



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“COMPARACIÓN DE LA INCIDENCIA DE  
MICRODELECCIONES DEL CROMOSOMA “Y” EN DOS  
POBLACIONES CON Y SIN ANTECEDENTES DE  
INFERTILIDAD”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**JANET ARACELI RODRÍGUEZ GUZMÁN**

**DIRIGIDA POR**

**M. en C. Anna Berenice Juárez Espinosa**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2008.**

**BIBLIOTECA CENTRAL, U.A.Q.**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**"COMPARACIÓN DE LA INCIDENCIA DE  
MICRODELECIONES DEL CROMOSOMA "Y" EN DOS  
POBLACIONES CON Y SIN ANTECEDENTES DE  
INFERTILIDAD"**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**JANET ARACELI RODRÍGUEZ GUZMÁN**

**DIRIGIDA POR**

**M. en C. Anna Berenice Juárez Espinosa**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2008.**

**BIBLIOTECA CENTRAL, U.A.Q.**

No. Adq.i. 472038

No. Título \_\_\_\_\_

Clas IS

616.692

R696C

\_\_\_\_\_



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“COMPARACIÓN DE LA INCIDENCIA DE  
MICRODELECCIONES DEL CROMOSOMA “Y” EN DOS  
POBLACIONES CON Y SIN ANTECEDENTES DE  
INFERTILIDAD”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**JANET ARACELI RODRÍGUEZ GUZMÁN**

**DIRIGIDA POR**

**M.en C. Anna Berenice Juárez Espinosa**

**SINODALES**

**M. en C. ANNA BERENICE JUÁREZ ESPINOSA** \_\_\_\_\_

**DIRECTOR**

**Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER.** \_\_\_\_\_

**SINODAL**

**Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA** \_\_\_\_\_

**SINODAL**

**Dr. ROBERTO GUEVARA YAÑEZ** \_\_\_\_\_

**SINODAL**

**M. en C. FRANCISCO RANGEL GONZÁLEZ** \_\_\_\_\_

**SINODAL**

**Trabajo apoyado por:**

- 1. Instituto Médica Fértil, Laboratorio de Genética.**
- 2. CONACyT-Proyecto: QRO.2003-CO1-9864.**
- 3. Población control: estudiantes de la Universidad Autónoma de Querétaro (Facultades de: Biología, Veterinaria y Biotecnología) y Universidad del Valle de México (Facultad de: Medicina).**

## AGRADECIMIENTOS

*Esta tesis de Licenciatura no habría sido posible sin la ayuda técnica, científica y personal de todas aquellas personas que me apoyaron durante la realización de este proyecto...*

*Uno nunca cree lo que es posible de lograr en la vida...y no se da cuenta hasta que las personas que están a su alrededor le hacen creer lo importante que puede ser para mucha gente...este trabajo esta dedicado a todas aquellas personas que de muchas maneras me han apoyado a lo largo de mi vida...*

*...A mis padres y hermanos, que con su cariño, amor y respeto he logrado cumplir mis metas...nunca tendré con que pagárselos...*

*...A la M. en C. Anna Berenice Juárez Espinosa, por creer en mí y por brindarme tanto el apoyo científico y personal, sin tu ayuda no habría podido concluir este proyecto...*

*...A mis grandes amigas: Lizet, Ana, Rocío, Evelia, Lety, Bety y Blanca, por su gran apoyo incondicional...*

*...A mis amigos de la facultad: Bibis, Adriana, Nacho, Adhylio, Rodrigo, Israel, Gaby, Nestor, Miguel, Levir, Alfredo por la ayuda brindada en la etapa más difícil de mi vida...*

*...A todas las chicas de GENEDICA, por el compañerismo, amistad y bonito ambiente de trabajo...sin su presencia, el trabajo realmente sería muy complicado...*

*...Por último, no por eso menos importante, sino todo lo contrario es el motor de mi vida... todos los esfuerzos y sacrificios pasados, se ven recompensados, al ser bendecida por ese angelito que llevo a mi vida el 2 de octubre de 2004 a las 2:03 de la tarde, cambiando todo mi ser, llenándola de felicidad, me ha hecho superarme en todos los sentidos, mi hija SOFIA FERNANDA, solamente puedo decirte...GRACIAS POR EXISTIR...espero que como hija estés orgullosa de tu madre que te adora, ya que eres lo más importante en mi vida, y que trato de ser una mejor persona por tí...*

# ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
I.INTRODUCCIÓN	1
II.ANTECEDENTES	3
II.1 Reproducción sexual	3
II.2 Regulación endocrina de la reproducción masculina	3
II.3 Espermatogénesis	5
II.4 Infertilidad masculina	8
II.4.1 Valoración del hombre infértil	9
II.4.1.1 Historia clínica	9
II.4.1.2 Exploración física	9
II.4.1.3 Espermatobioscopía	10
II.4.1.4 Evaluación hormonal	11
II.4.1.5 Ultrasonido testicular (escrotal)	12
II.4.1.6 Evaluación cromosómica	12
II.5.1 Estructura del cromosoma Y	13
II.5.2 Mapeo físico y molecular	14
II.5.3 Genes en el cromosoma Y	18
II.5.4 Factores de azoospermia	22
II.5.4.1 Región AZFa y sus genes	23
II.5.4.2 Región AZFb y sus genes	25
II.5.4.3 Región AZFc y sus genes	26
III.HIPÓTESIS	27
IV.OBJETIVOS	28
IV.1 General	28
IV.2 Específicos	28

Contenido	Página
V.METODOLOGÍA	29
V.1 Materiales	29
V.1.1 Equipos y consumibles	29
V.1.2 Materiales	29
V.1.3 Material biológico	30
V.1.4 Reactivos	30
V.2 Métodos	31
V.2.1 Metodología	31
V.2.1.1 Población con antecedentes de infertilidad	31
V.2.1.3 Población sin antecedentes de infertilidad	32
V.2.1.4 Venopunción (Extracción de Sangre periférica)	32
V.2.1.5 Registro de muestras	33
V.3 Extracción de DNA	33
V.3.1 Lisis celular	33
V.3.2 Precipitación de proteínas	34
V.3.3 Precipitación del DNA	34
V.4 Cuantificación del DNA	35
V.5 Reacción de la PCR-múltiple	35
V.6 Condiciones de amplificación	37
V.7 Análisis de la muestra	38
V.8 Entrega de resultados	38
VI.RESULTADOS	39
VI.1 Detección de microdeleciones en la población con antecedentes de infertilidad	39
VI.1.1 Incidencia de microdeleciones del cromosoma Y en pacientes con problemas de infertilidad	43
VI.2. Detección de microdeleciones en la población sin antecedentes de infertilidad.	44
VII.DISCUSIÓN	47

Contenido	Página
VIII.CONCLUSIONES	55
VIII.BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXO I. Consentimiento informado	63
ANEXO II. Resumen clínico para estudio de microdeleciones	65
ANEXO III. Análisis molecular	66
ANEXO IV. Análisis del semen	68
ANEXO V. Reporte de Espermiograma	69
ANEXO VI. Ultrasonido testicular	70
ANEXO VII. Perfil Hormonal	72
ANEXO VIII. Cariotipo en sangre periférica	73
ANEXO IX. Resultados obtenidos de microdeleciones del cromosoma Y en pacientes con antecedentes de infertilidad	74
ANEXO X. Resumen del trabajo para la AMGH, 2007.	79
ANEXO XI. Constancia de presentación del trabajo.	80

## ÍNDICE DE CUADROS

Contenido	Página
1 Parámetros de la OMS y terminología empleada para la concentración espermática, movilidad, morfología y volumen del eyaculado.	10
2 Clasificación de secuencias eucromáticas de la NRY	17
3 Genes localizados en el cromosoma Y.	19
4 Relación de parejas de oligonucleótidos utilizados para la detección de microdeleciones del cromosoma Y por PCR-múltiple.	36
5 Relación de reactivos para la reacción de PCR-múltiple para la detección de microdeleciones del cromosoma Y.	37
6 Resultados obtenidos de microdeleciones del cromosoma Y en pacientes con antecedentes de infertilidad.	42
7 Resultados de la detección de microdeleciones del cromosoma Y en la población sin antecedentes de infertilidad	46
8 Clasificación de la población con antecedentes de infertilidad de acuerdo a su concentración espermática	49
9 Relación de volumen testicular y resultados de microdeleciones del cromosoma Y	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
1 Regulación endocrina de la espermatogénesis en el testículo	4
2 Espermatogénesis	6
3 Representación esquemática del cromosoma Y	14
4 Representación de los diferentes mapeos del Cromosoma Y	15
5 Representación de las diferentes secuencias que comprende el cromosoma Y	16
6 Clasificación de secuencias eucromáticas de la NRY	18
7 Representación esquemática de los factores de azoospermia	25
8 Productos amplificados de una múltiple PCR (normales)	40
9 Productos amplificados de una múltiple PCR (deletado)	41
10 Incidencia de las microdeleciones del Cromosoma Y, en una población con antecedentes de infertilidad	43
11 Frecuencia de las microdeleciones del cromosoma Y en la población del bajío	44
12 Productos amplificados de una PCR múltiple (población juvenil)	45
13 Comparación de la incidencia de las microdeleciones del cromosoma Y, en varios estudios realizados	48
14 Algoritmo para la valoración del varón infértil en el Instituto Médica Fértil	54

## RESUMEN

La espermatogénesis es el mecanismo encargado de la producción de espermatozoides. Este mecanismo depende de una meticulosa cascada regulada por genes y cualquier mutación o delección de éstos puede alterar en la producción de espermias. Estas alteraciones involucran irregularidades en las células germinales como concentración, movilidad y morfología. Cualquiera de estas anomalías pueden comprometer al sistema reproductivo ocasionando la infertilidad masculina. Todos estos genes se encuentran en la mayoría de los cromosomas, pero en testículo se expresan genes ubicados en el brazo largo del cromosoma Y, se encuentran genes o grupos de genes denominados "Factores de Azoospermia" (AZF). Estos factores de azoospermia están divididos en tres regiones: AZFa, AZFb y AZFc. La delección de uno o más de estas regiones se le denominan microdelecciones. El análisis molecular de las microdelecciones del cromosoma Y es realizado como parte del diagnóstico del hombre infértil. En el presente proyecto se hizo la comparación de la incidencia de las microdelecciones del cromosoma Y en una población juvenil sin antecedentes de infertilidad contra una población que fue atendida dentro de una clínica de Reproducción asistida. Para los pacientes con infertilidad, se les realizó en su mayoría espermatobioscopia, cariotipo, perfil hormonal, ultrasonido testicular y aquellos pacientes que presentaron oligozoospermia (cuenta espermática disminuida) o azoospermia (ausencia de espermias en el eyaculado), fueron remitidos para el estudio de microdelecciones del cromosoma Y. El estudio se realizó obteniendo muestras de sangre periférica de ambas poblaciones y a partir de estas obtener el DNA de los leucocitos, realizando por medio de la técnica de PCR múltiple la detección de las microdelecciones. Los resultados obtenidos de nuestro estudio el 8.8% de los pacientes con antecedentes de infertilidad mostraron la delección de la región AZFc, en comparación con la población juvenil que mediante esta metodología no se encontraron microdelecciones. A los pacientes que se les detectaron microdelecciones y se les realizó el ultrasonido testicular, presentaron un volumen testicular disminuido. En conclusión la incidencia de microdelecciones del cromosoma Y, es más alta en pacientes con infertilidad en comparación con una población en general, siendo la región AZFc la que se deleta con mayor frecuencia, presentándose en mayor cantidad en pacientes azoospermicos que en oligozoospermicos.

## I.INTRODUCCIÓN

La infertilidad es el impedimento que presenta una pareja de concebir después de 12 meses de relaciones sexuales sin el uso de métodos anticonceptivos. Actualmente la infertilidad es considerada un problema de salud la cual afecta de un 15 a 20% de la población mundial, aproximadamente la mitad de las parejas con este problema de infertilidad son de origen masculino, conocido como factor masculino. Este factor se encuentra relacionado con alteraciones en la espermatogénesis (formación de espermatozoides) el cual involucra la concentración de espermias, movilidad y morfología. Dichas alteraciones pueden estar relacionadas con un mal funcionamiento testicular, hormonal, e incluso pueden deberse a alteraciones en el material genético. La alteración en el cariotipo (análisis cromosómico) o la ausencia de ciertos genes específicos pueden afectar la formación de espermias, maduración y/o concentración. La espermatogénesis depende de una cascada de eventos regulada por la participación de varios genes, la mutación o delección de cualquiera de estos, tiene efectos que se pueden manifestar en la salud reproductiva. Para obtener un diagnóstico correcto, se requiere de varios estudios, a fin de detectar o descartar patologías que puedan afectar la espermatogénesis, evento fundamental para la reproducción.

En la actualidad, se conocen varios genes que son expresados en testículos y que contribuyen a la producción de espermias. La gran mayoría de estos genes están localizados en el cromosoma Y. Existen varios genes considerados para la regulación de la espermatogénesis, pero los genes del brazo largo del cromosoma Y (Yq) son los más relacionados con la función reproductiva masculina y especialmente los que se encuentran dentro la región de eucromatina (Yq11). Esta región es llamada Factor de Azoospermia (AZF) y se ha dividido en tres regiones AZFa, AZFb y AZFc. El análisis molecular de las microdelecciones del cromosoma Y es realizado como parte del diagnóstico para la pareja infértil. Las delecciones de la

región AZF han sido correlacionadas con azoospermia, oligozoospermia severa e inclusive con oligozoospermia moderada.

La delección de la región AZFa esta relacionada con el síndrome de células de Sertoli. La ausencia de la región AZFb se correlaciona con el arresto espermático. Por último, la ausencia de la región AZFc provoca una disminución en la concentración espermática.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. Reproducción Sexual

La producción de las células germinales o gametos (esperma en el hombre u óvulo en la mujer) son formados dentro de las gónadas (testículos u ovarios, respectivamente) por un proceso denominado meiosis. Durante esta división, el número inicial de cromosomas en las células gaméticas humanas es de cuarenta y seis, el cual se reduce a la mitad y cada gameto recibe veintitres cromosomas (célula haploide). La fusión del espermatozoide y el óvulo se denomina fertilización, resultando en la restauración inicial del número original de cromosomas de cuarenta y seis en el cigoto. Cuando estos individuos alcanzan la pubertad, el espermatozoide maduro o el óvulo vuelven a tener un número haploide de cromosomas.

### II.2. Regulación endocrina de la reproducción masculina

Los testículos del embrión durante el primer trimestre del embarazo son glándulas endocrinas activas. Su función es secretar grandes cantidades de testosterona que son requeridas para masculinizar al embrión (genitales externos y órganos accesorios). La secreción de testosterona en el feto masculino declina durante el segundo trimestre del embarazo, sin embargo, las gónadas son relativamente inactivas hasta el momento del nacimiento (Ira, 2002).

Al comenzar la pubertad también inicia la secreción de varias hormonas quienes son responsables de realizar cambios fisiológicos que permitirán al individuo ser apto para reproducirse. La primer hormona que se secreta es la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, por sus siglas en inglés, Gonadotrophic Release Hormone), la cual es sintetizada en el hipotálamo, una vez liberándose tiene su

acción en la pituitaria anterior quien al recibir este estímulo permite la liberación de dos hormonas: la hormona luteinizante (LH) y la folículo estimulante (FSH) (Fox, 2002; Purves y col., 2003). La LH actúa sobre las células intersticiales del testículo para estimular la producción de testosterona está a su vez, al aumentar de concentración actúa sobre el hipotálamo y la hipófisis anterior (Figura 1) para inhibir la producción y la liberación de la LH (retroalimentación negativa). Por otra parte, la FSH actúa en las células de Sertoli quienes están involucradas en la espermatogénesis. Estas células al ser estimuladas liberan a la inhibina (Figura 1) que ejerce su efecto en la hipófisis anterior para impedir la producción de FSH (retroalimentación negativa), ésta hormona inhibe específicamente la pituitaria anterior en la secreción de la FSH sin afectar la secreción de la LH (Ira, 2002; Purves y col., 2003).

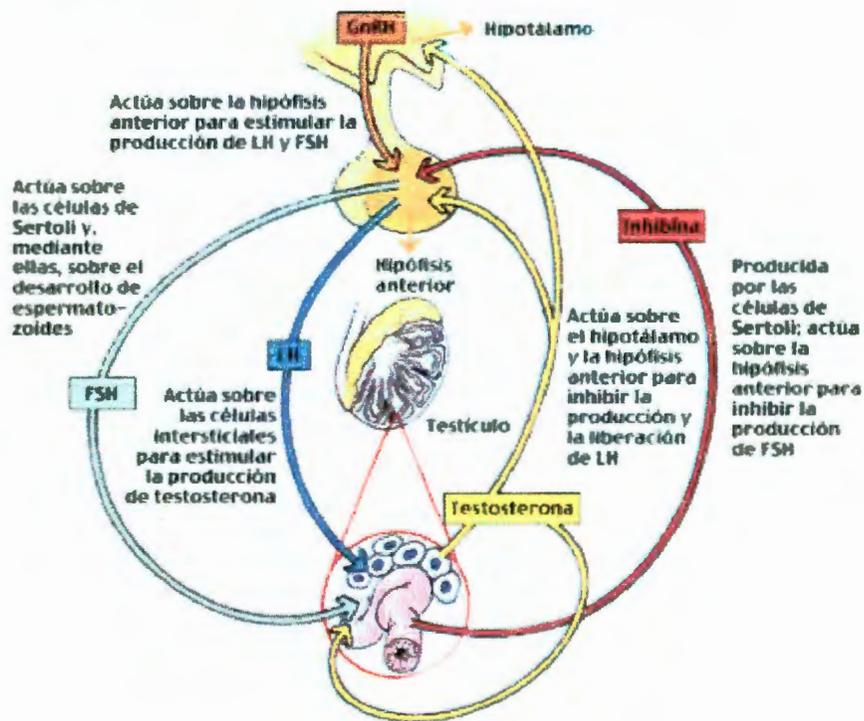


Figura 1. Regulación endocrina de la espermatogénesis en el testículo (Yates y Arce, 2003).

En general podemos resumir que las hormonas gonadotrópicas tienen tres funciones primarias: (1) estimulación de la espermatogénesis, (2) estimulación de la secreción de las hormonas gonadales; y (3) mantenimiento de las estructuras de las gónadas (Ira, 2002; Purves y col., 2003).

Otra hormona que interviene en la función reproductiva es la prolactina, esta se sintetiza en los lactótrpos de la glándula pituitaria de la hipófisis. La prolactina inhibe de manera pulsátil a la secreción de las gonadotropinas, su acción se dirige directamente hacia la GnRH, provocando la disminución de la secreción de las gonadotropinas. La prolactina también contribuye en la producción de testosterona (Strauss y Barbieri, 2004).

### II.3. Espermatogénesis

La espermatogénesis se inicia con la división de las células madre y finaliza con la formación de espermatozoides maduros (Gayton, 2000; Remohí y cols., 2003), este proceso se lleva a cabo aproximadamente en 70 días e involucra elaborados procesos que llevan a cabo distintos tipos celulares. Esto ocurre cuando inicia la pubertad (Foresta y col., 2001a; Huynh y col., 2002).

Durante la maduración espermática pueden diferenciarse tres fases características de este proceso. La primera consiste en una fase proliferativa, de las células madre, las cuales serán posteriormente diferenciadas en espermatozoides maduros. La segunda etapa es el inicio de la meiosis, que consiste en dos divisiones celulares y una sola replicación del ADN, proceso que comienza con células diploides y terminan como células haploides. Los espermatocitos primarios (células diploides) sufren la primera división meiótica (meiosis reduccional) formándose así por cada espermatocito primario dos espermatocitos secundarios. La segunda división meiótica (meiosis ecuacional), permite que de cada

espermatozoides se forman a partir de los espermatozoides secundarios (célula haploide), estas células migran a través de las estrechas uniones formadas por las células de Sertoli hacia el lado luminal de esta barrera testicular. En el momento en el que los espermatozoides alcanzan la membrana de la barrera testicular, la síntesis de ADN (Desoxirribonucleic Acid) esta totalmente finalizada. La última etapa consiste en un proceso de transformación denominado espermiogénesis, sin que se produzca división celular alguna. Los cambios más puntuales es el desarrollo del acrosoma (Figura 2c) y del flagelo, así como la reorganización del núcleo y del citoplasma. (Remohí y col., 2003).

