

## Frecuencia de microdeleciones del cromosoma Y en pacientes cubanos con azoospermia u oligozoospermia idiopática

Frequency of Y chromosome microdeletions in Cuban patient with idiopathic azoospermia or oligozoospermia

Elyen Vital Riquenes<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9704-7419>

Gilda Monteagudo Peña<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3815-0675>

Marisleivy García Heredia<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1796-5824>

Beatriz MarchecoTeruel<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6009-0405>

Teresa Collazo Mesa<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3984-9189>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Endocrinología, La Habana. Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [elyenvr@infomed.sld.cu](mailto:elyenvr@infomed.sld.cu)

### RESUMEN

**Introducción:** La microdelección del brazo largo del cromosoma Y, constituye una de las causas genéticas más frecuentes de infertilidad masculina. Se estima una alta incidencia en azoospermicos con relación a oligozoospermicos y una frecuencia de ocurrencia que varía entre el 2 % y el 10 %. El 95 % de las deleciones clínicamente relevantes y reportadas en la literatura ocurren en una región conocida como factor de azoospermia y el 80 % de las deleciones corresponden a la región AZFc.

**Objetivo:** Determinar la frecuencia de distribución de las microdeleciones del brazo largo del cromosoma Y.

**Método:** Se estudiaron 71 hombres con azoospermia u oligozoospermia severa que consultaron diferentes centros de atención a las parejas infértiles, específicamente de La Habana y Mayabeque. Se realizó el análisis molecular de microdeleciones de la región AZF a través de la técnica STS-PCR-Multiplex, utilizando ADN genómico extraído de leucocitos de sangre periférica. A cada paciente se le analizaron los sitios de secuencias conocidos para las regiones AZFa, AZFb y AZFc.

**Resultados:** Del total de pacientes estudiados 52 (73,2 %) presentaron azoospermia y 19 (26,8 %) oligozoospermia severa. Se diagnosticó microdelección en la región AZFc en 2 de los pacientes con azoospermia (2,8 %).

**Conclusiones:** La frecuencia de las microdeleciones del cromosoma Y en los pacientes estudiados es similar a la de otras poblaciones con diferentes orígenes

geográficos y étnicos. Con este trabajo se enfatiza la importancia de tener presente el diagnóstico de las microdeleciones en la región AZF como causa de infertilidad masculina, sobre todo en aquellos pacientes candidatos a terapias de reproducción asistida.

**Palabras clave:** infertilidad; infertilidad masculina; cromosoma Y; azoospermia; técnicas reproductivas asistidas; espermatogénesis.

## ABSTRACT

**Introduction:** Microdeletion of the long arm of the Y chromosome is one of the most common genetic causes of male infertility. A high incidence has been estimated among azoospermics as compared to oligozoospermics, as well as a frequency of occurrence that ranges between 2% and 10%. As many as 95% of the clinically relevant deletions reported in the literature occur in a region known as azoospermia factor, and 80% of the deletions correspond to the AZFc region.

**Objective:** Determine the distribution frequency of microdeletions of the long arm of the Y chromosome.

**Method:** A study was conducted of 71 men with severe oligozoospermia or azoospermia attending various fertility services, particularly in Havana and Mayabeque. Molecular analysis of microdeletions in the AZF region were performed with the STS-PCR-Multiplex technique, using genomic DNA extracted from peripheral blood leukocytes. Analysis was carried out of each patient's known sequence sites for the regions AZFa, AZFb and AZFc.

**Results:** Of the total patients studied, 52 (73.2%) had azoospermia and 19 (26.8%) had severe oligozoospermia. Microdeletion in the AZFc region was diagnosed in two of the patients with azoospermia (2.8%).

**Conclusions:** The frequency of Y chromosome microdeletions in the patients studied is similar to that of other populations of different geographic and ethnic origins. The study highlights the importance of bearing in mind the diagnosis of microdeletions in the AZF region as a cause of male infertility, mainly in assisted reproduction candidates.

**Keywords:** infertility; male infertility; Y chromosome; azoospermia; assisted reproductive techniques; spermatogenesis.

