

Esterilidad masculina y microdelecciones del cromosoma Y

María Luisa Martínez-Frías

Centro de Investigación sobre Anomalías Congénitas (CIAC). Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

La historia del conocimiento sobre la constitución genética y función del cromosoma Y humano es fascinante. Hace poco más de 30 años se consideraba que este cromosoma era genéticamente inerte porque contenía sólo unos pocos genes necesarios para la determinación del sexo. Sin embargo, en la actualidad se ha podido comprobar la complejidad estructural de este pequeño cromosoma —que contiene una importante cantidad y variedad de ADN repetitivo— en comparación con otros cromosomas humanos. Su estructura la forman grandes bloques de secuencias repetitivas llamados «amplicones», entre las que se dan procesos de recombinación y de estructuras palindrómicas (que son iguales de izquierda a derecha que de derecha a izquierda), junto a una amplia región de heterocromatina^{1,2}. Con el desarrollo de las nuevas tecnologías de estudio del ADN, la investigación sobre este cromosoma está experimentando un avance espectacular que abarca aspectos relacionados con diferentes áreas que van desde el desciframiento de su estructura molecular, la evolución filogenética de esa y su funcionamiento biológico hasta su relación con problemas de diferenciación sexual y de fertilidad masculina³⁻⁶. De hecho, hay cada vez más evidencias sobre los mecanismos genéticos del cromosoma Y que participan tanto en la regulación de la espermatogénesis como en la patogenia de ciertos tipos de esterilidad masculina. Este último aspecto está siendo objeto de un interés especial que no es ajeno al hecho constatado de la disminución que se viene observando en la cantidad y la calidad del esperma humano, así como a su potencial repercusión transgeneracional debido al gran impacto que está alcanzando la reproducción asistida.

El punto de partida de los conocimientos actuales se sitúa en el año 1976, cuando Tiepolo y Zuffardi⁷ publicaron los resultados de un estudio citogenético realizado en varones con azoospermia, en el que identificaron que seis de ellos tenían una delección en el brazo largo del cromosoma Y, concretamente en la región Yq11, y postularon que en esta zona eucromática Yq11 hay un *locus* (que podría ser sencillo o complejo) que definieron como «Azoospermia Factor» (AZF). Sin embargo, su existencia no se demostró definitivamente hasta que se pudo realizar el análisis molecular de microdelecciones del cromosoma Y como causa de alteraciones de la fertilidad masculina. En 1996, Vogt et al⁸ estudiaron a un grupo de 370 varones infériles que tenían cariotipo normal y observaron tres microdelecciones con localizaciones diferentes en la región Yq11, todas *de novo*, que se asociaban a determinados tipos de anomalías testiculares. Por tanto, propusieron que no había sólo un *locus*

AZF, sino tres *loci* de espermatogénesis en la región Yq11, y que cada uno era activo en diferentes fases del desarrollo de las células germinales masculinas. Dado que el fenotipo más grave que podía producir la delección de cada uno de esos tres *loci* era la azoospermia, los denominaron AZFa, AZFb, AZFc.

Esas tres regiones AZF se identificaron, pues, antes de que se conociera la secuencia completa del cromosoma Y, que, como ya se ha comentado, ha mostrado tener una estructura muy compleja. Hoy día ya se dispone de un mapa genético del cromosoma Yq¹, en el que también se han observado secuencias cortas de nucleótidos no repetidos en el genoma que se conocen como «Sequence-tagged site» (STS). Estos STS pueden estar delecionados en varones con problemas de fertilidad, por lo que se están utilizando diferentes *primers* de STS para el estudio de las microdelecciones de las regiones AZF de este cromosoma y su relación con la espermatogénesis. Los resultados han mostrado que sus delecciones representan ya la causa genética conocida más frecuente de infertilidad masculina idiopática⁹⁻¹⁴. Por otra parte, los genes localizados en la región Yq11 que se expresan en los testículos se han considerado genes candidatos para AZF^{3,6,11,12}.

