

CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DEL CROMOSOMA Y EN 2.173 PACIENTS INFÈRTILS ESTUDIATS EN ELS ÚLTIMS DEU ANYS

Cristina Gázquez,¹ Lucas Fares Taie,¹ Marta Aldea,¹ Josep Oriola,¹
José Luis Balleascà,² Rafael Oliva^{1*}

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

² Assisted Reproduction Units, ICGON, Hospital Clínic, IDIBAPS

Resum

El cromosoma Y conté tres regions importants per a la fertilitat: AZFa, AZFb i AZFc. Aquestes tres regions són susceptibles de delectonar-se, cosa que produeix una alteració de l'espermatogènesi. Des del seu descobriment fins al 1996, aquestes tres regions són estudiades des del punt de vista molecular en els laboratoris de genètica pel seu interès diagnòstic per a poder establir la causa de la infertilitat i, a més a més, això permet donar un consell genètic adequat abans de realitzar un tractament de reproducció assistida, ja que aquestes microdeleccions poden ser transmeses mitjançant ICSI (*intracytoplasmatic sperm injection*, injecció intracitoplasmàtica d'esperma). En aquest estudi s'han analitzat les microdeleccions completes de les regions AZFa, AZFb i AZFc en 2.173 pacients amb problemes d'infertilitat, que eren candidats a ICSI. Els resultats de les anàlisis indiquen que 24 pacients presentaven una microdelecció de la regió AZFc, 7 pacients presentaven una microdelecció de la regió AZFb, 8 pacients no tenien ni la regió AZFb, ni la AZFc i només un pacient presentava una microdelecció de la regió AZFa. També, s'han analitzat les microdeleccions parcials de la regió AZFc en un subgrup de 688 pacients. En concret, s'han buscat tres tipus de microdeleccions de la regió AZFc: la microdelecció gr/gr, la microdelecció b1/b3 i la microdelecció b2/b3. A falta de tipar 6 pacients, de moment, s'han trobat 19 pacients amb la microdelecció gr/gr, 2 amb la b2/b3 i cap amb la microdelecció b1/b3. S'ha trobat un cas amb una nova microdelecció amb els marcadors genòmics sY1191 i sY1291 delectonats.

Paraules clau microdeleccions completes, microdeleccions parcials, regions AZFa, AZFb i AZFc, cromosoma Y.

Abstract

The male chromosome Y have three important regions for fertility: AZFa, AZFb and AZFc. These regions could be deleted resulting in spermatogenesis failure. From 1996, these three molecular regions are habitual screening tests due to their diagnostic interest for infertility. Also the genetic analysis of the deletion from these regions is part of the procedures for genetic counselling prior to assisted reproduction treatments by ICSI (IntroCytoplasmatic Sperm Injection). In this study the complete microdeletions for the AZFa, AZFb and AZFc regions have been analysed in 2173 patients featuring infertility problems and potentially candidates to ICSI treatment. The genetic results indicates that 24 patients have a deletion of the AZFc region, 7 have a deletion of the AZFb region, 8 patients have deletions of the AZFb+c regions, and an unique individual have a deletion of the AZFa region. Also, in a subgroup of 688 patients, the following partial microdeletion for the AZFc region have been analysed: the gr/gr, the b1/b3 and the b2/b3 microdeletions. Pending the genotyping of 6 individuals, until present 19 patients have a gr/gr microdeletion, 2 have b2/b3 microdeletion, and any individuals with the b1/b3 microdeletion have been found. There is a case featuring a new microdeletion with the sY1191 and sY1291 genetic markers deleted.

Key words complete microdeletion, partial microdeletion, AZFa, AZFb i AZFc regions, Y chromosome.

INTRODUCCIÓ I METODOLOGIA

Les microdeleccions del braç llarg del cromosoma Y (Yq) representen la causa molecular més freqüent de la infertilitat masculina, com és el cas de les oligozo-

ospèrmies severes i de les azoospèrmies no obstructives (Oliva *et al.*, 1998; Moro *et al.*, 2000; Foresta *et al.*, 2001; Yen, 2001; Tyler-Smith *et al.*, 2003). El cromosoma Y conté molts amplicons, que fan que puguin aparèixer delections. El 1976 es va observar