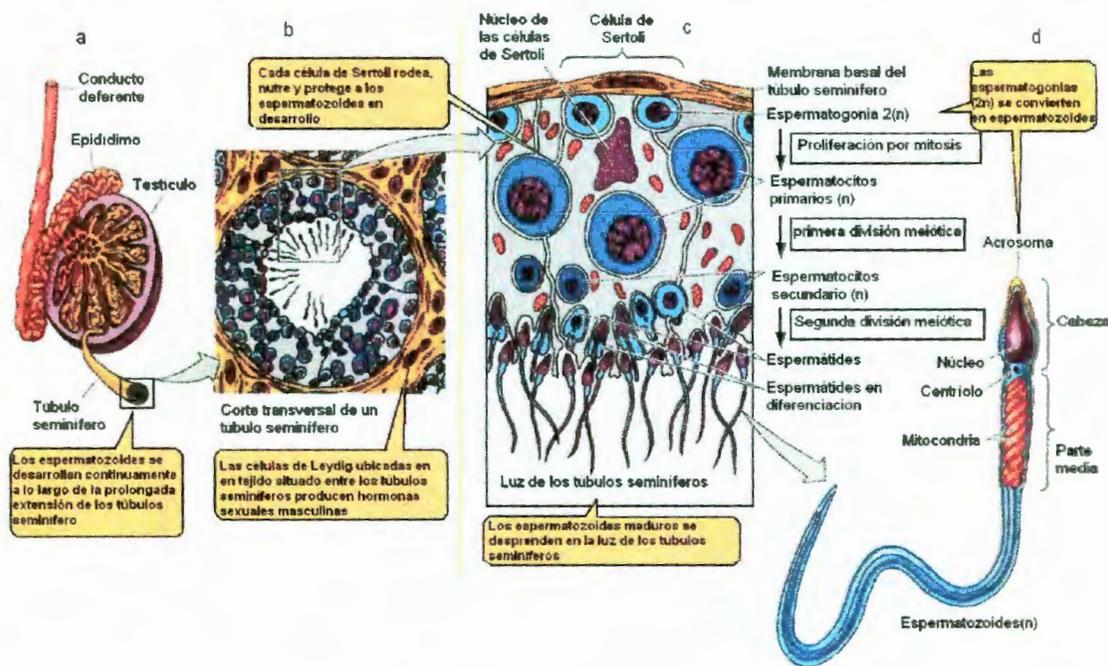


Figura 2. Espermatogénesis. a) Corte transversal de un testículo, b) Corte transversal del túbulo seminífero, c) Representación de un corte histológico del túbulo seminífero en donde se pueden apreciar las diferentes líneas celulares así como la representación de las diferentes etapas de maduración que sufren los espermatozoides y d) Morfología de un espermatozoide maduro (imagen modificada de Purves y col., 2002).

Cuando la espermiogénesis se ha completado, cada espermatozoide se libera de la célula de Sertoli hacia la luz del túbulo seminífero por un proceso que se llama espermiación. Los espermatozoides migran a lo largo del túbulo semínífero hasta la

*rete testis* y la cabeza del epidídimo. Los espermatozoides que abandonan los túbulos seminíferos son inmaduros: no pueden fertilizar un óvulo y no se pueden desplazar. Cuando se liberan a la luz del túbulo seminífero se encuentran suspendidos en un líquido producido primariamente por las células de Sertoli. Los espermatozoides concentrados suspendidos en este líquido fluyen de forma continua desde los túbulos seminíferos mediante cambios sutiles del medio iónico en la *rete testis*, a través de los conductos deferentes, hasta alcanzar el epidídimo en el que los espermatozoides permanecen de 12 a 21 días.

En el epidídimo, los espermatozoides adquieren progresivamente movilidad y capacidad de fecundación. A medida que maduran las células en el epidídimo, estas absorben los componentes de los líquidos, incluyendo las secreciones de las células de Sertoli.

La morfología de los espermatozoides sigue transformándose en el epidídimo, esto incluye la desaparición de la gota citoplasmática y la condensación del núcleo. Aunque el epidídimo es el principal almacén de espermatozoides hasta la eyaculación, aproximadamente el 30% de los espermatozoides en la eyaculación han estado almacenados en el conducto deferente. La eyaculación frecuente acelera el paso de los espermatozoides a través del epidídimo y puede aumentar el número de espermatozoides inmaduros presentes en la eyaculación, los cuales generalmente no tienen la capacidad de fecundar. Una vez en el conducto deferente, los espermatozoides son transportados por las contracciones musculares de la eyaculación (Gayton, 2000).

Como ya se mencionó, la espermatogénesis es un evento dinámico en el que intervienen todo un conjunto de órganos así como células específicas, diversas proteínas (hormonas, enzimas, etc.) y se presenta una gran variabilidad de expresión génica. Cualquier anomalía que interfiera en la maduración espermática puede comprometer al sistema reproductivo, ocasionando que el

individuo no pueda reproducirse. Para ello es conveniente conocer la fisiología normal del varón y de esta manera entender las patologías (celulares y moleculares) que se presentan como probables responsables de la infertilidad (Strauss y Barbieri, 2004).

#### II.4. Infertilidad masculina

La infertilidad es la dificultad de concebir después de 12 meses de relaciones sexuales regulares en ausencia de métodos anticonceptivos (Forti y Krausz, 1998). Actualmente la infertilidad es reconocida como una enfermedad, la cual en las últimas décadas ha ido en aumento. Tal motivo ha despertado el interés en la comunidad científica y médica para tratar de encontrar las causas que puedan dar lugar a que se presente esta enfermedad y así poder brindar algunos tratamientos u opciones a los pacientes que les permita concebir (Remohí y col., 2003; Strauss y Barbieri, 2004).

Aproximadamente en la mitad de las parejas con dificultades reproductivas, el problema se presenta en el hombre denominado clínicamente como factor masculino (Remohí y col., 2003).

El posible tratamiento médico de este factor masculino es con frecuencia controvertido, debido a la dificultad de dar un diagnóstico certero. Varios autores estiman un 25% (Briton-Jones y Hanes, 2000; Strauss y Barbieri, 2004), 30% (Remohí y col., 2001) y hasta un 50% (Foresta y col., 2001a) de los casos de hombres infértiles son de etiología idiopática (causa desconocida). Esta falta de información con frecuencia favorece la aplicación de tratamientos de dudosa eficacia y hace compleja la evaluación de los beneficios de un tratamiento en el factor masculino (Remohí y col., 2003).

## II.4.1. Valoración del hombre infértil

### II.4.1.1. Historia clínica

La historia clínica debe ser comprendida enfocándose en la identificación del riesgo potencial que afectando la fertilidad del hombre. Defectos genitourinarios congénitos (ejemplos: criptorquidismo, hipospadias), pubertad anormal, ginecomastia, síntomas de hipogonadismo (como disminución de la libido), etiologías infecciosas, traumatismos o cirugías, defectos en la producción de espermias, disfunción eyaculadora y desórdenes genéticos; todas éstas pueden ser posibles causas de infertilidad. Otras consideraciones incluyen: toxicidad debido a quimioterapia, exposición a químicos, o estilo de vida (tabaquismo, alcoholismo o drogadicción), prácticas laborales (exposición a tóxicos como plomo y arsénico, sedentarismo), exposición prolongada a altas temperaturas, entre otros (Strauss y Barbieri, 2004).

### II.4.1.2. Exploración Física

La exploración física debe ser abordada (porque cualquier enfermedad afecta negativamente a la espermatogénesis) con especial atención al área genital. La apariencia general del paciente se puede enfocar a los caracteres sexuales secundarios, signos de virilización inadecuada, tales como un pobre desarrollo testicular y del pene, poco vello corporal y en el área genital, sugieren una endocrinopatía (Strauss y Barbieri, 2004). El tamaño y la consistencia testicular deben ser tomados en cuenta, se ha reportado que de 80-85% del volumen testicular es el que ocupan los túbulos seminíferos. Además, un volumen testicular disminuido generalmente está relacionado con un daño severo en los túbulos seminíferos y con algunas patologías de etiología genética (Forti y Krausz, 1998).

### II.4.1.3. Espermatobioscopía

El análisis del semen se denomina espermatobioscopía. Este estudio sigue siendo fundamental en la valoración de la esterilidad conyugal, debido a que se analizan diferentes parámetros (Forti y Krausz, 1998) que nos permiten valorar la calidad espermática y en algunas ocasiones proporciona información para identificar la causa de la esterilidad, Cuadro 1.

Cuadro 1. Parámetros de la OMS y terminología empleada para la concentración espermática, movilidad, morfología y volumen del eyaculado (Aitken y col., 1998; Norma InPer, 2003).

CONCENTRACIÓN	NORMAL	ANORMAL	TERMINOLOGÍA
	20x10 <sup>6</sup> espermatozoides/mL	0	Azoospermia
		100,000	Criptozoospermia
		OLIGOZOOSPERMIA	
		200,000 – 4x10 <sup>6</sup>	Severa
		5x10 <sup>6</sup> – 9x10 <sup>6</sup>	Moderada
		10x10 <sup>6</sup> – 19x10 <sup>6</sup>	Leve
MOVILIDAD	NORMAL	ANORMAL	TERMINOLOGÍA
	50% o más de espermias móviles progresivos (Tipo A+B), o más del 25% de Tipo A.	ASTENOZOOSPERMIA	
		0-15%	Severa
		16-25%	Moderada
		26-49%	Leve
MORFOLOGÍA	NORMAL	ANORMAL	TERMINOLOGÍA
	OMS: 30% o más de formas normales	TERATOZOOSPERMIA	
		0 – 9 %	Severa
		10 – 19 %	Moderada
	KRUGER 14% o más de formas normales	20 – 29 %	Leve
		0 – 6 %	Severa
		7 – 9 %	Moderada
10 -13%		Leve	
VOLUMEN	NORMAL	ANORMAL	TERMINOLOGÍA
	2 a 6 mL de eyaculado	< 2 mL	Hipospermia
		>6 mL	Hiperespermia
		No eyaculado	Aspermia

Las probables causas de la infertilidad del varón han sido ligadas con una multitud de irregularidades en las células germinales, incluyendo número de espermias, motilidad y morfología (Huynh y cols., 2002). Las diferentes características que puede presentar la muestra espermática con más frecuencia en parejas infértiles son las siguientes: azoospermia (ausencia de espermatozoides en el eyaculado), oligozoospermia (cantidad disminuida de espermatozoides en el eyaculado), astenozoospermia (movilidad no progresiva de los espermatozoides en el eyaculado) y teratozoospermia (morfología anormal de los espermatozoides en el eyaculado) (Forti y Krausz, 1998).

Tales alteraciones en la producción de espermias pueden estar relacionadas a diferentes patologías histológicas testiculares, que van desde la ausencia completa de células germinales conocido como Síndrome de Células de Sertoli (SCOS, Sertoli Cell Only Síndrome) a hipoespermatogénesis y arresto en la maduración espermática. Las alteraciones de la espermatogénesis pueden ser ocasionadas por diferentes causas, como enfermedades sistémicas, criptoorquidismo, desórdenes endocrinológicos, obstrucción/ausencia de conductos seminales, por procesos infecciosos o por alteraciones genéticas (Foresta y col., 2001a).

#### II.4.1.4. Evaluación hormonal

Una evaluación del estado endocrino del paciente es otro factor importante para el historial clínico. Una prueba clínica general consiste en la evaluación de la LH, FSH, testosterona y prolactina (Strauss y Barbieri, 2004). Los niveles altos en suero de FSH y los niveles normales de LH y testosterona están presentes en la mayoría de los hombres infértiles con una concentración de espermias de  $5 \times 10^6$ /mL y están relacionados con daño espermatogénico. Bajos niveles de FSH, LH y testosterona sugieren un hipogonadismo hipotrófico (Forti y Krausz, 1998). Cuando existen niveles elevados en sangre de la prolactina (hiperprolactinemia) provocan una disminución de la LH, FSH y testosterona en el hombre. El conteo y la movilidad

espermática disminuyen y se presenta un incremento de formas anormales (Strauss y Barbieri, 2004).

#### II.4.1.5. Ultrasonido testicular (escrotal)

El ultrasonido testicular es un procedimiento imagenológico para examinar los testículos y otras estructuras testiculares, y se ha considerado una herramienta diagnóstica en pacientes que presentan antecedentes de infertilidad, la mayoría presenta anomalías como: varicocele, incremento en el tamaño de los epidídimos, quistes en el epidídimo, hidrocele, y quistes testiculares. Este estudio también es realizado a pacientes con antecedentes de criptorquidismo (Forti y Krausz, 1998).

#### II.4.1.6. Evaluación cromosómica

Las anomalías cromosómicas son más frecuentes en los hombres infértiles (5.3%) que en la población en general (0.6%); además, el cariotipo debe ser realizado en hombres con azoospermia y oligozoospermia si los niveles de FSH son elevados y el volumen testicular está marcadamente reducido. Las anomalías más frecuentes son aneuploidías en los cromosomas sexuales tales como: 47,XXY, y 47,XYY, translocaciones autosómicas balanceadas y no balanceadas (Strauss y Barbieri, 2004; Maduro y Lamb, 2002).

La producción de espermias depende de una meticulosa cascada de eventos regulados por la participación de genes que coordinan la proliferación de estas células. Se han estimado que alrededor de 2000 genes se encuentran involucrados en el control de la espermatogénesis, y se ha postulado que las mutaciones o deleciones en cualquiera de estos genes, tienen efectos en la reproducción, manifestándose como infertilidad (Huynh y col., 2002). Cabe mencionar que estos

genes están distribuidos en varios cromosomas autosómicos, pero los genes que están directamente relacionados con procesos de reproducción se encuentran en el cromosoma sexual Y, ya que en su mayoría son proteínas que se expresan solo en testículos y que son fundamentales para la espermatogénesis. Por lo tanto, su ausencia puede comprometer la capacidad de reproducción. Es por ello, que este estudio tiene importancia clínica, ya que el análisis de genes específicos del cromosoma Y pueden dar lugar a la identificación de la causa de la infertilidad, además de tener un valor pronóstico y diagnóstico (Huynh y col., 2002).

#### II.5.1. Estructura del Cromosoma Y

El cromosoma Y, está constituido por un brazo corto (Yp) y un brazo largo (Yq) separados por un centrómero. Tiene ~60Mb, es relativamente pequeño comparado con todos los otros cromosomas. Observaciones citogenéticas mostraron diferentes regiones del Y que pueden ser identificadas: las Regiones Pseudoautosómicas, (PARs, PseudoAutosomal Regions), divididos en dos secciones PAR1 y PAR2, y las regiones de heterocromatina y eucromatina (Figura 3).

Las regiones pseudoautosómicas se aparean con el cromosoma X durante la meiosis. La región que se encuentra entre los PARs que no se recombina es llamada región no recombinante del cromosoma Y, NRY (No Recombining Region Y), ver Figura 3.

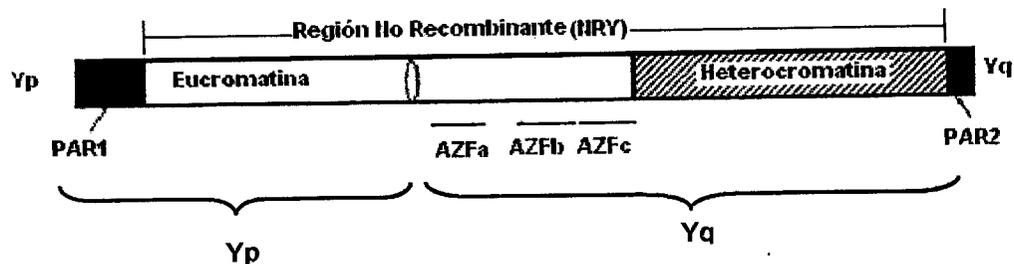


Figura 3. Representación esquemática del cromosoma Y. Yp representa el brazo corto y Yq el brazo largo. Los PARs están representados en negro, la eucromatina en blanco y la heterocromatina en líneas diagonales (imagen modificada de Foresta y col., 2001a).

Mientras que PAR1 y PAR2 representan el 5% del cromosoma entero, NRY representa el 95%, esta incluye las regiones de heterocromatina y eucromatina. La heterocromatina era considerada genéticamente inerte, la eucromatina tiene numerosas secuencias altamente repetitivas que contienen genes involucrados con varias funciones biológicas (Quintana-Murci y Fellous, 2001).

### II.5.2. Mapeo Físico y Molecular

El mapeo se ha basado a partir de la generación de deleciones de este cromosoma (Vogt, 2005). El primer mapa del cromosoma Y fue realizado por deleciones citogenéticas que eran visibles en el cromosoma, identificadas a partir de un patrón de bandas de baja resolución (ver Figura 4). El mapa inicial fue realizado por el grupo de Vergnaud (Vergnaud y col., 1986), usando diferentes sondas específicas se logró la clasificación de este cromosoma en siete intervalos (Quintana-Murci y Fellous, 2001); el brazo corto y el centrómero están incluidos en los intervalos 1 al 4 (distal a proximal); la parte de eucromatina de Yq es representada por los intervalos de 5 y 6 (proximal a distal); la región de heterocromatina se define como el intervalo 7, Figura 4 (Foresta y col., 2001a).

Después en 1992, Vollrath y colaboradores construyeron un mapa más preciso del cromosoma Y basados en la detección de 200 secuencias específicas de sitio (STS's, sequence-tagged sites). La presencia o ausencia de estos STS's fue realizado en la eucromatina de un grupo grande de pacientes con anomalías del cromosoma Y, permitiendo subdividir en 43 intervalos al cromosoma. Este mapa de 43 intervalos se modificó a partir del mapa de Vergnaud (Vollrath y col., 1992) quienes hacen una clasificación más específica gracias a la identificación de varios genes. Este grupo de STS's ha sido ampliamente usado para definir regiones de deleciones asociados con un fenotipo en particular y entonces así identificar genes específicos (Quintana-Murci y Fellous, 2001).

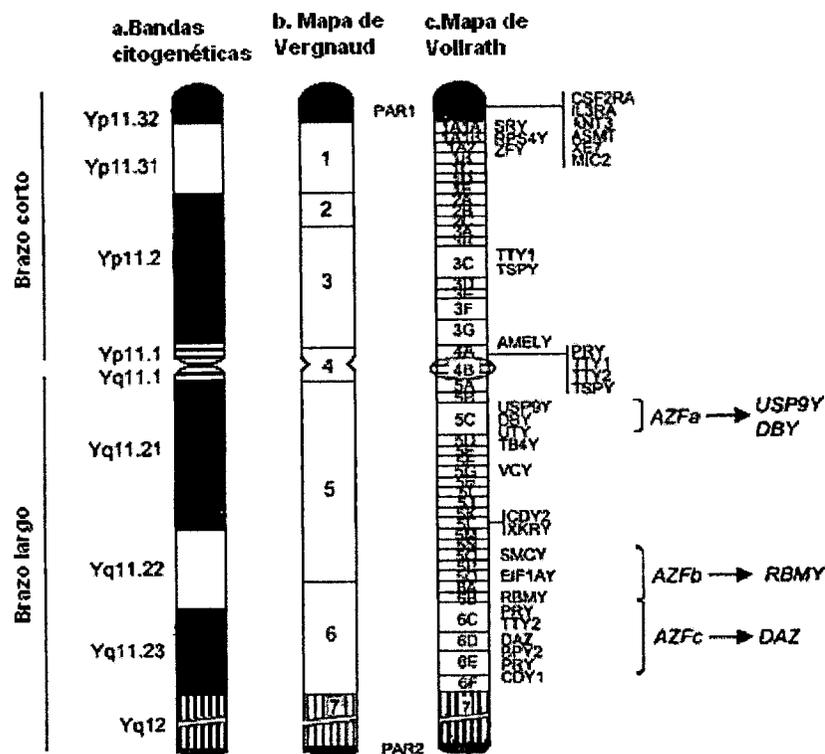


Figura 4. Representación de los diferentes mapeos del Cromosoma Y, a. Bandas cromosomitas identificadas por citogenética clásica, b. Mapa de Vergnaud, c. Mapa de Vollrath (imagen modificada de Foresta y col., 2001a).

