

FREQÜÈNCIA DE LES MICRODELECCIONS *gr/gr*, *b1/b3* i *b2/b3* DE LA REGIÓ AZFc DEL CROMOSOMA Y HUMÀ

Cristina Gázquez,¹ Josep Oriola,¹ Lourdes Mengual,² José Luis Ballecà,³ Rafael Oliva^{1*}

¹ Human Genetics Laboratory, Grup de Genètica Humana. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona, IDIBAPS. Casanova, 143. 08036, Barcelona. Adreça electrònica: roliva@ub.edu.

² Laboratori de Biologia Molecular. Fundació Puigvert. Barcelona.

Assisted Reproduction Units, ICGON. Hospital Clínic, IDIBAPS. Barcelona.

Resum

El cromosoma Y conté moltes seqüències repetides, anomenades *amplicons*, que fan que puguin produir-se deleccions. També conté diversos gens necessaris per a una espermatogènesi correcta. Concretament, la regió AZFc del cromosoma Y humà és essencial per a una espermatogènesi normal. Recentment, s'han caracteritzat tres tipus de microdeleccions de la regió AZFc: la microdelecció *gr/gr*, la microdelecció *b1/b3* i la microdelecció *b2/b3*. En aquest estudi s'han analitzat les freqüències d'aquestes tres microdeleccions en pacients amb problemes d'infertilitat, que eren candidats a ICSI. El cribratge de la regió AZFc s'ha realitzat mitjançant vuit *sequence-tagged site* (STS) en quatre-cents dos pacients i trenta-cinc controls. S'han trobat dinou pacients amb microdeleccions *gr/gr* (4,73 %), dos amb microdeleccions *b2/b3* (0,5 %), cap amb microdelecció *b1/b3* i un amb una nova microdelecció (sY1191 i sY1291 delecionats; 0,25 %). Cap control ha presentat microdeleccions. La delecció *gr/gr* és un factor de risc de defectes espermatogènics. La delecció *b1/b3* té una freqüència molt baixa i no s'ha trobat la relació que existeix entre la presència de la microdelecció i l'efecte a l'espermatogènesi. A més, s'ha identificat un pacient amb un nou tipus de microdelecció del qual encara es desconeix el mecanisme molecular.

Paraules clau STS, microdeleccions parcials, regió AZFc, cromosoma Y.

Abstract

Frequency of microdeletions *gr/gr*, *b1/b3* and *b2/b3* of the AZFc region in human Y chromosome. Y chromosome contains many repetitive sequences (called amplicons) that result in increased susceptibility of reorganizations. It also contains several genes that are essential for spermatogenesis. Specifically, the AZFc region in human Y chromosome is critical as its complete microdeletion results in azoospermia. Recently, three different type of partial microdeletions of the AZFc region have been characterized: the *gr/gr* deletion, the *b1/b3* deletion and the *b2/b3* deletion. In the present work we have analyzed the frequencies of these three types of microdeletions in infertile patients who were ICSI candidates through the screening with eight sequence-tagged site (STSs) along the AZFc region. A total of 402 patients and 35 controls have been studied. 19 patients have been found with the *gr/gr* microdeletion (4.73%), 2 with the *b2/b3* microdeletion (0.5%), none with the *b1/b3* microdeletion and one with a new type of microdeletion (negative for sY1191 and sY1291; 0.25%). No microdeletions have been detected in any of the control samples. The *gr/gr* microdeletion is a risk factor for spermatogenic failure. The *b1/b3* microdeletion occurs at a very low frequency and its clinical consequences are so far unknown. No molecular explanation is yet available for the new type of microdeletion detected.

Key words STSs, partials microdeletions, AZFc region, Y chromosome.

INTRODUCCIÓ

La infertilitat masculina afecta el 5-10 % de la població. L'error espermatogènic és la forma més comuna,

de la qual, aproximadament el 10 % són Yq microdeleccions (Oliva *et al.*, 1998; Moro *et al.*, 2002; Foresta *et al.*, 2001; Yen, 2001; Tyler-Smith i Mc Vean, 2003). El

cromosoma Y conté molts amplicons que fan que puguin aparèixer delecions. També conté diversos gens necessaris per a una espermatogènesi correcta. Les microdelecions en Yq, que eliminen un o diversos d'aquests gens són les responsables d'alguns casos d'infertilitat masculina. Concretament, la regió AZFc del cromosoma Y humà és essencial per a una espermatogènesi normal. La delecio b2/b4 elimina tota aquesta regió AZFc, cosa que provoca un error espermatogènic. L'interès en l'anàlisi de les microdelecions del cromosoma Y deriva de la possibilitat de la transmissió d'aquestes microdelecions mitjançant ICSI. Aquesta anàlisi s'ha convertit en una eina diagnòstica d'utilitat per a poder donar un consell genètic adequat abans de realitzar un tractament de reproducció assistida.

