



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica



Tesis de Doctorado

“Caracterización de polimorfismos genéticos en la región AZF del cromosoma Y potencialmente asociados a infertilidad en distintos grupos étnicos de la población argentina actual”

Bioq. Evguenia Alechine

Director

Dr. Daniel Corach

Lugar de realización

Servicio de Huellas Digitales Genéticas
Facultad de Farmacia y Bioquímica – U.B.A.

Año 2014

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Por la presente declaro que, según mi conocimiento, el presente trabajo es original y que no contiene material previamente publicado por mí o por otra persona, ni ha sido enviado para su evaluación en ninguna otra institución, con excepción de lo explícitamente aclarado en el texto.

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo de tesis, para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, se realizó íntegramente en el Servicio de Huellas Digitales Genéticas de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, bajo la dirección del Prof. Dr. Daniel Corach. El presente proyecto de Tesis fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (Res. N° 1640/12).

AGRADECIMIENTOS

A mi director... **Daniel Corach**, por haber creído siempre en mí, haberme formado como profesional y ayudarme día a día a ser mejor persona.

A mis compañeros del SHDG... **Andre, Marie, Ceci, Belu, Nati y Javier**, por haberme apoyado y enseñando tanto durante todos estos años.

A la **Facultad de Farmacia y Bioquímica**... por haber sido mi lugar de trabajo durante todos estos años.

A la **Universidad de Buenos Aires** y al **CONICET**... por haber posibilitado la realización de la presente Tesis Doctoral.

Al **Dr. Werner Schempp**, de la Universidad de Freiburg... por haber aportado en la generación de la idea del presente trabajo.

A los **donantes** anónimos de las muestras... por prestar su conformidad y posibilitar la realización de este trabajo.

A la **Dra. Gabriela Mendeluk** y su grupo de trabajo... por aportar las muestras, realizar el análisis citológico del semen y asesorarme en el análisis de los resultados obtenidos en pacientes infértiles.

Al **Dr. Mariano Cohen**, la **Dra. Florencia Fulco** y su grupo de trabajo... por aportar las muestras, historias clínicas y asesorarme en el análisis de los resultados obtenidos en pacientes azoospermicos y oligozoospermicos severos.

A la **Dra. Julieta Trinks**... por aportar las muestras provenientes del banco de hemoterapia de la Maternidad Sarda.

A **mis amigos**... que siempre estuvieron a mi lado durante todo este proceso.

A mi hermano... **Peter**, por su incondicional apoyo en todos mis emprendimientos.

A mis padres... **Natasha** y **Alexander**, por haberme dado no solo los genes sino también la fuerza necesaria para alcanzar mi metas, por haberme apoyado siempre y por haber creído en mí.

A mi compañero de vida... **Timo**, por estar siempre a mi lado y apoyarme en todos mis proyectos. Sin vos no podría haberlo logrado ni haber llegado a ser quien soy hoy.

GRACIAS!

*A mi familia... mis padres, Alexander y Natasha,
y mi hermano Peter, por su incondicional apoyo.*

*Бабуль, посвящаю эту диссертацию тебе...
за то что ты всегда верила во мне.*

“Honra tu camino. Fue tu elección, fue decisión tuya, y en la misma medida en que tú respetas el suelo que pisas, este mismo suelo respetará tus pies. Haz siempre lo más adecuado para conservar y mantener tu camino, y él hará lo mismo por ti.”

Paulo Coelho

RESUMEN

El presente trabajo de tesis describe la posible asociación entre infertilidad masculina y microdeleciones de la región AZF del cromosoma Y en la población argentina. Pacientes con azoospermia no obstructiva u oligozoospermia severa son candidatos a biopsia testicular o TESE, con el objetivo de recuperar espermatozoides para Tratamientos de Reproducción Asistida. El estudio de microdeleciones en la región AZF se solicita de rutina a estos pacientes, con el objetivo de predecir la recuperación de espermatozoides y asesorar con respecto a la posible transmisión de estas deleciones a la descendencia masculina. Según las recomendaciones internacionales, la detección de deleciones completas de las regiones AZFa y AZFb se correlaciona con ausencia de espermatozoides. Por el contrario, el 50% de los hombres con deleción completa de la región AZFc presentan espermatozoides a nivel testicular. Además, se sugiere el análisis adicional de la deleción parcial gr/gr, dado que se considera factor de riesgo para falla espermatogénica. Cabe destacar que los lineamientos internacionales se basan en estudios llevados a cabo en población europea. Dada la variabilidad en la composición étnica de las poblaciones mundiales, numerosos estudios se llevaron a cabo demostrando variación con respecto a la prevalencia y efecto de estas microdeleciones sobre la falla espermatogénica. Debido a que no se cuenta con datos sobre la población argentina, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la prevalencia y efecto de las microdeleciones de la región AZF del cromosoma Y en hombres fértiles e infértiles de nuestra población.

Para ello, se propuso analizar 240 hombres fértiles pertenecientes al Hg nativo americano Q, 170 pacientes infértiles con causa idiopática y 90 pacientes azoospermicos u oligozoospermicos severos. Se estudiaron microdeleciones completas y parciales de la región AZF, así como también el origen étnico a través del estudio del haplogrupo de cromosoma Y. En aquellos pacientes que presentaron microdeleciones, se analizaron marcadores complementarios para determinar la extensión de las mismas. Los resultados moleculares obtenidos se correlacionaron con el recuento espermático y la recuperación de espermatozoides mediante biopsia testicular. La evaluación estadística se realizó mediante el Test de Fisher ($p < 0,05$).

En primer lugar, se detectaron microdeleciones en los tres grupos analizados. En hombres fértiles del Hg Q, se detectaron únicamente microdeleciones parciales de la

región AZFc (gr/gr, b2/b3, b1/b2 y P1.1/P1.2); en pacientes infértiles se encontraron en su mayoría deleciones parciales (gr/gr, b2/b3, b1/b3 y AZFc); y en pacientes azoospermicos se detectaron en su mayoría deleciones completas (AZFb, AZFc, AZFbc, AZFabc y gr/gr). La diferencia entre la prevalencia de microdeleciones en hombres fértiles y pacientes infértiles con causa idiopática no fue estadísticamente significativa (3,3% vs 4,1%; $p=0,791$). En cambio, se observó una alta prevalencia de microdeleciones en pacientes azoospermicos u oligozoospermicos severos de la población argentina (11,1%). No se observó una diferencia significativa en la prevalencia de la deleción gr/gr (1,6% en fértiles, 1,7% en infértiles y 2,6% en azoospermicos; $p=0,600$), indicando que no existe asociación entre la deleción gr/gr y falla espermatogénica en la población analizada. Únicamente las microdeleciones completas se asociaron con azoospermia u oligozoospermia severa. A partir de los resultados de recuperación espermática, se observó falta de correlación entre las deleciones halladas (AZFb, AZFc y gr/gr) y falla espermatogénica. Llamativamente, se detectó la deleción AZFb en un paciente oligozoospermico. Las microdeleciones con relevancia clínica se detectaron únicamente en pacientes con recuento menor a $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Únicamente las deleciones de las regiones AZFabc y AZFbc se correlacionaron inequívocamente con ausencia de espermatozoides a nivel testicular.

En segundo lugar, la diferencia en la composición étnica entre los grupos estudiados no fue estadísticamente significativa, indicando que el origen étnico por sí solo no determina una predisposición a falla espermatogénica o infertilidad masculina. Aquellas microdeleciones que resultaron ser polimórficas en la población estudiada han demostrado una asociación con haplogrupos específicos (v.g. G2a, E1b1b y J2), mientras que microdeleciones asociadas a una alteración de la espermatogénesis no se asociaron a ningún haplogrupo. Esto podría implicar que mientras algunos haplogrupos predisponen a deleciones en el cromosoma Y, también presentarían factores compensatorios evitando un efecto deletéreo sobre la espermatogénesis. Por el contrario, aquellas microdeleciones que afectan la fertilidad no serían producto de recombinación específica en un determinado haplogrupo, estando probablemente asociadas a eventos esporádicos o a factores ambientales. La mayoría de los pacientes azoospermicos sin recuperación espermática no evidenciaron deleciones empleando los marcadores recomendados actualmente, indicando que existirían otros factores que afectan la espermatogénesis en estos casos. Característicamente, se observó un aumento

de prevalencia del Hg Q en pacientes con arresto espermatogénico y azoospermia, sugiriendo que en este Hg existirían factores asociados al cromosoma Y que aún no han sido estudiados.

De los resultados obtenidos en hombres fértiles e infértiles de la población argentina, se concluye que no es posible predecir la recuperación espermática a través del análisis de microdeleciones en la región AZF utilizando únicamente los marcadores recomendados actualmente. Es por esto que, con el fin de aportar a la identificación de otros marcadores en la región AZF que permitan predecir la recuperación de espermatozoides, desarrollamos una herramienta de biología molecular por PCR multiplex en Tiempo Real seguida de Desnaturalización Térmica de Alta Resolución para la detección de genes candidatos de la espermatogénesis. De esta manera, la identificación de nuevos marcadores en el cromosoma Y permitirán asistir a los andrólogos en la toma de decisiones más apropiadas en cuanto al tratamiento y asesoramiento genético de la pareja infértil. La implicancia del origen étnico requerirá estudios posteriores que identifiquen alteraciones potenciales en el cromosoma Y de pacientes azoospermicos del Hg nativo americano Q.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

AZF: región del factor de azoospermia/azoospermia factor region

CNVs: variaciones del número de copias/copy number variations

dNTPs: desoxirribonucleótidos

EAA: Academia Europea de Andrología/European Academy of Andrology

EMQN: Red Europea de Calidad en Genética Molecular/European Molecular Genetics Quality Network

ESCA: Esterilidad Sin Causa Aparente

FIV: fecundación in vitro

Hg: haplogrupo

HRM: desnaturalización térmica de alta resolución/high resolution melting

ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides

ISOGG: Sociedad Internacional de Genealogía Genética/International Society of Genetic Genealogy

MSY: región masculino específica del cromosoma Y/male specific region of the Y

NAHR: recombinación homóloga no alélica/non-allelic homologous recombination

NHJR: unión de extremos no homólogos/non-homologous end joining

NRY: región no recombinante del cromosoma Y/non-recombining region of the Y

PCR: reacción en cadena de la polimerasa/polymerase chain reaction

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa/quantitative polymerase chain reaction

RM-STRs: STRs con alta tasa de mutación/rapid mutating STRs

SCOS: Síndrome de Solo Células Sertoli/Sertoli cell-only Syndrome

SFVs: variantes familiares de secuencia/sequence family variants

SNPs: polimorfismos de nucleótido único/single nucleotide polymorphisms

SRY: región determinante del sexo en el cromosoma Y/sex determining region of the Y

STRs: repeticiones cortas en tandem o microsatélites/short tandem repeats

STSs: sitios marcadores de secuencia/sequence tagged sites

TESE: extracción espermática de testículo/testicular sperm extraction

Tm: temperatura de desnaturalización/melting temperature

Yp: brazo corto del cromosoma Y

Yq: brazo largo del cromosoma Y

Y-STRs: repeticiones cortas en tandem del cromosoma Y/Y chromosome short tandem repeats

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.1. CROMOSOMA Y.....	1
1.1.1. Los cromosomas.....	1
1.1.2. El origen de los cromosomas sexuales.....	3
1.1.3. Características del cromosoma Y.....	4
1.1.4. Estructura.....	4
1.1.5. Las secuencias palindrómicas.....	6
1.1.6. La naturaleza dinámica.....	6
1.1.7. Funciones.....	7
1.1.8. La región AZF.....	9
1.1.9. Haplogrupos.....	13
1.2. POBLACIÓN ARGENTINA.....	18
1.2.1. Historia.....	18
1.2.2. Composición genética.....	18
1.2.3. Haplogrupo nativo americano Q1a2a1a1.....	21
1.3. ESPERMATOGÉNESIS E INFERTILIDAD MASCULINA.....	24
1.3.1. Espematogénesis.....	24
1.3.2. Infertilidad masculina.....	25
1.3.3. Causas de infertilidad masculina.....	27
1.3.4. Microdeleciones clásicas del cromosoma Y.....	29
1.3.5. Microdeleciones parciales de la región AZFc.....	32
1.3.6. Recomendaciones internacionales para el estudio de microdeleciones.....	36
1.3.7. Meta-análisis de otras poblaciones.....	36
1.3.8. AZF en Argentina y la medicina traslacional.....	40
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	49
2.1. MUESTRAS ANALIZADAS.....	49
2.1.1. Características de las muestras analizadas.....	50
2.2. MÉTODOS.....	55
2.2.1. Extracción de ADN.....	56
2.2.2. Cuantificación de ADN.....	56
2.2.3. Análisis de marcadores autosómicos para estudios de paternidad.....	57
2.2.4. Determinación del Hg de cromosoma Y.....	57
2.2.5. Análisis de microdeleciones clásicas en la región AZF.....	62
2.2.6. Análisis de microdeleciones parciales en la región AZFc.....	63
2.2.7. Identificación de la presencia de los genes de la región AZFc.....	64
2.2.8. Cuantificación del número de copias de los genes DAZ, CDY y CDY1.....	65
2.2.9. Identificación de variantes de DAZ y CDY.....	65
2.2.10. Análisis de variantes alélicas de DYS464.....	67
2.2.11. Análisis de STRs de alta tasa de mutación (RM-STRs).....	68
2.2.12. Confirmación de las microdeleciones clásicas.....	68
2.2.13. Herramientas bioinformáticas.....	68
2.2.14. Análisis estadístico.....	68
RESULTADOS	71

