

# Cromosoma Y

50 million base pairs



- Short stature homeo box, Y-linked
- Short stature
- Leri-weill dyschondrosteosis
- Langer mesomelic dysplasia
- Interleukin-3 receptor, Y chromosomal
- Sex-determining region Y (testis-determining)
- Gonadal dysgenesis, XY type
- Protocadherin 11, Y-linked
- Azoospermia factors
- Male infertility due to spermatogenic failure
- Growth control, Y-chromosome influenced
- Chromodomain proteins
- Retinitis pigmentosa, Y-linked

## Microdeleciones de AZF

### Correlación

Infertilidad - Cáncer Testicular

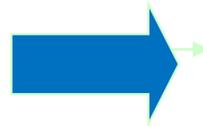
# Introducción

- Últimos 30-50 años:
  - ↓ 50% en la concentración y motilidad espermática
  - ↑ En la incidencia de los TGCT (tumores de células germinales de testículo)
  
- Principales causas de infertilidad masculina:
  - Desórdenes endócrinos
  - Desórdenes genéticos
  - Infecciones, agentes químicos, etc.
  
- En promedio, un 25% de los casos de infertilidad masculina poseen microdeleciones en una región específica del Yq

# Infertilidad masculina y deleciones del cromosoma Y

Estudios citogenéticos

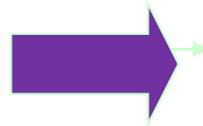
*Tiepolo, L. & Zuffardi, O. (1976)  
Hum. Genet. 34, 119*



Importancia del brazo largo del cromosoma Y (Yq) en la espermatogénesis

Estudios genéticos

*(varios, 1995-1997)*



Descubrimiento de familias de genes asociados al Yq necesarios para espermatogénesis normal. Ej: DAZ, DBY, etc.)



Descubrimiento de las regiones AZF

*Kent-First, M. et al. (1999)*

**AZF (Azoospermic factor)**

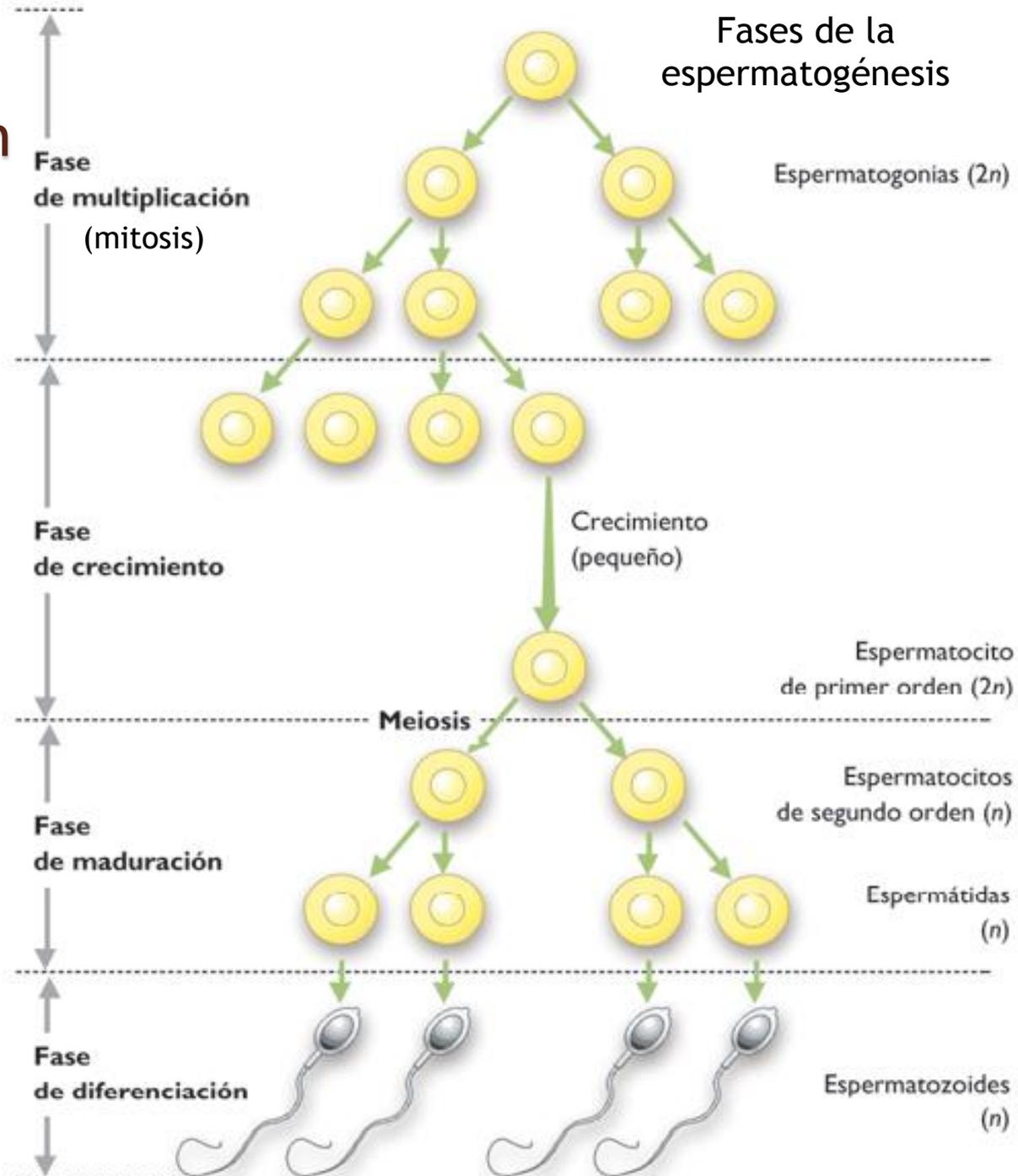
# Las regiones AZF están involucradas en la regulación de la espermatogénesis