Recibido: 03/03/2020

Aceptado: 14/07/2020

## Introducción

Las microdeleciones del brazo largo del cromosoma Y, constituyen una de las causas genéticas más frecuentes de fallo severo de la espermatogénesis en los hombres infértiles. A nivel mundial se estima una alta incidencia en azoospermicos con relación a oligozoospermicos y una frecuencia de ocurrencia que varía entre el 2 % y el 10 % entre las distintas poblaciones estudiadas.<sup>(1,2)</sup>

El 95 % de las deleciones clínicamente relevantes y reportadas en la literatura ocurren en una región específica del brazo largo del cromosoma Y (Yq11), conocido como factor de azoospermia (AZF), que incluye las subregiones AZFa, AZFb y AZFc, donde se localiza un grupo de genes que caracterizan cada una de estas subregiones AZF y que son de gran valor para la espermatogénesis y desarrollo de las gónadas masculina.<sup>(2,3)</sup> La deleción de la región AZF, se origina por recombinación homóloga no alélica, entre sitios con secuencias repetitivas muy similares, que llevan a la pérdida de material genético<sup>(4,1)</sup> ya sea parcial o completa, y afectar una o más regiones simultáneamente.<sup>(5)</sup>

Basado en un extenso estudio de mapeo de la deleción en hombres infértiles, se han reportado cinco patrones de microdeleción, sin embargo, en la práctica clínica se agrupan y se clasifican como microdeleción AZFa, AZFb y AZFc.<sup>(6)</sup>

La microdeleción AZFc es la más frecuente reportada en la literatura, seguida por la deleción AZFb y AZFa.<sup>(7)</sup>

Esta condición genética, puede ser detectada por técnicas citogenéticas, sin embargo, con el desarrollo de las técnicas de biología molecular, hoy en día pueden ser identificadas por reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR-Multiplex) en un menor tiempo.

Se realizó el presente estudio con el objetivo de determinar la frecuencia de distribución de las microdeleciones de la región AZF del cromosoma Y en pacientes cubanos con azoospermia no obstructiva y oligozoospermia severa de causa desconocida.

## Métodos

Se realizó un estudio transversal descriptivo que incluyó 71 pacientes referidos de las consultas de infertilidad del Instituto Nacional de Endocrinología (INEN), del Hospital Ramón González Coro y del Centro Provincial de Genética Médica de Mayabeque, durante el período comprendido entre noviembre de 2016 y junio de 2019. Los pacientes incluidos en el estudio cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: infertilidad primaria idiopática, azoospermia no obstructiva (ausencia de espermatozoides en el eyaculado) u oligozoospermia severa (conteo espermático  $< 5 \times 10^6$ /mL eyaculado).

### Aspectos éticos

La protección de la información de los pacientes estudiados, se realizó cumpliendo con las normas de seguridad de la información que se establecen en la Resolución 219/2007, del Ministerio de Salud Pública, publicada en la Gaceta Oficial de la República de Cuba. En la resolución antes mencionada se encuentran anexadas las normas éticas para la seguridad de la información genética de los ciudadanos cubanos que participan en investigaciones o se les realizan diagnósticos asistenciales en las que se accede a datos relativos al individuo y a sus familiares, así como a material biológico, estos datos solo serán manipulados por los investigadores involucrados en el estudio. La identidad de los resultados estará sujeta a estrictas normas de confidencialidad y, por tanto, solo podrán ser manejados por los profesionales que participaron en el estudio y no serán publicados datos que puedan conducir a la identificación de los casos. Además, se contó con la aprobación del Comité de Ética y el Consejo Científico del Centro Nacional de Genética Médica.

### Análisis molecular

La extracción del ADN genómico a partir de leucocitos de sangre periférica se realizó por el método convencional de precipitación salina establecido por *Miller* en 1988.<sup>(8)</sup> Se realizaron dos reacciones de PCR utilizando la técnica de STS-PCR Multiplex según lo recomendado por la Academia Europea de Andrología (EAA) y la Red Europea de Calidad en Genética Molecular (EMQN),<sup>(1)</sup> técnica previamente estandarizada en el laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Genética Médica (CNGM).<sup>(2)</sup> Los cebadores STS (sitios de secuencias conocidos) seleccionados incluyeron: sY84, sY86 para la región AZFa, sY127, sY134 para la región AZFb y sY254, sY255 para la región AZFc. Además, se utilizaron como controles internos los cebadores sY14 (del gen SRY) y los cebadores para los genes ZFX/ZFY localizados en el brazo corto del cromosoma Y. La secuencia de los cebadores utilizados se observa en la siguiente tabla.