3. CARACTERIZACIÓN DE HOMBRES FÉRTILES PERTENECIENTES AL HAPLOGRUPO NATIVO AMERICANO Q1A2A1A1.....	71
3.1. CARACTERÍSTICAS POLIMÓRFICAS DEL HG Q1A2A1A1.....	71
3.1.1. <i>Polimorfismo de longitud del marcador sY1291 característico del Hg Q1a.....</i>	71
3.2. CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA MUESTRAS DEL HG Q3 CARACTERIZADAS EN PUBLICACIONES PREVIAS.....	73
3.3. COMPARACIÓN DEL HG NATIVO AMERICANO Q1A2A1A1 CON EL HG ASIÁTICO Q1.....	75
3.4. LA PREVALENCIA DE MICRODELECCIONES COMO CARACTERÍSTICA POLIMÓRFICA DE LOS HOMBRES FÉRTILES PERTENECIENTES AL HG Q1A2A1A1.....	76
3.4.1. <i>Deleciones completas de AZFa, AZFb o AZFc.....</i>	76
3.4.2. <i>Deleciones parciales de AZFc.....</i>	77
3.4.3. <i>Mecanismos de deleción postulados para las deleciones parciales.....</i>	79
3.4.4. <i>Duplicaciones posteriores a las deleciones parciales en el Hg Q.....</i>	83
3.5. CONCLUSIONES.....	84
4. PREVALENCIA Y EFECTO DE MICRODELECCIONES EN PACIENTES INFÉRTILES DE LA POBLACIÓN ARGENTINA.....	87
4.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.....	87
4.1.1. <i>Recuento espermático.....</i>	87
4.1.2. <i>Movilidad espermática.....</i>	88
4.1.3. <i>Morfología espermática.....</i>	88
4.1.4. <i>Evaluación cuali/cuantitativa del semen.....</i>	89
4.2. ANÁLISIS MOLECULAR.....	90
4.2.1. <i>Prevalencia de Hgs.....</i>	90
4.2.2. <i>Prevalencia de microdeleciones.....</i>	91
4.2.3. <i>Duplicación de los genes CDY1 y CDY2 luego de la deleción.....</i>	95
4.2.4. <i>Asociación entre microdeleciones y Hgs.....</i>	96
4.2.5. <i>Asociación entre las deleciones y la calidad espermática en diferentes Hgs.....</i>	97
4.2.6. <i>Distribución de Hgs en pacientes azoospermicos sin deleciones.....</i>	98
4.3. CONCLUSIONES.....	99
5. PREVALENCIA Y EFECTO DE MICRODELECCIONES EN PACIENTES AZOOSPÉRMICOS Y OLIGOZOOSPÉRMICOS SEVEROS DE LA POBLACIÓN ARGENTINA.....	101
5.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.....	101
5.1.1. <i>Recuento espermático.....</i>	101
5.1.2. <i>Biopsias testiculares.....</i>	102
5.2. ANÁLISIS MOLECULAR.....	102
5.2.1. <i>Distribución de Hgs.....</i>	102
5.2.2. <i>Caracterización de microdeleciones.....</i>	104
5.2.3. <i>Asociación entre microdeleciones y Hgs.....</i>	112
5.2.4. <i>Asociación entre microdeleciones y recuento espermático en diferentes Hgs.....</i>	112
5.2.5. <i>Asociación entre microdeleciones y falla espermatogénica.....</i>	114
5.2.6. <i>Distribución de Hgs en pacientes azoospermicos sin deleciones.....</i>	115
5.2.7. <i>Distribución de Hgs en pacientes sin deleciones, con y sin falla espermatogénica.....</i>	116
5.3. CONCLUSIONES.....	117
6. DESARROLLO DE UN SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN DE GENES POTENCIALMENTE ASOCIADOS A INFERTILIDAD MASCULINA.....	119

6.1. DESARROLLO TEÓRICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	120
6.1.1. Selección de los genes a analizar.....	120
6.1.2. Diseño de primers.....	121
6.1.3. Muestras de ADN empleadas para la puesta a punto del método.....	121
6.2. PUESTA A PUNTO Y ESPECIFICIDAD.....	122
6.3. VALIDACIÓN ANALÍTICA DEL MÉTODO.....	123
6.3.1. Exactitud.....	123
6.3.2. Sensibilidad.....	125
6.3.3. Comparación del empleo de tres colorantes intercalares diferentes.....	126
6.3.4. Portabilidad.....	127
6.4. VALIDACIÓN CLÍNICA DEL MÉTODO.....	128
6.5. UTILIDAD DEL MÉTODO.....	129
6.6. CONCLUSIONES.....	132
DISCUSIÓN.....	137
CONCLUSIONES.....	151
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	152
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155
ANEXOS.....	169
ANEXO I: PROTOCOLOS.....	169
ANEXO II: PUBLICACIONES.....	181

Introducción



“Pienso, luego existo”

René Descartes

INTRODUCCIÓN

El cromosoma Y se transmite por línea paterna de generación en generación, prácticamente sin modificaciones, acumulando mutaciones que se fijan en las poblaciones pudiendo agruparse según etnias. La composición étnica de la población masculina argentina está determinada mayoritariamente por la información genética aportada por los inmigrantes europeos. Sin embargo, presenta un componente claramente distintivo: el aportado por el haplogrupo (Hg) nativo americano Q1a2a1a1. Las microdeleciones en la región AZF del cromosoma Y son una de las principales causas genéticas de infertilidad masculina. Si bien en nuestro país, el análisis de dichas microdeleciones se realiza prácticamente de rutina en pacientes azoospermicos u oligozoospermicos severos, la interpretación de este análisis se basa en la extrapolación de resultados obtenidos en población europea. Hasta el momento no se han estudiado las características que presentan estas microdeleciones en la población argentina ni aquellas aportadas por el Hg nativo americano Q1a2a1a1.

Con el objetivo de abordar esta temática en profundidad, resulta necesaria la introducción de conceptos tan diversos como: el cromosoma Y y su estructura, la infertilidad masculina, y el poblamiento de América y Argentina. El desarrollo de cada uno de estos conceptos permite comprender su interrelación e importancia. A continuación se presentan estos temas, comenzando por la descripción del origen y la estructura del cromosoma Y.

1.1. Cromosoma Y

1.1.1. Los cromosomas

El cariotipo humano, en condiciones normales, consiste en 23 pares de cromosomas, de los cuales 22 son pares homólogos denominados cromosomas autosómicos, y el restante es el par sexual conformado por los cromosomas X e Y (Figura 1.1.1). La composición del par sexual define, en situaciones fisiológicas, el sexo del individuo, siendo femenino al

haber heredado el par XX, y masculino si se heredó el par XY¹. A diferencia del par XX, el par sexual XY es heterogéneo ya que el cromosoma X es un cromosoma submetacéntrico mediano y el Y es acrocéntrico pequeño.

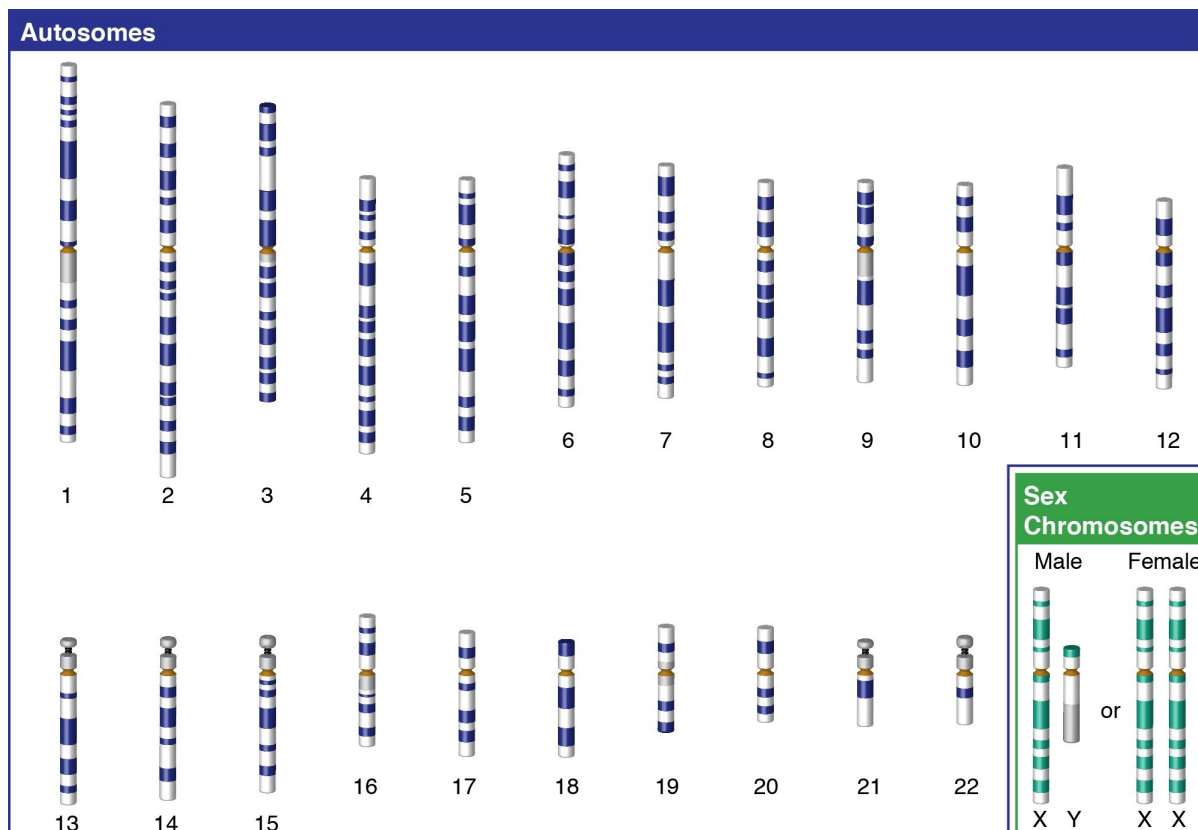


Figura 1.1.1. Esquema del cariotipo humano (Darryl Leja, NHGRI)

Los cromosomas autosómicos se heredan en forma biparental y sufren recombinación tanto en la meiosis materna como en la paterna, generando así diversidad genética en sus gametas. En las mujeres, el cromosoma X se comporta de manera similar a los cromosomas autosómicos, ya que sufre recombinación y cada una de las gametas formadas llevará entonces un cromosoma X recombinado. Por el contrario, en el hombre no se produce recombinación entre sus cromosomas sexuales heterólogos, salvo dos pequeñas regiones pseudoautosómicas ubicadas en ambos telómeros denominadas PAR1 y PAR2. La función de estas regiones pseudoautosómicas es la de permitir que los cromosomas X e Y se apareen y segreguen correctamente durante la meiosis paterna (Ciccodicola *et al* 2000).

¹ La disgenesia gonadal XY se caracteriza por una falta de correlación entre el fenotipo sexual manifestado (femenino) y

1.1.2. El origen de los cromosomas sexuales

Se considera que los cromosomas sexuales de los mamíferos en general, y del hombre en particular, evolucionaron de autosomas. Diecinueve genes autosómicos ancestrales persisten en los cromosomas humanos X e Y como homólogos diferenciados. A partir del estudio de la divergencia entre cada par de genes, se definió que dicho proceso evolutivo se llevó a cabo en 4 etapas, cada una suprimiendo la recombinación de un determinado “estrato” sin alterar el orden original de los genes en el cromosoma X. El primer evento que marcó el comienzo de la diferenciación ocurrió hace aproximadamente 240-320 millones de años, poco después de la divergencia entre mamíferos y aves (Lahn y Page 1999).

El cromosoma X actual es 3 veces mayor en tamaño, y contiene 10 veces más genes, que el Y. Dado que la mayoría de los genes del X no exhiben su contraparte en el Y, actúan como dominantes. Esto significa que aún los genes que sean recesivos en las mujeres, se expresarán obligatoriamente en el hombre. Estos se denominan genes ligados al X, y aquellos que se encuentran únicamente en el cromosoma Y se denominan ligados al Y. Contrario a lo que se tendería a pensar, la mayoría de los genes del X no codifican características femeninas. En cambio cumplen funciones vitales y, mediante eventos de mutación, pueden causar patologías tales como hemofilia, distrofia muscular de Duchenne, síndrome de X frágil y daltonismo, entre otras. Dado que dichas enfermedades son recesivas, se presentan más frecuentemente en el sexo masculino debido a su condición de hemicigosis². Debido a su mayor tamaño, contenido génico y condición tanto heterocigota/homocigota ó hemicigota, se han caracterizado un mayor número de patologías asociadas al cromosoma X que al Y (OMIM 2014). A continuación, la Tabla 1.1.2 resume las características de ambos cromosomas sexuales.

