

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



DETECCION MOLECULAR DE MICRODELECCIONES
EN EL CROMOSOMA "Y" EN VARONES INFERTILES
CANDIDATOS PARA INYECCION
INTRACITOPLASMICA DE ESPERMATOZOIDES

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TITULO DE
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA:

ARELI HERRERA DIAZ

San Nicolás de los Garza, N. L.

Abril del 2003

FCB
UANL
2003

TL
RC889
.H47
2003
c.1

AND

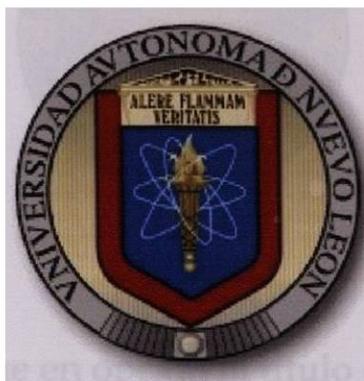


1080172954

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA



**DETECCIÓN MOLECULAR DE MICRODELECCIONES EN EL CROMOSOMA
"Y" EN VARONES INFÉRTILES CANDIDATOS PARA INYECCIÓN INTRA-
CITOPLÁSMICA DE ESPERMATOZOIDES**

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

PRESENTA

ARELI HERRERA DÍAZ

San Nicolás de los Garza, N.L.

Abril del 2003

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGÍA**



TESIS

**Que en opción al título de
Químico Bacteriólogo Parasitólogo**

PRESENTA

Areli Herrera Díaz

COMISION DE TESIS

**Dr. Roberto Montes de Oca Luna
PRESIDENTE**

**Dra. Diana Reséndez Pérez
SECRETARIO**

**Dr. Mario Morales Vallarta
VOCAL**

**Dra. Lydia Rivera Morales
SUPLENTE**

"Las verdades de ayer son hoy mentira, las de hoy quizá lo serán mañana; la incorregible vanidad humana siempre creyendo razonar delira"

Guillermo Blest Gana

"No sé lo que el mundo puede opinar de mí, pero a mi entender sólo he sido como el niño que juega en la playa y se divierte de tanto en tanto encontrando una piedra más lisa o una concha más bella de lo normal, mientras el gran océano de la verdad se extiende ante él totalmente sin descubrir"

Isaac Newton

"Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él"

Louis Pasteur

DEDICATORIA

A ése ser supremo que me ha permitido llegar hasta aquí y que como aconsejó su
Hijo sólo puedo nombrar *Abad...*

A mis dos grandes Héroeos en quienes confío, amo y a quienes debo ser lo que soy,
mis Padres Juan Herrera Ríos y Lupita Palomares Villalobos

A mi hermano Erick A. Herrera Palomares por ser parte de mi inspiración, por su
amistad y apoyo, aunque trate aparentar lo contrario

A todas esas personas que de alguna manera ayudaron a forjar mi carácter:
A mis abuelitos Elizabeth Ríos Martínez, Aurora Villalobos y Ernesto Palomares; a
mis tías y tíos: Elba, Titina, Tere, Gabriel, Jorge, Cesar, Nello, Mary, Lucy, Quique.

A todos los que en su momento y durante mi vida serán y fueron mis grandes
amigos, por orden de aparición: Tere, Mary, Carolina, Jessica, Juan Antonio, René,
Ricardo, Estrella, Karina, Vero, Erika Peña, Gerardo, Dalia, Poncho, Thelma, Rocío,
Santos, Jorge C, Almita, Teo, Rafa, Hamlet, Alicia, Gerardo, Ana, Katty, Jorge R,
Fito, Humberto, Jorge LB, Luis y Mario

A quien siempre me apoya y siempre llevo en mi corazón...

*Gracias por su compañía, paciencia, apoyo y comprensión... solo puedo agregar,
parafraseando a Manuel Acuña: Sin todos ustedes mi vida sería árida...*

AGRADECIMIENTOS

A mis buenos maestros de la Preparatoria Técnica Médica y de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, por sus conocimientos compartidos...

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por sus consejos, su apoyo, su amistad y principalmente por permitirme formar parte de su equipo de investigación.

Al QCB Roberto López Pérez Guzmán, el Dr. Mario Morales Vallarta y el M.C. Juan M. Adame Rodríguez; por su confianza, sus consejos y ejemplo, en mi recorrido por la vida...

A la Dra. Lydia Guadalupe Rivera y la Dra. Diana Reséndez Pérez por ser mi ejemplo a seguir como mujeres e investigadoras

Al Dr. Luis Bermúdez Humarán y al Biol. Julián López Reyes, por permitirme ser su “estorbante”; por su confianza, motivación y paciencia, cuando inicié en el laboratorio.

Al Biol. Abraham Castro Pérez por su irremplazable colaboración, y a el Biol. Arnulfo Villanueva por su ayuda en la presente tesis.

A mis amigos de carrera: Jeanny, Marco, Sussy, Ana, Estrella, Aimee, Lacho, René, Alma Elisa, Miguel, Mario

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Naima, Deyanira, Araceli, Abraham, Pablo, Arnulfo, Humberto, Armando, Gilberto, Julián, Elsa, Julio, Daniel, Sonia, Gina, Claudio, Belén, Ricardo, Gerardo, Solmila, Dianita.

De verdad gracias por involucrarse un poco en mi trabajo y en mi vida, a quienes a su forma me permiten recordar y amar mas a Dios: Jorge y Analí.

Al Sistema de Investigación Alfonso Reyes, (SIREYES) y al Programa de Apoyo a la Investigación en Ciencia y Tecnología (PAICYT), por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

Al Instituto de Estudios de la Concepción Humana (IECH). Especialmente al Biol. Genaro García y al Dr. Mauricio Canúl, quienes al participar en el proyecto proporcionaron las muestras.

ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología y Virología y en al Unidad de Manipulación Genética del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Roberto Montes de Oca Luna.



ÍNDICE GENERAL

Índice General.....	7
I. Resumen.....	10
II. Introducción.....	11
III. Antecedentes.....	12
3.1. Infertilidad Masculina.....	12
3.1.1 Factores Genéticos	13
3.2. Espermatogénesis.....	14
3.3. El Cromosoma Y.....	16
3.3.1. Genes DAZ y RBM en espermatogénesis.....	20
3.4. Alteraciones seminológicas.....	24
3.4.1. Oligozoospermia.....	24
3.4.2. Azoospermia.....	25
3.5. Microdeleciones en el Cromosoma Y.....	26
3.5.1. Microdeleciones y Marcadores STS.....	26
3.5.2. Localización de las microdeleciones.....	28
3.5.3. Microdeleciones en Regiones AZF y fenotipo.....	30
3.5.4. Frecuencia de las Microdeleciones.....	32
3.6. Reproducción Asistida en Infertilidad Masculina.....	32
3.6.1. Inyección Intra citoplásmica de Espermatozoides (ICSI).....	34
3.6.1.1. Transmisión Genética de Infertilidad mediante ICSI.....	37



IV. Objetivo General.....	39
4.1. Objetivos Específicos.....	39
V. Hipótesis	40
VI. Material y Equipo.....	41
VII. Metodología.....	42
7.1. Aislamiento de DNA.....	42
7.1.1. Técnica de TSNT.....	42
7.1.2. Técnica de “DE SALADO” (Salting-out).....	42
7.2. Marcadores Moleculares “STS”.....	43
7.3. Estandarización de la técnica de PCR para marcadores STS.....	46
7.3.1. Estandarización de las reacciones de PCR individuales.....	46
7.3.2. Estandarización de las reacciones de PCR múltiple.....	47
7.3.3. Análisis de pacientes utilizando PCR múltiple.....	47
7.3.4. Comprobación de microdeleciones utilizando un control interno.....	48
VIII. Resultados.....	48
8.1. Detección de varones con azoospermia y oligozoospermia severa.....	49
8.2. Obtención de DNA a partir de sangre periférica.....	50
8.3. Resultado de estandarización de las reacciones de PCR individuales.....	51
8.4. Resultado de estandarización de las reacciones de PCR múltiple.....	53
8.5. Resultado de estandarización de PCR con control interno.....	55
8.6. Resultado del Análisis de pacientes utilizando PCR múltiple.....	57



8.7 Detección molecular de Microdeleciones mediante PCR múltiple.....	59
8.8. Comprobación de Microdeleciones utilizando control interno.....	61
8.8.1. Ubicación de las microdeleciones en el cromosoma y del paciente afectado..	62
IX. Discusión.....	64
X. Conclusiones.....	70
XI. Índice de tablas.....	71
XII. Índice de figuras	72
XIII. Lista de abreviaturas.....	74
XIV. Literatura consultada.....	76





I. RESUMEN

La infertilidad es un problema de salud pública a nivel mundial; en México afecta del 10% al 15% de las parejas que desean procrear. Dentro de las causas de infertilidad, el factor masculino constituye hasta un 45%, caracterizándose por la presencia de alteraciones aisladas y/o combinadas en la movilidad, la morfología, la capacidad funcional y el número de espermatozoides. Sin embargo, una pareja con problemas de esterilidad por causa del factor masculino, cuenta con tecnologías de diagnóstico y de reproducción asistida que le permiten alcanzar el objetivo de convertirse en padres. Tal es el caso de la Inyección Intra citoplásmica de Espermatozoides (ICSI en inglés), un tratamiento relativamente nuevo de infertilidad que utiliza tecnología de micro manipulación .

Las causas de la infertilidad masculina son muy variadas, desde factores ambientales hasta de origen genético. Estudios moleculares han sugerido que microdeleciones en el cromosoma Y, principalmente en las regiones AZFa, AZFb, y AZFc, en donde se encuentran diversos genes involucrados en la espermatogénesis, representan un factor etiológico de infertilidad del 1 al 55% en pacientes con azoospermia y oligozoospermia severa idiopáticos.

Utilizando marcadores moleculares STS (sequence-tagget site) en el presente trabajo se estandarizaron pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) sencillos y múltiples, de la región AZFa, también se utilizaron marcadores localizados en AZFb y AZFc previamente estandarizados, en total se utilizaron veintinueve marcadores STS para buscar microdeleciones en el Cromosoma Y, de pacientes que recurrieron a ICSI como tratamiento de infertilidad.

Se seleccionaron un total de 46 varones con cuentas anormales de espermatozoides, de los cuales 6/46 presentaban Azoospermia, 15/46 presentaron oligozoospermia y 25/46 oligozoospermia severa. A cada paciente se le extrajo sangre periférica para aislar DNA y realizar el tamizaje genético.

De los pacientes analizados se logró la detección de microdeleciones en un paciente oligozoospermico severo, el cual presentaba la deleción de 10 marcadores moleculares (STS), 8 de ellos localizados en el gen DAZ, de la región AZFc. Además se comprobó la confiabilidad de la técnica al detectar microdeleciones en una muestra proporcionada por otro equipo de investigación.

Los resultados obtenidos permitieron diferenciar entre una esterilidad masculina idiopática de una genética, logrando con esto, brindar un consejo genético a la pareja.



II. INTRODUCCIÓN

La infertilidad es un problema de salud pública con una frecuencia mas alta de lo que se considera; a nivel mundial afecta a un 10% de las parejas que desean procrear. En nuestro país, según datos del Consejo Nacional de Población (CONAPO) la población en edad fértil es de 61.7 millones de los cuales se calculan más de 20 millones de parejas.

Dentro de las causas de infertilidad de las parejas el factor masculino constituye entre un 23% a un 50%, caracterizándose por la presencia de alteraciones aisladas o combinadas en la movilidad, la morfología, un claro defecto en la capacidad funcional y en el número de espermatozoides. Sin embargo, una pareja con problemas de esterilidad por causa del factor masculino, tiene a su alcance muchas tecnologías de diagnóstico y de reproducción asistida que le permiten alcanzar el objetivo de convertirse en padres. Tal es el caso de la Inyección Intra citoplásmica de Espermatozoides (ICSI en inglés), un tratamiento relativamente nuevo que permite solucionar los problemas de infertilidad, utilizando tecnología de micro manipulación, que se aplica específicamente en casos de infertilidad de causas masculinas severas.

Las causas de la infertilidad masculina son muy variadas, desde factores ambientales hasta de origen genético. Estudios moleculares han sugerido que microdeleciones en el cromosoma Y, principalmente en las regiones AZFa, AZFb, y AZFc, en donde se encuentran diversos genes involucrados en la espermatogénesis, representan un factor etiológico de infertilidad del 1 al 55% en pacientes con azoospermia (ausencia de espermatozoides) y oligozoospermia severa (menos de 1 millón de espermatozoides por mililitro) idiopática.

Una de las ventajas del diagnóstico de microdeleciones en el cromosoma Y son el poder diferenciar entre una esterilidad masculina idiopática y genética. Por otra parte, las personas con este padecimiento de tipo genético disponen de la información que les permite medir el riesgo de transmitir su problema de infertilidad a su descendencia, como consecuencia de las técnicas de reproducción asistida.

En el presente trabajo se estandarizó una metodología basada en PCR para la identificación de microdeleciones y su aplicación en el análisis de 46 pacientes que ingresaron a un programa de ICSI.



III. ANTECEDENTES

3.1. INFERTILIDAD MASCULINA

La infertilidad es un problema de salud que a nivel mundial afecta a un 10% de las parejas; en México el porcentaje varía del 10% al 15% (Vázquez, 1999). Los hombres representan en promedio un 45% de la causa de infertilidad en la pareja; el origen etiológico de esta infertilidad masculina puede ser determinado en base a una historia clínica detallada, así como a estudios de laboratorio que los complementen; actualmente se reporta un 15% de infertilidad sin causa aparente, conocida como idiopática.

Kretser *et al.*, (1997, 1999) muestran en sus publicaciones las alteraciones seminológicas en pacientes infértiles y clasifican la etiología de la infertilidad masculina en tres grandes grupos denominados: pre-testiculares, testiculares y post-testiculares (Tabla 1).

Tabla 1. Factores etiológicos de infertilidad masculina

Pre- testicular	Testicular	Post- testicular
Endocrino	Genética	Obstructiva
Hipogonadotrópico	Sínd. Klynefelter	Epididimal
Hipogonadismo	<u>Deleciones Cromosoma Y</u>	Congénita
Desordenes coitales	Sínd. Cilios inmóviles	Infeciosa
Disfunción eréctil	Congénitos	Vasos
Psicosexual	Cryptorquidismo	Genética: Fib. Quística
Endocrino/Neural/Vascular	Infecioso (orquitis)	Adquirida: Vasectomía
Falla eyaculatoria	Antic. Antiespermáticos	Hostilidad epidídima
Psicosexual	Calor	Astenozoospermia epidídima
Cirugía post-genitourinaria	Quimioterapia	Infec. Glándulas accesorias
Neural	Radiación	Inmunológica
Relacionado a drogas	Vasculares	Idiopática
	Torsión	Post-vasectomía
	Varicocele	
	Inmunológicos	
	Idiopáticos	



3.1.1. FACTORES GENÉTICOS E INFERTILIDAD MASCULINA

Estudios realizados por Irvine *et al.*, en 1998 demuestran una disminución en la cuenta de espermatozoides, así como un deterioro en la calidad de los espermatozoides de los varones a nivel mundial, durante los últimos cincuenta años. La etiología de las anomalías en la espermatogénesis ha sido atribuida a problemas endócrinos, infecciosos, anatómicos, congénitos, adquiridos o idiopáticos (Sharpe y Franks, 2002).

Al analizar la etiología de tipo congénita, Crow en el 2000 revelan que la frecuencia de mutaciones en células germinales masculinas es mas alta que en mujeres, debido al número de divisiones celulares, lo que hace más probable el origen de mutaciones *de novo*.

Las alteraciones genéticas son responsables de una gran variedad clínica de infertilidad masculina. Hackstein *et al.*, en el 2000 determinaron que la infertilidad masculina con y sin defectos en la espermatogénesis tiene bases hereditarias. Estos estudios se vieron reforzados por el OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man database), la principal biblioteca virtual de información sobre la función de genes, donde en el año 2000 existía una lista de aproximadamente 50 desórdenes monogénicos asociados con la infertilidad masculina.

Entre las causas genéticas conocidas de infertilidad masculina destacan: el Síndrome de Kallman, la Distrofia Miotónica, la obstrucción congénita de las vías deferentes (CBAVD) en la que los pacientes son portadores de mutaciones en el gen CFTR causante de la Fibrosis Quística, expansión del trinucleótido CAG en el gen del receptor de andrógenos, mutaciones en los genes de gonadotropina y



receptores de gonadotropina, Criptorquidismo y una de las causas mas frecuentes y de las mas estudiadas, en la que se enfoca el presente trabajo, son las Microdeleciones en el Cromosoma Y (Abusheikha *et al.*, 2001; Aclaren, 1998; Foresta *et al.*, 1999; Hackstein *et al.*, 2000; Briton-Jones y Haines., 2000; Jadranka *et al.*, 2001).

3.2. ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis es un proceso único de diferenciación continua (Figura1), que en humanos requiere entre 72 y 74 días para la maduración completa de las células germinales (espermatogonias) hasta espermatozoides. En los túbulos seminíferos, las células de Sertoli nutren a las células germinales y regulan su maduración, mientras que las células de Leydig se encuentran rodeando los túbulos seminíferos y producen testosterona, necesaria para el mantenimiento de la espermatogénesis (Alberts *et al.*, 1994; Okwun *et al.*, 1996).

Los espermatozoides se forman en los túbulos seminíferos de los testículos a partir de la madurez sexual. Los túbulos están llenos de espermatogonias, que se encuentran en distintas etapas de diferenciación, estas células se desarrollan a partir de las células germinales primordiales, por medio de una larga serie de mitosis. El siguiente tipo de células en la secuencia del desarrollo es el espermatocono primario, que experimenta una Meiosis I para formar dos espermatoconos secundarios, y cada uno de estos forma dos espermátidas las cuales se elongan durante un proceso conocido como espermiogénesis.

Durante el proceso de espermiogénesis las espermátidas se convierten en espermatozoides, sin necesidad de mas divisiones, se compacta la cromatina dentro de la cabeza del espermatozoide y se producen proteínas necesarias para el

espermatozoide (Alberts *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 2001; Champion y Hauley, 2002; Maymon *et al.*, 2000).

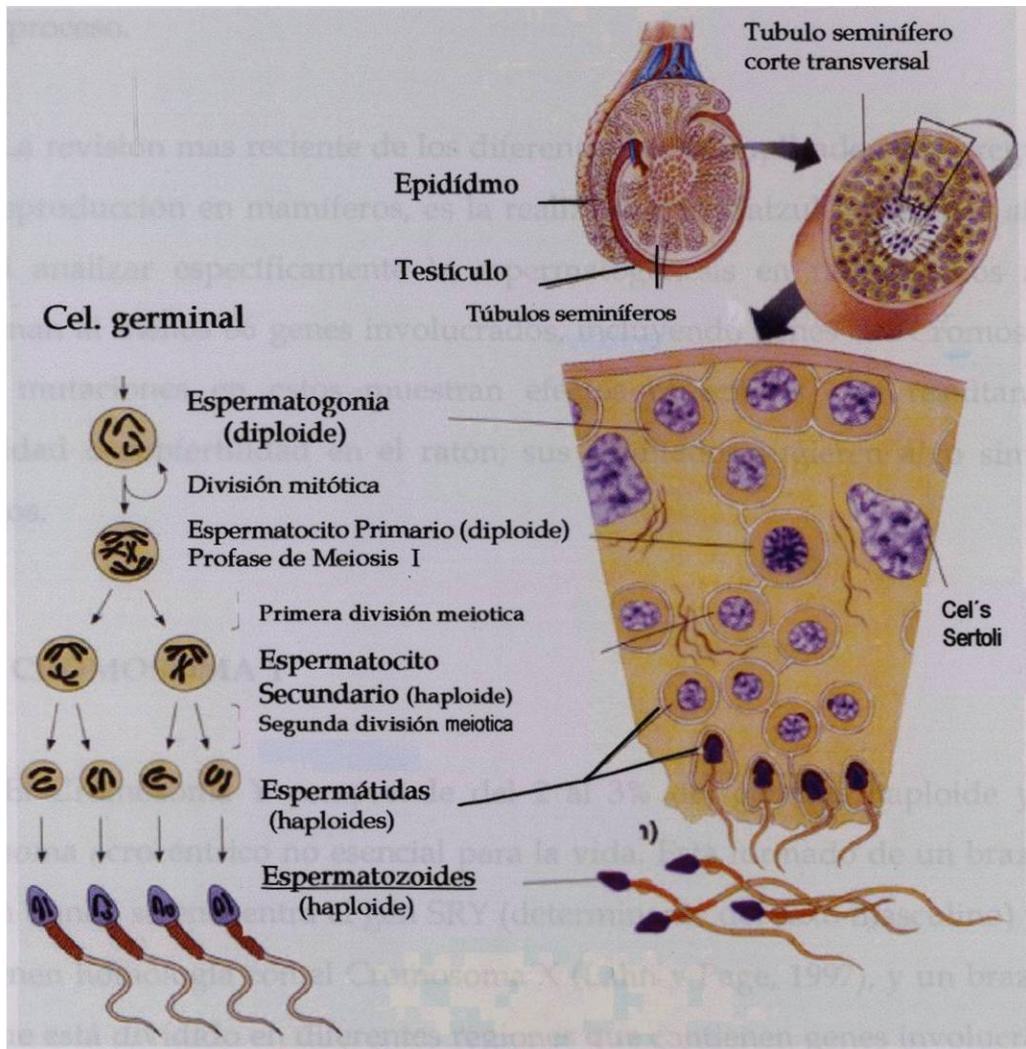


Figura 1. Representación esquemática de la espermatogénesis: A la derecha de la figura se ve un corte transversal del testículo, donde se ubican los túbulos seminíferos, en ellos se encuentran las células germinales o espermatogonias, las cuales están rodeadas de células de Sertoli que le proporcionan alimento. A la izquierda de la imagen se presentan las fases de la espermatogénesis, indicando el tipo de división celular. Tomado y modificado de: www.sunyduthces.edu/.../Bio102



Con los avances de la ingeniería genética ha sido posible identificar diferentes genes implicados en la espermatogénesis. Estudios realizados por Okabe *et al.*, en 1998 reportan genes ubicados en cromosomas autosómicos, involucrados en este proceso.

