Saegrecopy_version5.qxd 5/30/07 2:55 PM Page 70

PREMIO BIOQUÍMICO PROF. DRA. JOSEFINA VARELA - ACCESIT

ESTUDIO DE MICRODELECIONES EN PACIENTES AZOOSPÉRMICOS Y OLIGOZOOSPÉRMICOS IDIOPÁTICOS

Ibáñez, Cecilia[*1], Granados, Patricia*[*1], Mercado, Graciela*[*2], Luna, Cecilia*[*3], Jofré, Felipe***[4], Naveira, Pablo***[4], Perco, Mariano***[4,5].*

** Centro Nacional de Genética Médica. A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán";*
*** Htal. Bernardino Rivadavia, Servicio de Ginecología, Sección Reproducción.*
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina.

1-Bioquímica - 2-Médica Genetista - 3-Lic. en Ciencias Biológicas
4-Médico Ginecólogo - 5-Andrólogo Especialista en Reproducción

Resumen

Se estudió la presencia de microdeleciones en el brazo largo del cromosoma Y, en pacientes con azoospermia u oligozoospermia severa idiopáticas (recuento menor de 5.000.000 de espermatozoides/ml), con los siguientes objetivos: determinar su frecuencia en nuestra población, contribuir al diagnóstico de la infertilidad masculina, y brindar al paciente la posibilidad de acceder a un adecuado asesoramiento genético.

Fueron seleccionados 40 pacientes con azoospermia u oligozoospermia severa idiopáticas que consultaron al Servicio de Reproducción del Htal. Rivadavia, cuyas edades estuvieron comprendidas entre 28 y 55 años, hallándose dichas deleciones en el ADN de 4 de ellos.

La frecuencia de microdeleciones encontrada en los pacientes estudiados fue del 10%, y la zona más afectada fue AZFc, datos que coincidieron con lo descripto en la bibliografía [1,2,3], demostrando la importancia de este estudio como una alternativa a considerar en este tipo de pacientes.

Palabras clave: microdeleciones -AZF- cromosoma Y-infertilidad masculina

INTRODUCCIÓN

El factor de azoospermia ubicado en el brazo largo del cromosoma Y, contiene genes que intervienen en la espermatogénesis y está dividido en tres zonas: AZFa, AZFb y AZFc, que son vulnerables a perder su material genético [4,5,6]. Estas pérdidas o

Saegrecopy_version5.qxd 5/30/07 2:55 PM Page 71

ZONA AFECTADA	FENOTIPO HISTOLOGICO	FENOTIPO SEMINAL
AZFa	CELULAS DE SÉRTOLI UNICAMENTE	Azoospermia
AZFb	SCOS Arresto madurativo	Azoospermia
AZFc	Variable	Azoospermia Oligozoospermia

Cuadro 1: Asociación Genotipo – Fenotip

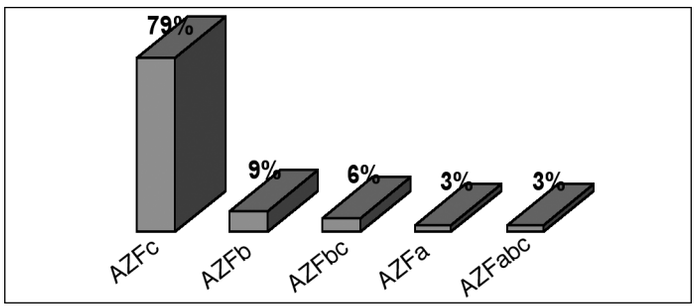

Figura 1: Frecuencia de deleciones de cada zona AZF.

Tipo de Pacientes	Cantidad de pacientes	Zona con Microdeleciones				Total de Microdeleciones	Porcentaje de Microdeleciones
		AZFa	AZFb	AZFc	AZFb-c		
Azoospérmicos	22	0	0	3	1	4	18%
Oligozoospérmicos	18	0	0	0	0	0	0%
Total	40	0	0	3	1	4	10%

Cuadro 2: Resultados

microdeleciones en individuos azoospérmicos no obstructivos u oligozoospérmicos severos, son la causa genética más frecuente de infertilidad masculina después del Síndrome de Klinefelter [5]. La microdeleción de toda la zona AZFa está asociada con el Síndrome de Solo Células de Sértoli (SCOS), sin células precursoras de espermatozoides [7], y las de las zonas AZFb o AZFb-c se caracterizan por SCOS o arresto espermatogénico en algún estadío de la meiosis, resultando también en casos de azoospermia [1,2,5,8,9]. Cuando AZFc es la zona involucrada en la pérdida de material genético el fenotipo, tanto clínico como histológico, es variable [10], habiéndose informado casos de espermatogénesis residual y de individuos oligozoospérmicos que posteriormente llegaron a la azoospermia, para los cuales sería de interés la criopreservación de esperma [1,11,12] (cuadro 1). En cuanto a la frecuencia de deleciones, la zona AZFc es la más afectada, con un valor muy superior al de las otras zonas [1,2,5,13] (figura 1). Esta información tiene valor pronóstico en el momento de considerar una extracción de espermatozoides por punción testicular (TESE) para proceder a técnicas de reproducción asistida y, además, permite asesorar sobre los riesgos de herencia de la misma deficiencia reproductiva para el caso de descendencia masculina [5,14]. De esta manera, la utilidad del estudio de microdeleciones sería, además de la determinación de la causa de la infertilidad, la consideración de la criopreservación de esperma, la evaluación de la probabilidad de éxito para una TESE, y el asesoramiento genético correspondiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 22 pacientes azoospérmicos y 18 oligozoospérmicos severos (menos de 5.000.000 de espermatozoides/ml de eyaculado) que consultaron al servicio de Reproducción del Htal. Rivadavia, cuyas edades oscilaron entre 28 y 55