Mutaciones en algunos *loci* de las regiones AZF conducen a defectos en la espermatogénesis



❖ Azoospermia: falla en la producción de células germinales maduras, reflejada por ejemplo en ausencia de motilidad espermática en el eyaculado

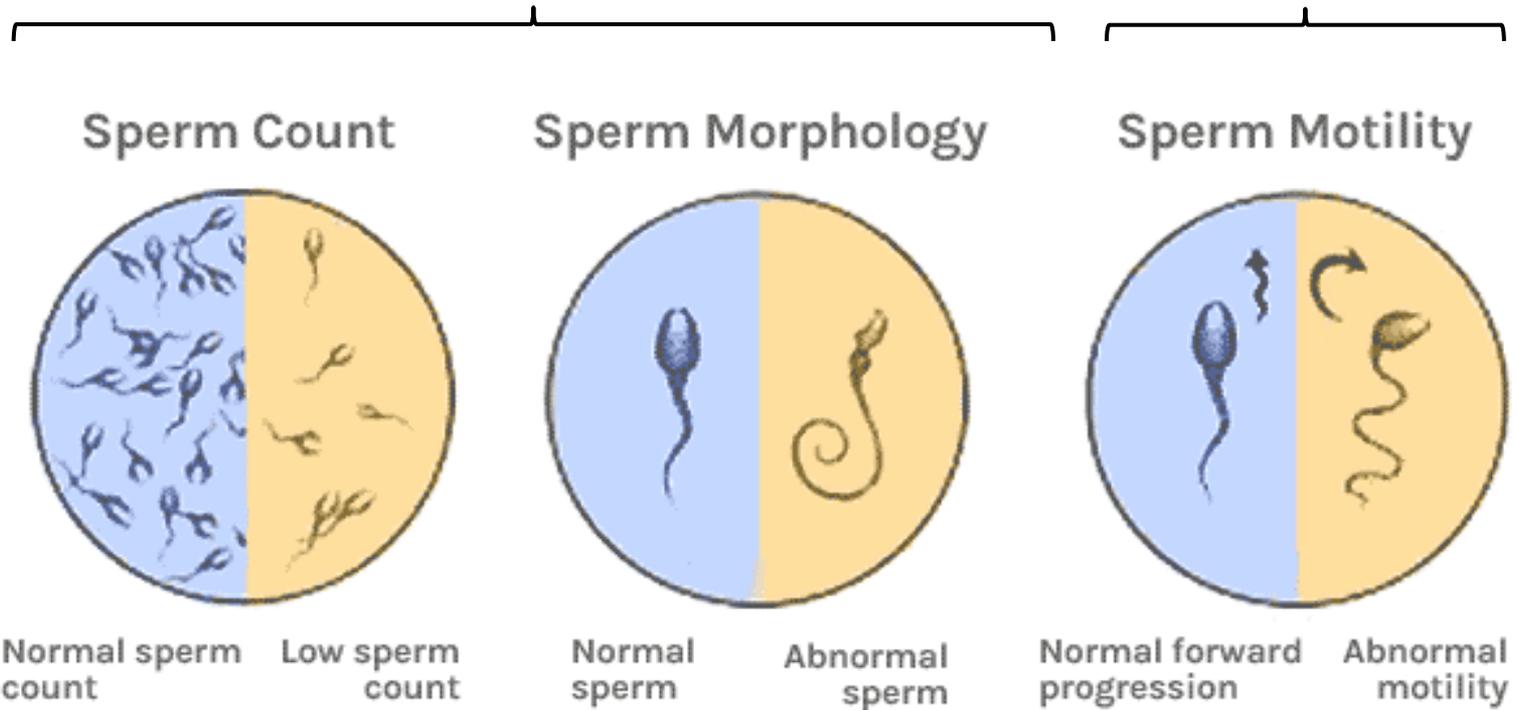
❖ Oligozoospermia: bajo número de espermatozoides, o morfología anormal