Aunque los conocimientos sobre la estructura y la función de las tres regiones AZF están avanzando continuamente, un resumen comprensible y simplificado de éstas se muestra en la figura 1¹⁵. La región AZFa (parte proximal Yq11.21) es la más pequeña (0,8 Mb), y en ella se encuentran los genes *USP9Y* (o *DFFRY*—*Drosophila fat-facets related Y*—), y el *DBY* (*dead box on the Y*) que, si se pierden por microdelección o tienen mutaciones, dan lugar a alteraciones de la espermatogénesis^{6,16-19}. La delección completa de AZFa se produce como consecuencia de la recombinación homóloga de bloques de secuencias idénticas con la misma orientación¹⁹⁻²⁰. Se han identificado muy pocos casos con delecciones de AZFa, por lo que hasta la fecha es la que ha mostrado la menor frecuencia en los pocos trabajos en los que se ha estudiado.

La delección completa de AZFb (fig. 1) se consideró que podía tener un tamaño de unos 6,23 Mb. Sin embargo, recientemente Ferlin et al¹¹ han observado que la parte proximal de esta zona AZFb tiene una estructura similar a la de AZFc, con grandes secuencias repetidas, directas e indirectas, organizadas en palíndromos, como se puede observar en la parte inferior de la figura 1. Sin embargo, no pudieron identificar los puntos de rotura, por lo que consideraron que el tamaño de la delección puede ser desde 2,8 a más de 6 Mb. Algunos autores han propuesto la existencia de un cuarto *locus* (AZFd), que estaría entre los *loci* AZFa y AZFb, aunque esto no se ha corroborado. Los resultados de Ferlin et al¹¹ también indican que los mecanismos para la delección de AZFb no se producen por recombinación entre grandes bloques de secuencias repetitivas, como se ha observado para AZFa y AZFc. No obstante, al haber secuencias similares entre los *loci* AZFb y AZFc, consideran que, al menos en teoría, podría darse recombinaciones entre esas secuen-

Correspondencia: Dra. M.L. Martínez-Frías.
Centro de Investigación sobre Anomalías Congénitas (CIAC).
Instituto de Salud Carlos III.

Sinesio Delgado, 4-6. 28029 Madrid. España.
Correo electrónico: mlmartinez.frias@isciii.es

Recibido el 29-8-2005; aceptado para su publicación el 9-9-2005.