La revisión mas reciente de los diferentes genes implicados en la regulación de la reproducción en mamíferos, es la realizada por Matzuk y Lamb *et al.*, en el 2002 al analizar específicamente la espermatogénesis en ratones. Los autores mencionan al menos 86 genes involucrados, incluyendo genes del Cromosoma Y, donde mutaciones en estos muestran efectos específicos que resultan en la infertilidad o subfertilidad en el ratón; sus resultados sugieren algo similar en humanos.

3.3. EL CROMOSOMA Y

El Cromosoma Y comprende del 2 al 3% del genoma haploide y es un cromosoma acrocéntrico no esencial para la vida. Esta formado de un brazo corto (Yp) en donde se encuentra el gen SRY (determinante del sexo masculino) y genes que tienen homología con el Cromosoma X (Lahn y Page, 1997), y un brazo largo (Yq) que está dividido en diferentes regiones que contienen genes involucrados en la espermatogénesis.

El Cromosoma Y ha sido mapeado de manera considerable, aunque no completamente, al utilizar una combinación de estudios de mapeo-delección, que definen intervalos específicos. Para esto se han empleado diferentes sistemas como YAC (Cromosomas Artificiales de Levaduras), PAC (Cromosomas Artificiales de



Plásmidos) y BAC (Cromosomas Artificiales de Bacterias). Además han servido para identificar genes candidatos a la espermatogénesis (Affara, 2001).

Foresta *et al.*, en el 2001 realizaron una revisión de los principales mapeos cromosómicos del Cromosoma Y efectuados hasta esa fecha, por los diferentes equipos de investigación (Figura 2).

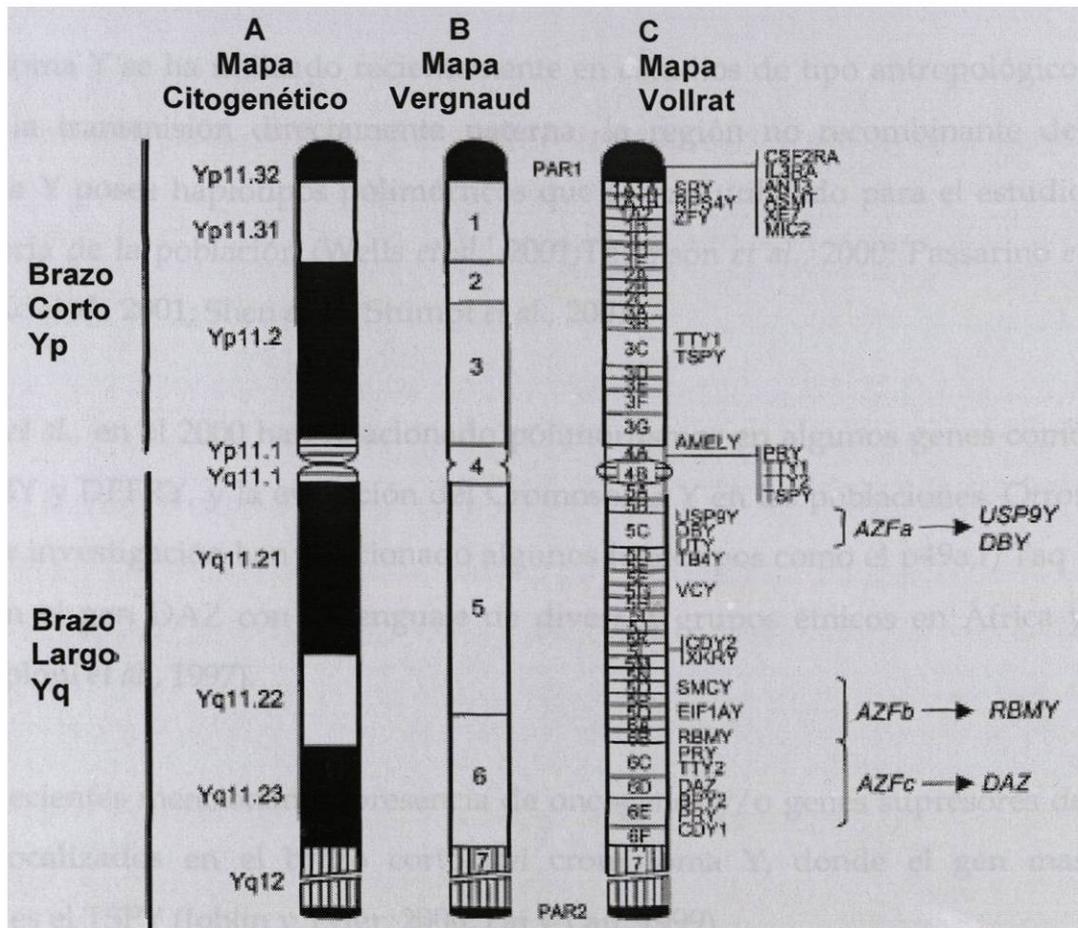


Figura 2. Mapas del Cromosoma Y. A, Representación de las bandas citológicas del Cromosoma Y. El brazo corto se denomina Yp y el brazo largo Yq, este último se subdivide en Yq11 (región eucromática) y Yq12 (Región heterocromática). B, Los siete intervalos de el mapa del Cromosoma Y de Vergnaud *et al.*, (1986) donde los intervalos 1-4 se encuentran en el brazo corto y el centrómero, los intervalos 5 y 6 se encuentran en la región eucromática, y el intervalo 7 se encuentra en la región heterocromática. C, Los 43 intervalos del mapa del cromosoma Y según Vollrat *et al.*, (1992). A la derecha se presenta una lista de los principales genes mapeados en el Cromosoma Y con su localización en las regiones AZF.



Mediante estudios citogenéticos el Cromosoma Y se ha dividido en tres regiones: región pseudoautosómica, región eucromática y región heterocromática. Con técnicas modernas de mapeo cromosómico se han identificado al menos 50 genes, en el cromosoma Y, algunos de los cuales se expresan únicamente en testículos (Lahn y Page, 1997; Ma *et al.*, 2000).

El Cromosoma Y se ha utilizado recientemente en estudios de tipo antropológico, debido a la transmisión directamente paterna; la región no recombinante del cromosoma Y posee haplotipos polimórficos que se han utilizado para el estudio de la historia de la población (Wells *et al.*, 2001; Thomson *et al.*, 2000; Passarino *et al.*, 1998; Ke *et al.*, 2001; Shen *et al.*, Stumpf *et al.*, 2001).

Thomson *et al.*, en el 2000 han relacionado polimorfismos en algunos genes como SMCY, DBY y DFFRY, y la evolución del Cromosoma Y en las poblaciones. Otros equipos de investigación han relacionado algunos haplotipos como el p49a,f/Taq I ubicado en el gen DAZ con el lenguaje de diversos grupos étnicos en África y Europa (Poloni *et al.*, 1997).

Estudios recientes mencionan la presencia de oncogenes y/o genes supresores de tumores localizados en el brazo corto del cromosoma Y, donde el gen mas estudiado es el TSPY (Joblin y Tyler, 2000; Fai y Lau, 1999).

Este cromosoma, además de contener el gene SRY determinante del sexo (Foster JW, 1992) tiene grupos de genes involucrados en proporcionar algunas de las características dimórficas masculinas como la estatura (Roldan y Gomendio, 1999).



Los genes ubicados en la región no recombinante del Cromosoma Y, pueden ser divididos como ubicuitos y aquellos que solo se expresan en testículo, lo que supone su rol importante en la espermatogénesis (Lahn y Page, 1997).

McElreavy y Krausz (1999), realizaron una revisión de los genes ubicados en el Cromosoma Y, y la relación de éstos con la espermatogénesis; en su revisión realizan una clasificación mas completa de los dos grupos de genes, los de expresión ubicuota y los de expresión específica de testículo, que se describen a continuación.

En el primer grupo se incluyen los genes: *DFFRY* (*Drosophila* fats facets related Y), este gen codifica para un antígeno menor de transplante específico de varones, involucrado en el rechazo a injerto de médula ósea (Vogt *et al.*, 2000). El gene *DBY* (Dead box Y) codifica para una proteína que podría ser una RNA helicasa (Lahn y Page, 1997). El gen *UTY* (Ubiquitous tetratricopeptide repeat motif Y), codifica para un antígeno menor de histocompatibilidad-HLA-B60-específico de varón (Vogt *et al.*, 2000). El gen *eIF-1AY* (Eukaryotic translation-initiation-factor 1A Y isoform), codifica para un factor iniciador de la traducción (Lahn y Page, 1997). El gen *SMCY* (Selected mouse cDNA on the Y) codifica para un epítipo del antígeno H-Y, y el gen *TB4Y* (Thymosin β 4 Y isoform) codifica una proteína involucrada en el secuestro de actina (McElreavy y Krausz, 1999)

Estos genes se encuentran en el intervalo 5 del Cromosoma Y, son de expresión ubicuota y solo existe una copia; además, presentan una variación muy pequeña en algunos aminoácidos con respecto a su gen homólogo en el cromosoma X los cuales escapan a la inactivación del X. (Chanddley, 1994).

Del grupo de genes que solo se expresan en testículo se incluyen: *CDY* (Chromodomain Y) involucrado en la modificación de las cromátidas durante la



espermatogénesis; *XKRY* (XK-related Y) una probable proteína de transporte en la membrana; *PTP-BL* (Protein-tyrosine phosphatase BAS-like) ó *PRY* (Protein-related Y) de los cuales existen cuatro genes, dos ubicados en el intervalo 6, codifican una proteína de probable transporte en la membrana (Stouffs *et al.*, 2001); genes *BPY1* y *BPY2* (Basic Proteins Y1 and Y2) de función no conocida, y los mas estudiados *RBM* (RNA-binding-motif) y *DAZ* (Deleted in Azoospermia). Estos últimos genes contienen múltiples copias en el cromosoma Y, no presentan homólogos en el cromosoma X (McElreavey y Krausz, 1999).

3.3.1. GENES DAZ Y RBM EN ESPERMATOGÉNESIS

En el intervalo 6 del Cromosoma Y existen dos genes en particular que han sido estudiados ya que su frecuencia de deleción es muy alta en varones infértiles, uno es el Motivo de Reconocimiento del RNA en el Cromosoma Y (*YRRM/RBM*) y el otro gen es el Deletado en Azoospermia (*DAZ*). Cooke *et al.*, en 1998 realizaron una revisión de los genes involucrados en la espermatogénesis, destacando la participación de los genes *DAZ* y *RBM* en ésta.

Venables *et al.*, en 1999 reafirman que el producto de estos genes son proteínas citoplásmicas (*DAZ*) y nucleares (*RBM*) de unión a RNA y que son esenciales en la espermatogénesis. Su papel funcional en la espermatogénesis se ve sustentado en varias evidencias: el patrón de expresión específico de células germinales masculinas, la presencia de motivos RRM (Motivos de Reconocimiento de RNA), el papel funcional de sus genes homólogos relacionado a espermatogénesis, en otros organismos, y por último los efectos de infertilidad en pacientes con microdeleciones en estos genes.



La Familia de Genes RBM

El primer gen asociado con la región AZF (Factor de Azoospermia) del Cromosoma Y fue RBM (Ma *et al.*, 1993), es un miembro de la familia de genes que codifican proteínas de unión al RNA (RNA-binding protein), el cual está representado en múltiples copias en diferentes regiones del cromosoma Y, y al menos una copia está localizada en la región AZFb y su delección se relaciona con alteraciones seminológicas (Kadandale *et al.*, 2002).

La proteína *RBM* se halla exclusivamente en células germinales de testículo, es una proteína nuclear que está involucrada en el procesamiento del RNA durante la espermatogénesis. Es posible que el gen *RBM* juegue un papel importante durante el splicing (procesamiento del RNA), de las moléculas pre-mRNA, ya que contiene un dominio RRM amino-terminal y regiones ricas en dipéptidos SR (Reguladores del Splicing); además, se ha demostrado su interacción *in vitro* con la proteína nuclear TRA2 β , la cual se sabe regula el splicing alternativo. RBM tiene una proteína homóloga en *Drosophila*, involucrada en el splicing alternativo, que permite la determinación del sexo (Elliot *et al.*, 1998).

La familia de genes DAZ

La familia de los genes *DAZ* comparten ciertas características con la familia de genes *RBM* (Reijo *et al.*, 1995; Venables *et al.*, 1999) (Figura 3). Habermann *et al.*, en 1998 mediante experimentos de inmunotinción con anticuerpos específicos para un dominio de la proteína DAZ, detectaron la proteína en la parte mas interna del epitelio de las células germinales y en el tallo de los espermatozoides, lo que sugiere una función en el metabolismo del RNA de espermátidas tardías, posiblemente en el almacenamiento o el transporte del RNAm específico de testículo.

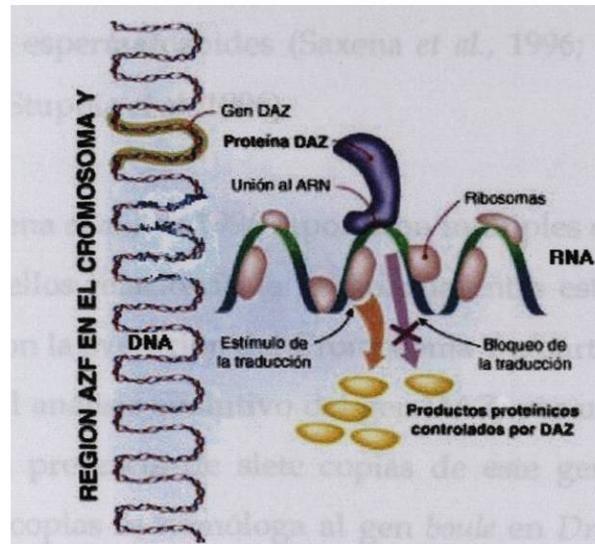


Figura 3. Proteína DAZ. El gen DAZ contiene siete exones con diferentes sitios de splicing, codifica para una proteína cuya región amino-terminal tiene capacidad de unirse al ARN, modificando la expresión genética. Tomado de : <http://www.iladiba.com.co/revista/1995/09/avgen.asp>

En humanos existe otro gen homólogo a DAZ en el cromosoma 3(p24) nombrado *DAZL1* ó *DAZLA*, y en ratones se identificó un gen homólogo a DAZ en el cromosoma 17 que corresponde al gen *Dazl1* ó *Dazla*. Se ha demostrado que el gen *Dazl1* codifica para una proteína esencial en la gametogénesis, ya que su inactivación (mediante recombinación homóloga en células germinales) afecta dicho proceso, tanto en machos como en hembras (Ruggiu *et al.*, 1997).

Slee *et al.*, en 1999 demostraron el papel crucial del gen DAZ en la espermatogénesis, así como la homología en funcionalidad entre los genes DAZ (humano) y *Dazl1* (ratón), ya que lograron conferir un rescate parcial en el fenotipo de ratones *Dazl1* mutantes, al introducir un transgen DAZ humano.

DAZ es el gen que más frecuentemente se deleta en pacientes con Azoospermia y Oligozoospermia; se sabe que la delección en estos pacientes interfiere con la



maduración de los espermatozoides (Saxena *et al.*, 1996; Habermann *et al.*, 1998; Simoni *et al.*, 1997; Stuppia *et al.*, 1996).

Originalmente Saxena *et al.*, en 1996 reportaron múltiples copias del gen DAZ, en el Cromosoma Y, ellos relacionan la homología entre estos genes DAZ y el gen funcional DAZH con la evolución del Cromosoma Y a partir de genes autosómicos. Continuando con el análisis evolutivo del gen DAZ, por un lado Eberhart *et al.*, en 1996 reportaron la presencia de siete copias de este gen en el intervalo AZFc, donde una de las copias es homóloga al gen *boule* en *Drosophila*, posterior a este reporte Houston *et al.*, en 1998 encontraron una homología significativa del gen DAZ con el gen XDAZ en *Xenopus*. Sin embargo estudios mas recientes realizados por diferentes grupos de investigación, en el año 2000, demostraron que no son siete las copias del gen DAZ, en realidad existen dos regiones con dos genes DAZ, cada uno, orientados cabeza-cabeza (Saxena *et al.*, 2000; Vries *et al.*, 2002) (Figura 4).

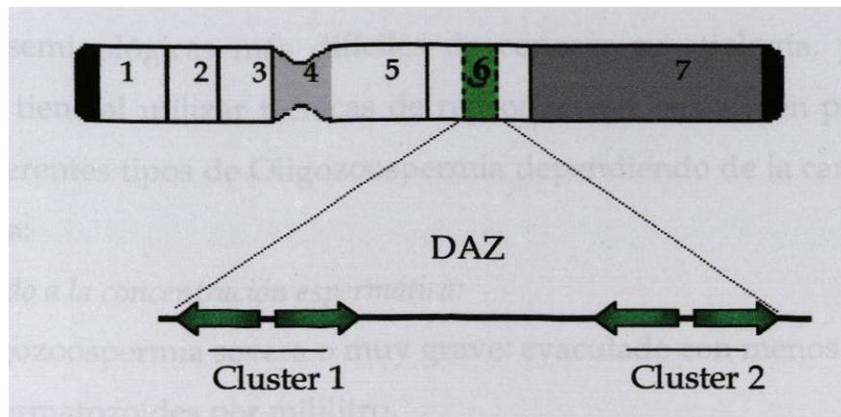


Figura 4. Organización genómica del gen DAZ. El gen DAZ se encuentra en el intervalo 6 de la región AZFc, del Cromosoma Y, en dos cluster con cuatro copias del gen orientados cabeza-cabeza cada uno (la homología entre ellos es de 99.8%.)



3.4. ALTERACIONES SEMINOLÓGICAS

Cuando el factor de infertilidad es de tipo masculino se sabe que al menos en el 35% de los casos, los varones presentan alteraciones seminológicas, con un claro trastorno en la capacidad funcional de sus espermatozoides (Bahsin *et al.*, 1994). Son dos las alteraciones seminológicas más documentadas, según la Organización Mundial de la Salud y organismos internacionales que dictan las pautas en reproducción humana: la Oligozoospermia y la Azoospermia (WHO, 1992).

3.4.1. OLIGOZOOSPERMIA

La Oligozoospermia (menos de 20 millones de espermatozoides por mililitro) es junto con la astenozoospermia (espermatozoides anormales) la de mayor frecuencia en la clínica de la infertilidad masculina, y es una de las entidades seminológicas más difíciles de conocer su etiología, y la que mejor pronóstico tiene al utilizar técnicas de reproducción asistida en parejas infértiles. Existen diferentes tipos de Oligozoospermia dependiendo de la cantidad y calidad espermática:

1. Atendiendo a la concentración espermática:

- a) Oligozoospermia severa o muy grave: eyaculado con menos de un millón de espermatozoides por mililitro.
- b) Oligozoospermia grave: eyaculado con una concentración de 1-10 millones de espermatozoides por mililitro.
- c) Oligozoospermia moderada: eyaculado con una concentración entre 10 y 20 millones de espermatozoides por mililitro



2. Atendiendo a la calidad espermática:

- a) Oligozoospermia u oligozoospermia pura: el 50% o más de los espermatozoides tienen motilidad progresiva y son morfológicamente normales.
- b) Oligoastenozoospermia: menos del 50% de los espermatozoides tienen motilidad progresiva, siendo adecuado el porcentaje de células morfológicamente normales.
- c) Oligoteratozoospermia: menos del 50% de los espermatozoides tienen una morfología normal, presentando un porcentaje adecuado de motilidad progresiva.
- d) Oligoastenoteratozoospermia: menos del 50% de los espermatozoides tienen motilidad progresiva y una morfología normal.

3.4.2. AZOOSPERMIA

Se define como Azoospermia a la ausencia de espermatozoides en el eyaculado. La azoospermia puede ser a consecuencia de alteraciones de la espermatogénesis (patología secretora), la obstrucción de la vía seminal (patología excretora) o la combinación de ambas (patología mixta).

Ante el diagnóstico de origen secretor el paciente únicamente tiene tres alternativas: resignación, adopción o inseminación con semen de donante.

La única excepción la constituye el hipogonadismo hipogonadotrófico, ya que el tratamiento con gonadotrofinas permite la recuperación de espermatozoides en el eyaculado.

