

## Estudio de las regiones AZF del cromosoma Y en varones con infertilidad idiopática. Comparación de dos métodos de diagnóstico molecular

María Isidoro-García<sup>a</sup>, Rogelio González-Sarmiento<sup>a</sup>, Mar Cordero<sup>b</sup>, Carmen García-Macías<sup>c</sup>, Juan José Corrales-Hernández<sup>b</sup> y José Manuel Miralles-García<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Medicina Molecular. Departamento de Medicina. Universidad de Salamanca. Salamanca.

<sup>b</sup>Servicio de Endocrinología. Hospital Universitario de Salamanca. Salamanca.

<sup>c</sup>Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario de Salamanca. Salamanca. España.

**FUNDAMENTO Y OBJETIVO:** La azoospermia y la oligospermia causantes de infertilidad masculina se asocian con delecciones en regiones que contienen secuencias no repetitivas en el brazo largo del cromosoma Y. La caracterización de estas delecciones se realiza mediante reacción en cadena de la polimerasa, aunque varían el número y la localización de las regiones estudiadas dependiendo de los laboratorios. En este estudio nos planteamos analizar la presencia de delecciones en el cromosoma Y de pacientes infértils empleando dos métodos diferentes.

**PACIENTES Y MÉTODO:** Se ha estudiado a 30 pacientes con infertilidad idiopática masculina, siguiendo las recomendaciones de la EMQN (European Molecular Genetics Quality Network) y, en paralelo, con el test Y Chromosome Deletion Detection System® (Promega).

**RESULTADOS:** Hemos detectado delecciones en la región AZF en 4 pacientes (13%). En sólo un caso ambos sistemas la detectaron simultáneamente.

**CONCLUSIONES:** La detección de microdelecciones de las regiones AZF del cromosoma Y presenta problemas metodológicos. Se necesitan más estudios para conseguir un consenso sobre el método más fiable para aplicar este tipo de estudios a los laboratorios clínicos.

**Palabras clave:** AZF. Azoospermia. Infertilidad. Microdelección. Cromosoma Y.

Study of AZF regions of Y chromosome in males with idiopathic infertility. Analysis of two methods of molecular diagnosis

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** It is well known that both azoospermia and oligozoospermia are associated to microdeletions of single tagged sites (STS) in the long arm of the Y chromosome. Characterization of deletions is carried out by polymerase chain reaction, although the number and regions included in the analysis varies between laboratories. The aim of this study was to analyze the presence of chromosome Y microdeletions using 2 different sets of STSs.

**PATIENTS AND METHOD:** We analysed the presence of microdeletions in the Yq chromosome in 30 patients with idiopathic male infertility, using 2 sets of STSs, those proposed by the European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) as first choice and those of the Y Chromosome Deletion Detection System® (Promega).

**RESULTS:** AZF microdeletions were detected in 4 patients (13%). Only one case was detected simultaneously with both sets.

**CONCLUSION:** In patients with idiopathic male infertility detection of AZF microdeletion in Y chromosome has important methodological problems. Further studies are needed to achieve a more reliable method to be used by clinical laboratories.