# Azoospermia y oligozoospermia

## Oligozoospermia

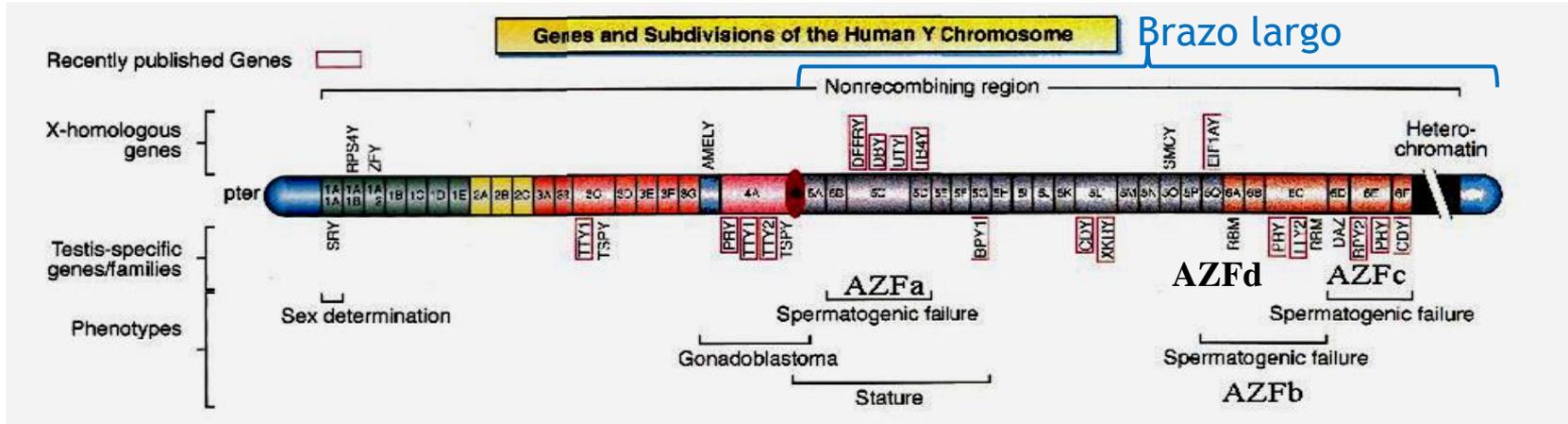
## Azoospermia



Conteo normal:  $>20 \times 10^6/\text{ml}$

# Regiones AZF

Se ubican en Yq11 del cromosoma Y humano y coinciden con zonas funcionales asociadas con la espermatogénesis.



1996, Vogt → Existencia de 3 regiones dentro de AZF

- AZFa (proximal)
- AZFb (central)
- AZFc (distal)

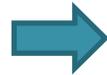
Correlación entre microdeleciones en cada región e histología testicular:

- Expresión genes AZFa → proliferación de células germinales
- AZFb → progresión meiótica
- AZFc → activos durante la meiosis tardía o en las espermátidas

1999, Kent-First → Existencia de una 4° región AZFd (AZFc proximal)

# Microdeleciones AZF e infertilidad masculina

Deleciones en AZFa



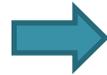
Falta de espermatogénesis - o espermatogénesis parcial - asociada con oligozoospermia severa.

Deleciones en AZFb y c



Azoospermia y oligozoospermia.

Deleciones en AZFd



Rango de conteo de esperma entre normal y azoospermia, con morfología anormal.

# Microdeleciones AZF y cáncer testicular

## Incidencia de cáncer testicular

- ❖ Cáncer de testículo, 1% de los tumores en hombres.
- ❖ Forma más común de cáncer en varones jóvenes (15-40 años).
- ❖ La frecuencia de aparición exhibe una curva de 3 puntos con picos en la niñez, adultos jóvenes y ancianos.
- ❖ 6-8 hombres cada 100.000 por año.
- ❖ Las poblaciones de origen africano poseen una menor incidencia que las de otros orígenes.
- ❖ La incidencia más alta se observa entre los hombres del norte de Europa.