Tabla 1.1.2. Características de los cromosomas sexuales

Cromosoma	Morfología	Tamaño (Mb)	Genes descriptos*	Grupos de ligamiento	Patologías asociadas*
X	Submetacéntrico	156	811	4	3930
Y	Acrocéntrico	57	53	1	184

*Según OMIM 2014

² La hemicigosis es la condición de un gen que está presente en una sola copia en un individuo diploide (v.g. todos los genes de los cromosomas X e Y en varones se encuentran en hemicigosis)

1.1.3. Características del cromosoma Y

El cromosoma Y es uno de los cromosomas más pequeños del complemento cromosómico humano, y hasta hace poco más de 10 años, Mark Jobling y Chris Tyler-Smith irónicamente sugerían que “*el cromosoma Y parecía cumplir el papel del delincuente juvenil entre los cromosomas humanos - rico en chatarra, pobre en atributos útiles, reacio a sociabilizar con sus vecinos y con una inevitable tendencia a degenerar*” (Jobling y Tyler-Smith 2003). En la actualidad contamos con un conocimiento más detallado sobre las funciones del cromosoma Y: su implicancia en funciones específicas tales como la formación del esmalte dental, la diferenciación sexual hacia el fenotipo masculino y la capacidad del hombre para dejar descendencia. En marcado contraste con la especialización funcional del cromosoma Y, está la naturaleza ecléctica de los campos de investigación que abarcan el estudio de su diversidad, como la genética reproductiva y la dinámica del genoma, como así también en genética de poblaciones y forense (Jobling y Tyler-Smith 2003).

1.1.4. Estructura

Debido a la particularidad de evadir la recombinación meiótica, los hombres transmiten sus cromosomas sexuales prácticamente sin modificaciones a su descendencia (salvo en casos de mutaciones). Así, el cromosoma X presente en un espermatozoide determinará la formación de un cigoto femenino, siendo la información transmitida en el cromosoma X idéntica entre padre e hija. Si, en cambio, el espermatozoide posee un cromosoma Y, el cigoto resultante de la cariogamia con el óvulo determinará el desarrollo de un individuo de sexo masculino. Al no recombinar, los cambios en el cromosoma Y se producirán únicamente por mutación y se transmitirán de una generación a la siguiente, estableciéndose así un **linaje paterno**³. Por esta razón, el cromosoma Y conserva un registro de su historia y resulta una herramienta útil para el seguimiento de la evolución humana (Jobling y Tyler-Smith 2003).

Desde el punto de vista estructural, la región del cromosoma Y que no sufre recombinación fue inicialmente denominada **región no recombinante** (NRY). Sin

³ A lo largo del texto se encuentran resaltadas con negrita las palabras clave específicas del tema de la tesis

embargo, una vez que se conoció la secuencia completa del cromosoma Y, la región no recombinante ha pasado a llamarse región masculino-específica (MSY), ya que el término “no recombinante” no estaba reflejando la reorganización dinámico-evolutiva que esta región del genoma estaba sufriendo (ver punto 1.1.6) (Skaletsky *et al* 2003).

La MSY está compuesta por tres bloques de heterocromatina (la región centromérica, y las regiones del brazo largo Yq11.22 y Yq12), y por tres clases de secuencias eucromáticas. La heterocromatina abarca al menos seis diferentes tipos de secuencia que forman largas y homogéneas series en tándem, de las cuales hasta el momento no hay evidencia clara de transcripción (Skaletsky *et al* 2003, Navarro-Costa y Plancha 2011). Por otro lado, la porción eucromática presenta tres clases diferentes de secuencias: X-transpuestas, X-degeneradas y amplicónicas. Las secuencias X-transpuestas exhiben 99% de identidad con el cromosoma X. Las secuencias X-degeneradas son restos de autosomas antiguos de los que el X e Y evolucionaron. Las **secuencias amplicónicas** (o amplicones) abarcan grandes regiones (alrededor del 30% de la eucromatina), presentando cada par de secuencias 99,9% de identidad entre sí (Figura 1.1.4) (Kuroda-Kawaguchi *et al* 2001, Repping *et al* 2006). Estas últimas son regiones duplicadas del cromosoma, ya sea en forma directa o invertida, constituyendo así palíndromos. Estas regiones, si bien luego de la duplicación cada secuencia puede sufrir eventos de mutación independientes, presentan alto grado de homología.

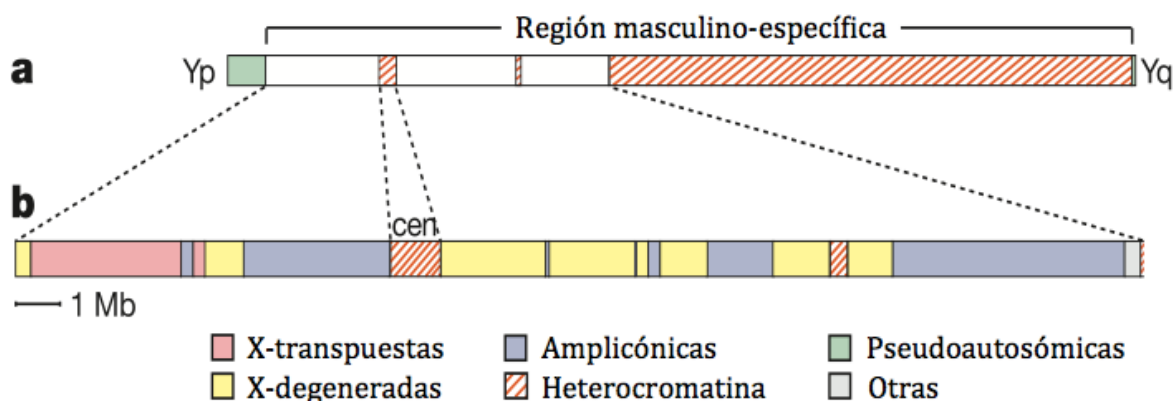


Figura 1.1.4. Estructura del cromosoma Y (Skaletsky *et al* 2003)

1.1.5. Las secuencias palindrómicas

Una de las características particulares del cromosoma Y es su estructura palindrómica. A lo largo del brazo largo del Y (Yq) se localizan ocho palíndromos (Figura 1.1.5). El alto grado de homología, la estructura palindrómica "en espejo" y la ausencia de recombinación con un par homólogo hacen que esta región sea propensa a frecuentes eventos de **recombinación intracromosómica** y de **conversión génica**. El mecanismo de recombinación intracromosómica se describirá en profundidad en el siguiente punto.

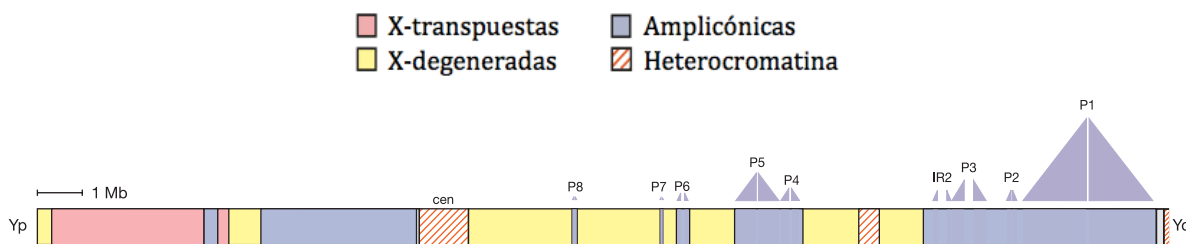


Figura 1.1.5. Estructura palindrómica del cromosoma Y humano con la localización de los palíndromos P1 a P8 (Skaletsky et al 2003).

1.1.6. La naturaleza dinámica

Debido a la aumentada densidad de secuencias amplicónicas con alto grado de homología y estructura palindrómica, el cromosoma Y se caracteriza por ser rico en **variantes de número de copias** (CNVs). Por su haploidía, el apareamiento intracromosómico no se encuentra restringido, y esto ha dado lugar a la acumulación de un gran número de duplicaciones de segmentos que pueden actuar como sustratos para la generación de CNVs a través del mecanismo de **recombinación homóloga no alélica** (NAHR). La NAHR es un tipo de recombinación homóloga que no ocurre entre alelos localizados en cada cromosoma del par homólogo. Por el contrario, los sustratos de la recombinación son secuencias dentro de un mismo cromosoma que han sido previamente duplicadas durante el proceso evolutivo. Tales estructuras pueden sufrir eventos de recombinación que generan consecuentemente inversiones, duplicaciones, deleciones, y conversión génica (Sasaki et al 2010) (Figura 1.1.6).

También se han descritos deleciones en el cromosoma Y cuyo mecanismo no se explica mediante NAHR. Es por ello que se sugirió que ciertos tipos de deleción podrían ocurrir mediante recombinación no homóloga (Noordam et al 2011). La **recombinación no homóloga** o **unión de extremos no homólogos** (NHEJ) es un mecanismo que repara roturas en la doble hebra de ADN. Es denominada no homóloga dado que los extremos

rotos son directamente ligados sin la necesidad de un molde homólogo, en contraste con la recombinación homóloga, que requiere una secuencia homóloga para guiar la reparación (Moore y Haber 1996).

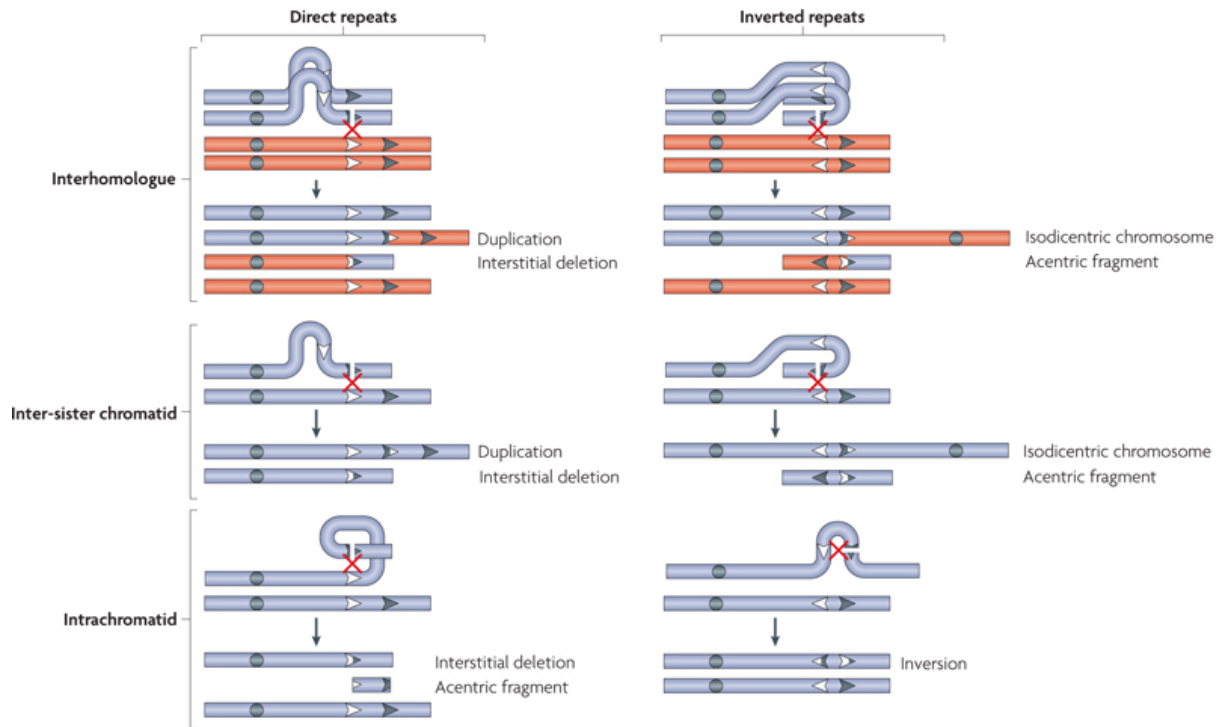


Figura 1.1.6. Mecanismos de recombinación homóloga no alélica. La figura esquematiza seis consecuencias de NAHR entre secuencias repetidas localizadas en el mismo cromosoma, con dos orientaciones entre las repeticiones (directa o invertida) para los tres tipos posibles de interacción (entre cromosomas homólogos, entre cromátides hermanas o dentro de la misma cromátide). Los cromosomas homólogos se muestran en azul y rojo, y las cromátides hermanas en el mismo color. Las repeticiones se muestran como flechas blancas y negras (Sasaki et al 2010).

1.1.7. Funciones

Desde el punto de vista funcional, la historia del cromosoma Y se puede dividir en tres etapas. La primera etapa se enfocó en el estudio de la transmisión mendeliana de los caracteres visibles, asociando al cromosoma Y con la transmisión de ciertos caracteres “masculinos” como vellos en las orejas y piel escamosa, entre otros. La segunda etapa consideró al cromosoma Y como un terreno baldío genético dado que no se encontraba evidencia de la existencia de nuevos genes, salvo el gen SRY que se consideraba una excepción al desolado cromosoma. La característica de la tercera etapa fue la aplicación

de técnicas de ADN recombinante y tecnologías genómicas, definiendo finalmente la presencia de genes implicados en el cambio de sexo gonadal, el Síndrome de Turner, rechazo de trasplantes y falla espermatogénica (Skaletsky *et al* 2003).

