos estructurales pero una poca variación en secuencias, esta característica puede ser entendida por su rol en la determinación del sexo masculino, y gracias a ello, se ha podido determinar en buena medida el árbol filogenético del cromosoma Y (ya que es una región que no sufre recombinación), y con ello se ha podido inferir el tiempo y el lugar de origen del “Adan cromosómico”, hace aproximadamente 338,000 años. (22)



**Figura 4:** Características del cromosoma Y, genes codificantes para proteínas (rojo), genes no codificantes (azul) Pseudogenes (gris). Obtenido Ensembl en [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/Chromosome?r=Y:3884385-3984385](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Chromosome?r=Y:3884385-3984385)

El cromosoma Y puede ser dividido en 2 grandes regiones, una región recombinante, que corresponde a la región pseudoautosómica (PAR1 y PAR2) y

una región no recombinante (NRY). (**Figura 5**) Dentro de la región recombinante encontramos genes que se encuentra tanto en cromosoma X como en el cromosoma Y y que son requeridos en doble dosis para el desarrollo adecuado. La PAR1 es una región obligada para la recombinación entre el cromosoma X y Y, mientras que para la PAR1 no siempre es necesario recombinar. (23). El cromosoma Y también puede ser dividido en región eucromática (donde se encuentran las secuencias codificantes) y la región heterocromática, donde no hay secuencias codificantes.



**Figura 5:** Regiones dentro de los cromosomas sexuales. PAR1 Y PAR2 regiones donde se lleva a cabo la recombinación.

En el brazo corto, justo por debajo de PAR1, tenemos la región determinante del sexo (*SRY*). *SRY* es el TDF (factor determinante de testículo), codifica para una proteína del tipo factor de transcripción, pero no se han dilucidado todas las secuencias sobre las cuales actúa, uno de los genes candidatos es *SOX9* (sex

determining region Y box 9), cuya mutación ha sido encontrada en pacientes con displasia campomélica y disgenesia gonadal o regresión sexual XY. (24)

### **2.3 GENES EN PAR1, PAR2 Y NRY**

PAR1 y PAR2 contienen al menos 29 genes. PAR1 contiene genes que escapan a la inactivación de X (24 genes), es decir estos genes son requeridos en doble dosis tanto en hombres como en mujeres, por ejemplo el gen SHOX está directamente relacionado a la Osteogenesis y la talla, cuando se carece una copia de este gen (como en el caso de la monosomía X, o síndrome de Turner) se producen alteraciones esqueléticas y talla baja. (25) PAR2 por otro lado contiene solo 5 genes.

Dentro de NRY (la porción no recombinante) encontramos la región eucromática y la heterocromática. La región heterocromática, no es transcripcionalmente activa y se ha visto variación en su tamaño entre las poblaciones, sin conocerse una implicación clínica. (26). La porción eucromática abarca la región pericentromérica tanto del brazo corto como del brazo largo del cromosoma Y, contiene secuencias que se han dividido tradicionalmente en 3, las traspuestas a X, las X degeneradas y amplicónicas. (27) **(Figura 6)**. Las secuencias traspuestas con X, son compuestas en su mayoría por elementos repetitivos, y secuencias codificantes que se expresan ubicuamente en los tejidos, mientras que las secuencias amplicónicas contienen genes y factores de transcripción que se expresan únicamente en testículos, contribuyen a la formación de gónadas, la regulación de la espermatogénesis, al desarrollo cerebral, cardiaco y renal.

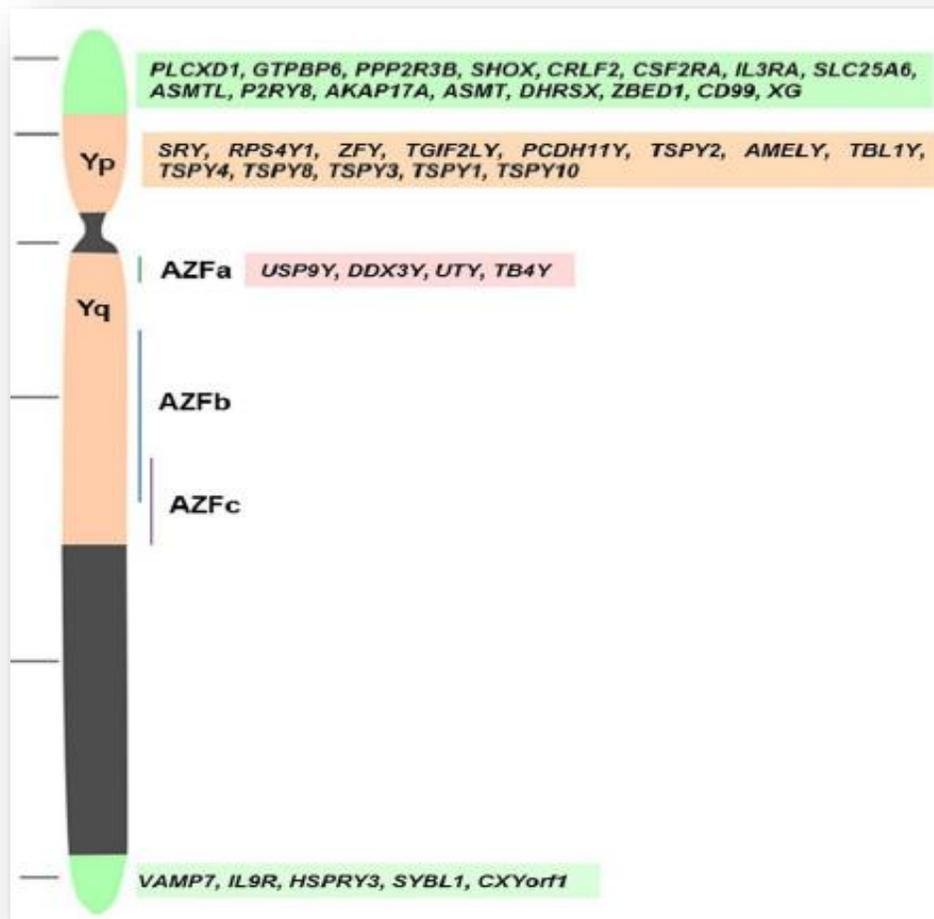
**Tabla 1: Genes en el cromosoma Y y su función**

Gen	Localización	Función	Expresión celular en testículos	Expresión en otros tejidos	Rol en la espermatogénesis.
AMELY	Yp11.2	Familia Amelogenina proteínas de la matriz extracelular	Poco RNA en testículos	RNA en tiroides	Desconocido
ASMT	PAR1	Cataliza la reacción final de la síntesis de la melatonina	NA	RNA en el epididimo	Desconocido
ASMTL	PAR1	Actividad de metiltransferasa	Células germinales y Leydig	Múltiple	Desconocida
BPY1 y BPY1B	Yq11.221  AZFa	Codifica una proteína que interactúa con la proteína ubiquitin ligasa E3A y puede estar involucrada en el desarrollo de las células germinales y la infertilidad masculina	Ambas son expresadas en la espermatogonia, el espermatocito en preleptoteno, espermatocitos en paquiteno, espermatocitos redondos y espermátides alargadas.	Testículo específico	Desconocido
BPY2, BPY2B y BPY2C	Yq11.223 BPY2 en AZFb/c BPY2B en AZFb/c y BPY2C en AZFc	Similar a BPY1 y BPY1B	RNA en testículos	Específica de testículo	Regulación del citoesqueleto
CDY1A y CDY1B	Yq11.23  CDY1A en AZFb/c,  CDY1B en AZFb y AZFc	Codifica una proteína que contiene un cromodominio y un dominio catalítico histona acetiltransferasa	RNA en testículos	Específica de testículo	Dominio catalítico de histona acetiltransferasa
CDY2A	Yq11.222  AZFb	Similar a CDY1A y CDY1B	RNA en testículos	Testículos y epididimo	Regulación de la expresión génica y remodelación post-meiótica nuclear
CRLF2	PAR1	Codifica para un receptor miembro de la familia receptores de Citoquina	NA	NA	NA
CSF2RA	PAR1	La proteína codificada por este gen es la subunidad alfa de un receptor heterodimérico para el factor 2 estimulante de colonias.	RNA en	Múltiples tejidos, altamente expresado en placenta.	Desconocido.
CSFR2Rα	PAR1	Receptor que une al factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos	NA	Expresión en múltiples tejidos (Solo RNA)	Desconocido
CSPG4LY	Yq11.23 AZFb y AZFc	Pseudogen	NA	NA	Desconocido
CYorf15A y CYorf15B	Yq11.22 AZFb	Pseudogen	NA	NA	Desconocido
DAZ1, DAZ2 y DAZ4	Yq11.223 DAZ1 en AZFb/c	Codifica para una proteína de un non a RNA que tiene un rol importante durante la espermatogénesis	Expresados en la espermatogonia en preleptoteno y el	Proteínas exclusivas de testículos	Regulación pre-meiotica de la transcripción, transporte y

	DAZ2 en AZFb/c DAZ4 en AZFc		paquiteno de espermatocitos		almacena-miento, iniciación de la traducción e interacción proteínica.
DAZ3	Yq11.223 AZFc	Similar a DAZ1, DAZ2 y DAZ3	Expresado en la espermatogonia en preleptoteno y el paquiteno de espermatocitos	Específica de testículos	Regulación premeiotica de la transcripción, transporte y almacena-miento, iniciación de la traducción e interacción proteínica
DBY	Yq11.22 AZFa	Codifica para una proteína que forma parte de la familia de helicasas DEAD-box RNA	Células germinales máxima expresión en espermatogonias	Múltiples tejidos RNA alto en testículos y proteína más alta en amígdalas	Metabolismo del RNA en células germinales premeiotica
EIF1AY	Yq11.223 AZFb	Codifica para una proteína relacionada al factor de inicio de la traducción eucarionta 1 <sup>a</sup>	Presente en células germinales y de Leydig	Múltiples tejidos	Regula la iniciación de la traducción
GOLGA1, GOLGA2LY, GOLGA3, GOLGA5, GOLGA7	Yq11.23 GOLGA2LY en AZFb y AZFc	Genes que pertenecen a la familia de genes Golgin	Presente en células germinales y de Leydig	Múltiples tejidos	Desconocido
GOLGA6B y GOLGA6D	Yq11.23	Genes que pertenecen a la familia de genes Golgin	Espermatogonia, y espermátides redondas y alargadas	RNA en hígado y testículos, proteína solo presente en testículos	Desconocido
GOLGA6C	Yq11.23	Gen que pertenecen a la familia de genes Golgin	Espermatogonia, y espermátides redondas y alargadas	Específica de testículos	Desconocido
GOLGA6L7P	Yq11.23	Gen que pertenecen a la familia de genes Golgin	RNA en testículos	Específica de testículos	Desconocido
GTPBP6	PAR1	Codifica para una proteína GTP de unión	Células germinales	Múltiples tejidos	Desconocido
HSFY1 y HSFY 2	Yq11.222 AZFb	Codifica para un miembro del factor de choque térmico	Ambos RNA expresados en testículos	Específica de testículos	Regulador de splicing durante la espermatogénesis
HSPRY3	PAR2	Pseudogen	NA	NA	Desconocido
IL3RA	PAR1	Subunidad alfa del receptor de interleucina 3	Células germinales y de Leydig	Múltiples tejidos, altamente expresado en cerebro y trompas de Falopio	Desconocido
CD99	PAR1	Codifica para una glicoproteína de superficie celular	Células germinales	Múltiples tejidos	Desconocido
NLGN4Y	Yq11.221	Codifica para un tipo de proteína de membrana I, que pertenece a la familia de proteínas adhesión	RNA expresado en testículos	RNA expresado en múltiples tejidos. La proteína es exclusiva de colon y cerebro	Desconocido
P2RY8	PAR1	Codifica para una proteína G de membrana de la familia de proteínas G acopladas a receptor	RNA en testículos	Múltiples tejidos	Desconocido

PCDH11Y	Yp11.2	Codifica para una proteína con repetidos de cadherinas	NA	ARN en la corteza cerebral, placenta y vesículas seminales	Desconocido
PGPL	PAR1	Codifica para una proteína de unión GTP	Células germinales	Múltiples tejidos	Desconocido
PLCXD1	PAR1	Desconocido	Células germinales y de Leydig	Múltiples tejidos	Desconocido
PPP2R3B	PAR1	El producto de este gen pertenece a la familia de subunidad beta de regulación	RNA en testículos	Múltiples tejidos expresión más alta en músculo esquelético	Desconocido
PRKY	Yp11.2	Pseudogen	NA	NA	Desconocido
PRY/PRY2	Yq11.223 PRY en AZFb	Similitud de Bajo grado a la proteína de tirosin fosfatasa	Poco RNA en testículos	RNA en epidídimo	Células germinales, apoptosis
RBMY1A1	Yq11.223 AZFb	Codifica una proteína que contiene un motivo de unión RNA N-terminal, y cuatro cajas SRGY (serina arginina, glicina y tirosina) en el dominio C terminal	Expresado en espermatogonia, espermatoцитos en preleptoteno, espermatoцитos en paquiteno, espermátides redondas	Específica de testículo	Splicing de RNA y metabolismo, transducción de señal. Y regulación meiótica
RPS4Y1 y RPS4Y2	RPS4Y1 en Yp11.2 RPS4Y2 en Yq11.223 AZFb	Codifica para isoformas de la proteína ribosomal S4	Ambos en en células germinales y células de Leydig	RPS4Y1 en múltiples tejidos RPS4Y2 en testículos y próstata solamente	Regulación de RNAm y unión al ribosoma
SHOX	PAR1	Factor de transcripción asociado a la talla baja	NA	Múltiple,	Desconocido
SLC25A6 o ANT3, ANT3Y	PAR1	El producto génico funciona como un poco cerrado que trasloca ADP y ATP	Células germinales y células de Leydig	Múltiple	Desconocido
SMCY	Yq11.223 AZFb	Codifica para una proteína que contiene dominios de dedo de zinc	RNA en testículos	RNA en múltiples tejidos, más alto en intestino delgado	Remodelador de cromatina en meiosis
SRY	Yp11.2	Factor determinante de testículo	RNA en células germinales y esperma	Expresión predominantemente en testículos baja presencia de RNA en piel y tracto gastrointestinal	Inicia la determinación la sexual y el desarrollo de las células germinales masculinas
SYBL1	PAR2	Codifica una proteína transmembrana que es un miembro de la familia de receptores de la proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida soluble	Ambos en células germinales y células de Leydig	Múltiples tejidos	Desconocido
TBL1Y	Yp11.2	La proteína codificada por este gen tiene una similitud de secuencia con los miembros de la familia de proteínas que contienen repeticiones WD40	RNA en testículos y próstata	RNA alto en próstata y tiroides	Desconocido
TGIF2LY	Yp11.2	Codifica a un miembro de la familia de factores de transcripción TALE / TGIF homeobox	RNA expresado en testículo	Específica de testículo	Rol transcripcional en testículos