En el año 2001 se reportó un mapa de alta resolución de NRY. De este mapa surgieron 758 STS's de los cuales 136 se encuentran en dos o más lugares de la

NRY, reflejando una inusual composición de secuencias repetitivas (Tilford y col., 2001).

La región eucromática de la NRY comprende tres clases de secuencias denominadas: X-transpuestas, X-degeneradas y amplicónicas (Figura 5).

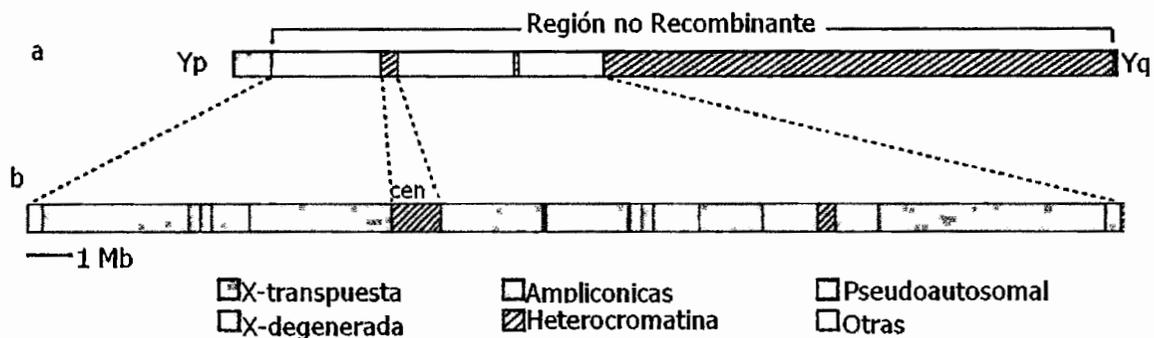


Figura 5. Representación de las diferentes secuencias que comprende el cromosoma Y, a) Regiones pseudoautosomales y regiones de heterocromatina, b) las tres clases de secuencias de eucromatina (imagen modificada de Skaletsky y col., 2003).

Las secuencias X-transpuestas son 99% idénticas a las secuencias del cromosoma X. Estas secuencias son llamadas así porque la presencia en NRY resulta de una transposición masiva del X-Y ocurrida hace aproximadamente de 3 a 4 millones de años, después de la divergencia de las líneas entre chimpancé y el humano.

Dentro de los segmentos de X-transpuestas, se han identificado solo dos genes homólogos a Xq21. Estas secuencias exhiben una baja densidad de genes comparada con las otras dos clases de eucromatina, cuadro 2.

En contraste, los segmentos de las secuencias X-degeneradas están compuestos por una copia del gen o pseudogenes homólogos de 27 genes diferentes ligados al X. Estos genes de copia única y pseudogenes, presentan entre 60% y 96% de similitud a la secuencia de nucleótidos homólogos al X, y han sobrevivido reliquias

de cromosomas autosómicos de los cuales los cromosomas X y Y evolucionaron, cuadro 2.

La tercera clase de secuencias eucromáticas son los segmentos amplicónicos, que están compuestos de secuencias largas que exhiben una marcada similitud con ella misma (99.9%). Los amplicones están localizados en siete segmentos que están dispersados a través de la eucromatina del brazo largo y la parte proximal del brazo corto (Skaletsky y col., 2003).

Los amplicones están formados por familias de genes específicos en testículo que pueden ser críticos para la espermatogénesis, cuadro 2 (Tilford y col., 2001).

Cuadro 2. Clasificación de secuencias eucromáticas de la NRY (cuadro modificado de Skaletsky y col., 2003).

Clases de secuencias	Características	Origen de evolución	Distribución	Longitud (Mb)	No. de genes que codifican
X- transpuesta	99% de identidad con X	Simple transposición de X	2 bloques en Yq	3.4	2
X- degenerada	Copias únicas de genes o pseudogenes homólogos a los de X	Reliquias de cromosomas autosómicos de los cuáles X y Y se desarrollaron	8 bloques en Yp y Yq	8.2	16, se expresan en varios tejidos
Amplicónica	Su longitud es igual a otras secuencias de NRY	Adquirido de diversas fuentes, entonces se amplifico	7 bloques en Yp y Yq	10.2	60(en 9 familias) se expresan mayoritaria mente testículos

### II.5.3. Genes en el cromosoma Y

Los diferentes genes identificados dentro de la NRY, pueden ser divididos dentro de dos categorías: los primeros comprenden aquellos genes que se expresan en todos los tejidos, teniendo homólogos en X, aparecen en una sola copia en NRY y participan en el metabolismo celular expresándose en la mayoría del cuerpo y órganos. La segunda categoría incluye genes que se expresan de manera específica en los testículos, existiendo múltiples copias en NRY y que codifican a proteínas con funciones mucho más especializadas (Quintana-Murci y Fellous, 2003; Skaletsky y col., 2003). El gen SRY, determina el desarrollo en los testículos; es Y-específico, tiene una copia y un patrón diferente de expresión tanto en el límite de la cresta genital, en células de Sertoli de adulto y en células germinales (Foresta y col., 2001a). En el Cuadro 3, se resumen los genes que están localizados en el cromosoma Y, así como su función.

Cuadro 3. Genes localizados en el cromosoma Y (tabla modificada de Quintana-Murci y Fellous, 2003; Skaletsky y col., 2003). \*=genes reportados en el estudio de Skaletsky y col., 2003.

Clases de secuencias de NRY	Símbolo del gen	Localización	Nombre del gen	Número de copias	Tejido en donde se expresa	Patología asociada o función
X-transpuestas	<i>TGIF2LY*</i>	Yp11.2		1*	Testículos	
	<i>PCDH11Y</i>		Protocaderina 11 Y	1	Cerebro fetal, cerebro	Cáncer de prostata
Total				2		
X-degeneradas	<i>SRY</i>	Yp: 1A1A	Regresión sexual	1	Predominantemente en testículos	Regresión sexual
	<i>RPS4Y1</i>	Yp: 1A1B	Proteína Ribosomal S4Y isoforma 1	1	Varios tejidos	Síndrome de Turner?
	<i>ZFY</i>	Yp:1A2	Dedo de Zinc de Y	1	Varios tejidos	Determinación del sexo
	<i>AMELY</i>	Yp: 4A	Amelogenina Y	1	dientes	
	<i>TBL1Y</i>		Proteína parecida a la transducina(beta)	1	Cerebro fetal, próstata	Cáncer de prostata
	<i>PRKY</i>	Yq11.2	Proteína cinasa,Y	1	Varios tejidos	
	<i>USP9Y</i>	Yq: 5C	Proteasa específica de la ubiquitina	1	Varios tejidos	
	<i>DBY</i>	Yq: 5C	Caja de la Muerte	1	Varios tejidos	
	<i>UTY</i>	Yq: 5C	Dominio UTY ubiquitinado	1	Varios tejidos	
	<i>TMSB4Y</i>		Timosina(beta)-4Y	1	Varios tejidos	

Cuadro 3. Genes localizados en el cromosoma Y (tabla modificada de Quintana-Murci y Fellous, 2003; Skaletsky y col., 2003).  
 \*=genes reportados en el estudio de Skaletsky y col., 2003.

Clases de secuencias de NRY	Símbolo del gen	Localización	Nombre del gen	Número de copias	Tejido en donde se expresa	Patología asociada o función
	<i>NLGN4Y</i>		Neuroligina del 4, isoforma Y	1	Cerebro fetal, cerebro y prostata	
	<i>CYorf15A*</i>	PAR2	Chromosome Y open reading frame 15A	1	Varios tejidos	
	<i>CYorf15B*</i>	PAR2	Chromosome Y open reading frame 15B	1	Varios tejidos	
	<i>SMCY</i>	Yq: 5P	cDNA seleccionado de ratón, Y	1	Varios tejidos	
	<i>EIF1AY</i>	Yq: 5Q	Factor 1A de inicio de transducción	1	Varios tejidos	
	<i>RPS4Y2*</i>	Yp: 1A1B	Proteína ribosomal S4, isoforma 2	1	Varios tejidos	
Total				16		
Amplicónicas	<i>TSPY</i>	Yp: 3G+5	Proteína específica testicular	~35	Testículos	
	<i>VCY</i>	Yq: 6F	Variable intercambiadora de Y	2*	Testículos	Desconocido
	<i>XKRY</i>	Yq: 5L	XK relacionado a Y	2	Testículos	
	<i>CDY</i>	Yq: 5L,6F	Cromodominio Y	4	Testículos	

Cuadro 3. Genes localizados en el cromosoma Y (tabla modificada de Quintana-Murci y Fellous, 2003; Skaletsky y col., 2003).  
 \*=genes reportados en el estudio de Skaletsky y col., 2003.

Clases de secuencias de NRY	Símbolo del gen	Localización	Nombre del gen	Número de copias	Tejido en donde se expresa	Patología asociada o función
	<i>HSFY*</i>		Heat shock transcription factor Y	2	Testículos	
	<i>RBMV</i>	Yp+q	El dominio de la unión a RNA	6	Testículos	
	<i>PRV</i>	Y: 4A,6C	PTP-BL relacionada a Y	2	Testículos	
	<i>BPY2*</i>	Yq: 5G	Proteína básica Y2	3	Testículos	
	<i>DAZ</i>	Y: 6F	Delección en azoospermia	4	Testículos	
Total						
Gran Total				~60		
				~78		

#### II.5.4. Los Factores de Azoospermia

Tiepolo y Zuffardi en 1976, fueron los primeros en hipotetizar una correlación entre las deleciones del cromosoma Y en el hombre infértil. Estos autores revisaron el cariotipo de 1170 hombres, seis de ellos con azoospermia, en donde se observaron grandes deleciones incluyendo la región de heterocromatina entera (Yq12) y una cantidad indefinida de región de eucromatina (Yq11). En dos casos se demostraron que los padres de los pacientes con deleciones portan un Y normal, indicando que las deleciones son mutaciones *de novo*. Esto sugiere que las deleciones en esta área son la causa de la azoospermia y postularon que un factor genético localizado en Yq11 es importante para el desarrollo de las células germinales masculinas. Este gen o grupo de genes fueron definidos como "Factores de Azoospermia" AZF (AZoospermia Factor) (Tiepolo y Zuffardi, 1976; Foresta y col., 2001a; Vogt, 2005).

La región de azoospermia ha sido dividida dentro de tres regiones AZFa, AZFb y AZFc. Las regiones fueron identificadas a partir de estudios que muestran deleciones ocurridas en cada uno (Briton-Jones y Hanes, 2000). La complejidad genética del *locus* de AZF pudo ser revelado por los mapas de los STS. Estos análisis permiten la detección de deleciones a nivel molecular (STS-PCR o Southern blotting) ya que no pueden ser detectadas por citogenética convencional. Tales deleciones se han denominado microdeleciones. El mapeo molecular en pacientes con microdeleciones ha permitido detectar varios *locus* relacionados con espermatogénesis Yq, esto ha sugerido que tres regiones que no se sobrelapen entre los intervalos 5 y 6 pueden estar deletadas en el hombre infértil (Foresta y col., 2001a).

Cada STS presenta secuencias de DNA genómico conocido, y esta amplificación por PCR indica la presencia de estas secuencias en el cromosoma Y, mientras que la ausencia indica su deleción (Foresta y col., 2001a).

Los marcadores STS se clasifican en tres categorías: 1) marcadores con una sola copia, estos STS son más informativos y más específicos, y la ausencia de ellos indica la pérdida de la secuencia específica del gen. 2) marcadores que son multicopia están agrupados en una pequeña región del cromosoma Y, en tal caso un PCR negativo indica la pérdida de toda la familia de genes. 3) marcadores que son multicopias y se dispersan a lo largo de las regiones del cromosoma Y, tales marcadores pueden ser informativos sólo cuando la ausencia indica una delección muy grande en el cromosoma Y.

El análisis molecular de las microdeleciones, es actualmente realizado en algunos laboratorios de diagnóstico y de investigación como parte de estudio para la infertilidad masculina (Simoni, 2004).

La técnica de STS-PCR es rápida, sencilla y no invasiva; se realiza con una muestra de DNA genómico extraído de leucocitos principalmente. Para el diagnóstico molecular de las microdeleciones del cromosoma Y se sugiere emplear la técnica de amplificación por PCR múltiple, que permite amplificar el mismo *loci* seleccionado con diferentes STSs al mismo tiempo. El número de STSs usados para la detección de las deleciones puede ser de dos a tres STSs por cada región de AZF.

#### II.5.4.1. Región AZFa y sus genes

La región AZFa esta localizada en la parte proximal de Yq del intervalo 5 (ver figura 7) y esta extensión molecular ha sido aproximadamente estimada entre 1 y 3 Mb. Varios genes han sido identificados en esta región, DBY (Dead Box Y), UTY (Ubiquitous TPR motif Y), TB4Y (Tymosin B4Y isoform) y DFFRY (Drosophila Development gene Fats Facets), recientemente renombrado USP9Y (Ubiquitin Specific Protease 9, Y chromosome). Los primeros tres genes aparentemente no

tienen funciones especializadas y se han involucrado en funciones de metabolismo celular (Quintana-Murci y Fellous, 2001; Strauss y Barbieri, 2004). Por el contrario, el gen USP9Y está relacionado con la gametogénesis (Quintana-Murci y Fellous, 2001).

Estudios iniciales en pacientes con deleciones claramente delimitadas en AZFa sugieren que la deficiencia de USP9Y, causa infertilidad en el hombre (Blanco y col., 2000; Krausz y col., 2003; Strauss y Barbieri, 2004). Este gen es de copia única y ocupa más de la mitad de la región AZFa, y codifica para una proteína cuya función es ubiquitina C-terminal hidrolasa. La mayoría de hombres infértiles muestran la ausencia del intervalo entero. Estos resultados sugieren que otros genes en esta región pueden ser responsables, solo o en combinación con USP9Y, para la disrupción espermatogénica observada en pacientes con AZFa deletado. La presencia o ausencia de este gen se detecta con el STS sY84 (Foresta y col., 2001a).

La pérdida adicional del gen DBY esta asociado con un fenotipo conocido como síndrome de células de Sertoli, este gen codifica para una proteína cuya función es RNA helicasa, que está involucrada en procesos celulares tales como modificación de la estructura secundaria del RNA al inicio de la traducción. Esta proteína, está asociada en espermatogénesis, crecimiento y división celular, identificando su presencia o deleción con el STS sY86 (Blanco y col., 2000; Foresta y col., 2001a; Krausz y col., 2003; Strauss y Barbieri, 2004).

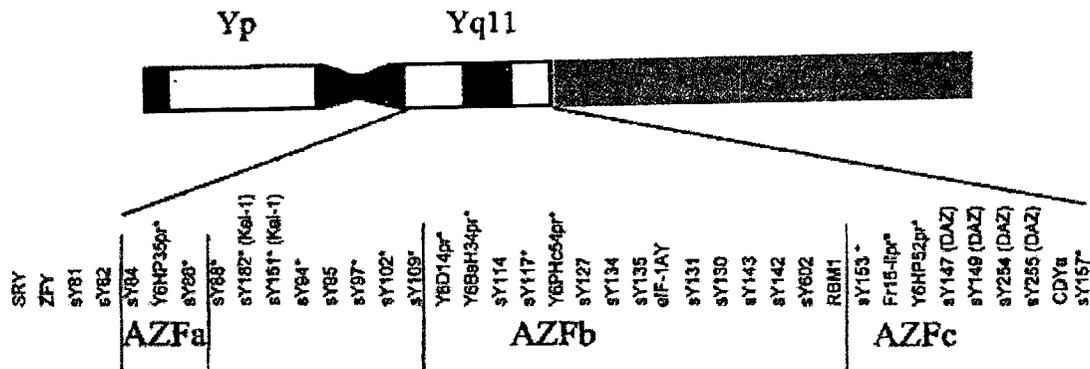


Figura 7. Representación esquemática de la localización de los factores de azoospermia en la región Yq11 del cromosoma Y (imagen modificada de Rolf y col., 2002).

#### II.5.4.2. Región AZFb y sus genes

La región AZFb está localizada entre la delección del intervalo 5 y la delección proximal del intervalo 6 (ver Figura 7), constituida de 1 a 3 Mb. Se han descrito cinco genes dentro de este intervalo; RBMY (RNA-binding motif), CDY (Chromodomain Y), XKRY (XK Related Y), e1F-1A (eukaryotic translation initiation factor 1A) y SMCY (Selected Mouse cDNA on the Y), (Quintana-Murci y Fellous, 2001).

Los genes RBMY son expresados solo en la línea germinal en los testículos (espermatogonia, espermatoцитos y espermátides redondos), por ello se dice que tiene un papel funcional en la espermatogénesis (Cooke, 1999; Huynh y col., 2002; Quintana-Murci y Fellous, 2003).

Sugiriendo que muchos de estos genes pueden contribuir al fenotipo de AZFb que consiste en un arresto espermático (Cooke, 1999; Krausz y col., 2003). Los STS que se utilizan para determinar la presencia o ausencia de esta región son el

sY127 que se localiza en la parte media y sY134 que se localiza en la parte distal de esta región (Simoni y col., 2004).

#### II.5.4.3. Región AZFc y sus genes

La Región AZFc esta localizada en la proximidad de la heterocromatina distal de Yq11 (ver Figura 7) esta constituido de 500kb. Esta región contiene el grupo de genes DAZ (Deleted in AZoospermia), PRY (PTP-BL Related Y), BPY2 (Basis Protein Y2), CDY y RBM (Quintana-Murci y Fellous, 2001; Strauss y Barbieri, 2004).

El gen DAZ fue encontrado solo en el cromosoma Y de monos, simios y humanos. En todos los otros mamíferos esta localizado en cromosomas autosómicos, en comparación con los humanos, este gen se encuentran el cromosoma Y. La expresión de este gen esta restringida en células premeioticas, principalmente en espermatogonias. Este gen codifica para proteínas de unión de RNA que son importantes para la espermatogénesis (Strauss y Barbieri, 2004). Para poder determinar la presencia o la deleción de esta región se utilizan dos STS, sY254 y sY255 ambos para este gen.

Las deleciones parciales o completas en la región AZFc esta asociada con un fenotipo variable que puede ser hipospermatogénesis, oligozoospermia, SCOS entre otros.

### **III. HIPÓTESIS**

La población con antecedentes de infertilidad mostrará una mayor incidencia de microdeleciones del cromosoma Y en comparación con la población sin estos antecedentes.

## **IV. OBJETIVOS**

### **IV.1. GENERAL**

Comparar la incidencia de microdeleciones del cromosoma Y, en una población juvenil de la región del bajo contra una población que presenta antecedentes de infertilidad en Médica Fértil.

### **IV.2. ESPECÍFICOS**

- Determinar la incidencia de microdeleciones del cromosoma Y en dos poblaciones con y sin antecedentes de infertilidad.
- Determinar la microdelección más frecuente de las regiones de factores de azoospermia (AZF) en cada una de las poblaciones.

## V. METODOLOGÍA

### V.1. Materiales

#### V.1.1. Equipos y consumibles

- Balanza Analítica
- Micropipetas automáticas de 2  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$
- Vórtex
- Centrífuga
- Microcentrífuga
- Incubador a 37°C
- Refrigerador de -20°C
- Refrigerador de 4°C
- Espectrofotómetro
- Campana para PCR con UV y flujo laminar
- Gradilla para mantener a 4°C los reactivos en viales
- Termociclador (marca eppendorf, modelo Mastercycler epgradient)
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Analizador de imágenes con Transiluminador de luz UV
- Computadora para el software del analizador de imágenes

#### V.1.2. Materiales

- Matraces Erlenmeyer de 250 ml
- Pipetas Pasteur
- Probetas
- Puntas para micropipetas estériles con y sin filtro de 10  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$

- Tubos de 5 a 10 mL con EDTA (tubos con tapa morada) para recolectar las muestras de sangre periférica.
- Agujas vacutainer
- Viales con capacidad de 200  $\mu$ L, 0.5 mL, 1.5 mL, 2.0 mL

#### V.1.3. Material Biológico:

- Sangre periférica recolectada de una población de varones de 20-25 años.
- Sangre periférica de una población de pacientes con antecedentes de infertilidad (rango entre 19 y 56 años).