Actualmente se sabe que el cromosoma Y participa en tres funciones fundamentales: la alimentación (a través de la formación del esmalte dental), la diferenciación sexual y la fertilidad masculina. La primer función que se asoció al cromosoma Y fue la formación del esmalte dental mediante el gen de amelogenina, un gen de copia única cuyos homólogos están ubicados en los cromosomas X e Y. Este gen codifica para una proteína hidrofóbica producida por los ameloblastos durante el desarrollo del esmalte dental. Además, el gen de amelogenina es ampliamente usado en genética forense para la determinación de sexo debido a que en el cromosoma X da lugar a un producto de amplificación de 106 pb, y en el cromosoma Y de 112 pb (Nakahori *et al* 1991).

La segunda función que se asoció a una región particular del cromosoma Y fue la determinación sexual masculina. La diferenciación sexual en mamíferos placentarios es el resultado de la acción de un gen ubicado en el brazo corto del cromosoma Y (Yp). Esta región fue inicialmente denominada Región de Determinación Testicular (TDF). Un gen localizado en esta región causa que la gónada indiferenciada se desarrolle a testículo, consecuentemente generando una cascada hormonal hacia el fenotipo masculino (Sinclair *et al* 1988). Se describió que el SRY es un gen localizado en la región TDF que cumple con las características funcionales esperadas para la determinación testicular. Se vio que el cambio de sexo en mujeres XY es el resultado de la falla en la determinación testicular o en sus vías de diferenciación. Algunas mujeres XY, con disgenesia gonadal, presentan deleciones o mutaciones en este gen (Berta *et al* 1990).

La tercer función asociada al cromosoma Y, y que se desarrollará a continuación, fue descrita en el año 1976. Mediante técnicas citogenéticas se identificó que la deleción de una región del brazo largo del cromosoma Y era la característica común entre hombres azoospermicos. Desde entonces se asoció esta región a espematogénesis e infertilidad masculina (Tiepolo y Zuffardi 1976).

1.1.8. La región AZF

Hace ya casi 40 años se demostró la existencia del **factor de azoospermia** (AZF) en el brazo largo del Y (Yq11→qter) (Tiepolo y Zuffardi 1976). Debido a la complejidad estructural del cromosoma Y, la caracterización de la región AZF llevó casi 30 años. Primero, la secuenciación de las regiones AZFa y AZFc permitió un acercamiento a su estructura (Sun *et al* 2000, Kuroda-Kawaguchi *et al* 2001). Más adelante, la secuenciación completa de la región MSY permitió una mejor comprensión de esta parte específica del genoma, y ha disparado numerosas investigaciones moleculares en materia de infertilidad masculina asociada al cromosoma Y, y su implicancia en la espermatogénesis (Skaletsky *et al* 2003).

La detección molecular a gran escala de **microdeleciones**⁴ en el cromosoma Y, reveló que la región AZF presenta una organización tripartita. De esta manera, se establecieron las regiones AZFa, AZFb y AZFc como aquellas que regulan la espermatogénesis (Figura 1.1.8.1) (Vogt *et al* 1996). Posteriormente, mediante el mapeo de la extensión de dichas regiones, se demostró que el extremo proximal de la región AZFc se solapaba con el extremo distal de la región AZFb (Repping *et al* 2002). La secuenciación posterior demostró que estas tres regiones albergan un total de 15 familias diferentes de genes. De los principales genes descritos hasta el momento, *USP9Y* y *DDX3Y* se localizan en la región AZFa; *CYorf5*, *RPS4Y2*, *EIF1aY*, *KDM5D*, *XKRY*, *HSFY*, *PRY*, *RBMY1A1* y *CDY2* en AZFb; y *BPY2*, *CDY1*, *GOLGA2LY*, *CSPG4LY* y *DAZ* en AZFc (Navarro-Costa *et al* 2010, Navarro-Costa *et al* 2010).

⁴ Se denomina microdeleciones a aquellas deleciones que no pueden ser visualizadas por técnicas citogenéticas

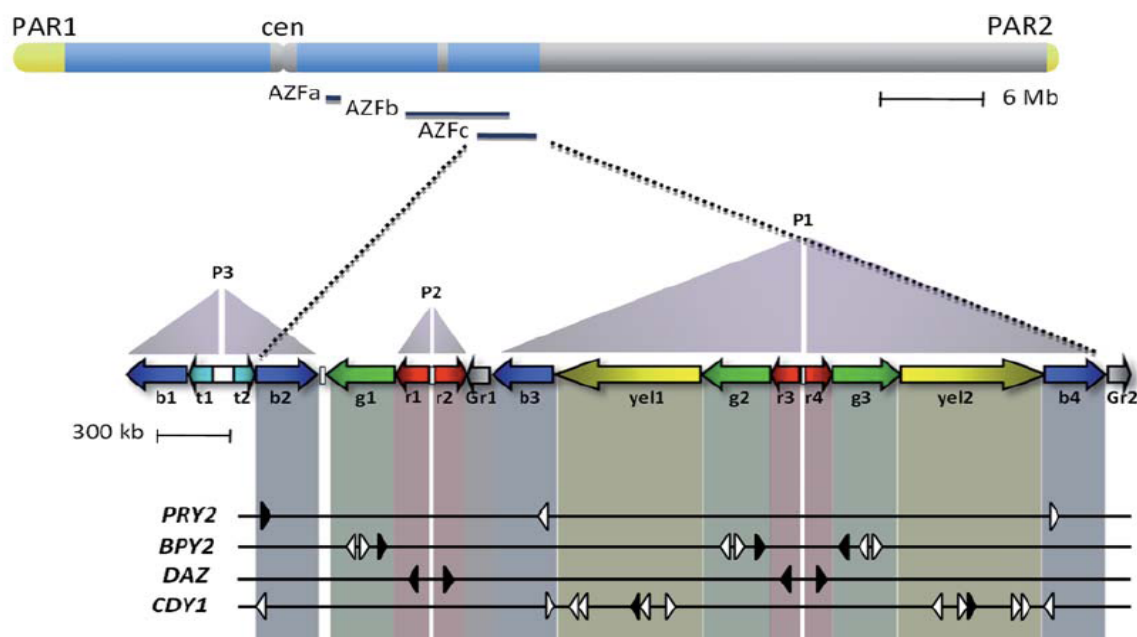


Figura 1.1.8.1. Localización de las regiones AZFa, AZFb and AZFc (Navarro-Costa et al 2010)

A partir de la secuenciación completa de la región AZFc, se identificaron en ella seis familias de **amplicones**⁵, a los cuales se les asignó un código de color para estudios posteriores (Figura 1.1.8.2). Estas unidades amplicónicas varían en longitud desde 115 kb (gris) hasta 678 kb (amarillo). Los amplicones de color turquesa (t), gris (gr) y amarillo (y) se repiten dos veces cada uno en la región, mientras que el amplicón verde (g) se repite tres veces, y los amplicones azul (b) y rojo (r) se repiten cuatro veces cada uno. En su conjunto, las seis familias de amplicones representan el 93% de la secuencia de 4,5 Mb de la región AZFc (Kuroda-Kawaguchi et al 2001).

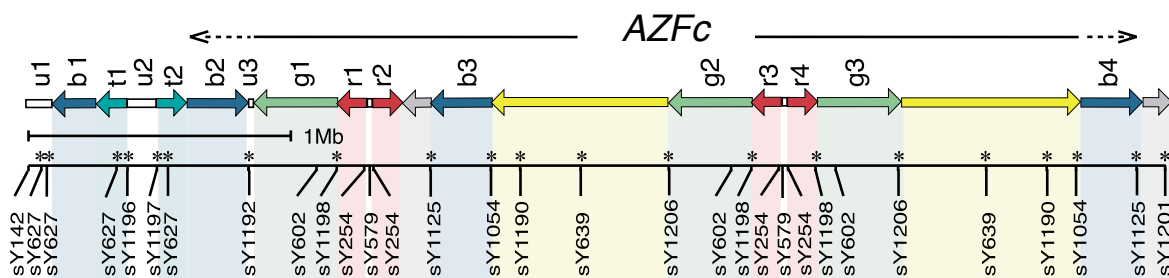


Figura 1.1.8.2. Esquema del código de color y los marcadores empleados para la designación de los amplicones de la región AZFc (Kuroda-Kawaguchi et al 2001)

⁵ Si bien el término "amplicón" se emplea de rutina para referirse a los productos de amplificación por PCR, en el contexto del presente trabajo se utilizará este término haciendo referencia a las secuencias amplicónicas descritas en el punto 1.1.4.

1.1.9. Los genes de la región AZFc

La región AZFc contiene ocho familias de genes multicopia expresados únicamente en el testículo, sin embargo la implicancia de cada gen individual para la fertilidad aún no ha sido dilucidada (Fernandes *et al* 2004). La Figura 1.1.9 esquematiza la localización y número de copias de los principales genes descritos hasta la actualidad, así como su localización en el cromosoma Y de referencia publicado en GenBank.

Uno de los principales genes, y el primero en ser descrito, es el gen *deleted in azoospermia (DAZ)*. El gen *DAZ* restringe su expresión a las células germinales premeióticas, particularmente espermatogonias, y codifica para una proteína de unión al ARN importante para la espermatogénesis. Cuatro copias de este gen (*DAZ1*, *DAZ2*, *DAZ3* y *DAZ4*) se encuentran en el cromosoma Y dentro de duplicaciones palindrómicas; un par de genes se encuentra en el palíndromo P1 y el segundo par en el palíndromo P2, dentro de las secuencias amplicónicas rojas o “r” (r1, r2, r3 y r4, respectivamente) (Reijo *et al* 2000) (Figura 1.1.9 – rojo).

Otro de los genes asociados a espermatogénesis es el gen *chromodomain protein Y (CDY)* que codifica para una proteína con un cromodominio y un dominio catalítico de la enzima histona acetiltransferasa. Esta proteína se localiza en el núcleo de las espermátides tardías, donde ocurre la hiperacetilación de las histonas, facilitando la transición de histonas a protaminas como proteína de empaquetamiento del ADN. El cromosoma Y humano tiene dos copias idénticas de este gen dentro de la región palindrómica P1 (*CDY1A* y *CDY1B*), y un par de genes estrechamente vinculados y con alto grado de homología en el palíndromo P5 (*CDY2A* y *CDY2B*). El gen *CDY* se encuentra localizado en el amplicón amarillo o “y” (y1, y2, y3 e y4) (Lahn *et al* 2002) (Figura 1.1.9 – amarillo).

El gen *testis-specific basic protein Y 2 (BPY2)* también se expresa específicamente en testículo y su producto proteico se encuentra involucrado en el desarrollo celular germinal masculino. Existen tres copias prácticamente idénticas del gen *BPY2* en el cromosoma Y, localizadas dentro de las secuencias amplicónicas verdes o “g” (g1, g2 y g3) (Wong *et al* 2004) (Figura 1.1.9 – verde).

El gen *PTPBL-related gene on Y (PRY)* es otro de los genes que se expresa específicamente en el testículo y codifica para una proteína similar a la tirosina

fosfatasa. Existen dos copias prácticamente idénticas del gen en el cromosoma Y localizadas en el amplicón azul o “b” (b1 y b2) (Lahn y Page 1997) (Figura 1.1.9 – azul).

Las familias de genes *golgi autoantigen, golgi subfamily a, 2-like, Y-linked (GOLGA2LY)* (Figura 1.1.9 – fucsia) y *chondroitin sulfate proteoglycan 4 pseudogene 1, Y-linked (CSPG4P1Y)* (Figura 1.1.9 – turquesa) son unidades de transcripción con marcos de lectura abiertos. Se expresan únicamente en testículo, y cuentan con productos proteicos descritos *in silico* no aislados aún. Ambos genes se presentan en dos copias, y se localizan en el amplicón amarillo o “y”, dentro del palíndromo P1 (Kuroda-Kawaguchi *et al* 2001).

Inicialmente, en humanos, el gen *DAZ* se describió como un gen de copia única, y posteriormente se evidenció su amplificación y existencia como gen multicopia (Reijo *et al* 1995, Saxena *et al* 1996). De manera similar, los genes *DAZ* y *CDY* se describieron en primates, con variaciones tanto en el número de copias de los mismos, como así también en su localización en el cromosoma Y. Estas características polimórficas en primates se asociaron con características reproductivas diferenciales entre especies de primates (Schaller *et al* 2010, Greve *et al* 2011).

En el campo de la infertilidad masculina, las deleciones que generan una reducción del número de copias de los genes mencionados, se correlacionan con una disminución en la cantidad de espermatozoides en el eyaculado. Las duplicaciones posteriores a la deleción tienden a restaurar, y a veces incluso aumentar, el número de copias de estos genes, y consecuentemente también el recuento espermático. Esto sugiere que el contenido génico de la región AZFc habría sido preservado a lo largo de la evolución, dada su repercusión directa en la capacidad reproductiva masculina (Noordam *et al* 2011).