En la azoospermia excretora, mediante técnicas de microcirugía y endoscopia puede restablecerse en algunos casos la permeabilidad de la vía seminal. Si se hallan espermatozoides móviles, se ofrece a los pacientes la recuperación espermática peroperatoria combinada a técnicas de fertilización *in vitro*.



3.5. MICRODELECCIONES EN EL CROMOSOMA Y

Aunque se ha establecido desde los años setentas que deleciones en el brazo largo del cromosoma Y (Yq) están asociadas con fallas en el proceso de espermatogénesis, solo en los últimos años estas regiones han sido descritas a nivel molecular. Además, se han identificado genes y familias de genes en el cromosoma Y que pueden explicar los fenotipos de los hombres que presentan estas deleciones (Krausz *et al.*, 1999, 2001).

3.5.1. MICRODELECCIONES Y MARCADORES STS

Se conoce como Delección a la pérdida de uno o mas pares de bases en la secuencia del DNA. Cuando las deleciones no son visibles mediante procedimientos citogenéticos se denominan Microdeleciones.

Las Microdeleciones se originan principalmente por mutaciones espontáneas debido a la recombinación entre secuencias repetidas. Existen varias enfermedades genéticas originadas por este tipo de recombinaciones entre secuencias repetidas, las cuales dependiendo de la orientación de la secuencia repetida se producen deleciones o duplicaciones (Griffiths *et al.*, 1998).

En algunos casos las secuencias repetidas flanquean a un gen o grupo de genes, de manera que al recombinar eliminan dichos genes, en otros casos, las secuencias repetidas están dentro del mismo gen, de manera que al recombinar eliminan una región del mismo. A este último tipo se les denomina deleciones intersticiales o intragénicas (Figura 5).



Las deleciones pueden originarse por errores en la replicación del DNA, y/o por los mecanismos de recombinación empleados por uno o varios sistemas enzimáticos celulares que reconocen secuencias repetidas.

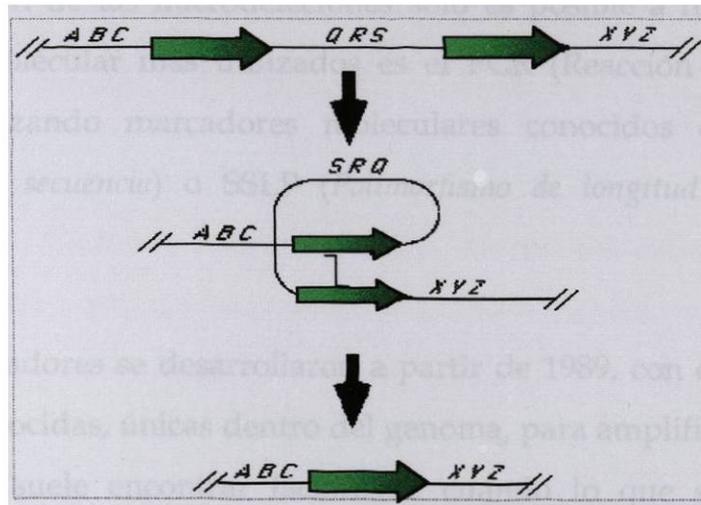


Figura 5. Mecanismo de Deleciones intersticiales por recombinación homóloga. Las letras mayúsculas representan la secuencia del gen, la flecha verde indica la secuencia repetida, ambas secuencias repetidas tienen la misma orientación, al ocurrir la recombinación se pierde una parte interna del gen (representado como QRS).

El Cromosoma Y se caracteriza por presentar varias familias de genes con secuencias repetidas, lo que podría explicar la alta frecuencia de microdeleciones en varones infértiles con alteraciones seminológicas (Foresta *et al.*, 1997; Jobling *et al.*, 1996).

Se ha demostrado además que no únicamente la presencia de familias de genes con secuencias repetidas es la causa de las microdeleciones. Kamp *et al.*, en el 2000 encontraron deleciones en la región AZFa en los seis pacientes analizados. Ellos al igual que Sun *et al.*, en el 2000 detectaron la presencia de secuencias homólogas de retrovirus endógenos adyacentes a la región AZFa. Sus resultados sugieren que el



evento de recombinación intracromosómica entre los retrovirus endógenos originó la deleción.

La detección de las microdeleciones solo es posible a nivel molecular. El procedimiento molecular más utilizados es el PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), utilizando marcadores moleculares conocidos como STS (*Sitios etiquetados por la secuencia*) o SSLP (*Polimorfismo de longitud en las secuencias discretas*).

Estos marcadores se desarrollaron a partir de 1989, con ellos se aprovecha las secuencias conocidas, únicas dentro del genoma, para amplificarlas por PCR. El polimorfismo se suele encontrar fácilmente cuando lo que se amplifican son intrones en lugar de exones. La ventaja principal es la velocidad con la que se pueden realizar los análisis una vez que las parejas de oligonucleótidos se han establecido claramente.

La presencia de microdeleciones puede ser detectada por la amplificación de productos de PCR de menor tamaño al esperado, o la ausencia de éste (The Centre Sanger and The Center Sequencing Genome Washington University, 1998).

3.5.2 LOCALIZACIÓN DE LAS MICRODELECCIONES

La primera asociación entre fallas en la espermatogénesis y una causa genética fue demostrada por Tiepolo y Zuffardi, (1976), en un reporte de seis pacientes azoospermicos portadores de deleciones microscópicamente detectables en la porción distal de Yq; en cuatro pacientes, la deleción fue *de novo*. Con estas bases ellos propusieron la existencia de un factor de espermatogénesis, llamado



“factor de azoospermia” (AZF), el cual suponían codificaba para un gen y se encontraba localizado en Y(q) (Kretser, 1997).

Sin embargo, la suposición de que AZF está representado por un simple gen ligado al Cromosoma Y fue refutado cuando Vogt *et al.*, en 1996 observaron que microdeleciones en el cromosoma Y seguían un cierto patrón. Detectaron tres subregiones deletadas recurrentemente no traslapadas en Yq proximal, medio y distal, denominados “AZFa”, “AZFb” y “AZFc” respectivamente. El tamaño físico de estas regiones se ha estimado en aproximadamente 800 Kilobases para AZFa, la cual fue caracterizada por Sargent *et al.*, en 1999 y la región AZFb comprende alrededor de 1.4 Mb (Mega base).

La región AZFc fue mapeada por Kuroda-Kawaguchi *et al.*, en el 2001 quienes determinaron que comprendía un tamaño de 4.5 Mb con seis familias de amplicones (unidades repetidas masivas), las cuales pueden recombinar entre ellas y causar una deleción de 3.5Mb en pacientes azoospermicos y oligozoospermicos severos (Figura 6).

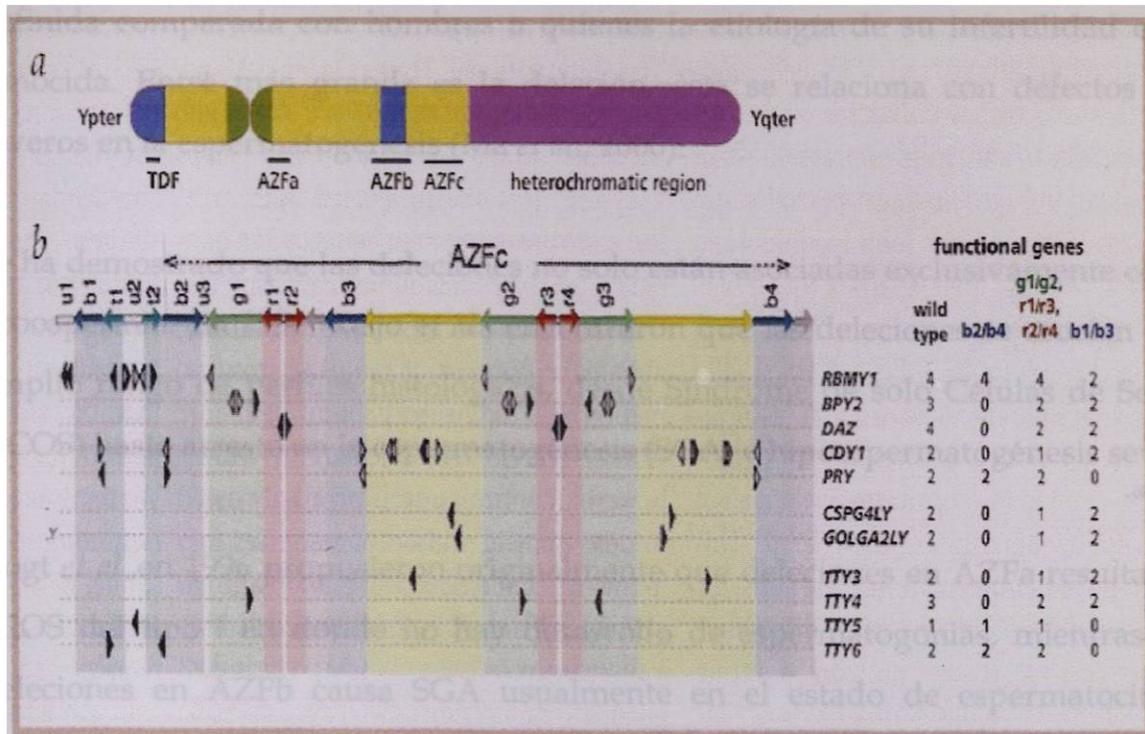


Figura 6. Región AZFc. a. Cromosoma Y, mostrando los locus con funciones propias del género masculino: TDF (Factor Determinante de Testículos) y las regiones AZF. b. Mapa de amplicones y regiones de transcripción de la región AZFc. Son seis las familias de amplicones (unidades repetidas masivas), mostradas de diferente color. La recombinación puede ocurrir entre los pares de amplicones, que se encuentran en la misma orientación, provocando la delección del segmento interno. En la tabla de la derecha se muestran los genes ubicados en el cromosoma Y, los números de los genes potencialmente funcionales (triángulos rellenos) y los genes que permanecen después de los eventos de recombinación.

3.5.3. MICRODELECIONES EN REGIONES AZF Y FENOTIPO

Las microdeleciones son encontradas casi exclusivamente en varones afectados por azoospermia u oligozoospermia severa, y ocasionalmente en pacientes con alguna otra anomalía andrológica. En hombres azoospermicos se ha encontrado una frecuencia elevada de microdeleciones en Yq, comparada con hombres oligozoospermicos, así como en hombres con infertilidad idiopática bien





definida comparada con hombres a quienes la etiología de su infertilidad es ya conocida. Entre más grande es la deleción, ésta se relaciona con defectos más severos en la espermatogénesis (Ma *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que las deleciones no solo están asociadas exclusivamente con la azoospermia. En 1996, Reijo *et al.*, encontraron que las deleciones se asocian a un amplio rango de perfiles histológicos, desde Síndrome de solo Células de Sertoli (SCOS) hasta arresto en la espermatogénesis (SGA) e hipoespermatogénesis severa.

Vogt *et al.*, en 1996 propusieron originalmente que deleciones en AZFa resultan en SCOS del tipo I en donde no hay desarrollo de espermatogonias, mientras que deleciones en AZFb causa SGA usualmente en el estado de espermatocito, y deleciones en AZFc están asociadas con una gran variedad de fenotipos, variando desde el SCOS tipo II (ausencia de células germinales en la mayor parte de los túbulos testiculares) a hipoespermatogénesis (presencia de células germinales normales aunque en número reducido). En general, estudios subsecuentes han reafirmado estos descubrimientos; además también se han reportado deleciones en AZFa y AZFb en varones oligozoospermicos (Kobayashi *et al.*, 1995; Brandell *et al.*, 1998; Landuyt *et al.*, 2001; Kleiman *et al.*, 2001).

Por otro lado, Fujisawa *et al.*, en el 2001 realizaron un estudio para correlacionar la presencia de microdeleciones con los diferentes fenotipos clínicos. Ellos confirmaron lo encontrado por otros equipos de investigación (Ferlin *et al.*, 1999; Bar-Shira *et al.*, 2000), al determinar que la región mas importante para hacer un tamizaje es la región AZFc. Además relacionaron las regiones AZFa y b con la presencia de células germinales; determinaron además que microdeleciones en la región AZFc no tienen un patrón histológico definido de anomalías.



Se ha demostrado que las microdeleciones no son exclusivas de patrones histológicos o relacionadas a la cuenta de espermatozoides, ya que en un paciente con globozoospermia, (espermatozoides con cabeza redonda y sin capa acrosómica) se detectó una deleción de dos marcadores, uno en AZFa (sY86) y otro en AZFb (sY131) (Zeyneloglu *et al.*, 2002). Esta anomalía es poco frecuente y no permite que ocurra la reacción del acrosoma con el óvulo, por lo que el ICSI es la única opción de tratamiento. Este reporte es el primero que menciona una relación entre la globozoospermia y las microdeleciones en el Cromosoma Y.

3.5.4. FRECUENCIA DE LAS MICRODELECIONES

Numerosos estudios moleculares han tratado de identificar las regiones más comúnmente deletadas en Yq. Esto, para determinar la incidencia de microdeleciones entre hombres con azoospermia u oligozoospermia, y para correlacionar el tamaño y posición de la deleción que causa la infertilidad (Calogero *et al.*, 1999).

Actualmente se tienen reportes de mas de 3,000 pacientes infértiles analizados en búsqueda de microdeleciones en el Cromosoma Y. Cuando la causa de infertilidad es el factor masculino, el rango de incidencia de microdeleciones varía del 1% al 55.5% (Prior *et al.*, 1997; Reijo *et al.*, 1996; Quereshi *et al.*, 1996; Stuppia *et al.*, 1996,1997; Foresta *et al.*, 1997, 1998; Najmabadi *et al.*, 1996; Simoni *et al.*, 1998; Vander *et al.*, 1997; Peterlin *et al.*, 2002; Rolf *et al.*, 2002; Kleiman *et al.* 1999; Jobling *et al.*, 1996).

Las deleciones en AZFa, son las menos frecuentes y varían del 1% al 5% (Simoni *et al.*, 1998). En España, Oliva *et al.*, en 1998 realizaron un estudio para evaluar la



prevalencia de Microdeleciones en pacientes que recurren a ICSI como tratamiento de infertilidad. Ellos confirmaron los datos ya antes mencionados, donde los pacientes Azoospermicos presentan una incidencia más alta de deleciones con respecto a la población de pacientes oligozoospermicos.

Debido a estos antecedentes es de gran importancia el poder identificar la presencia de microdeleciones en AZFa, AZFb y AZFc en pacientes Azoospermicos y Oligospermicos severos, que recurren a ICSI (Kim *et al.*,1999).

3.6. REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN INFERTILIDAD MASCULINA

Una vez que el varón infértil se ha realizado tratamientos específicos, tanto médicos como quirúrgicos, sin que se haya conseguido la gestación, debe realizarse un ensayo de selección espermática para la posible práctica de reproducción asistida (Vázquez, 1999).

El tratamiento de infertilidad masculina ha revolucionado desde 1978 cuando dos investigadores ingleses, después de 18 años de investigación reportaron el primer nacimiento de un bebé mediante fertilización *in vitro* (FIV) (Edwards y Steptoe, 1978). En este procedimiento se ponen en contacto espermatozoides capacitados (50,000 a 100,000) con un óvulo maduro en medio de cultivo. Una vez fertilizado el óvulo se procede a la transferencia embrionaria.

En los casos de pacientes con un número de espermatozoides recuperados de buena calidad y con una cuenta superior a un millón, se procede a practicar inseminaciones intrauterinas. Si éstas fracasan o el número de espermatozoides



recuperados es reducido, se aconseja utilizar técnicas de fertilización *in vitro* (Schlegel *et al.*, 1997; Edwards, 2001).

En los casos de cuentas bajas de espermatozoides se han desarrollado ensayos para evaluar la funcionalidad de los espermatozoides ya que esta información es necesaria para la elección del tipo de reproducción asistida a utilizar en los casos de pacientes infértiles

La mayoría de las pruebas evalúan la capacidad de reacción del acrosoma de los espermatozoides (espontáneamente o después de la estimulación), para penetrar y fusionarse con un óvulo de hámster libre de zona pelúcida, y pruebas de unión a la zona pelúcida directamente en bioensayos de emizona, o indirectamente usando pruebas citoquímicas para detectar receptores en la superficie de los espermatozoides, que sean capaces de unirse a ligandos de la zona pelúcida (Khorram *et al.*, 2001).

3.6.1. INYECCIÓN INTRACITOPLÁSMICA DE ESPERMATOZOIDEOS (ICSI)

Originalmente para la introducción del espermatozoide al óvulo se realizaba una disección parcial de la zona pelúcida en el óvulo (PDZ), posteriormente se realizó un procedimiento en el que se introducía el espermatozoide en la parte subzonal del óvulo (SuZi), y por último se desarrolló la Inyección Intracitoplásmica de Espermatozoides (Figura 7) (Palermo *et al.*, 1992; Berger, 1999; Sherman *et al.*, 1996).

Basados en los trabajos de fertilización *in vitro*, Palermo *et al.*, en 1992, publicaron la técnica de inyección intra citoplásmica de espermatozoides (ICSI), la

cual ha solucionado los problemas de infertilidad en un gran número de casos en que los espermatozoides son incapaces de penetrar en el óvulo, o en casos de pacientes con oligozoospermia severa u azoospermia excretora o mixta. El ICSI tiene la gran ventaja de requerir solamente un espermatozoide, a diferencia de la FIV, en la que se requieren al menos 50,000 espermatozoides móviles y morfológicamente normales (Berger, 1999).

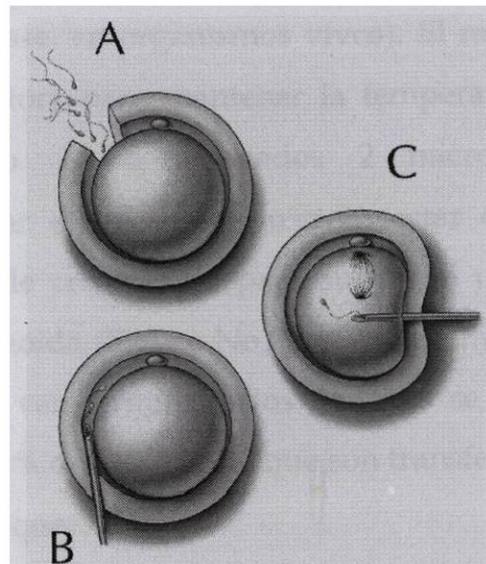


Figura 7. Técnicas de Micromanipulación A. Representación esquemática de Disección Parcial de Zona (PDZ). **B.** Procedimiento de Inserción Subzonal (SuZi). **C.** Representación de Inyección Intracitoplásmica de Espermatozoides (ICSI).

Las fases de la ICSI son las mismas que en FIV en cuanto a la estimulación y punción ovocitaria. Una vez obtenidos los ovocitos se procede a liberarlos de las células que les rodean para determinar el grado de maduración, ya que solo aquellos ovocitos que se encuentren en metafase II (maduros) podrán microinyectarse.



Tras procesar la muestra de semen y seleccionar los espermatozoides, éstos son colocados en una microgota con una solución hiperviscosa (Polivinilpirrolidona), que disminuye la velocidad de los espermatozoides, permitiendo una fácil captura de los mismos. Los ovocitos se colocan en microgotas y se procede a la microinyección de un espermatozoide en el interior de cada ovocito. Actualmente para realizar una microinyección correcta es necesario disponer de un microscopio invertido provisto de una óptica Normarki o Hoffman (aumento de contraste de fase, en organismos vivos). El microscopio debe llevar acoplada una placa calefactora para mantener la temperatura constante a 37°C durante todo el proceso. Lleva acoplados 2 micromanipuladores y 2 microinyectores para sujetar el ovocito y microinyectar el espermatozoide. Se utilizan dos micropipetas de cristal, una para sujetar el ovocito y la otra para microinyectar el espermatozoide (Figura No.8). La microinyección se lleva a cabo en placas de plástico, una vez terminada los ovocitos se colocan en medio de cultivo en estufa de 37°C y 5% de CO₂, hasta que son transferidos al fondo uterino, al día 2 ó 3 (2-8 células) (Vazquez, 1999).

La introducción del ICSI a la Reproducción Asistida incrementó los resultados exitosos de nacimientos obtenidos, al menos en un 35 a 40%; hasta 1998, en Estados Unidos, los intentos de FIV incluyendo ICSI fueron 61,284 con el 57% de embarazos múltiples; en Europa fueron de 193,111 tratamientos en base al ciclo reproductivo de las pacientes, con 43% de embarazos múltiples (Katz *et al.*, 2002).

Además, se han desarrollado procedimientos para extraer espermatozoides del epidídimo y del testículo, en casos de pacientes con Azoospermia. Cuando los pacientes presentan obstrucciones en los conductos se recurren a técnicas como el MESA (Aspiración Micro quirúrgica de Espermatozoides del Epidídimo) y el PESA (Aspiración Percutánea de Espermatozoides del Epidídimo). Esta última es la mas empleada (Sherman *et al.*, 1996; Patrizio *et al.*, 1998).



Cuando la Azoospermia no es debida a obstrucciones, se recurre a la Recuperación Testicular de Espermatozoides (*TESA y TESE*) la primera se lleva a cabo usando una jeringa, mientras que la segunda es una biopsia testicular en la cual los espermatozoides son extraídos *in vitro* y usados para ICSI (Khorram *et al.*, 2001).

