

## Introducción del estudio molecular de la microdelección del cromosoma Yq en hombres cubanos con azoospermia u oligozoospermia idiopática

### Introduction of the molecular study of Yq chromosome microdeletion in Cuban men with idiopathic azoospermia or oligozoospermia

*Elyen Vital Riquenes,<sup>I</sup> Beatriz Marcheco Teruel,<sup>II</sup> Teresa Collazo Mesa,<sup>III</sup>  
Gilda Monteagudo Peña,<sup>IV</sup> Marisleivy García Heredia.<sup>V</sup>*

#### Resumen

La infertilidad es una condición que afecta el 15% de las parejas alrededor del mundo, siendo el factor masculino responsable del 50% de los casos y la microdelección del cromosoma Yq la segunda causa genética, con una incidencia del 2% al 10% a nivel global. En el presente estudio nos propusimos estandarizar el diagnóstico molecular de las microdelecciones del cromosoma Yq en el laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Genética Médica. Se realizó una investigación aplicada, observacional, descriptiva y transversal de base hospitalaria. El universo y población de estudio estuvo constituido por 22 pacientes con azoospermia no obstructiva y oligozoospermia severa de causa desconocida que asistieron a la consulta de referencia nacional de infertilidad del Instituto Nacional de Endocrinología en el periodo de noviembre 2016 a junio 2017. Se estandarizó el análisis molecular mediante la técnica STS-PCR-Multiplex y se verificó luego en una corrida electroforética en geles de agarosa al 2%. No se identificó la mutación en los pacientes estudiados, pero se logró estandarizar una técnica diagnóstica que se ha convertido en indicación de rutina en el estudio del hombre con trastorno severo para la reproducción, siendo de obligatoriedad identificarla antes de utilizar las técnicas de reproducción asistida como parte del asesoramiento genético en el estudio de la pareja infértil.

**Palabras clave:** Infertilidad, Infertilidad masculina, Cromosoma Y.

#### Abstract

Infertility affects around 15% of the couples all over the world, 50% of cases are associated to male's factor. The Yq chromosome microdeletion is the second most frequent genetic cause, with an incidence of 2% to 10% at the level global. Our main goal was to standardize the molecular diagnosis the Yq chromosome microdeletion in the DNA lab. In the present study we carried out an observational, descriptive and transversal investigation hospital based. The universal and population of study was constituted by twenty-two patients with non-obstructive azoospermia and severe oligozoospermia of unknown origin that were attended by the national reference infertility consultation at the National Institute of Endocrinology in the period November 2016-June 2017. The molecular analysis was standardized by STS-PCR-Multiplex technique and was verified by electrophoresis in 2% agarose gels. We were able of standardizing the diagnosis technique but we did not found the mutation in any patient. Its diagnosis has become a routine test when studying men with severe masculine factor before starting to use techniques for assisted reproduction and as part of the genetic counseling process for the infertile couple.

**Keywords:** Infertility, Male infertility, Y chromosome.

---

<sup>I</sup> Especialista de Primer Grado en Genética Clínica. Profesor Instructor. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

<sup>II</sup> Especialista de Segundo Grado en Genética Clínica. Profesor e Investigador Titular. Doctora en Ciencias Médicas. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

<sup>III</sup> Licenciada en Bioquímica. Investigador titular. Doctora en Ciencias de la Salud. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

<sup>IV</sup> Especialista de Segundo Grado en Endocrinología. Profesor e Investigador Auxiliar. Máster en Salud Reproductiva. Doctora en Ciencias Médicas. Instituto Nacional de Endocrinología, La Habana. Cuba.