#### V.1.4. Reactivos:

- Kit de extracción de DNA genómico a partir de leucocitos (BIO-RAD).  
Contiene: solución de lisis RBC (de sus siglas en inglés, red blood cell), lisis de DNA genómico, RNasa, solución de precipitación de proteínas y TE 1X.
- Alcohol etílico
- Alcohol isopropílico
- Agua inyectable estéril
- Agua MQ estéril
- Buffer TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5)
- Buffer TBE 5X (1.0mM TRis, 0.9 mM ácido bórico, 0.01mM EDTA, pH 8.4)
- Bromuro de etidio (5 mg/ml)
- Agarosa Ultrapura (temperatura de gelificación 34.5 a 37.5°C)
- dNTPs
- MgCl<sub>2</sub>
- *Taq* polimerasa
- Buffer de carga (10X Blue Juice™; 65% (p/v) sucrosa, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM EDTA, 0.3% (p/v) azul de bromofenol)
- Marcador de DNA de 100 pb (pares de bases)
- Agua destilada

- Los oligonucleótidos utilizados para PCR-multiple, tanto para la reacción A y B.

## V.2. Métodos

### V.2.1. Metodología

Existen grandes diferencias en la prevalencia de microdeleciones, que oscila desde el 1% hasta el 35% (Foresta y cols., 2001b) y 55% (Krausz y col., 2003; Briton-Jones y Hanes, 2000) reflejando el criterio de selección del paciente. Por la tanto, la incidencia actual de microdeleciones no es clara. El hombre infértil entra dentro de una categoría de diagnóstico heterogéneo que puede ser clasificado con datos seminológicos (normo-, oligo-, azoospermia) y/o estructura testicular (SCOS, hipoespermatogénesis, arresto espermático) (Foresta y col., 2001b).

#### V.2.1.1. Población con antecedentes de infertilidad

Pacientes con antecedentes de infertilidad el médico los refiere que la causa puede ser factor masculino, se indica un estudio espermático (espermatobioscopía), si este resultado presenta algunos parámetros anormales, principalmente azoospermia (es decir ausencia de espermatozoides) y oligozoospermia (cuenta espermática disminuida) eran candidatos para el estudio de microdeleciones del cromosoma "Y". A individuos de está población que aceptaron, se les realizaron otros estudios para la valoración del hombre infértil como: análisis del semen (Anexo IV, y V), ultrasonido testicular (Anexo VI), perfil hormonal (Anexo VII) y cariotipo en sangre periférica (Anexo VIII)

#### V.2.1.2. Población sin antecedentes de infertilidad

Se seleccionó una población juvenil masculina universitaria de entre 18 y 25 años de edad que no contaban con antecedentes de infertilidad. Se realizaron visitas a diferentes facultades, en las que se impartió un seminario titulado: "Cromosoma Y, de la investigación básica a la aplicación clínica" en donde se les explicó de manera general en que consistía el estudio; y se les invitó a participar de manera voluntaria. Para ello, se les pidió una muestra de sangre periférica. Se les dió a leer y a firmar un consentimiento informado para darles a conocer por escrito sus derechos como participantes del proyecto, ver anexo 1. Los voluntarios llenaron un cuestionario en donde nos proporcionaron sus datos personales, así como sus antecedentes clínicos generales, ver anexo 2.

#### V.2.1.4. Venopunción (extracción de la sangre periférica)

Se extrajo la sangre de una vena de la parte interior del codo o la parte posterior de la mano. Se limpió el sitio de la punción con un antiséptico, en este caso alcohol del 96%; se colocó una banda elástica alrededor del antebrazo para aplicar presión y limitar el flujo sanguíneo a través de la vena, lo que permite su dilatación. Luego se introdujo una aguja en la vena y se recolectó la sangre en un tubo vacutainer con el anticoagulante K<sub>3</sub> EDTA con capacidad de 7 mL. Durante el procedimiento, se retiró la banda elástica para reestablecer la circulación. Una vez tomada la muestra, se rotuló el tubo con el nombre del participante, y se guardó en una caja para su fácil transportación, manteniéndose alejados de la luz y evitando cambios bruscos de temperatura.

### V.2.1.5. Registro de muestras

Al cuestionario y a la muestra de cada individuo le fue asignado un código para identificarlos y diferenciarlos como muestras únicas:

EY-00-00

MYQ-00-00

En donde:

EY: representa a los estudiantes que participan en el estudio de microdeleciones del cromosoma Y. MYQ: representa a los pacientes atendidos dentro de la clínica. Los primeros dos dígitos significan el número consecutivo que se le asignó a cada individuo. Los últimos dos dígitos significan el año en que se tomó la muestra. Estos datos se registraron en bitácoras en donde se tuvo el control de las muestras, así como sus datos personales.

### V.3. Extracción de DNA

#### V.3.1. Lisis celular

Para la extracción de las células nucleadas a partir de la sangre periférica que se obtuvo, podía separarse el mismo día por medio de centrifugación de 10 min a 3000 rpm o procesarse 24 horas después, permaneciendo la muestra a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo los componentes celulares se separan y en ambos casos se obtiene la capa de células blancas que se formó entre el plasma y el paquete globular (aproximadamente de 300  $\mu$ L a 500  $\mu$ L), depositando la muestra en tubo estéril de 2 mL. El procedimiento se realizó según el protocolo de extracción (BIORAD-Genomic DNA Blood Kit). La capa de células blancas se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se le adicionó la solución de Lisis RBC y se mezcló invirtiendo suavemente durante 10 minutos. A continuación

se centrifugó durante 1 min a 15,000 rpm. Se removió el sobrenadante con una pipeta, dejando una pastilla blanca. Se agitó vigorosamente para resuspender las células. Se adicionaron 300  $\mu$ L de una solución de lisis de DNA genómico y se resuspendieron las células cuidadosamente hasta homogenizar la muestra. Se incubó a 37°C por 30 min, invirtiendo ocasionalmente el tubo. A continuación se le adicionó 1.5  $\mu$ L de RNasa, se mezcló la muestra invirtiéndola (aproximadamente unas 25 veces). Después se incubó durante 60 min a 37°C.

### V.3.2. Precipitación de proteínas

Se enfrió la muestra durante 10 min a -20°C, posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ L de la solución de precipitación de proteínas y se agitó vigorosamente durante 20 seg, se centrifugó a 15,000 rpm por 3 min (si la pastilla no estaba bien compacta se repetía este paso adicionando la solución de precipitación de proteínas y refrigerándola durante otros 10 min).

### V.3.3. Precipitación del DNA

Del paso anterior se recupera el sobrenadante que contiene el DNA en un vial de 1.5 mL conteniendo 300  $\mu$ L de alcohol isopropílico al 100%, se mezcló la muestra invirtiendo gentilmente el tubo unas 20 veces. Se centrifugó a 15,000 por 1 min. Se quitó el sobrenadante invirtiendo el tubo e inmediatamente, se adicionó 300  $\mu$ L de alcohol etílico al 100% agitando el tubo para lavar el DNA. Se invirtió el tubo para decantar el alcohol etílico y se dejó en esta posición para que se secase la muestra (aproximadamente 10 min). Se adicionó de 200-400  $\mu$ L de solución de hidratación de DNA. Después se incubaron las muestras a 65°C por 5 min para acelerar el proceso de hidratación o se dejaban toda la noche a temperatura ambiente. En ambos procedimientos; las muestras posteriormente eran almacenadas a 4°C hasta su utilización.

#### V.4. Cuantificación del DNA

Una vez hidratada la muestra, se cuantificó en un espectrofotómetro, midiendo la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 260 nm para DNA. La dilución que se emplea es de 1:50. Considerando que una DO es igual a 50 µg de DNA/mL, la concentración de DNA fue calculada en base a la siguiente fórmula:  $DO_{260} \times 50 \times$  dilución. La relación de 260/280 debió ser  $> 1.8$ , indicándonos la pureza del DNA obtenido. Cada tubo debió ser rotulado con el número de caso y la fecha para poder identificarlos en cualquier momento. Por otra parte, el DNA se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% para verificar su integridad.

#### V.5. Reacción de PCR-múltiple

Se requirió de controles internos de la propia técnica. Uno de ellos fue la amplificación del gen *ZFX/ZFY*. Este gen se utilizó porque estos oligonucleótidos amplifican solamente un fragmento de DNA tanto femenino como masculino. Se contó con controles positivos y negativos que consisten en muestras de DNA de un hombre fértil y de una mujer, respectivamente. La muestra de DNA del hombre fértil, fue control para verificar la sensibilidad y la especificidad del ensayo. La muestra de DNA femenino nos indicó especificidad de los cebadores, así como contaminación de DNA de varón. Por otra parte, se requirió de un control en donde se utilicen los mismos reactivos y enzimas, solo que esta ocasión en lugar de DNA, fue reemplazado por agua. Ellos nos indicaron si tuvimos contaminación por DNA extraño en los suministros que utilizamos. Esta reacción se corrió con el mismo conjunto de reacciones (Simoni, 2004a; Simoni y col., 2004b).

Cuadro 4. Relación de parejas de oligonucleótidos utilizados para la detección de microdeleciones del cromosoma Y por PCR-múltiple.

STS	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño (pb)	Reacción
ZFY/ZFX	ZFY-F:5'-ACCRCTGTA CTGACTGTGATTACC-3' ZFY-R:5'-GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT-3'	495 pb	A y B
SRY	SRY-F:5'-GAATATTCCCGCTCTCCGGA-3 SRY-R:5'-GCTGGTGCTCCATTCTTGAG-3'	472 pb	
AZFa	sY84-F:5'-AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT-3' sY84-R:5'-GCCTACTACCTGGAGGCTTC-3'	320 pb	A
AZFb	sY127-F:5'-GGCTCACAAACGAAAAGAAA-3' sY127-R:5'-CTGCAGGCAGTAATAAGGGA-3'	400 pb	
AZFc	sY254-F:5'-GGGTGTTACCAGAAGGCCAAA-3' sY254-R:5'-GAACCGTATCTACCAAAGCAGCAGC-3	126 pb	
AZFa	sY86-F:5'-GTGACACACAGACTATGTTT C -3' sY86-R:5'-ACACACAGAGGGACAACCCT-3'	274 pb	B
AZFb	sY134-F:5'-GTCTGCCTCACCATAAAAGT-3' sY134-R:5'-ACCACTGCCAAA ACT TTCAA-3'	301 pb	
AZFc	sY255-F:5'-GTTACAGGATTCGGCTGTAT-3' sY255-R:5'-CTCGTCATGTGCAGCCAC-3	126 pb	

La reacción de PCR-múltiple se realizó en condiciones estériles y todo el proceso se llevó a cabo en la campana para PCR, la cual antes de iniciar el procedimiento permaneció de 5 a 10 minutos con la lámpara de luz UV prendida, junto con todo el material que fue utilizado para esta metodología (micropipetas, puntas para micropipetas, viales de varios tamaños, gradilla, agua, microcentrífuga, marcador indeleble). La manipulación de la muestra dentro de esta campana tuvo que ser con guantes estériles que a su vez eran abiertos dentro de esta. La reacción de amplificación del DNA se realizó en un volumen final (vf) de 25  $\mu$ L, en donde el volumen del agua y de la muestra es variable de acuerdo a la concentración

obtenida de cada muestra. En el cuadro 4, se presentan las concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados para cada reacción.

Cuadro 5. Relación de reactivos para la reacción de PCR-múltiple para la detección de microdeleciones del cromosoma Y. \*=volumen a determinar en cada muestra (Simoni y col., 2004).

MULTIPLE A		MULTIPLE B	
Reactivo	Concentración	Reactivo	Concentración
Agua	*	Agua	*
dNTPs	1.5 mM	dNTPs	1.5 mM
Buffer	1X	Buffer	1X
MgCl <sub>2</sub>	6.7 mM	MgCl <sub>2</sub>	6.7 mM
Taq	2 U	Taq	2 U
ZFY	2 μM	ZFY	2 μM
SRY	2μM	SRY	2μM
sY127(AZFa)	2μM	sY86(AZFa)	2μM
sY84(AZFb)	2μM	sY134(AZFb)	2μM
sY254(AZFc)	2μM	sY255(AZFc)	2μM
DNA	200ng	DNA	200ng

La reacción de PCR se realiza además del DNA del paciente con los siguientes tres controles: a) DNA de mujer, b) DNA de un varón fértil y c) agua.

#### V.6. Condiciones de amplificación

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: comenzó una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 27 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C por 1 minuto y una extensión de 72°C por 3 min y dejando las muestras a 4°C. Estas condiciones fueron para el termociclador modelo Mastercycler eppgradient (eppendorf). El equipo permanece en un área restringida y separada de las demás para evitar posible contaminación. El

transporte de los tubos debió manejarse con guantes. Una vez terminada la reacción de PCR, las muestras fueron almacenadas a 4°C.

#### V.7. Análisis de la muestra (electroforesis de DNA)

Para el análisis de los fragmentos amplificados, se utilizaron 15 µl de la muestra obtenida por PCR y se cargaron en un gel de agarosa al 2.5% conteniendo TBE 0.5X y bromuro de etidio (5 mg/mL). La electroforesis se llevó a cabo en los primeros 20 minutos a 100 V y después a 80 V durante 2 horas. Una vez que la muestra se corrió en el gel, se analizó el DNA por medio de un transiluminador de luz UV y se capturó la imagen, la cual fue procesada en un software especializado (Quantity One 1-D analysis Software) para analizar los fragmentos de DNA que esperábamos; en este estudio debieron ser 5 para cada múltiple (A y B).

#### V.8. Entrega de resultados

Los resultados para pacientes con antecedentes de infertilidad fueron un original para el interesado y una copia para el expediente clínico. Los resultados para la población juvenil se entregaron de manera personal en sobres cerrados. Por otra parte, el laboratorio cuenta con un respaldo de los resultados tanto impreso como digital.

## VI. RESULTADOS

### VI.1. Detección de Microdeleciones en la población con antecedentes de infertilidad

Los resultados que se obtuvieron en este estudio fueron de una población de 102 varones con antecedentes de infertilidad, presentando una espermatobioscopía alterada con oligozoospermia o azoospermia, que fueron atendidos en Médica Fértil, en el período de enero del 2004 a mayo del 2007. Esta población se encontraba en un rango de edad entre 19 a 53 años. Para este estudio se eliminaron a los pacientes que presentaron un cariotipo alterado (cambios estructurales y/o numéricos).

El estudio de microdeleciones del cromosoma Y, fue realizado por medio de la técnica PCR-múltiple, y todas las muestras de DNA fueron analizadas a la par con controles negativos (DNA femenino) y positivos (DNA masculino), así como un control interno para la reacción denominado blanco de agua (libre de DNAasas y RNAasas). En la figura 8 se muestra la amplificación de las muestras de controles negativos y positivos, así como el control interno de la reacción denominado blanco, los carriles 1, 2, 3, 4, 5 y 6 son pacientes con antecedentes de infertilidad, a los cuáles por medio de DNA genómico fueron identificadas tres regiones del cromosoma Y (AZFa, AZFb y AZFc). Los productos de amplificación obtenidos por PCR y analizados en un gel de agarosa que se muestran en los carriles 1, 2, 3, 4, 5 y 6 son pacientes que presentan los fragmentos esperadas para la Múltiple A: SRY=472 pb, ZFY=495 pb, AZFa=320 pb, AZFb=274 pb y AZFc=400 pb; para la Múltiple B: SRY=472 pb, ZFY=495 pb, AZFa=301 pb, AZFb=326 pb y AZFc=126 pb. Los productos de amplificación obtenidos por PCR y analizados en un gel de agarosa muestran los fragmentos esperados en la amplificación dirigida a diferentes STS del cromosoma Y. Todas las muestras de pacientes que se observa en la figura 8 presentaron amplificación para las tres regiones AZF al igual que las regiones de los genes SRY y ZFY.

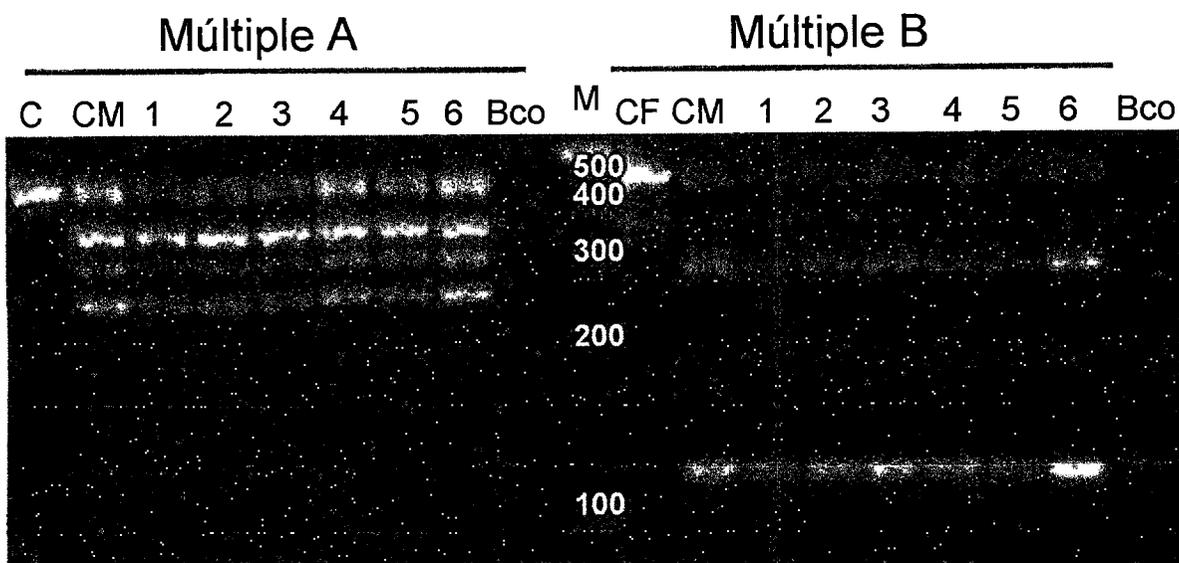


Figura 8. Productos amplificados de una PCR-múltiple (normales) analizado en un gel de agarosa al 2.5% por electroforesis identificando los siguientes genes: ZFY, SRY, AZFa, AZFb y AZFc; pb= pares de bases, M=Marcador de peso molecular, CF= Control Femenino, CM= Control Masculino.

En la figura 9 se amplificaron las muestras de controles negativos y positivos, así como el blanco para descartar contaminación de DNA. Los carriles 1, 2, 3 y 4, son pacientes con antecedentes de infertilidad, a los cuales por medio de DNA genómico se les identificaron las regiones específicas del cromosoma Y. La muestra que se encuentra en el carril 3, no presenta las bandas esperadas para la región AZFc en ninguna de las dos reacciones (A y B), indicándonos que este paciente presenta una microdelección de la región AZFc (evidenciada con una flecha en la figura 9). El blanco demuestra que no existe contaminación con DNA contaminante.

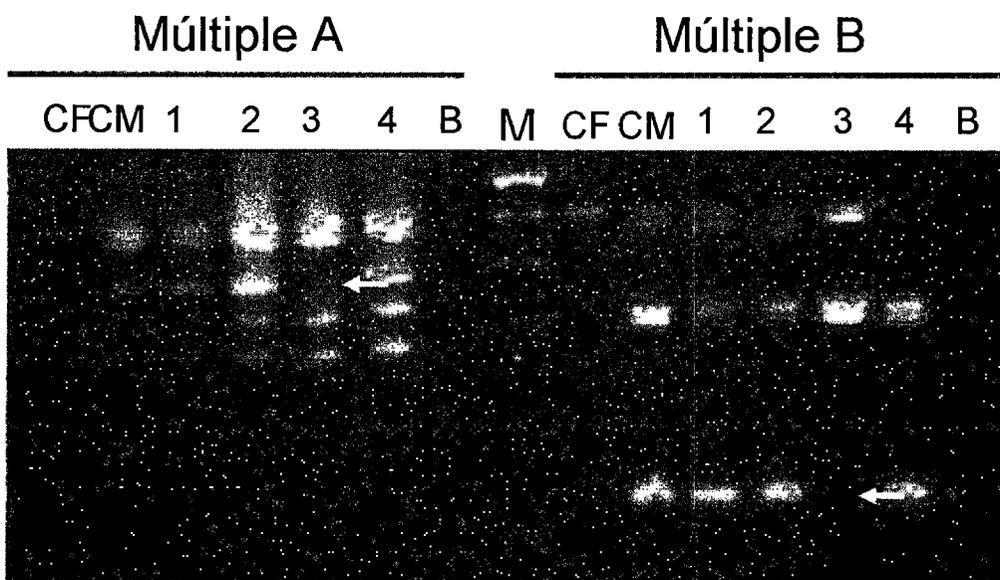


Figura 9. Productos amplificados de una PCR-múltiple (paciente deletado) analizado en un gel de agarosa al 2.5% por electroforesis identificando a los siguientes genes: ZFY, SRY, AZFa, AZFb y AZFc. La flecha indica la ausencia de la región AZFc en la reacción A y B. pb=Pares de bases, M=Marcador de peso molecular, CF=Control Femenino, CM=Control Masculino, carril 1 (MYQ24-07), 2 (MYQ25-07), 3 (MYQ22-07), 4 (MYQ17-07) y Bco=blanco.