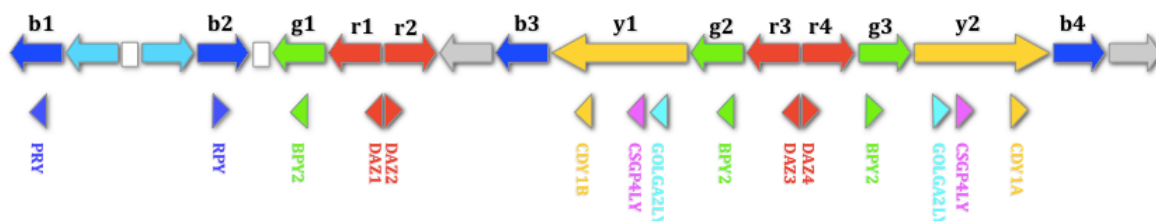


Figura 1.1.9. Localización de los principales genes candidatos de la espermatogénesis de la región AZFc. Las flechas indican la posición relativa y orientación de los amplicones de la región AZFc (adaptado de Kuroda-Kawaguchi *et al* 2001) y los triángulos esquematizan la localización y orientación de los principales genes descritos para dicha región.

1.1.9. Haplogrupos

Dado que el cromosoma Y no sufre recombinación prácticamente en toda su longitud, resulta una herramienta muy poderosa para el estudio de las migraciones humanas relacionadas a los linajes paternos. Los marcadores genéticos empleados en genética de poblaciones para el rastreo de estos linajes son las repeticiones cortas en tándem (STRs) y los polimorfismos de nucleótido único (SNPs). La combinación de variantes alélicas de STRs del cromosoma Y que se heredan en bloque se denominan **haplotipos**⁶, los cuales son compartidos por una misma patrilinea. Dado que no sufren recombinación, se modifican únicamente por eventos de mutación. Diferentes haplotipos o linajes paternos pueden clasificarse dentro de **haplogrupos**⁷ (Hgs), que permiten establecer un árbol filogenético. Estos Hgs se definen por el estado derivado (mutado) para un determinado marcador SNP. Los individuos que presentan la variante ancestral (no mutada) para dicho SNP, no pertenecen al Hg en cuestión. Mediante el uso de estos polimorfismos binarios con bajas tasas de mutación, que definen estos Hgs, se puede construir de manera relativamente sencilla una filogenia del cromosoma Y humano. De esta manera, es posible reconstruir la historia subyacente a los procesos migratorios que determinaron la distribución de las poblaciones actuales (Jobling 2008).

Actualmente se encuentran definidos más de 300 Hgs y sub-Hgs distribuidos geográficamente en todo el mundo. El constante incremento en el número de Hgs hizo necesaria la unificación de la nomenclatura para futuros estudios poblacionales. Las Figuras 1.1.9a y 1.1.9b representan el árbol filogenético de los Hgs de cromosoma Y (y su actualización), junto con la evolución de la nomenclatura y la actualización de la misma (YCC 2002, Karafet *et al* 2008). En términos funcionales, la Sociedad Internacional de Genética Genealógica (ISOGG) estableció una base de datos de acceso libre con permanente actualización de la nomenclatura y características de los Hgs y polimorfismos analizados (ISOGG 2014).

⁶ Conjunto de variantes alélicas de STRs del cromosoma Y que se heredan en bloque y se transmiten por línea paterna

⁷ Conjunto de haplotipos que se definen mediante SNPs diagnósticos y permiten establecer filogenias con distribución geográfica definida

- Introducción -

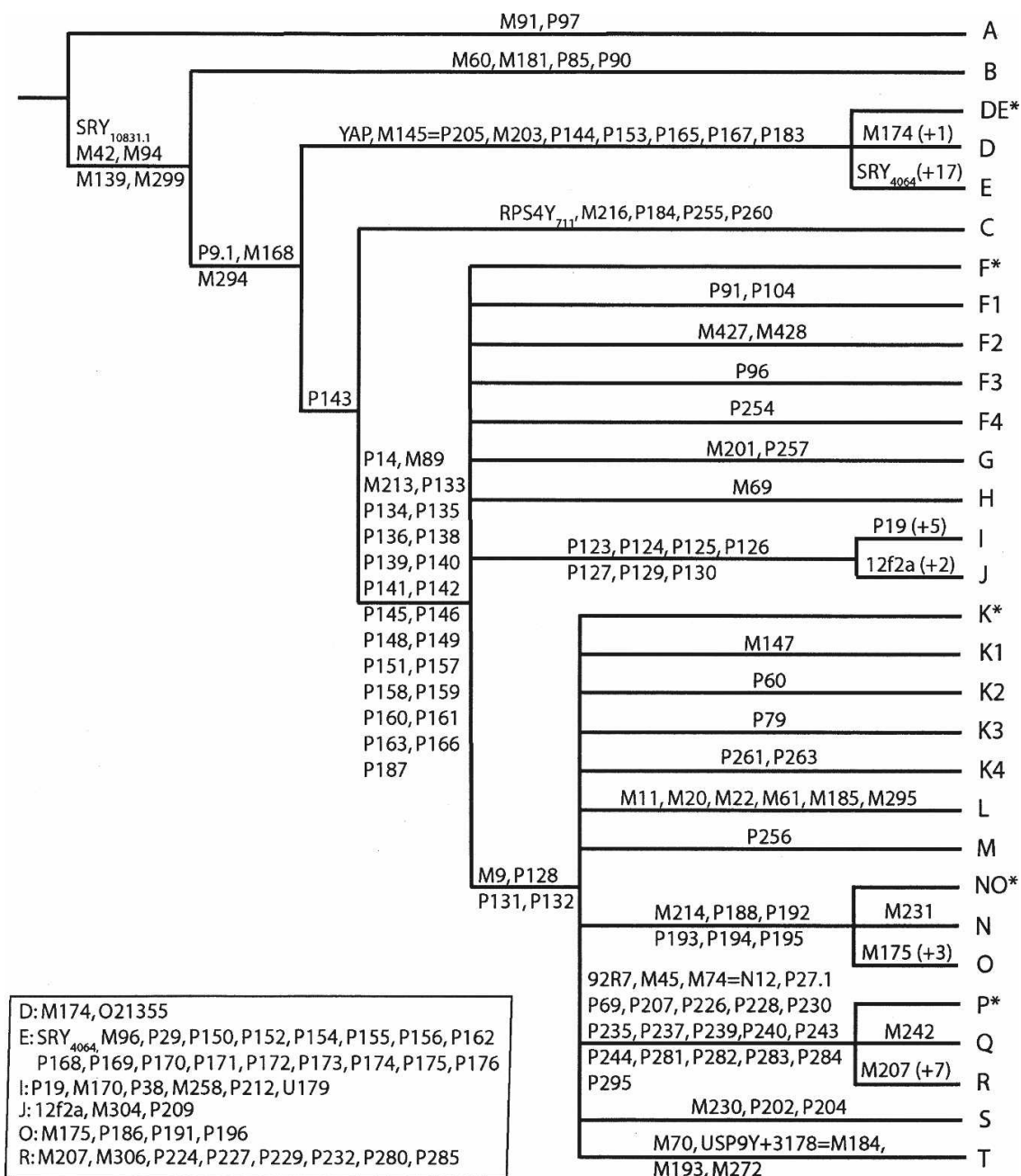


Figura 1.1.9b. Actualización de los polimorfismos empleados en la definición y resolución de Hgs de cromosoma Y (Karafet et al 2008)

Los Hgs de cromosoma Y se identifican mediante letras desde la A hasta la T. Las subdivisiones se indican con números a la derecha de las letras, y sucesivamente letras minúsculas, de acuerdo con la nomenclatura definida por el Y Chromosome Consortium (YCC 2002, Karafet et al 2008).

La distribución de los Hgs ancestrales refuerzan la teoría del origen de los humanos modernos en la región subsahariana de África, pudiéndose trazar en forma aproximada

- Introducción -

las migraciones humanas prehistóricas a partir de África y la sucesiva población del resto del mundo (Figura 1.1.9c). La distribución actual de los Hgs a nivel mundial se esquematiza en la Figura 1.1.9d.

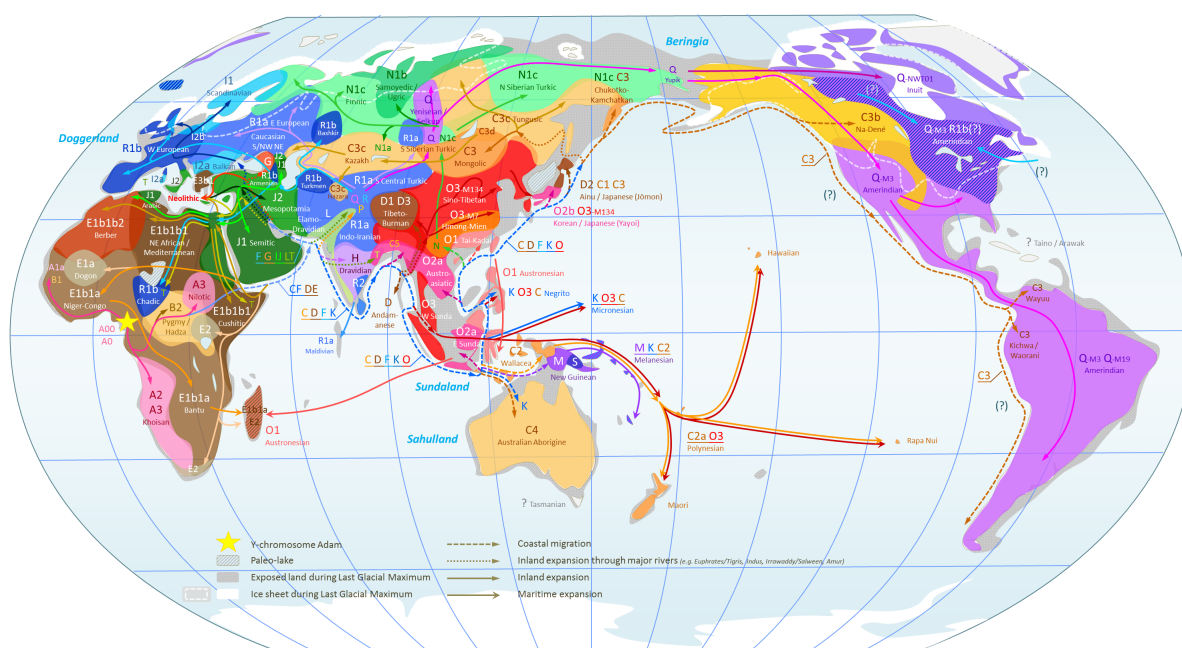


Figura 1.1.9c. Mapa de las migraciones humanas según el estudio de Hgs de cromosoma Y

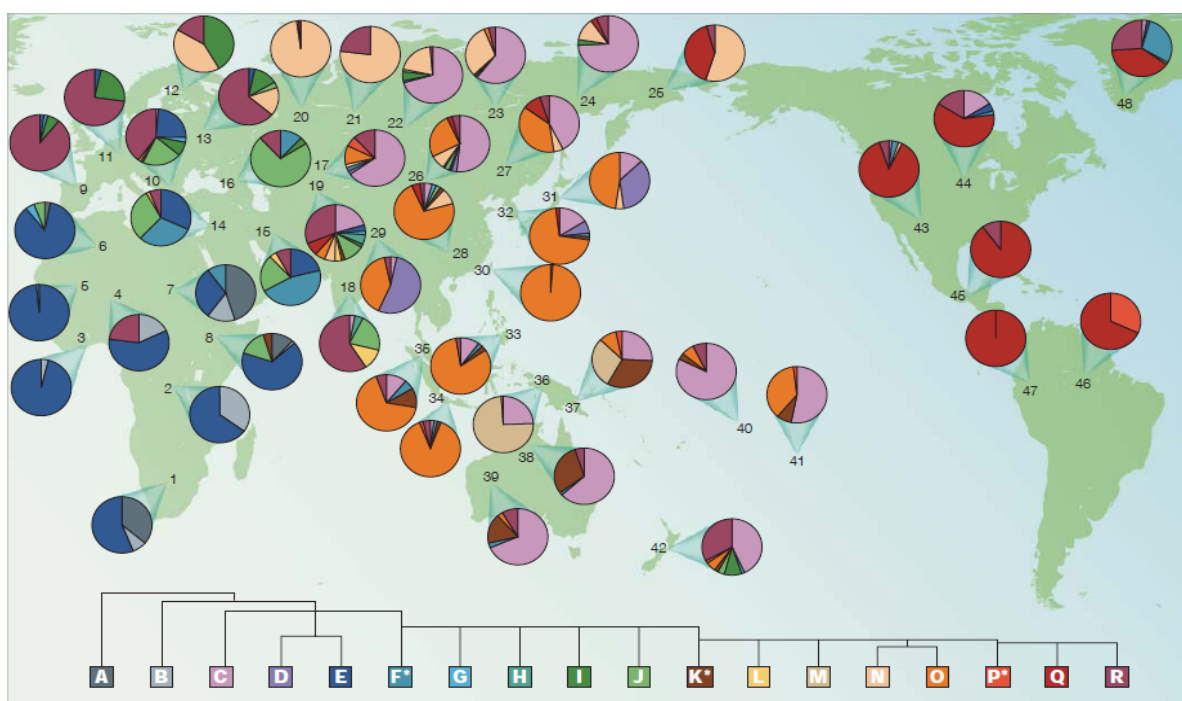


Figura 1.1.9d. Distribución geográfica de los Hgs de cromosoma Y (Jobling y Tyler-Smith 2003)

Si bien, en la población mundial existen alrededor de 30 Hgs y cientos de sub-Hgs evidenciando la diversidad de la misma, la información disponible con respecto a la secuencia de referencia del cromosoma Y publicada en GenBank pertenece a un único individuo correspondiente al Hg europeo R1b1a2⁸ (Jobling y Tyler-Smith 2003, Skaletsky *et al* 2003, Repping *et al* 2006). Se considera que el Hg R se originó aproximadamente hace 27.000 años en Asia, y actualmente se divide en dos ramas principales: R1 y R2. El sub-Hg R1b1a2 (M269C), caracterizado a partir de la secuencia de referencia, es el mayoritario en Europa y particularmente en España (ISOGG 2014).