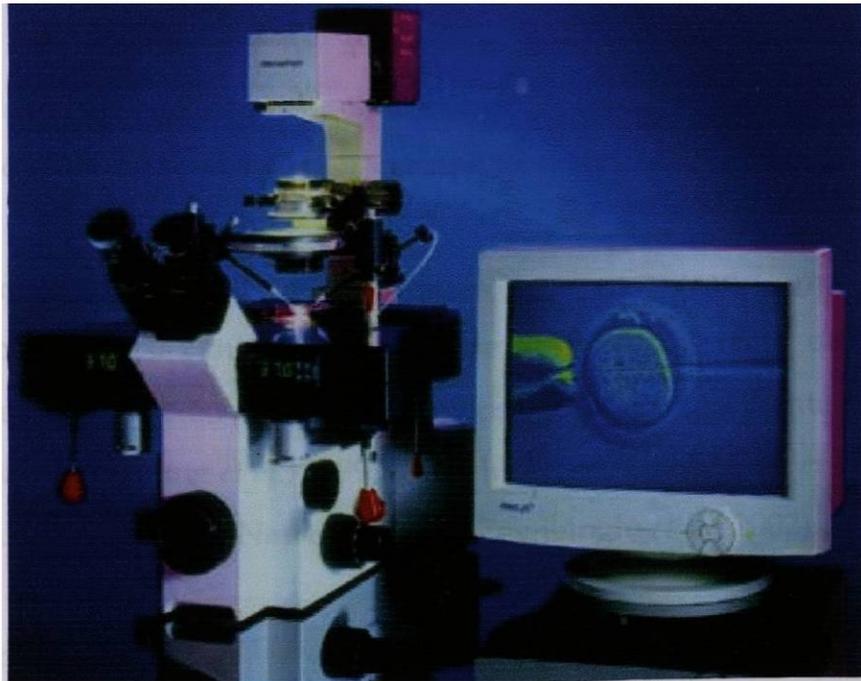


Figura 8. Equipo semiautomatizado para ICSI . Equipo de micromanipulación (The Integra Ti Micromanipulation System compañía Zander Medical Supplies), empleado en la Inyección Intracitoplásmica de Espermatozoides. (ICSI). Tomado de: www.zanderivf.com/zms2001/Microscopu.thm

3.6.1.1. TRANSMISIÓN GENÉTICA DE INFERTILIDAD POR ICSI

Los criterios para incluir a pacientes en la técnica de Reproducción Asistida ICSI por el factor masculino, incluye anomalías detectadas por análisis de semen (mencionadas anteriormente), y la posibilidad de obtener espermatozoides por cirugía (Khorram *et al.*, 2001). Estos criterios de inclusión son los que aumentan las probabilidades de transmitir la infertilidad masculina a los hijos varones, ya



las probabilidades de transmitir la infertilidad masculina a los hijos varones, ya que es en estos pacientes es donde se encuentra el mayor porcentaje en la detección de microdeleciones en el Cromosoma Y (Winston y Ardy, 2002).

Mulhall *et al.*, en 1997 demostraron que es posible en pacientes con azoospermia no obstructiva y microdeleciones en el gen DAZ, obtener espermatozoides del testículo y realizar un TESE-ICSI exitoso, pero con el problema de que los hijos varones serán estériles.

Diferentes grupos de investigadores han encontrado una transmisión vertical directa entre las microdeleciones de hombres infértiles que recurren a programas de reproducción asistida y sus hijos procreados mediante estas técnicas (Crausz C *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 1999; Kmischke *et al.*, 1999; Mark *et al.*, 1998; Page *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2001; Nap *et al.*, 1999; Zeyneloglu *et al.*, 2002).

El ejemplo mas claro es el presentado por Chang *et al.* (1999), quienes describen el caso de una familia en la que el padre (probada su paternidad) transmitió una deleción en la región DAZ a sus cuatro hijos. Al padre se le diagnosticó azoospermia hasta la edad de 64 años. Sus cuatro hijos fueron infértiles, presentando azoospermia y oligozoospermia; uno de los hijos después de realizarse un TESE-ICSI pudo procrear, sin embargo su hijo varón presentó la misma deleción que su padre y su abuelo.

En resumen la detección de microdeleciones en el Cromosoma Y es importante no únicamente para definir la etiología de la infertilidad, sino también para brindar un consejo genético a familias que recurren a programas de reproducción asistida.



IV. OBJETIVO GENERAL

- Detectar microdeleciones en las región AZF del Cromosoma Y, en varones infértiles candidatos para inyección intracitoplásmica de espermatozoides, utilizando PCR múltiple.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar la técnica de PCR para cada uno de los 16 marcadores moleculares STS's del intervalo 5, en varones fértiles.
- Estandarizar una técnica de PCR Múltiple del intervalo 5, para los 16 marcadores moleculares STS's en varones fértiles.
- Analizar mediante pruebas de PCR Múltiple los intervalos 5 y 6 del cromosoma Y, de varones infértiles con azoospermia y oligozoospermia que recurren a ICSI.
- Comprobar las posibles microdeleciones mediante la amplificación de los marcadores individuales, utilizando un control interno en la amplificación.



V. HIPÓTESIS

Es posible detectar microdeleciones en las regiones AZF del Cromosoma Y, en pacientes que recurren a Inyección Intracitoplásmica de Espermatozoides, por factor masculino de infertilidad.



VI. MATERIAL Y EQUIPO

EQUIPO

Microcentrífuga 5415 C Eppendorf®

Cámara de Electroforesis OWL Separation System Inc.

Termociclador PTC-100™, MJ Research, Inc

Transiluminador FBTIV-88 Fischer Scientific

MATERIAL BIOLÓGICO

Los pacientes seleccionados fueron en total 46 varones con cuentas anormales de espermatozoides, de los cuales 6/46 presentaban Azoospermia idiopática, 25/46 oligozoospermia severa y 15/46 presentaron oligozoospermia. A cada paciente seleccionado se le extrajo sangre periférica, mediante venopunción utilizando EDTA como anticoagulante. Con las muestras de sangre periférica se aisló DNA genómico para realizar el tamizaje genético.





VII. METODOLOGÍA

7.1. AISLAMIENTO DE DNA

Para el aislamiento de DNA se utilizaron dos técnicas diferentes dependiendo del tiempo de almacenamiento de la muestra de sangre. Para muestras recientes se utilizó la técnica de "TSNT" (Tritón 100X al 2%, SDS al 1%, NaCl a 100 mM, Tris-HCl a 10 mM, pH 8) y para muestras con mayor tiempo de almacenamiento se utilizó la técnica de "de Salado". La descripción de las técnicas se muestra a continuación.

7.1.1. TÉCNICA DE "TSNT"

Se colocan 300µl de sangre total anticoagulada con EDTA 5mM en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml y se añaden 200µl de buffer de lisis (Tritón 100X al 2%, SDS al 1%, NaCl a 100 mM, Tris-HCl a 10 mM, pH 8) y 500µl de fenol saturado. Se mezcla completamente por inversión durante un minuto. Posteriormente, se agregan 100µl de Sevag y se agita en Vortex durante cinco minutos. Una vez concluida la agitación, se añade a la mezcla 200µl de buffer TE 1X y se procede inmediatamente a centrifugar por 15 minutos a 14,000 g.

Una vez concluida la centrifugación, se transfiere la fase acuosa a otro tubo de microcentrifuga de 1.5 ml y se precipita el DNA agregando 2 volúmenes de etanol al 100%. Por último, se centrifuga por 2 minutos a 14,000 g para decantar el sobrenadante y obtener la pastilla de DNA, se lava la pastilla con un ml de etanol al 70%, se vuelve a centrifugar por 2 minutos, se decanta el sobrenadante y se pone a secar la pastilla. La pastilla se resuspende en 50µl de TE 1X a 4°C por 24 horas.

7.1.2. TÉCNICA DE "DE SALADO" (SALTING-OUT)

Se colocan 200µl de la muestra de sangre con 1000µl de buffer lisis eritrocitos (NH₄Cl 155mM, NaHCO₃ 10mM, EDTA 0.1mM pH 7.4). Después, se



incuba por 10 min a 4°C mezclando ocasionalmente; posteriormente se centrifuga a 14,000 rpm por 10 min. Descartar el sobrenadante y lavar la pastilla con 800µl de buffer lisis eritrocitos incubar y centrifugar como se hizo anteriormente. Hacer lo mismo con 500 µl y 200 µl de buffer de lisis de eritrocitos.

Se resuspende el botón con 150µl de buffer lisis leucocitos agregando 3.5µl de proteinasa K (10mg/ml) y 10µl de SDS 10%. Incubar toda la noche a 55°C. Posteriormente, añadir 50µl de NaCl (6M) y agitar vigorosamente por un minuto. Se centrifuga a 14,000rpm por 15 min y se transfiere el sobrenadante a un vial para precipitar las proteínas con 500µl de fenol y 100µl de SEVAG, y se centrifuga por 20 min a 14,000rpm. Recuperar el sobrenadante y precipitar el DNA con 2 volúmenes de etanol.

Por último, se centrifuga por 2 minutos a 14,000 g para decantar el sobrenadante y obtener la pastilla de DNA, se lava la pastilla con un ml de etanol al 70%, se vuelve a centrifugar por 2 minutos, se decanta el sobrenadante y se pone a secar la pastilla. La pastilla se resuspende en 50µl de TE 1X a 4°C por 24 horas, ó a 37 °C durante 30 minutos.

7.2 MARCADORES MOLECULARES "STS"

Para el análisis de detección de microdeleciones en el cromosoma Y se probaron un total de 30 marcadores moleculares STS's (sequence-tagget site) que incluyen regiones que ya se han determinado que se deletan en Yq11, principalmente en las regiones AZFa, AZFb y AZFc de dicho cromosoma. De los 30 marcadores, 14 de ellos se encuentran localizados en el intervalo 5, y 16 en el intervalo 6. En el presente trabajo se estandarizó solo el intervalo 5, las reacciones del intervalo 6 ya estaban estandarizadas previamente (Castro-Pérez A, 2000).



Cada marcador molecular seleccionado, fue analizado contra el banco genómico del NCBI mediante el programa BLAST, para comprobar su localización, y para detectar si había hibridación entre ellos. En los casos donde no se sabía la localización exacta se recurrió a los mapas propuestos por los diferentes equipos de investigación. La selección de los marcadores se realizó en base a la literatura; la figura 9 muestra el mapa con los marcadores STS de las regiones conocidas hasta el momento de la elección de éstos.

Además de los marcadores del Cromosoma Y, se estandarizaron pruebas de PCR con un control interno. En los intervalos 5 y 6 se utilizó el ZP3 (ubicado en el Cromosoma X) y en el intervalo 6 algunos marcadores se estandarizaron con el SRY, ubicado en el brazo corto del Cromosoma Y (Tabla 2).

Primero se probaron todos los diferentes marcadores por separado, utilizando DNA de individuos sin problemas aparentes de infertilidad. En la Tabla 1 se muestran los 30 marcadores moleculares utilizados, su locus, la secuencia de los marcadores (derecho e izquierdo) y el tamaño de los productos de PCR esperados. Se llevaron a cabo reacciones de PCR bajo condiciones controladas de temperatura de desnaturalización, hibridación y polimerización.

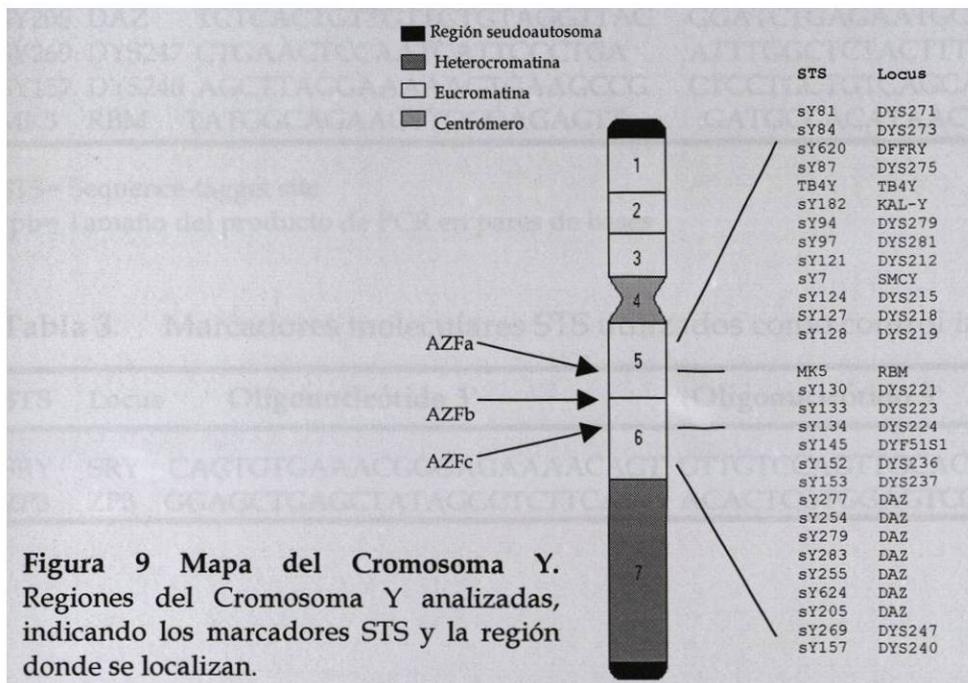


Figura 9 Mapa del Cromosoma Y. Regiones del Cromosoma Y analizadas, indicando los marcadores STS y la región donde se localizan.



Tabla 2. Marcadores moleculares STS del cromosoma Y (Yq11).

STS	Locus	Oligonucleótido 3'	Oligonucleótido 5'	*pb
UTY	UTY	TGTCCTCTTTTCGCATTTGCGCCC	CTGGTTGGTTGATGGTCACGTC	212
DBY	DBY	TTGGCAATCGTGAAAGACCTGGC	CCGGTTGCCTCTACTGGTATATC	277
SY84	DYS273	GAGAAGGGTCTGAAAGCAGGT	AAGCCTACTACCTGGAGGCTTC	326
SY620	DFFRY	GGCTGATATATGCTGGTACTTCA	TCACAGTACTCAAACAACACAG	249
SY86	DFFRY	GTGACACACAGACTATGCTTCAGC	ACACACAGAGGGACAACCCTGT	326
SY87	DYS27	5 GCTCTGTTGCTTGAAAAGAGGG	CACTGCAGGAAGAATCAGCTG	252
TB4Y	TB4Y	CAAAGACCTGCCTGACAATGGAG	CTCCGCTAAGTCTTTCACCAAC	102
SY182	KAL-Y	TTCAGAAGTGAAACCCTGTATG	GCATGTGACTCAAAGTATAAGC	132
SY94	DYS279	NGTCATGACAGCCAGGGTATTT	TTTGGACATAGTTTTTTGGTC	149
SY121	DYS212	TNAGTTCACAGAATGGAGCCTG	GACCTGTGACTCCAGTTTGGTC	190
SY7	SMCY	AGTGACCACAGGGCCTATCGTG	AATTTGCTGAGCACCTAGAAGG	201
SY124	DYS215	TCCAGGCAGGACAGCTTAAAAG	TACTGTGGCAAAGTTGCTTTC	107
SY127	DYS218	TAGGCTCACAAACGAAAAGAAA	AGCTGCAGGCAGTAATAAGGGA	274
SY128	DYS219	GAGGATGAGACATTTTTGTGGG	CTAGCCCAATGTAAACTGGACA	228
SY130	DYS221	CAGAGAGTTTTCTAACAGGGCG	TATGGGAATCACTTTTGCAACT	173
SY133	DYS223	TNATTTCTCTGCCCTTACCAG	TATGATGATTGCCTAAAGGGAA	177
SY134	DYS224	CTGTCTGCCTCACCATAAAACG	CAACCACTGCCAAAACTTTCAA	301
SY145	DYF51S1	ACACAAAACACTCATATACTC	TGAGAATAATTGTATGTTACGGG	142
SY152	DYS236	AAAGACAGTCTGCCATGTTTCA	TNACAGGAGGGTACTTAGCAGT	125
SY153	DYS237	AAGCATCCTCATTTTATGTCCA	CCCAACCCAAAAGCACTGAGTA	139
SY277	DAZ	GGGTTTTGCCTGCATACGTAAT	CTAAAAGCAATTCTAAACCTCCA	312
SY254	DAZ	CTGGGTGTTACCAGAAGGCAAA	GAACCGTATCTACCAAAGCAGC	370
SY279	DAZ	CCACCTCATGGTAGTAAAATTGTA	TGTAGCAATAAGATAAATAAGA	835
SY283	DAZ	CAGTGATACTCGGACTTGTGT	GTTATTTGAAAAGCTACACGGG	497
SY255	DAZ	GGTGCTCGTCATGTGCAGCCAC	GAGTTACAGGATTCGGCGTGAT	123
SY624	DAZ	TTTAAATCTGTTGGATCCTCTCA	CTTTCAGTCTCGATTATTTGTTA	256
SY205	DAZ	TCTCACTGTTGTTGTGTAGGTTAC	GGATCTGAGAATGCTTCACCTTA	99
SY269	DYS247	CTGAACTCCAATCATTCCCTGA	ATTTGGCTCTACTTTTCCCCTT	115
SY157	DYS240	AGCTTAGGAAAAAGTGAAGCCG	CTCCTGCTGTCAGCAAGATACA	289
MK5	RBM	TATGGCAGAAGTTGGGAGAGTT	GATGCCACATAACTTGAGCTAC	154

STS= Sequence-tagget site

*pb= Tamaño del producto de PCR en pares de bases

Tabla 3. Marcadores moleculares STS utilizados como control interno.

STS	Locus	Oligonucleótido 3'	Oligonucleótido 5'	pb
SRY	SRY	CAGTGTGAAACGGGAGAAAACAGT	GTTGTCCAGTTGCACTTCGCTGCA	352
ZP3	ZP3	GGAGCTGAGCTATAGGCTCTTCAT	ACACTCGTGGAGTCCAACCTCAA	277



7.3. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA MARCADORES STS

Se estandarizaron las concentraciones de reactivos y de DNA a utilizar, para cada reacción individual de PCR, con cada uno de los marcadores moleculares antes descritos.

7.3.1. ESTANDARIZACIÓN DE LAS REACCIONES DE PCR INDIVIDUALES

Para la preparación de la mezcla de reacción de PCR se colocaron en un vial de 0.5 ml primeramente 1 μ l de cada oligonucleótido, a una concentración de 100 ng/ μ l, 2.5 μ l de dNTP's (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) a 2.5 mM, 0.25 μ l de Taq polimerasa (5 U/ μ l), 2.5 μ l de buffer para la enzima, así como 17 μ L de agua bidestilada esterilizada y libre de nucleasas. Para poder estandarizar cada uno de los treinta marcadores STS's se empleó 1 μ l del DNA de un varón sin problemas aparentes de infertilidad. Se llevaron a cabo reacciones de PCR bajo condiciones controladas de temperatura de desnaturalización, hibridación y polimerización. (Tabla 3).

Tabla 4. Programa del Termociclador

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Evento
1	94	4	<i>Desnaturalización inicial</i>
2	94	1	<i>Desnaturalización</i>
3	57	1	<i>Apareamiento</i>
4	72	3	<i>Extensión</i>
5		35 ciclos al paso 2	
6	72	7	<i>Extensión prolongada</i>

7.3.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR MÚLTIPLE

Las pruebas de PCR múltiple (multiplex-PCR) consisten en usar varios marcadores moleculares STS's en una misma reacción lo cual permite amplificar varias regiones del cromosoma Y en un mismo tiempo (Henegariu *et al.*, 1997). Utilizando DNA de personas sin problemas aparentes de infertilidad, se probaron diferentes combinaciones de oligonucleótidos para determinar cuales de ellos funcionan mejor en una misma reacción de PCR.

Se consideró los tamaños de los oligonucleótidos, la homología que puede haber entre ellos y la proximidad dentro del cromosoma Y. Las reacciones de PCR múltiple se realizaron basándose en los cálculos utilizados en el PCR individual, las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50µl de reacción.

7.3.3. ANÁLISIS DE PACIENTES UTILIZANDO PCR MÚLTIPLE

Posterior a la estandarización del PCR múltiple con DNA de hombres fértiles, se procedió al análisis de pacientes que recurren a Inyección Intracitoplásmica de espermatozoides, por factor masculino de infertilidad, a éstos pacientes se les realizaron espermatobioscopias para analizar cualitativa y cuantitativamente sus espermatozoides. A los que presentaron Azoospermia u Oligozoospermia se les extrajo sangre periférica por venopunción, para extraer el DNA y realizar el tamizaje genético.

Para cada paciente analizado se realizó la mezcla de reactivos correspondiente en un tubo eppendorf 0.6ml, e incluyendo su control positivo (DNA de hombres sin problemas aparentes de infertilidad) y control negativo



(DNA de mujer). Los cálculos se realizaron multiplicando por 1.1 debido al error del pipeteo. De la mezcla de reactivos se depositaron 48 μ l de la reacción a un tubo eppendorf conteniendo los 2 μ l del DNA a analizar.

A continuación se presenta un ejemplo representativo de los cálculos realizados para una de las mezclas de PCR múltiple, en la que se amplifican cuatro diferentes marcadores.