**Tabla - Secuencia de los cebadores STS**

Regiones	Marcadores STS	Secuencia del cebador (5'-3')	Fragmentos de ADN
Control Interno	sY14 (SRY)	F- GAATATTCCCGCTCTCCGGA R- GCTGGTGCTCATTCTTGAG	472 pb
	ZFX/ZFX Y	F-ACCRCTG TACTGACTGTGATTACAC R-GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT	495 pb
AZFa	sY84	F-AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT R-GCCTACTACCTGGAGGCTTC	326 pb
	sY86	F-GTGACACACAGACTATGCTTC R-ACACACAGAGGGACAACCT	318 pb
AZFb	sY127	F-GGCTCACA AACGAAAAGAAA R-CTGCAGGCAGTAATAAGGGA	274 pb
	sY134	F-GTCTGCCTCACCATAAAACG R-ACCCACTGCCAAAACCTTCAA	301 pb
AZFc	sY254	F- GGGTGT TACCAGAAGGCAAA R- GAACCGTATCTACCAAAGCAGC	380 pb
	sY255	F- GTTACAGGATTCGGCGTGAT R- CTCGTCATGTGCAGCCAC	123 pb

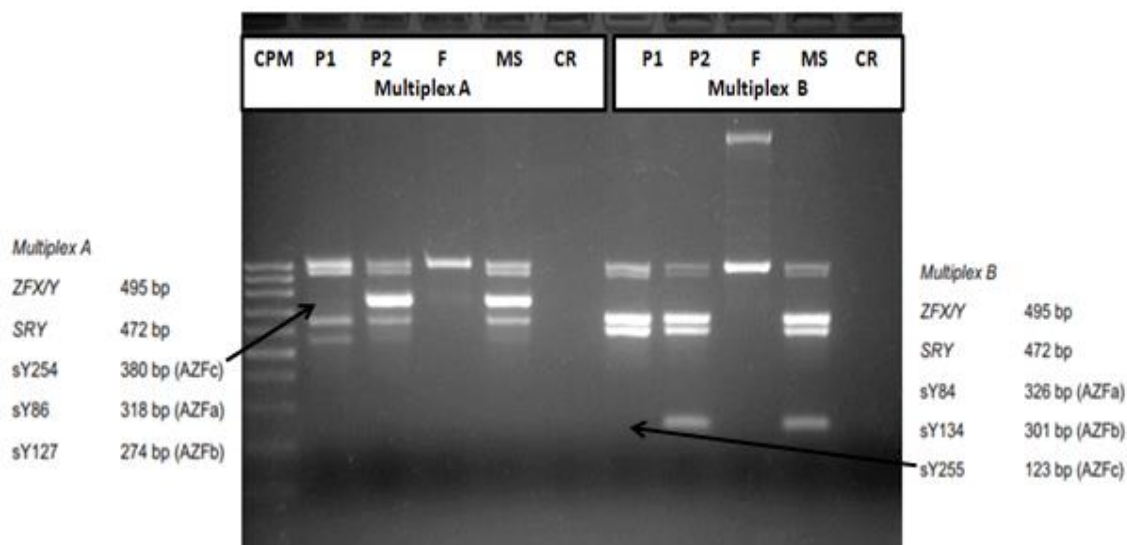
La mezcla de reacción de PCR se realizó como se describe a continuación: 1,7  $\mu$ L de solución tampón de PCR a 10x (15mM MgCl<sub>2</sub>), 2,5  $\mu$ L dNTP (2mM), y una mezcla de cebadores sY86, sY127, sY254 (2 pmol) para el primer PCR (Multiplex A) y una mezcla de cebadores sY84, sY134, sY255 (2 pmol) para el segundo PCR (Multiplex B).<sup>(2)</sup>

La mezcla de reacción requirió de 0,2  $\mu$ L de la enzima Hot Star Taq (5 UI/ $\mu$ L) y 0,5  $\mu$ L de ADN (250 ng/ $\mu$ L) y fue ajustada a un volumen final de 25  $\mu$ L (cada reacción de PCR). La amplificación se realizó en un termociclador MJ Research, con las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 15 minutos a 95 °C, seguida por 34 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 90 segundos de hibridación a 57 °C y una extensión de 60 segundos a 72 °C, y una extensión final de 10 minutos a 72 °C.<sup>(2)</sup>