<sup>V</sup> Técnica del Laboratorio de Genética Molecular. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba

---

## **Introducción**

En el campo de la salud reproductiva, la infertilidad constituye un problema de salud que genera un impacto negativo en el orden psíquico y social. Esta condición afecta alrededor del 15 % de las parejas alrededor del mundo.<sup>1</sup> La infertilidad masculina es tan frecuente como la infertilidad en la mujer, a quienes se les ha dedicado el mayor peso de las investigaciones, cuando realmente la atención en este sentido debe estar dirigida a ambos miembros de la pareja. Es conocido, que el factor masculino es responsable del fallo reproductivo en el 40%-50% de los casos,<sup>2,3</sup> y como señalan Guerrero-Bosagna y Skinner *“En las últimas décadas se ha observado una tendencia a la disminución de la fertilidad en el hombre, así lo demuestran parámetros como la disminución en la cantidad y calidad del semen, el incremento del cáncer testicular y de la criptorquidia o hipospadias. Son varios los estudios que demuestran una fuerte disminución de la calidad del semen desde 1940 hasta la actualidad”*.<sup>4</sup>

Los avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares de la espermatogénesis, han permitido conocer la contribución de la genética en la fisiopatología de la infertilidad y caracterizar las causas genéticas de muchos de los desórdenes que previamente se consideraron como idiopáticos. Las microdeleciones del brazo largo del cromosoma Y (Yq) constituyen, después de las aberraciones cromosómicas, la segunda causa genética, con una incidencia del 2% al 10% a nivel global.

En esta región se han identificado genes candidatos que están involucrados en la patogénesis de la infertilidad masculina asociada con la azoospermia u oligozoospermia severa.

Los hombres con microdeleciones en las regiones AZFa muestran defectos severos en la espermatogénesis, con alta prevalencia de Síndrome de Solo Células de Sertoli (SCOS), el cual se define como la ausencia de células germinales en la biopsia testicular. Cuando la región afectada es la AZFb y AZFbc histológicamente se correlaciona con el SCOS o arresto espermatogénico resultando en azoospermia.<sup>2,5</sup>

Sin embargo, las deleciones de la región AZFc están asociadas con una clínica y fenotipo histológico variable,<sup>5,6</sup> pero en general son compatibles con una espermatogénesis residual con mejor pronóstico, existiendo la posibilidad de recuperación de espermatozoides por la extracción testicular (TESE), que en combinación con técnicas de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), el 50% de pacientes azoospermicos pueden lograr tener su propia descendencia.<sup>2,7</sup> Esta correlación genotipo/

fenotipo le confiere un valor diagnóstico y pronóstico al análisis de la microdelección del Yq, respecto a la recogida testicular de espermatozoides.<sup>8</sup>

Actualmente se considera de obligatoriedad estudiar la microdelección del cromosoma Yq en los hombres infértiles que serán sometidos a programas de reproducción asistida, como una etapa preliminar necesaria o en parejas con abortos a repetición. Es por esto que el objetivo fundamental de este estudio fue estandarizar la técnica diagnóstica en el laboratorio de biología molecular del Centro Nacional de Genética Médica para introducir el estudio de las microdeleciones del brazo largo del cromosoma Y en pacientes cubanos con infertilidad idiopática, dentro de la rutina diagnóstica.

## **Método**

Se realizó una investigación aplicada, observacional, descriptiva y transversal de base hospitalaria. El universo y población de estudio estuvo conformado por los 22 pacientes diagnosticados de infertilidad idiopática que asistieron a la consulta de infertilidad del Instituto Nacional de Endocrinología (INEN) durante el período comprendido entre noviembre de 2016 a junio de 2017.

Para su inclusión en el estudio se verificó que los pacientes cumplieran con los siguientes criterios: azoospermia no obstructiva (ausencia de espermatozoides en el eyaculado), oligozoospermia severa (conteo espermático  $< 5 \times 10^6$ /mL eyaculado), ausencia de antecedentes médicos que pudieran ser causa de la infertilidad y la presencia de un cariotipo normal 46, XY.

La información necesaria se obtuvo a través del examen clínico general y genital y de la historia clínica se tomaron los resultados de estudios complementarios como el espermograma, estudios hormonales, ultrasonográficos y cariotipo convencional que aseguraron un diagnóstico de certeza para el propósito de este estudio a fin de evitar sesgos en la validez de la investigación.

La azoospermia u oligozoospermia fueron definidas de acuerdo con las alteraciones detectadas en el análisis de semen siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS).<sup>9</sup> Para los sujetos que tenían un espermograma reciente (tiempo menor de 6 meses) se les tomaron estos datos y aquellos que tenían un tiempo mayor, se les repitió el estudio para confirmar si se mantenían en la misma categoría diagnóstica seminal o había cambiado.