	1X	4X
Oligonucleótido 5' (100ng/ μ l)	1 μ l	4.4 μ l
Oligonucleótido 3' (100ng/ μ l)	1 μ l	4.4 μ l
dNTP's 2.5mM	5 μ l	22 μ l
Buffer 10X (Boheringer)	5 μ l	22 μ l
H ₂ O	30 μ l	120 μ l
*Taq Polimerasa	1 μ l	4.4 μ l
DNA (Aprox.100ng/ μ l)	2 μ l	-----

* Taq DNA Polimerasa preparada en el laboratorio a partir de una cepa recombinante de *Escherichia coli*.

7.3.4. COMPROBACIÓN DE MICRODELECCIONES UTILIZANDO UN CONTROL INTERNO

Para comprobar que la ausencia de algún marcador molecular se debe a una deleción en el Cromosoma Y; no a un error en la amplificación, se estandarizaron las reacciones de PCR para amplificar los diferentes marcadores moleculares junto con un control interno en la reacción. En los intervalos 5 y 6 se utilizó el ZP3 el cual se encuentra ubicado en el cromosoma X. Para algunos marcadores del intervalo 6 se utilizó el marcador molecular SRY localizado cerca del centrómero en el Cromosoma Y (Tabla 2).



VIII. RESULTADOS

8.1. DETECCIÓN DE VARONES CON OLIGOZOOSPERMIA SEVERA Ó AZOOSPERMIA

Para cumplir con los objetivos del presente trabajo, se sostuvo una colaboración con el Instituto para el Estudio de la Concepción Humana, para la detección de pacientes con Azoospermia u Oligozoospermia que recurren a ICSI. La colaboración consistió en la realización de estudios clínicos y paraclínicos.

Los estudios clínicos comprendieron Historial Clínico y Exploración Física; los estudios paraclínicos incluyeron un Espermograma. En base al diagnóstico, se realizó la selección de pacientes para realizar el tamizaje genético (Tabla 5).

Tabla 5. Pacientes con Azoospermia y oligozoospermia analizados

No.Paciente	Cuenta Espermática	Diagnóstico	No. Paciente	Cuenta Espermát.	Diagnóstico
1	0-1/campo	Parotiditis	24	9.4 mill/ml.	Oligozoospermia grave
2	2.5 mill/ml.	Oligoastenozoospermia	25	1/campo	Oligozoospermia severa
3	3.1 mill/ml.	Varicocele	26	4.4 mill/ml.	Oligozoospermia grave
4	1.9 mill/ml.	Oligozoospermia grave	27	8.6 mill/ml.	Oligozoospermia grave
5	1/campo	Oligozoospermia severa	28	18 mill/ml.	Oligozoospermia
6	0/campo	Azoosperm/Fib quística	29	18 mill/ml.	Oligozoospermia
7	1.2 mill/ml	Oligoastenozoospermia	30	23 mill/ml.	Oligozoospermia
8	2.5 mill/ml.	Oligoastenozoospermia	31	18 mill/ml.	Oligozoospermia
9	0.8 mill/ml.	Oligozoospermia severa	32	0/campo	Azoospermia/Hormonal
10	2.8 mill/ml.	Oligoastenozoospermia	33	1.6 mill/campo	Oligoastenozoospermia
11	0/campo	Azoospermia	34	30 mill/ml.	Oligozoospermia
12	8.1 mill/ml.	Oligoastenozoospermia	35	1-2/campo	Oligozoospermia severa
13	2/campo	Oligoastenozoosp/severa	36	6.9 mill/ml.	Oligozoospermia grave
14	4.5 mill/ml.	Oligoastenozoospermia	37	0/campo	Azoospermia/obstructiva
15	1-2/campo	Oligozoosp/Paratoditis	38	0-1/campo	Oligoastenozoosp/severa
16	0/campo	Azoospermia	39	0/campo	Azoospermia
17	4.3 mill/ml.	Oligoastenozoospermia	40*	4.2 mill/ml.	Oligoastenozoosp/severa
18	1.4 mill/ml.	Oligoastenozoospermia	41*	0/campo	Azoospermia
19	22 mill/ml.	Oligozoospermia	42	0/campo	Azoospermia
20	3.6 mill/ml.	Oligoastenozoospermia	43	0/campo	Azoospermia
21	5 mill/ml.	Oligoastenozoospermia	44	4.7 mill/ml.	Oligozoospermia severa
22	17.7 mill/ml.	Oligozoospermia	45	0-1/campo	Oligozoospermia severa
23	1/campo	Oligoastenozoosp/severa	46	1-2/campo	Oligoastenozoosp/severa

8.2. OBTENCIÓN DE DNA A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

Lo primero que se realizó fue el estandarizar dos procedimientos para el aislamiento de DNA: "Salting out" y TSNT. El primero se utiliza cuando la muestra de sangre es fresca y el segundo cuando ya ha sido almacenada por más de una semana. En la Figura 10 se muestra un gel representativo de los aislamientos de DNA. El DNA se observa por arriba del marcador de peso molecular 1Kb indicando que es de buena calidad en cuanto a su peso molecular. Con este procedimiento se aisló DNA de personas normales y de los pacientes.

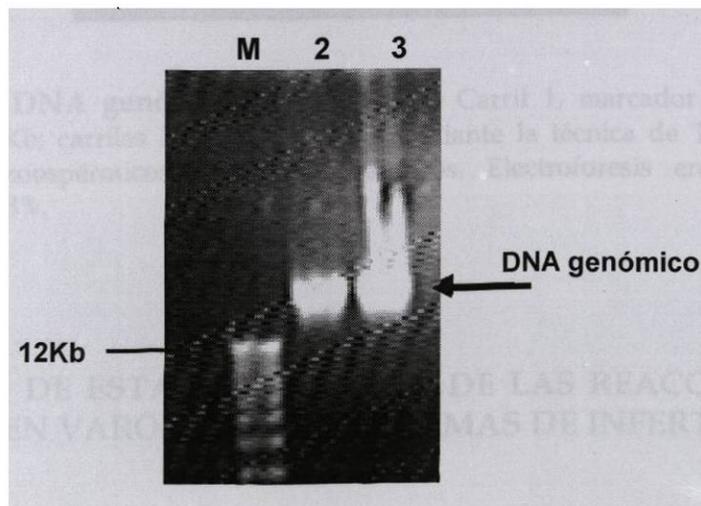


Figura 10. DNA genómico de varones fértiles. Carril M, Marcador de peso molecular 1Kb; carril 2, DNA aislado mediante la técnica de Salting out; carril 3, DNA aislado por TSNT. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Después de estandarizar las técnicas para extracción de DNA genómico, se obtuvo DNA de los pacientes (Figura 11) que posteriormente se analizaron con los marcadores moleculares.

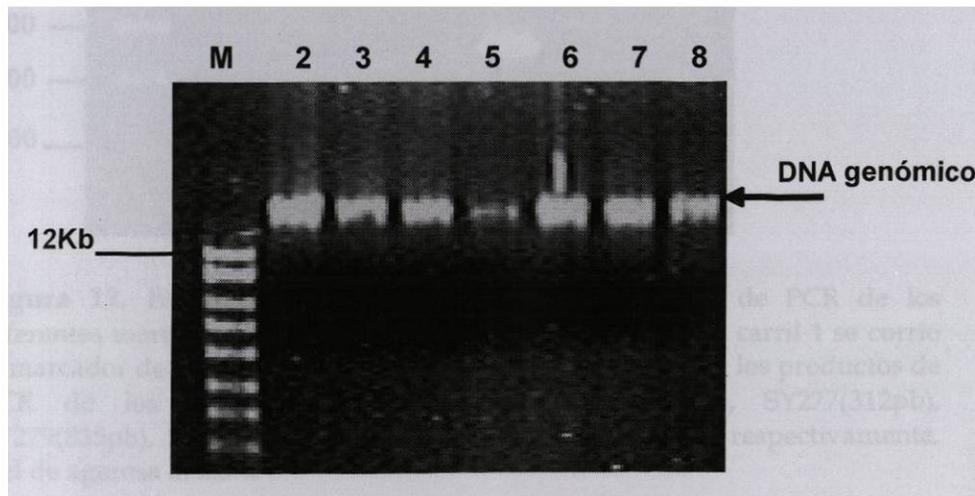


Figura 11. DNA genómico de pacientes. Carril 1, marcador de peso molecular 1Kb; carriles 2-8 DNA aislado mediante la técnica de TSNT, en pacientes azoospermicos y oligozoospermicos. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

8.3. RESULTADO DE ESTANDARIZACIÓN DE LAS REACCIONES DE PCR INDIVIDUALES EN VARONES SIN PROBLEMAS DE INFERTILIDAD.

Con el DNA obtenido de los varones fértiles, se probaron los marcadores del intervalo 6 (Castro-Pérez A, 2000) y se estandarizaron los marcadores del intervalo 5. Cada uno de los 30 marcadores STS's, de los intervalos 5 y 6, se amplificaron por separado a partir de DNA de varones fértiles.

En las figuras 12 y 13 se presentan los resultados de algunos de los diferentes marcadores amplificados mediante PCR-STS, en individuos sin problemas de infertilidad.

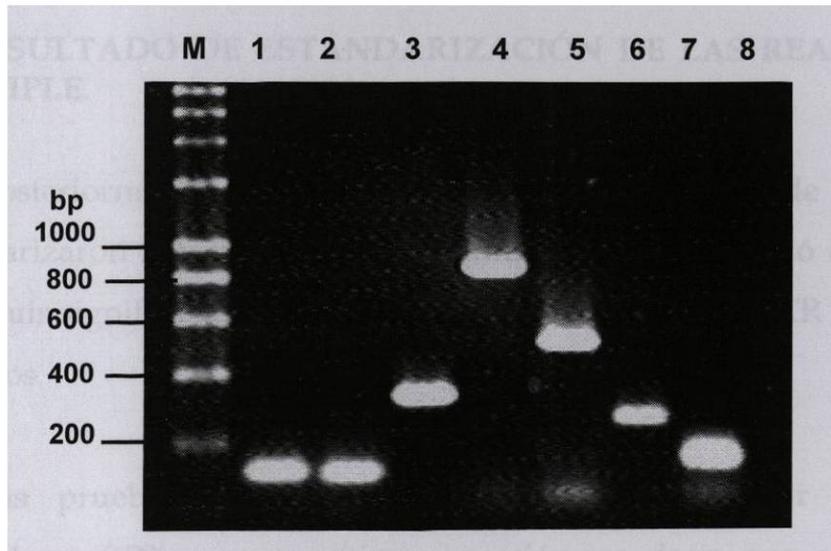


Figura 12. Estandarización de PCR-STS. Productos de PCR de los diferentes marcadores moleculares STS's individuales. En el carril 1 se corrió el marcador de peso de 50pb. En los carriles 2- 8, se corrieron los productos de PCR de los marcadores SY255(127pb), SY269(118pb), SY277(312pb), SY279(835pb), SY283(497pb), SY624(256pb) y MK5(154pb) respectivamente. Gel de agarosa al 2.5 %

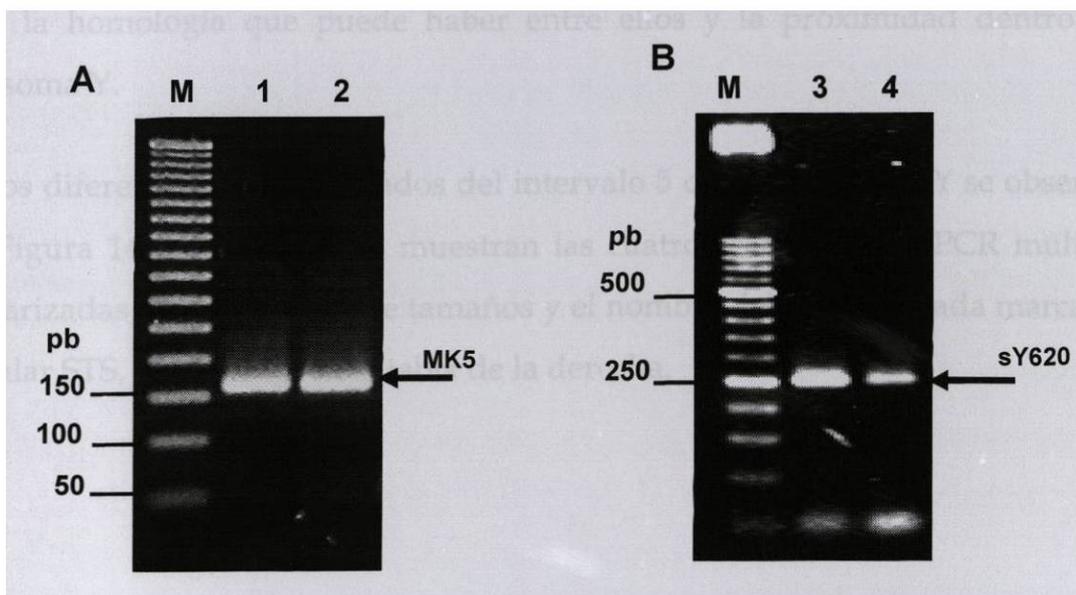


Figura 13. Estandarización de PCR-STS. A, amplificación del marcador MK5 (154pb) correspondiente al gen RBM, (carriles 1 y 2), Marcador de peso molecular 50pb (M). B, amplificación del marcador sY620 (249pb), (carriles 3 y 4). Marcador de peso molecular 50pb (M) .



8.4 RESULTADO DE ESTANDARIZACIÓN DE LAS REACCIONES DE PCR MÚLTIPLE.

Posteriormente a la estandarización de cada uno de los marcadores, se estandarizaron reacciones de PCR múltiple. Esto se realizó con el propósito de disminuir significativamente el número de reacciones de PCR así como el gasto de reactivos.

Las pruebas de PCR múltiple consisten en usar varios marcadores moleculares STS's en una misma reacción, es decir que se amplifican varias regiones del cromosoma Y en un mismo tiempo. Se probaron diferentes combinaciones de oligonucleótidos para determinar cuales de ellos funcionaban mejor en una misma reacción de PCR.

Como ya se mencionó anteriormente se tomó en cuenta los tamaños de los oligos, la homología que puede haber entre ellos y la proximidad dentro del cromosoma Y.

Los diferentes locus analizados del intervalo 5 del Cromosoma Y se observan en la Figura 14, en la figura se muestran las cuatro reacciones de PCR múltiple estandarizadas, la descripción de tamaños y el nombre del locus de cada marcador molecular STS, se presenta en la tabla de la derecha.

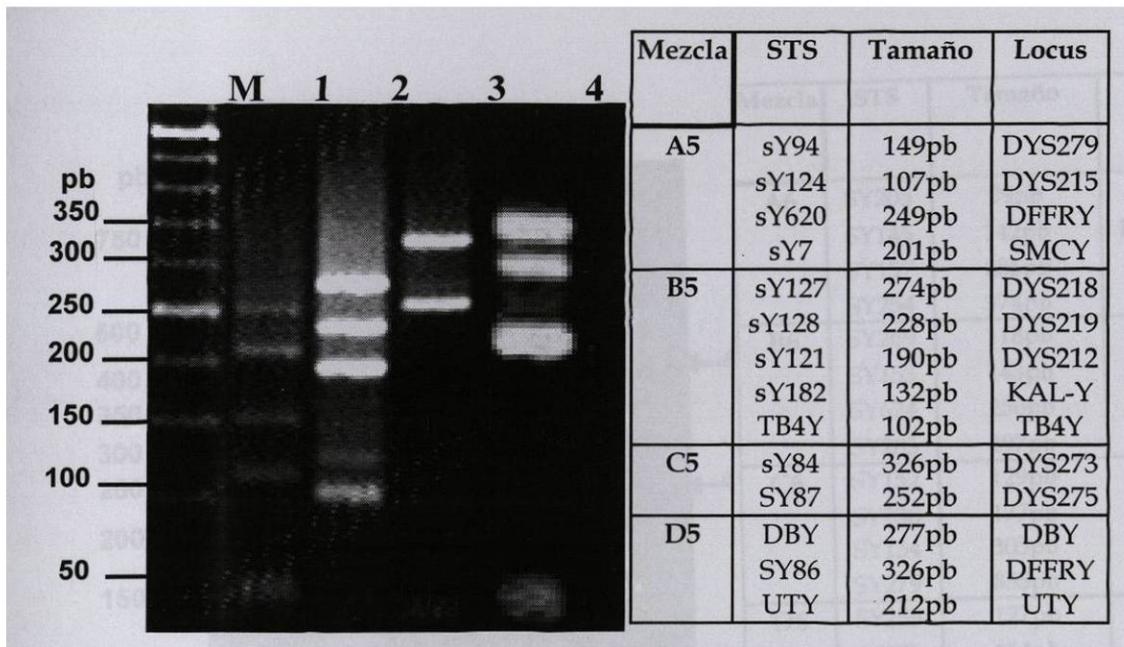


Figura 14. PCR múltiple del intervalo 5. A la izquierda se observa el resultado de los marcadores amplificados y analizados en geles de agarosa al 2.5%; M, marcador de peso molecular de 50 pb. Los carriles 1 al 4 representan las mezclas de reacción A5,B5,C5 y D5 respectivamente. En el cuadro de la derecha se encuentran los marcadores con la información del tamaño del producto de PCR y el locus de cada marcador molecular STS. Las bandas inferiores, cercanas al peso molecular de 50pb son los restos de la reacción de PCR.

Las reacciones de PCR múltiple del intervalo 6 del Cromosoma Y fueron estandarizadas previamente (Castro-Pérez A., 2000). La figura 15 presenta los locus analizados de este intervalo. Al igual que en la figura anterior, se muestran las cuatro reacciones de PCR múltiple analizadas, la descripción de tamaños y el nombre del locus se presenta en la tabla de la derecha.

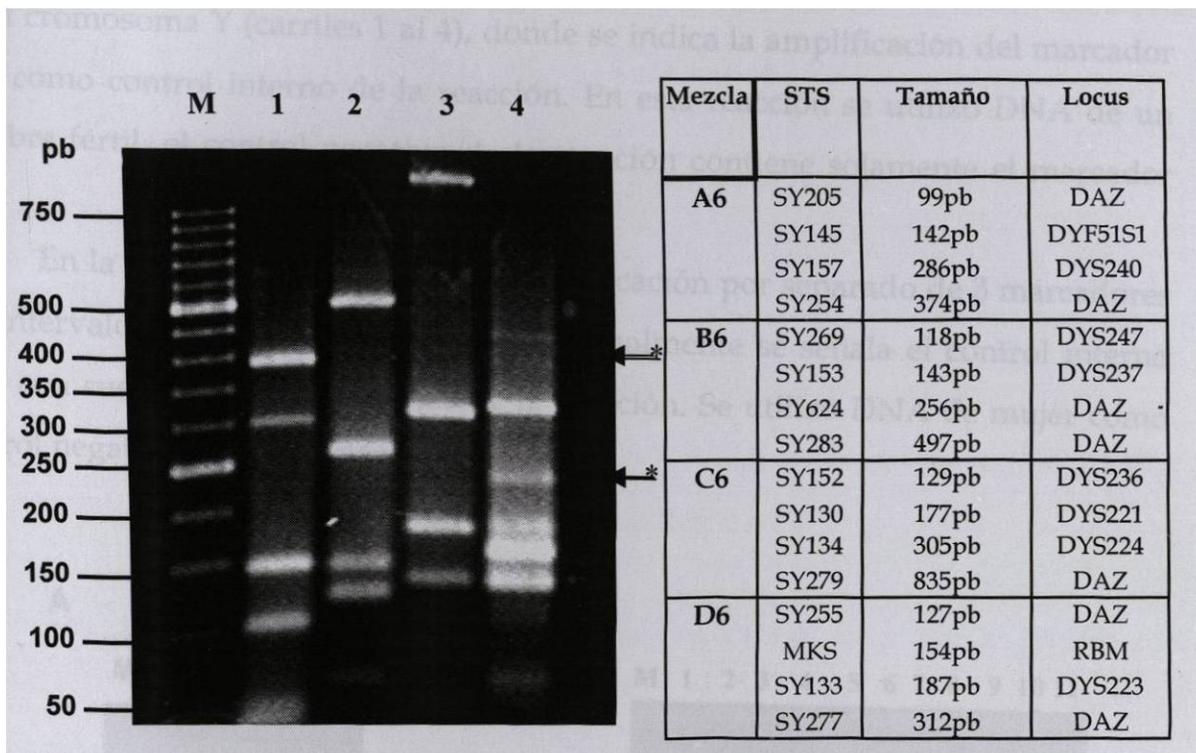


Figura 15. PCR múltiple del intervalo 6. A la izquierda se observa el resultado de los marcadores amplificados y analizados en geles de agarosa al 2.5%; M, marcador de peso molecular de 50 pb. Los carriles 1 a 4 representan las mezclas de reacción A6,B6,C6 y D6 respectivamente. En el cuadro de la derecha se encuentran los marcadores con la información del tamaño del producto de PCR y el locus de cada marcador molecular STS. Las bandas inferiores, cercanas al peso molecular de 50pb son los restos de la reacción de PCR. En la mezcla D se pueden ver bandas de amplificaciones inespecíficas, señaladas con asteriscos (*).