citogenèticament l'existència de la regió AZF en el braç llarg del cromosoma Y. Aquesta regió contenia la presència d'un factor d'azoospermia; d'aquí el seu nom (*azoospermia factor*). Vint anys després, es va veure que aquesta regió contenia en realitat tres regions AZF, les quals es van designar com a AZFa, AZFb i AZFc, des de l'extrem proximal al distal del Yq. Des d'aleshores aquestes tres regions han estat incloses en les anàlisis de rutina dels centres diagnòstics. D'una banda, l'interès diagnòstic d'aquestes microdelecions del cromosoma Y és poder establir la causa d'un fenotip determinat i, d'altra banda, donar un consell genètic adequat abans de realitzar un tractament de reproducció assistida, ja que aquestes microdelecions poden ser transmeses mitjançant la tècnica ICSI. Més recentment, s'han caracteritzat tres tipus de microdelecions parcials de la regió AZFc: la microdeleció gr/gr, la qual seria un factor de risc d'infertilitat, la microdeleció b2/b3, que seria un polimorfisme sense efecte en la fertilitat, i la microdeleció b1/b3, de la qual no es coneix quin efecte té en fertilitat (Repping *et al.*, 2004; De Llanos *et al.*, 2004). L'anàlisi molecular d'aquestes microdelecions parcials no està inclosa en les anàlisis de rutina. En aquest estudi fem un resum de tots els casos de pacients infèrtils dels últims 10 anys que han passat pel nostre centre.

SUBJECTES D'ESTUDI

Els pacients provenen de la Unitat de Reproducció Assistida de l'Hospital Clínic de Barcelona i són candidats per a ICSI entre els anys 1996 i 2006, ambdós inclosos. Les mostres utilitzades en aquest estudi són mostres de DNA aïllat a partir de la sang dels pacients en la Unitat de Genètica, de l'Hospital Clínic de Barcelona, mitjançant mètodes estàndard.

El total de pacients analitzats pel que fa a les mi-

crodelecions completes del cromosoma Y durant aquests deu anys ha estat de 2.173. Un subgrup de 688 pacients ha estat estudiat per a analitzar-ne les microdelecions parcials.

ANÀLISI MOLECULAR DE LES MICRODELECIONS COMPLETES DE LES REGIONS AZFa, AZFb i AZFc

Des de 1999, l'European Academy of Andrology (EAA) i l'European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) encapçalen la qualitat diagnòstica dels assaigs, gràcies a la publicació de guies de referència per al diagnòstic molecular de les microdelecions del cromosoma Y (Simoni *et al.*, 2004). Seguint la seva línia des de 2004, l'anàlisi de les microdelecions es fa com es descriu a continuació.

Per a analitzar la presència de microdelecions completes en les regions AZFa, AZFb i AZFc es fa un *screening* amb dos parells de marcadors genòmics (STS) per a cadascuna de les regions, els quals cobreixen la detecció del 95 % de les delecions en els pacients azoospèrmics o oligosospèrmics severos. Els primers utilitzats són:

- Per a la regió AZFa: sY84 i sY86.
- Per a la regió AZFb: sY127 i sY134.
- Per a la regió AZFc: sY254 i sY255.

Per a estudiar les microdelecions totals es fan dues PCR *multiplex* paral·leles anomenades *multiplex A* i *B* (figura 1). En la *multiplex A* es combinen els marcadors sY254, sY86, sY127, ZFY i SRY. En la *multiplex B* es combinen els marcadors sY84, sY134, sY255, ZFY i SRY. Els marcadors ZFY i SRY serveixen com a controls interns de la PCR.

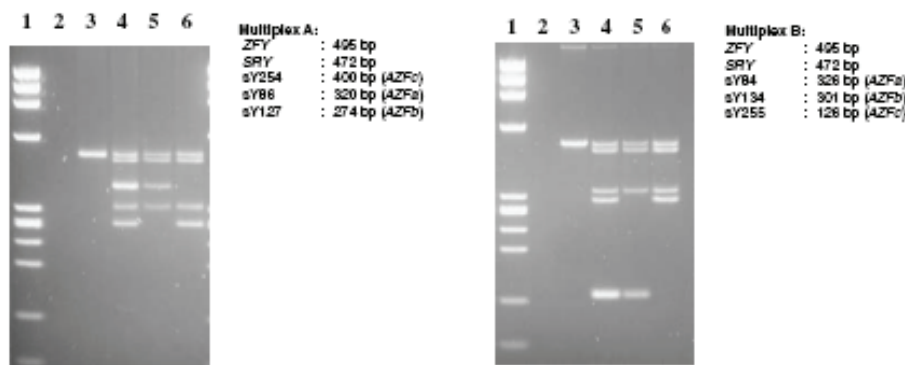


Figura 1 *Multiplex A* i *B* per a determinar microdelecions completes de les regions AZFa, AZFb i AZFc. Carril 1: marcador de pes molecular; carril 2: aigua; carril 3: DNA de dona; carril 5: DNA de pacient amb microdeleció de la regió AZFb; carril 6: DNA de pacient amb microdeleció de la regió AZFc.