En el cuadro 6, se muestran los resultados obtenidos del estudio de microdeleciones del cromosoma Y, así como la edad de cada paciente. Los casos que se encuentran en negro, son aquellos pacientes que en el estudio de microdeleciones del cromosoma Y, su resultado fue normal, a pesar de tener una espermatobioscopía alterada. Los casos que se encuentran en azul, son aquellos pacientes que en el estudio de microdeleciones su resultado presentó una o más regiones deletadas (esta diferenciación de pacientes se presentara de igual manera en tablas posteriores).

Cuadro 6. Resultados obtenidos de microdeleciones del cromosoma Y en pacientes con antecedentes de infertilidad.

Nº	Caso	Edad	Resultados de Microdeleciones	Nº	Caso	Edad	Resultados de microdeleciones
1	MY0104	32	NORMAL	44	MYQ0505	29	NORMAL
2	MY0304	32	NORMAL	45	MYQ0605	22	NORMAL
3	MY0404	30	AZFc ausente	46	MYQ0705	24	AZFc ausente
4	MY0504	30	NORMAL	47	MYQ0905	32	NORMAL
5	MY0604	28	NORMAL	48	MYQ1105	32	NORMAL
6	MY0704	38	NORMAL	49	MYQ1205	41	NORMAL
7	MY0804	33	NORMAL	50	MYQ1305	40	NORMAL
8	MY1004	34	AZFc ausente	51	MYQ1405	44	NORMAL
9	MY1204	38	NORMAL	52	MYQ1605	52	NORMAL
10	MY1303	46	NORMAL	53	MYQ1705	36	NORMAL
11	MY1504	25	NORMAL	54	MYQ1805	41	NORMAL
12	MY1604	38	NORMAL	55	MYQ1905	36	NORMAL
13	MY1704	26	NORMAL	56	MYQ2005	34	NORMAL
14	MY1804	32	NORMAL	57	MYQ2105	32	NORMAL
15	MY1904	44	NORMAL	58	MYQ2205	46	NORMAL
16	MY2004	34	NORMAL	59	MYQ2305	38	NORMAL
17	MY2204	36	AZFc ausente	60	MYQ2405	47	NORMAL
18	MY2304	45	NORMAL	61	MYQ2505	33	NORMAL
19	MY2404	45	NORMAL	62	MYQ2605	47	NORMAL
20	MY2504	45	NORMAL	63	MYQ2705	30	NORMAL
21	MY2604	26	NORMAL	64	MYQ2805	36	NORMAL
22	MY2704	24	NORMAL	65	MYQ2905	31	NORMAL
23	MY2904	35	NORMAL	66	MYQ3005	36	NORMAL
24	MY3104	31	NORMAL	67	MYQ0106	43	NORMAL
25	MY3204	25	NORMAL	68	MYQ0306	40	AZFc ausente
26	MY3304	33	NORMAL	69	MYQ0406	34	NORMAL
27	MY3504	30	NORMAL	70	MYQ0506	38	NORMAL
28	MY3604	35	NORMAL	71	MYQ0606	36	NORMAL
29	MY3804	27	NORMAL	72	MYQ0806	34	NORMAL
30	MY4004	29	NORMAL	73	MYQ0906	38	NORMAL
31	MY4104	38	NORMAL	74	MYQ1006	35	NORMAL
32	MY4204	50	NORMAL	75	MYQ1106	31	NORMAL
33	MY4304	35	NORMAL	76	MYQ1306	41	NORMAL
34	MY0105	50	NORMAL	77	MYQ1406	28	NORMAL
35	MY0205	34	NORMAL	78	MYQ1506	41	NORMAL
36	MY0505	27	NORMAL	79	MYQ1706	32	NORMAL
37	MY0605	29	NORMAL	80	MYQ2006	34	NORMAL
38	MY0705	34	NORMAL	81	MYQ2106	32	NORMAL
39	MY0805	31	NORMAL	82	MYQ2206	29	NORMAL
40	MY1005	30	NORMAL	83	MYQ2306	29	NORMAL
41	MYQ0105	29	NORMAL	84	MYQ2406	33	NORMAL
42	MYQ0205	34	NORMAL	85	MYQ2506	32	NORMAL
43	MYQ0405	33	NORMAL	86	MYQ2706	32	NORMAL

Cuadro 6. Resultados obtenidos de microdeleciones del cromosoma Y en pacientes con antecedentes de infertilidad.

No	Caso	Edad	Resultados de Microdeleciones	No	Caso	Edad	Resultados de Microdeleciones
87	MYQ2806	23	AZFc ausente	95	MYQ1107	42	NORMAL
88	MYQ0207	34	NORMAL	96	MYQ1207	25	AZFc ausente
89	MYQ0407	38	NORMAL	97	MYQ1607	32	NORMAL
90	MYQ0507	30	NORMAL	98	MYQ1807	53	NORMAL
91	MYQ0607	33	NORMAL	99	MYQ1907	26	AZFc ausente
92	MYQ0707	28	NORMAL	100	MYQ2007	41	NORMAL
93	MYQ0807	32	NORMAL	101	MYQ2107	48	NORMAL
94	MYQ0907	30	NORMAL	102	MYQ2207	30	NORMAL

V.1.1. Incidencia de microdeleciones del cromosoma Y en pacientes con problemas de infertilidad

En pacientes con antecedentes de infertilidad, presentando un diagnóstico de espermatobioscopia alterada (oligozoospermia y azoospermia), evidenciamos que nueve (8.8%), presentaban la deleción de una región, figura 10.

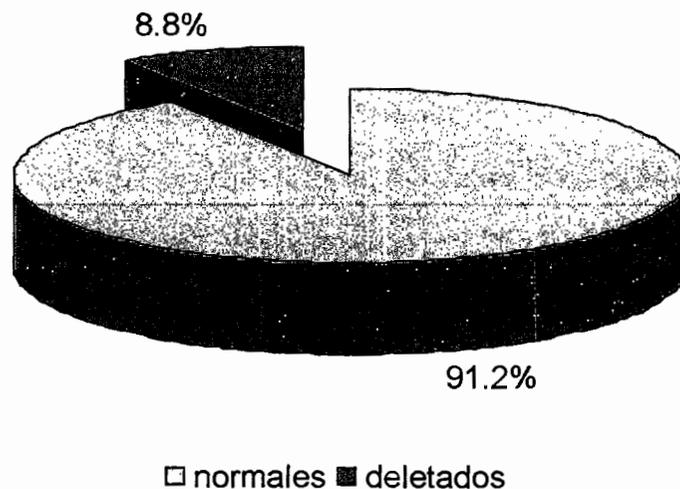


Figura 10. Incidencia de las microdeleciones del Cromosoma Y, en una población del bajo del país con antecedentes de infertilidad.

En todos los pacientes se presentó solo la delección de la región AZF, figura 11.

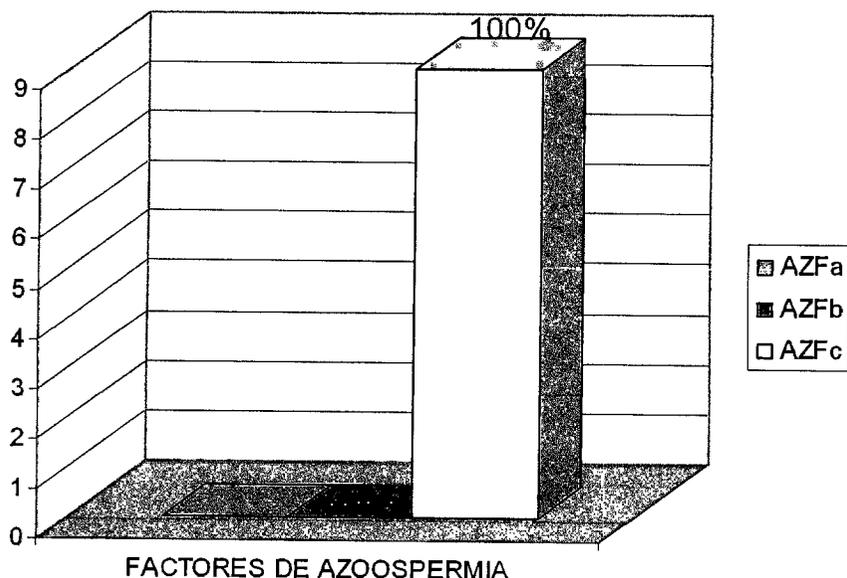


Figura 11. Frecuencia de las microdeleciones del cromosoma Y en la población del bajo

En el anexo IX, se presenta una tabla en donde se concentran los resultados de los individuos a los que se les hicieron los estudios de espermatobioscopia, ultrasonido testicular, perfil hormonal y cariotipo en sangre periférica, datos que son necesarios para la valoración del hombre infértil y que permitirá al médico dar una asesoría específica a la pareja y así poder decidir sobre la mejor técnica de reproducción asistida.

#### VI.2. Detección de Microdeleciones en la población sin antecedentes de infertilidad.

La segunda población fueron individuos voluntarios a los cuales se les realizó la detección de microdeleciones del cromosoma Y, el rango de edad que se determinó como adultos jóvenes fue de 18 a 25 años, ninguno presentaba antecedentes de infertilidad. Las muestras fueron recolectadas y procesadas durante el período de

octubre del 2005 a enero del 2007. El estudio de microdeleciones del cromosoma Y se realizó también por la técnica de PCR-múltiple a partir del DNA genómico. Todas las muestras se analizaron con sus respectivos controles. En la Figura 12 se presentan cinco muestras representativas de esta población analizando a los cinco genes: ZFY, SRY, AZFa, AZFb y AZFc.

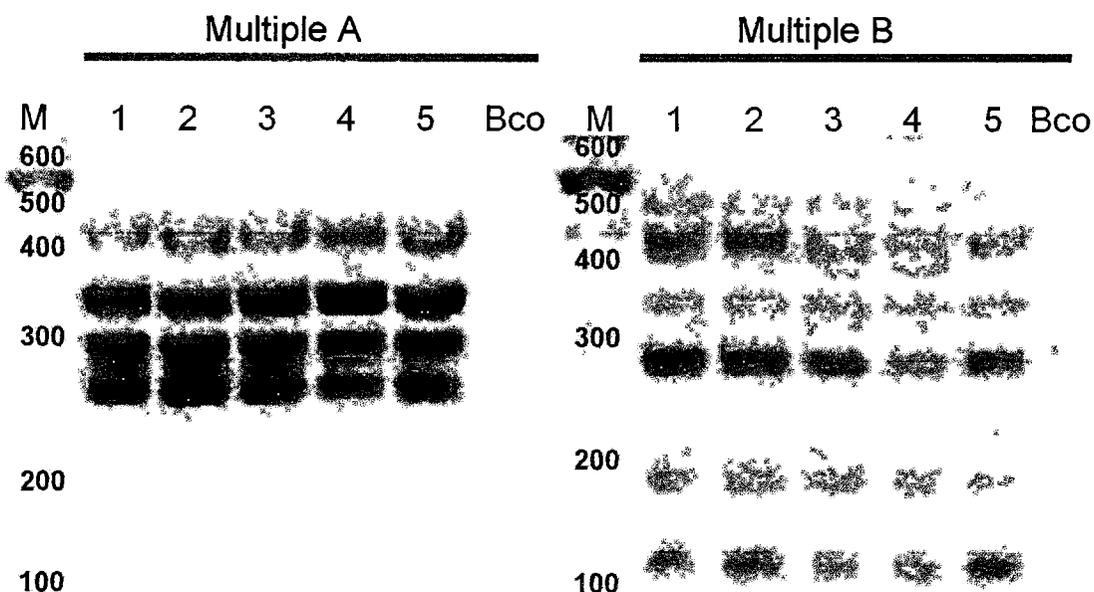


Figura 12. Productos amplificados de una PCR-múltiple (población juvenil). Electroforesis de un gel de agarosa al 2.5% de los productos de PCR obtenidos a partir de DNA genómico de una población juvenil, identificando los siguientes genes: ZFY, SRY, AZFa, AZFb y AZFc; pb= pares de bases, M=Marcador de peso molecular.

A continuación, en el cuadro 6 se concentran los resultados de la población sin antecedentes de infertilidad quienes no presentan microdeleciones de cromosoma Y, por medio de esta metodología.

Cuadro 7. Resultados de la detección de microdeleciones del cromosoma Y en la población sin antecedentes de infertilidad (controles).

Caso	Resultado	Caso	Resultado
EY-01-05	Normal	EY-42-05	Normal
EY-02-05	Normal	EY-43-05	Normal
EY-03-05	Normal	EY-44-05	Normal
EY-04-05	Normal	EY-45-05	Normal
EY-05-05	Normal	EY-46-05	Normal
EY-06-05	Normal	EY-47-05	Normal
EY-07-05	Normal	EY-48-05	Normal
EY-08-05	Normal	EY-49-05	Normal
EY-09-05	Normal	EY-50-05	Normal
EY-10-05	Normal	EY-51-05	Normal
EY-11-05	Normal	EY-52-05	Normal
EY-12-05	Normal	EY-53-05	Normal
EY-13-05	Normal	EY-54-05	Normal
EY-14-05	Normal	EY-55-05	Normal
EY-15-05	Normal	EY-56-05	Normal
EY-16-05	Normal	EY-57-05	Normal
EY-17-05	Normal	EY-58-05	Normal
EY-18-05	Normal	EY-59-05	Normal
EY-19-05	Normal	EY-60-05	Normal
EY-20-05	Normal	EY-61-05	Normal
EY-21-05	Normal	EY-62-05	Normal
EY-22-05	Normal	EY-63-05	Normal
EY-23-05	Normal	EY-64-05	Normal
EY-24-05	Normal	EY-65-05	Normal
EY-25-05	Normal	EY-66-05	Normal
EY-26-05	Normal	EY-67-05	Normal
EY-27-05	Normal	EY-68-05	Normal
EY-28-05	Normal	EY-69-05	Normal
EY-29-05	Normal	EY-70-05	Normal
EY-30-05	Normal	EY-71-05	Normal
EY-31-05	Normal	EY-72-05	Normal
EY-32-05	Normal	EY-73-05	Normal
EY-33-05	Normal	EY-74-05	Normal
EY-34-05	Normal	EY-75-06	Normal
EY-35-05	Normal	EY-76-06	Normal
EY-36-05	Normal	EY-77-06	Normal
EY-37-05	Normal	EY-78-06	Normal
EY-38-05	Normal	EY-79-06	Normal
EY-39-05	Normal	EY-80-06	Normal
EY-40-05	Normal	EY-81-06	Normal
EY-41-05	Normal	EY-82-07	Normal

## VII. DISCUSIÓN

Nuestra población con antecedentes de infertilidad presentó microdeleciones del cromosoma Y en el 8.8% (9/102). Lo contrario de nuestra población general (sin antecedentes de infertilidad) en los cuales se amplificaron todos los fragmentos de PCR esperados con los oligonucleótidos dirigidos contra genes y/o marcadores localizados en regiones específicas del cromosoma Y. Estos datos refuerzan lo publicado por otros autores quienes tampoco detectan la ausencia de estas regiones en hombres fértiles (Tournaye y col., 1997 y Foresta y col., 2001a).

Una de las causas más frecuentes de infertilidad en el varón, es debido a las alteraciones en la producción de espermatozoides (Mitra y col., 2006). El factor genético más relacionado es debido a la ausencia de algunos genes, los cuales pueden ser identificados mediante el estudio de microdeleciones del cromosoma Y. Su incidencia oscila entre el 1% al 55%, reflejando el amplio criterio médico para la realización de este estudio (Forti y Krausz, 1998; Foresta y col., 2001a; Foresta y col., 2001b; Rolf y col., 2002; Krausz y col., 2003 y Tomassi y col., 2003). Este rango de incidencia es muy amplio, pero de acuerdo a lo publicado con varios autores el criterio de exclusión para la realización de este estudio, es para aquellos pacientes que presentaron problemas de infertilidad debido a alteraciones en la espermatogénesis, azoospermia u oligozoospermia, reduciendo así el rango de incidencia (3% a 28%), debido a que el estudio está dirigido a una población más específica (Tournaye y col., 1997), ver Figura 13. Esta misma figura muestra de manera más clara la variabilidad de la incidencia de microdeleciones dependiendo de la región de la población en donde se realizó el estudio.

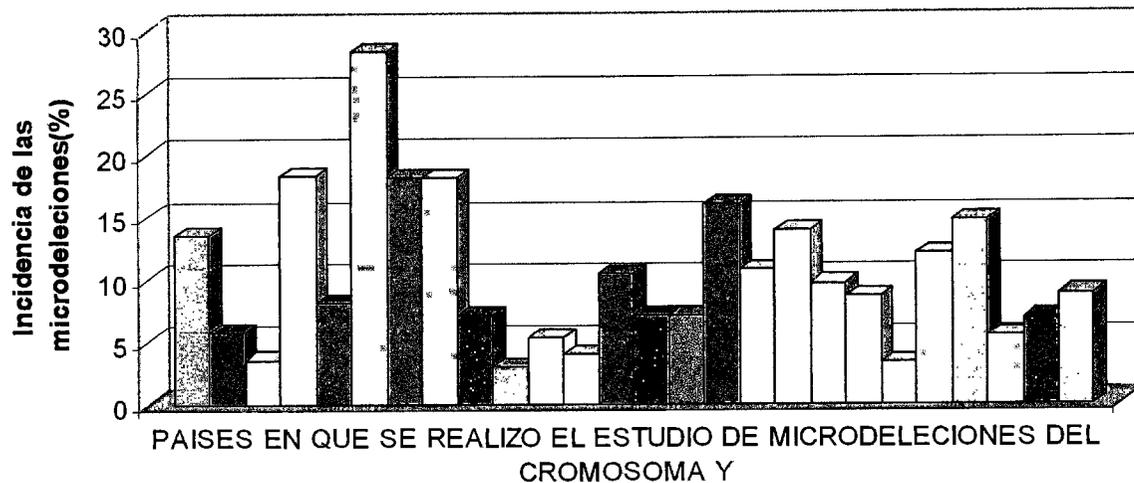


Figura 13. Países en que se realizó el estudio de microdeleciones del cromosoma Y. Comparación de la incidencia de las microdeleciones del cromosoma Y, en varios estudios revisados en la literatura científica: ■ Reijo y col., 1995, USA, ■ Reijo y col., 19996, USA, Vogt y col., 1996, Alemania, Najmabadi y col., 1996, California, ■ Qureshi y col., 1996, Escocia, ■ Foresta y col., 1996, Italia, ■ Stupia y col., 1996, Italia, ■ Kent-First, y col., 1996, Inglaterra, ■ Pryor y col., 1997, Minnesota, ■ Simoni y col., 1997, Alemania, ■ Kremer y col., 1997, Países Bajos, ■ Tornaye y col., 1997, Bélgica, ■ Seifer y col., 1997, Francia, ■ Krausz y col., 1999, Francia, ■ Martínez y col., 2000, España, ■ Yao y col., 2001, China, ■ Shimizu y col., 2002, Japón, Calleja y col., 2003, México, ■ Dada y col., 2003, India, ■ Thangaraj y col., 2003, India, ■ Sargin y col., 2004, Turquía, ■ Awady y col., 2004, Egipto, ■ Song y col., 2006, Ristanovic y col., 2007, Serbia, ■ Rejeb y col., 2007, Túnez, ■ Resultados de este trabajo, GENÉDICA, 2008 (trabajo presentado en XXXII AMGH, Oaxaca, 2007, Anexos X y XI).