8.5. RESULTADO DE ESTANDARIZACIÓN DE PCR UTILIZANDO UN CONTROL INTERNO

Por otro lado se estableció una prueba confirmatoria para aquellos casos en los cuales algún paciente resultara con la delección de un marcador, es decir, que en la reacción de PCR múltiple no se observara una de las bandas. Esta prueba consistió en amplificar cada uno de los marcadores con un control interno

En la Figura 16 A se observa la amplificación de 4 marcadores del intervalo 5 del cromosoma Y (carriles 1 al 4), donde se indica la amplificación del marcador ZP3 como control interno de la reacción. En esta reacción se utilizó DNA de un hombre fértil, el control negativo de la reacción contiene solamente el marcador ZP3.

En la Figura 16 B se observa la amplificación por separado de 3 marcadores del intervalo 6 del cromosoma Y, donde igualmente se señala el control interno ZP3, con sus respectivos controles de la reacción. Se utilizó DNA de mujer como control negativo de la reacción.

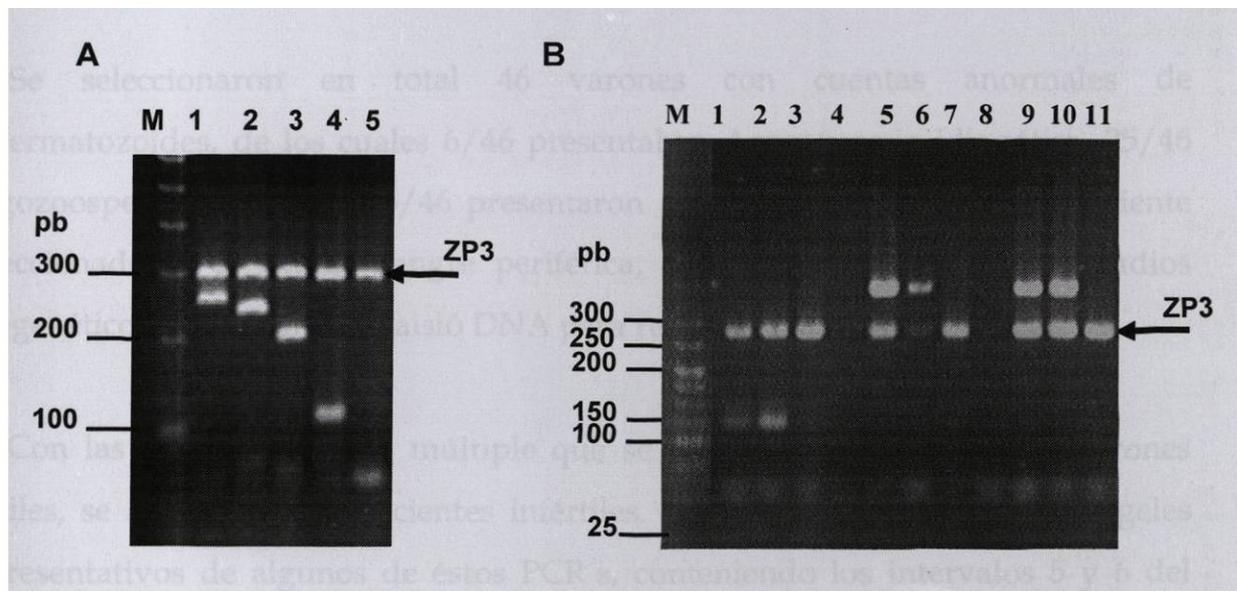


Figura 16. Amplificación de marcadores STS individuales con un control interno de la reacción. A. Cada uno de los marcadores se amplificó por separado en combinación con el marcador ZP3. Carril 1. sY620 (249pb), carril 2 sY128 (228pb), carril 3 sY121 (190pb), carril 4 TB4Y (102PB), carril 5 solo ZP3 (295pb). Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa 2.5% con el Marcador de peso molecular (M) 100pb. B. Carril M marcador de peso molecular 25pb. Carriles 1-4 marcador sY152 (129pb); carriles 5-8 marcador sY254 (374pb) y carriles 9-11 marcador sY283 (497pb). En los carriles 1,2,5,6,9 y 10 se utilizó DNA de varones fértiles; carriles 4, 7 y 11 es DNA de mujer; carriles 4 y 8 son el control negativo de la reacción. Gel de Agarosa 2.5%



8.6. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE PACIENTES UTILIZANDO PCR MÚLTIPLE.

De acuerdo a los objetivos anteriores, se analizaron por pruebas de PCR múltiple a varones infértiles con azoospermia u oligozoospermia.

Como se mencionó anteriormente, las microdeleciones en el cromosoma Y están asociadas a azoospermia y/o oligozoospermia severa, por lo tanto la selección de los pacientes con factor masculino de infertilidad incluyó solo aquellos pacientes con diagnóstico de azoospermia y oligozoospermia severa, que recurrieron al programa de Reproducción Asistida ICSI.

Se seleccionaron en total 46 varones con cuentas anormales de espermatozoides, de los cuales 6/46 presentaban Azoospermia idiopática, 25/46 oligozoospermia severa y 15/46 presentaron oligozoospermia. A cada paciente seleccionado se le extrajo sangre periférica, con la que se realizaron estudios citogenéticos y además se les aisló DNA para realizar el tamizaje genético.

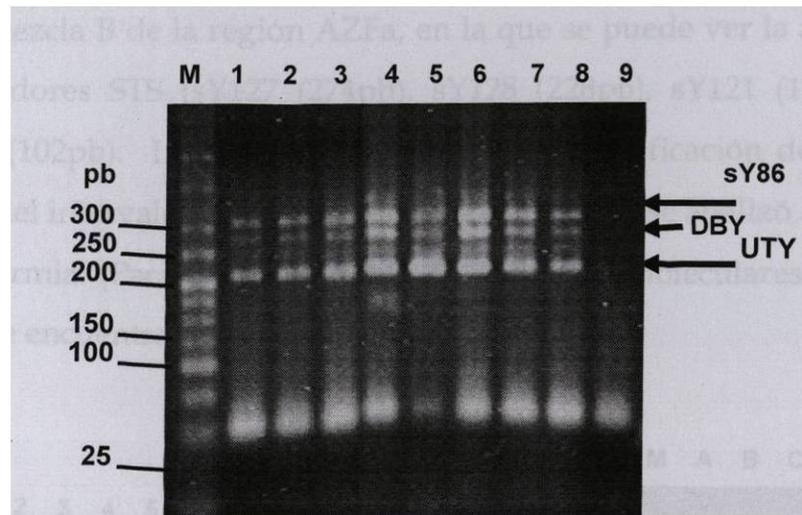
Con las pruebas de PCR múltiple que se estandarizaron utilizando varones fértiles, se analizaron los pacientes infértiles. A continuación se presentan geles representativos de algunos de éstos PCR's, conteniendo los intervalos 5 y 6 del Cromosoma Y (Figuras 17 y 18).

En la figura 17 A se presenta el análisis de 6 pacientes infértiles, con sus respectivos controles, utilizando la mezcla D5, la cual incluye los marcadores: UTY (212pb), DBY (277pb) y SY86 (326pb) de la región AZFa.

La figura 17 B5 se analiza la mezcla C con los marcadores: sY84 (326pb) y sY87 (252pb) de la región AZFa, con sus respectivos controles.



A



B

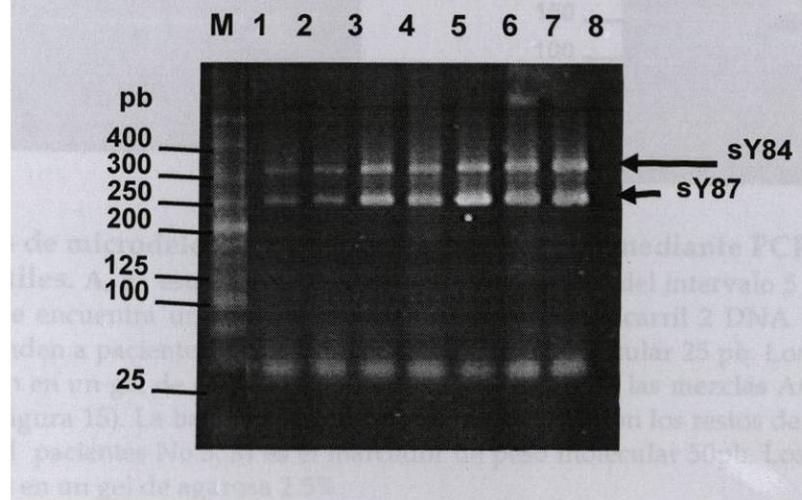


Figura 17. Análisis de microdeleciones en el Intervalo 5 por PCR múltiple en pacientes infértiles . A, en esta figura se amplificó la mezcla D5 del intervalo 5 (Ver figura 5). En el carril 1 se utilizó DNA control, los carriles 2-8 corresponden a pacientes, carril 9 control negativo. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa 2.5%. **B,** amplificación de la mezcla C5 del intervalo 5 (Ver figura 5). En el carril 1 se utilizó DNA control, los carriles 2-7 corresponden a pacientes, carril 8 negativo. M es el marcador de peso molecular 25 pb. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 2.5%.



La figura 18 A presenta el análisis de 7 pacientes con sus respectivos controles, utilizando la mezcla B de la región AZFa, en la que se puede ver la amplificación de cinco marcadores STS (sY127 (274pb), sY128 (228pb), sY121 (190pb), sY182 (132pb) y TB4Y(102pb). La figura 18 B contiene la amplificación de las mezclas A6,B6,C6 y D6 del intervalo 6 del Cromosoma Y, en la cual se analizó a un paciente con oligozoospermia. (Paciente 5, ver tabla 2). Los pesos moleculares de cada una de las mezclas se encuentra en la figura 15.

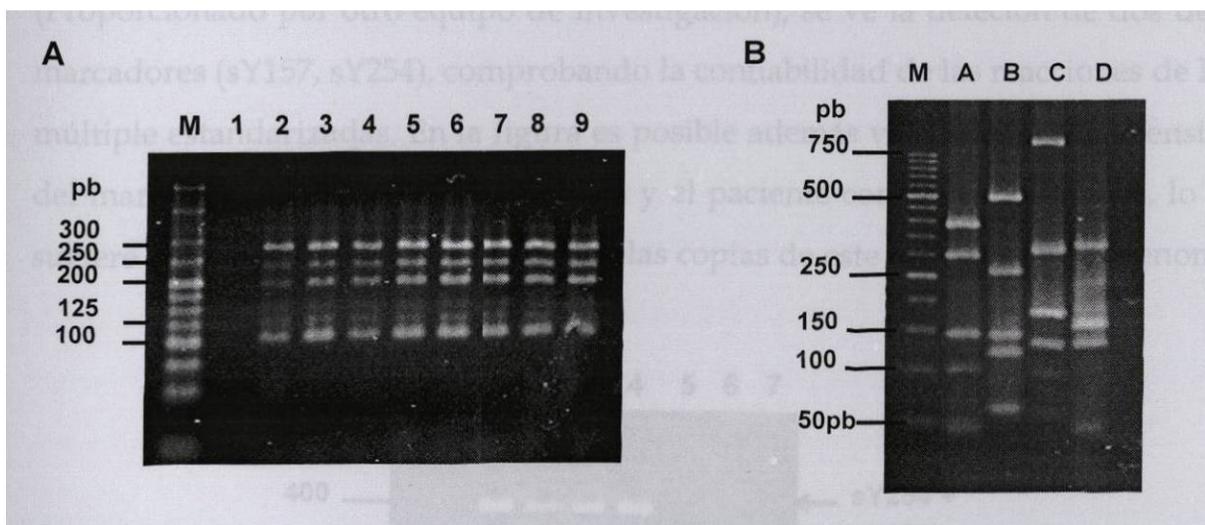


Figura 18. Análisis de microdeleciones en los Intervalos 5 y 6 mediante PCR múltiple en pacientes infértiles. A, en esta figura se amplificó la mezcla B5 del intervalo 5 (Ver figura 14). En el carril 1 se encuentra un control negativo de la reacción, carril 2 DNA control, los carriles 3-9 corresponden a pacientes. M es el marcador de peso molecular 25 pb. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa 2.5%. B. Amplificación de las mezclas A6,B6,C6,D6, del intervalo 6 (Ver figura 15). La banda cercana al tamaño de 25 pb son los restos de la reacción de PCR. Se analizó el pacientes No.5. M es el marcador de peso molecular 50pb. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa 2.5%.

8.7. DETECCIÓN MOLECULAR DE MICRODELECIONES MEDIANTE PCR MÚLTIPLE.

De los pacientes analizados se logró la detección de microdeleciones en el paciente No. 40, el cual tenía un diagnóstico de oligozoospermia severa. Se detectó la delección de 10 marcadores moleculares STS (sY153, sY152, sY277, sY157, sY283,

sY279, sY254, sY205, sY255, sY624), ocho de ellos localizados en el gen DAZ. y uno en el gen PRY4 (Marcador sY157).

Además, se comprobó la confiabilidad de la técnica al detectar microdeleciones en una muestra proporcionada por otro equipo de investigación. La figura 19 muestra un gel representativo de PCR múltiple, donde se puede ver la microdelección de 3 marcadores (sY 205, sY157, sY254) en la mezcla A del intervalo 6, en el paciente antes mencionado, en el DNA control de microdeleciones (Proporcionado por otro equipo de investigación), se ve la delección de dos de los marcadores (sY157, sY254), comprobando la confiabilidad de las reacciones de PCR múltiple estandarizadas. En la figura es posible además ver la diferente intensidad del marcador sY145, entre los controles y el paciente con microdeleciones, lo que sugiere una microdelección en alguna de las copias de este marcador en el genoma.

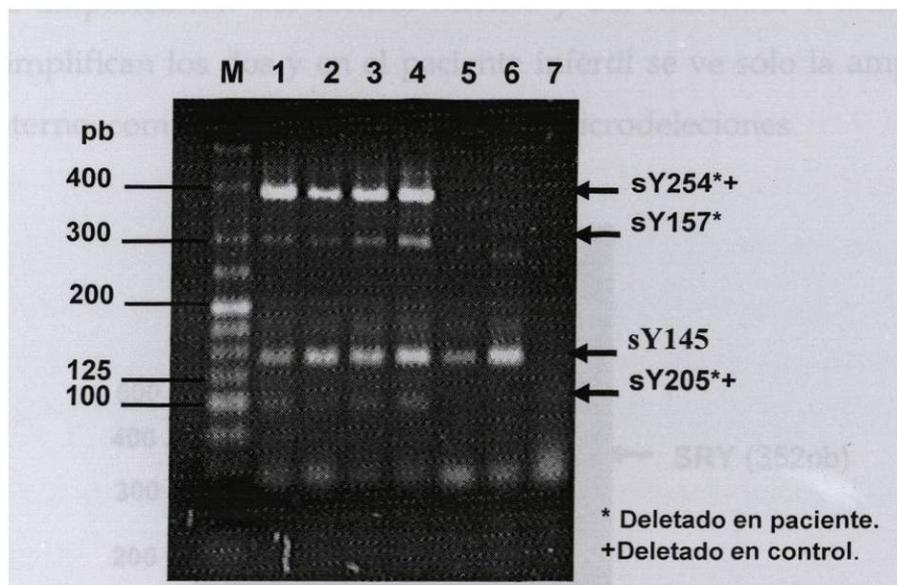


Figura 19. Amplificación de la Mezcla A intervalo 6. M Marcador 25pb. El carril 1 es con DNA control, los carriles 2-5 son el resultado de la amplificación de los pacientes analizados, el carril 5 es el paciente con microdeleciones, el carril 6 se amplificó DNA control positivo para microdeleciones, Carril 7 control negativo. Resultados en gel de agarosa 2.5%

8.8. COMPROBACIÓN DE MICRODELECCIONES UTILIZANDO CONTROL INTERNO

Después de la detección de microdeleciones mediante PCR múltiple se procedió a la comprobación de microdeleciones utilizando un control interno.

La figura 20 es la comprobación de 4 de los 10 marcadores deletados en el paciente No.40, con Oligozoospermia severa.

Las reacciones de PCR se realizaron mezclando todos los reactivos incluyendo el DNA y los oligonucleótidos del control interno (SRY), excepto los marcadores a analizar, los cuales se añadieron individualmente por reacción. Para tener una mayor confiabilidad en los resultados, se realizó el mismo procedimiento con un DNA control de un paciente fértil. La banda que se observa en el gel de la figura 20 a un mismo nivel es el control interno. En el gel se puede observar claramente la amplificación del control interno y del marcador a analizar en el varón fértil amplifican los dos y en el paciente infértil se ve sólo la amplificación del control interno, comprobando la presencia de microdeleciones.

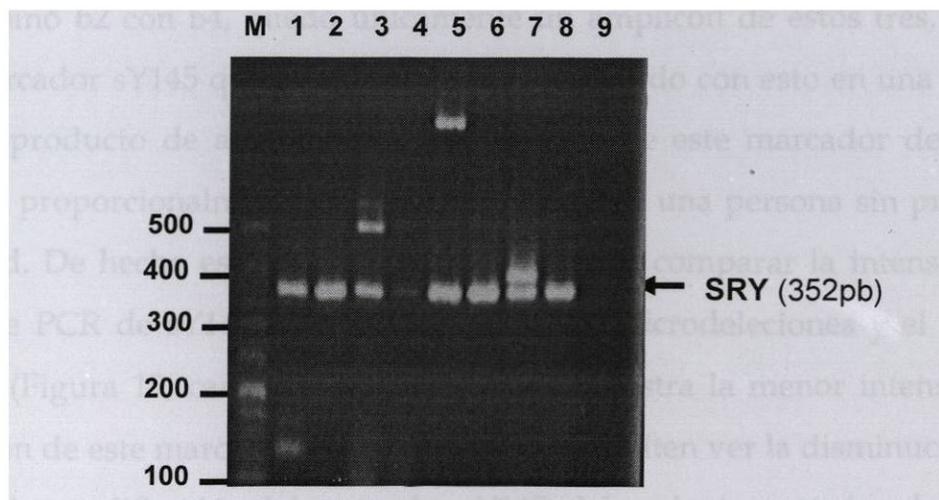


Figura 20. Comprobación de microdeleciones. M Marcador 25pb. Los carriles 1, 3, 5, 7 son el resultado de la amplificación de los marcadores sY152(129pb), sY283(497pb), sY279(835pb) y sY254(374pb) respectivamente en un varón fértil, con su control interno (SRY); los carriles 2,4,6,8 son el resultado de la amplificación de éstos marcadores utilizando DNA del paciente infértil, es posible ver solo la amplificación del control interno, el carril 9 es el negativo, sin DNA. Resultados en agarosa 2.5%



8.8.1. UBICACIÓN DE LAS MICRODELECCIONES EN EL CROMOSOMA Y DEL PACIENTE AFECTADO

Se detectó una deleción de 10 marcadores STS, localizados en la región AZFc (sY153, sY152, sY277, sY157, sY283, sY279, sY254, sY205, sY255, sY624) en el paciente número 40. Posterior a esto, se procedió a determinar la ubicación y el tamaño de la deleción, para lo cual se recurrió al Banco de genes (Gene Bank) del NCBI y al mapa de la región AZFc reportado por Kuroda-Kawaguchi *et al.*, (2001). Esta región AZFc comprende 4.5 Mb (Megabases), está formada por seis familias de amplicones (unidades repetidas masivas), que pueden recombinar entre ellas por homología y causar la deleción del segmento interno (Figura 21).

En base a la localización de los marcadores en los mapas se determinó que el tamaño de la deleción corresponde a 3.5Mb resultado de la recombinación de los amplicones b2 y b4 (Figura 21). Esta región deletada involucra al marcador sY145 del cual existen tres copias, una en cada uno de los amplicones b2, b3 y b4. Puesto que recombinó b2 con b4, quedó únicamente un amplicón de estos tres, es decir que del marcador sY145 quedó uno de ellos. De acuerdo con esto en una reacción de PCR el producto de amplificación proveniente de este marcador debería de encontrarse proporcionalmente en mayor cantidad en una persona sin problemas de fertilidad. De hecho esto es lo que observamos al comparar la intensidad del producto de PCR de sY145 entre las personas sin microdeleciones y el paciente número 40 (Figura 19, carril 5), quien es el que muestra la menor intensidad de amplificación de este marcador. Estos resultados permiten ver la disminución en la intensidad de amplificación del marcador sY145, del paciente con microdeleciones, comparado con la amplificación de los controles.