Taula 1 Descripció de la mida de cada microdeleció parcial de la regió AZFc, amb els STS que no han amplificat (-).

Tipus deleció	STS													
	142	1258	1161	1197	1161	1191	254	254	1291	1206	254	254	1206	1201
gr/ gr	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
b1/ b3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
b2/ b3	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Nova deleció	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+

ANÀLISI MOLECULAR DE LES MICRODELECCIONS PARCIALS DE LA REGIÓ AZFc

Les mostres analitzades en aquest estudi són un subgrup de l'estudi anterior en què es va avaluar si el pacient estava afectat d'una microdeleció completa d'una de les tres regions AZF (AZFa, b i c) del cromosoma Y. Si el resultat va donar una absència de microdeleció, la mostra s'ha inclòs en el present estudi. D'aquesta manera s'han estudiat 688 pacients i 35 controls. S'ha analitzat la presència de microdeleccions en la regió AZFc.

Per a analitzar la presència de microdeleccions parcials en la regió AZFc, s'han estudiat vuit marcadors STSs localitzats en aquesta regió del Yq: sY142, sY1258, sY1161, sY1197, sY1191, sY1291, sY1206 i sY1201. En una primera etapa s'han coamplificat els STS sY1191 i sY1291 mitjançant PCR. El cas que algun d'aquests marcadors hagi estat negatiu ens indica una possible microdeleció en la regió estudiada. Per tal de determinar la mida i el tipus d'aquesta microdeleció, la mostra s'analitza amb els sis marcadors STS addicionals: sY142, sY1258, sY1161, sY1197, sY1206 i sY1201. Així podem caracteritzar les microdeleccions parcials en funció de la combinació de marcadors que amplifiquen (taula 1).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

La taula 2 recull el resum dels resultats de les microdeleccions completes estudiades en les anàlisi de rutina. Dels 2.173 pacients estudiats, 24 pacients presentaven una microdeleció completa de la regió AZFc, 7 pacients presentaven una microdelció completa de la regió AZFb, 8 pacients no tenien ni la regió AZFb, ni la AZFc i només 1 pacient presentava una microdeleció completa de la regió AZFa.

En referència a les microdeleccions parcials de la regió AZFc, s'han estudiat 688 pacients. Queden pendent de tipar sis microdeleccions, però de moment s'han trobat 19 pacients amb la microdeleció gr/gr, 2

amb la b2/b3, cap amb la microdeleció b1/b3 i un amb una nova microdeleció (sY1191 i sY1291 delecionats). Totes aquestes microdeleccions s'han trobat en el grup de pacients i no s'ha trobat cap microdeleció en el grup control. En total, 28 homes dels 688 pacients amb un defecte espermatogènic (4,06 %) tenen microdeleccions en la regió AZFc.

La regió AZF presenta tres loci (AZFa, AZFb i AZFc) que contenen els principals gens responsables de la producció d'espermatozoides. L'origen de les microdeleccions d'aquestes regions està lligat directament a l'existència de seqüències repetides. En realitat, les microdeleccions responsables d'infertilitat (AZFa, AZFb, AZFc i AZFb+c) són la conseqüència de la recombinació entre blocs de seqüències repetides que flanquegen els intervals delecionats. Aquestes seqüències repetides poden ser de diversos tipus: elements retrovirals, seqüències llargues palindròmiques de repeticions en tàndem, o bé diversos gens en múltiples còpies. És el cas de les famílies de gens com DAZ, RBMY i TSPY, que presenten un nombre variable de còpies segons els individus i són susceptibles d'estar implicades en la fertilitat masculina (Chai *et al.*, 1998).

Les microdeleccions de la regió AZFc són les més freqüents (24 pacients de 2.173). Tenen lloc després d'una recombinació homòloga de dos elements repetits de 229 kb. Les microdeleccions d'aquesta regió representen un 60 % (24/40) de les microdeleccions diagnosticades.

Per contra, les microdeleccions de la regió AZFa, localitzades en la regió pericentromèrica del braç llarg del cromosoma Y, són molt més rares: només s'ha diagnosticat un pacient en aquests deu anys. Aquestes microdeleccions són la conseqüència d'una recombinació homòloga entre elements repetits de 10 kb de llarg. La diferència en la mida de la microdeleció (229 kb envers 10 kb) podria explicar per què les microdeleccions AZFa són molt més rares que les microdeleccions AZFc.