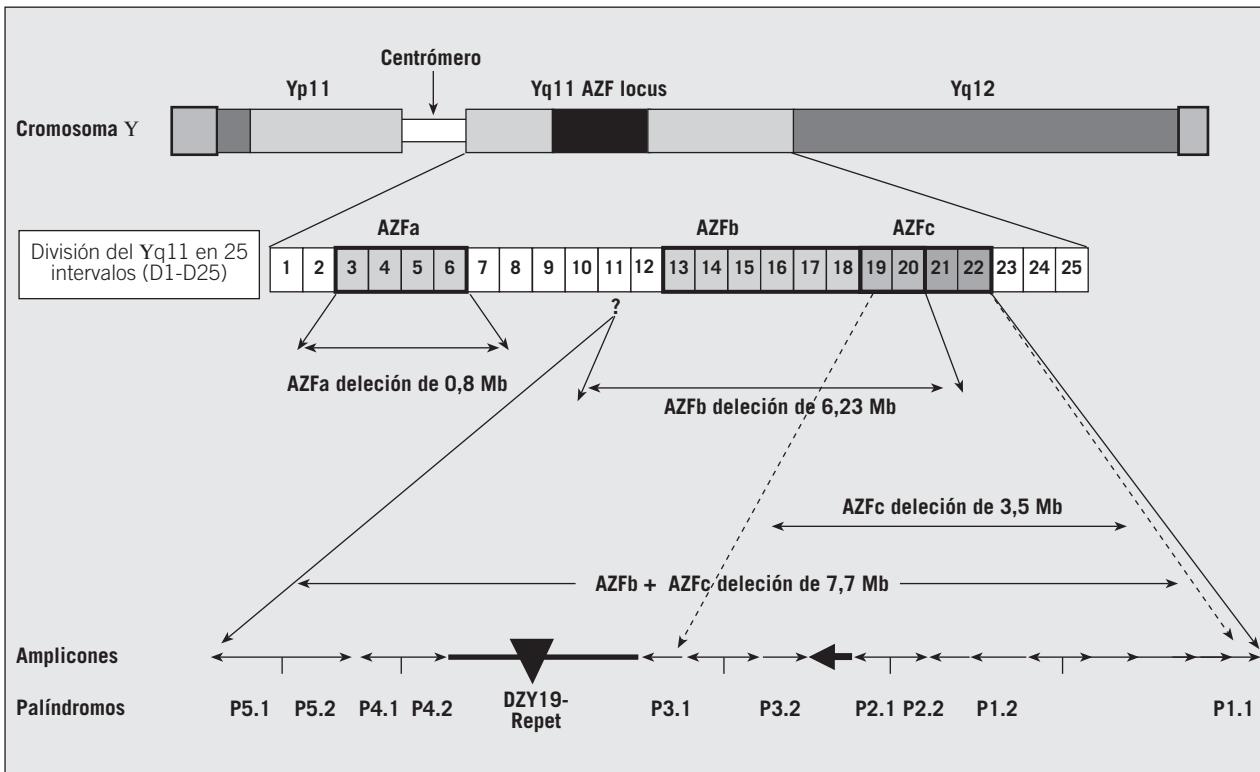


Fig. 1. Esquema del cromosoma Y, y visión de la zona AZF en Yq11. (Modificado de Vogt, 2004)¹⁵

cias, lo que explicaría las delecciones que incluyen ambas regiones AZFb y AZFc^{6,8}. También en esta región AZFb se han identificado genes³ (como el *RBMY1*), la mayoría de los cuales son específicos para el desarrollo testicular. Hace unos años ya se planteó que la familia de genes *RBMY1* eran los candidatos para AZFb²¹. La identificación de cuatro varones con una grave infertilidad y delecciones de esta región en las que no se había perdido el gen *RBMY1* lleva a Ferlin et al¹¹ a postular que otros genes de esta zona AZFb podrían estar también implicados en la espermatogenia. La región AZFc (cuyo tamaño se estima entre 3,5 y 4,5 Mb) presenta una extraordinaria estructura que consiste en una serie de bloques de secuencias homólogas repetidas (amplicones) que se organizan en tres palíndromos²², como se indica en la parte inferior de la figura 1. El locus AZFc es el más susceptible de presentar delecciones, que se originan por la recombinación entre amplicones de los palíndromos P3 y P1^{9,22} (fig. 1), y representa la microdelección más frecuente de las tres. Como ya se ha comentado, se han identificado delecciones de AZFc que afectaban también al locus AZFb^{8,22,23}, lo que complica la definición de su tamaño. En un estudio muy reciente¹² en el que se han analizado diferentes delecciones parciales de la zona AZFc, se señala que delecciones parciales específicas de este locus también son un factor de riesgo para la fertilidad y muestran diferentes efectos sobre la espermatogenia. Además, dada la estructura palindrómica con amplicones de esta zona del cromosoma Y humano, se podrían producir otros tipos de delecciones, incluso algunas que podrían ser polimorfismos, como han apuntado Repping et al²⁴, que identificaron una microdelección en AZFc de un tamaño de 1,6 Mb que se transmitió a lo largo de varias generaciones, aunque aún no se conoce realmente su significado. En la región AZFc se encuentran copias activas de la familia de genes *DAZ* (dele-

ted in azoospermia), que se han relacionado con una gran variedad de alteraciones que van desde azoospermia debida al síndrome de sólo células de Sertoli hasta oligospermia con diferentes fenotipos testiculares^{8,9,13,25}. Además, aparte de los genes *DAZ*, esta región incluye otros genes y unidades de transcripción, relacionados también con el desarrollo testicular. De hecho, se ha observado que ciertos pacientes con azoospermia tenían microdelecciones de AZFc que estaban fuera de la región en la que se encuentra el gen *DAZ*, lo que indicaría que también otros genes pueden participar en la infertilidad¹³.