TB4Y	Yq11.221 AZFa	codifica una proteína secuestradora de actina	RNA en testículos y próstata	ARN más alto en el recto, testículos y próstata	Desconocido
TSPY1	Yp11.2	La proteína codificada por este gen se encuentra solo en el tejido testicular y puede estar involucrada en la espermatogénesis	Espermatocitos espermatogonia y preleptoteno	Testículo específica	Proliferación espermatogonial de una manera dependiente de la fosforilación; TSPY1 CNV que afecta la susceptibilidad a la falla espermatogénica al modular la eficiencia de la espermatogénesis
TTY1	Yp11.2	RNA no codificante	NA	NA	Desconocido
TTY2	Yp11.2	RNA no codificante	NA	NA	Desconocido
USP9Y	Yq11.221 AZFa	Codifica para una proteína similar a proteasa ubiquitin específica	RNA en testículos	Expresado en múltiples tejidos, más alto en próstata	Participa en el recambio de proteínas en la espermatogénesis
UTY	Yq11.221 AZFa	Codifica una proteína que contiene repeticiones de tetra-tricopéptidos involucradas en las interacciones proteína-proteína	Baja expresión en células germinales	Múltiples tejidos ARN más alto en los testículos y proteína más alto en el cerebro, el bazo y las amígdalas	Las mutaciones en este gen dan como resultado la infertilidad masculina, una reducción en el número de células germinales y pueden dar lugar al síndrome de células de Sertoli únicamente
XE7	PAR1	Parte del complejo de spliceosome involucrado en la regulación del empalme alternativo en algunos precursores de ARNm	Alto en células germinales y bajo en células de Leydig	Múltiples tejidos	Desconocido
XKRY	Yq11.222 AZFb	codifica una proteína que es una proteína de transporte de membrana putativa	En células germinales y células de Leydig	Múltiples tejidos	Interacción de gametos
ZBED1	PAR1	Codifica los factores de transcripción que se unen a los elementos del ADN que se encuentran en las regiones promotoras de varios genes relacionados con la proliferación celular	RNA en testículos	Múltiples tejidos	Desconocido
ZFY	Yp11.2	codifica una proteína que contiene dedos de zinc que puede funcionar como un factor de transcripción	En células germinales y células de Leydig	Múltiples tejidos	Parece estar involucrado en la maduración de esperma o testículo



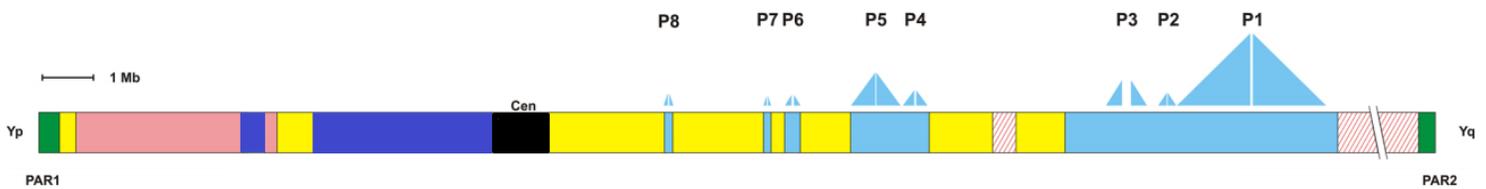
**Figura 6:** Estructura del cromosoma Y humano. En verde se muestran las regiones pseudoautosómicas, (PAR1 y PAR2) marcados en verde también se muestran los genes que son codificados por estas regiones. En color negro la region heterocromatica en el brazo largo del cromosoma Y, y en color naranja las regiones euromáticas de brazo corto y brazo largo. Aquí nuestra zona de interes es la euromatina del brazo largo dentro de la que se encuentra las 3 regiones que componen la región AZF AZFa, AZFb y AZFc, y en color rosa algunos genes candidatos involucrados directamente en la espermatogenesis. Figura modificada de: Colaco and Modi, Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility, Reproductive Biology and Endocrinology 2018 16:14 (25).

## 2.4 SECUENCIAS PALINDRÓMICAS

Las secuencias palindrómicas del cromosoma Y cubren aproximadamente una cuarta parte de la euromatina del cromosoma Y humano y contienen la mayoría de los genes específicos del testículo. La presencia de estas regiones palíndromicas se han atribuido a recientes eventos de duplicación y/o

recombinación intracromosómico, suelen encontrarse en “espejo” donde las secuencias palindrómicas se encuentran invertidas y separadas por una secuencia no duplicada. (27)

La región amplicónica contiene 8 grandes palíndromos, que en total miden 5.7Mb, en el brazo largo del cromosoma Y (28). Dichas secuencias se han designado como P1 a P8, basado en su localización respecto al telómero en Yq. Dichas secuencias poseen una similitud entre sí del 99.9% (**figura 7**)



**Figura 7:** Esquema representativo de la localización de las secuencias palindrómicas denotadas por triángulos azul claro. El espacio entre los triángulos representa las secuencias no duplicadas espaciadoras. En negro representado el centrómero y en verde las regiones pseudoautosómicas. Figura recuperada de: Rombetta, B. & Cruciani, F., Y chromosome palindromes and gene conversión, Human Genetics (2017) Volume 136, Issue 5, pp 605–619

## 2.5 CAUSAS DE LA INFERTILIDAD MASCULINA

La infertilidad es definida como la incapacidad de una pareja sexualmente activa y que no emplea métodos anticonceptivos de lograr un embarazo en el plazo de un año (29). Alrededor del 15% de las parejas no logran el embarazo en el plazo de un año y solicitan tratamiento médico de la infertilidad. En el 50% de los casos se han identificado causas atribuibles al factor masculino, junto a parámetros seminales anormales, dentro de las causas identificables se han encontrado las siguientes:

- Infecciosas
- Trastornos endocrinológicos

- Aumento de la temperatura escrotal (como en el varicocele)
- Factores inmunitarios
- Tumores testiculares
- Criptorquidia
- **Anomalías genéticas**

En alrededor del 40% de los casos, no se identifica ningún factor asociado a infertilidad masculina. Dichos individuos no suelen presentar antecedentes de problemas de infertilidad, ni otros antecedentes de importancia, sin embargo los datos del espermiograma muestran una disminución del número de espermatozoides (**oligozoospermia**), una reducción de la motilidad normal de los espermatozoides (**astenozoospermia**) y formas anormales de espermatozoides (**teratozoospermia**) y en casos severos la ausencia completa de espermatozoides en el eyaculado (**azoospermia**). Parámetros que se definen de acuerdo a los valores normales de la espermatobioscopia establecidos en el 2010 por la OMS: (30)

**Tabla 2:** Valores normales de la espermatobioscopia

<b>Parámetros</b>	<b>Valores de referencia</b>
Volumen de eyaculación (ml)	≥ 1,5
Concentración de espermatozoides (10 <sup>6</sup> /ml)	≥ 15
Total de espermatozoides por eyaculación	≥ 39
Movilidad total (% motilidad)	≥ 40
Movilidad progresiva (%)	≥ 32
Vitalidad (% de espermatozoides vivos)	≥ 58
Morfología (% de espermatozoides con formas normales)	≥ 15

Leucocitos 10 <sup>6</sup> /ml	< 1.0
PH	>7.2

Definiciones de las alteraciones en la espermatozoidoscopia.

- **Normozoospermia:** valores seminales dentro de los límites de la normalidad.
- **Oligozoospermia:** número total de espermatozoides inferior a los valores normales.
  - **Oligozoospermia leve:** el eyaculado contiene entre 5 y 10 millones de espermatozoides por mililitro de semen.
  - **Oligozoospermia moderada:** el eyaculado contiene entre 1 y 5 millones de espermatozoides por mililitro de semen.
  - **Oligozoospermia grave** cuando el eyaculado contiene menos de un millón de espermatozoides por mililitro de semen
  - **Criptozoospermia:** cuando el eyaculado contiene menos de 100mil espermatozoides por ml.
- **Astenozoospermia:** Porcentaje de espermatozoides móviles inferior a los valores normales.
- **Teratozoospermia:** Porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales inferior a los valores de referencia.
- **Azoospermia:** ausencia de espermatozoides en la eyaculación.
- **Oligoastenoteratozoospermia:** numero, movilidad y morfología inferiores a los valores de referencia.
- **Necrozoospermia:** Bajo porcentaje de espermatozoides vivos, de acuerdo a los valores de referencia.
- **Aspermia:** Ausencia de eyaculado.
- **Azoospermia obstructiva:** Ausencia de espermatozoides en el eyaculado, a pesar de haber una producción adecuada de los mismos debido a una obstrucción física, o mecánica, que puede tener como causa

la ausencia de conductos deferentes, secuelas quirúrgicas (hernias inguinales, vasectomía), infecciosas (ETS, tuberculosis), etc.

- **Azoospermia no obstructiva:** Ausencia de espermatozoides en el eyaculado, debido a una baja producción de los mismos.

Un estudio realizado por Nieschlag E., en 2010, presento los siguientes factores asociados a la infertilidad masculina: (31)

Infertilidad idiopática	30%
Endocrinológicos	10.1%
Criptorquidia	8.4%
Infección genitourinaria	9.3%
Trastornos de eyaculación	2.4%
Enfermedades generales y sistémicas	2.2%
Varicocele	14.8%
Factores inmunitarios	3.9%
Obstrucciones	2.2%
Tumores testiculares/quimioterapias	7.8%
Otras anomalías	5%

Como podemos observar dentro de estas causas no se incluyen las causas genéticas, sin embargo hay un importante 30% de pacientes de los cuales se desconoce la causa de su infertilidad, de acuerdo a este estudio en población alemana.

Las guías de la Asociación Americana de Medicina Reproductiva (ASRM por sus siglas en inglés), para el abordaje diagnóstico del varón infértil, y del manejo del varón con azoospermia, incluyen como componente esencial de la evaluación, el

estudio de las alteraciones genéticas, que incluyen las alteraciones cromosómicas, y las microdeleciones del cromosoma Y. (32)

## **2.6 CAUSAS GENÉTICAS DE INFERTILIDAD MASCULINA**

### **2.6.1 SINDROME DE KLINEFELTER**

Se trata de la causa más común de infertilidad genética reportada. Su frecuencia estimada en la población es de entre 1:500 a 1:1000 hombres. (33,34) Su prevalencia aumenta hasta el 3-4% entre los hombres infértiles y hasta un 10 a 12% en los pacientes azoospermicos. (35) Este síndrome se caracteriza por la presencia de un cromosoma X demás, el 85% de los casos de Síndrome de Klinefelter son debidos a un solo cromosoma X aberrante (47,XXY) Mientras que el 15% restante presenta múltiples cromosomas X, o mosaicismo. (37). El origen del cromosoma X supranumerario parece tener una distribución equitativa entre los pacientes con síndrome de Klinefelter (SK) (50% de origen materno y 50% de origen paterno).

El fenotipo de estos pacientes, se ha caracterizado por presentar talla alta, testículos pequeños, ginecomastia, distribución ginecoide del vello púbico y grasa corporal, vello escaso, y datos de deficiencia de andrógenos y testosterona, con aumento de gonadotropinas (hipogonadismo hipergonadotrópico) y disfunción sexual. Sin embargo este fenotipo clásico es altamente variable, y se ha visto que solo el 10% de los pacientes son diagnosticados en etapas prepuberales, y por lo general son diagnosticados cuando acuden a consulta por infertilidad masculina. (37). Estos pacientes presentan un patrón de azoospermia no obstructiva en la espermatobioscopia, junto a estas alteraciones los pacientes con SK presentan algún tipo de déficit cognitivo o trastorno del desarrollo intelectual.

La función testicular se ve afectada desde la vida fetal, donde hay una pérdida de células germinales que continua hasta la infancia y se acelera hacia la pubertad, que conduce a la fibrosis e hialinización de los conductos

seminíferos, y a la hiperplasia de las células de Leydig, lo que da como resultado testículos pequeños y firmes, por lo regular con <3ml de volumen testicular (37). Al nacer algunos niños con SK pueden presentar datos de hipogonadismo como micropene o criptorquidia. Los niveles de testosterona suelen encontrarse bajos, pero esto puede variar desde extremadamente bajo, e incluso algunos alcanzar rangos normales. Otras hormonas reproductivas pueden encontrarse alteradas, a menudo el estradiol. La relación estradiol/testosterona suele encontrarse elevada con frecuencia en estos pacientes. El fenotipo clínico y hormonal, orientan al diagnóstico de estos pacientes, siendo el estándar de oro el estudio de cariotipo.

Se han encontrado pacientes SK con producción espermática residual, tanto en pacientes que presentan mosaicismo como aquellos que no. Estos pacientes tienen mayor riesgo de producir gametos con aneuploidia de los cromosomas sexuales hasta en un 50%. Sin embargo en estudios recientes, han revelado que los espermatoцитos primarios aneuploides, no progresan y sufren arresto meiotico en etapas iniciales de la diferenciación, lo que elimina gran cantidad de espermatozoides con aneuploidias. (38)

### *2.6.2 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES*

Los hombres infértiles con translocaciones cromosómicas han mostrado conteos de espermatozoides muy variables, que van desde conteos normales hasta oligospermia o incluso azoospermia. (39) En hombres con recuento de espermatozoides  $<10 \times 10^6 / \text{ml}$ , las tasas de anomalías cromosómicas se estiman en 5 a 7%, aumentando a 10 a 15% en aquellos con azoospermia (40)

Durante la meiosis, los cromosomas homólogos se emparejan y recombinan. Estos pasos son cruciales para la correcta segregación cromosómica y la producción de gametos. En las translocaciones, se generan tetra o trivalentes que pueden conducir a una segregación desequilibrada y por lo tanto dar origen a espermatozoides desequilibrados (41)

Las translocaciones cromosómicas son reordenamientos cromosómicos estructurales más comunes observados en humanos. Entre ellas las translocaciones robertsonianas son las más comunes, y ocurren cuando los brazos largos de un par de cromosomas acrocéntricos (cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22) que pueden ser homólogos o no, se fusionan, mientras que los brazos cortos se pierden. Las translocaciones robertsonianas más comunes son: t(13;14) y t(14;21) (42). Las translocaciones recíprocas balanceadas le siguen en orden de frecuencia, y se produce cuando hay un intercambio de material genético entre dos cromosomas no homólogos, aunque estas pueden estar subdiagnosticadas ya que un 40% de los pacientes que tienen una translocación recíproca balanceada presentan conteos espermáticos normales. (43)

En estudios recientes se ha visto que hay una mayor prevalencia de translocaciones recíprocas balanceadas en pacientes masculinos con infertilidad, y que presentan conteos espermáticos menos severos que los pacientes que presentan una translocación robertsoniana. A pesar de que los pacientes con translocaciones robertsonianas presentan los conteos espermáticos más pobres, el porcentaje de embriones balanceados obtenidos después de la fertilización in vitro, fue más favorable en ellos que en aquellos portadores de translocaciones recíprocas balanceadas (42).