Les microdeleccions de la regió AZFb, que inicialment van considerar-se com una regió diferent de la regió AZFc, cobreixen 6,23 Mb i eliminen 1,5 Mb

Taula 2 Resum de les microdelecions completes de les regions AZFa, AZFb, AZFc, classificades per any.

	AZFa	AZFb	AZFc	AZFb+c	Sense delecions	TOTAL	%
1996	0	0	0	0	17	17	0
1997	0	0	7	1	173	181	4,6
1998	0	0	1	0	162	163	0,6
1999	0	1	2	1	197	201	2,1
2000	0	0	2	1	189	192	1,6
2001	0	2	3	0	334	339	1,5
2002	0	0	5	1	330	336	1,8
2003	0	4	0	1	259	264	1,9
2004	0	0	3	0	167	170	1,8
2005	0	0	2	2	142	146	2,8
2006	1	0	4	1	163	169	3,5
Total	1	7	24	8	2133	2173	

de la porció proximal d'AZFc. Les microdelecions completes d'AZFb estan lligades a recombinacions entre seqüències palindròmiques.

Les microdelecions AZFb+c són també la conseqüència de la recombinació entre palíndroms. Aquestes dues últimes microdelecions (AZFb i AZFb+c) representen, respectivament, el 17,5 % i el 20 % de les microdelecions diagnosticades en els nostres pacients.

La identificació de la microdeleció pot ajudar en la decisió de practicar una eventual biòpsia testicular en un pacient amb una azoospermia secretora per a obtenir espermatozoides testiculars utilitzables en ICSI. D'aquesta manera, el descobriment d'una microdeleció AZFa o AZFb fa que la realització d'una biòpsia testicular no sigui adequada, ja que la probabilitat de trobar espermatozoides és gairebé nulla. Per contra, en pacients amb la regió AZFc delecionada, la biòpsia té oportunitats de ser positiva.

En referència a les microdelecions parcials, la microdeleció gr/gr és la més abundant en els pacients que presenten un defecte espermatogènic (De Llanos *et al.*, 2004). Aquesta microdeleció elimina més de la meitat de la regió AZFc: concretament, elimina dues còpies de les quatre còpies existents del gen DAZ.

La microdeleció b2/b3 s'originaria a partir d'una inversió gr/rg i després tindria lloc una deleció entre els amplicons b2 i b3 (Repping *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2004). S'elimina una regió de 1,8 Mb i, per tant, la deleció és més gran que la deleció gr/gr. Aquesta microdeleció s'ha postulat que seria un polimorfisme sense efecte en la fertilitat.

La deleció 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 microdeleció

i l'efecte a l'espermatogènesi, tot i que alguns autors defensen que el seu paper seria irrellevant en aquest procés (Hucklenbroich *et al.*, 2005). No es pot, però, assegurar aquesta afirmació, ja que, com és tan poc freqüent, n'hi ha poc casos i resulta difícil establir una relació conclouent.

AGRAÏMENTS

Subvencionat amb projecte de recerca de la Generalitat de Catalunya (2001SGR00382), Ministeri de Ciència i Tecnologia (Plan Nacional de I+D, MC2003-03937) y Fondo de Investigaciones Sanitarias (V-2003-RED CO7A-0) a R. O.

BIBLIOGRAFIA

- CHAI, N. N.; ZHOU, H.; HERNANDEZ, J.; NAJMABADI, H.; BHASIN, S.; YEN, P. H. (1998). «Structure and organization of the RBMY genes on the human Y chromosome: transposition and amplification of an ancestral autosomal hnRNPG gene». *Genomics*, 49: 283-289.
- DE LLANOS, M.; BALLESCÀ, J. L.; GÁZQUEZ, C.; MARGARIT, E.; OLIVA, R. (2005). «High frequency of gr/gr chromosome Y deletions in consecutive oligospermic ICSI candidates». *Hum. Reprod.*, 20: 216-220.
- 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.

- HUCKLENBROICH, K.; GROMOLL, J.; HEINRICH, M.; HOHOFF, C.; NIESCHLAG, E.; SIMONI, M. (2005). «Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis». *Hum. Reprod.*, 20: 191-197.
- 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-VIJANDE, 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.; DAALLEN, S. K. VAN; KORVER, C. M.; BROWN, L.; MARSZALEK, J. D.; GIANOTTEN, J.; OATES, R. D.; SILBER, S.; VEEN, F. VAN DER; 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.
- SIMONI, M.; BAKKER, E. [et al.] (2004). «EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004». *International Journal of Andrology*, 27: 240-249.
- 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.