Desde el punto de vista clínico, las microdelecciones que hoy se consideran relevantes son AZFa, AZFb, AZFb + c y AZFc. Sin embargo, al revisar la bibliografía se observa que la frecuencia con la que se han encontrado estas microdelecciones en los distintos estudios muestra un amplio intervalo de valores^{10,12,26-30}, si bien en todos los trabajos la microdelección más frecuentemente detectada es la de la región AZFc. En un estudio realizado en Barcelona³⁰ sobre 186 pacientes candidatos para inyección intracitoplásmica de esperma (ICSI), se observó una frecuencia de microdelecciones del 5,38% (intervalo de confianza [IC] del 95%, 2,61-9,66) y todas fueron de la región AZFc, aunque en tres de los pacientes había una alteración de cromosomas sexuales. Recientemente Ferlin et al¹² han estudiado esta misma región AZFc en 337 varones con problemas de fertilidad (sin hacer ninguna otra selección) y han obtenido la misma frecuencia de microdelecciones AZFc (5,3%; IC del 95%, 3,20-8,31). No obstante, es muy probable que las diferencias entre las frecuencias observadas en los distintos estudios no sean sólo consecuencia de los criterios de selección de los pacientes y del tamaño de las muestras analizadas (que varía entre 17 y 700 pacientes)^{10,12,26,27,29,30}, sino también de los métodos utilizados. Las posibilidades que ofrecen los constantes avan-

ces en las técnicas de estudio molecular, que lógicamente no han sido las mismas a las que se ha tenido acceso en los distintos años en que se realizaron esos trabajos³¹, constituyen una importante fuente de variabilidad.

Los problemas potenciales derivados del método utilizado se muestran claramente en el trabajo de Isidoro-García et al³² que se publica en este número de MEDICINA CLÍNICA, en el que se usan dos métodos de análisis de microdelecciones del cromosoma Yq11 en los mismos pacientes con resultados diferentes. Con uno de los métodos se detectó una pequeña delección de la región AZFa que no lo detectó con el otro, que, a su vez, identificó una delección en la zona AZFc no observada con el primero. De los resultados del trabajo de Isidoro-García et al, que muestran por primera vez, y de forma muy elegante, cómo la identificación de las distintas delecciones depende directamente de los grupos de STS utilizados para el estudio, se puede colegir también que la baja frecuencia de las delecciones de la región AZFa podría estar relacionada, en cierta medida, con los tipos de STS que se apliquen para su estudio. Es más, los resultados indican rotundamente que en varones con problemas graves de infertilidad en los que no se detecten microdelecciones no se puede descartar que las tengan. Por tanto, la aportación que hacen estos autores es de gran relevancia para la interpretación de muchos resultados de estos estudios en varones con problemas de fertilidad, así como por sus repercusiones clínicas.

Esos aspectos metodológicos llevan también a considerar otro problema clínico relacionado con el efecto que puede tener la existencia de microdelecciones paternas –detectadas o no– en los recién nacidos tras la aplicación de técnicas de reproducción asistida, particularmente la fecundación *in vitro* (FIV) y el ICSI. Hay ya cierto consenso sobre la posibilidad de que pacientes con azoospermia o grave oligospermia que se someten a una extracción de esperma para FIV o ICSI puedan transmitir las microdelecciones del Yq11 paterno a sus hijos varones^{33,34}. De hecho, se está insistiendo en recomendar que se ofrezca el cribado de estas microdelecciones a los pacientes con azoospermia o grave oligospermia, ya que se desaconseja realizar tratamientos de FIV o ICSI en los que tengan delecciones completas de la región AZFa y AZFb, o delecciones de cualquier tipo de la AZFb + c. Además, se han publicado otros trabajos que señalan que alguna de las microdelecciones Yq se relacionan también con una inestabilidad general del cromosoma Y, que puede dar lugar a líneas celulares con constitución cromosómica 45,X, así como con otros mosaicismos de los cromosomas sexuales^{35,36}. Por todo esto, hoy se considera que es obligatorio ofrecer asesoramiento genético antes de realizar una FIV o una ICSI, no sólo sobre la transmisión de las microdelecciones –las identificadas, y otras posibles que no se puedan detectar–, sino también sobre los problemas subsiguientes de infertilidad en los hijos varones nacidos tras FIV o ICSI, y sobre el riesgo potencial de que la descendencia presente síndrome de Turner y otras anomalías (como genitales ambiguos) asociadas a mosaicos de cromosomas sexuales.