Se ha observado que la incidencia de microdeleciones es más alta en pacientes con azoospermia, en comparación con los que presentan una cuenta espermática disminuida (oligozoospermia). El estudio realizado por Krausz y col., 2003 con una población europea con un total 250 pacientes con oligozoospermia y azoospermia, presentando mayor cantidad de microdeleciones en pacientes azoospermicos. Nuestros resultados coinciden con los reportes anteriores, evidenciando en nuestra población la relación que existe entre una espermátobioscopía alterada y microdeleciones del cromosoma Y (Cuadro 8).

Cuadro 8. Clasificación de la población con antecedentes de infertilidad de acuerdo a la concentración espermática y deleción del cromosoma "Y".

	CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA		Otros
	Azoospermia	Oligozoospermia	
sin deleción	36/102(38.7%)	36/102(38.7%)	21/102(22.6%)
deletados	5/9(55.6%)	4/9(44.4%)	0

Los pacientes que mostraron microdeleción, la mayoría de ellos presentan azoospermia en un 55.6%, y los oligozoospermicos en un 44.4%. En estos pacientes con la identificación de deleción en el cromosoma Y, nos permitió asociar la ausencia de está región como agente etiológico de la infertilidad en estos varones

Los demás pacientes con análisis del semen alterado y sin deleciones puede asociarse a causas genéticas como la ausencia bilateral de vasos deferentes, CBAVD, (congenital bilateral absecens of the vas deferens), que es caracterizado por la variable regresión en diferentes secciones del epidídimo, esta alteración se presenta en pacientes azoospermicos. Se ha asociado la CBAVD con mutaciones del gen regulador del conductor transmembrana, de fibrosis quística, CF (Cystic Fibrosis) (Huynh y col., 2002; Shin y col; 1997). Otra causa genética asociada a espermatogénesis deficiente, puede deberse a la mutación del gen receptor de andrógenos (receptor androgen gen), localizado en Xq11.1 (Martínez y col., 2008). Entre otras causas genéticas se ha reportado la ausencia del gen elemento modulador de respuesta de cAMP, CREM gene (cAMP-responsive element gene) como responsable de una inadecuada espermatogénesis (Tournaye y col., 1997).

En cuanto a los pacientes que presentan otro tipo de alteraciones en la espermatobioscopía, como morfología, movilidad y volumen de eyaculado, 21/93 (22.6%), no se evidenciaron microdeleciones del cromosoma Y, esto también

coincide con reportes previos que evalúan estos parámetros para observar alguna correlación con microdeleciones del cromosoma Y (Foresta y col., 2001; Strauss y Barbieri, 2004).

De las tres regiones delatadas del cromosoma Y, la deleción que ocurre con mayor frecuencia se presenta en la región AZFc. Los padres de pacientes con microdeleciones no presentan esta alteración, sugiriendo así que las microdeleciones se originan en la línea germinal del padre o que las microdeleciones sean originadas *de novo*, siendo está, la causa mas común que se ha reportado en 1 de 4000 varones, debido a la susceptibilidad del material genético del cromosoma Y, dándose la deleción durante la recombinación de la región no recombinante (Foresta y col., 2001b, Kuroda-Kawaguchi y col., 2001, Vogt, 2005), por lo tanto el futuro hijo carecerá de la misma región deletada. Por otra parte, se han reportado microdeleciones en hombres fértiles, siendo estas pequeñas. Esta deleción puede ser transmitida a la progenie masculina siendo del mismo tamaño o más grande, causando en los hijos fenotipos diferentes (oligozoospermia y azoospermia), (Chang y col., 1999; Foresta y col., 2001; Kuhnert y col., 2004 y Silber y Repping, 2002). En este estudio se reportó un caso familiar en donde tres integrantes (hermanos), se sometieron al estudio de microdeleciones del cromosoma Y, y todos ellos, presentaron la deleción de la región AZFc y un cariotipo normal, a excepción de uno de ellos que presento Síndrome de Klinefelter (casos MYQ2606, MYQ1207 y MYQ1307). Nosotros sugerimos que la deleción de los miembros varones de esta familia fue heredado, en estos casos sería ideal hacer el estudio al padre, pero desafortunadamente en este caso familiar la persona estaba finada.

De acuerdo a los resultados arrojados en este estudio, el 100% de los pacientes que presentan deleción es de la región AZFc. Nuestros datos coinciden con lo reportado en la literatura internacional, en donde pudimos evidenciar que la región AZFc es la que presenta mayor incidencia en nuestra población de estudio de la

región del bajo. En un estudio realizado en una clínica privada en León, Guanajuato emplearon 18 sitios de secuencia marcada, reportando microdeleciones de las regiones AZFb, AZFc y AZFd, en un 13.9%(5/36) en pacientes azoospermicos (Calleja y col., 2003).

Los parámetros clínicos que presentan los individuos con microdeleciones del cromosoma Y, son variables, los que se han relacionado con mayor frecuencia debido a la correlación con la reproducción, es la concentración espermática disminuida, volumen testicular disminuido y altos niveles de Hormona Folículo Estimulante (FSH) en plasma (Forti y Krausz, 1998; Foresta y col., 2001b, Frydelund-Larsen y col., 2002; Krausz y col., 2003).

Nosotros no pudimos realizar una correlación de FSH y microdeleciones, ya que a solo el 24.7% de nuestra población de estudio se les realizó el perfil hormonal. Dentro de esta población, seis de ellos presentó microdelección de alguna región y dos de ellos tienen esta hormona ligeramente elevada. En un estudio realizado con pacientes con infertilidad idiopática y con varones con microdeleciones, no se encuentra diferencia significativa en los niveles de FSH (Tomassi y col., 2003). Nosotros, al igual que Tomassi, sugerimos que los genes del cromosoma Y que están deletados, provocan alteración en la espermatogénesis, causando infertilidad, ya que la expresión de estos genes se limita en las células germinales.

La evaluación del volumen testicular es importante en la valoración del hombre infértil, ya que es sabido que el 85% del volumen testicular, es ocupado por las células germinales masculinas (Carlsen y col., 2000). En los testículos, existen zonas en donde la producción de espermias es normal, en comparación con otras regiones testiculares donde se presenta, solamente células de Sertoli o arresto espermático (Friedler y col., 1997).

El volumen testicular promedio es de 15-25 cc (Mendoza, 2008). La disminución de este generalmente indica un daño en la producción de espermatozoides (Forti y Krausz, 1998).

En el Cuadro 9, presentamos una relación entre volumen testicular y ausencia o presencia de regiones AZF, los datos presentados en esta tabla, no nos permiten hacer una correlación entre el volumen testicular y las microdeleciones, ya que tanto pacientes que no presentan microdeleciones, también presentan una disminución en el volumen testicular. En la población de varones atendidos en la clínica, el volumen testicular es un indicativo de fallo en la espermatogénesis, pero nosotros sugerimos que no es un parámetro para determinar la presencia de espermatozoides en el testículo, ya que el paciente MYQ22-07 a pesar de tener un volumen de casi un 50% menor al de un individuo normal, tiene espermatozoides en el eyaculado.

Cuadro 9. Relación de volumen testicular en pacientes con y sin deleciones del cromosoma Y.

Caso	VOLUMEN TESTICULAR		Microdeleciones del cromosoma Y	EBD
	derecho (cc)	izquierdo (cc)		
MY18-04	4.2	3.2	Normal	azoospermia
MY27-04	6.5	6.1	Normal	azoospermia
MYQ03-06	3.5	3.1	Microdelección de AZFc	azoospermia
MYQ14-06	11.8	15.9	Normal	oligozoospermia
MYQ28-06	9.8	9.3	Microdelección de AZFc	azoospermia
MYQ04-07	17.1	16.8	Normal	oligozoospermia
MYQ12-07	10.7	10.7	Microdelección de AZFc	azoospermia
MYQ22-07	8.4	6.3	Microdelección de AZFc	oligozoospermia

Es importante sugerir al medico tratante realizar el estudio de microdeleciones del cromosoma Y, en pacientes con espermatobioscopía alterada, ya que este estudio de las microdeleciones puede ser una herramienta complementaria a los demás estudios para la valoración del hombre infértil (perfil hormonal y volumen testicular) y nos puede ayudar a determinar la presencia o no de espermatozoides en los

testículos antes de que el paciente sea sometido a una biopsia testicular, en particular con los pacientes azoospermicos con deleción de la región AZFc, un porcentaje elevado (58%) de ellos presenta hipoespermatogenesis severa en tejido testicular (Foresta y col, 2001a). Por ello se recomienda realizar el estudio de microdeleciones a pacientes con oligozoospermia y azoospermia, ya que el estudio tiene un valor pronóstico y predictivo. La ausencia de la región AZFc esta asociada con un fenotipo variable que puede ser hipospermatogenésis, oligozoospermia, SCOS entre otros. Una posible explicación para los variables fenotipos, es una regresión progresiva del epitelio germinal, la cual ha sido reportada en pacientes con deleciones de AZFc (Krausz y col., 2003). Portadores con esta deleción y presentando oligozoospermia es recomendable la criopreservación de espermias con el fin de evitarse usar técnicas invasivas tales como Biopsia Testicular con Extracción de Espermias (TESE, TEsticular Biopsy and Sperm Extraction) (Krausz y col., 2003, Strauss y Barbieri, 2004). Espermatozoides de pacientes con microdeleciones de la región AZFc en el cromosoma Y se pueden utilizar para procedimientos como FIV o ICSI. Después de la fertilización, la deleción en el Cromosoma Y es transmitido a la progenie masculina. El fenotipo de la siguiente generación puede variar substancialmente y al extenderse la falla espermática no se puede predecir por completo, (Krausz y col., 2003 y Kurinczuk, 2003).

En hombres azoospermicos, la presencia de una deleción completa de AZFa esta correlacionado con SCOS (Blanco y col., 2000) y con quienes AZFb, ya que la deleción de esta región esta relacionado con arresto espermático (Cooke, 1999; Krausz y col., 2003), tiene pronóstico negativo para una recuperación de espermia testicular. Pacientes que presentan las deleciones de estas ultimas dos regiones mencionadas, es recomendable sugerir donación de espermias (semen de donante).

De acuerdo a lo discutido anteriormente, el algoritmo propuesto en el estudio del hombre infértil, es el que a continuación se presenta.

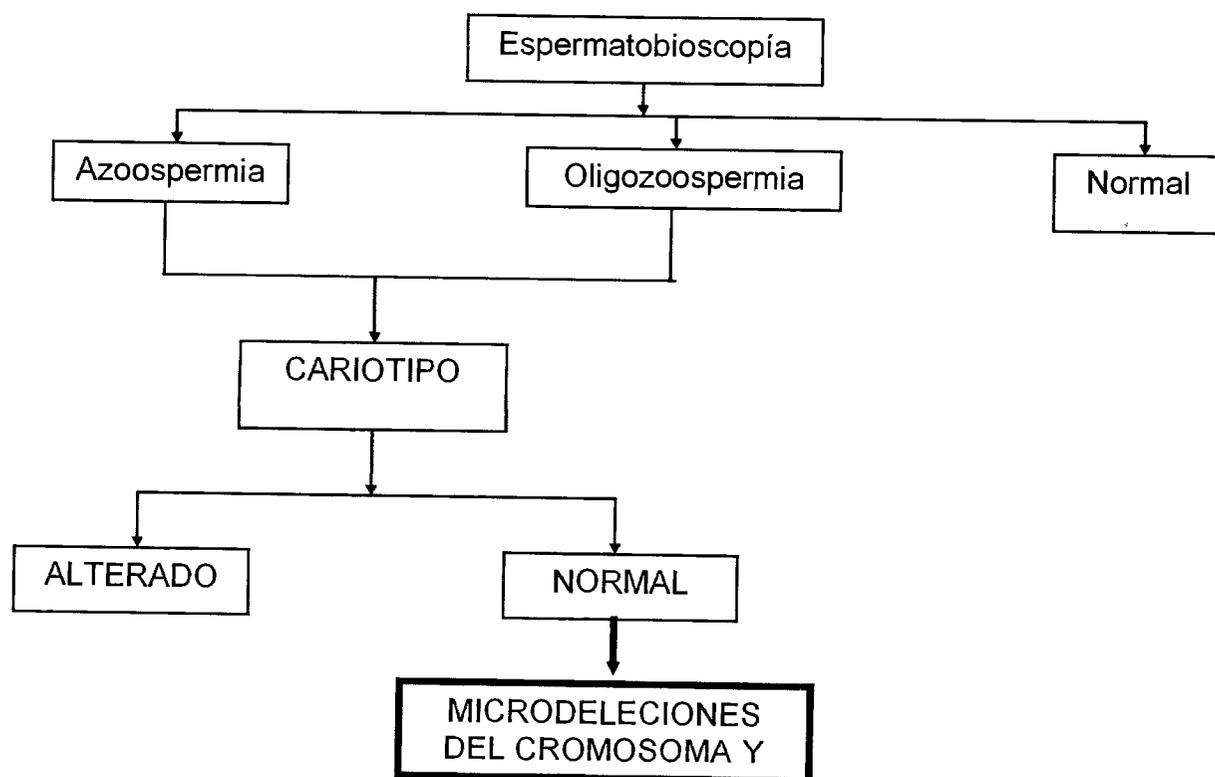


Figura 14. Algoritmo para la valoración del varón infértil en el Instituto Médica Fértil.

Este estudio abre nuevas posibilidades de diagnosticar a la pareja infértil, el cual permite determinar el agente etiológico además de tener un valor diagnóstico y pronóstico. Por otra parte, nos permitió conocer que AZFc región más deletada es, por lo tanto podríamos sugerir en un futuro tener más marcadores y el fenotipo más común que podamos encontrar en los pacientes, en particular para el porcentaje de pacientes con la delección de la región AZFc, que aunque bajo, después de una intervención de biopsia testicular no se encuentran espermatozoides, quizá entre más marcadores podamos establecer una relación entre los diferentes marcadores localizados en el brazo largo del cromosoma Y.

## **VIII. CONCLUSIONES**

La incidencia de microdeleciones del cromosoma Y es mayor en pacientes que presentan antecedentes de infertilidad, en comparación con quienes no presentan este tipo de antecedentes.

Las microdeleciones del cromosoma Y se presentan en pacientes con azoospermia y en menor proporción en individuos que tienen una cuenta espermática disminuida.

La región del cromosoma Y que se deletó con mayor frecuencia en nuestra población fue la región AZFc.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aitken, R.J., Aribag, A., Gopalkrishnan, kK., Hamilton D.W., Katz, D.F., Mortimer, D., Nieschlag, E., Kigendu, C., Wang, C., Yeung C.H., Waites, G.M.H. 1998.** WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University. 3a edición .56-90.
- Awady, MK., El Shater, SF., Ragaa, E., Atef, K., Shaheen, IM., Megiud, NA. 2004.** Molecular study on Y chromosome microdeletions Egyptian males with idiopathic infertility. *Ann Genet.* Vol.47(1):61-68.
- Blanco, P., Sclumukova, M., Sergnet, A., Jobling, M., Affara, N., Hurles, M., 2000.** Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male on fertility and recurrent polymorphism. *J Med Genet.* Vol. 37: 752-758.
- Briton-Jones C., Hanes CJ. 2000.** Microdeletions on the long arm of the Y chromosome and their associaton with male-factor infertility. *HKJM.*(6)2: 184-189.
- Calleja, IE., Martínez SG., Gallegos, MC., Ortiz R., Gómez L., Barrera, HA., Gutiérrez, AM., 2003.** Y chromosome micro-deletion identification in infertile males. *Ginecol Obstet Mex.* Vol. 71:25-31.
- Carlsen , E., Anderser, A., Buchreitz, L., Jorgensen, L., Magnus, O., Matuleviccus, E., Holm, J., Punab M., Suominen, J., Zilaitiene, B., Giwercman, A. 2000.** Inter-observer variation in the results of the clinical andrological examination including estimation of testicular size. *International Journal of Andrology.* Vol. 23:248-253.
- Chang, P., Sauer, M., Brown, S., 1999.** Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. *Human Reproduction.* Vol.14(11): 2689-2694.
- Cooke, H., 1999.** Y chromosome and male infertility. *Reviews of Reproduction.* Vol.4:5-10.
- Dada, R., Gupta, NP., Kucheria, K. 2003.** Molecular screening for Yq microdeletion in men with idiopathic oligozoospermia and azoospermia, *J Biosci.* Vol.28(2):163-168.
- Foresta, C., Rossato, M., Garoll, A., Ferlin, A. 1996.** Male infertility and ICSI: are there limits? *Hum Reprod.* Vol.:1:2347-2348.

- Foresta, C., Moro E., Ferlin, A. 2001a.** Y Chromosome Microdeletions and Alterations of Spermatogenesis. *Endocrine Reviews*. Vol.22(2): 226-239.
- Foresta, C., Moro, E., Ferlin, A. 2001b.** Prognostic value of Y deletion analysis. *Human Reproduction*. Vol.6(8): 1543-1547.
- Forti, G., Krausz, C., 1998.** Evaluation and treatment of the Infertile Couple. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol.83(2) 4177-4188.
- Friedel, S., Raziell, A., Strassburger, D., Soffer, Y., Komarovsky, D., R.Ron-E. 1997.** Testicular sperm retrieval by percutaneous fine needle sperm aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men with non-obstructive azoospermia. *Human Reproduction*. Vol.12(7):1488-1493.
- Frydelund-Larsen, L., Krusz, C., Leffers, H., Andersson, A., Carlsen, E., Bangsboell, S., McElreavey, Skakkebaek, N., Rajpert-De Meyts, E. 2002.** Inhibin B: Marker for the Functional State of the Seminiferous Epithelium in Patients with Azoospermia Factor c Microdeletions. Vol. 87(12):5618-5624.
- Gayton, 2000.** Tratado de fisiología médica. Editorial Elsever. 8a edición. Cap.18 862-889.
- Huvnh T., Mollard R., Trounsen A. 2002.** Selected genetic factors associated with male infertility. *Human reproduction*. Vol.8(2): 183-198.
- Ira, S. 2002.** *Human Physiology*. McGrawHill. Estados Unidos. 635-655.
- Krausz, C., Quintana-Murci, L., Barboux, S., Siffroi, JP., Rouba, H., Delafontaine, D., Soulevreau-Therville, N., Arvis, G., Antoine, JM., Erdei, E., Taar, JP., Tar, A., Jeandidier, E., Plessis, G., Bourgeron, T., Dadoune, JP., Fellous, M., McElreavey, K., 1999.** A high frequency of Y chromosome deletions in males with nonidiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab*. Vol.84(10):3606-3612.
- Krausz C., Forti G., McElreavey, K. 2003.** The Y chromosome and male fertility and infertility. *International Journal of Andrology*. Vol.26(2): 70-75.
- Kremer, J., Tuerlings, J., Meuleman E., Schoute, F., Mariman, E., Smeets, D. 1997.** Microdeletions of the Y-chromosome and intracytoplasmic sperm injection: from de gene to clinic. *Hum Reprod*. Vol.:12:687-691.
- Kent-First, M., Kol, S., Muallem, A., Blazer, S., Itskovitz-Eldor, J. 1996.** Infertility in intracytoplasmic-sperm-injection-derived sons. *Lancet*. Vol.: 348:332.

**Kuhnert, B., Gromoll, J., Kostova, E., Luetjens, C., Simoni, M., Nieschlag, E. 2004.** Case Report: Natural Transmission of an AZFc Y-chromosomal microdeletion from father to his son. *Human Reproduction*. Vol.19(4):886-888.

**Kurinczuk, J. 2003.** From the theory to reality-just what are that data telling us about ICSI offspring health and future fertility and should be concerned?. *Human Reproduction*. Vol.18(5): 925-931.

**Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Brown, L.G., Minx, P.J., Cordum, H.S. 2001.** The AZFc region of the chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nature Genetic*. Vol. 29:279-286.

**Maduro, R., Lamb, D. 2002.** Understanding the new genetics of male infertility. *The journal of Urology*. Vol. 18:2197-2205.

**Martínez, MC., Bernabé, MJ., Gómez, E., Ballesteros, A., Landeras, J., Glover, G., Gil-Salom, M., Remohí, J., Pellicer, A. 2000.** Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients. 2000. *J Androl*. Vol.21(5): 651-655.