Las alteraciones cromosómicas reportadas en pacientes con oligospermia y azoospermia en orden de frecuencia son: (40)

- Translocaciones recíprocas 1%
- Translocaciones robertsonianas 0.7%
- Translocación gonosoma-autosoma 0.4%

Detectar estas alteraciones mediante el cariotipo convencional, es imprescindible ya que la segregación anómala de los cromosomas con translocación a menudo pueden dar como resultado Deleciones o duplicaciones de material genético, y dar origen a productos con defectos congénitos, y abortos espontáneos.

### 2.6.3 MICRODELECCIONES DEL CROMOSOMA Y

En un estudio prospectivo de 9 años llevado a cabo en Inglaterra (44), sobre 1737 pacientes con un recuento reducido de espermatozoides, se encontró la causa etiológica para un 40% de los pacientes, sin embargo un 75% de los pacientes con oligozoospermia permanecieron con causa idiopática. Las causas genéticas se encontraron como siguen:

Anomalías de los cromosomas sexuales (Klinefelter y sus mosaicos)	4.1% (71/1737)
Deleciones de Cromosoma Y (AZF)	2.3% (40/1735)
Aberraciones cromosómicas en autosomas (translocaciones)	0.7% (13/1737)
Mutaciones en CTFR	0.6% (11/1735)

Como podemos observar, las microdeleciones del cromosoma Y específicamente del factor de azoospermia, son la segunda causa más frecuente de infertilidad y falla espermatogénica. Se estima que entre el 10 y 15% de los hombres infértiles tienen una microdeleción de AZF como causa de la falla espermatogénica.

La detección de estas microdeleciones ha atraído la atención en los últimos años, no solo para diagnosticar la etiología de la azoospermia y oligozoospermia sino que también proporciona a los pacientes un tiempo oportuno para la terapia reproductiva asistida oportuna y adecuada. Desafortunadamente las microdeleciones son demasiado pequeñas para ser evaluadas mediante el cariotipo. Se ha visto una clara correlación entre el fenotipo clínico y la extensión de las microdeleciones.

Las eliminaciones de toda la región AZFa, condiciona a la azoospermia grave y al síndrome de sólo células de Sertoli. (45). De hecho esta región desempeña un papel clave durante la espermatogénesis durante las primeras etapas, así como la supervivencia de las células germinales (46). Como consecuencia estos pacientes no son candidatos para las técnicas de reproducción asistida,

En los casos de eliminación de AZFb, sólo se han encontrado espermatozoides cuando se tratan de deleciones parciales, ya que cuando se trata de eliminaciones completas no suelen encontrarse espermatozoides maduros, (47). Las eliminaciones en la región de AZFc, tienen un fenotipo altamente variable que va desde oligozoospermia hasta azoospermia. Se ha aceptado en general que la región de AZFc es esencial para completar el proceso espermatogénico y que la deficiencia de AZFc dará como resultado la hipospermatogénesis. (48). Estos pacientes suelen ser los mejores candidatos para las técnicas de reproducción asistida, así como a la criopreservación de semen en la edad adulta temprana.

En resumen, el tipo de microdeleciones de AZF puede proporcionar mucha información efectiva para el diagnóstico clínico y el tratamiento de la infertilidad masculina. Mientras examinamos estas microdeleciones de AZF, podemos elegir oportunamente los tratamientos médicos y quirúrgicos adecuados para el hombre infértil

## **CAPITULO III METODOLOGÍA**

### **3.1 MATERIALES Y PACIENTES DE ESTUDIO**

De 60 pacientes enviados a la consulta de Genética Médica del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, con diagnóstico de infertilidad, fueron seleccionados, 12 pacientes que cumplían las siguientes características, para determinar el universo de trabajo:

- Pacientes cuyos resultados de espermatozoides demostraron azoospermia u oligozoospermia severa
- Pacientes sin obstrucción de los conductos deferentes confirmado por USG testicular
- Pacientes con cariotipo normal
- Pacientes con estudio de PCR multiplex para Deleciones de cromosoma Y negativo
- Pacientes que aceptaron participar en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado

Se excluyeron del estudio aquellos pacientes con antecedentes de comorbilidades que pudieran repercutir en función espermatogénica tales como:

- Alteraciones cromosómicas identificadas por cariotipo
- Enfermedades infecciosas (parotiditis, enfermedades de transmisión sexual, etc)
- Azoospermia obstructiva
- Tumores testiculares, radiación, quimioterapia, etc.
- Antecedente de criptorquidia, con tratamiento tardío
- Varicocele

Finalmente fueron eliminados del estudio aquellos pacientes que:

- No otorgaron su consentimiento informado.
- Casos cuyas muestras biológicas sean insuficientes para su análisis

## **Descripción operacional de las variables**

### Variable independiente

#### 1. Microdeleciones parciales de AZF

- Definición conceptual: Tipo de mutación genética en la cual se pierde material genético, desde solo nucleótido hasta un fragmento cromosómico, que abarca la región crítica de AZF en el cromosoma Y.
- Definición operacional: Ausencia de ligación de sondas para la región crítica de AZF, constituida por la falta de dicho fragmento y representada con la ausencia de su aplicación en el electroferograma.
- Dimensiones: Cualitativa, dicotómica (presente o no)

### Variables dependientes:

#### 1. Oligozoospermia severa

- Definición conceptual: Causa de infertilidad masculina, donde el semen contiene una baja cantidad de espermatozoides.
- Definición operacional: un conteo espermático menor a 15 millones/mililitro de eyaculado, en el estudio de espermatobioscopia.
- Dimensiones: cuantitativa discreta

#### 2. Azoospermia

- Definición conceptual: Ausencia de espermatozoides en el semen.
- Definición operacional: Un conteo espermático de 0 en el eyaculado
- Dimensiones: Cuantitativa discreta

### 3.2 MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE MICRODELECCIONES DEL CROMOSOMA Y

Para iniciar con el estudio de las microdeleciones, fue necesario extraer DNA genómico a partir de la muestra sanguínea de nuestros pacientes, para lo cual se empleó un método que combina la técnica salina con la precipitación con cloroformo-isoamilico en dos fases:

#### Primera fase de la extracción de DNA

1. Tomar 500 $\mu$  de sangre total anticoagulada con EDTA, y se deposita en microtubo de 1.5ml.
2. Adicionar 500 $\mu$  de solución de lisis de eritrocitos (cloruro de amonio, EDTA, bicarbonato de sodio) y mezclar en el vortex.
3. Incubar a 4<sup>o</sup> C por 30 min
4. Centrifugar a 14,000rpm durante 2 min, y decantar sobrenadante.
5. Lavar con 1ml de solución de lisis y mezclar en el vórtex
6. Centrifugar a 14,000rpm durante 2 min, y decantar sobrenadante.
7. Lavar con 1ml de solución de lisis y mezclar en el vórtex
8. Centrifugar a 14,000rpm durante 2 min, y decantar sobrenadante.
9. Lavar con 1ml de solución de lisis y mezclar en el vórtex
10. Resuspender el botón en 570 $\mu$  de NaCl 5.0mM y se mezcló en el vórtex
11. Adicionar 40  $\mu$  de SDS al 10% v/v y se mezcló en el vortex por 5 min.
12. Adicionar 300 $\mu$  de NaCl saturado y se mezcló en el vortex.
13. Centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos
14. Recuperar la fase liquida
15. Adicionar 600 $\mu$  de cloroformo alcohol isoamilico en proporción 49:1, y mezclar en el vórtex por 2 minutos
16. Centrifugar a 14,000 rpm por 6 minutos.

17. Transferir la fase superior del tubo a un frasco esteril con 5ml de etanol absoluto frio (-20° C)
18. Almacenar toda la noche a -20° C.

Segunda fase de la extracción de DNA:

1. Tomar con una micropipeta cuidadosamente el DNA flotante del etanol y transferirlo a un microtubo de 0.5ml que contiene 400 µ de etanol al 70-75%.
2. Centrifugar a 14,000 rpm por 6 minutos y decantar el etanol.
3. Se deja secar el DNA dentro del tubo a temperatura ambiente.
4. Resuspender el botón con agua libre de DNAsas de acuerdo al tamaño del botón.
5. Cuantificar la concentración del DNA por espectofotometria UV usando un espectofotometro Nanodrop® (Thermo Scientific), tomando la razón 260/280 como calidad de la extracción del DNA. La integridad del DNA se verifico en un gel de agarosa al 1%.

### **3.2.1 Fundamentos de la prueba de MLPA**

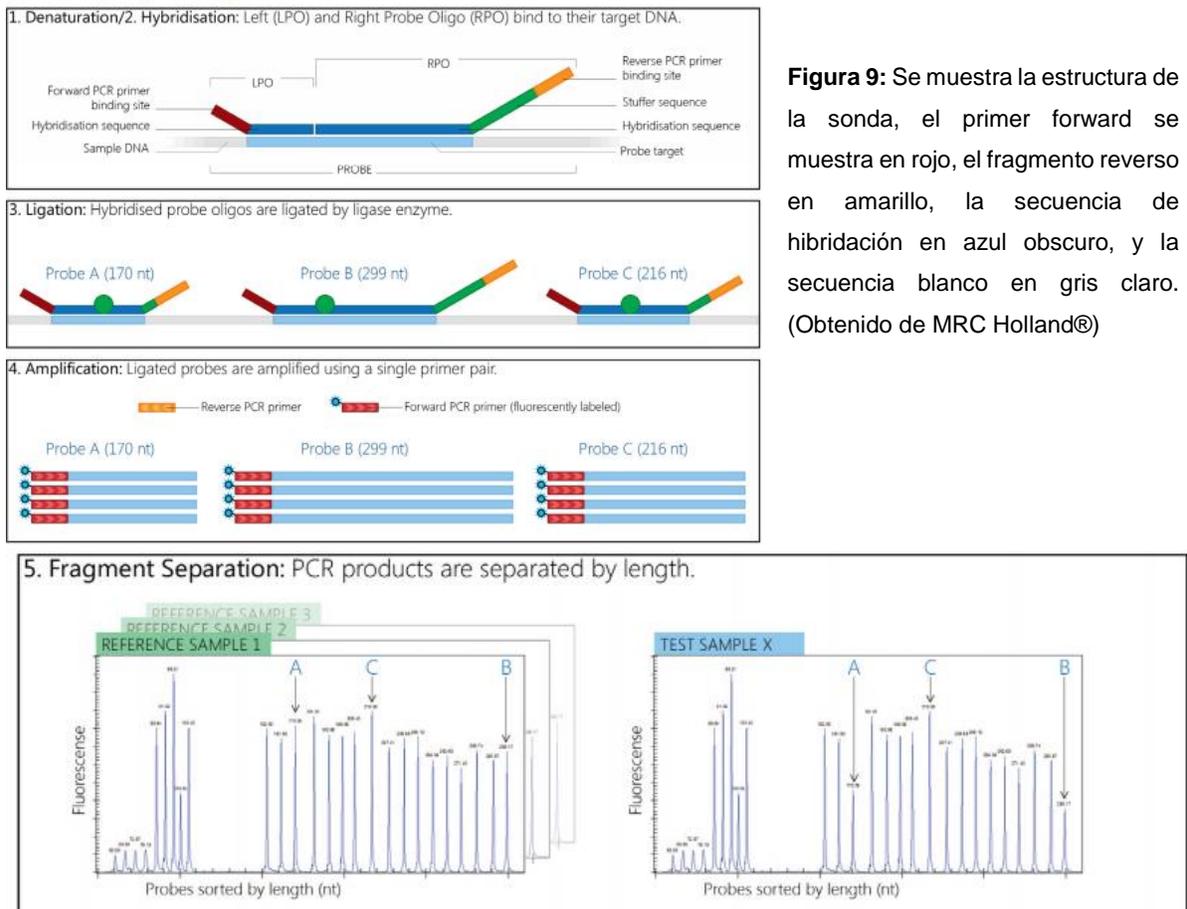
MLPA (Amplificación de la sonda dependiente de la ligación múltiplex) es un método de PCR múltiple que detecta números de copias anormales de hasta 60 secuencias de ADN genómico diferentes, que pueden distinguir secuencias que difieren en un solo nucleótido (48). No solo permite identificar DNA, si no también RNA, análisis de metilación, y cuantificación relativa del mRNA. Una ventaja adicional de esta técnica es que permite detectar variaciones en el número de copias, como deleciones, duplicaciones y permite analizar genes que son demasiado grandes para otras técnicas como la secuenciación. (49)

La técnica de MLPA se basa en una primera reacción de unión ligación de sondas con la zona homóloga de interés, solo las sondas que hayan hibridado podrán ser ligadas y posteriormente amplificadas por PCR. Mediante un análisis de

fragmentos y aprovechando la diferencia de tamaño de cada una de las sondas se podrán identificar aberraciones en el número de copias genómicas.

Cada sonda utilizada consiste en dos fragmentos de oligonucleótidos, los cuales hibridan uno junto al otro en una secuencia específica complementaria. **Solo si ambas sondas hibridan**, se podrá llevar a cabo la ligación y la amplificación del fragmento de tamaño específico mediante una PCR convencional. (49) (**figura 9**). Los oligonucleótidos son de un tamaño variable de 50 a 70nt, y la sonda unida a ellos tiene un tamaño bien definido el cual detectable mediante el análisis de fragmentos en un secuenciador. Cada uno de los fragmentos es separado mediante electroforesis capilar, como cada sonda tiene un tamaño determinado, los fragmentos son separados por su longitud, dando como resultado una gráfica como se muestra en la **figura 10**.

### How MLPA® works



**Figura 10:** Gráficos que muestran el resultado del análisis de fragmentos, posterior a la electroforesis capilar.

- ✓ Se identifican los fragmentos mediante una electroforesis capilar, que cuente con un software para analizar fragmentos
- ✓ Cada pico representa una sonda diferente
- ✓ El tamaño del pico representa el número de copas para ese fragmento (importancia de los controles)

Dentro De esta prueba existen fragmentos de control, que permiten identificar fallas en la misma como siguen.