## **Aspectos éticos**

Se consideraron durante el estudio los principios de la ética. Se cumplió rigurosamente con el proceso

de consentimiento informado y se protegió la confidencialidad de la información. Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética y el Consejo Científico del Centro Nacional de Genética Médica, La Habana. Cuba.

### **Extracción de ADN y estudio molecular**

La extracción del ADN genómico a partir de leucocitos de sangre periférica, se realizó por el método convencional de precipitación salina (*Salting out*) establecido por Miller en 1988.<sup>10</sup>

### **Estandarización del estudio molecular de microdelección del cromosoma Yq**

El protocolo se basó en el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple (PCR Multiplex), usando STSs (*Sequence target sites*) específicos del cromosoma Y. Los cebadores STS seleccionados incluyeron: sY84, sY86 (AZFa), sY127, sY134 (AZFb), sY254, sY255 (AZFc) según lo recomendado por la *European Academy of Andrology (EAA)* y la *European Molecular Genetics Quality Network (EMQN)*.<sup>7</sup> Además, se utilizaron como controles los cebadores sY14 (del gen SRY localizado en Yp) y ZFX/ZFY de un hombre y una mujer con fertilidad demostrada.

Se realizaron dos reacciones de PCR utilizando la técnica de STS-PCR Multiplex. La mezcla de reacción de PCR se realizó como se describe a continuación: 1,7 µL *PCR Buffer 10x* (15mM MgCl<sub>2</sub>), 2,5 µL 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).

La mezcla de reacción requirió de 0,2 µL de la enzima *Hot StarTaq* (5 UI/µL) y 0,5 µL de ADN (250 ng/µL) y fue ajustada a un volumen final de 25 µL (cada reacción de PCR).

Esta técnica 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 para terminar con una extensión final por 10 minutos a 72°C.

Para realizar la electroforesis fueron mezclados 25µl del producto de PCR obtenido, con 5µl de bromofenol azul (BFA) como frente de corrida, y fueron aplicados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó durante 1 hora a 200 Voltios. Para la visualización de las bandas obtenidas, el gel fue expuesto a luz ultravioleta en un transiluminador.

### **Interpretación de los resultados**

En cada reacción multiplex fueron utilizados los *primers* STS para las regiones AZFa, AZFb, AZFc y los controles SRY y ZFX/Y. El ADN amplificado en ambas reacciones de PCR para todos los marcadores analizados en el total de pacientes estudiados, lo que se interpretó como la existencia de los sitios de secuencias conocidos (STS) y por tanto la ausencia de la delección.

### **Resultados**

Los pacientes estudiados se caracterizaron por tener una edad promedio de 38.36 años (Desviación estándar(DE) ± 6.4) y se observó un predominio de individuos con azoospermia con de causa no obstructiva (14/22=64%) en relación con los oligozoospermicos severos (8/22=36%).