**Martínez, S., Gallegos, M., Vargas, M., Rubio, J., Monteros, M., González, C., Cancino, P., Vazquez, L., Gutiérrez, A. 2008.** Genetic screening (Chromosomal abnormalities, Y chromosome deletions and Androgen receptor CAG repeat length) in infertile Mexican men. *Journal of Andrology*. Vol.22(15):162-172.

**Mendoza, D.,2008.** Factor masculino en la infertilidad. *Gineco*, Vol.15(93):16-30

**Mitra, A., Dada, R., Kumar, R., Prasad, G., Kucheria, K., Kumar, S. 2006.** Y chromosome microdeletions in azoospermic patients with Klinefelter's syndrome. *Asian J Androl*. Vol.8(1):81-88.

**Najmabadi, H., Chai, N., Kapali, A., Subbaro, M., bhasin, D., Woodhouse, E., 1996.** Genomic Structure of a Y-specific ribonucleic acid binding motif containing gene: a putative candidate for a subset of male infertility. *J Clin Endocrinol Metab*. Vol.: 81:2159-2164.

**Normatividad de Ginecología y Obstetricia INPer , 2003.**

**Prior, J., Kent-First, M., Muallem, M., Van Bergen, A., Nolten, W., Meisner, L., Roberts, K. 1997.** Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N engl J med*. Vol.:336:534-539.

- Purves W., Sadava D., Urians G., Craig, C. 2003.** Vida la Ciencia de la Biología. Editorial médica Panamericana, España: 739-740.
- Quintana-Murci, L., Fellous, M. 2001.** The Human Y chromosome: the biological role of a "functional wasteland". *Journal of a Biomedicine and Biotechnology*. Vol. 1(1):18-24.
- Qureshi, S., Ross, A., Ma, k., Cooke, H., McIntyre, M., Chandley, T. 1996.** Polymerase chain reaction screening for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis of genetically determined spermatogenesis. *Mol Hum Reprod*. Vol.:2:775-779.
- Reijo, R., Lee, T., Salo, P., Alagappan, R., Brown, L.G., Rosenberg, M. 1995.** Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genet*. Vol.10:383-393.
- Reijo, R., Alagappan, R., Patrizio, P., Page, D. 1996.** Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet*. Vol. 347:1290-1293.
- Rejeb, I., M'rad, R., Maazoul, F., Trabelsi, M., Ben Jemma, I., Chaabouni, M., Zhioua, F., Chaabouni, H. 2007.** Y chromosome microdeletions in Tunisian infertile males. *Pathol Biol*. Vol. 26: 625-631.
- Remohí, J., Pellicer, A., Simón, C., Navarro, J. 2003.** Reproducción Humana. Editorial McGrawHill. España: 273-285.
- Remohí, J., Pellicer, A., Simón, C., Navarro, J., Romero J. 2001.** Manual Práctico de Esterilidad y reproducción Humana. Editorial McGrawHill Interamericana. España: 185-198.
- Ristanovic, M., Bunjevacki, V., Tulic, C., Novakovic, I., Perovic, V., Lukovic, LJ., Milasin, J. 2007.** Prevalence of Y chromosome microdeletions in infertile man with severe oligozoospermia un Serbia. *Genet couns*. Vol. 18(3):337-342.
- Rolf, C., Gromoll, J., Simoni, M., Nieschlag, E. 2002.** Natural transmission of a partial AZFb deletion of the Y chromosome over three generations. *Human reproduction*. Vol.17(9): 2267-2271.

- Sargin, CF.,** Berker-Karauzum, S., Manguoglu, E., Erdogru, T., Karaveli, S., Gulkesen, KH., Baykara, M., Luleci, G. **2004.** AZF microdeletions on the Y chromosome of infertile men from Turkey. *Ann Genet.* Vol.47(1):61-68.
- Seifer, I.,** Amat, S., Delgao-Viscogliosi, P., Boucher, D., Bignon, YJ., **1998.** Search for microdeletions on the long arm chromosome Y in 48 infertile men. *C R Seances Soc Biol Fil.* Vol.192(4):725-732.
- Shefi, A.,** Turek, P., **2006.** Definition and Current Evaluation of Subfertile Men. *International Braz J Urol.* Vol.32(4): 385-397.
- Shimizu, A.,** Ichikawa, T., Suzuki, N., Yamazaki, T., imamoto, T., Kojima, S., Naya, Y., Komiya, A., Suzuki, H., Miura, K., Ito, H. **2002.** Multiplex sequence-tagged site PCR for efficient screening of microdeletions in Y chromosome in infertile males with azoospermia or severe oligozoospermia. *Arch Androl,* Vol.48(5):351-358.
- Shin, D.,** Gilbert, S., Goldstein, M., Schelegel, PN. **1997.** Congenital absence of the vas deferens: incomplete penetrance of cystic fibrosis gene mutations. *J Urol,* Vol.158(8):1808-1809.
- Silber, S.,** Repping, S. **2002.** Transmission of male infertility to future generations:lessons from the Y crhromosome. *Human Reproduction.* Vol.8(3): 217-229.
- Simoni, M.,** Gromoll, J., Dworniczak, B., Rolf, C., Abshagen, K., Kamischke, A. **1997.** Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in AZoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil Steril.* Vol.:67:542-547.
- Simoni, M.,** Bakker, E., Eurlings,M., Matthijs, G., Moro, E., Müller,C., Vogt,P., **2001.** Laboratory guidelines for the molecular diagnosis of Y chromosomal microdeletions. *European Molecular Genetics Quality Network:*1-7.
- Simoni, M.,** **2004a.** Molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions in Europe state-of-the-art and quality control. *Int J Androl.* Vol.27(4): 240-249.
- Simoni, M.,** Bakker, E., Krausz, C., **2004b.** EAA/EMNQ best practice guidelines for molecular diagnosis Y chromosomal microdeletions. *State of the art 2004.* *International Journal of Andrology.* Vol. 27: 240-249.

**Skaletsky, H.,** Kuroda-Kawaguchi T., Minx, P., Cordum, H., Hillier, L., Brown, L., Reeping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T., Chinwalia, A., Delehuanty, A., Delehuanty, K., Du, H., Fewell, G., Fulton, L., Fulton, R., Graves, T., Hou, S., Latrielle, P., Leonard, S., Mardis, E., Maupin, R., McPherson, J., Miner, T., Nash, W., Nguyen, C., Ozersky, P., Pepin, K., Rock, S., Rohlfing, T., Scott, K., Schuitz, B., Strong, C., Tin-Wollam, A., Yang, S., Waterson, R., Wilson, R., Rozen, S., Page, D. **2003.** The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*. Vol.423:825-838.

**Song, NH.,** Wu, HF., Zhang, W., Hua, LX., Zhou, ZM., Fehg, NH., Zhan, J., Qiao, D., Zhang, JX. **2006.** Detection of Y chromosome microdeletions in patients with severe oligozoospermia and azoospermia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. Vol. 86(20):1376-1380.

**Strauss, J.,** Barbieri, R. **2004.** *Reproductive Endocrinology*. Editorial ELSEVIER SAUNDERS. E.U.A. 367-387.

**Stuppia, L.,** Mastroprimiano, G., Calabrese, G. **1996.** Microdeletions of interval 6 of the y-chromosome detected by STS-PCR in 6 of 33 patients with idiopathic oligo- or azoospermic. *Cytogenet Cell Genet*. Vol.:72:155-158.

**Tapia, R.,** Rojas, J. **2003.** Semiología del análisis del semen. *Boletín del colegio Mexicano de Urología*. Vol.18(2): 48-52. Vol. 87(11): 5258-5264.

**Teng, YN.,** Lin, YM., Tsao, SY., Hsu, CC., Lin, SJ., Tsai, WC., Kuo, PL. **2002.** Association of a single-nucleotide polymorphism of the deleted-in-azoospermia-like gene with susceptibility to spermatogenic failure. *J Clin Endocrinol Metab*. Vol.

**Thangaraj, K.,** Gupta, NJ., Pavani, K., Reddy, AG., Subramanian, S., Rani, DS., Ghosh, B., Chakravarty, B., Singh, L. **2003.** Y chromosome deletions in azoospermic men India. *J Androl*. Vol. 24(4):588-597.

**Tiepolo, L.,** Zuffardi, O., **1976.** Localization of factors spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet*. Vol 34 (2):119-124.

**Tilford, C.,** Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Rozen, S., Brown, L., Rosenberg, M., McPherson, J., Wylie, K., Sekhon, M., Kucaba, T., Waterston, R., Page, D. **2001.** A physical map of the Human Y chromosome. *Nature*. Vol 409:943-945.

**Tomasi, P., Oates, R., Brown, L., Delitala, G., Page, D. 2003.** The pituitary-testicular axis in Klinefelter's syndrome and in oligo-azoospermic patients with and without deletions of the Y chromosome long arm. *Clinical Endocrinology*. Vol.59:214-222.

**Tournaye, H., Lissesns, W., Liebaers, I., Van Assche, E., Bonduelle, M., Fastenaekels, V., Van Steirteghem, A., Devroey, P. 1997.** Heritability of sterility: clinical implications. *Genetics of Human Male Fertility*.123-144.

**Vergnaud, G., Page, D., Simmler, M., Brown, L., Rouyer, F., Noel, B., Botstein, D., de la Chapelle, A., Weissenbach, J. 1986.** A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum Genet*. Vol. 38(2):109-124.

**Vogt, P., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter F. 1996.** Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet*. Vol.:5:933-943.

**Vogt, P., 2005.** AZF deletions and Y chromosomal haplogroups: history and update based on sequence. *Human Reproduction*. Vol.11(4): 319-336.

**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*: Vol. 258(5079):52-59.

**Yao, G., Chen, G., Pan, T. 2001.** Study of microdeletions in the Y chromosome of infertile men with idiopathic oligo- or azoospermia. **2001.** *J Assist Reprod Genet*. Vol. 18(11) :612-616.

**Yates, Ch., Arce, P. 2003.** [www.uc.cl/sw\\_educ/biologia](http://www.uc.cl/sw_educ/biologia).

## ANEXO I.

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Proyecto:** Detección de Microdeleciones del cromosoma Y dentro de una población juvenil en el estado de Querétaro.

**Responsables:** Janet Araceli Rodríguez Guzmán, M. en C. Anna Berenice Juárez Espinosa, Dr. Sergio Romero Gómez, Dr. Rafael Sánchez Usabiaga.  
Laboratorio de Genética Reproductiva, Médica Fértil. Prol. Constituyentes 128, Col. El Jacal. CP 76180. Querétaro, Qro. TEL: (442) 242 10 43/2154624.

#### Información Preliminar

Los seres humanos tenemos 23 pares de cromosomas, uno de ellos define el sexo de cada persona y se le conoce como par sexual, las mujeres tienen un par XX y los varones XY. El cromosoma Y del varón dirige la formación de los espermatozoides.

Dos de las causas más comunes de la infertilidad masculina son la oligozoospermia (baja cantidad de espermatozoides) y la azoospermia (ausencia de espermatozoides), ambas afecciones pueden deberse a una multitud de causas como enfermedades, infecciones, desordenes hormonales, obstrucción / ausencia de conductos seminales o a causas genéticas.

Los espermatozoides se forman en los testículos por medio de un proceso llamado espermatogénesis (formación de espermatozoides) y los genes críticos para la Espermatogénesis están localizados en el brazo largo del cromosoma Y, dentro de una región conocida como **Factor de AZoospermia (AZF)**, la región AZF se divide en tres zonas llamadas AZFa, AZFb y AZFc, cualquier daño en estas zonas produce la disminución o ausencia de espermatozoides, esta condición se le denomina **microdeleciones del cromosoma Y**.

Los portadores de daños del cromosoma Y son normales en cualquier otro aspecto, pero es posible analizar la región AZF por biología molecular, para determinar si se han perdido uno o varios fragmentos de cada zona.

Al localizar si existe una causa genética de la azoospermia y la oligozoospermia es posible identificar de manera segura la causa de infertilidad masculina.

En algunos casos es posible tomar medidas correctivas que permitan al varón afectado ser padre, e incluso es posible tomar medidas preventivas ya que las microdeleciones son hereditarias a todos los hijos varones.

Esta información evita que al paciente se le someta a tratamientos de infertilidad que no serán efectivos e incluso a intervenciones quirúrgicas innecesarias como la biopsia testicular, cuando de antemano ya se sabe que no se encontraran espermatozoides.

Médica Fértil es una institución privada que cuenta con el registro de RENIECyT, y que realiza investigación en genética reproductiva. En este momento estamos realizando un estudio para contar con datos acerca de la incidencia de las Microdeleciones del cromosoma Y en poblaciones juveniles del estado de Querétaro y es por eso que se le invita a formar parte del este estudio.

La determinación se lleva a cabo por Múltiple PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y solo requiere de una toma de muestra de sangre periférica.



ANEXO II.



### RESUMEN CLÍNICO PARA ESTUDIO DE MICRODELECIONES

médicafértil

Caso No.: \_\_\_\_\_

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

Fecha de toma de muestras: \_\_\_\_\_

Medicamentos: \_\_\_\_\_

Antibióticos: \_\_\_\_\_

Hijos previos (si): \_\_\_\_\_

Años de esterilidad: \_\_\_\_\_

Antecedentes familiares de infertilidad: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Estudio de cariotipo previo: \_\_\_\_\_ Resultado: \_\_\_\_\_

Enfermedad crónica (s/n): \_\_\_\_\_Cuál: \_\_\_\_\_

Ocupación: \_\_\_\_\_

Exposición a teratogenos: \_\_\_\_\_

Caracteres sexuales secundarios: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Estudios hormonales: \_\_\_\_\_

Resultados de espermatozoides: \_\_\_\_\_

Otros estudios: \_\_\_\_\_

Biopsia testicular (s/n): \_\_\_\_\_ Resultado: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Diagnostico probable: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Nombre de la consue: \_\_\_\_\_

Ocupación: \_\_\_\_\_

Nombre del médico solicitante: \_\_\_\_\_

Querétaro

Celaya

Expendo

28-09-06

Revisión: 02

1 de 1

F0-GR-08

**ANEXO III.****ANÁLISIS MOLECULAR****NOMBRE DEL PACIENTE:** -----**CASO:** EY -05**FECHA TOMA DE MUESTRA:** - -2005**FECHA INFORME:** - -2005**ESTUDIO REALIZADO:** Microdeleciones del cromosoma Y  
**TECNICA UTILIZADA:** PCR multiplex de STS del cromosoma Y.**RESULTADO:**

Multiplex A: PCR	Resultado de PCR	Multiplex B:	Resultado de
ZFY	Presente	ZFY	Presente
SRY	Presente	SRY	Presente
sY254 (AZFc)	Presente	sY86 (AZFa)	Presente
sY84 (AZFa)	Presente	sY134 (AZFb)	Presente
sY127 (AZFb)	Presente	sY255 (AZFc)	Presente

**OBSERVACIONES:** Los análisis se realizaron por duplicado y como referencia se tomaron controles positivos y negativos. No se encontró ninguna microdelección mediante esta metodología.

**REALIZÓ:** Laboratorio de Genética Reproductiva

MC. Anna Berenice Juárez Espinosa

pQFB. Janet Araceli Rodríguez Guzmán

## ANÁLISIS MOLECULAR

**NOMBRE DEL PACIENTE:** -----

**CASO:** MYQ12-07

**FECHA TOMA DE MUESTRA:** 10-ABRIL-2007

**FECHA INFORME:** 14-ABRIL-2007

**ESTUDIO REALIZADO:** Microdeleciones del cromosoma Y  
**TÉCNICA UTILIZADA:** PCR multiplex de STS del cromosoma Y.

### RESULTADO:

Multiplex A:	Resultado de PCR	Multiplex B:	Resultado de PCR
ZFY	Presente	ZFY	Presente
SRY	Presente	SRY	Presente
sY254 (AZFc)	<b>Ausente</b>	sY86 (AZFa)	Presente
sY84 (AZFa)	Presente	sY134 (AZFb)	Presente
sY127 (AZFb)	Presente	sY255 (AZFc)	<b>Ausente</b>

**OBSERVACIONES:** Los análisis se realizaron por duplicado y como referencia se tomaron controles positivos y negativos. Mediante esta metodología se concluye que el paciente presenta una microdelección en la región AZFc del cromosoma Y.

**SOLICITÓ:** Dr. Rafael Sánchez Usabiaga

**REALIZÓ:** Laboratorio de Genética Reproductiva

M en C. Anna Berenice Juárez Espinosa  
Coordinadora

## **ANEXO IV.**

### **Análisis del semen**

Las muestras de semen fueron obtenidas por masturbación después de un período recomendado de 3 a 7 días de abstinencia sexual. Todas las muestras de semen fueron analizadas de acuerdo a los parámetros de la Organización Mundial de la Salud, como parte de estudio de rutina en la clínica. La concentración de espermatozoides fue determinada en una cámara de Makler y la movilidad, así como su morfología fueron evaluadas por observación directa en el microscopio por los especialistas del laboratorio.

**ANEXO V.**



**REPORTE DE ESPERMIOGRAMA**

FECHA: \_\_\_\_\_

PACIENTE: \_\_\_\_\_  
CÓNYUGE: \_\_\_\_\_  
DR: \_\_\_\_\_

EDAD: \_\_\_\_\_  
EDAD: \_\_\_\_\_

HORA DE RECOLECCION: \_\_\_\_\_ HORA DE ENTREGA: \_\_\_\_\_

DIAS DE ABSTINENCIA: \_\_\_\_\_

VOLUMEN: \_\_\_\_\_  
COLOR: \_\_\_\_\_  
AGLUTINACIÓN: \_\_\_\_\_

LICUEFACCIÓN: pH: \_\_\_\_\_

CONCENTRACIÓN: \_\_\_\_\_

**MOVILIDAD**

TIPO "A" \_\_\_\_\_ % (MÓVILES RAPIDOS PROGRESIVOS)  
TIPO "B" \_\_\_\_\_ % (MÓVILES PROGRESIVOS LENTOS)  
TIPO "C" \_\_\_\_\_ % (MÓVILES NO PROGRESIVOS)  
TIPO "D" \_\_\_\_\_ % (INMÓVILES)

**MORFOLOGÍA**

NORMALES: \_\_\_\_\_ ANORMALES: \_\_\_\_\_

CRITERIO: \_\_\_\_\_

LEUCOCITOS: \_\_\_\_\_ CELULAS INMADURAS: \_\_\_\_\_

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## **ANEXO VI.**

### Ultrasonido testicular.

Para que se llevara a cabo este estudio se necesito de un ultrasonido bidimensional, un transductor lineal de 7.5-10 MHz. Al realizar este estudio, el paciente tenía que vaciar su vejiga, y acomodarse en posición supino (boca arriba, colocando gel en el escroto para su revisión. El tamaño testicular se realizo haciendo un corte longitudinal y otro transverso. Para calcular el volumen se tomaron medidas (ancho x largo x transverso x 0.52), continuando con el estudio se busco alguna masa, o irregularidad ecogénica (microcalcificaciones, hidrocele, tumores, etc.). Para la valoración del epidídimo se valoro realizando mediciones y observando la presencia de alguna anomalía (quiste). Se continuo con el estudio en la parte posterior del testículo, observando el grosor de los vasos, reportando si se encontraban agrandados o tortuosos (varicocele).



ULTRASONIDO TESTICULAR

NOMBRE \_\_\_\_\_ EDAD \_\_\_\_\_ FECHA \_\_\_\_\_

MOTIVO DE ESTUDIO \_\_\_\_\_ TÉCNICA \_\_\_\_\_

TESTICULOS	DERECHO	IZQUIERDO
TAMAÑO	_____	_____
CARACTERISTICAS	_____	_____
OBSERVACIONES	_____	_____
EPIDIDIMO		
TAMAÑO	_____	_____
CARACTERISTICAS	_____	_____
PLÉXO PAMPINIFORME		
VALSALVA	_____	_____
IDX	_____	_____
OBSERVACIONES	_____	_____
PLAN	_____	_____
	_____	_____
	_____	_____

Realizó \_\_\_\_\_

Dr. \_\_\_\_\_  
Médico tratante

01-12-05

rev 02

1 de 1

FO - CI - 06

## ANEXO VII.

### Perfil hormonal.

Se tomo la muestra de sangre periférica en un tubo sin anticoagulante, los cuales fueron identificados con el nombre del paciente. Las muestras fueron referidas a un laboratorio de análisis clínicos externo, donde evaluaron: FSH, LH, Testosterona y Prolactina. Los valores de referencia se presentan a continuación:

Nombre de la hormona	Valor de referencia
Hormona luteinizante	1.1 a 7.0 mUI/mL
Hormona folículo estimulante	1.7 a 12.0 mUI/mL
Prolactina	3.0 a 25.0 ng/mL
Testosterona Total	3.0 a 10.6 ng/mL

Cuadro. Valores de referencia de las hormonas en el estudio del hombre infértil.