Nombre	Longitud	Interpretacion
Benchmark fragment	92	Para comparar otros fragmentos de calidad
Q- Fragments	64, 70, 76 y 82	Se muestran altos cuando la muestra de DNA es escasa o la ligación falló. (>33% de los fragmentos 92nt Benchmark)
D- Fragments	88, 96	Bajos, en caso de que el DNA tuviera una pobre desnaturalizacaion (<50% de la longitud del fragmento 92nt Benchmark)
X y Y fragments	100, 105	Control para las muestras.

**Ventajas de la prueba:**

- ✓ Permite analizar multiples secuencias en una sola reacción (alrededor de 50)
- ✓ No requiere grandes cantidades de DNA
- ✓ Es una técnica económica y fácil de usar si se siguen las recomendaciones
- ✓ Rápida y da un alto rendimiento.
- ✓ El protocolo es idéntico para muchas aplicaciones diferentes.
- ✓ Permite detectar un rango amplio de alteraciones genómicas tanto mutaciones puntuales como deleciones y duplicaciones que afectan exones, intrones, o grandes regiones cromosómicas.

**Desventajas:**

- ✘ No detecta variaciones en el número de copias, en las secuencias para las que no se han diseñado sondas
- ✘ Si hay polimorfismos, la hibridación de la sonda se ve afectada
- ✘ No se pueden detectar translocaciones balanceadas
- ✘ Es sensible a la contaminación de la muestra.
- ✘ La mayoría de las mutaciones puntuales no son detectadas por esta técnica.
- ✘ Se deben confirmar las variantes en el número de copias mediante otra técnica (qPCR).
- ✘ La patogenicidad de las variantes en el número de copias, deben ser confirmadas en las bases de datos.

### 3.2.2 Técnica de MLPA

#### Materiales:

- Agua ultrapura
- TE (Tris-HCL. pH 8.0 +0.1mM EDTA)
- Tubos para PCR 0.2ml
- Termociclador
- Equipo para electroforesis capilar
- Programa para análisis de resultados Coffalyser, así como las librerías.
- Muestra de DNA
- Kit de MLPA (MRC-Holland®)
  - SALSA MLPA buffer (amarillo)
  - Probemix (negro) → Oligonucleótidos sintéticos y purificados de bacterias, Tris-HCL, EDTA
  - SALSA Ligase-65 (verde) → Ligasa de origen bacteriano
  - Ligasa Buffer A y B (blanco y transparente)(coenzimas, detergente no iónico, Cloruro de magnesio, etc)
  - SALSA PCR Mix → DNTPs, KCL, EDTA, y oligonucleótidos sintéticos fluorescentes. (café)
  - SALSA Polimerasa → Enzima polimerasa de origen animal, EDTA, KCL, glicerol, etc. (naranja)

Para llevar a cabo esta técnica se requiere:

- ✓ Muestras de DNA purificadas a una concentración de 50-250ng/μl (ideal de 50 a 100)
- ✓ Controles negativos (Individuos sanos) Colocar 1 muestra de referencia por cada 7 muestras a analizar.
- ✓ Controles positivos → es recomendable incluir uno cuando este disponible.
- ✓ Un control blanco sin muestra de DNA. (agua o TE)
- ✓ Todos los Buffers deben ser mezclados (vórtex) antes de ser utilizados, **excepto** las enzimas (ligasa y polimerasa)
- ✓ Programa para el termociclador durante la reacción:
  1. Desnaturalización del DNA
    - 98° C → 5 minutos
    - 25° C → pausa
  2. Reacción de hibridación
    - 95° C → 1 minuto
    - 60° C → Pausa
  3. Reacción de ligación
    - 54° C → Pausa
    - 54° C → 15 min.
    - 98° C → 5 min
    - 20° C → Pausa
  4. Reacción de PCR
    - 35 ciclos:
      - 95° C 30 seg.
      - 60° C 30 seg
      - 72° C 60 seg
    - 72° C 20 min
    - 15° C Pausa

#### 1. Desnaturalización:

- a. Etiquetar cada tubo

- b. Agregar 5µ de muestra (DNA a una concentración de 50-100ng/µl)
- c. Colocar las muestras en el termociclador a 98° C por 5 min y enfriar a 25° C.

## 2. Hibridación:

- a. Preparar la mezcla para la reacción de hibridación: para cada reacción colocar:
  - i. 1.5µl de MLPA buffer (amarillo)
  - ii. 1.5µl de Probemix (negro)
  - iii. Agregar 3 µl de la mezcla a cada muestra
  - iv. Continuar el programa en el termociclador.
    - 1. Incubar 1min a 95° C
    - 2. Luego incubar a 60° C por 16 a 20 hrs.

## 3. Ligación:

- a. Preparar la reacción de ligación para cada muestra
  - i. 25 µl de agua ultrapura
  - ii. 3 µl de ligasa A (transparente)
  - iii. 3 µl de ligasa B (blanco)
  - iv. 1 µl de ligasa -65 (verde)
- b. Continuar el programa en el termociclador a 54° C cuando se encuentre a dicha temperatura sin sacar las muestras del termociclador agregar 32 µl de la mezcla de ligación y mezclar pipeteando gentilmente.
- c. Continuar el programa del termociclador:
  - i. 54° C por 15min
  - ii. 98° C por 5 min
  - iii. 20° C Pausa→ remover las muestras del termociclador.

## 4. Reacción de PCR

- a. Preparar la Mezcla para la PCR para cada reacción agregar:
  - i. 7.5 µl de agua ultrapura
  - ii. 2 µl de SALSA PCR mix (café)
  - iii. 0.5 µl de SALSA Polimerasa (naranja)

- iv. Mezclar pipeteando.
  - b. A temperatura ambiente, agregar 10 µl de la mezcla a cada reacción y mezclar pipeteando
  - c. Colocar los tubos en el termociclador y continuar el programa:
    - i. 35 ciclos:
      - 95° C 30 seg.
      - 60° C 30 seg
      - 72° C 60 seg
    - ii. 72° C 20 min
    - iii. 15° C Pausa.
5. **Electroforesis capilar:** Dependiendo del tipo de equipo que se disponga para hacer la electroforesis capilar el fabricante nos hace recomendaciones en cuanto a la cantidad de muestra, formamida, o elementos que se requieren para ella

### 7.3. ELECTROPHORESIS SPECIFICATIONS

Instrument	Primer Dye	Capillaries	Injection mixture
Beckman/SCIEX CEQ-2000 CEQ-8000/GeXP single rail CEQ-8800/GeXP dual rail GeXP	Cy5	33 cm	1 µl PCR reaction <sup>a</sup> 0.5 µl CEQ - size standard 600 <sup>b</sup> 28.5 µl HiDi formamide / Beckman SLS Add one drop of high quality mineral oil.
ABI-Prism 3100 (Avant) ABI-3130 (xL) ABI-3500 <sup>c</sup> (xL) ABI-3730 (xL)	FAM	36, 50 cm	0.7 µl PCR reaction <sup>a</sup> 0.3 µl ROX or 0.2 µl LIZ GS 500 size standard 9 µl HiDi formamide Seal the injection plate. Heat 3 min at 86°C, cool for 2 min at 4°C <sup>d</sup> .
ABI-SeqStudio	FAM	28 cm	0.8 µl PCR reaction <sup>a</sup> 0.3 µl ROX/LIZ GS500 size standard 12 µl HiDi formamide Seal the injection plate. Heat 3 min at 86°C, cool for 2 min at 4°C <sup>d</sup> .

<sup>a</sup> Never use more than 10% of the PCR product in the injection mixture.

<sup>b</sup> Reduce volume of size standard if needed.

Obtenido de MRC-Holland®

En nuestro caso utilizamos un secuenciador CEQ-8000

### 3.2.3 Sondas y regiones utilizadas en el kit de MLPA

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Probe start (hg38)	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe (kb)
279	SRY probe 01023-L28750	2787442	GCACTGAAAGCT-GTAACTCTAAGT	9418.8
<b>AZFa locus:</b>				
315	<b>RPS24P1 probe</b> 20393-L28553	12206264	TTACAGAAGGTA-TGTCCTTGCACT	28.2
	sY82 STS marker	12207374		
227	<b>RPS24P1 probe</b> 15239-L18627	12234480	TCCCTAGTGCTA-CTGCCTCACTTA	127.6
	sY1064 STS marker	12321375		
250	<b>ARSEP probe</b> 11818-L28545	12362126	ACCTTCCCAGCA-AGCCGCCTTGAA	154.4
	sY86 STS marker	12495696		
370	<b>USP9Y probe</b> 15244-L28758	12516542	ATCATGTGGCAT-TACCTCATTTGC	138.8
	sY85 STS marker	12525880		
336	<b>USP9Y probe</b> 11826-L28756	12655385	GAAAGGCAAGGA-CTTTACCTTAAA	130.9
	sY84 STS marker	12678104		
256	<b>USP9Y probe</b> 11821-L12616	12786240	TGGAGAAGGCAA-ACTTAGTCCACC	128.8
	sY1324 STS marker	12790267		
	sY1316 STS marker	12791368		
	sY1714 STS marker	12859074		
234	<b>DDX3Y probe</b> 11816-L12611	12915001	AAGCAAAGAACA-TGTCAGTGACTA	2.1
308	<b>DDX3Y probe</b> 13061-L28753	12917057	AGCCTTCACTCT-TGTTATTGCTTA	331.1
	sY1065 STS marker	13110496		
	sY1182 STS marker	13112000		
348	<b>UTY probe</b> 11828-L19232	13248173	TGCATTATTGCA-GTACTTTCTTCA	54.7
328 +	<b>UTY probe</b> 20392-L28932	13302888	ATTGGTCCAGGA-GATTGTGAATGG	301.5
	sY88 STS marker	13492083		
215 +	<b>UTY probe</b> 11812-L13342	13604368	AGGATCCTGGAT-ATTCCACTACCA	159.0
342	<b>BPY1 probe</b> 15243-L28903	13763364	TCCCTTCTACA-CTTAGATCTCTG	161.4
184	<b>VCY1B probe</b> 15238-L17485	13924779	GCATATTGAGTA-GATCATTCTAG	153.7

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Probe start (hg38)	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe (kb)
403	<b>VCY1B probe</b> 11852-L18631	14078518	CACGTTGCTCA-GTTCTCACTGAT	159
355	<b>VCY1B probe</b> 20394-L18629	14237473	GGAGTAGACCAA-GAGAGGAATATA	209.5
463	<b>NLGN4Y probe</b> 11853-L12650	14447009	TTCTGCGTGCA-TCACAGTCTTCC	3007.7
	sY105 STS marker	17245407		
<b>AZFb locus:</b>				
160	<b>CDY2B probe</b> 15236-L17486	17454741	TTCCAGCCAGGA-CACATCTGAAA	5.1
291 H	<b>CDY2B probe</b> 11759-L28751	17459821	CTTCTGGCTGAA-CTGCGGCACCAA	492.7
220	<b>CDY2A probe</b> 20673-L18625	17952534	GGCTGTTAATGA-ATTCGTTAATGC	0.1
239 W	<b>CDY2A probe</b> 15245-L28543	17952663	ATTTTCTGTTAA-CCTTAGTGTA	1.8
	sY1024 STS marker	17954445		
291 H	<b>CDY2B probe</b> 11759-L28751	18446112	CTTCTGGCTGAA-CTGCGGCACCAA	970.7
	sY1224 STS marker	18449738		
398 H	<b>HSFY1 probe</b> 15247-L18630	18543186	ATTTGATGATGA-AGATTTAGCAGA	84.4
	sY1967 STS marker	18590923		
436 H	<b>HSFY1 probe</b> 12740-L18632	18627607	AAAGAACACATA-CCAATATAGCTG	21.1
	sY1309 STS marker	18640156		
410	<b>HSFY1 probe</b> 11772-L12555	18648702	CTGGACTATGGA-TGCAACTCCGA	80.3
436 H	<b>HSFY1 probe</b> 12740-L18632	18692719	AAAGAACACATA-CCAATATAGCTG	84.4
	sY1967 STS marker	18729004		
398 H	<b>HSFY1 probe</b> 15247-L18630	18777144	ATTTGATGATGA-AGATTTAGCAGA	555.3
	sY121 STS marker	18890191		
	sY3199 STS marker	18978781		
245	<b>KDM5D probe</b> 11754-L28544	19332437	CCAACAAAGTCT-TACAATTATACT	587.9
445	<b>KDM5D probe</b> 11776-L12559	19920317	CTGATTGGAGCA-CTCAGCCTAAAC	78.0
208	<b>KDM5D probe</b> 11747-L12530	19998258	GACCAGGTTTCAAT-GCCAATATATT	20.0
273	<b>KDM5D probe</b> 21365-L31361	20017832	GATCTGAAGTTA-CTGATGAATCTG	390.7
	sY127 STS marker	20408530		
499	<b>EIF1AY probe</b> 15249-L28507	20483261	ACTTTCTAAATG-TTCTTGAATGTA	465.4
136	<b>EIF1AY probe</b> 11734-L12517	20507396	CCTGATTCTCCA-ATGGCTTCATAG	1771.9
	sY1233 STS marker	20575614		
	sY134 STS marker	21394174		
	sY142 STS marker	21831727		
	sY143 STS marker	21831756		
	sY3010 STS marker	21860648		
427	<b>RBM11 probe</b> 11774-L28902	22279283	TGGCAAATCCAT-AATATTACAACA	6.4
263	<b>RBM11 probe</b> 11757-L28748	22285703	TACAACCAGAGA-TAATGTAATAG	441.2
	sY2990 STS marker	22357096		
	sY1197 STS marker	22377470		
<b>AZFc locus:</b>				
	sY1192 STS marker	22726630		
418	<b>BPY2 probe</b> 11773-L12556	22726854	TTTACATGGTAA-ATTGATGTGCTT	0.5
166	<b>BPY2 probe</b> 11739-L13811	22727392	TAGGAGAAAATA-ACAAAATAATGA	1.7
178	<b>BPY2 probe</b> 11740-L14251	22729077	CACAGAAATATA-TACTGTTTGA	42.6
	sY1191 STS marker	22729472		
486 W	<b>BPY2 probe</b> 15248-L17487	22771726	TCTTTGATTCA-TGCCAAGAAACG	49.2
376 W	<b>BPY2 probe</b> 11768-L28759	22820917	TCATATGTCTGA-AGTCAGAACTTG	45.6
	sY153 STS marker copy 1	22866497		
	sY254 STS marker copy 1	23170045		
	sY254 STS marker copy 2	23180885		
	sY1307 STS marker copy 1	23207970		
	sY1189 STS marker	23358832		
	sY1291 STS marker	23358922		
284 H	<b>DAZ2 probe</b> 12738-L14632	23375997	GTTCACTGGCA-AGCTAGCTGTGC	98.0
301 H	<b>DAZ2 probe</b> 11761-L28752	23473986	AGTATATTCCA-TTCTAATAATG	242.0
	sY1050 STS marker copy 1	23702572		
267 H	<b>DAZ2 probe</b> 11758-L28912	23716012	CAGTGCTTCTGA-ATGATTTTCAGT	196.1
	sY2858 STS marker copy 1	23718095		