Recentment, s'han caracteritzat tres tipus de microdelecions de la regió AZFc: la microdelecio gr/gr, la microdelecio b1/b3 i la microdelecio b2/b3 (Repping *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2004). S'ha vist que microdelecions de la regió AZFc són comunes en homes infèrtils, però de moment la seva anàlisi molecular no forma part de les anàlisis de rutina. En aquest estudi s'han analitzat les freqüències d'aquestes tres microdelecions en pacients amb problemes d'infertilitat amb un cribratge de la regió AZFc amb vuit *sequence-tagged site* (STS) (Repping *et al.*, 2004; De Llanos *et al.*, 2004).

MATERIAL I MÈTODES

Pacients

Els pacients provenen de la Unitat de Reproducció Assistida de l'Hospital Clínic de Barcelona i són candidats per a ICSI. Les mostres utilitzades en aquest estudi són mostres de DNA aïllat a partir de la sang

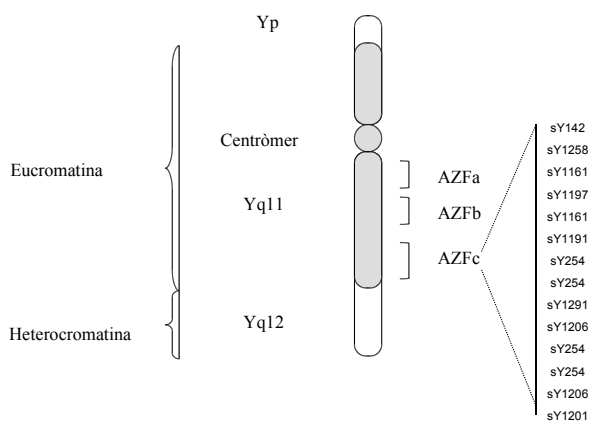


Figura 1 Detall de la regió AZFc analitzada i els STS utilitzats en el cribratge ordenats segons Skaletsky (2003).

dels pacients en la Unitat de Genètica, de l'Hospital Clínic de Barcelona, mitjançant mètodes estàndards.

Les mostres analitzades en aquest estudi provenen d'un estudi anterior on es va avaluar si el pacient estava afectat d'una delecio total d'una de les tres regions AZF (AZFa, b i c) del cromosoma Y. Si el resultat va donar una absència de delecio, la mostra s'ha inclòs en el present estudi. D'aquesta manera, s'han estudiat quatre-cents dos pacients i trenta-cinc controls. S'ha analitzat la presència de microdelecions en la regió AZFc.

Anàlisi molecular de microdelecions en la regió AZFc del cromosoma Y

Per a analitzar la presència de microdelecions en la regió AZFc, s'han estudiat vuit STS localitzats en aquesta regió del Yq (vegeu la figura 1). Tots els primers utilitzats ja s'havien descrit. En una primera etapa s'han coamplificat els STS sY1191 i sY1291 mitjançant PCR (vegeu la taula 1). En el cas que algun o ambdós d'aquests marcadors hagi estat negatiu ens indica una possible microdelecio en la regió estudiada. Per tal de determinar la mida i el tipus d'aquesta microdelecio, la mostra s'analitza amb sis STS addicionals: sY142, sY1258, sY1161, sY1197, sY1206 i sY1201. Els marcadors sY142 i sY1161 es coamplifiquen en la mateixa reacció de PCR, mentre que els quatre marcadors restants s'amplifiquen en reaccions independents.

Cada reacció de PCR consisteix en 25 µl de volum final i els següents components: 2,5 µl de tampó 10X (+Mg), 4 µl dNTPs, 2 µl de primer sentit a 10 pm/µl, 2 µl de primer antisentit a 10 pm/µl, 0,2 µl de Taq polimerasa, 1 µl de DNA genòmic; es completa fins a

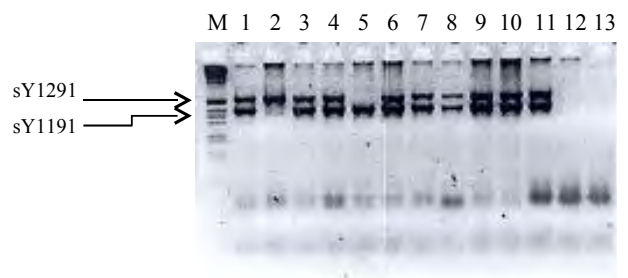


Figura 2 Fotografia d'un gel d'agarosa al 3% dels productes d'amplificació corresponents als STS sY1191 i sY1291. El carril M conté el marcador de pes molecular d'1 Kb. Els carrils 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9 i 10 corresponen a pacients sense cap microdelecio en la zona estudiada. El carril 2 correspon a un pacient amb l'sY1191 delecionat i el carril 5 a un pacient amb l'sY1291 delecionat. El carril 11 és el control positiu, el carril 12 és el control negatiu (DNA de dona) i el 13 és el blanc (aigua).