**Key words:** AZF. Azoospermia. Infertility. Microdelección. Y chromosome.

La infertilidad es un importante problema sanitario que afecta entre el 15 y el 20% de las parejas en edad reproductiva<sup>1</sup>. Por el momento, son pocos los estudios epidemiológicos realizados en España sobre este importante problema clínico<sup>2</sup>. Se acepta que aproximadamente el 50% de estos casos se atribuye al varón, aunque los estudios de fertilidad realizados en los varones son, con frecuencia, incompletos<sup>3</sup>. La infertilidad masculina se manifiesta generalmente como azoospermia secretora grave o como oligospermia, y se caracteriza por hipoespermatoferia, detención de la maduración espermática o síndrome de sólo células de Sertoli (SCOS). Se ha detectado que algunos varones con infertilidad idiopática presentan alteraciones genéticas asociadas. En 1976 Tiepolo y Zuffardi<sup>4</sup> encontraron pequeñas pérdidas de material genético (delecciones) en la región distal del brazo largo del cromosoma Y en el 0,5% de los varones infértils y denominaron a esta región *Azoospermia factor* (AZF). Desde entonces se ha detectado más delecciones en el cromosoma Y y se ha delimitado mejor las zonas afectadas<sup>5</sup>. Así, Reijo et al<sup>5</sup> describieron un nuevo gen, denominado *DAZ* (*deleted in azoospermia*), que se perdía en el 4-13% de los casos de azoospermia/oligospermia. Posteriormente, los trabajos de Vogt et al<sup>6</sup> permitieron la caracterización de 3 regiones, denominadas AZFa (1,1 Mb), AZFb (3,2 Mb) y AZFc (3,5 Mb), localizadas en Yq11, la última de las cuales contenía el gen *DAZ*. La prevalencia de delecciones en la región AZF varía considerablemente según los estudios, desde un 0,98 hasta un 55%<sup>7,8</sup>. Además, hay discrepancias sobre el tipo de delección y el patrón histológico, debido probablemente a la heterogeneidad del material estudiado en las distintas series y de método empleado para su análisis.

### Pacientes y método

Se ha estudiado a 30 varones diagnosticados de infertilidad y controlados en el Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario de Salamanca, con la aprobación y siguiendo las recomendaciones del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca. De los pacientes estudiados, 19 casos (73%) presentaban azoospermia secretora y 11 casos (27%) oligospermia grave (densidad espermática inferior a 5 millones/ml). El desarrollo sexual de todos los pacientes fue normal y el volumen testicular, determinado mediante el orquidómetro, fue superior a 15 ml. El estudio ecográfico de los testículos y del tracto reproductor permitió descartar cualquier alteración morfológica. Mediante ecografía Doppler se constató la ausencia de varicocele y el estudio urogenital no reveló ninguna obstrucción en el tracto urogenital. En todos los casos se determinó las concentraciones de hormona foliculoestimulante y luteinizante en el plasma mediante inmunorradioactividad y los valores de testosterona mediante inmunoanálisis. El seminograma se realizó por duplicado. Se valoró la densidad, la motilidad, la morfología y la viabilidad del esperma y siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1992). En los casos en que se sospechó azoospermia por el seminograma, se realizó el recuento en cámara de Neubauer para su confirmación. El cultivo del semen permitió descartar la presencia de infección. Se realizaron punciones aspirativas con aguja fina testicular con agujas de 21 G, fijación en alcohol y tinción con hematoxilina y eosina. El 65% de los pacientes presentó SCOS, el 18%, parada madurativa, el 12%, hipospermia, y un 5% no presentó ninguna alteración.

El estudio molecular se realizó a partir de ADN de sangre periférica, mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se empleó dos métodos diferentes: por una parte, se analizó los 18 *single tagged sites* (STS) incluidos en el test Y Chromosome Deletion Detection System®, versión 1.1 (Promega, Wisconsin, EE.UU.) (tabla 1) y, por otra, los STS considerados de primera elección en las recomendaciones propuestas por la European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) para el estudio del cromosoma Y<sup>9</sup>. La amplificación del locus SMCX ligado al cromosoma X y del locus SRY del cromosoma Y se empleó como control interno y de la integridad del ADN genómico. Además, se utilizó una muestra procedente de un varón fértil como control positivo y los correspondientes controles para detección de posibles contaminaciones. Todas las delecciones se confirmaron por duplicado y mediante PCR simple.

### Resultados

El análisis genético de las muestras con el equipo Y Chromosome Deletion Detec-

Estudio financiado con los proyectos MCYT PM 0070 y la Junta de Castilla y León SA 09/01.

Correspondencia: Dr. R. González-Sarmiento.

Unidad de Medicina Molecular.

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina Campus Miguel Unamuno. 37007 Salamanca. España.

Correo electrónico: gonzalez@usal.es

Recibido el 10-3-2005; aceptado para su publicación el 17-5-2005.