Isidoro-García et al³² indican que se debe establecer un consenso sobre el método de análisis molecular más fiable para su utilización en los laboratorios clínicos. Sin embargo, analizando los conocimientos existentes y el desarrollo de las técnicas moleculares, es previsible que en la práctica clínica se vaya disponiendo de sistemas cada vez más avanzados, y de grupos de STS más completos y precisos, que permitan determinar fácilmente microdelecciones de distintos tamaños. Por tanto, cualquier consenso que se establezca muy posiblemente tendrá que ir modificándose para in-

cluir los nuevos conocimientos. De hecho, las primeras guías que se elaboraron para los laboratorios han tenido que modificarse en sucesivas ocasiones^{31,37,38}. A pesar de todo, podemos considerar que, con los conocimientos actuales, la detección de una delección en Yq11 tiene un gran valor diagnóstico y etiopatológico. Además, dado el avance de conocimientos continuo y espectacular que se está produciendo, se vislumbra un importante futuro para la identificación completa de las bases biológicas relacionadas con estos problemas de fertilidad masculina que, sin duda, tendrán una gran repercusión clínica.

Entre tanto, y como conclusión, hemos de insistir en que es necesario evaluar la aplicación previa de las técnicas de diagnóstico molecular de microdelecciones del cromosoma Y (que estén disponibles en ese momento) en las parejas con problemas de fertilidad idiopática masculina que quieran someterse a alguna de las técnicas de FIV o ICSI. Esta recomendación es particularmente importante ya que, en España, no se efectúan estos estudios en todos los centros de reproducción asistida. Por otra parte, teniendo presente que en muchos casos no se podrán detectar algunas microdelecciones, y que se han descrito casos de recién nacidos con malformaciones congénitas tras la aplicación de esas técnicas^{39,40}, aparte de informar a la pareja sobre todos esos aspectos, se debería hacer un seguimiento de los niños nacidos tras una FIV o una ICSI. Esto es necesario no sólo para evaluar potenciales efectos adversos derivados de los problemas de fertilidad, o de las propias técnicas, sino para diagnosticar lo antes posible esos efectos, si es que los hay, y establecer el tratamiento y las pautas de actuación más adecuadas, con prontitud.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali S, Hasnain SE. Molecular dissection of the human Y chromosome. *Gene*. 2002;383:1-10.
- Tilford CA, Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Rozen S, Brown LG, Rosenberg M, et al. A physical map of the human Y chromosome. *Nature*. 2001;409:943-5.
- Ali S, Hasnain SE. Genomic of the human Y-chromosome 1. Association with male infertility. *Gene*. 2003;321:25-37.
- Bardoni B, Zuffardi O, Guioli S, Ballabio A, Simi P, Cavalli P, et al. A deletion map of the human Yq11 region: implications for the evolution of the Y chromosome and tentative mapping of a *locus* involved in spermatogenesis. *Genomics*. 1991;11:443-51.
- Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Rossato M, Barbaux S, De Bortoli A. Y-chromosome deletions in idiopathic severe testiculopathies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:1075-80.
- Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev*. 2001;22:226-39.
- Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet*. 1976;28:119-24.
- Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet*. 1996;5:933-43.
- Vogt PH. Genetics of idiopathic male infertility: Y chromosomal azoospermia factors (AZFa, AZFb, AZFc). *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1997;11:773-95.
- Martínez MC, Bernabé MJ, Gómez E, Ballesteros A, Landeras J, Glover G, et al. Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients. *J Androl*. 2000;21:651-5.
- Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapiccola B, Foresta C. The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *J Med Genet*. 2003;40:18-24.
- Ferlin A, Tessari A, Ganz F, Marchina E, Barlati S, Garolla A, et al. Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J Med Genet*. 2005;42:209-13.
- Najmabadi H, Huang V, Yen P, Subbarao MN, Bhasin D, Banaag L, et al. Substantial prevalence of microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence-tagged site-base mapping strategy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:1347-52.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum 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.