# TGCT (tumores de células germinales de testículo)

## Factores de riesgo

Criptorquidia

Hernia inguinal congénita

Bajo peso al nacer

Estrógenos

Malformación de los órganos sexuales

SK↑ Riesgo a desarrollar tumores primarios de células germinales de testículo.

## Predisposición Genética

Familias c/antecedentes 2%

Hermanos 1/60

Mellizos 1/40

Gemelos 1/10

Hombres c/cáncer en un testículo 1/20

# Microdeleciones AZF y cáncer testicular

- ❖ Originalmente se había propuesto una asociación entre deleciones AZF y la incidencia de tumores testiculares.
- ❖ Sin embargo, varios trabajos reportaron ausencia de deleciones AZF en pacientes con cáncer testicular (*Frydelund-Larsen et al., 2003; Lutke Holzik et al., 2005; Bor et al., 2006, etc.*).
- ❖ Se debe tener en cuenta las diferencias geográficas y poblacionales, ya que la secuencia del cromosoma Y varía entre distintas poblaciones (*Y haplogrups*)
- ❖ Por ejemplo, se encontró asociación entre ciertos haplogrupos y deleciones AZFc en una población del norte de Italia (*Arredi et al., 2007*) pero no en otras poblaciones (*Ferlin et al., 2007*). En Finlandia, un % significativo de pacientes con cáncer testicular posee deleciones AZF (*Richard et al., 2004*).



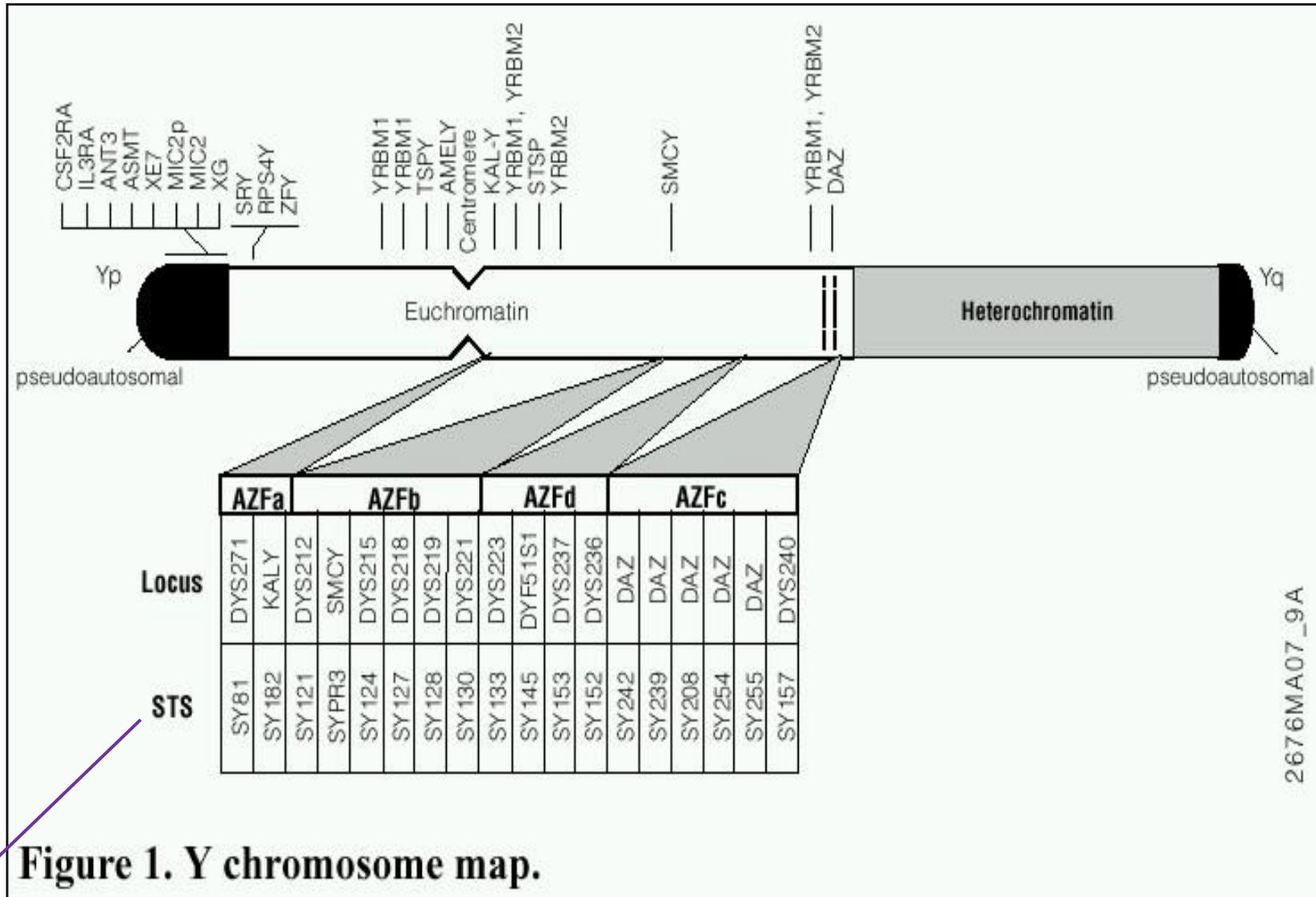
No hay una correlación tan directa como en el caso de infertilidad  
(depende de la población)