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Probe start (hg38)	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe (kb)
	sY1742 STS marker copy 1	23719123		
362 H	<b>CDY1B probe</b> 15246-L28757	23912085	CCTTACTGCTTA-AGGCCGTATTTTC	193.1
239 ω	<b>CDY2A probe</b> 15245-L28543	24105184	ATTTTCTGTAA-CCTTAGTGAAA	300.3
	sY1206 STS marker	24380298		
486 ω	<b>BPY2 probe</b> 15248-L17487	24405469	TCTTTGTATTCA-TGCCAAGAAACG	49.2
376 ω	<b>BPY2 probe</b> 11768-L28759	24454665	TCATATGCTGA-AGTCAGAACTTG	760.7
	sY153 STS marker copy 2	24500246		
	sY1307 STS marker copy 2	24822355		
	sY254 STS marker copy 3	24840815		
	sY254 STS marker copy 4	24851663		
376 ω	<b>BPY2 probe</b> 11768-L28759	25215367	TCATATGCTGA-AGTCAGAACTTG	49.2
486 ω	<b>BPY2 probe</b> 15248-L17487	25264573	TCTTTGTATTCA-TGCCAAGAAACG	300.3
	sY1206 STS marker copy 1	25289446		
	sY255 STS marker copy 1	25374204		
239 ω	<b>CDY2A probe</b> 15245-L28543	25564875	ATTTTCTGTAA-CCTTAGTGAAA	193.1
362 H	<b>CDY1B probe</b> 15246-L28757	25757938	CCTTACTGCTTA-AGGCCGTATTTTC	196.0
267 H	<b>DAZ2 probe</b> 11758-L28912	25953979	CAGTGCTTCTGA-ATGATTTTCAGT	242.6
	sY1050 STS marker copy 2	25967161		
301 H	<b>DAZ2 probe</b> 11761-L28752	26196541	AGTATATCCCA-TTCCTAATAATG	98.0
284 H	<b>DAZ2 probe</b> 12738-L14632	26294558	GTTTCAGCTGGCA-AGCTAGCTGTGC	41.1
	sY1201 STS marker	26311168		
142	<b>PPP1R12BP probe</b> 12733-L14796	26335630	AGCATTTGGAGA-TGCTCCAGAAGA	88.4
391	<b>RBMY2DP probe</b> 15241-L12617	26423998	CACTGAATGGAA-AAGTACAGCTGG	
	sY255 STS marker copy 2	26988591		
	sY255 STS marker copy 3	26999439		

H These probes detect 2 sequences (for a detailed explanation, please see Table 4a).

ω These probes detect 3 sequences (for a detailed explanation, please see Table 4b).

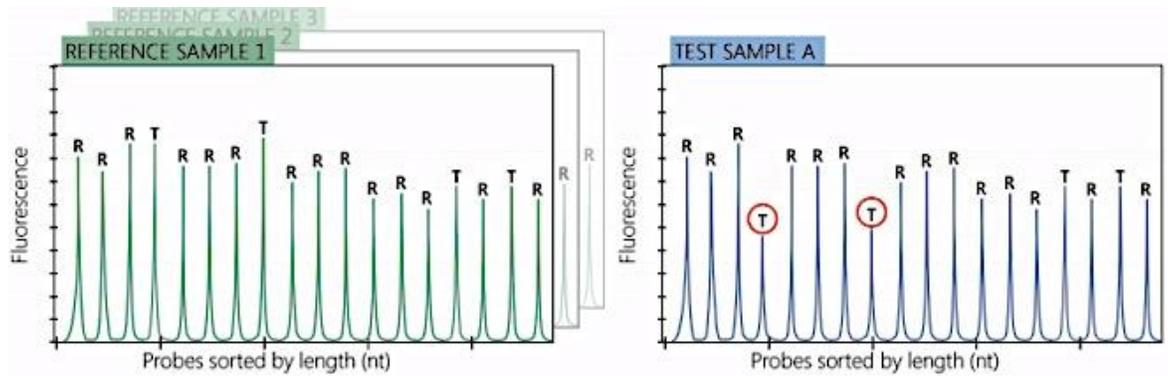
+ The 105 nt Y probe detects a sequence located 52 kb after the 328 nt probe and 250 kb before the 215 nt probe

### 3.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS:

El análisis de datos se realiza en dos pasos:

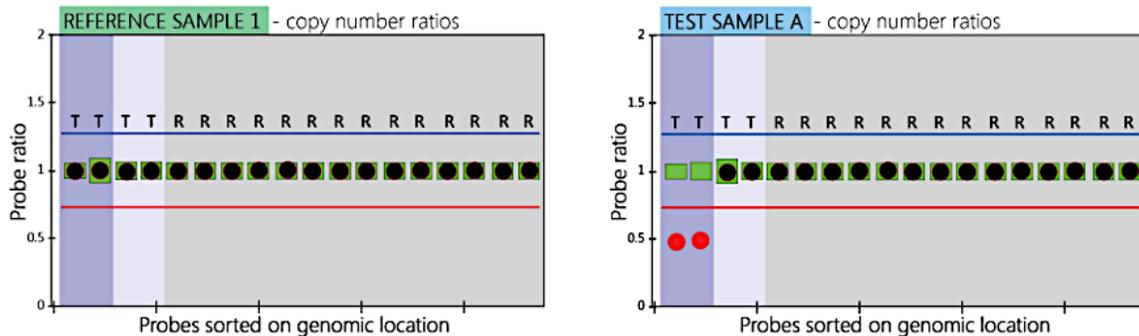
a. Análisis de fragmentos

La técnica de MLPA puede detectar diferencias relativas al comparar patrones de pico de las muestras de DNA. La altura relativa de cada pico de sonda individual, en comparación con la altura de pico de las sondas de referencia. Una detección de una o más secuencias son visibles con una disminución en la altura del pico, mientras que un aumento en la altura del pico refleja un aumento en el número de copias.



b. Análisis comparativo

Los resultados de los electroferogramas obtenidos del secuenciador CEQ8000, se analizaron posteriormente mediante el uso del software de Coffalyser de MRC Holland que calcula las proporciones de las sondas, una proporción de 1.0 significa un número de copias normal, la proporción de 0.5 una delección heterocigota y la proporción de 1.5 una duplicación heterocigota



[https://:www.mlpa.com/WebFormMain](https://www.mlpa.com/WebFormMain)

Las variantes encontradas se buscaron en las bases de datos de ClinVar y DGV (Database Genomic Variants) (50,51) para su clasificación como variantes patógenas, benignas o de significado incierto. (Bases de datos del Genoma Humano)

Se utilizaró la base de datos de Excel para ordenar la información epidemiológica y clínica de los pacientes así como los resultados del análisis genético. El procesamiento de los datos (variantes genéticas y características

clínicas) se realizará con el programa SPSS V.16, y para la correlación específica entre el genotipo y el fenotipo utilizó la prueba de ANOVA de una vía, por tratarse de variables descriptivas.

La correlación fenotipo genotipo se presenta en un cuadro simple, donde se anotan los genes deletados, los fenotipos encontrados en los pacientes y los fenotipos reportados previamente en la literatura.

## **CAPITULO IV: RESULTADOS**

Se seleccionaron 12 pacientes masculinos con diagnóstico de infertilidad, de un total de 60 muestras previamente utilizadas en el proyecto de investigación: “Análisis genético como parte del estudio integral de la pareja infértil” con número de registro: 143.2013 en la Coordinación de Investigación del CMN “20 de Noviembre”. Muestras que fueron utilizadas para la determinación STS de *AZF* por PCR múltiplex.

Los 12 casos seleccionados cumplieron con los criterios de selección para el presente estudio:

- Pacientes cuyos resultados de espermatozoides demostraron azoospermia u oligozoospermia severa
- Pacientes sin obstrucción de los conductos deferentes confirmado por USG testicular
- Pacientes con cariotipo normal
- Pacientes con estudio de PCR multiplex para deleciones de cromosoma Y negativo
- Pacientes que aceptaron participar en el estudio y firmaron la carta de consentimiento informado

Previo consentimiento informado se obtuvieron datos clínicos y de laboratorio de los expedientes electrónicos de los pacientes. La firma del consentimiento también otorgó la autorización del uso de muestras biológicas resguardadas en el Laboratorio de Medicina para el proyecto no. 143.2013, para el análisis de *AZF* por MLPA.

Los datos obtenidos fueron:

- Edad del paciente
- Resultados de espermatozoides
- Estudio de cariotipo
- Resultado para Deleciones del cromosoma Y por medio de PCR multiplex.
- Resultado de biopsia

Los datos de los sujetos se resumen en la siguiente tabla:

		ESPERMATOBIOSCOPIAS									
MUESTRA	EDAD (AÑOS)	TOTAL	OVALES	AMORFOS	INMADUROS	VIVOS	MUERTOS	INMOVILES	CARIOTIPO	DEL AZF PCR MULTIPLEX	BIOPSIA
1	31	9.5M	50%	50%	25%	70%	30%	70%	46,XY	NEG	DETENCION DE LA MADURACION Y ATROFIA MODERADA
		7.4M	0%	100%	--	--	--	100%			
2	39	0	0	0	0	0	0	0	46,XY	NEG	DETENCION DE LA MADURACION
3	31	0.4M	50%	50%	0%	60%	40%	50%	46,XY	NEG	NO REALIZO
4	38	14.5M	28%	66%	10%	70%	30%	70%	46,XY	NEG	NO REALIZO
		5M	40%	60%	5%	90%	10%	100%			
5	38	0	0	0	0	0	0	0	46,XY	NEG	DETENCION DE LA MADURACION DEL EPITELIO GERMINAL A NIVEL DE ESPERMATIDES REDONDAS.
6	31	0	0	0	0	0	0	0	46,XY	NEG	ESCASA HIALINOSIS, DETENCION EN LA MADURACION A DIFERENTES NIVELES
7	38	8.1M	30%	70%	-	30%	70%	70%	46,XY	NEG	DETENCION DE LA MADURACION ESPERMATICA.
		66MIL	42%	47%	15%	58%	42%	58%			
8	33	4.8M	36%	51%	15%	60%	40%	50%	46,XY	NEG	NO REALIZO
9	33	0	0	0	0	0	0	0	46,XY	NEG	RETENCION PARCIAL DE LA ESPERMIOGENESIS
10	37	37M	2%	98%	8%	-	-	25%	46,XY	NEG	NO REALIZO
		458	75%	25%	-	80%	20%	15%			
11	36	0	0	0	0	0	0	0	46,XY	NEG	AUN EN ESTUDIO
12	36	0	0	0	0	0	0	0	46,XY	NEG	AUN EN ESTUDIO

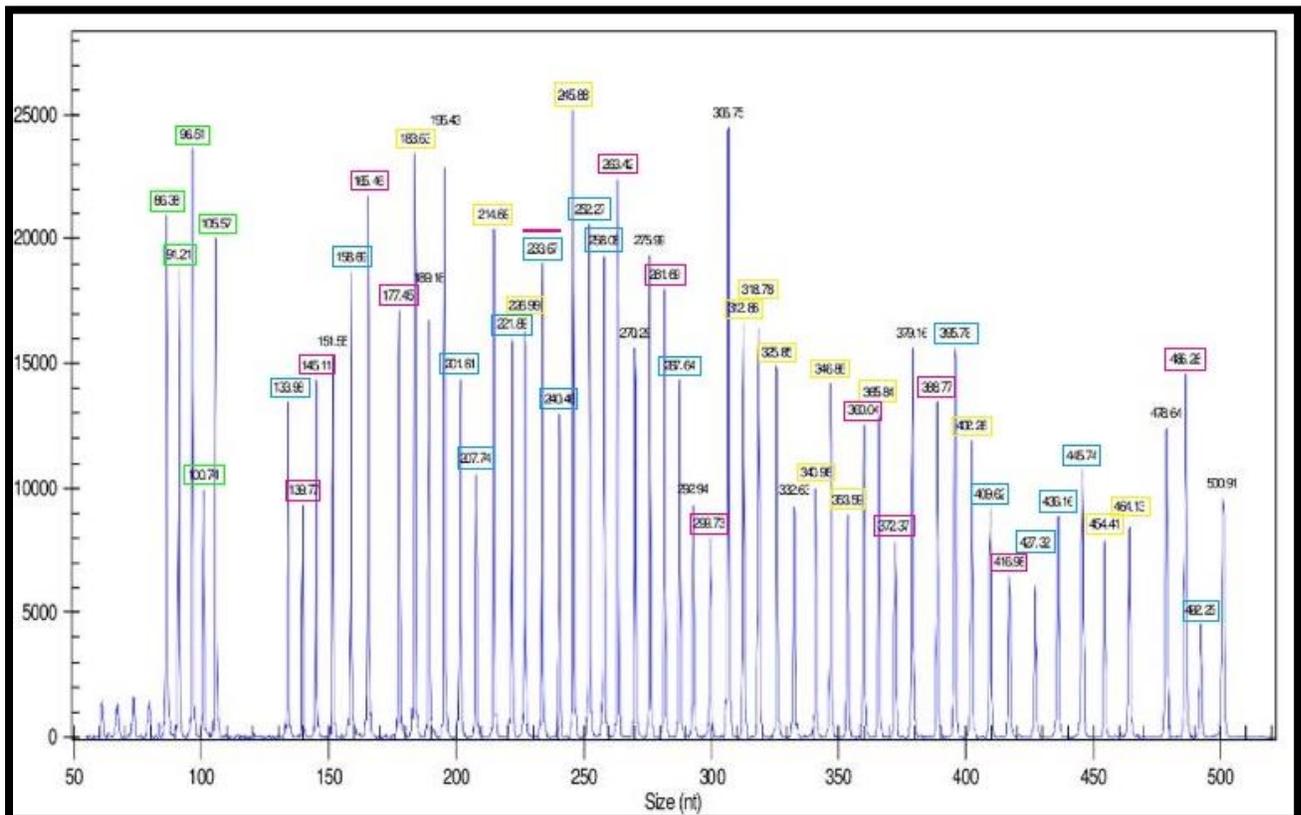
Tres pacientes (muestras 1, 4 y 7) mostraron oligozoospermia leve (25%). Dos pacientes (muestras 3 y 8) presentaron oligozoospermia moderada (16.6%). El 50% de los pacientes (6/12) presentaron azoospermia. Un paciente que en un principio no presento alteraciones en el conteo espermático, fue incluido en el estudio porque en un segundo estudio de espermatobioscopia presento criptozoospermia (paciente 10). No fue posible realizar biopsia testicular a todos los pacientes

Para el estudio de microdeleciones de *AZF* en los pacientes seleccionados, se utilizó el kit SALSA MLPA P360 del Cromosoma Y, que contiene 16 sondas que detectan secuencias de los genes *RPS24P1*, *ARSEP*, *USP9Y*, *DDX3Y*, *UTY*, *BPY1*, *VCY1B* y *NLGN4Y* de la región AZFa.