TABLA 1

**Microdelecciones detectadas empleando el test diagnóstico Y Chromosome Deletion Detection System®, versión 1.1 (Promega, Wisconsin, EE.UU.)**

Caso	AZFa				AZFb					AZFc								
	sY81	sY182	sY121	sYPR3	sY124	sY127	sY128	sY130	sY133	sY145	sY153*	sY152	sY242	sY239	sY208	sY254	sY255	sY157
2.913 (SCOS)	+	+	+	+	+	+	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
3.018 (SCOS)	+	+	+	+	+	+	+	+	(-)	(-)	(-)	+	+	+	+	+	+	
3.046 (SCOS)	+	+	+	+	+	+	+	+	(-)	(-)	(-)	+	+	+	+	+	+	

AZF: Azoospermia factor; SCOS: síndrome de sólo células de Sertoli. +: indica presencia del locus; (-): indica ausencia del locus.

\*Es polimórfico.

TABLA 2

**Microdelecciones del cromosoma Y detectadas empleando las secuencias no repetitivas propuestas por la European Molecular Genetics Quality Network, como de primera elección**

Caso	FNAC	AZFa		AZFb		AZFc	
		sY86	sY84	sY127	sY134	sY254	sY255
2.913	SCOS	+	+	+	+	(-)	(-)
3.028	SCOS	+	(-)	+	+	+	+

AZF: Azoospermia factor; FNAC: citología por aspiración con aguja fina; SCOS: síndrome de sólo células de Sertoli. +: presencia del locus; (-): ausencia del locus.

TABLA 3

**Comparación de las secuencias no repetitivas (STS) incluidas en el diagnóstico de delecciones en el cromosoma Y en el test diagnóstico Y Chromosome Deletion Detection System®, versión 1.1 (Promega, Wisconsin, EE.UU.) y las propuestas como de primera elección por la European Molecular Genetics Quality Network (EMQN)**

	Versión 1.1		EMQN	
	STS	Locus	STS	Locus
AZFa	SY81 SY182	DYS271 KAL-Y	SY86 SY84	DYS148 DYS173
AZFb	SY121 SYPR3 SY124 SY127 SY128 SY130 SY133	DYS212 SMCY DYS215 DYS218 DYS219 DYS221 DYS223	SY127	DYS218
AZFc	SY145 SY153 SY152 SY242 SY239 SY208 SY254 SY255 SY157	DYF51S1 DYS237 DYS236 DAZ DAZ DAZ DAZ DAZ DYS240	SY134	DYS224  DAZ DAZ

tion System®, versión 1.1 reveló la presencia de delecciones en tres de los 30 pacientes (10%) incluidos en el estudio. El análisis citológico mostró que los tres pacientes presentaban SCOS. Todos los pacientes tenían valores elevados de hormona foliculoestimulante y normales de luteinizante y testosterona, lo que reflejaba la alteración grave de la línea germinal. De estos pacientes, el caso 2.913 presentaba una amplia delección en la región AZFc que incluía desde el STS sY145 hasta sY157, y los casos 3.018 y 3.046 una delección más corta, desde el STS sY145 hasta sY152 (tabla 1). Cuando se empleó el panel de STS recomendado por la EMQN, se detectó delecciones en dos pacientes (6,6%) que tam-

bien presentaban SCOS al realizar el estudio citológico. El paciente 2.913 mostró una delección que incluía los STS sY254 y sY255 y el paciente 3.028 portaba una delección exclusiva del STS sY84 (tabla 2).

### Discusión

En la actualidad se dispone de un mapa genético detallado del brazo largo del cromosoma Y que incluye secuencias cortas de nucleótidos no repetidos en el genoma conocidas como STS. Algunas de estas secuencias, localizadas en regiones bien delimitadas del cromosoma Y<sup>10</sup>, pueden estar delecionadas en los varones con infertilidad. Aunque se ha do-

cumentado que la frecuencia con la que se encuentran delecciones de material genético no depende directamente del número de STS estudiados<sup>1</sup>, se acepta que para realizar un adecuado diagnóstico molecular de infertilidad masculina se debe analizar un amplio número de STS seleccionados y significativos. Recientemente se ha propuesto que se debe incluir un mínimo de dos STS no polimórficos de cada región AZF en los estudios de infertilidad<sup>9</sup>. Como mostramos en las tablas 1 y 2, en nuestro estudio, considerando conjuntamente ambos sistemas, se han detectado delecciones en el 13% de los pacientes. Las discrepancias observadas en las diferentes series, entre el 2,7% y 55,5%, pueden depender del número y tipo de STS empleados y de los aspectos técnicos del análisis<sup>1,9</sup>.