PACIENTE  
 NOMBRE:  
 EDAD:  
 INSTITUCIÓN: PARTIDARIA  
 BUCAR

#### LABORATORIO DE ANALISIS CLINICOS

" G O C A "

D.R. MONICA A. GONZALEZ CASTRO

CALLE COLONIALES Y AV. DEL GABRIEL GARCIA MARQUEZ  
 TEL: 2-16-70-01 FAX: 1-83-44-32

YA TENEMOS LAS SIGUIENTES PRUEBAS DIAGNOSTICAS:  
 PERFILES TIPOICOS, GASOMETRIAS ARTERIALES  
 PERFILES GINECOLOGICOS Y DIRERO  
 URGENCIAS TEL. DIRECTO: 3-41-29-2500

### PERFIL GINECOLOGICO MASCULINO



	RESULTADO	VALORES DE REFERENCIA
HORMONA LUTEINIZANTE	mUI/ml	DE 1.1 A 7.0
HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE	mUI/ml	DE 1.7 A 12.0
PROLACTINA	ng/ml	DE 3.0 A 25.0
TESTOSTERONA TOTAL	ng/ml	DE 3.0 A 10.6

METODO: INMUNOENSAYO ENZIMATICO

## ANEXO VIII.

### Cariotipo en sangre periférica

Para la realización de este estudio se necesito recolectar sangre periférica en un tubo vacutainer heparinizado (tapa verde), y de esta muestra se realizo un cultivo de linfocitos de sangre y análisis de cariotipo por la técnica de bandeo convencional (GTG) con una resolución de bandas de 350 a 450.



Laboratorio de Genética Molecular Diagnóstica

NOMBRE DEL PACIENTE

CASO

DOCTOR

ANÁLISIS

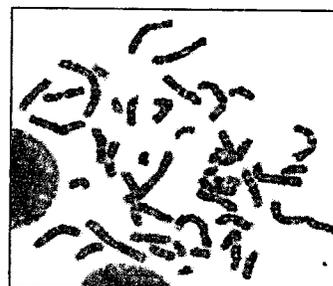
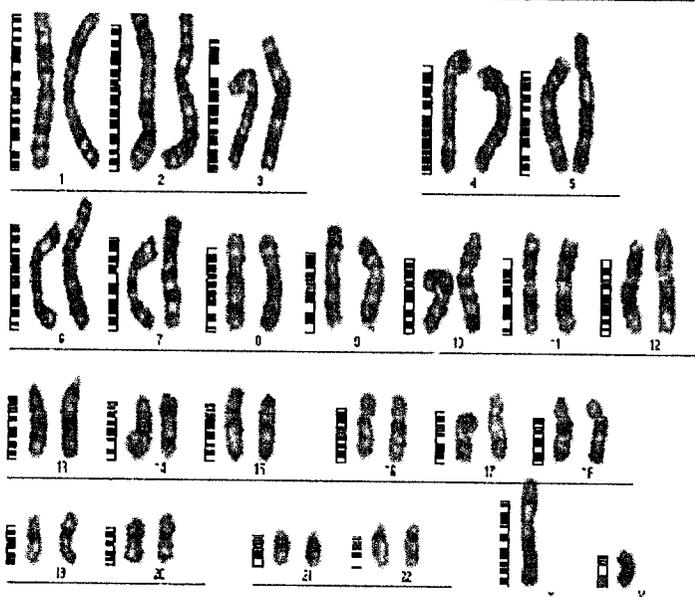
MUESTRA

RESULTADO

FO-GM-

MC. Juárez E.

Laboratorio de Genética Reproductiva



No.	Caso	Edad	Resultados de la microdelección	Resultados de EIA	Utr Testicular	Perfil Hormonal				Carácter
						FSH	LH	Test	Prol	
1	MY0104	32	NORMAL	azoospermia						
2	MY0304	35	NORMAL	azoospermia		2.8	1.2	0.41	28.0	46, XY
3	MY0404	30	Microdelección de la región AZFc	criptozoospermia	normal	20.4	5.6	3.9	13.3	46, XY
4	MY0504	30	NORMAL	Oligomoderada Astenoleve						46, XY
5	MY0604	28	NORMAL	Oligomoderada Astenoleve	Varicocele bilateral					
6	MY0704	38	NORMAL	Hipospermia	Quiste calcificado, varicocele bilateral	13.58				46, XY
7	MY0804	33	NORMAL	astenozoospermia	Varicocele bilateral	3.0		10.0	10.3	46, XY
8	MY1004	34	Microdelección de la región AZFc	Oligospermia severa		11.1		8.6	7.2	46, XY
9	MY1204	38	NORMAL	Criptoospermia		11.0				
10	MY1304	46	NORMAL	Astenosevera oligomoderada						46, XY
11	MY1504	25	NORMAL	azoospermia	Microlitiasis bilateral leve	3.92		4.98	17.0	
12	MY1604	38	NORMAL	azoospermia		21.6	13.9	325.9	5.1	46, XY
13	MY1704	26	NORMAL	oligospermia severa		9.2		536.4	17.5	46, XY
14	MY1804	32	NORMAL	azoospermia	Testículos pequeños					46, XY
15	MY1904	44	NORMAL	oligospermia						46, XY
16	MY2004	34	NORMAL	Eyacuación retrograda, criptoastenototal, necrospermia, hipospermia		3.09		6.91	14.69	46, XY
17	MY2204	36	Microdelección de la región AZFc	Criptoospermia teratoospermia		12.4	3.8	4.78	23.4	46, XY
18	MY2304	45	NORMAL	Astenosevera teratoleve						46, XY
19	MY2404	45	NORMAL	Azoospermia	Varicocele bilateral					46, XY
20	MY2504	45	NORMAL	Oligosevera astenomoderada						46, XY
21	MY2604	26	NORMAL	Astenomoderada con hipospermia	Microcalcificaciones bilaterales					46, XY
22	MY2704	24	NORMAL	azoospermia	Volumen disminuido					46, XY

Resultados obtenidos de microdelecciones del cromosoma Y en pacientes con antecedentes de infertilidad (Continua...)

Nº	Caso	Edad	Resultado de Microdelección	Resultado de FISH	US Testicular	Perfil Hormonal				Carotipo
						FSH	LH	Test	Prog	
23	MY2904	35	NORMAL	azoospermia	Testículo único izquierdo					46,XY
24	MY3104	31	NORMAL	azoospermia		6.01	3.5	3.74	24.57	46, XY
25	MY3204	25	NORMAL	astenomoderada						
26	MY3304	33	NORMAL	oligoastenoleve						
27	MY3504	30	NORMAL	oligomoderada	Varicocele					
28	MY3604	35	NORMAL	azoospermia		35.0				46, XY
29	MY3804	27	NORMAL	astenosevera	Varicocele	8.35	4.86	5.36	10.6	
30	MY4004	29	NORMAL	oligoasteno						46, XY
31	MY4104	38	NORMAL	azoospermia						46, XY
32	MY4204	50	NORMAL	criptozoospermia		8.29	0.96	16.15		46, XY
33	MY4304	35	NORMAL	Astenosevera teratoleve						46, XY
34	MY0105	50	NORMAL	azoospermia		11.8		3.79	6.2	46, XY
35	MY0205	34	NORMAL	oligosevera						46, XY
36	MY0505	27	NORMAL	azoospermia		24.9		17.63		46, XY
37	MY0605	29	NORMAL	Oligoleve astenosevera		5.49		2.02	14.66	46,XY
38	MY0705	34	NORMAL	azoospermia		18.2			6.9	46, XY
39	MY0805	31	NORMAL	oligozoospermia						46, XY
40	MY1005	30	NORMAL	Oligoastenoterato severa	Microcalcificaciones	3.09		6.91	14.69	46, XY
41	MYQ0105	29	NORMAL	azoospermia						46, XY
42	MYQ0205	34	NORMAL	azoospermia		4.56	1.14	6.28	12.03	46, XY
43	MYQ0405	33	NORMAL	Hipospermia azoospermia				0.51		46,XY
44	MYQ0505	29	NORMAL	azoospermia						46,XY
45	MYQ0605	22	NORMAL	azoospermia						46,XY
46	MYQ0705	24	Microdelección de la región AZFc	azoospermia		2	2.8	249.3	8.7	46,XY
47	MYQ0905	32	NORMAL	azoospermia						46,XY
48	MYQ1105	32	NORMAL	Oligoasteno severa		19.38	8.22	3.4		46,XY

Resultados obtenidos de microdelecciones del cromosoma Y en pacientes con antecedentes de infertilidad (Continua...)

No.	Caso	Edad	Resultados de FISH	Cariotipo	Cariotipo	Pruebas de Semen				Cariotipo
						ES	FS	FS	FS	
49	MYQ1205	41	NORMAL	hipospermia						46, XY
50	MYQ1305	40	NORMAL	Oligoasteno severa						46, XY
51	MYQ1405	44	NORMAL	Oligomoderada astenoleve						46, XY
52	MYQ1605	52	NORMAL	azoospermia						46, XY
53	MYQ1705	36	NORMAL	Oligoasteno severa		4.15	4.45	7.4	19.6	46, XY
54	MYQ1805	41	NORMAL	Astenomoderada Hipospermia						46, XY
55	MYQ1905	36	NORMAL	Hipospermia, oligosevera astenoterato moderada						46, XY
56	MYQ2005	34	NORMAL	Oligoastenoterato moderada		9.06		3.3	3.69	46, XY
57	MYQ2105	32	NORMAL	astenoleve						
58	MYQ2205	46	NORMAL	Oligoastenoterato moderada						46, XY
59	MYQ2305	38	NORMAL	Oligoteratosevera astenomoderada						46, XY
60	MYQ2405	30	NORMAL	azoospermia	Varicocele izquierdo					46, XY
61	MYQ2505	33	NORMAL	Astenomoderada terato						46, XY
62	MYQ2605	47	NORMAL	Astenosevera (criptozoospermia)	Epididimitis					46, XY
63	MYQ2705	30	NORMAL	Oligoleve asteno severa						46, XY
64	MYQ2805	36	NORMAL	azoospermia	Testículos con volúmenes disminuidos, microcalcificaciones aisladas	15.33	3.52	3.97	16.68	46, XY
65	MYQ2905	31	NORMAL	Hipospermia oligosevera						46, XY
66	MYQ3005	36	NORMAL	Criptozoospermia teratoleve						46, XY
67	MYQ0106	43	NORMAL	Azoospermia						46, XY
68	MYQ0306	40	Microdelección de la región AZFc	azoospermia	Testículos hipotrofos					
69	MYQ0406	34	NORMAL	Hipospermia astenoleve						46, XY
70	MYQ0506	38	NORMAL	Hipospermia astenosevera	Varicocele izquierdo					46, XY
71	MYQ0606	36	NORMAL	azoospermia						46, XY
72	MYQ0806	34	NORMAL	azoospermia						46, XY

Resultados obtenidos de microdeleciones del cromosoma Y en pacientes con antecedentes de infertilidad (Continua...)

No.	Grupo	Edad	Resultado de Microdelecciones	Resultado de FISH	Us. Testicular	Parámetros			Cariotipo
						Vol.	U	Total	
73	MYQ0906	38	NORMAL	azoospermia					
74	MYQ1006	35	NORMAL	azoospermia					46, XY
75	MYQ1106	31	NORMAL	azoospermia	Quiste de epidídimo	16.57		14.45	46, XY
76	MYQ1306	41	NORMAL	azoospermia	Testículos pequeños, microcalcificaciones				46, XY
77	MYQ1406	28	NORMAL	Hipospermia, oligosevera astenoteratomoderada	Testículos pequeños, microcalcificaciones, quistes y varicocele				46, XY
78	MYQ1506	41	NORMAL	Criptozoospermia, astenoteratosevera	Testículo izquierdo hipotrófico				46, XY
79	MYQ1706	32	NORMAL	Oligosevera, astenomoderada, teratosevera	Izq. Microlitiasis, microcalcificaciones				46, XY
80	MYQ2006	34	NORMAL	Oligomoderada astenoleve teratosevera					46, XY
81	MYQ2106	32	NORMAL	teratozoospermia					46, XY
82	MYQ2206	29	NORMAL	Astenomoderada teratosevera	Lipomas escrótales				46, XY
83	MYQ2-06	25	NORMAL	Oligoastenosevera terato	Hidrocele 5% testículo derecho				
84	MYQ2406	33	NORMAL	azoospermia					
85	MYQ2506	32	NORMAL	Astenomoderada terato					
86	MYQ2706	32	NORMAL	criptozoospermia	Testículos pequeños				46, XY
87	MYQ2806	23	Microdelección de la región AZFc	azoospermia					46, XY
88	MYQ0207	34	NORMAL	azoospermia					46, XY
89	MYQ0407	38	NORMAL	Oligosevera astenomoderada	hidrocele				46, XY
90	MYQ0507	30	NORMAL	azoospermia					46, XY
91	MYQ0607	33	NORMAL	Azoospermia	Calcificaciones en 20% en ambos testículos				46,XY
92	MYQ0707	28	NORMAL	Criptozoospermia teratomoderada					46,XY
93	MYQ0807	32	NORMAL	azoospermia	Pb. SCOS				46,XY
94	MYQ0907	30	NORMAL	normozoospermia					46,XY
95	MYQ1107	42	NORMAL	Hipospermia, oligomoderada astenosevera					46,XY
96	MYQ1207	25	Microdelección de la región AZFc	azoospermia					46,XY

Resultados obtenidos de microdelecciones del cromosoma Y en pacientes con antecedentes de infertilidad (Continua...)

No.	Caso	Edad	Resultados de Microdelecciones	Resultado de EBD	US Testicular	Perfil Hormonal				Cariotipo
						FSH	LH	Test	Prol	
97	MYQ1607	32	NORMAL	azoospermia						
98	MYQ1807	53	NORMAL	Oligosevera teratoleve						
199	MYQ1907	26	Microdelección de la región AZFc	azoospermia	Quiste en el epididimo izquierdo	5.98	5.12	3.73		46, XY
100	MYQ2007	41	NORMAL	azoospermia						46, XY
101	MYQ2107	48	NORMAL	Oligoteratosevera-asteno moderada						46, XY
102	MYQ2207	30	Microdelección de la región AZFc	Oligomoderada asteno severa	Hidrocele testicular, quistes en el epididimo	6.0	2.4	10.4		

Resultados obtenidos de microdelecciones del cromosoma Y en pacientes con antecedentes de infertilidad. También se presentaron otros datos clínicos que fueron evaluados por otras áreas: laboratorio de reproducción (EBD=espermatobioscopía), clínica (US Testicular=Ultrasonido Testicular), Perfil Hormonal (FSH=Hormona folículo Estimulante, LH= Hormona Leutinizante, Test= Testosterona, Prol= Prolactina), y departamento de citogenética (cariotipo).

## ANEXO X.

### COMPARACIÓN DE LA INCIDENCIA DE MICRODELECCIONES DEL CROMOSOMA "Y" EN DOS POBLACIONES CON Y SIN ANTECEDENTES DE INFERTILIDAD

pQFB. Janet Rodríguez Guzmán, M. en C. Berenice Juárez Espinosa, Dr. Rafael Sánchez Usabiaga. Instituto Médica Fértil. [qf\\_jancta@yahoo.com.mx](mailto:qf_jancta@yahoo.com.mx).

**Introducción:** Entre la población mundial del 15% al 20% de las parejas padecen de infertilidad. La mitad de esta población se ha visto relacionada debido al factor masculino, el cual generalmente involucra una alteración en la producción de espermatozoides (Shefi y Turek, 2006). La espermatogénesis es regulada por la participación de varios genes y se ha postulado que la delección de cualquiera de estos puede reflejarse en el paciente presentando oligozoospermia (cuenta disminuida de espermatozoides) o azoospermia (ausencia de espermatozoides en el eyaculado). La mayoría de estos genes se encuentran ubicados en el cromosoma sexual Y en el brazo largo (Yq) (Huynh y col., 2002). En una región denominada Factor de Azoospermia (AZF), que a su vez se ha dividido en tres regiones AZFa, AZFb y AZFc. El análisis molecular de las microdelecciones localizadas en estas regiones es realizado como parte del diagnóstico para el hombre infértil, debido a que es una de las causas genéticas más frecuentes de infertilidad masculina (Foresta y col., 2001).

**Material:** Muestras de sangre periférica de pacientes varones con antecedentes de infertilidad que cuentan con una espermatobioscopia alterada (104), y varones jóvenes sin antecedentes de infertilidad (82).

**Métodos:** Extracción de DNA de leucocitos de sangre periférica, para la detección de genes localizados en las regiones AZFa, AZFb, y AZFc empleando una multiplex-PCR utilizando controles negativos y positivos

**Resultados:** La población analizada con antecedentes de infertilidad, encontramos por medio de este método que 11 pacientes presentaron una o más regiones deletadas. Estos pacientes manifiestan oligozoospermia o azoospermia. Dentro de este estudio, reportamos un caso familiar de tres hermanos con antecedentes de infertilidad y todos ellos presentaron la ausencia de la región AZFc, uno de ellos cursa con síndrome de Klinefelter. Otro caso que se reporta, es de un paciente que

presento la delección de las regiones AZFa+AZFb+AZFc y un cariotipo de 46,XX. Por medio de esta metodología no se identificó ninguna delección en la población sin antecedentes de infertilidad.

**Conclusiones:** En nuestro estudio reportamos que la incidencia de microdelecciones del cromosoma Y es mas alta en pacientes con antecedentes de infertilidad, en comparación de los individuos que no presentan este tipo de problemas.

Las microdelecciones del cromosoma Y en nuestra población están correlacionadas en pacientes con oligozoospermia y azoospermia, así como otros estudios previamente reportados (Krausz y col., 2003)

La región que se deleta con más frecuencia en nuestra población es la región AZFc (91%). Aunque el tamaño de nuestra población es pequeña, corrobora los datos de otro estudio (Foresta y col., 2001 y Krausz y col., 2003), identificando esta región como la más frecuente.

**Agradecimientos:** Proyecto apoyado por CONACYT: QRO.2003-CO1-9864.

#### **Bibliografía:**

- Foresta, C., Moro E., Ferlin, A. 2001. Y Chromosome Microdeletions and Alterations of Spermatogenesis. *Endocrine Reviews*. Vol.22(2): 226-239.
- Forti, G., Krausz, C., 1998. Evaluation and treatment of the Infertile Couple. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol.83(2) 4177-4188.
- Huynh T., Mollard R., Trounsen A. 2002. Selected genetic factors associated with male infertility. *Human reproduction*. 8(2): 183-198.
- Krausz C., Forti G., McElreavey, K. 2003. The Y chromosome and male fertility and infertility. *International Journal of Andrology*. Vol.26(2): 70-75.
- Shefi, A., Turek, P., 2006. Definition and Current Evaluation of Subfertile Men. *International Braz J Urol*. Vol.32(4): 385-397.

ANEXO XI.



LA ASOCIACION MEXICANA DE GENETICA HUMANA, A.C.,  
LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA "BENITO JUÁREZ DE OAXACA"  
Y LA UNIVERSIDAD REGIONAL DEL SURESTE

**Otorgan la presente constancia a:**

J Rodríguez Guzmán, B Juárez Espinosa, R Sánchez Usbiaga.

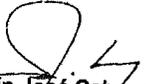
Por la presentación del trabajo titulado:

COMPARACIÓN DE LA INCIDENCIA DE MICRODELECCIONES DEL CROMOSOMA "Y" EN  
DOS POBLACIONES CON Y SIN ANTECEDENTES DE INFERTILIDAD.

**XXXII CONGRESO NACIONAL DE GENETICA HUMANA**

**"La Genética Clínica en la Era Genómica"**

Oaxaca, Oax., 7-11 de noviembre, 2007

  
Dr. Joaquín José Cabrera Juárez  
Rector de la URSE

  
Dra. Lorena Orozco  
Presidenta de la AMGH

  
C.P. Francisco Martínez Neri  
Rector de la UABJO