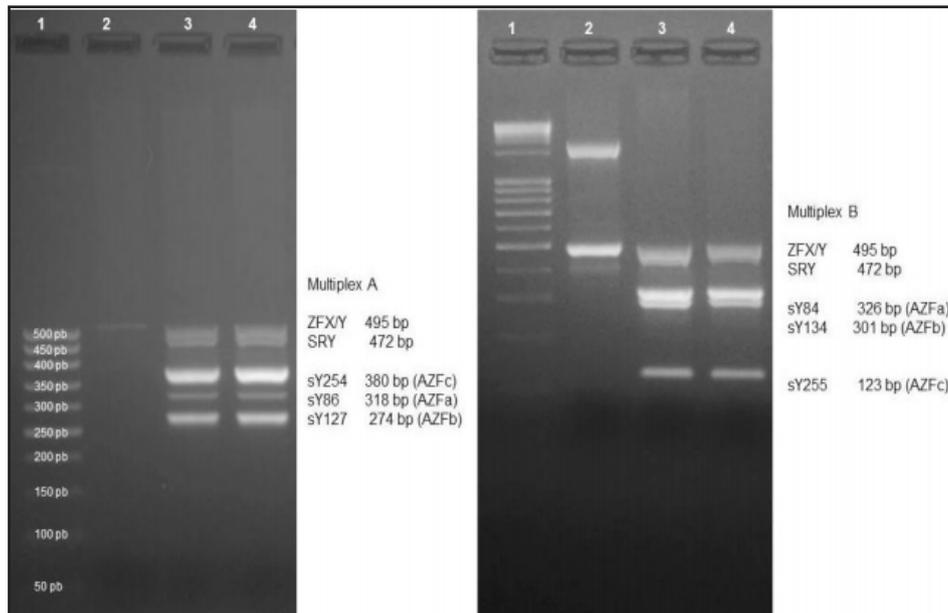
Estos pacientes en su totalidad clasificaron en el grupo de la infertilidad de causa primaria, con niveles de FSH (Hormona Folículo Estimulante) aumentados en los azoospermicos para una media de 13,76UI/L (DE ± 8,70) en relación a los oligozoospermicos 6,10 UI/L (DE ±8,95). Los niveles promedio de LH (Hormona Luteinizante), Prolactina y Testosterona se mantuvieron en parámetros normales. En los estudios ultrasonográficos no se encontraron hallazgo de interés y los cariotipos realizados no mostraron alteraciones. No se detectaron dismorfias ni signos de posible síndrome clínico genético asociado con la infertilidad y se detectó mayor compromiso del volumen testicular en los pacientes oligozoospermicos en relación con los azoospermicos.

### **Diagnóstico molecular**

La técnica diagnóstica quedó estandarizada en el laboratorio de Biología Molecular y no se encontró la microdelección del cromosoma Yq en los individuos estudiados. Esto se interpretó como la ausencia de la mutación para los 6 STS que se analizaron en el diagnóstico molecular por la técnica STS-PCR Multiplex. El uso de estos STS permitió el estudio de casi todas las delecciones clínicamente relevantes y alrededor del 95% de las delecciones reportadas en la literatura en las tres regiones AZF, que debe resultar suficiente para su diagnóstico según estándares internacionales.

En la Figura 1 se muestra un ejemplo de un paciente (Línea 4) en que amplificaron los tres STS utilizados en cada una de las reacciones multiplex y no posee las mutaciones estudiadas.

**Figura 1.** Resultado del estudio de la microdelección Yq en un paciente infértil que no muestra la delección.



Para Multiplex A / Multiplex B:

Línea 1: MPM: Marcador de peso molecular (50 pb),

Línea 2: ADN Femenino,

Línea 3: ADN Hombre fértil

Línea 4: Ejemplo representativo de un paciente infértil que no muestra la delección.

## Discusión

En las últimas décadas se ha observado un incremento significativo en la edad promedio en que los hombres comienzan a preocuparse por procrear descendencia, lo que puede estar condicionado por el incremento de la esperanza de vida, el mayor uso de anticonceptivos, los matrimonios tardíos, el estatus económico, entre otros.<sup>11</sup> Son varios los artículos de revisión que han mostrado el efecto negativo de la edad avanzada sobre la calidad espermática y la función testicular, además de estar asociado con un incremento del riesgo de enfermedades genéticas, los cambios epigenéticos e incluso en la disminución del éxito en los resultados de las técnicas de reproducción asistida como FIV/ICSI.<sup>11</sup>

La infertilidad puede clasificarse en primaria o secundaria, lo que orienta hacia un posible diagnóstico etiológico. En relación con ello, se esperaba encontrar la mutación una vez que se descartó la causa genética más frecuente, si se tiene en cuenta que los pacientes estudiados presentan un daño severo de la espermatogénesis. Chellat y colaboradores en Argelia, encontraron que todos los pacientes incluidos en su estudio de microdelección del cromosoma Yq, presentaban infertilidad primaria de más de un año de evolución.<sup>12</sup> El fallo testicular primario y las causas hipotalámicas resultan más

frecuentes en la infertilidad masculina primaria, mientras que las causas adquiridas son más frecuentes en la infertilidad secundaria.<sup>13</sup>

Es reconocido que el fallo de la espermatogénesis es responsable de dos tercios de los casos de infertilidad y está fuertemente asociado con niveles elevados de FSH. Wang y colaboradores, investigaron la relación entre la FSH y la microdelección del cromosoma Yq y concluyeron que la microdelección de la región AZF es una causa importante de niveles elevados de la FSH,<sup>14</sup> aunque pacientes con niveles hormonales normales, pueden ser portadores de la microdelección de la región AZF y viceversa, como lo observado por Zhang y colaboradores.<sup>15</sup> Por lo tanto, el estudio hormonal no debe considerarse, como indicador de microdelección de la región AZF, ni debe ser utilizado para predecir pronóstico.