# Diagnóstico de las deleciones: multiplex PCR

## Para qué puede servir?

- ❖ Principalmente para el estudio de infertilidad masculina.
- ❖ Conocer el mecanismo que produce infertilidad es importante para evaluar el tratamiento a seguir por el paciente. *Ej: tratamientos hormonales vs. otros tratamientos como ICSI.*
- ❖ Para el diagnóstico preventivo de familiares del paciente.
- ❖ Profundización en la investigación del mecanismo de regulación genética de la espermatogénesis (*genes específicos, factores epidemiológicos, etc.*)

# Regiones AZF: amplificación por PCR



2676MA07\_9A

Figure 1. Y chromosome map.

**STS = Sequence tagged sites:** secuencias cortas de ADN (200 a 500 pb) de localización única en el genoma y cuya secuencia y posición son conocidas.

# Sistema de detección

Microdeleciones: loci de AZF → 4 subintervalos a-d

Estrategia experimental:

ADN → PCR Multiplex → Geles agarosa *low melting*

Ausencia de alguna banda

Obtención de todas las bandas  
individuo no delecionado

PCR Duplex

C+ Locus amplificado

Locus ausente

Ausencia de la banda

Obtención de ambas bandas  
individuo no delecionado

Reamplificación con  
PCR como molde

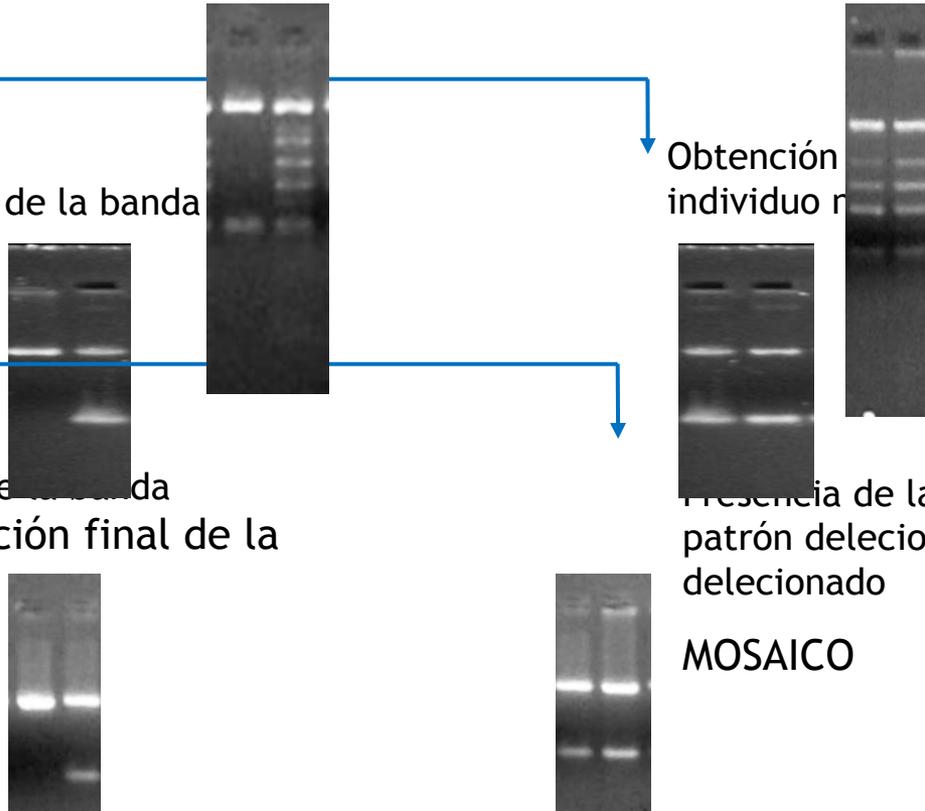
C+ Locus amplificado  
Locus ausente

Ausencia de la banda

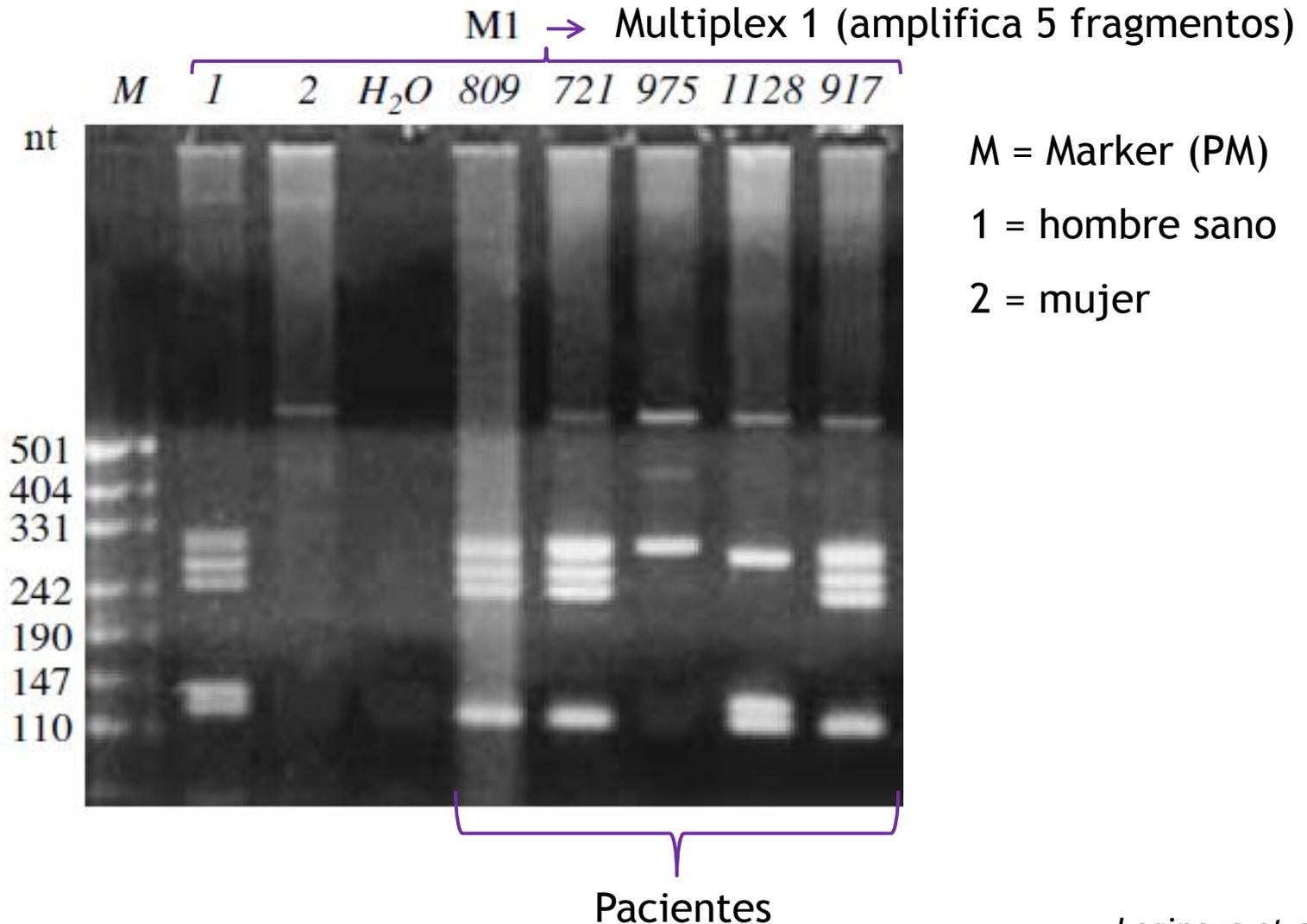
Confirmación final de la  
deleción

Presencia de la banda cambio de  
patrón delecionado a no  
delecionado

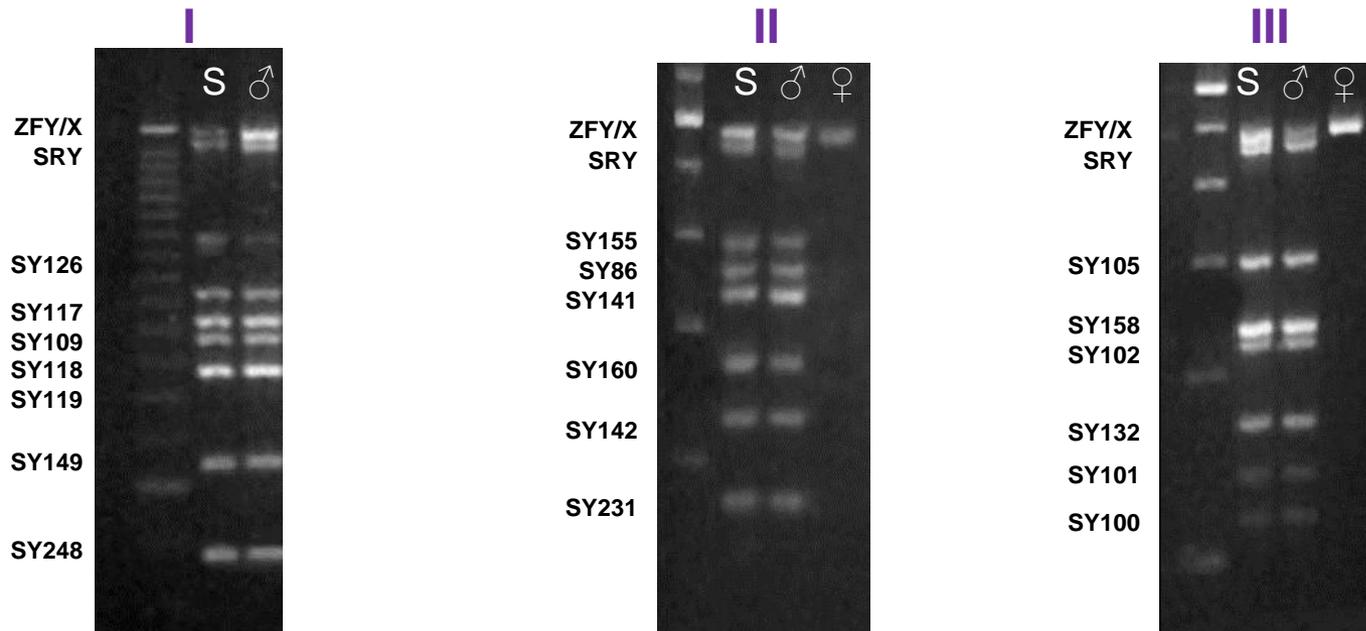
MOSAICO



# Ejemplo de multiplex PCR para detectar deleciones en el cromosoma Y



En general se usan varias multiplex PCRs para cubrir toda la región AZF



¿Qué hay que tener en cuenta al diseñar los primers para una multiplex PCR?

Multiplex	Locus	STS	Tamaño (pb)	Condiciones PCR		% Geles - Tinción	Ciclado	
				[ primers ]				
<b>I</b>	1	ZFY		495	1.2/100 µl	Buffer 1X Taq : 4/100 µl DNA : 48 ng	Agarosa Nusieve 2.8% Tinción luego de la corrida: Br. de Etidio 1.5 / 100 TBE 1X  3 ½ Hs	95° C 5' 95° C 1' 60° C 1' x 35 68° C 1' 68° C 5'
	2	SRY		472	1.2/100 µl			
	3	DYS 217	SY 126	323	4/100 µl			
	4	DYS 209	SY 117	262	2/100 µl			