25 µl amb aigua destil·lada. (Quan es posa més d'una parella de primers es resta el volum afegit de més de l'aigua). Les condicions d'amplificació per a cadascun dels STS es detallen a la taula 1.

En tots els casos es realitzen trenta-cinc cicles d'amplificació amb una desnaturalització inicial a 95° C durant cinc minuts i una extensió final a 72° C durant deu minuts. Els productes de l'amplificació se separen en gels d'agarosa al 3 % tenyits amb bromur d'etidi i es visualitzen en un transil·luminador. Després es fa la fotografia (vegeu la figura 2).

RESULTATS

La taula 2 recull el resum dels resultats. S'han trobat dinou pacients amb la microdelecció gr/gr (4,73 %), 2 amb la b2/b3 (0,5 %), cap amb la microdelecció b1/b3 i un amb una nova microdelecció (sY1191 i sY1291 delecionats; 0,25 %) (vegeu la figura 3). Totes aquestes microdeleccions s'han trobat en el grup de pacients i no s'ha trobat cap microdelecció en el grup control. En total, vint-i-dos homes dels quatre-cents dos pacients amb un defecte espermatogènic (5,47 %) tenen microdeleccions en la regió AZFc.

DISCUSSIÓ

En aquest estudi s'analitzen les microdeleccions de la regió AZFc de quatre-cents dos pacients candidats per a ICSI. En total s'han trobat vint-i-dos pacients amb microdelecció dels quatre-cents dos pacients analitzats (5,47 %) mentre que no s'ha trobat cap microdelecció en el grup control (n = 35).

Pel que fa a la microdelecció gr/gr, és la més abundant en els pacients que presenten un defecte esperma-

togènic (De Llanos *et al.*, 2004). Aquesta microdelecció elimina més de la meitat de la regió AZFc, concretament, dues còpies de les quatre còpies existents del gen DAZ. Afecta unes 1,6 Mb (Repping *et al.*, 2003). En el grup control no s'ha trobat cap pacient amb aquesta microdelecció, cosa que concorda amb els resultats de Repping *et al.* (2003), ja que en un grup de cent quaranta-vuit homes amb espermatogènesi normal no van trobar cap microdelecció gr/gr. La freqüència de gr/gr que obtenim en els nostres pacients (4,73 %) és superior a la freqüència que obtenen Repping *et al.* (3,18 %; 15/471 en el cribratge inicial i 3,66 %; en l'estudi d'associació). La diferència entre freqüències pot ser deguda a diferències entre les poblacions estudiades o bé a diferències entre els tipus de pacients inclosos en els dos estudis. Els resultats obtinguts són consistents amb la idea que l'existència de microdeleccions en el cromosoma Y causa defectes espermatogènics greus, però la microdelecció gr/gr, com que elimina només dues còpies del gen DAZ, és només un factor de risc de defectes espermatogènics.

Només un 0,5 % de pacients estudiats presenten la microdelecció b2/b3. Aquesta microdelecció s'originaria a partir d'una inversió gr/rg i després tindria lloc una delecció entre els amplicons b2 i b3 (Repping *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2004). Elimina una regió de 1,8 Mb; per tant, la delecció és més gran que la delecció gr/gr.

La delecció b1/b3 no s'ha trobat en cap pacient. La seva freqüència és molt baixa i no s'ha trobat la relació que existeix entre la presència de la microdelecció i l'efecte a l'espermatogènesi, tot i que alguns autors (Hucklenbroich *et al.*, 2004) diuen que el seu paper seria irrellevant en aquest procés. No es pot, però, assegurar aquesta afirmació, ja que com que és tan poc freqüent resulta difícil establir una relació.

En el nostre estudi hem trobat un pacient que tenia delecionats els STS sY1191 i sY1291; per tant, no seria ni una microdelecció gr/gr (tindria el sY1191) ni una microdelecció b2/b3 (tindria l'sY1291), ni una microdelecció b1/b3 (no tindria ni l'sY1161 ni l'sY1197). En un estudi anterior (Hucklenbroich *et al.*, 2004) aquesta microdelecció també s'ha presentat. Es tracta d'una nova microdelecció que es desconeix com s'origina i quins efectes pot tenir a l'espermatogènesi. Per tant, resultarà interessant aprofundir en el seu possible mecanisme com a extensió del present treball.