Las diferencias entre ambos sistemas se muestran en la tabla 3. Cuando estudiamos las delecciones del cromosoma Y empleando el kit comercial Y Chromosome Deletion Detection System®, versión 1.1, sólo detectamos tres casos que presentaban delecciones (10%). En los tres las regiones implicadas incluían STS contiguos de la región AZFc, aunque en dos casos fueron parciales. Se ha descrito recientemente que las delecciones parciales se dan con relativa frecuencia, aunque su papel aún no se ha dilucidado<sup>9</sup>. Cuando el estudio se realizó amplificando los STS recomendados por la EMQN, sólo se detectó delecciones en dos pacientes (6,6%); uno de ellos (caso 3.028) presentaba una delección en AZFa. Sólo uno de los casos (2.913) se detectó simultáneamente con ambos métodos. Dos de los pacientes diagnosticados de SCOS portadores de delecciones detectadas con el equipo comercial no fueron detectados siguiendo las recomendaciones de la EMQN (tablas 1 y 2).

Todas las delecciones en AZFc de los pacientes con SCOS incluidos en nuestro trabajo presentan una región común entre sY145 y sY152, lo que indicaría que la localización de esta microdelección podría tener un impacto específico en el desarrollo del epitelio seminífero y que genes funcionales o reguladores podrían localizarse en dicha región. En este sentido, sY153 presenta secuencias comunes con un clón de ADNC TESTI2007466 –número

de acceso en Genebank AK057495– que codifica una proteína de 519 aa, similar a la proteína 91 en dedo de cinc, cuya función se desconoce. Se necesitan más estudios para determinar la significación específica de este hallazgo.

El análisis de delecciones del cromosoma Y resulta muy controvertido. Además de la heterogeneidad de los protocolos de laboratorio, hay diferentes criterios respecto de los STS que deben analizarse. A pesar de las excelentes recomendaciones propuestas por la EMQN y del amplio panel de STS incluidos en el sistema Y Chromosome Deletion Detection System, versión 1.1 ninguno de ellos permitió identificar a todos los pacientes portadores de delecciones en el cromosoma Y. Aunque el tamaño muestral no es muy grande, ha sido suficiente para evidenciar las discrepancias diagnósticas entre ambos métodos. Dada la importancia del diagnóstico de estas delecciones en los pacientes con azoospermia y su enorme implicación en las técnicas de reproduc-

ción asistida, consideramos que son necesarios más estudios que permitan alcanzar una mayor sensibilidad y especificidad de estos métodos antes de que se empleen de forma habitual en los laboratorios clínicos.

### Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a Pilar Rodríguez y Nieves Mateos su colaboración técnica.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kent-First M, Mualem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, et al. Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev*. 1999;53:27-41.
2. Martínez-Frías ML, Bermúdez E, Rodríguez-Pinilla, Dequino G, Grupo periférico del ECEMC. Evolución secular y por autonomías de la frecuencia de tratamientos de fertilidad, partos múltiples y cesáreas en España. *Med Clin (Barc)*. 2005; 124:132-9.
3. Peinado JA, Bolúmar F. Reflexiones sobre la esterilidad en España. *Med Clin (Barc)*. 1997; 109:585-7.
4. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the non fluorescent portion of the human chromosome long arm. *Hum Genet*. 1976;34:119-24.
5. Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y-chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet*. 1995;10:383-93.
6. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter, et al. Human Y chromosome azoospermic factors (AZF) mapped to different sub regions in Yq11. *Hum Mol Ge-net*. 1996;5:933-43.
7. Van der Ven K, Montag M, Peschka B, Leygraaf J, Schwanitz G, Haidl G. Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Mol Hum Reprod*. 1997;3:699-704.
8. Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Moro E, Pistorello M, Barbaux S, et al. High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reprod*. 1998;13:302-7.
9. Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl*. 2004;27:240-9.
10. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cor-dum HS, Hillier L, Brown LG, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*. 2003;423:825-37.