## Resultados

Del total de pacientes estudiados 73,2 % (52/71) son pacientes con azoospermia no obstructiva y 26,8 % (19/71) con oligozoospermia severa, clasificados según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS).<sup>(9)</sup>

Se estableció una frecuencia del 2,8 % (2/71) de microdelección en la región AZF del cromosoma Y en los pacientes analizados. La delección se encontró en dos pacientes azoospermicos, y en ambos se observó la ausencia de los STS: sY254 y sY255, que, por su distribución, implica la ausencia total de la subregión AZFc como se puede apreciar en la siguiente figura. No se observaron casos positivos en el grupo de los oligozoospermicos severos.



**Fig.** - Corrida electroforética en gel de agarosa 2 % donde se identifica delección completa de la región AZFc, con ausencia de sY254 y sY255. CPM (marcador de 50pb); P1 (paciente con delección completa AZFc); P2 (paciente sin delección AZF); F (control femenino); MS (control masculino sano); CR (control de reacción).

## Discusión

Generalmente los hombres con microdelección del brazo largo del cromosoma Y son azoospermicos y solo en casos muy raros presentan un conteo espermático  $>2 \times 10^6/\text{mL}$ . La Asociación Europea de Urología (EAU) establece que todo hombre con azoospermia y oligozoospermia severa (concentración espermática  $<5 \times 10^6/\text{mL}$ ) deben ser testados para la microdelección.<sup>(1,2)</sup> En el presente estudio de 71 pacientes analizados, 2 fueron positivos para microdelección del brazo largo del cromosoma Y, y ambos casos presentaron ausencia de espermatozoides en el eyaculado. No se encontró positividad en el grupo de los hombres con oligozoospermia severa, lo que pudiera estar en correspondencia con el menor número de pacientes oligozoospermicos estudiados (26,8 %) en

comparación con los azoospermicos (73,2 %), o como señala *Mark Johnson* “varios estudios sugieren que la microdelección clínicamente relevante ocurre en aquellos hombres con un conteo espermático entre  $0-2 \times 10^6/\text{mL}$ ”.<sup>(5)</sup> Es el caso del estudio realizado por *Ferlin* y otros en Italia, donde de un total de 3073 pacientes, 99 presentaron positividad al test de microdelección y el 84 % de estos hombres tenían un conteo espermático  $<0,1 \times 10^6/\text{mL}$  y solo dos tenían concentraciones de  $>2 \times 10^6/\text{mL}$ .<sup>(10)</sup> *Mark Johnson* y otros obtuvieron resultados similares, todos los hombres con microdelección en su investigación presentaron una concentración espermática  $\leq 0,5 \times 10^6/\text{mL}$ .<sup>(5)</sup>

La delección de una o más de las regiones AZFa, AZFb y AZFc provoca un fallo severo de la espermatogénesis, con una frecuencia a nivel mundial que varía entre el 2 % y más del 10 %.<sup>(1)</sup> La frecuencia reportada de microdelección de la región AZF del cromosoma Y en este estudio fue de un 2,8 % (2/71), lo cual coincide con lo reportado en la literatura. Sin embargo, existe diferencia en comparación con frecuencias bajas como la encontrada en Alemania (1,8 %) y frecuencias elevadas reportadas en Francia,<sup>(5)</sup> aunque pueden observarse cifras muy diversas al comparar la prevalencia de otros países como Turquía, Irán, Corea y China donde se reportan 5,42 %, 8 %, 7,7 % y 10,8 % respectivamente.<sup>(7)</sup>

La variabilidad observada en la tasa de microdelección de la región AZF del cromosoma Y entre poblaciones étnicamente diferentes puede deberse a varios factores: diseño del estudio, inconsistencia, en el uso de los marcadores STSs entre las diferentes investigaciones y el grado por el cual otras mutaciones genéticas o fenómenos epigenéticos pueden conducir a azoospermia u oligozoospermia severa.<sup>(1,2)</sup> Por tanto es importante el conocimiento de la frecuencia y el patrón de microdelección de la región AZF del cromosoma Y en las diferentes regiones y etnias estudiadas.