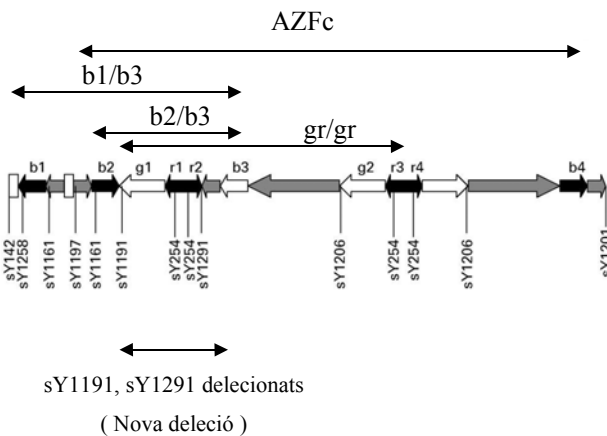


Figura 3 Esquema descriptiu de les diferents regions delecionades.

AGRAÏMENTS

Subvencionat amb projecte de recerca de la Generalitat de Catalunya (2001SGR00382), Ministerio de Ciencia y Tecnología (Plan Nacional de I+D, MC2003-03937)

Taula 1 Condicions de PCR per als vuit STS utilitzats en el cribratge de microdeleccions de la regió AZFc del cromosoma Y.

STS	Desnaturalització 94° C	Hibridació	Extensió 72° C
sY1191 + sY1291			
sY1258 sY1197 sY1201	1 min	1 min a 61° C	1 min
sY142 + sY1161	30 s	30 s a 64° C	30 s
sY1206	30 s	30 s a 60° C	30 s

Taula 2 Descripció de la mida de cada microdelecció, amb els STS que no han amplificat (-) i el nombre de pacients que presenten la delecció (n).

Tipus delecció n	142	1258	1161	1197	1161	1191	254	254	1291	1206	254	254	1206	1201
gr/gr	19	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
b1/b3	0	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
b2/b3	2	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Nova delecció	1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+

i Fondo de Investigaciones Sanitarias (V-2003-RED CO7A-0) a R. O.

BIBLIOGRAFIA

- FERNANDES, S.; PARACCHINI, S.; MEYER, L. H.; FLORIDIA, G.; TYLER-SMITH, C.; VOGT, P. H. (2004). «A large AZFc deletion removes DAZ3/DAZ4 and nearby genes from men in haplogroup N». *Am. J. Hum. Genet.*, 74:180-187.
- FORESTA, C.; MORO, E.; FERLIN, A. (2001). «Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis». *Endocr. Rev.*, 22:226-239.
- MORO, E.; FERLIN, A.; YEN, P. H.; FRANCHI, P. G.; PALKA, G.; FORESTA, C. (2000). «Male infertility caused by a de novo partial deletion of the DAZ cluster on the Y chromosome». *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85:4069-4073.
- OLIVA, R.; MARGARIT, E.; BALLESCA, J. L.; CARRIO, A.; SANCHEZ, A.; MILA, M.; JIMENEZ, L.; ALVAREZ-VIJAN, J. R.; BALLESTA, F. (1998). «Prevalence of Y chromosome microdeletions in oligospermic and azospermic candidates for intracytoplasmic sperm injection». *Fertil. Steril.*, 70:506-510.
- REPPING, S.; SKALETSKY, H.; BROWN, L.; VAN DAALLEN, S. K.; KORVER, C. M.; PYNTIKOVA, T.; KURODA-KAWAGUCHI, T.; DE VRIES, J. W.; OATES, R. D.; SILBER, S. [*et al.*](2003). «Polymorphism for a 1.6Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection». *Nat. Genet.*, 35:247-251.
- REPPING, S.; VAN DAALLEN, S. K.; KORVER, C. M.; BROWN, L.; MARSZALEK, J. D.; GIANOTTEN, J.; OATES, R. D.; SILBER, S.; VAN DER VEEN, F.; PAGE, D. C.; ROZEN, S. (2004). «A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azospermia factor c region». *Genomics.*, 83:1046-1052.
- SKALETSKY, H.; KURODA-KAWAGUCHI, T.; MINX, P. J.; CORDUM, H. S.; HILLIER, L.; BROWN, L. G.; REPPING, S.; PYNTIKOVA, T.; ALI, J.; BIERI, T. [*et al.*](2003). «The male specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes». *Nature*, 423:825-837.
- TYLER-SMITH, C.; MCVEAN, G. (2003). «The comings and goings of a Y polymorphism». *Nat. Genet.*, 35:201:202.
- YEN, P. (2001). «The fragility of fertility». *Nat. Genet.* 29:243-244.