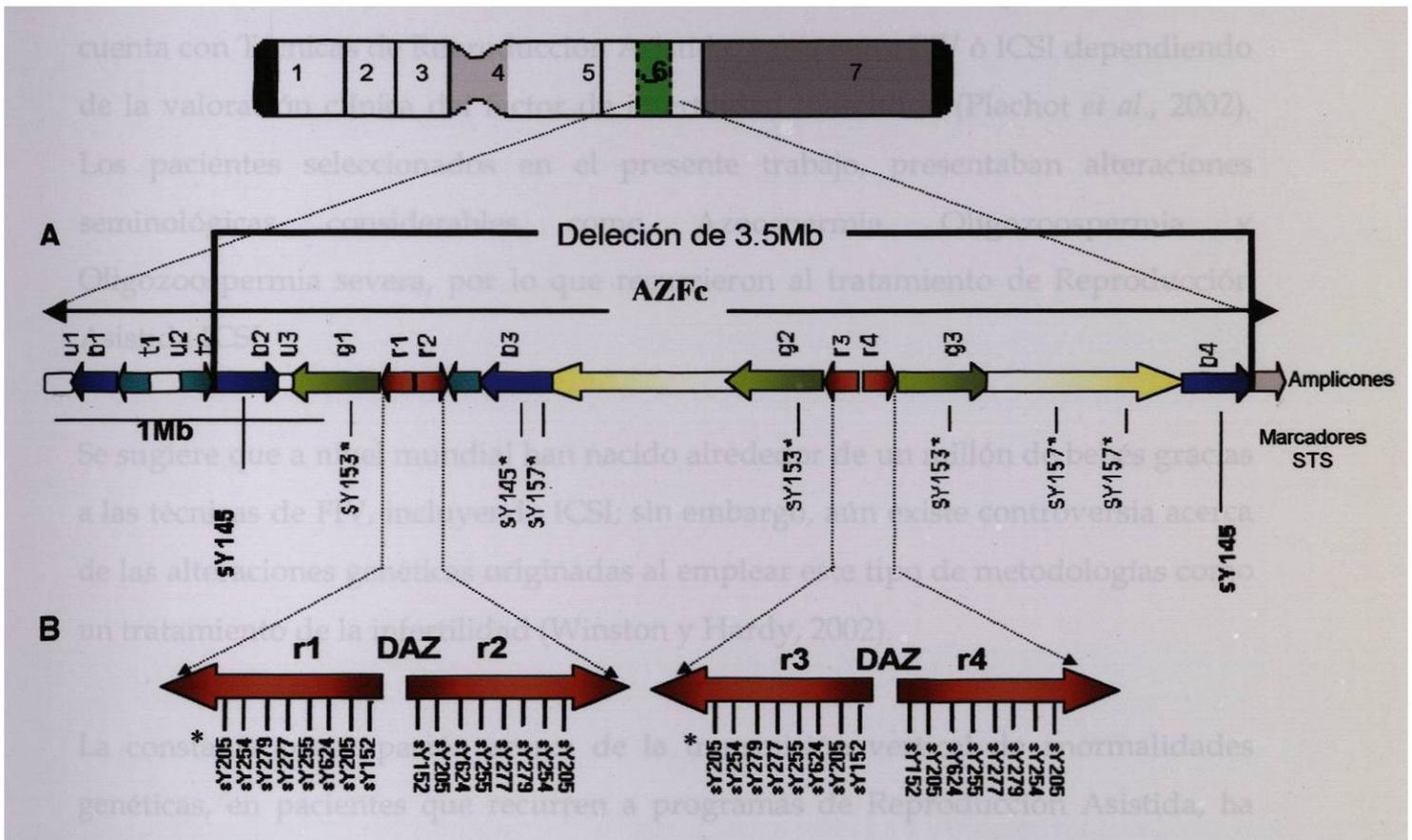


Figura 21. Mapa de Microdeleciones de la región AZFc del Cromosoma Y en un paciente oligozoospermico severo. A Región AZFc con la orientación y ubicación de los amplicones (flechas), y la localización de los diferentes marcadores moleculares STS deletados en el paciente. **B.** Genes DAZ con los diferentes marcadores analizados, los cuales se encuentran repetidos y deletados(*).

IX. DISCUSION

Riesgos del ICSI como Tratamiento de Reproducción Asistida.

La infertilidad a nivel mundial tiene una frecuencia del 10 al 15%, la decisión acerca de que tratamiento de infertilidad brindar a la pareja, cuando se cuenta con Técnicas de Reproducción Asistida, varía entre FIV ó ICSI dependiendo de la valoración clínica del factor de infertilidad masculino (Plachot *et al.*, 2002). Los pacientes seleccionados en el presente trabajo, presentaban alteraciones seminológicas considerables como Azoospermia, Oligozoospermia y Oligozoospermia severa, por lo que recurrieron al tratamiento de Reproducción Asistida ICSI.

Se sugiere que a nivel mundial han nacido alrededor de un millón de bebés gracias a las técnicas de FIV, incluyendo ICSI; sin embargo, aún existe controversia acerca de las alteraciones genéticas originadas al emplear este tipo de metodologías como un tratamiento de la infertilidad (Winston y Hardy, 2002).

La constante preocupación acerca de la transmisión vertical de anormalidades genéticas, en pacientes que recurren a programas de Reproducción Asistida, ha llevado a la implementación de innovadoras metodologías que permiten incluso saber la calidad del DNA genómico y mitocondrial de los espermatozoides en pacientes con problemas de infertilidad (Angelopoulous *et al.*, 1999). De hecho, Wei *et al.*, en el 2000 demostraron una relación directa de una fertilidad disminuida cuando el DNA mitocondrial de los espermatozoides estaba dañado. Por otro lado, Morris *et al.*, (2002) mediante ensayos de electroforesis de células individuales (Comet assay) fueron capaces de evaluar la calidad del DNA genómico de los espermatozoides de pacientes que recurrieron a ICSI. Mediante esta evaluación



pudieron predecir fallas en el desarrollo del embrión después del ICSI, en los casos donde el daño del DNA era significativo.

También es sabido que algunas anormalidades cromosómicas están asociadas a la infertilidad. Sin embargo, en un estudio realizado por Bonduelle *et al.*, en el 2002 utilizando métodos mas convencionales de citogenética a nivel prenatal, de 1586 individuos analizados, provenientes de ICSI, encontraron una mayor frecuencia (1.7%) de aberraciones cromosómicas y aneuploidias de cromosomas sexuales con respecto a la población en general (0.87%). De este 1.7% el 50% de las anormalidades fueron de origen paterno. Estos datos indican que es posible que alguno de los pacientes infértiles analizados en la presente tesis pudiese haber heredado alguna aberración cromosómica responsable de su infertilidad. Sin embargo, en un estudio citogenético de estos pacientes realizado en paralelo a la presente tesis, se encontró que únicamente uno de ellos presentó un mosaicismo de una inversión del Cromosoma 14 (datos no publicados). Actualmente se desconoce si una inversión del cromosoma 14 pudiese estar asociada a infertilidad.

Transmisión genética de microdeleciones en el Cromosoma Y.

Estudios realizados por Khorram *et al.*, en el 2001 indican que debido al éxito y demanda que ha tenido en los últimos años el procedimiento de ICSI como tratamiento de infertilidad, contrario a lo esperado, poco tiempo se le ha dedicado a desarrollar pruebas que valoren a nivel genético la calidad de los espermatozoides. Esto es importante, ya que se han encontrado aberraciones cromosómicas asociadas a anormalidades en los espermatozoides.

Uno de los estudios mas recientes que sugieren como un factor de riesgo genético a la azoospermia y la oligozoospermia, es el realizado por Dohle *et al.*, en el 2002 quienes encontraron deleciones en la región AZFc de pacientes que recurrieron a





ICSI como tratamiento de infertilidad. Las deleciones encontradas por este grupo de investigación son similares a las encontradas por nosotros. El porcentaje de microdeleciones encontradas en el presente estudio fué del 2%, coincidiendo con diferentes equipos de investigación (Landuyt *et al.*, 2000; Krausz *et al.*, 1999), que han encontrado este porcentaje de microdeleciones, cuando se realiza el tamizaje genético a pacientes que recurren a ICSI como tratamiento de infertilidad, sin realizar estrictos criterios de exclusión. Esto es importante considerando la transmisión vertical a la descendencia.

La importancia en la detección de microdeleciones no únicamente está implicada en la transmisión vertical de la infertilidad masculina. Estudios recientes, realizados por Siffroi *et al.*, en el 2001 sugieren una asociación entre las microdeleciones y la presencia de mosaicismos 45,XO (Síndrome de Turner) en células sanguíneas y en espermatozoides, de pacientes con deleciones grandes en la región AZFc del Cromosoma Y. Aún no es claro el mecanismo por el que ocurren este tipo de mosaicismos, sin embargo se considera de alto riesgo en pacientes portadores de microdeleciones, que recurren a técnicas de reproducción asistida (Winston y Hardy, 2002).

Krausz *et al.* en 1999 realizaron un estudio en pacientes con Azoospermia de causa desconocida (Idiopática) y en pacientes con oligozoospermia y normospermia, con infertilidad no-idiopática, ellos encontraron un porcentaje significativamente mayor de microdeleciones en el Cromosoma Y, en pacientes con infertilidad masculina idiopática, lo cual concuerda con la detección de microdeleciones en el presente estudio, donde el paciente presentaba infertilidad idiopática.

Otro punto importante planteado por Krausz *et al.*, en el 2001 es la hipótesis de que en los pacientes con azoospermia u oligozoospermia severa idiopáticos, que no



presentan microdeleciones en el cromosoma Y, pudieran portar otros rearrreglos o secuencias variantes en la región no recombinante del cromosoma Y, asociado con disminución de espermatogénesis. De hecho al analizar una población Danesa con azoospermia y oligozoospermia severa encontraron un haplotipo asociado con la infertilidad. Sería interesante el determinar si este tipo de haplotipo esta asociado con las cuentas bajas de espermatozoides en nuestra población analizada que no presentan microdeleciones.

Por otro lado, nuestros resultados concuerdan con los resultados de Kim *et al.*, en 1999 ya que el paciente con microdeleciones en el gen DAZ, no presentó deleciones en la región AZFa, además los estudios histológicos fueron normales, de acuerdo con Kansaki *et al.*, en el 2001 quienes afirman no encontrar un fenotipo citogeneticamente anormal en pacientes con microdeleciones en la región AZFc del Cromosoma Y.

El paciente que presentó la deleción de diez marcadores, en la región AZFc, al ser tratado mediante ICSI, el embrión tuvo varias fallas en la implantación, por lo que se tuvo que recurrir a espermatozoides de donante, estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Golde *et al.*, en el 2002 donde demostraron que hay decremento en el rango de fertilización y en la calidad embrionaria, en hombres oligozoospermicos con microdeleciones en la región AZFc del Cromosoma Y, características presentes en el paciente analizado.

Microdeleciones en genes con multicopias: DAZ y RBM

Un dato muy importante de tomar en cuenta es que los genes DAZ y RBM se encuentran en multicopias (4 copias del gen DAZ y 15 copias del gen RBM) en el intervalo 6 del Cromosoma Y (Moro *et al.*, 2000), y dependiendo de la región



microdeletada se pueden perder dos o las cuatro copias del gen DAZ y copias del gen RBM, localizadas en el intervalo 6. Es decir que el hecho de que se vea una amplificación del marcador DAZ o RBM no descarta la posibilidad de una microdelección que involucre únicamente parte de las copias. El mejor procedimiento para resolver esta situación es el de realizar un Southern Blot (Najmabadi et al., 1996; Grimaldi *et al.*, 1998).

Se han desarrollado diferentes metodologías que permiten la detección de deleciones intragénicas en solo una de las copias, de estos genes. Algunos investigadores han utilizado ensayos con patrones de restricción en el gen DAZ (Lucas *et al.*, 2000).

Una de las técnicas más actuales para la detección de secuencias repetidas, en los cromosomas, es la modificación de la técnica de PRINS (*Primed in situ labelling*). Originalmente esta técnica se diseñó para detectar secuencias de DNA repetidas en las regiones del centrómero y en el telómero. Una modificación de esta técnica realizada por Kadandale *et al.*, en el 2002 permite la detección de copias sencillas de un gen, lo que permitió evaluar las translocaciones Y-X del gene SRY, así como confirmar deleciones individuales de marcadores en los genes DAZ y RBM.

Por último Vries *et al.*, en el 2002 pudieron distinguir entre secuencias variantes de familia, las cuales son utilizadas para distinguir a las cuatro copias del gen DAZ debido a polimorfismos de algún nucleótido en los genes orientados cabeza-cabeza. Mediante PCR-RFLP, dirigido a los intrones, ellos analizaron 139 pacientes, de los cuales 129 tenían cuatro copias del gen DAZ, 6 pacientes tenían solo dos copias y 4 no tenían alguna copia. De los pacientes analizados en este trabajo, sólo en uno de ellos se detectaron deleciones en las cuatro copias del gen DAZ, sin



embargo aún no está claro si el resto de los pacientes presentaba la delección de solo dos de las copias del gen.

Estos resultados sugieren que la frecuencia de microdeleciones podría ser mas alta que la que se tiene reportada por métodos convencionales como el utilizado en el presente trabajo (PCR-STS), por lo que es necesario en casos de secuencias repetidas realizar las metodología antes descritas, así como la implementación de nuevas metodologías que permitan la correcta detección de microdeleciones, a un menor costo.

En los programas de reproducción asistida, principalmente ICSI, es de gran importancia la implementación de técnicas de diagnóstico molecular para la detección de problemas genéticos. El no implementar este tipo de pruebas, conllevaría en este caso, al aumento en las alteraciones genéticas en la población (Bahsin *et al.*, 1994; Liow *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2001).



X. CONCLUSIONES

1. Se estandarizó un procedimiento de PCR múltiple para la Detección Molecular de Microdeleciones en el Cromosoma Y.
2. Se analizaron 46 pacientes que recurrieron a ICSI como tratamiento de infertilidad. Fue posible detectar que la etiología de la infertilidad del paciente 40 era de origen genético, siendo la causa la microdelección de 10 marcadores genéticos.
3. El tamaño de la deleción en la región AZFc del paciente 40 es de 3.5Mb. Esta deleción resultó de un evento de recombinación homóloga entre los amplicones b2 y b4.
4. Desde el punto de vista económico, al estandarizar las pruebas de PCR múltiple con los marcadores STS reportados en la literatura, se logró un ahorro significativo de hasta un 90% con respecto a la utilización de un Kit comercial.
5. El presente trabajo aportó un beneficio social que es el consejo genético que se brindó en particular al paciente con infertilidad, y en general a cualquier pareja que recurre a ICSI como tratamiento de Reproducción Asistida.
6. Todos los paciente con indicaciones de ICSI como tratamiento de infertilidad deberán contar con un consejo genético.



XI. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores etiológicos de infertilidad masculina.....	12
Tabla 2. Marcadores moleculares STS del cromosoma Y (Yq11).....	43
Tabla 3. Marcadores moleculares STS utilizados como control interno.....	43
Tabla 4. Programa del Termociclador	44
Tabla 5. Pacientes con Azoospermia y oligozoospermia analizados.....	48





XII. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la espermatogénesis.....	15
Figura 2. Mapas del Cromosoma Y.....	17
Figura 3. Proteína DAZ.....	22
Figura 4. Organización genómica del gen DAZ.....	23
Figura 5. Mecanismo de Deleciones intersticiales por recombinación homóloga....	27
Figura 6. Región AZFc.....	30
Figura 7. Técnicas de micromanipulación.....	35
Figura 8. Equipo semiautomatizado para ICSI.....	37
Figura 9. Mapa del Cromosoma Y.....	43
Figura 10. DNA genómico de varones fértiles.....	50
Figura 11. DNA genómico de pacientes.....	51
Figura 12. Estandarización de PCR-STS.....	52
Figura 13. Estandarización de PCR-STS.....	52
Figura 14. PCR múltiple del intervalo 5.....	54





Figura 15. PCR múltiple del intervalo 6.....55

Figura 16. Amplificación de marcadores STS individuales con un control interno de la reacción.....56

Figura 17. Análisis de microdeleciones en el Intervalo 5 por PCR múltiple en pacientes infértiles.....58

Figura 18. Análisis de microdeleciones en los Intervalos 5 y 6 mediante PCR múltiple en pacientes infértiles.....59

Figura 19. Amplificación de la Mezcla A intervalo 6.....60

Figura 20. Comprobación de microdeleciones.....61

Figura 21. Mapa de Microdeleciones de la región AZFc del Cromosoma Y en un paciente oligozoospermico severo.....63



XIII. LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AZF	Factor de Azoospermia
C	Citocina
dATP	Desoxiadenosintrifosfato
DAZ	Deletado en Azoospermia
dCTP	Desoxicitidintrifosfato
dGTP	Desoxiguanosintrifosfato
DNA	Acido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleosintrifosfato
dTTP	Desoxitimidintrifosfato
EDTA	Acido Etilendiamino Tetraacético
G	Guanina
Mb	Megabases
NaCl	Cloruro de Sodio
NaHCO ₃	Carbonato de Sodio
NH ₄ Cl	Cloruro de Amonio
mM	Milimolar
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Iones Hidrógeno
RBM	Motibo de Unión al RNA



SCOS	Síndrome de Solo Células de Sertoli
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SGA	Arresto en la Espermatogénesis
STS	Sequence-Tagget Site
T	Timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris- EDTA
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometono Hidroclorado
TSNT	Triton X-100, SDS, NaCl, Tris-HCl
μl	Microlitros
Yq11	Brazo Largo del Cromosoma Y



XIV. LITERATURA CONSULTADA

Abusheikha N, Lass A, Brinsden P (2001) XX males without SRY gene and with infertility. *Human Reproduction*. **16**:4 717-718.

Affara A.N (2001) The role of the Y Chromosome in male infertility. *Expert Reviews in molecular medicine*. **1**-16.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) Molecular Biology of the Cell. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana Tercera Edición. Capítulo 20. Parte IV.

Angelopoulos T, Moshel YA, Lu L, Macanas E, Grifo JA, Krey CL (1998) Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedures: effect on the clinical outcome after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. **69**:4 740-747.

Bhasin S, Kretser DM, Baker WG (1994) CLINICAL REVIEW 64 Pathophysiology and Natural History of Male Infertility. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **19**:6 1525-1530.

Berger A (1999) What is involved in intracytoplasmic sperm injection? *British Medical Journal*. **318**:705.

Brandell R, Mielnik A, Liotta D (1998) AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic test. *Human Reproduction*. **13**:2812-5.

Briton-Jones C, Haines CJ (2000) Microdeletions on the long arm of the Y chromosome and their association with male-factor infertility. *HKMJ*. **6**:184-9.

Bonduelle M., Assche EV., Joris H., Keymolen K., Devroey P, Steirteghem AV., Liebaers I (2002) Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Human Reproduction*. **17**:10 2600-2614.

Calogero AE, Garofalo MR, D'Agata R (1999) Current status of the molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions in the work-up of male infertility. *Human Reproduction*. **14**:2 275.

Castro-Pérez A (2000) Estandarización de una prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección molecular de microdeleciones en el intervalo 6 del cromosoma Y en varones infértiles. Tesis, Facultad de Ciencias Biológicas. UANL



Champion MD, Hawley RS (2002) Playing for half the deck: the molecular biology of meiosis. *Fertility Supplement Nature Cell Biology & Nature Medicine*. S50-S56.

Chanddley AC., Cooke HJ (1994) Human male fertility Y linked genes and spermatogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **3**:1449-1452.

Chang LP, Sauer MV, Brown (1999) Y crhromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. *Human Reproduction*. **41**:2689-2694.

Cooke HJ, Hargreave T, Elliott DJ (1998) Understanding the genes involved in spermatogenesis: a progress report. *Fertility and sterility*. **69**:6 989-995.

Crow JF (2000) The origins, atterns and implications of human spontaneous mutation. *Nature*. **1**:40-46.

Dohle GR, Halley DJJ, Van Hemel JO, Van den Oweland AMN, Pieters MHEC, Weber RFA, Govaerts LCP (2002) Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Human Reproduction*. **17**:1 13-16.

Eberhart CG, Maines JZ, Wasserman SA (1996) Meiotic cell-cycle requirement for a fly homolog of human deleted in azoospermia. *Nature*. **381**:783-785.

Edwards RG (2001) The bumpy road to human *in vitro* fertilization. *Nature Medicine* **7**: 1091-1094.

Elliott DJ, Oghene K, Makarov G, Makarova O, Hargreave TB, Chandley AC, Eperon IC (1998) Dynamic changes in the subnuclear organisation of pre-mRNA splicing proteins and RBM during germ cell development. *J Cell Sci* **111** 1255.1265
The bumpy road to human *in vitro* fertilization. *Nature Medicine* **7**: 1091-1094.

Elliott DJ, Millar MR, Oghene K., Ross A, Kiesewetter F, Pryor J, McIntyre M, Hargreave TB, Saunders PTK, Vogt PH, Chandley AC, Cooke H (1997) Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 3848-3853.

Fai Y, Lau C (1999) Gonadoblastoma, Testicular and Prostate Cancers, and the TSPY Gene. *Am. J. Hum. Genet.* **64**:921-927.

Ferlin A, Moro E, Garolla A, Foresta C (1999) Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Human Reproduction*. **14**:7 1710-1716.





Foresta C, Ferlin A, Garolla A (1998) High frequency of well defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reproduction*. **13**:302-7.

Foresta C, Moro E, Ferlin A (2001) Y Chromosome Microdeletions and Alterations of Spermatogenesis. *Endocrine Reviews*. **22**:2 226-239.

Foresta C, Moro E, Garolla A, Onisto M, Ferlin A (1999) Y Chromosome Microdeletions in Cryptorchidism and Idiopathic Infertility. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **84**:10 3660-3665.

Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Rossato M, Barbaux A, De Bortoli A (1997) Y-Chromosome Deletions in Idiopathic Severe Testiculopathies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **82**:4 1075-1080.