⁸ A lo largo del presente trabajo, R1b y R1b1a2 se utilizarán como sinónimos, debido al constante cambio en la nomenclatura de los Hgs

1.2. Población argentina

1.2.1. Historia

Desde el punto de vista histórico, hasta mediados del siglo XVI, el territorio argentino estaba ocupado por poblaciones originarias que llegaron al continente americano hace aproximadamente 15.000 años a través del Estrecho de Bering. Estas comunidades se encontraban distribuidas por todo el territorio, agrupadas según sus diferentes actividades económicas, lenguas y cultura. Luego del descubrimiento de América en 1492, las olas migratorias hacia el actual territorio argentino se iniciaron en el siglo XVI con la colonización española. Entre los siglos XVII y XIX, se ha descrito la introducción forzada de población africana, traída como mano de obra esclava. En el siglo XIX, tuvo lugar el tercer evento migratorio promovido por el gobierno argentino. Los inmigrantes provenían de Europa y Asia Menor, en su mayoría de origen italiano. Por último, a finales del siglo XX y principios del siglo XXI, llegaron inmigrantes de África sub-Sahariana, Corea, China, Bolivia, Perú, Paraguay, Colombia, y de Europa Central y Oriental. Todos estos acontecimientos migratorios han tenido un impacto importante en la estructura de la población argentina, principalmente debido al mestizaje con la población originaria.

1.2.2. Composición genética

Desde el punto de vista genético, nuestro grupo de trabajo investigó y publicó datos que demostraron que, basado en el análisis del cromosoma Y, mediante la utilización de STRs y SNPs, el componente europeo es mayoritario en la población argentina con respecto al amerindio y africano (Corach *et al* 2010). La proporción de linajes paternos amerindios observada en la población argentina es relativamente baja como consecuencia del mestizaje ocurrido con los primeros europeos que llegaron al territorio. Por el contrario en los linajes maternos, son mayoritarios los Hgs nativo americanos.

El primer contacto con la población europea produjo una reducción severa de la población masculina nativa, producto de las sucesivas guerras ocurridas con la finalidad de ocupar el territorio. Así mismo, como consecuencia de una decisión política de poblamiento del territorio conquistado, sumado a la falta de población femenina de

origen europeo, el mestizaje entre hombres españoles y mujeres nativas fue un evento frecuente que dio origen a descendientes con linajes paternos europeos y maternos amerindios. La desaparición exponencial de los hombres nativos ocurrida durante las sucesivas corrientes conquistadoras, y el flujo genético sesgado debido a que los nativos no tenían descendencia con mujeres europeas, fueron dos factores fundamentales que determinaron la frecuencia de los linajes paternos observados en la población argentina actual. Otro factor que contribuyó a la proporción de Hgs observada, es la inmigración masiva proveniente principalmente de Italia y España, ocurrida entre los años 1850 y 1950. Esto fue consecuencia de la situación social existente en los países europeos y de la política inmigracionista existente en Argentina. La escasa población de origen africano encontrada en la actualidad, a pesar de la entrada masiva de esclavos entre 1580 y 1810, podría deberse en parte a barreras sociales existentes en aquel momento que traerían como consecuencia un bajo grado de mestizaje. Por otro lado, la alta tasa de mortalidad sufrida por este último grupo como consecuencia de guerras y enfermedades, provocó una reducción en los linajes paternos africanos que actualmente exhibe frecuencias menores al 1% (Bobillo C, Tesis de Doctorado, 2010).

Actualmente, la composición de la población argentina, en relación con los linajes del cromosoma Y, es de 45% perteneciente al Hg europeo R1b1a2, 11% al J2, 9% al E, 8% al Hg I, 4% al G y 5% al Hg nativo americano Q1a3a1, entre otros (Figura 1.2.2) (Corach *et al* 2010).

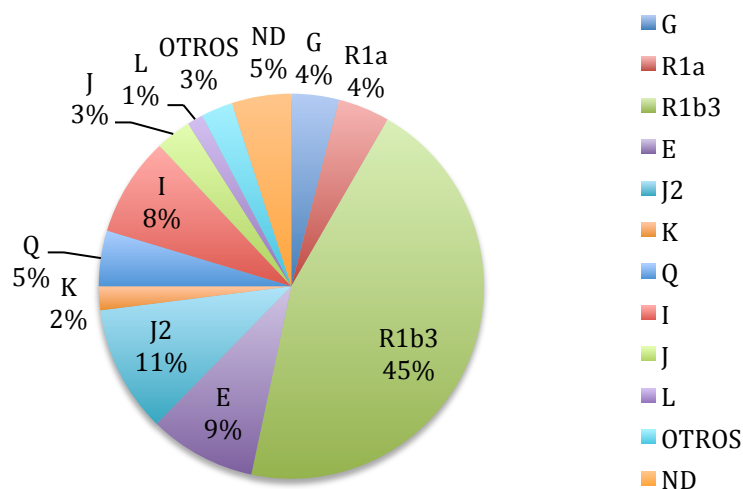


Figura 1.2.2. Distribución de Hgs de cromosoma Y en Argentina, adaptado de los resultados de Corach *et al* (2010)

En la población argentina, los Hgs más frecuentes son originarios de Europa occidental. Estos son: R1b1a2, I, G2a y E1b1b. La presencia de dichos Hgs en nuestra población es el resultado de las migraciones masivas provenientes de España e Italia, hace tres o cuatro generaciones.

El Hg R1b1a2 o R1b es el mayoritario en Argentina, y además se encuentra en alta proporción en población irlandesa, galesa, escocesa, francesa, belga, española, portuguesa, inglesa del oeste, holandesa del sur, austríaca del oeste, italiana del norte y alemana del sur. R1b1a2 es el Hg más común en Europa occidental, llegando a más del 80% de la población en algunos países. Se asocia tradicionalmente con el hombre de Cromagnon, que se considera que fueron los primeros humanos modernos en entrar a Europa. De esta manera, los europeos de las costas del Atlántico conservarían el linaje de los primeros pobladores de Europa (Figura 1.2.2.1a).

El Hg I es mayoritario en las poblaciones de habla eslava de la península de los Balcanes (serbios y croatas), y también tiene presencia entre los búlgaros y rumanos (Figura 1.2.2.1b).

El Hg G2a se encuentra altamente representado en la región del Cáucaso, este del Mar Mediterráneo, y en Córcega y Cerdeña (Figura 1.2.2.1c).

En el sur de Italia, Grecia, Serbia, Albania y en Turquía, hay una importante presencia del Hg E1b, que es mayoritario en Egipto, Túnez y Libia, entre otros. Se trata del Hg más característico de África del Norte y representa la última gran migración de África a Europa. En el continente europeo se presenta con mayor frecuencia en el noroeste de Grecia, Albania y Kosovo, alrededor de los Balcanes, el resto de Grecia y Turquía occidental. Es muy característico en el norte de África occidental, y por lo tanto se encuentra en la Península Ibérica (principalmente la parte occidental), Italia y Francia (Figura 1.2.2.1d).

En cuanto al Hg J2, está relacionado con los antiguos etruscos, griegos, fenicios, asirios y babilonios. En Europa, alcanza su mayor frecuencia en Grecia (especialmente en Creta, Peloponeso y Tracia), en el sur y el centro de Italia, el sur de Francia y el sur de España. Los antiguos griegos y fenicios fueron los principales impulsores de la expansión J2 en todo el oeste y el sur del Mediterráneo. Los fenicios, judíos, griegos y romanos,

contribuyeron a la presencia de J2 en la Península Ibérica, especialmente en el sur (Figura 1.2.2.1e).

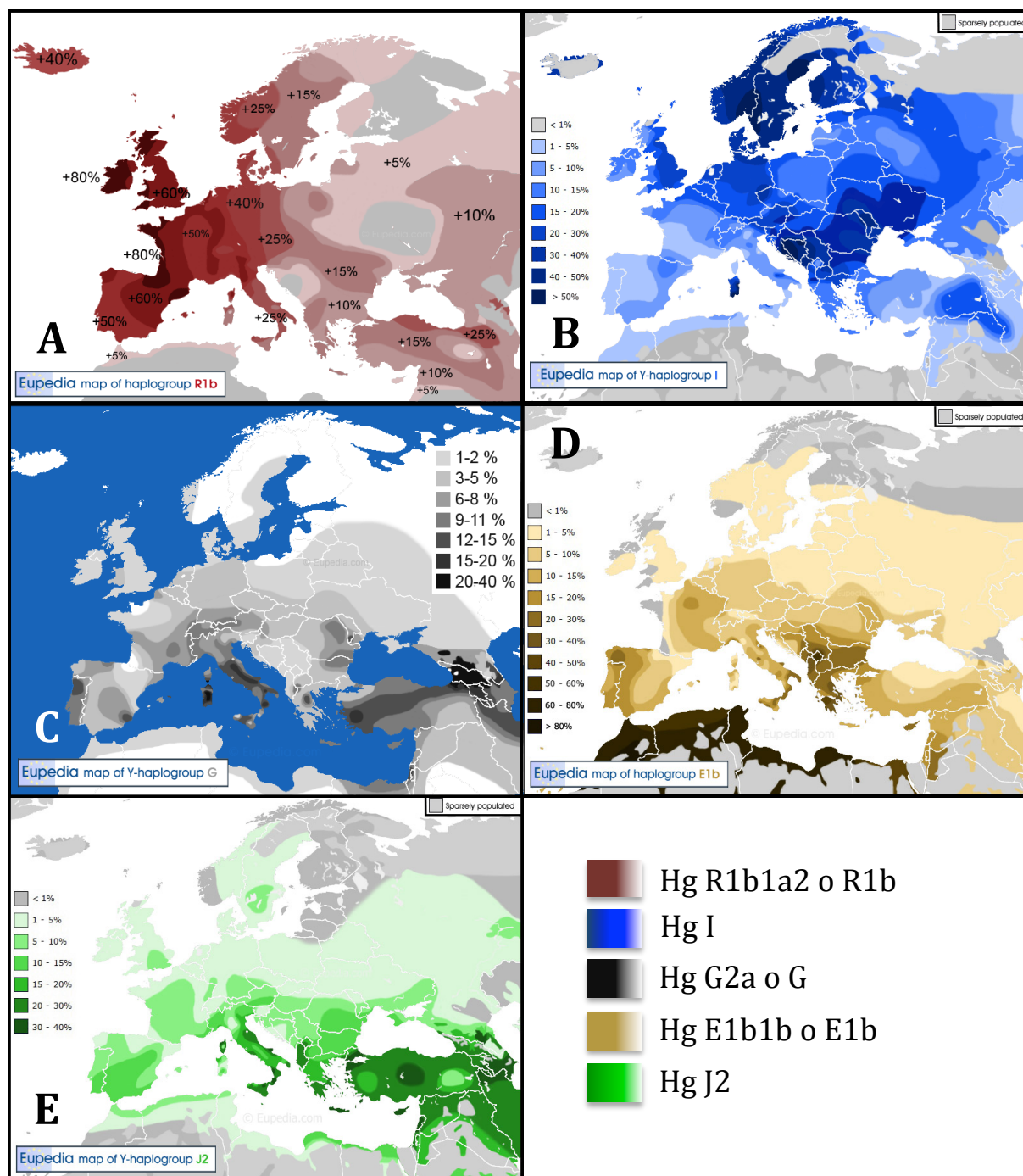


Figura 1.2.2.1. Distribución de los Hgs R1b1a2 (a), I (b), G (c), E1b (d) y J2 (e)

1.2.3. Haplogrupo nativo americano Q1a2a1a1

El Hg Q1a2a1a1 según la nomenclatura actualizada, anteriormente Q1a3a1 o Q3 (a lo largo del presente trabajo Q3, Q1a3a1 y Q1a2a1a1 se utilizarán como sinónimos) (ISOGG

2014), un sub-Hg del Hg asiático Q1, es el más frecuente entre las poblaciones nativo americanas (Figura 1.2.3).