El examen físico de los genitales constituye la primera evaluación de la integridad anatómica de estos. El 85% del volumen testicular está asociado con la producción de espermatozoides y su disminución es indicativa de un fallo potencial de la espermatogénesis. El volumen testicular de un hombre adulto es de al menos 4,6 cm de largo y 2,6 cm de ancho, resultando en un volumen promedio de 18 a 20 mL.<sup>11</sup> Los testes de un paciente con azoospermia no obstructiva tienen típicamente un volumen menor de 15 mL.<sup>11</sup> Lo observado en

este estudio, difiere con lo observado por Ambulkar en su investigación, donde no hubo diferencias significativas entre los azoospermicos de causa no obstructiva y los oligozoospermicos severos.<sup>1</sup>

Las microdeleciones del brazo largo del cromosoma Y, constituyen la segunda causa genética de infertilidad masculina idiopática después del Síndrome de Klinefelter y ha sido tema de interés de múltiples investigadores desde que las técnicas de reproducción asistida se introdujeron como opción terapéutica fundamental en la infertilidad por factor masculino severo. En esta investigación no se identificó esta mutación en los pacientes estudiados y al constituir este el primer estudio realizado en Cuba, no fue posible compararlo con investigaciones precedentes en la misma población.

En la literatura revisada, se encontró un estudio con resultado similar reportado por Kihailo y colaboradores, investigadores que estudiaron la microdelección del cromosoma Yq en parejas de origen japonés y africano y no se encontró la mutación.<sup>16</sup> Estos autores consideraron que la insuficiente muestra estudiada fue un factor determinante para obtener este resultado. En el presente estudio también se trabajó con una muestra limitada de casos por lo que pudo haber ocurrido algo similar.

Alrededor del mundo se han llevado a cabo investigaciones que han permitido establecer la frecuencia de distribución de esta microdelección en diferentes áreas geográficas, por ejemplo, África (1.3%),<sup>13</sup> España (6.2%),<sup>17</sup> China (12.95%),<sup>18</sup> entre otros muchos países con una variabilidad entre el 2% y más del 10%.<sup>6</sup>

La variabilidad observada en la tasa de microdelección del cromosoma Yq entre poblaciones étnicamente diferentes puede deberse a varios factores: diseño del estudio (criterios de inclusión, definición clínica de los pacientes), inconsistencia en el uso de los marcadores

STSs entre los diferentes estudios y el grado por el cual otras mutaciones genéticas o fenómenos epigenéticos pueden conducir a azoospermia u oligozoospermia severa.<sup>6</sup> También puede relacionarse con la frecuencia alélica del marcador según el origen étnico de la población en estudio.

En esta primera investigación no se identificó la microdelección del cromosoma Yq, lo que no significa que no esté presente en otros pacientes cubanos. Los autores del presente estudio consideran que, por la baja incidencia de esta condición genética, el número de sujetos estudiados para detectar la mutación fue insuficiente, lo que constituyó una limitante del estudio.

Por los antecedentes descritos con anterioridad y la diversidad en la mezcla étnica de la cual resulta el cubano actual, se recomienda continuar con la investigación e incluir en el estudio un número mayor de casos e implementar el diagnóstico en pacientes que serán sometidos a programas de reproducción asistida (TRA), específicamente en la técnica ICSI en combinación con TESE, como una etapa preliminar necesaria.