	5	DYF 43 S1	SY 109	233	2/100 µl			
	6	DYS 210	SY 118	218	2/100 µl			
	7	DYS 211	SY 119	191	2/100 µl			
	8	DYS 1	SY 149	133	2/100 µl			
	9	DAZ	SY 248	94	4/100 µl			
<b>II</b>	1	ZFY		495	1.2/100 µl	Buffer 1X Taq : 4/100 µl DNA : 48 ng	Agarosa Nusieve 2.8% Tinción luego de la corrida: Br. de Etidio 1.5 / 100 TBE 1X  3 ½ Hs	95° C 5' 95° C 1' 60° C 1' x 35 68° C 1' 68° C 5'
	2	SRY		472	1.2/100 µl			
	3	DYF 53 S1	SY 155	349	4/100 µl			
	4	DYS 148	SY 86	320	2/100 µl			
	5	DYS 229	SY 141	290	2/100 µl			
	6	DYZ 1	SY 160	236	2/100 µl			
	7	DYS 230	SY 142	196	2/100 µl			
	8	DAZ	SY 231	149	2/100 µl			
<b>III</b>	1	ZFY		495	1.2/100 µl	Buffer 1X Taq : 4/100 µl DNA : 48 ng	Agarosa Nusieve 2.8% Tinción luego de la corrida: Br. de Etidio 1.5 / 100 TBE 1X  3 ½ Hs	95° C 5' 95° C 1' 60° C 1' x 35 68° C 1' 68° C 5'
	2	SRY		472	1.2/100 µl			
	3	DYS 201	SY 105	301	2/100 µl			
	4	DYS 241	SY 158	231	2/100 µl			
	5	DYS 198	SY 102	218	2/100 µl			
	6	DYS 7	SY 132	159	2/100 µl			
	7	DYS 197	SY 101	131	2/100 µl			
	8	DYS 196	SY 100	111	2/100 µl			