15. Vogt PH. Genomic heterogeneity and instability of the AZF locus on the human Y chromosome. Mol Cell Endocrinol. 2004;224:1-9.
16. Sargent CA, Boucher CA, Kirsch S, Brown G, Weiss B, Trundley A, et al. The critical region of overlap defining the AZFa male infertility interval of proximal Yq contains three transcribed sequences. J Med Genet. 1999;36:670-7.
17. Foresta C, Moro E, Rossi A, Rossato M, Garolla A, Ferlin A. Role of the AZFa candidate genes in male infertility. J Endocrinol Invest. 2000;23: 646-51.
18. Kamp C, Huellen K, Fernandes S, Sousa M, Schlegel PN, Mielenk A, et al. High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoli-cell-only syndrome. Mol Hum Reprod. 2001;7:987-94.
19. Kamp C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K, Vogt PH. Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. Hum Mol Genet. 2000;9:2563-72.
20. Blanco P, Shlumukova M, Sargent CA, Jobling MA, Affara N, Hurles ME. Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism. J Med Genet. 2000;37:752-8.
21. Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, Ross A, Kiesewetter F, Pryor J, et al. 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 U S A. 1997;94:3848-53.
22. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordin HS, Watters RH, Wilson RK, et al. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. Nat Genet. 2001;29:70-5.
23. Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Van der Veen F, Oates RD, et al. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. Am J Hum Genet. 2002;71:906-22.
24. Repping S, Skaletsky H, Brown L, Van Daalen SK, Korver CM, Pyntikova T, et al. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. Nat Genet. 2003;35:247-51.
25. Saxena R, De Vries JW, Repping S, Alagappan RK, Skaletsky H, Brown LG, et al. Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. Genomics. 2000;67:256-67.
26. 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.
27. Sawai H, Komori S, Koyama K. Molecular analysis of the Y chromosome AZFc region in Japanese infertile males with spermatogenic defects. J Reprod Immunol. 2002;53:37-44.
28. Patsalis PC, Skordis N, Sismani C, Kousoulidou L, Koumbaris G, Eftychi C, et al. Identification of high frequency of Y chromosome deletions in patients with sex chromosome mosaicism and correlation with the clinical phenotype and Y-chromosome instability. Am J Med Genet A. 2005;135A:145-9.
29. Tse JY, Yeung WS, Ng EH, Cheng LN, Zhu HB, Teng XM, et al. A comparative study of Y chromosome microdeletions in infertile males from two Chinese populations. J Assist Reprod Genet. 2002;19:376-83.
30. Oliva R, Margaret E, Ballesca JL, Carrío A, Sánchez A, Milá M, et al. Prevalence of Y chromosome microdeletions in oligospermic and azoospermic candidates for intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 1998; 70:506-610.
31. 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.
32. Isidoro-García M, González-Sarmiento R, Cordero M, García-Macías C, Corrales-Hernández JJ, Miralles García JM. Estudio de las regiones AZF del cromosoma Y en varones con infertilidad idiopática. Comparación de 2 métodos de diagnóstico molecular. Med Clin (Barc). 2005;19:731-3.
33. Page DC, Silber S, Brown LG. Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility. Hum Reprod. 1999;14:1722-6.
34. Oates RD, Silber S, Brown LG, Page DC. Clinical characterization of 42 oligospermic or azoospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. Hum Reprod. 2002;17:2813-24.
35. Siffrin JP, Le Bourhis C, Krausz C, Barbaux S, Quintana-Murci L, Kanafani S, et al. Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. Hum Reprod. 2000;15:2559-62.
36. Patsalis PC, Sismani C, Quintana-Murci L, Taleb-Bekkouche F, Krausz C, McElreavey K. Effects of transmission of Y chromosome AZFc deletions. Lancet. 2002;360:1222-4.
37. Simoni M, Bakker E, Eurlings MC, Matthijs G, Moro E, Muller CR, et al. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. Int J Androl. 1999;22:292-9.
38. Simoni M. Molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions in Europe: state-of-the-art and quality control. Hum Reprod. 2001;16:402-9.
39. Rimm AA, Katayama AC, Diaz M, Katayama KP. A meta-analysis of controlled studies comparing major malformation rates in IVF and ICSI infants with naturally conceived children. J Assist Reprod Genet. 2004;21: 437-43.
40. Bonduelle M, Wennerholm UB, Loft A, Tarlatzis BC, Peters C, Henriot S, et al. A multi-center cohort study of the physical health of 5-years-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. Hum Reprod. 2005;20:413-9.