Para el estudio de la región AZFb, el kit de MLPA tiene 15 sondas que detectan secuencias de *RBMY1J*, *CDY2A*, *CDY2B*, *KDM5D*, *E1F1AY* y *HSFY1*. Y para el análisis de AZFc, el kit cuenta con 12 sondas para secuencias de los genes *DAZ2*, *BPY2*, *CDY2A* y *CDY1B*.

El kit P360 contiene 55 sondas que amplifican productos de 130 a 507 nucleotidos, 41 sondas de *AZF* y 12 sondas de referencia (diferentes localizaciones en cromosomas autosómicos).

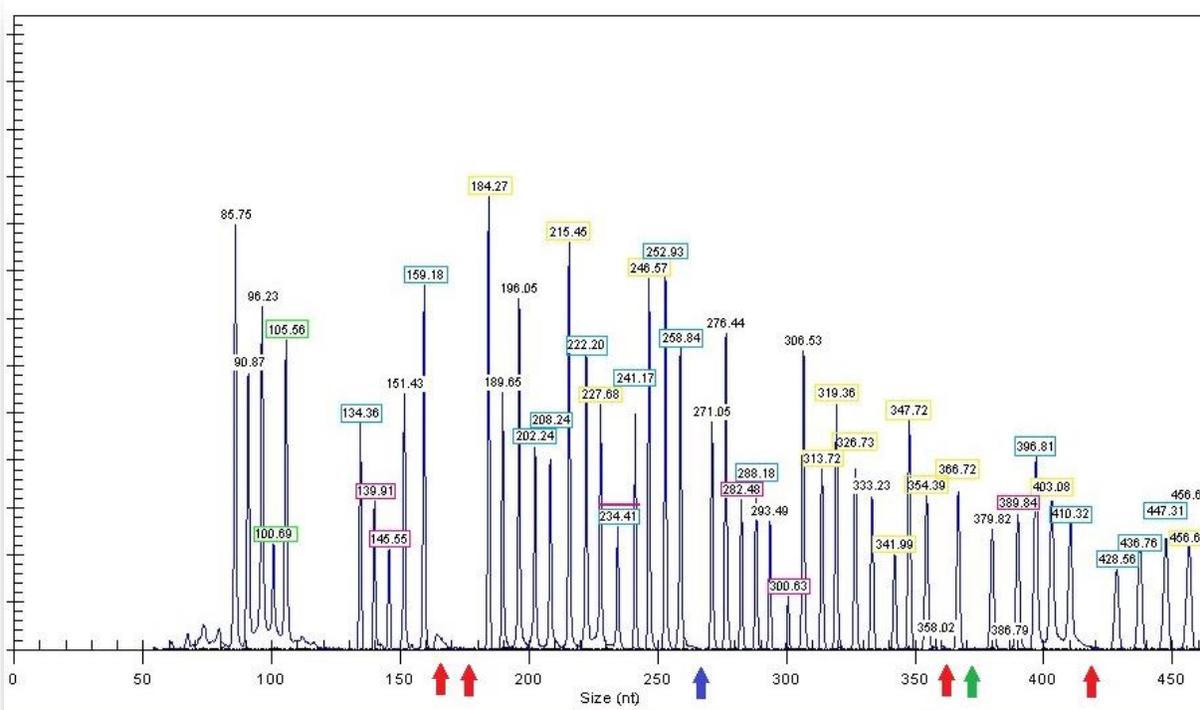
El Kit de MLPA utilizado en para el estudio, cuenta con el patrón electroforético de un control masculino sano que se muestra en la figura 11:



**Figura 11:** Patrón electroforético de un masculino sano. En verde se encuentran circulados los fragmentos de control. En amarillo se encuentran circulados los fragmentos de la región AZFa, en azul los

fragmentos de la región AZFb y en rosa los fragmentos que corresponden a la región de AZFc. (Control obtenido de MRC Holland®)

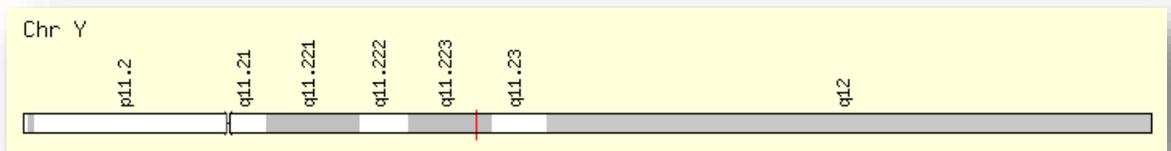
El análisis de fragmentos de los pacientes seleccionados, mostro en el paciente 7 la falta de 7 sondas en el patrón electroforético, 4 de los cuales corresponden a los fragmentos de 166nt, 178nt, 373nt, y 418nt, que corresponden a diferentes exones del gen **BPY2**. Una sonda más de 265nt, también se encontró ausente y corresponde a una de las 6 sondas del gen **DAZ2**, y finalmente se encontró la ausencia de la sonda de 361 que corresponde a una de las dos sondas para el gen **CDY1B**. (Figura 12)



**Figura 12:** Patrón electroforético del paciente 7. Se muestra la ausencia de 6 sondas, 4 de las cuales corresponden a diferentes fragmentos del gen **BPY2**, (flechas rojas) una sonda que corresponde a un fragmento del gen **DAZ2** (flecha azul) y la sonda que corresponde a un fragmento de **CDY1B** (flecha verde).

La técnica de MLPA permite identificar deleciones parciales dentro de las regiones de **AZF**, en el caso que se presenta, fue posible identificar deleciones de sondas que corresponden a los genes **BPY2**, **DAZ2** y **CDY1B** en **AZFc**, lo que puede explicar la oligozoospermia, la astenozoospermia y la detención de la maduración espermática en el paciente.

**BPY2** se encuentra en la porción no recombinante del cromosoma Y, y se expresa específicamente en testículo. La proteína codificada por dicho gen, interactúa con la proteína ligasa de ubiquitina E3A y **puede estar involucrada en el desarrollo de células germinales masculinas y la infertilidad masculina**. Tres copias **casi** idénticas de este gen existen en el cromosoma Y; dos copias son parte de una región palindrómica. Este registro representa la copia fuera de la región palindrómica en (Yq11.223). (52)



**Figura 13:** Localización del gen *BPY2* en el cromosoma Y. (imagen obtenida de genecards.org)

Los genes **BPY2B** y **BPY2C** son las copias del gen en la región palíndroma, se encuentran distales al centrómero, (q11.23) posiblemente su amplificación inespecífica mediante el estudio de PCR previo realizado al paciente, dio un falso negativo para la delección del gen. Sin embargo no podemos asegurar que se trate de una delección, ya que una mutación cercana a un punto de ligación de la sonda, (incluso cuando están a más de 10nt del sitio de ligación) puede dar como resultado una falsas delección, por lo que el paciente puede ser portador de una mutación, o varias, que afecten la función de la proteína BPY2. Por otro lado también es posible que como existe esta región repetida palindromica, hubiese sido ésta la causal de una recombinación homóloga no alélica, y por lo tanto de la delección.

El paciente 7 se realizó 2 espermatobioscopias, (tabla 1) se encontró un conteo espermático en oligozoospermia moderada (8.1 millones) que posteriormente avanza a oligozoospermia severa (66mil), (las espermatobioscopias se realizaron con un año de diferencia) además alrededor del 40% de los espermatozoides estaban muertos y otro buen porcentaje (más del 50%) se

encontraban inmóviles. La biopsia testicular realizada posteriormente al paciente reveló una detención en la maduración espermática.

En un estudio realizado por J.Y.M. Tse et al.,(53) se demostró por medio de inmunohistoquímica sobre tejido testicular, que la proteína BPY2 es expresada en los núcleos de espermatogonias, espermátocitos tempranos y tardíos, y espermátidas redondas con grados variables de expresión, pero no se detectó en espermátidas alargadas. Sin embargo en pacientes con hipoespermatogénesis y espermatogénesis alterada, cuando se detuvo la espermatogénesis en la etapa de los espermátocitos, la inmunorreactividad de BPY2 solo se detectó débilmente a nivel espermatogénico. No se encontraron inmunorreactividades en estados posteriores de la maduración. En todos los casos de hipospermatogénesis, se detectó inmunorreactividad débil de BPY2 a nivel de espermatogonia en los túbulos seminíferos, y la espermatogénesis progresó a la etapa espermática. Ellos también estudiaron casos de deleciones en AZFc, y en todos estos casos la presencia de la expresión de la proteína BPY2 era prácticamente nula. (54)

También se detectó la ausencia del fragmento 265, que corresponde a uno de los exones del gen DAZ2, el kit contiene 6 fragmentos de diferentes tamaños y exones para este gen, pero solo 1 no amplificó, por lo que podemos sospechar que existe una mutación puntual cercana al sitio de ligación, y como consecuencia dar una falsa deleción.(incluso un polimorfismo puede ocasionar que la sonda no ligue adecuadamente)

El gen **DAZ2** pertenece a la familia de los genes DAZ, está ubicado en Yq11.22 (Ensembl) su expresión está restringida a las células germinales premeióticas, particularmente en la espermatogonia. Codifica para una proteína de unión a ARN que es importante regulador para la espermatogénesis. Existen cuatro copias de este gen (enumerados del 1 al 4), dentro del cromosoma Y dentro de las duplicaciones palindrómicas; un par de genes es parte del palíndromo P2 y el segundo par es parte del palíndromo P1, cada gen contiene una repetición de 2.4kb que incluye un exón de 72 pb llamado *repetido DAZ*. El número de repetidos DAZ es variable y hay variaciones en las secuencias de los repetidos DAZ. Cada copia

del gen también contiene una región de 10.8kb que pueden amplificarse; esta región incluye cinco exones que codifican un dominio *motivo de unión a RNA*. El splicing alternativo da como resultado múltiples variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas. (55)

Por último, en el mismo paciente se encontró la ausencia de una de las sondas para el gen **CDY1B**. Este gen codifica para una proteína con actividad de acetiltransferasa de histona, que también contiene un cromodominio. Las proteínas de cromodominio son componentes de complejos similares a la heterocromatina y pueden actuar como represores genéticos. Esta proteína se localiza en el núcleo de las espermátides tardías, donde tiene lugar la hiperacetilación de histonas, dicho proceso facilita el recambio de histonas por protaminas las cuales son las principales proteínas de empaquetamiento del DNA en los espermátocitos. El cromosoma Y humano contiene dos copias idénticas de este gen dentro de una región palindrómica. Esta referencia representa la copia más centromérica. El cromosoma Y también contiene un par de genes estrechamente relacionados en otro palíndromo más telomérico, así como varios pseudogenes relacionados. (56) La ausencia de la amplificación de esta sonda en nuestro paciente, igual puede deberse tanto a una mutación puntual como a una posible delección parcial, todos los resultados aquí mostrados requieren de otro método de estudio para determinar la naturaleza de las alteraciones encontradas, como lo es la secuenciación específica de los genes.

## CONCLUSIONES

A lo largo de los años, con la mejora de las tecnologías para el estudio del genoma humano, nuestra comprensión acerca de la patología genética se ha ido ampliando y mejorando.

En el diagnóstico de infertilidad masculina, las microdeleciones del cromosoma Y es una de las primeras causas a investigar en pacientes con azoospermia y oligozoospermia severa, como parte de un protocolo de estudio completo que incluya: Espermatobioscopia, estudio de cariotipo, perfil hormonal, TORCH, ultrasonido testicular y una buena historia clínica para excluir otras causas de infertilidad. Los criterios de selección para incluir pacientes en el estudio de microdeleciones de cromosoma Y deben ser basados en los hallazgos anteriores así como en el conteo espermático, básicamente todos aquellos pacientes con una causa idiopática de infertilidad (con azoospermia u oligozoospermia severa) son candidatos a realizarse este estudio, así como aquellos pacientes que presentan una disminución progresiva en el conteo espermático (mostrado por dos o más espermatobioscopias consecutivas), o con una disminución en la calidad de dichos espermatozoides, (como los que presentan necrozoospermia o teratozoospermia)

La identificación y caracterización de las secuencias del cromosoma Y no ha sido una tarea sencilla, debido al alto contenido de secuencias repetidas y palíndricas que abundan en Yq11, y a que este cromosoma no tiene un homólogo. Las regiones palindrómicas son una de las causas de eventos de recombinación intracromosómica que dan lugar a estas deleciones. Curiosamente en el paciente 7 todos los genes sospechosos de deleción, (*BPY2*, *DAZ2* y *CDY2*) tienen copias idénticas dentro de regiones palindrómicas. El siguiente paso en nuestro estudio sería realizar la secuenciación selectiva de dichos genes, para corroborar su ausencia, o comprobar si existen mutaciones puntuales que hayan impedido la hibridación de la sonda y por consiguiente su amplificación.

El empleo de la técnica de *MLPA* considero, debería ser utilizado como primera línea para el estudio de estos pacientes, ya que abarca un abanico más

amplio de posibilidades, en comparación con una técnica convencional por PCR multiplex, ya que se trata de una técnica rápida y de bajo costo, además de que nos permite identificar deleciones parciales de cada región de *AZF* incluso en pacientes que presentan una oligozoospermia moderada.

De cualquier forma, la entrega de resultados a los pacientes debe estar acompañada por un adecuado asesoramiento genético, como sea reportado en la literatura y en el presente estudio, las microdeleciones distales o muy puntuales causan infertilidad pero con espermatogénesis residual, lo que hace a estos pacientes candidatos para técnicas de reproducción asistida, y los pacientes deben conocer el riesgo que existe de transmitir a su descendencia masculina las alteraciones encontradas.