# Ejemplo de un *screening* exhaustivo

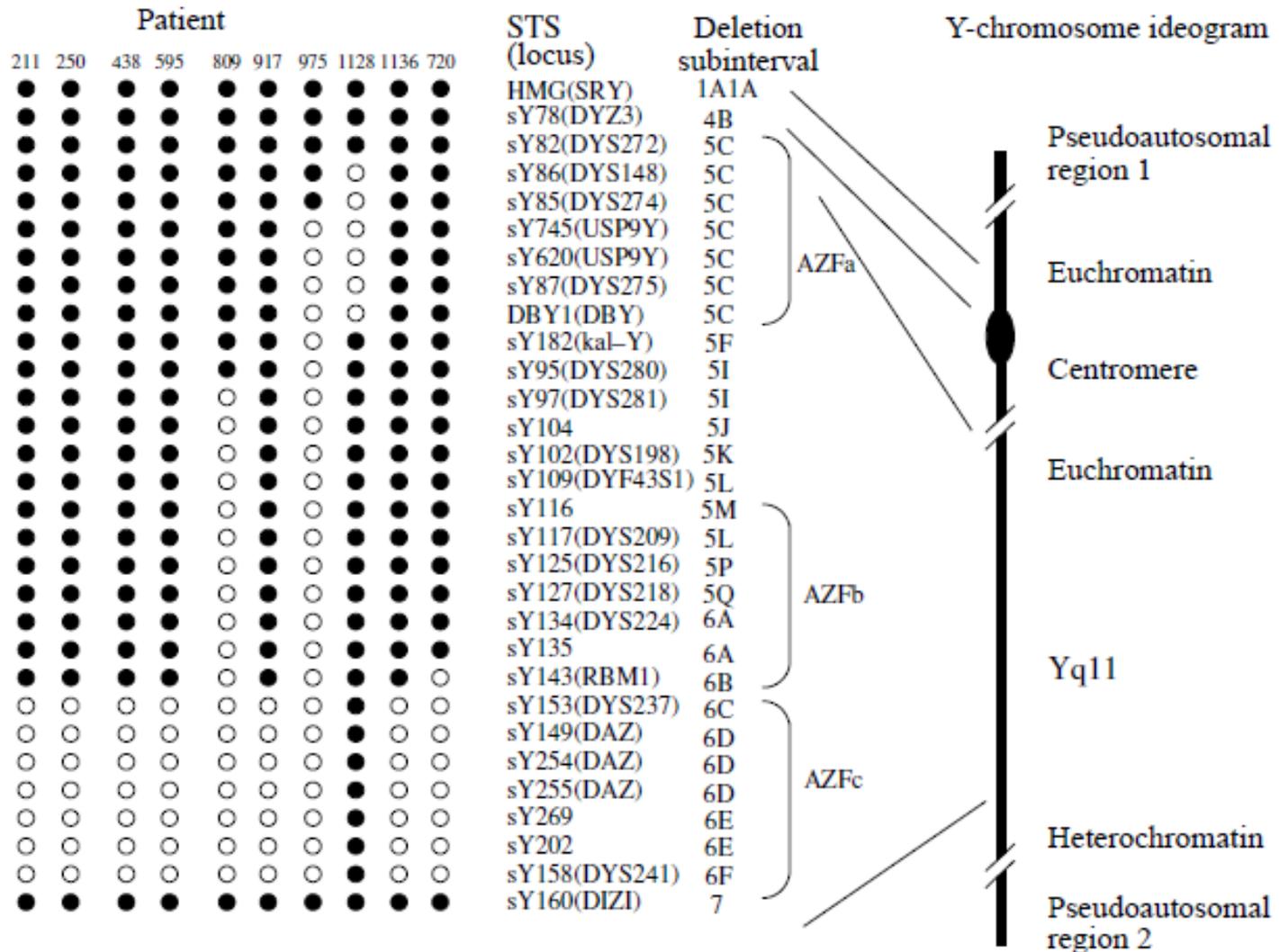


Fig. 3. Characterization of microdeletions by the presence (●) or absence (○) of markers.

# Resumen

- ❖ Importancia de la regulación genética en el proceso de espermatogénesis.
- ❖ Correlación entre deleciones AZF e infertilidad masculina.
- ❖ Diagnóstico de deleciones AZF mediante multiplex PCR
  - ❖ Requisitos para la selección de *primers*
  - ❖ Procedimiento y visualización de los resultados
  - ❖ Controles experimentales