El patrón de microdelección observado por los investigadores de este estudio, se corresponde con la delección AZFc en el total de casos que presentaron microdelección del brazo largo del cromosoma Y. Resultados similares observó *Ting Liu*<sup>(7)</sup> y otros en un estudio realizado en el suroeste de China, quienes encontraron que la delección AZFc, es el tipo de patrón que con más frecuencia (62,20 %) se observó en paciente con microdelección del brazo largo del cromosoma Y. De igual forma *Mark Johnson* y otros, realizaron un estudio en Londres, y encontraron que el patrón de delección más frecuente fue el AZFc, presente en el 75 % de los casos.<sup>(5)</sup> Estos autores coinciden con lo citado en la literatura internacional, donde se describe que 80 % de las delecciones corresponden a la región AZFc, región que abarca alrededor de 4,5 Mb en la



porción distal del Yq11 e incluye 21 genes candidatos y 11 familias de unidades de transcripción, cada una presente en un número variable de copias que hacen un total de 32 copias, que se expresan exclusivamente en los testículos.<sup>(6,11)</sup> Los genes candidatos de importancia en este intervalo son: 4 copias del gen DAZ (deleted in azoospermia), 3 copias del gen BPY2 (basic protein on Y chromosome 2) y dos copias del gen CDY1 (CDY1a y CDY1b (chromodomainprotein, Ychromosome1). El gen DAZ fue el primer gen que se identificó, es el más representativo de los genes causantes de azoospermia y el mejor estudiado de los genes candidatos.<sup>(12,13)</sup> Las 4 copias del gen DAZ se expresan en la espermatogonia, codifican una proteína de unión al ARN importante para la espermatogénesis y se expresan en todos los estados del desarrollo de la célula germinal y la progresión meiótica. Por lo tanto, todos los genes de la familia DAZ son importantes en el desarrollo de la célula germinal.<sup>(6)</sup>

El estudio molecular para la microdeleción del brazo largo del cromosoma Y, en pacientes azoospermicos u oligozoospermicos, es de gran utilidad clínica en aquellos pacientes que requieren de las técnicas de reproducción asistida (TRA), de ahí que la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva, recomienda su uso sobre todo en aquellos pacientes que son candidatos a las técnicas de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) combinado con la posibilidad de recuperación espermática (TESE).<sup>(6)</sup> Determinar el patrón de deleción es de valor diagnóstico y pronóstico por la correlación que existe entre el genotipo y el fenotipo. La deleción completa de la región AZFa, se correlaciona fenotípicamente con el síndrome de solo células de Sertoli (SCOS) y azoospermia. Así lo demuestran varias investigaciones en las que ha sido imposible la recuperación de espermatozoides por la extracción testicular (TESE) en aquellos pacientes que se le han identificado la deleción completa de la región AZFa. Cuando la región afectada es la AZFb histológicamente se correlaciona con el SCOS o arresto espermatogénico, lo cual resulta en azoospermia y de igual forma es imposible la recuperación testicular de espermatozoides. Sin embargo, la deleción de la región AZFc está asociada con una clínica y fenotipo histológico variable,<sup>(12)</sup> pero en general son compatibles con una espermatogénesis residual con mejor pronóstico. En este caso existe posibilidad de recuperación de espermatozoides por la extracción testicular (TESE), que en combinación con la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), la pareja puede lograr tener su propia descendencia en el 50 % de los casos,<sup>(14)</sup> aunque existe un riesgo del 100 % de transmitir la infertilidad a la descendencia masculina lograda por estas técnicas de reproducción asistida.<sup>(15)</sup>



## Limitaciones del estudio

Se analizaron solamente los 6 STSs [AZFa (sY84, sY86), AZFb (sY127, sY134), y AZFc (sY254, sY255)] recomendados por EAA/EMQN por ser los de mayor relevancia clínica. Sin embargo, a pesar de las excelentes recomendaciones propuestas por la EMQN y del amplio panel de STS incluidos en el Sistema de Detección de Deleciones del Cromosoma Y, versión 1,1, no es posible identificar a todos los pacientes portadores de deleciones en el cromosoma Y.

## Conclusiones

Se logró establecer la frecuencia de microdelección del brazo largo del cromosoma Y, la cual se encontró en el rango de lo reportado a nivel mundial. Con este trabajo se enfatiza la importancia de tener presente el diagnóstico de las microdeleciones en la región AZF como causa de infertilidad masculina, sobre todo en aquellos pacientes candidatos a terapias de reproducción asistida (TRA).