### **Conclusiones**

Aunque no fue posible encontrar la mutación, se logró estandarizar la técnica STS-PCR-Multiplex para el diagnóstico molecular de la microdelección del cromosoma Yq, lo que constituye una herramienta diagnóstica para el estudio del hombre cubano con azoospermia u oligozoospermia idiopática. El estudio de la infertilidad masculina y sus causas en Cuba, permitirá diseñar estrategias terapéuticas y brindar un mejor asesoramiento genético a las personas que lo padecen y disminuir considerablemente los costos en salud al evitar tratamientos y atención médica prolongada a pacientes, personalizando mejor el manejo individual de cada uno de ellos.

---

### **Referencias bibliográficas**

1. Ambulkar P, Chuadhary A, Waghmare J, Tarnekar A, Pal A. Prevalence of Y Chromosome Microdeletions in Idiopathic Azoospermia Cases in Central Indian Men. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* [Internet]. 2015; 9(9): GC01-GC04. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4606250/>.
2. Kleiman SE, Almog R, Yogev L, Hauser R, Lehavi O, Paz G, et al. Screening for partial AZFa microdeletions in the Y chromosome of infertile men: is it of clinical relevance? *Fertil Steril*. 2012; 98:43–7.
3. McLachlan RI, Krausz C. Clinical evaluation of the infertile male: new options, new challenges. *Journal of Andrology*. 2012; 14:3–5.
4. Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of male infertility. *Curr Opin Genet Dev*. 2014; 0:79–88.
5. Fernández E, Álvarez F, Borjas L, Osuna J. Frecuencia de microdeleciones del cromosoma Y en hombres venezolanos con infertilidad idiopática. *Invest Clin*. 2006; 47(4): 395 – 403.
6. 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*. 2014; 2(1):5-19.

7. Wang XQ, Zhang HY, Qi QW. Relationship between follicle stimulating hormone and AZF microdeletion on Y chromosome in patients with azoospermia or severe oligozoospermia. *Chin J MedGenet.* 2011;(28): p. 559-61.
8. Lo Giacco D, Chianese C, Sánchez-Curbelo J, Bassas L, Ruiz P, al. ROe. Clinical relevance of Y-linked CNV screening in male infertility: new insights based on the 8-year experience of a diagnostic genetic laboratory. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2013; doi:10.1038/ejhg.253.
9. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.ed.5 Geneva,Switzerland: WHO; 2010.
10. MillerSA, DykesDD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.*Nucleic AcidsRes.*1988 Feb 11; 16(3):12-15.
11. Cocuzza M, Alvarenga C, Pagani R. The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics.* 2013; 68(S1): 15-26.
12. Challat D, Rezgounne ML, McElreavey K. First Study of Microdeletions in the Y Chromosome of Algerian Infertile Men with Idiopathic Oligo or Azoospermia. *Urol Int.* 2013;(90): 455-9.
13. Gowri V, Venkiteswaran KP, Al-Zakwani J, Mathew J, Raman AK, Al-Marhoon M. Men with primary and secondary infertility. *SQU Med.* 2010;10(3):350-3.
14. Wang XQ, Zhang HY, Qi QW. Relationship between follicle stimulating hormone and AZF microdeletion on Y chromosome in patients with azoospermia or severe oligozoospermia. *Chin J MedGenet.* 2011;(28): 559-61.
15. Zhang F, Li L, Whang L, Yang L, Liang Z, Li J, Jin F, Tian Y. Clinical Characteristics and Treatment of Azoospermia and Severe Oligospermia Patients With Y-Chromosome Microdeletions. *Mol. Reprod. Dev.* 2013; 80: 908-15.
16. Kihale PE, Yasui A, Shuto Y. Prospective assessment of Y-chromosome microdeletions y reproductive outcomes among infertile couples of Japanese and African origin. *Journal of Experimental and Clinical Assisted Reproduction.* 2005; 2(9): 1-7.
17. Elfateh F, Rulin D, Xin Y, Linlin L, Haibo Z, Liu RZ. Prevalence and patterns of Y chromosome microdeletion in infertile men with azoospermia and oligozoospermia in Northeast China. *Iran J Reprod Med.* 2014 Jun; 12(6): 383-8.
18. Kim MJ, Choi HW, Park SY, Song IO, Seo JT, Lee HS. Molecular and cytogenetic studies of 101 infertile men with microdeletions of Y chromosome in 1,306 infertile Korean men. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29: 539-46.