## REFERENCIAS

1. Tiepolo, L., and Orsetta Zuffardi. "Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm." *Human genetics* 34.2 (1976): 119-124.
2. Vergnaud, G., Page, D. C., Simmler, M. C., Brown, L., Rouyer, F., Noel, B., ... & Weissenbach, J. (1986). A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *American journal of human genetics*, 38(2), 109.
3. Vogt, P., Chandley, A. C., Hargreave, T. B., Keil, R., Ma, K., & Sharkey, A. (1992). Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Human genetics*, 89(5), 491-496.
4. Vollrath, D., Foote, S., Hilton, A., Brown, L., Beer-Romero, P., Bogan, J., & Page, D. (1992). The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science*, 258(5079), 52–59. doi:10.1126/science.1439769
5. P. H. Vog, A. Edelmann, S. Kirsch, O. Henegariu, P. Hirschmann, F. Kiesewetter, F. M. Köhn, W. B. Schill, S. Farah, C. Ramos, M. Hartmann, W. Hartschuh, D. Meschede, H. M. Behre, A. Castel, E. Nieschlag, W. Weidner, H-J. Gröne, A. Jung, W. Engel, G. Haidl, Human Y Chromosome Azoospermia Factors (AZF) Mapped to Different Subregions in Yq11, *Human Molecular Genetics*, Volume 5, Issue 7, 1 July 1996, Pages 933–943,
6. Carlo Foresta, Enrico Moro, Alberto Ferlin, Y Chromosome Microdeletions and Alterations of Spermatogenesis, *Endocrine Reviews*, Volume 22, Issue 2, 1 April 2001, Pages 226–239,
7. Ferlin, A., Tessari, A., Ganz, F., Marchina, E., Barlati, S., Garolla, A., Foresta, C. (2005). Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *Journal of medical genetics*, 42(3), 209–213. doi:10.1136/jmg.2004.025833
8. Lin, Y. W., Chia-Ling Hsu, L., Kuo, P. L., Huang, W. J., Chiang, H. S., Yeh, S. D., ... & Yen, P. H. (2007). Partial duplication at AZFc on the Y chromosome

- is a risk factor for impaired spermatogenesis in Han Chinese in Taiwan. *Human mutation*, 28(5), 486-494.
9. Ferlin, A., Arredi, B., Speltra, E., Cazzadore, C., Selice, R., Garolla, A., ... & Foresta, C. (2007). Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(3), 762-770.
  10. Krausz, C., Hoefsloot, L., Simoni, M., Tüttelmann, F., European Academy of Andrology, & European Molecular Genetics Quality Network (2014). EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*, 2(1), 5–19.
  11. INEGI, 2010
  12. Norris D., Lopez K.H. (2011) Hormones and reproduction of vertebrates Vol. 3. *Reptiles* pp1-38 <https://doi.org/10.1016/C2009-0-01698-5>
  13. Furman, B., y Evans, BJ Divergent Evolutionary Trajectories of Two Young, Homomorphic, and Closely Related Sex Chromosome Systems. *Genome Biology and Evolution*, Vol 10 (3), 742-755. doi: 10.1093 / gbe / evy045
  14. Abbott, J. K., Nordén, A. K., & Hansson, B. (2017). Sex chromosome evolution: historical insights and future perspectives. *Proceedings. Biological sciences*, 284(1854), 20162806. doi:10.1098/rspb.2016.2806
  15. Li, X., & Heyer, W. D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell research*, 18(1), 99–113. doi:10.1038/cr.2008.1
  16. Tyler-Smith C. Chromosome Y: General and Special Features, *Encyclopedia of Life Sciences* 2005, doi: 10.1038/npg.els.0005796
  17. Lucchesi JC. 1978 Gene dosage compensation and the evolution of sex chromosomes. *Science* 202, 711–716. doi:10.1126/science.715437) Crossref, PubMed, Google Scholar
  18. Graves JAM. 2016 Evolution of vertebrate sex chromosomes and dosage compensation. *Nat. Rev. Genet.* 17, 33–46. (doi:10.1038/nrg.2015.2) Crossref, PubMed, Google Scholar

19. Kitano J, Peichel CL. 2012 Turnover of sex chromosomes and speciation in fishes. *Environ. Biol. Fish* 94, 549–558. (doi:10.1007/s10641-011-9853-8) Crossref, Google Scholar
20. Charlesworth B, The evolution of the sex chromosomes, *Science* 251(4997) pp 1030—1033 DOI: 10.1126/science.1998119
21. Ensemble, Human Genome, Human Karyotype, Y chromosome characteristics [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Genome/Ychromosome](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Genome/Ychromosome)
22. Méndez, FL, Krahn, T., Schrack, B., Krahn, AM, Veeramah, KR, Woerner, AE, ... Hammer, MF (2013). Un linaje paterno afroamericano agrega una raíz extremadamente antigua al árbol filogenético del cromosoma Y humano. *Revista estadounidense de genética humana* , 92 (3), 454–459. doi: 10.1016 / j.ajhg.2013.02.002
23. Cris Tyler Smith, University Of Oxford Chromosome Y: General and Special Features, encyclopedia of life sciences & 2005, John Wiley & Sons doi:10.1038/npg.els.0005796
24. Cameron, F. J., Hageman, R. M., Cooke-Yarborough, C., Kwok, C., Goodwin, L. L., Sillence, D. O., Sinclair, A. H. A novel germ line mutation in SOX9 causes familial campomelic dysplasia and sex reversal. *Hum. Molec. Genet.* 5: 1625-1630, 1996.
25. Colaco, S., & Modi, D. (2018). Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 16(1), 14. doi:10.1186/s12958-018-0330-5
26. Cotter, P. D., & Norton, M. E. (2005). Y chromosome heterochromatin variation detected at prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, 25(11), 1062–1063. doi:10.1002/pd.1280
27. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*. 2003;423:825–837

28. Rombetta, B. & Cruciani, F., Y chromosome palindromes and gene conversión, *Human Genetics* (2017) Volume 136, Issue 5, pp 605–619. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1777-8>
29. World Health Organization (2016) Sexual and reproductive health, Infertility definitions and terminology URL <https://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/>
30. World Health Organization. WHO laboratory manual for examination and processing of human semen. 5ta Ed. Geneva: World Health Organization 2010
31. Nieschlag E, Behre HM. *Andrology* (Eds), Male reproductive health and dysfunction, 3rd Ed. Springer Verlag, Berlin, Chapter 5, pp.90. 2010
32. ASRM, American Society for Reproductive Medicine. All Rights Reserved.(2019) <https://www.asrm.org/news-and-publications/fertility-and-sterility/>
33. Bonomi, M., Rochira, V., Pasquali, D., Balercia, G., Jannini, E. A., Ferlin, A., & Klinefelter ItaliaN Group (KING) (2017). Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism. *Journal of endocrinological investigation*, 40(2), 123–134. doi:10.1007/s40618-016-0541-6
34. Bojesen A, Juul S, Gravholt CH. Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome: a national registry study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(2):622–626. doi: 10.1210/jc.2002-021491.
35. Forti G, Corona G, Vignozzi L, Krausz C, Maggi M. Klinefelter’s syndrome: a clinical and therapeutical update. *Sex Dev Gene Mol Biol Evol Endocrinol Embryol Pathol Sex Determ Differ.* 2010;4(4–5):249–258
36. Shiraishi, K., & Matsuyama, H. (2018). Klinefelter syndrome: From pediatrics to geriatrics. *Reproductive medicine and biology*, 18(2), 140–150. doi:10.1002/rmb2.12261
37. Høst, C., Skakkebak, A., Groth, K. A., & Bojesen, A. (2014). The role of hypogonadism in Klinefelter syndrome. *Asian journal of andrology*, 16(2), 185–191. doi:10.4103/1008-682X.122201

38. Templest HG, Meiotic recombination errors, the origin of sperm aneuploidy and clinical recommendations. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, Vol 57 (2011) doi:10.3109/19396368.2010.504879
39. Dong, Y., Du, R.-C., Jiang, Y.-T., Wu, J., Li, L.-L., & Liu, R.-Z. (2012). Impact of Chromosomal Translocations on Male Infertility, Semen Quality, Testicular Volume and Reproductive Hormone Levels. *Journal of International Medical Research*, 40(6), 2274–2283. <https://doi.org/10.1177/030006051204000625>
40. Retief, A. E., Van Zyl, J. A., Menkveld, R., Fox, M. F., Kotze, G. M., & Brusnický, J. (1984). Chromosome studies in 496 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Human genetics*, 66(2-3), 162-164.
41. Baldi, E., & Muratori, M. (Eds.). (2014). *Genetic damage in human spermatozoa*. Springer.
42. Therman, E., Susman, B., y Denniston, C. (1989). La participación no aleatoria de los cromosomas acrocéntricos humanos en las translocaciones de Robertson. *Anales de la genética humana* , 53 (1), 49-65.
43. Mayeur, A., Ahdad, N., Hesters, L., Brisset, S., Romana, S., Tosca, L., ... & Frydman, N. (2019). Chromosomal translocations and semen quality: A study on 144 male translocation carriers. *Reproductive biomedicine online*, 38(1), 46-55.
44. Punab, M., Poolamets, O., Paju, P., Vihljajev, V., Pomm, K., Ladva, R., ... Laan, M. (2017). Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Human reproduction* (Oxford, England), 32(1), 18–31. doi:10.1093/humrep/dew284
45. Zhu, X. B., Gong, Y. H., He, J., Guo, A. L., Zhi, E. L., Yao, J. E., ... & Li, Z. (2017). Multicentre study of Y chromosome microdeletions in 1,808 Chinese infertile males using multiplex and real-time polymerase chain reaction. *Andrologia*, 49(5), e12662.
46. Gueler, B., Sonne, S. B., Zimmer, J., Hilscher, B., Hilscher, W., Graem, N., ... & Vogt, P. H. (2012). AZFa protein DDX3Y is differentially expressed in human male germ cells during development and in testicular tumours: new

- evidence for phenotypic plasticity of germ cells. *Human reproduction*, 27(6), 1547-1555.
47. Krausz, C., Quintana-Murci, L., & McElreavey, K. (2000). Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis?. *Human Reproduction*, 15(7), 1431-1434.
  48. Oates, R. D., Silber, S., Brown, L. G., & Page, D. C. (2002). Clinical characterization of 42 oligospermic or azospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. *Human reproduction*, 17(11), 2813-2824.
  49. Schouten JP y col. (2002) Cuantificación relativa de 40 secuencias de ácido nucleico mediante amplificación de sonda dependiente de la ligadura múltiplex *Nucleic Acids Res* 30, e57.
  50. MRC Holland (2019) General Protocol Information, file:///C:/Users/USER/Downloads/General-MLPA-Information-GB-M-G-010D-.pdf
  51. NCBI (2019) Information about genomic variants and its relationship to human health <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
  52. DVG (2019) Data Base Genomic Variants, "A curated catalogue of human genomic structural variation" <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>
  53. National Center for Biotechnology Information (2019) NCBI *BPY2* Gene <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9083>
  54. Wong, Elaine & Y M Tse, Jenny & Yao, Kwok-Ming & Lui, Vincent & Tam, Po-Chor & Yeung, William. (2004). Identification and characterization of human VCY2-interacting protein: VCY2IP-1, a microtubule-associated protein-like protein.. *Biology of reproduction*. 70. 775-84.
  55. National Center for Biotechnology Information (2019) NCBI *DAZ2* Deleted in Azoospermia 2 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/57055>
  56. National Center for Biotechnology Information (2019) NCBI *CDY2B* chromodomain Y-linked 1B, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/253175>

# ANEXOS



**ISSSTE**

INSTITUTO DE SEGURIDAD  
Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS  
TRABAJADORES DEL ESTADO

Centro Médico Nacional "20 de Noviembre"  
Subdirección Médica  
Subdirección de Enseñanza e Investigación  
Comité de Ética en Investigación  
Cmbioética-03-017-09-11052016

"2017, AÑO DEL CENTENARIO DE LA PROMULGACIÓN DE LA  
CONSTITUCIÓN POLÍTICA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS"

## AVISO DE PRIVACIDAD

**TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:** ESTUDIO DE MICRODELECCIONES PARCIALES DE AZF, POR MEDIO DE MLPA EN PACIENTES CON AZOOSPERMIA U OLIGOZOOSPERMIA SEVERA

**Número de registro:** 03-029

El presente Aviso de Privacidad tiene como objeto informarles sobre el tratamiento que se le dará a sus datos personales cuando los mismos son recabados, utilizados y almacenados.

**Investigador responsable de recabar sus datos personales, de su uso y protección:**

Nombre: **Dra. Rosa Angelica Rosales de Avila**

Domicilio: **Calle Félix Cuevas #540 Col Del Valle Sur CP 03100 Delegación Benito Juárez CDMX**

Teléfono: **52005003 ext. 14645** Correo electrónico: **angelicarosales.a@hotmail.com**

Su información personal será utilizada con la finalidad de **ponernos en contacto con usted e informarle acerca de los resultados obtenidos en el protocolo de investigación y agendar nuevas citas médicas**, para lo cual requerimos obtener los siguientes datos personales: **Nombre completo, edad, número telefónico, (particular, trabajo o teléfono celular) número de expediente, y dirección particular** estos datos son considerados como sensibles de acuerdo a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares.

Es importante que usted sepa que todo el equipo de investigación que colabora en este estudio se compromete a que todos los datos proporcionados por usted serán tratados bajo medidas de seguridad y garantizando siempre su confidencialidad. En el caso de este proyecto las medidas que se tomaran para ello serán **no se usaran nombres, solo iniciales** y se almacenaran en **un archivo electrónico a cargo del investigador principal**

Los datos que usted nos proporcione no serán compartidos con otras instancias o instituciones y únicamente serán usados por el equipo de investigadores para este proyecto.

Usted tiene derecho de acceder, rectificar y cancelar sus datos personales, así como de oponerse al manejo de los mismos o anular el consentimiento que nos haya otorgado para tal fin, presentando una carta escrita dirigida a el/ la investigador responsable **Dra Rosa Angelica Rosales de Avila**, o con la Presidente del Comité de Ética en Investigación del CMN "20 de Noviembre", Mtra. Erika Graciela Meza Dávalos. Tel. 52003544.