Foster WJ, Brennan EF, Hampikian GK, Goodfellow PN, Sincliar AH, Lovell-Badge R, Selwood L, Renfree MB, Cooper DW, Graves MAJ (1992) Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials. *Nature*. **359** 531-533.

Fujisawa M, Shirakawa T, Kanzaki M, Okada H, Arakawa S, Kamidono S (2001) Y-chromosome microdeletion and phenotype in cytogenetically normal men with idiopathic azoospermia. *Fertility and Sterility*. **76**:3 491-495.

Golde JTR, Wetzels MMA, Graf R, Tuerlings JA, Braat DDM, Kremer JAM (2001) Decreased fertilization rate and embryo quality after ICSI in oligozoospermic men with microdeletion in the azoospermia factor c region of the Y chromosome. *Human Reproduction*. **16**:2 289-292.

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (1998) *Genética*, Quinta Edición, Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, México, pp 550-556.

Grimaldi P, Scarponi C, Rossi P, March RM, Fabbri A, Isidori A, Spera G, Krausz C, Geremia R (1998) Analysis of Yq microdeletions in infertile males by PCR and DNA hybridization techniques. *Molecular Human Reproduction*. **4**: 116-1121.

Habermann B, Mi HF, Edelmann A, Bohring C, Ba"ckert IT, Kiesewetter F, Aumu"ller G, Vogt PH (1998) DAZ (Deleted in AZoospermia) genes encode proteins located in human late spermatids and in sperm tails. *Human Reproduction*. **13**:2 363-369.



Hackstein JHP, Hochstenbach R, Pearson PL (2000) Towards an understanding of the genetics of human male infertility: lessons from flies. *Elsevier Science TIG*. **16**:12 565-572.

Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH (1997) Multiplex PCR parameters and step by step protocol. *Biotechniques*. **23**:3 504-511.

Houston DW, Zhang J, Maines JZ, Wasserman SA, King ML (1998) A *Xenopus* DAZ-like gene encodes an RNA component of germ plasm and is a functional homologue of *Drosophila boule*. *Development* **127** 171-180.

Irvine DS, Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB (1998) Changes in male reproductive health?. *J. Biosci.* **26**:4 429-435.

Jadranka S, Cvitkoviæ P, Myers A, Saiki RK, Stavljeniaè AR (2001) Genetic Markers of Male Infertility: Y Chromosome Microdeletions and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Gene Mutations. *Croatian Medical Journal* **42**:4416-420.

Jiang MC, Lien YR, Chen SU, Ko TM, Ho HN, Yang YS (1999) Transmission of de novo mutations of the deleted in azoospermia genes from a severely oligozoospermic male to a son via intracytoplasmic sperm injection *Fertility and Sterility*. **71**:6.

Jobling MA, Tyler-Smith C (2000) New uses for new haplotypes the human Y chromosome, disease and selection. *Elsevier Science*. **16**:8 352-359.

Jobling MA, Samara V, Pandya A, Fretwell N, Bernasconi B, Mitchel RJ, Gerelsaikhan T, Dashnyam B, Sajantila A, Salo PJ, Nakahori Y, Disteché CM, Thangaraj K, Singh L, Crawford MH, Tyler-Smith C (1996) Recurrent duplication and deletion polymorphisms on the long arm of the Y chromosome in normal males. *Human Molecular Genetics*. **5**:11 1767-1775.

Johnson L, Staub C, Neaves B, Yanagimachi R (2001) Live human germ cells in the context of their spermatogenic stages. *Human Reproduction* **16**:8 1575-1582.

Kadandale JS, Wachtel SS, Tunca Y, Martens PR, Wilroy RS, Tharapel AT (2002) Deletion of RBM and DAZ in Azoospermia: Evaluation by PRINS. *American Journal of Medical Genetics*. **107**:105-108.

Kamisckhe A, Gromoll J, Simoni M, Behre HM, Nieschlag E (1999) Transmission of a Y chromosomal deletion involving the deleted in azoospermia (DAZ) and



chromatin (*CDY1*) genes from father to son through intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*. **14** 2320-2.

Kamp C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K, Vogt HP (2000) Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of a intrachromosomal recombinations events. *Human Molecular Genetics*. **9**:17 2563-2572.

Kanzaki M, Okada H, Arakawa S, Kamidono S (2001) Y-chromosome microdeletion and phenotype in cytogenetically normal men with idiopathic azoospermia. *Fertility and Sterility*. **76**: 3 491-495.

Katz P, Nachtigall P, Showstack J (2002) The economic impact of the assisted reproductive technologies *Fertility Supplement Nature Cell Biology & Nature Medicine*. S29-S32.

Ke Y, Su B, Song X, Lu D, Chen L, Li H, Qi C, Marzuki S, Deka R, Underhill P, Xiao C, Shriver M, Lell J, Wallace D, Wells RS, Seiestad M, Oefner P, Zhu D, Jin J, Huang W, Chakraborty R, Chen Z, Jin L (2001) African origin of modern humans in east Asia: A tale of 12,000 Y Chromosomes. *Science* **292**: 1151-1155.

Khorram O, Patrizio P, Wang C, Swerdloff R (2001) Reproductive Technologies for Male Infertility. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **86**: 6 2373-2379.

Kim SW, Kim KD, Paick JS (1999) Microdeletions within the azoospermia factor subregions of the Y chromosome in patients with idiopathic azoospermia. *Fertility and Sterility*. **72**: 2 349-53.

Kobayashi K, Mizumo K, Hida A (1995) PCR análisis of the Y chromosome long arm in azoospermic patients. Evidence for a second locus required for spermatogenesis. *Human Molecular Genetics*. **3**:1965-1967.

Krausz C, Mastellone BC, Granchi S, McElreavey K, Scarcelli G, Forti G (1999) Screening for microdeletions of Y chromosome genes in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*. **14**:7 1717-1721.

Krausz C, McElreavey K (1999) Y chromosome and male infertility. *Frontiers in Bioscience*. **1**-14.

Krausz C, Meyts ER, Larsen LF, Murci LQ, McElreavey K, Skakkebaek NE (2001) Double-blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm



parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific for spermatogenic failure. *J Clin Endocrinol Metab.* **86**: 2638-2642.

Krausz C, Murcil Q, Meyts ERD, Jorgensen N, Jobling MA, Rosser ZH, Skakkebaek NE, McElreavey K (2001) Identification of a Y chromosome haplogroup associated with reduced sperm counts. *Human Molecular Genetics.* **10**:18 1873-1877.

Krausz C, Quintana M, Barbaux S, Siffroi JP, Rouba IH, Delafontaine D, Souleyreau SH, Arvis G, Taar JP, Tar A, Jeandidier E, Plessis G, Boyrgeron T, Dadoune JP, Fellous M, Mc Elreavey K (1999). A High Frequency of Y Chromosome Deletions in Males with Nonidiopathic Infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* **84**: 3606-3612.

Kleiman SE, Maymon SBB, Yogev L, Paz G, Yavetz H (2001) Prognostic value of Y deletion analysis: The prognostic role of the extent of Y microdeletions on spermatogenesis and maturity of Sertoli cells. *Human Reproduction.* **16**:3 339-409.

Kleiman SE, Yogev L, Gamzu R, Hauser R, Botchan A, Lessing JB, Paz G, Yavetz H (1999) Genetic evaluation of infertile men. *Human Reproduction.* **14**: 1 33-38.

Kretser DM (1997) Male Infertility. *Lancet.* **349**: 787-90.

Kretser DM, Baker WG (1999) Infertility in Men: Recent Advances and Continuing Controversies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* **84**:10.

Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Silber S, Oates R, Rozen S, Page DC (2001) The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nature Genetics.* **29**:279-286.

Lahn BT, Page D (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science.* **278**:675-680.

Landuyt VL, Lissens W, Stouffs K, Tournaye H, Liebaers I, Steirteghem AV (2000) Validation of a simple Yq deletion screening programme in an ICSI candidate population. *Molecular Human Reproduction.* **6**:4 291-297.

Landuyt VL, Lissens W, Stouffs K, Tournaye H, Steirteghem AV, Liebaers I (2001) The role of USP9Y and DBY in infertile patients with severely impaired spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction.* **7**:7 691-693.





Liow LS, Yong LE, Chye S (2001) Prognostic value of Y analysis: How reliable is the outcome of Y deletions analysis in providing a sound prognosis?. *Human Reproduction* **16**: 9 9-12.

Lucas H, Patrat C, Jouannet P, Beldjord C, Bienvenu T (2000) A novel, rapid, and accurate method for detecting microdeletion involving the DAZ gene in infertile men. *Fertility and Sterility*. **73**:2 242-248.

Ma K, Inglis JD, Sharkey A, Bickmore WA, Hill RE, Prosser EJ (1993) A Y-chromosome gene family with RNA-binding protein homology-candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell*. **75** 1287-1295.

Ma K, Mallidis C, Bhasin S (2000) The role of Y chromosome deletions in male infertility. *European Journal of Endocrinology*. **142** 418-430.

Mark D, Johnson MD (1998) Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertility and Sterility*. **70**:3.

Maymon SBB, Paz G, Elliott DJ, Hammel I, Kleiman SE, Yogev L, Hauser R, Botchan A, Yavetz H (2000) Maturation phenotype of Sertoli cells in testicular biopsies of azoospermic men. *Human Reproduction*. **15**:7 1537-1542.

Matzuk MM, Lamb DJ (2002) Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Fertility Supplement Nature Cell Biology & Nature Medicine*. S41-S49.

McElreavey K, Krausz C (1999) Male infertility and Y chromosome. *Am J Hum. Genet.* **64**:928-933.

McLaren A (1998) Genetics and human reproduction *Elsevier Science*. **14**:10 427-431.

Moro E, Ferlin A, Yen PS, Franchi PG, Palka G, Foresta C (2000) Male Infertility Caused by a de Novo Partial Deletion of the DAZ Cluster on the Y Chromosome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **85**:11 4069-4074.

Morris I.D, Ilott S, Dixon L (2002) The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction*. **17**:4 990-998.

Mulhall JP, Reijo R, Alagappan R, Brown L, Page D, Carson R, Oates RD (1997) Azoospermic men with deletion of the DAZ gene cluster are capable of completing spermatogenesis: fertilization, normal embryonic development and pregnancy



occur when retrieved testicular spermatozoa are used for intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*. **12**: 3 503-508.

Najmabadi H, Huang V, Yen P, Subbarao MN, Hasin DB, Banaag L, Naseeruddin S, de Kretser DM, Baker HWG, Mclachlan H, Loveland KA, Bhasin S (1996) Substantial Prevalence of Microdeletions of the Y-Chromosome in Infertile Men with Idiopathic Azoospermia and Oligozoospermia Detected Using a Sequence-Tagged Site-Based Mapping Strategy. *Journal Clin Endocrinol Metab*. **81**: 1347-1352.

Nap AW, Golde RJT, Tuerlings JHA, Sutter DP, Pietters HEC, Giltay JC, Kastrop PMM, Braat DDM, Kremer JAM (1999) Reproductive decisions of men with microdeletions of the Y chromosome: the role of genetic counselling. *Human Reproduction*. **14**:8 2166-2169.

Okabe M, Ikawa M, Ashkenas J (1998) Male Infertility and the genetics of spermatogenesis. *Am. J. Hum Genet*. **62**:1274-1281.

Okwn OE, Igboeli G, Ford JJ, Lunstra DD, Johnson L (1996) Number and function of Sertoli cells, number and yield of spermatogonia, and daily sperm production in three breeds of boar. *Journal of Reproduction and Fertility*. **107**: 137-149.

Oliva R, Margarit E, Balleca JL, Carrió A, Sánchez A, Milá M, Jiménez L, Alvarez JR, Ballesta F (1998) Prevalence of Y chromosome microdeletions in oligospermic and azospermic candidates for intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*. **70**:3 506-511.

Page DC, Silber S, Brown LG (1999) Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility. *Human Reproduction*. **14**:1722-6.

Passarino G, Semino O, Murci QL, Excoffier L, Hammer M, Benerecetti SSA (1998) Different genetic components in the ethiopian population, identified by mtDNA and Y-Chromosome polymorphisms. *Am J Human*. **62**:420-434.

Palermo G, Joris H, Devroey P. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. **340**: 17-18.

Patrizio P, Silber S, Ord T, Balmaceda JP, Asch RM (1998) Two births after microsurgical epididymal sperm aspiration. *Lancet*. **2**:1364.



Peterlin B, Kunej T, Sinkovec J, Gligorievska N, Zorn B (2002) Screening of Y chromosome microdeletions in 226 slovenian subfertile men. *Human Reproduction*. 17:1 17-24.

Plachot M, Allart JB, Mayenga JM, Chouraqui A, Tesquier L, Serkine AM (2002) Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility. *Human Reproduction*. 17: 362-369.

Poloni ES, Semino O, Passarino G, Santachiara-Benerecetti AS, Dupanloup I, Langaney A, Excoffier L (1997) Human Genetic Affinities for Y-Chromosome P49a,f/TaqI Haplotypes Show Strong Correspondence with Linguistics. *Am. J. Hum. Genet.* 61:1015-1035.

Prior JL, Kent-First M, Muallem A (1997) Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *New England Journal of Medicine*. 336:634-9.

Qureshi SJ, Ross AR, Ma K (1996) Polymerase chain reaction screening for Y chromosome microdeletions. A first step towards the diagnosis of the genetically-determined spermatogenic failure in men. *Mol Hum. Reprod.* 2:775-779.

Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, Page D (1996) Severe oligospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet*. 347: 1290-1293.

Roldan ERS, Gomendio M (1999) The Y chromosome as a battle ground for sexual selection. *Elsevier Science TREE*. 14:2 58-62.

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*. 17: 9 2267-.2271.

Rubio C, Salom MG, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, Remohi J, Pellicer A (2001) Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Human Reproduction*. 16:10 2084-2092.

Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P (1997) The mouse *Dazl* gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature*. 389: 73-77.

Sargent CA, Boucher CA, Kirsch S, Brown G, Weiss B, Trundley A, Burgoyne P, Saut S, Durand C, Levy N, Terriou P, Hargreave T, Cooke H, Mitchell M, Rappold



GA, Vara NAA (1999) The critical region of overlap defining the AZFa male infertility interval of proximal Yq contains three transcribed sequences *J Med Gene.* **36**:670-677.

Sanger The Centre, Washington University Genome Sequencing The Center (1998) Toward a Complete Human Genome Sequence *Genome Research.* **8**:1097-1108.

Saxena R, Brown L.G, Hawkins T, Alagappan RK, Skalestky H, Reeve MP (1996) The DAZ gene cluster on the Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nature Genetics.* **14**: 292-299.

Saxena R, Vries JWA, Repping S, Alagappan RK, Skaletsky H, Brown LG, Ma P, Chen E, Hoovers JMN, Page DC (2000) Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. *Genomics.* **67** 256-267.

Schlegel PN, Girardi SK (1997) In Vitro Fertilization for Male Factor Infertility Clinical Review. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* **82**:387.

Sharpe RM, Franks S (2002) Environment, lifestyle and infertility—an inter-generational issue. *Fertility Supplement Nature Cell Biology & Nature Medicine.* S33-S40.

Shen P, Wang F, Underhill PA, Franco C, Yang WH, Roxas A, Sung R, Lin AA, Hyman RW, Vollrath D, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ (2000) Population genetic implications from sequence variation in four Y chromosome genes. *PNAS.* **97**:13 7354-7359.

Sherman JS, Steirteghem AV, Liu J, Tournaye H, Nagy Z, Devroey MD (1996) Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertility and Sterility.* **66**:1 110-117.

Siffroi JP, Bourhis CL, Krausz C, Barbaux S, Quintana-Murci L, Kanafani S, Rouba H, Buajan L, Bourrouillou G, Seifer I, Boucher D, Fellous M, Mc Elreavey K, Dadoune JP (2000) Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. *Human Reproduction.* **15**:12 2559-2569.

Simoni M, Gromoll J, Dwoeniczak B, Rolf C, Abshagen K, Kambischke A, Carani C, Meschede D, Behre HM, Horst J, Nieschlag E (1997) Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in Azoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertility and Sterility.* **67**:3 542-546.



Simoni M, Kamischke A, Nieschlag E (1998) Current status of the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions in the work-up of male infertility. *Hum Reprod.* **13**:1764-8.

Slee R, Grimes B, Speed RM, Taggart M, Maguire SM, Ross A, Cgill NI, Saunders PTK, Cooke HJ (1999) A human DAZ transgene confers partial rescue of the mouse Dazl null phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96** 8040-8045.

Stouffs K, Lissens W, Landuyt VL, Tournaye H, Steirteghem VA, Liebaers I (2001) Caracterización of the genomic organization, localization and expression of four PRY genes /PRY1,PRY2,PRY3 and PRY4).*Human Reproduction.* **7**:7 603-610.

Stephoe PC, Edwards RG (1978) Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet.* **2**: 366.

Stumpf MPH, Goldstein DV (2001) Genealogical and Evolutionary Inference with the Human Y Chromosome. *Science.* **291** 1738-1743.

Stuppia L, Calabrese G, Franchi GP, Mingarelli R, Garra V, Palka G, Dallapiccola B (1996) Widening of a Y-Chromosome interval-6 deletion transmitted from a father to his infertile son accounts for an oligozoospermia critical region distal to the RBM1 and DAZ genes. *Am. J. Human Genet.* **59**: 1393-1395.

Stuppia L, Gatta V, Mastroprimiano G, Pompetti F, Calabrese G, Guanciali P., Morizio E (1997) Clustering of Y chromosome deletions in subinterval E of interval 6 supports the existence of an oligozoospermia critical region outside the DAZ gene. *J Med Genet.* **34**: 881-883.

Stuppia L, Mastroprimiano G, Calabrese G, Peila R, Tenaglia R, Palka G (1996) Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome detected by STS-PCR in 6 of 33 patients with idiopathic oligo- and azoospermia. *Cytogenet Cell Genet.* **72**: 155-158.

Sun C, Skaletsky H, Rozen S, Gromoll J, Nieschlag E, Oates R, Page DC (2000) Deletion of azoospermia factor a /AZFa) region of human Ychromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. *Human Molecular Genetics.* **9**:15 2291-2296.

Thomson R, Pritchard JK, Shen P, Oefner PJ, Feldman MW (2000) Recent common ancestry of human Y chromosomes: Evidence from DNA sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**:13 7360-7365.



Vander VK, Montag M, Peshka B, Leygraaf J, Schwanitz G, Haidl G, Krebs D (1997) Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmatic sperm injection. *Mol Hum Reprod.* 3: 699-704.

Vázquez BE (1999) Medicina Reproductiva en México. Editorial JGH Editores Primera Edición PP 27- 290

Venables JP, Eperon IC (1999) The roles of RNA-binding proteins in spermatogenesis and male infertility. *Current Opinion in Genetics & Development.* 9:346-354.

Vergnaud G, Page DC, Simmler MC, 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.* 38:109-124.

Vogt MHJ, Goulmy E, Kloosterboer FM, Blokland E, de Paus RA, Willemze R, Falkenburg JHF (2000) UTY gene codes for an HLA-B60-restricted human male-specific minor histocompatibility antigen involved in stem cell graft rejection: characterization of the critical polymorphic amino acid residues for T-cell recognition. *Blood.* 96:3126-3132.

Vogt MHJ, de Paus RA, Voogt PJ, Willemze R, Falkenburg JH (2000) DFFRY codes for a new human male-specific minor transplantation antigen involved in bone marrow graft rejection transplantation antigens. *Blood.* 95:1100-1105.

Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Kohn FM (1996) Human Y chromosome azoospermia factor (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Human Molec Genet.* 5: 933-943.

Vollrath D, Foot S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC (1992) The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science.* 258:52-59.

Vries JWA, Hoffer MJV, Repping S, Hoovers JMN, Leschot NJ, Veen FVD (2002) Reduced copy number of DAZ genes in subfertile and infertile men. *Fertility and Sterility.* 77:1 68-75.

Wei YH., Kao SH (2000) Mitochondrial DNA Mutation and Depletion Are Associated with Decline of Fertility and Motility of Human Sperm. *Zoological Studies.* 39:1 1-12.



Wells RS, Yuldasheva N, Ruzibakiev R, Underhill PA, Evseeva I, Smithd JV, Jin JL, Suf B, Pitchappan R, Shanmugalakshmi S, Balakrishnan K, Read M, Pearson NM, Zerj T, Webster MT, Zholoshvil I, Jamarjashvili E, Gambarov S, Nikbin B, Dostiev A, Aknazarov O, Zalloua P, Tsoy I, Kitaev M, Mirrakhimov M, Chariev A, Bodmera WF (2001) The Eurasian Heartland: A continental perspective on Y-chromosome diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:18 10244-10249.

Winston RML, Hardy H (2002) Are we ignoring potential dangers of *in vitro* fertilization and related treatments?. *Fertility Supplement Nature Cell Biology & Nature Medicine.* S14-S19

World Health Organization (1992) WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucous interaction. Third Edition. Cambridge, UK: Cambridge.

Zeyneloglu HB, Baltaci V, Duran HE, Erdemli E, Batioglu S (2002) Achievement of pregnancy in globozoospermia with Y chromosome microdeletions after ICSI. *Human Reproduction* 17:7 1833-1836.

www.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclean/plsc431/markers/

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