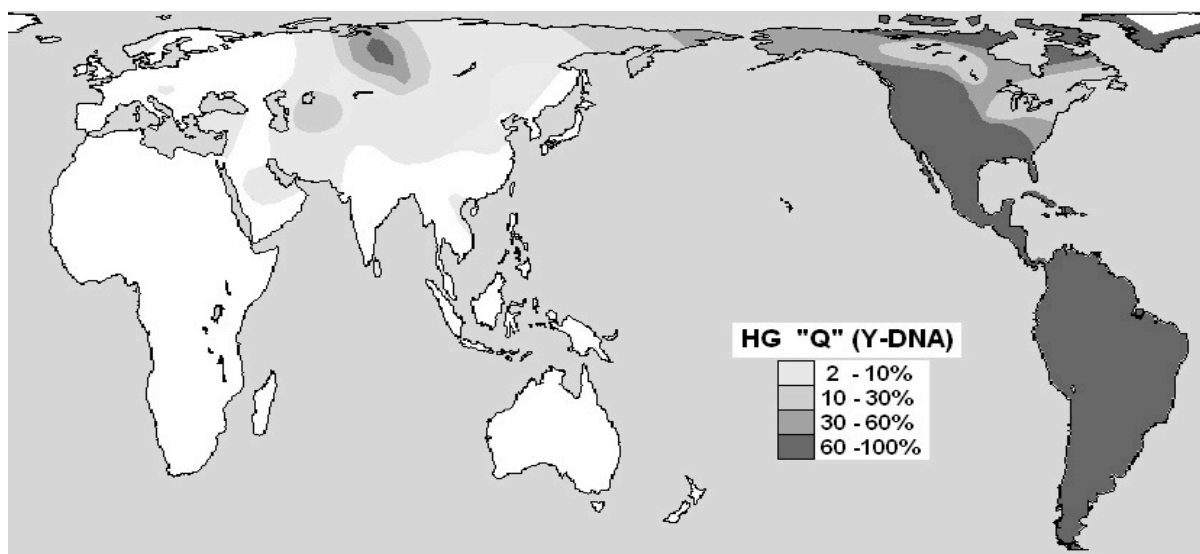


Figura 1.2.3. Distribución mundial del Hg Q

Se considera que América fue colonizada por primera vez desde Asia por hombres que emigraron principalmente a través del estrecho de Bering (Figura 1.1.9c). Estas poblaciones se expandieron rápidamente por el continente americano hace aproximadamente 15.000 años (Cavalli-Sforza y Feldman 2003). Recientemente se determinó que la colonización ocurrió al menos en tres oleadas desde Asia. La mayoría de los nativo americanos descenderían de una única población ancestral, que fue la primera en ingresar a América y se expandió hacia el Sur a través de la costa occidental. Sin embargo, se encontraron descendientes de otras dos poblaciones asiáticas cuya migración fue posterior y se dirigieron hacia el norte del continente (actualmente Canadá y Groenlandia) (Reich *et al* 2012).

La observación de un único Hg de cromosoma Y con alta frecuencia (92%, según Roewer *et al* 2013) en las poblaciones nativo americanas, se interpretó como posible único linaje fundador Nativo Americano. Este linaje se caracteriza por un cambio C>T en el locus DYS199/M3 (Underhill *et al* 1996, Bortolini *et al* 2003). En Eurasia, el Hg Q se encuentra en Siberia central entre los selkupis (~70%) y kets (~95%); y en baja frecuencia en Noruega, Mongolia, Uzbekistán, Turkmenistán, norte de China e Irán. En China, el sub-Hg mayoritario es el Q1a1a1 (M120). Se ha reportado como Hg mayoritario en poblaciones nativas de Brasil, Paraguay, Venezuela, Perú, Colombia, Ecuador, Chile y Argentina. En

Norteamérica se encontró en un 58% en los pueblos nativos de los Estados Unidos. En Sudamérica, prácticamente la totalidad de los individuos de este Hg pertenecen al sub-Hg Q1a2a1a1 (M3T). Si bien durante muchos años se consideró al Hg Q como el único fundador de América, recientemente se describieron individuos de poblaciones nativo americanas originarias de la región sur del continente cuyo linaje pertenece al Hg C3. Dada su localización, una hipótesis es que el Hg C3 haya ingresado al continente americano por vía marítima a través del Océano Pacífico hace aproximadamente 6.000 años, a diferencia del Hg Q que lo hizo por tierra (Roewer *et al* 2013). Hasta el momento se desconoce si la alta prevalencia del Hg Q en la población nativo americana se debe a un único linaje fundador o a un posible efecto de selección natural positiva de los individuos del Hg Q sobre otros haplogrupos contemporáneos en el territorio americano.

El Hg Q1a2a1a1 ha sido ampliamente estudiado desde el punto de vista poblacional, lingüístico y geográfico, sin embargo el estudio de su relación con distintas patologías genéticas recientemente ha despertado gran interés (Lardone *et al* 2013, Trinks *et al* 2014).

1.3. Espermatogénesis e Infertilidad Masculina

1.3.1. Espematogénesis

La diferenciación testicular está controlada por la presencia del cromosoma Y. Como se describió anteriormente, su brazo corto incluye el gen SRY, que se expresa fundamentalmente en el testículo y es responsable del desarrollo testicular, determinando así el desarrollo del aparato reproductor masculino.

Los túbulos seminíferos localizados en el testículo están formados principalmente por tres tipos celulares: células germinales, células de Sertoli y células de Leydig. Las células germinales entran en la gónada durante el desarrollo y se dividen por mitosis para formar espermatogonias de tipo A. Éstas se comienzan a dividir mitóticamente en la pubertad, lo que marca el inicio de la espermatogénesis. Luego, se forman espermatogonias intermedias y de tipo B. A partir de este punto, la barrera hemato-testicular impide el contacto de las células espermatogénicas (salvo las espermatogonias) con el torrente sanguíneo evitando el reconocimiento antigénico. Las células tipo B se dividen mitóticamente para producir espermatocitos primarios en reposo (diploides o $2n$). Éstos replican su ADN y se trasladan hacia el compartimiento luminal del citoplasma de la célula de Sertoli donde entran en una prolongada profase meiótica. Durante la anafase I, los cromosomas homólogos se separan, y en la telofase I se forman dos células hijas denominadas espermatocitos secundarios ($2n$). Estas células entran rápidamente en la segunda división meiótica, en la cual las cromátidas se separan y dan origen a las espermatidas redondas tempranas, que son haploides (n). Las espermatidas, mediante el proceso de espermiogénesis, se transforman en espermatozoides maduros altamente especializados. Luego, el espermatozoide requiere del paso por el epidídimo para su completa maduración: modificación de la cromatina, la redistribución de las organelas hacia la cola, pérdida del remanente citoplasmático y adquisición de movilidad progresiva (Figura 1.3.1) (Palacios 2009).

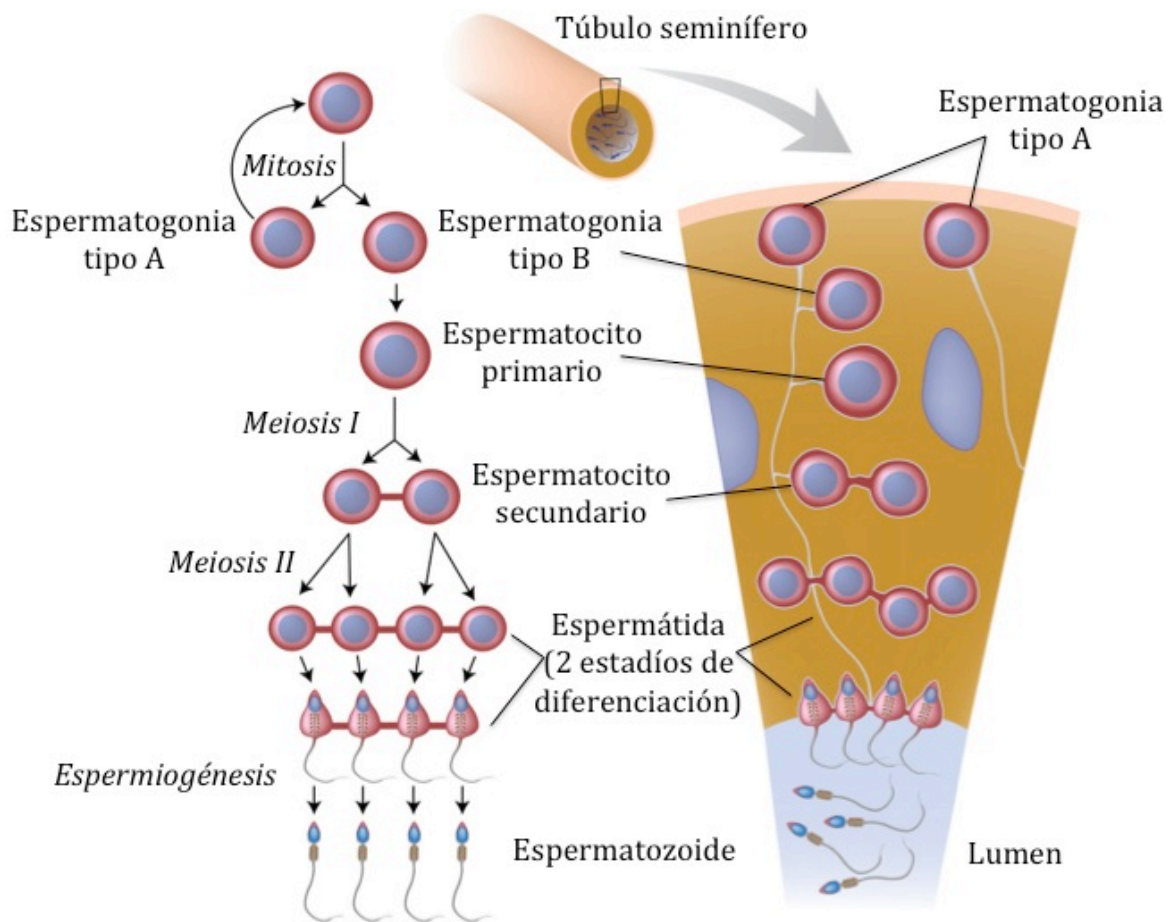


Figura 1.3.1. Esquema de la espermatogénesis (Fuente: Alila Medical Media)

1.3.2. Infertilidad masculina

La infertilidad es una condición patológica que afecta a 1 de cada 8 parejas que tratan de concebir, en países occidentales (Ferlin *et al* 2006). Según la OMS, se considera una pareja infértil aquella que no puede concebir un hijo luego de un año de relaciones sexuales, sin utilizar métodos anticonceptivos. Sin embargo, con el advenimiento de las técnicas de reproducción asistida, se ha incorporado el concepto de sub-fertilidad para aquellas parejas que no pueden lograr el embarazo de manera natural. Debido al aporte tanto del factor femenino como masculino a esta patología, se considera que aproximadamente en la mitad de los casos la causa puede atribuirse parcial o totalmente al factor masculino. De éstos, 2 de cada 3 casos involucran alteraciones testiculares primarias que afectan la espermatogénesis, de las cuales la mayoría son de etiología idiopática y se caracterizan únicamente por alteraciones de los parámetros seminales (McLachlan y O'Bryan 2010).

El factor masculino puede deberse, en términos generales, a alteraciones cualitativas o cuantitativas del semen. Entre los diagnósticos más frecuentes en pacientes infértiles se encuentra la azoospermia (ausencia de espermatozoides en el eyaculado), oligozoospermia (recuento espermático $<15 \times 10^6$ espermatozoides/mL), teratozoospermia (alteración de la morfología espermática) o astenozoospermia (alteración de la movilidad espermática), entre otros (Tabla 1.3.2; OMS 2010).

Tabla 1.3.2. Nomenclatura para la evaluación de la calidad del semen (OMS 2010)

Nomenclatura	Definición
Astenozoospermia	Porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva menor al límite inferior de referencia
Astenoteratozoospermia	Porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva y morfológicamente normales menor a los límites inferiores de referencia
Azoospermia	Ausencia de espermatozoides en el eyaculado
Criptoospermia	Ausencia de espermatozoides en la muestra en fresco, pero presencia en el pellet del centrifugado
Normozoospermia	Recuento total (o concentración) de espermatozoides con movilidad progresiva y morfología normal igual o mayor al límite inferior de referencia
Oligoastenozoospermia	Recuento total (o concentración) de espermatozoides con movilidad progresiva menor a los límites inferiores de referencia
Oligoastenoteratozoospermia	Recuento total (o concentración) de espermatozoides con movilidad progresiva y morfología menor a los límites inferiores de referencia
Oligoteratozoospermia	Recuento total (o concentración) de espermatozoides con morfología normal menor a los límites inferiores de referencia
Oligozoospermia	Recuento total (o concentración) menor al límite inferior de referencia
Teratozoospermia	Porcentaje de espermatozoides con morfología normal menor al límite inferior de referencia

* Los valores de referencia se detallan en la Tabla 2.1.1.4

A su vez, la azoospermia puede clasificarse en obstructiva (si hay presencia de espermatozoides a nivel testicular, pero no en el eyaculado) o secretora (ausencia completa o parcial de espermatogénesis a nivel testicular). Para determinar la presencia/ausencia de espermatozoides en el testículo, se requiere realizar un procedimiento invasivo como biopsia testicular o extracción espermática de testículo (TESE). A partir de los resultados obtenidos, es posible determinar el tratamiento más

apropiado para la pareja. Desde el punto de vista andrológico, si el paciente presenta un perfil espermático cualitativa y cuantitativamente adecuado, se recomiendan tratamientos de baja complejidad, como relaciones sexuales programadas o inseminación intrauterina. Sin embargo, en casos de azoospermia obstructiva u oligozoospermia severa, es necesario realizar tratamientos de alta complejidad, como fecundación in vitro (FIV) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). En el caso de los pacientes con azoospermia secretora, la conducta médica será completamente diferente, ya que el paciente no cuenta con espermatozoides propios para realizar los tratamientos antes mencionados, requiriendo donación de semen heterólogo. El flujo de decisiones en cuanto a los tratamientos de reproducción asistida se esquematiza en la Figura 1.3.2. Estos procedimientos tienen un fuerte impacto en la pareja, desde el punto de vista económico, médico y psicológico.