## Referencias bibliográficas

1. Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tüttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology* [Internet]. 2014 [acceso 29/07/2019];2(1):5-19. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=EAA%2FEMQN+best+practice+guide+lines+for+molecular+diagnosis+of+Ychromosomal+microdeletions%3A+state-of-the-art+2013>
2. Vital E, Marcheco B, Collazo T, Monteagudo G, García M. Introducción del estudio molecular de la microdelección del cromosoma Yq en hombres cubanos con azoospermia u oligozoospermia idiopática. *Rev Cubana Genet Comunit*. 2017;11(3):32-7.
3. Hamada AJ, Esteves SC. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. *Clinics Sao Paulo*. 2013;68(S1):39-60.
4. Mokánszki A, Ujfalusi A, Gombos É, Balogh I. Examination of Y-Chromosomal Microdeletions and Partial Microdeletions in Idiopathic Infertility in East Hungarian Patients. *J Hum Reprod Sci*. 2018 [acceso 29/07/2019];11(4):329-36. DOI: [https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS\\_12\\_18](https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_12_18) . Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6333031/>
5. Johnson M, Raheem A, De Luca F, Hallerstrom M, Zainal Y, Poselay S, *et al*. An analysis of the frequency of Y-chromosome microdeletions and the determination of a threshold sperm concentration for genetic testing in infertile men. *BJU Int*.

2019 Feb [acceso 29/07/2019];123(2):367-72. DOI:

<https://doi.org/10.1111/bju.14521>

6. Colaco S, Mod D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2018 [acceso 29/07/2019];16:14. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0330-5>

7. Liu T, Song YX, Jiang YM. Early detection of Y chromosome microdeletions in infertile men is helpful to guide clinical reproductive treatments in southwest of China. *Medicine*. 2019 [acceso 19/11/2019];98:5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000014350>

8. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):12-5.

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

10. Ferlin A, Arredi B, Speltra E, *et al*. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:762-70.

11. Yu XW, Wei ZT, Jiang YT, Zhang SL. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8:14634.

12. Masoudi R, Mazaheri-Asadi L, Khorasani S. Partial and complete microdeletions of Y chromosome in infertile males from South of Iran. *Molecular Biology Research Communications* [Internet]. 2016 [acceso 29/07/2019];5(4):247-55. Disponible en: <http://mbrc.shirazu.ac.ir>

13. Nailwal M, Chauhan JB. Azoospermia factor C subregion of the Y chromosome. *J Hum Reprod Sci* [Internet]. 2017 [acceso 29/07/2019];10:256-60. Disponible en: <http://www.jhrsonline.org/text.asp?2017/10/4/256/223277>

14. Miraghazadeh A, Sadighi Gilani MA, Reihani-Sabet F, Ghaheri A, Borjian Boroujeni P, Zamanian M. Detection of partial AZFc microdeletions in azoospermic infertile men is not informative of micro TESE outcome. *Int J Fertil Steril*. 2019 [acceso 29/07/2019];12(4):298-302. DOI:

<http://dx.doi.org/10.22074/ijfs.2019.5397>

15. Agudelo-Hincapié N, Laverde-Angarita LJ, Páez-Vila AL. Efecto de la microdelección en la región AZF sobre marcadores forenses del cromosoma Y. *Colomb. Forense*. 2015 [acceso 29/07/2019];2(1):75-85. DOI:

<http://dx.doi.org/10.16925/cf.v3i1.1173>

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses en la realización del estudio.

### Contribución de los autores

*Elyen Vital Riquenes*: Concepción y diseño de la investigación, obtención y análisis de los datos primarios, redacción del documento, revisión y aprobación final del manuscrito.

*Gilda Monteagudo Peña*: Obtención de los datos primarios, procesamiento estadístico, revisión y aprobación final del manuscrito.

*Marisleivy García Heredia*: Obtención de los datos primarios, revisión bibliográfica, revisión crítica del diseño y resultados de la investigación, revisión y aprobación final del manuscrito.

*Beatríz Marcheco Teruel y Teresa Collazo Mesa*: Revisión crítica del diseño y de los resultados de la investigación, revisión y aprobación final del manuscrito.

### Institución que auspicia la investigación

Centro Nacional de Genética Médica. Ave. 31 Esq.146 No 3102, Rpto. Cubanacán.  
CP. 11400, Playa, La Habana, Cuba.