**DECLARACION DE CONFORMIDAD:** Manifiesto estar de acuerdo con el tratamiento que se dará a mis datos personales

**Nombre y firma del sujeto de investigación o paciente:** \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

1/1

Presidente del Comité de Ética en Investigación: Dra. Erika Graciela Meza Dávalos.  
Av. Félix Cuevas 540 Col. Del Valle, C.P. 03100 Delegación Benito Juárez, Ciudad de México  
Tel.: (55) 52005003 Ext. 14634 [www.gob.mx/issste](http://www.gob.mx/issste)



**ISSSTE**  
INSTITUTO DE SEGURIDAD  
Y SALUD SOCIALES DE LOS  
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS



**2019**  
AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR,  
EMILIANO ZAPATA

**CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"**  
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN  
COMBIOÉTICA 03-017-09-11052016

2019 "AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR, EMILIANO ZAPATA"

**CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD.**

**NOMBRE DEL ESTUDIO:**

ESTUDIO DE MICRODELECCIONES PARCIALES DE *AZF*, POR MEDIO DE MLPA EN PACIENTES CON AZOOSPERMIA U OLIGOZOOSPERMIA SEVERA

Lugar y fecha.  
Ciudad de México  
Delegación Benito Juárez,  
2019-2020

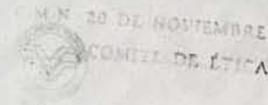
Por favor tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento, pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga, para decidir si participa o no deberá tener el conocimiento suficiente acerca de los beneficios y riesgos del presente estudio de investigación.

Estimado Señor: \_\_\_\_\_, se le invita a participar en el estudio arriba mencionado, que se desarrollará en el CMN "20 de Noviembre", cuyo objetivo será el de buscar pérdidas de material genético en el cromosoma Y en una región conocida como "factor de azoospermia" (*AZF* por sus siglas en inglés), lo cual nos permitirá establecer un diagnóstico, pronóstico reproductivo, delimitar que pacientes son candidatos a técnicas de reproducción asistida, y otorgar un asesoramiento genético.

Su participación en el estudio consiste en autorizar el uso de la muestra de DNA utilizada para el proyecto Análisis genético como parte del estudio integral de la pareja infértil, con número de registro 143.2013, para la identificación de pérdidas de material genético del cromosoma Y

**BENEFICIOS:** El presente estudio tendrá un beneficio directo a usted, ya que nos permitirá saber si es portador de una pérdida parcial de material genético como causa de azoospermia (falta de producción espermática) o causa de oligozoospermia severa (baja producción espermática por debajo de 1 millones por ml), así como establecer un pronóstico reproductivo en caso de encontrar pérdidas de material genético en el cromosoma Y, otorgarle un asesoramiento genético adecuado, para que con base en el mismo, usted pueda tomar una decisión informada.

Además gracias a su participación altruista podremos contribuir en investigaciones en infertilidad masculina.



1/3

Presidente del Comité de Ética en Investigación: Dra. Erika Graciela Meza Dávalos  
Av. Félix Cuevas 540 Col. Del Valle, C.P. 03100 Alcaldía Benito Juárez, Ciudad de México  
Tel.: (55) 52005003 [www.gob.mx/issste](http://www.gob.mx/issste)



**ISSSTE**  
INSTITUTO DE SEGURIDAD  
Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS  
TRABAJADORES DEL ESTADO



**2019**  
AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR  
EMILIANO ZAPATA

**CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"**  
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN  
COMBIOÉTICA 03-017-09-11052016

2019 "AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR, EMILIANO ZAPATA"

**RIESGOS:** Su participación no conlleva riesgo alguno para su salud.

**PARTICIPACIÓN**

Su participación es **VOLUNTARIA**, usted puede decidir libremente participar o no, esto no afectará su derecho para recibir atención médica en el CMN "20 de Noviembre", si participa, puede retirarse del estudio en el momento en que lo desee sin que esto influya sobre el tratamiento habitual que le ofrece el hospital.

**INFORMACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS ALTERNATIVOS O TRATAMIENTOS EXISTENTES:** No hay un tratamiento específico para las pérdidas de material en el cromosoma Y, sin embargo, algunas perdidas de material son compatibles con espermatogénesis residual, es decir, este estudio nos permitirá saber si existe la posibilidad de encontrar espermatozoides a nivel testicular, y saber si usted es candidato a alguna técnica de reproducción asistida.

**MANEJO DE LA INFORMACION.**

En la recolección de datos personales se siguen todos los principios que marca la ley (art. 6): Licitud, calidad, consentimiento, información, finalidad, lealtad, proporcionalidad y responsabilidad. Se han implementado las medidas de seguridad, técnicas, administrativas y físicas necesarias para proteger sus datos personales y evitar daño, pérdida, alteración, acceso o tratamiento no autorizado. Su nombre no será usado en ninguno de los estudios, las muestras biológicas obtenidas, no contendrán ninguna información personal y se codificarán con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación. Los códigos que identifican su muestra o información estarán solo disponibles a los investigadores titulares quienes están obligados por ley a no divulgar su identidad

Usted podrá tener acceso a la información sobre este estudio en caso de solicitarlo. Los resultados de la investigación podrán presentarse en foros académicos y médicos, así como en alguna publicación médica, de manera global y no individual, de modo que su información se mantendrá en el anonimato.

**PARTICIPANTE.**

Confirmando haber recibido información suficiente y clara sobre el estudio propuesto, doy mi autorización para ser incluido en este proyecto de investigación, reservándome el derecho de abandonarlo en cualquier momento si así lo decido.

Nombre y firma del Participante

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Domicilio.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

2/3

Presidente del Comité de Ética en Investigación: Dra. Erika Graciela Meza Dávalos  
Av. Félix Cuevas 540 Col. Del Valle, C.P. 03100 Alcaldía Benito Juárez, Ciudad de México  
Tel.: (55) 52005003 [www.gob.mx/issste](http://www.gob.mx/issste)



**ISSSTE**  
INSTITUTO DE SEGURIDAD  
Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS  
TRABAJADORES DEL ESTADO



**2019**  
AÑO DEL CAUILLLO DEL SUR  
EMILIANO ZAPATA

**CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"**  
**COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN**  
**COMBIOÉTICA 03-017-09-11052016**

2019 "AÑO DEL CAUILLLO DEL SUR, EMILIANO ZAPATA"

**TESTIGOS:**

\_\_\_\_\_  
(1) Nombre y firma  
Parentesco: \_\_\_\_\_  
Domicilio: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(2) Nombre y firma  
Parentesco: \_\_\_\_\_  
Domicilio: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

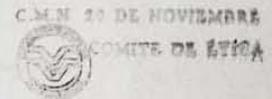
**INVESTIGADOR O MÉDICO QUE INFORMA:** \_\_\_\_\_  
Le he explicado al Sr (a) \_\_\_\_\_, la naturaleza y los propósitos de la investigación, así como los riesgos y beneficios que implica su participación. He dado respuesta a todas sus dudas, y le he preguntado si ha comprendido la información proporcionada, con la finalidad de que pueda decidir libremente participar o no en este estudio. Acepto que he leído, conozco y me apego a la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos, por encima de cualquier otro objetivo.

**INVESTIGADOR RESPONSABLE.**

Dra. María del Carmen Chima Galán  
Adscrita a la División de Medicina Genómica  
CMN "20 de Noviembre"

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma  
Teléfono de contacto: 5200 5003 Ext 14645

El documento se expide por duplicado, entregando una copia al participante.



3/3

Presidente del Comité de Ética en Investigación: Dra. Erika Graciela Meza Dávalos  
Av. Félix Cuevas 540 Col. Del Valle, C.P. 03100 Alcaldía Benito Juárez, Ciudad de México  
Tel.: (55) 52005003 [www.gob.mx/issste](http://www.gob.mx/issste)

## GLOSARIO

**Aneuploidia:** Cambio en el número de cromosomas, que difiere del número de cromosomas que se encuentran de manera silvestre, el cual suele ser un múltiplo exacto del número haploide. En el caso de los seres humanos, el número haploide es 23.

**Autosoma:** se refiere a cualquier cromosoma que no sea el sexual. En los seres humanos, los cromosomas 1 a 22 son denominados autosomas y el par 23 corresponde a los cromosomas sexuales X y Y.

**AZF:** Pertenecen a las siglas Factor de azoospermia en inglés, y se refiere a la región del cromosoma Y que alberga a los genes para la espermatogénesis.

**Azoospermia:** Trastorno masculino que se caracteriza por la ausencia de espermatozoides en el semen.

**Cariotipo:** Conjunto de los cromosomas de una célula, un individuo, o una especie, después del proceso en que se unen por pares de cromosomas idénticos y se clasifican de acuerdo al tamaño,

**CDY1:** Gen de expresión específica de testículo, cuyo producto codificante es una proteína con dominio catalítico de acetiltransferasa de histona, y cuya función está relacionada directamente a la espermtogénesis, en la etapa de transición donde las protaminas remplazan a las histonas, para una mayor compactación del DNA.

**Centrómero:** Es la porción más estrecha de un cromosoma que lo separa en un brazo corto (p) y un brazo largo (q). Una de sus funciones es contribuir a la correcta segregación cromosómica durante la mitosis y la meiosis.

**Criptorquidia:** Trastorno del desarrollo que consiste en el descenso incompleto de uno o ambos testículos a través del canal inguinal hacia el escroto.

**Cromosoma:** Orgánulo en forma de filamento que se haya en el interior del núcleo de una célula eucarionte y que contiene el material genético DNA. El número de cromosomas es constante para las células de una misma especie.

**DAZ:** Familia de genes de expresión específica de testículo, corresponde al acrónimo del inglés Deleted in Azoospermia. Codifican para proteínas de unión a RNA, la cual es importante durante la espermatogénesis.

**DBY:** Gen de expresión específica de testículo, el cual codifica para una Helicasa de RNA, que contiene un motivo de unión para una secuencia específica de aminoácidos (glu-ala-asp), y que esta involucrada en procesos celulares que implican la alteración de la estructura secundaria de RNAs.

**Delección:** Una delección es un tipo de mutación genética en la cual se pierde material genético, desde un solo par de nucleótidos de ADN hasta todo un fragmento de cromosoma.

**Duplicación:** Tipo de mutación genética en la cual hay una repetición de un fragmento de DNA, pueden abarcar unas bases y abarcar hasta un fragmento cromosómico.

**Elementos transponibles:** es una secuencia de ADN que puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula, un fenómeno conocido como transposición.

**Espermátide:** Célula que deriva de un espermatocono secundario por fisión, origen del espermatozoide

**Espermatocono:** Célula germinal masculina que deriva de la espermatogonia y que da lugar a las espermátidas, a partir de las cuales se originan los espermatozoides.

**Espermatogénesis:** Proceso de formación de las células sexuales masculinas, desde la espermatogonia hasta los espermatozoides.

**Espermatogonia:** Célula germinal masculina de la cual derivan, por divisiones y reducciones cromosómicas sucesivas, los espermatoconos.

**Eucromatina:** Forma de la cromatina que se encuentra poco condensada, con una gran concentración de genes, y a menudo se encuentra en transcripción activa

**Fenotipo:** Conjunto de caracteres visibles que un individuo presenta como resultado de la interacción entre su genotipo y el medio.

**Gen:** es una unidad de información de DNA, que codifica para uno o mas productos funcionales.

**Genotipo:** Conjunto de los genes que existen en el núcleo celular de cada individuo.

**Ginecomastia:** agrandamiento patológico de una o ambas glándulas mamarias en el hombre.

**Heterocromatina:** regiones de la cromatina más compacta y condensada, debido a esta característica no se puede transcribir y se replica tardíamente

**Hipogonadismo:** es un trastorno en que los testículos u ovarios no son funcionales o hay incapacidad genética del hipotálamo para secretar cantidades normales de GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas).

**Homólogo:** en genética, los cromosomas homologos son un par de cromosomas que se emparejan durante la meiosis, poseen la misma disposición de secuencias de ADN de un extremo a otro pero distintos alelos.

**Infertilidad:** Incapacidad para concebir un embarazo

**Meiosis:** Proceso de división celular, propio de las células reproductoras, en el que se reduce a la mitad el número de cromosomas.

**Mosaicismo:** implica la presencia de dos o más poblaciones de células con genotipos diferentes en un individuo que se ha desarrollado a partir de un solo óvulo fertilizado.

**Normospermico:** Cuando en la espermatobioscopia, el semen tiene características normales.

**Oligozoospermia:** Secreción deficiente de esperma o escasa cantidad de espermatozoides en el semen.

**PAR:** siglas en inglés de Pseudoautosomical Region, que corresponde a determinadas secciones de los cromosomas sexuales que pueden recombinarse

entre sí durante el proceso de meiosis. Estas regiones están presentes tanto en el cromosoma X como en el cromosoma Y

**RBMY:** Gen motivo de unión al ARN (RRM) en el cromosoma Y (RBMY), que codifica una proteína de unión al ARN específica de células germinales masculinas asociada con la espermatogénesis, su expresión se restringe a los testículos de hombres sanos.

**Recombinación:** proceso por el cual una hebra de material genético se corta y luego se une a una molécula de material genético diferente. En eucariotas la recombinación comúnmente se produce durante la meiosis, como entrecruzamiento cromosómico entre los cromosomas apareados.

**Repetidos en tándem:** es una secuencia de dos o más pares de bases de ADN que se repite de tal manera que las repeticiones se encuentran uno al lado del otro en el cromosoma

**Repetidos palindrómicos:** Secuencia de DNA que se encuentra repetida y de manera invertida respecto a la secuencia original, lo que ocasiona que se encuentre en una imagen de espejo.

**SOX9:** gen que codifica una proteína factor de transcripción SOX9. Actúa durante la diferenciación de condrocitos y, con el factor esteroideogénico 1, regula la transcripción del gen de la hormona anti-Mülleriana

**STS:** Sitio de Secuencia Rotulada (Sequence Tagged Site). Es un segmento corto de DNA, único en el genoma, cuya ubicación y secuencia es conocida. Sirven de "cotas", para indicar la ubicación de una secuencia mayor ya que localizan en los extremos de estas.

**TSPY:** gen que codifica para La proteína 1 codificada en Y específica de los testículos, dicha proteína solo en el tejido testicular y puede estar involucrada en la espermatogénesis.

**USP9Y:** gen codificante para proteína, miembro de la familia de la peptidasa C19. Codifica una proteína que es similar a las proteasas específicas de ubiquitina,

desempeña un papel regulador importante en el nivel de renovación de proteínas al prevenir la degradación de proteínas mediante la eliminación de ubiquitina conjugada. Su falla esta asociada a insuficiencia espermatogénica e infertilidad masculina.

**UTY:** Este gen codifica una proteína que contiene repeticiones tetratricopeptídicas que se cree que están involucradas en las interacciones proteína-proteína. Esta proteína es un antígeno de histocompatibilidad menor que puede inducir el rechazo del injerto de los injertos de células madre masculinas.

**Varicocele:** Dilatación varicosa de las venas del cordón espermático y del escroto.