Saegrecopy_version5.qxd 5/30/07 2:55 PM Page 72

años. Los mismos fueron evaluados cuidadosamente para establecer el carácter idiopático del déficit de producción de espermatozoides y, mediante el cariotipo, los casos de síndrome de Klinefelter pudieron ser descartados. La presencia de criptorquidia o varicocele no fue condición excluyente

Todos los pacientes al momento del estudio fueron asesorados adecuadamente por la médica genetista, quien evaluó los antecedentes familiares y suministró un consentimiento escrito para que el paciente exprese su conformidad.

A partir de ADN extraído por métodos convencionales de leucocitos de sangre periférica de los 40 pacientes seleccionados, se estudió la presencia de fragmentos específicos de AZFa AZFb y AZFc. Estos fragmentos, recomendados por la Academia de Andrología Europea, permiten la detección de más del 90% de las microdeleciones clínicamente relevantes [1, 4, 5]. Para esto se realizaron dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) múltiples, cuyos productos fueron revelados mediante una electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, y expuestos a luz ultravioleta.

Todos los pacientes incluidos contaban con cariotipo conocido y consentimiento firmado.

RESULTADOS

Como se muestra en el cuadro 2, el 10% de los pacientes estudiados (4/40) presentó deleciones en el AZF. En tres casos, correspondieron a la zona AZFc, y en un sólo caso se encontró una microdeleción que involucró las zonas AZFb y AZFc a la vez (AZFb-c). Si se consideraran solamente los individuos azoospérmicos, el porcentaje de microdeleciones llegaría a un 18% (4/22).

DISCUSIÓN:

Si bien todos los casos de microdeleciones se vieron únicamente en el grupo de los azoospérmicos, la ausencia de microdeleciones en los pacientes oligozoospérmicos podría deberse al tamaño de la muestra. Algunas publicaciones proponen incluir en este tipo de estudios sólo aquellos pacientes con recuento espermático menor de 1.000.000 de espermtozoides/ml; aquí se eligió un valor de corte superior dada la posible existencia de pacientes oligozoospérmicos con deleción en AZFc, que más tarde pudieran llegar a la azoospermia, ya que su detección temprana les permitiría optar por la criopreservación.

De esta manera, conocer la presencia de microdeleciones brinda al médico especialista información de utilidad para el diagnóstico y tratamiento del problema de fertilidad, la posibilidad o no de reproducción asistida, el asesoramiento genético y el buen uso de los recursos disponibles.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer muy especialmente la importante colaboración de la bioquímica Marcela Fernández en la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Bienvenu T, Patrat C, Jouannet P. Molecular detection of Ychromosome microdeletions: a new approach based on the denaturing gradient gel electroforesis. Gynecol Obstet Fertil 2003;31:639-46
2. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Prognostic value of Y deletion analysis. The rol of current methods. Hum Reprod 2001;16:1543-7
3. Girardi S, Mielnik A, Schlegel N. Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. Hum Reprod 1997;12:1635-41
4. Simoni M, Bakker E, Eurlings M, Matthijs G, Moro E, Muller C, Vogt P. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. Int J Androl 1999;22:292-9
5. Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y cromosomal microdeletions. State of the art 2004. Int J Androl 2004;27:240-9
6. Vogt PH. Genomic heterogeneity and instability of the AZF locus on the human Y chromosome. Mol Cell Endocrinol 2004;224:1-9
7. Kamp C, Huellen K, Fernandes S, Sousa M, Schlegel P, Mielnik A, Kleiman S, Yavetz H, Krause W, Kupker W, Johannisson R, Schulze W, Weidner W, Barros A, Vogt PH. High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoli-cell-only syndrome. Mol Hum Reprod 2001;7:987-94
8. Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Van Der Veen F, Oates RD, Page DC, Rozen S. 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
9. Liow SL, Yong EL, Ng S. Prognostic value of Y deletion analysis: How reliable is the outcome of Y deletion analysis in providing a sound prognosis? Hum Reprod 2001;16:9-12
10. Ferras C, Fernandes S, Marques CJ, Carvalho F, Alves C, Silva J, Sousa M, Barros A. AZF and DAZ gene copy-specific deletion analysis in

Saegrecopy_version5.qxd 5/30/07 2:55 PM Page 73

maturation arrest and Sertoli cell only syndrome. Mol Hum Reprod 2004;10:755-61
11. Kleiman S, Maymon B, Yogev L, Paz G, Yavetz H. Prognostic value of Y deletion analysis. The prognostic rol of the extent of Y microdeletions on spermatogenesis and maturity of Sertoli cells. Hum Reprod 2001;16:339-402
12. Krausz C, Mc Elreavey K. Y chromosome microdeletion in fertile men(letter). Hum Reprod 2001;16:1306-7
13. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Silber S, Oates R, Rozen S, Page DC. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. Nat Genet 2001;29:279-86
14. Simoni M, Gromol J, Dworniczak B, Rolf C, Abshagen K, Kamischke A, Carani C, Meschede D, Behre H, Horst J, Nieschlag E. Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in Azoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia . Fertil Steril 1997;67:542-7