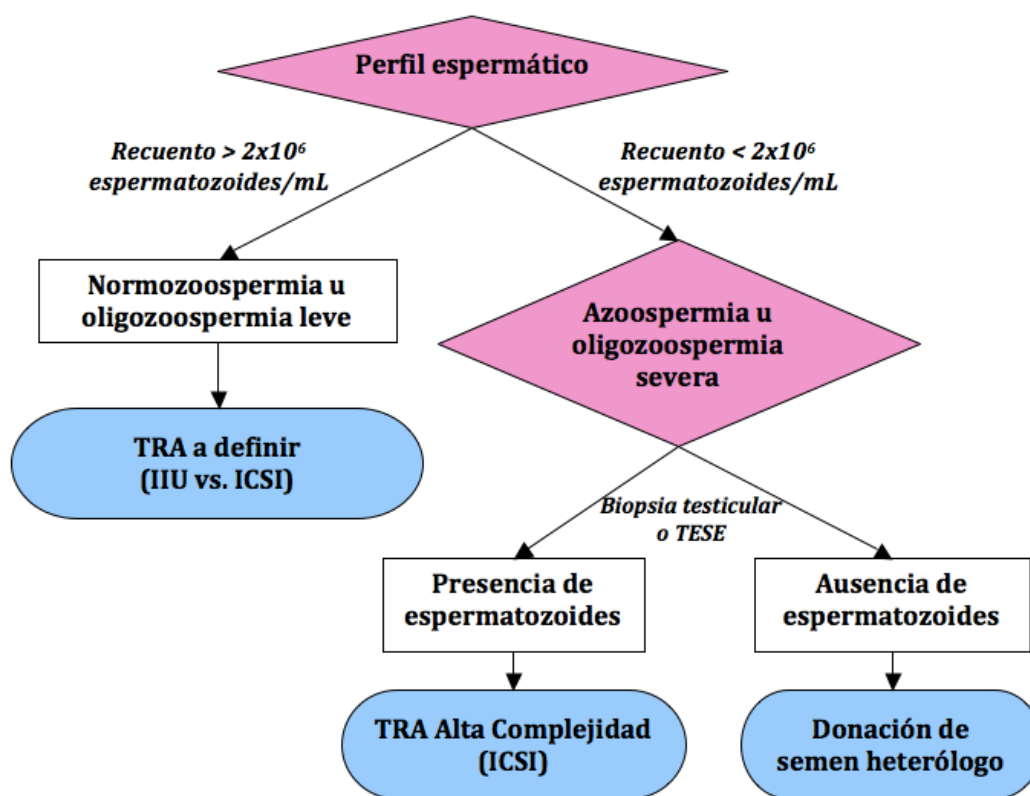


Figura 1.3.2. Diagrama de flujo de los tratamientos de reproducción asistida.

1.3.3. Causas de infertilidad masculina

Las diferentes causas de infertilidad masculina incluyen: alteraciones hormonales, infecciones seminales, agentes tóxicos como quimioterápicos, radiaciones o pesticidas,

estrés oxidativo, lesiones obstructivas de la eyaculación y disfunciones sexuales, entre otras. Se considera que en aproximadamente el 50% de los casos la causa es idiopática y se considera que el paciente presenta esterilidad sin causa aparente (ESCA). En los últimos años se han descrito factores genéticos que afectan la fertilidad, como aneuploidías (síndrome de Klinefelter 47XXY, síndrome de Noonan 46XY, síndrome XYY, disgenesia gonadal mixta 45X/46XY o varones XX), mutaciones puntuales (v.g. mutaciones en el gen CFTR de la fibrosis quística causan agenesia de los conductos deferentes) y microdeleciones del cromosoma Y (Palacios 2009). La importancia del diagnóstico de las causas genéticas de la infertilidad reside en determinar la conducta médica más apropiada, y en asesorar al paciente sobre la transmisión de dichas alteraciones a la prole en caso de realizarse técnicas de reproducción asistida como FIV o ICSI. La Figura 1.3.3 esquematiza el diagrama de flujo a seguir para el diagnóstico de pacientes infértiles. Brevemente, el resultado del recuento espermático determina en primer lugar la necesidad o no de solicitar el cariotipo del paciente, y en caso de ser normal, el análisis de microdeleciones del cromosoma Y. A partir de este último, y de acuerdo al resultado obtenido (deleciones AZFa, AZFb, AZFc o ausencia de deleciones), el médico determinará el pronóstico de los procedimientos de biopsia o TESE, y podrá aconsejar a la pareja sobre la transmisión de la deleción a la prole.

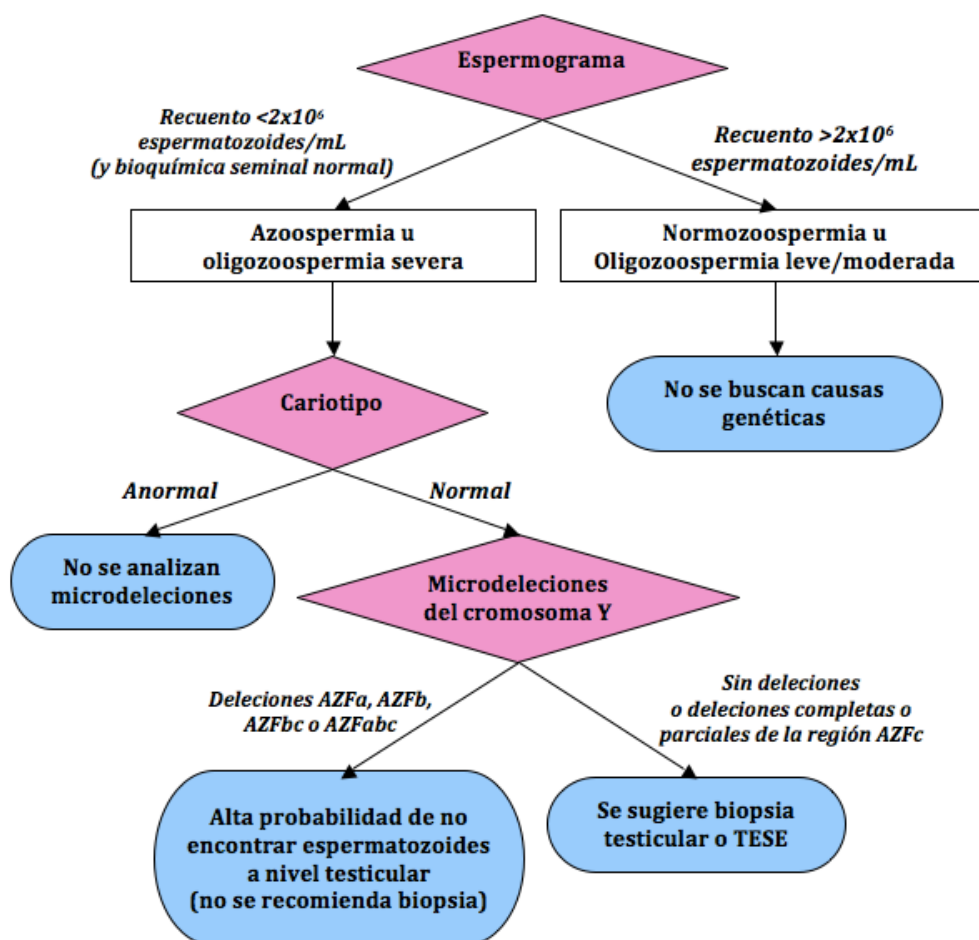


Figura 1.3.3. Diagrama de flujo para el estudio genético de pacientes infértiles.

1.3.4. Microdeleciones clásicas del cromosoma Y

Las microdeleciones en la región AZF del cromosoma Y se han asociado con infertilidad masculina, siendo la segunda causa genética más frecuente después del síndrome de Klinefelter. Hasta el momento, se han descrito al menos 5 deleciones que presentan relevancia clínica (Figura 1.3.4a). Las deleciones clásicas o completas de las regiones AZFa, AZFb y AZFc se definen mediante la ausencia de sitios marcadores de secuencia (STSs), que son marcadores moleculares “anónimos” o localizados en regiones no codificantes. Estos marcadores permiten caracterizar la extensión de una determinada deleción, pero no permiten asociarla con la ausencia de un determinado gen, debido a que por lo general se localizan fuera de los mismos.

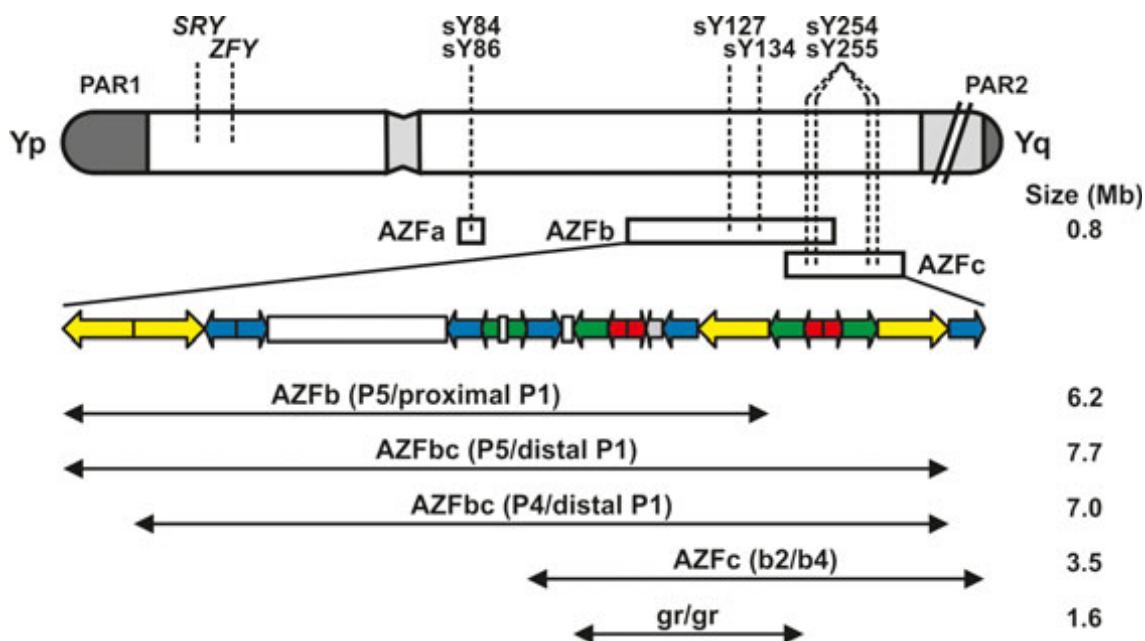


Figura 1.3.4a. Microdeleciones con relevancia clínica (Krausz *et al* 2014)

Las deleciones clásicas de la región AZF se asocian con diferentes escenarios de la espermatogénesis, permitiendo predecir la recuperación de espermatozoides mediante biopsia o TESE (Krausz *et al* 2014). De esta manera, la ausencia de la región AZFa por lo general conduce al síndrome de sólo células de Sertoli (SCOS) (Vogt *et al* 1996). Este síndrome se caracteriza por la ausencia completa de la línea germinal en los túbulos seminíferos, quedando únicamente las células de Sertoli (Figura 1.3.4b). La secuenciación de la región deletada permitió su caracterización detallada, determinando que contiene dos genes funcionales: USP9Y y DDX3Y. La deleción completa de la región AZFa elimina 792 Kb y su prevalencia en pacientes con falla espermatogénica es baja, no superando el 4% (Sun *et al* 2000). La ausencia completa de esta región determina una probabilidad prácticamente nula de recuperar espermatozoides de testículo para realizar el procedimiento de ICSI (Krausz *et al* 2014).

La deleción de la región AZFb (también llamada P5/P1 proximal, por los palíndromos que abarca) también es poco frecuente, presentándose en el 1-5% de los hombres con falla espermatogénica. La deleción completa de esta región elimina 6,2 Mb como resultado de la recombinación homóloga entre los palíndromos P5 y P1 proximal, incluyendo 32 copias de genes y unidades de transcripción (Repping *et al* 2002). La deleción conjunta de las regiones AZFb y AZFc se denomina deleción AZFbc, y se

diferencia según su tamaño y región deletada en: P5/P1 distal de 7,7 Mb y P4/P1 distal de 7 Mb. La deleción AZFbc presenta una prevalencia de 1-3% en pacientes azoospermicos (Krausz *et al* 2014). La deleción completa de las regiones AZFb o AZFbc conduce a azoospermia como consecuencia de SCOS o arresto espermatogénico. Esta última situación se caracteriza por la presencia de células inmaduras de la línea germinal en los túbulos seminíferos, en estadios de espermatogonias, espermatocitos o espermátides (Figura 1.3.4b). Cabe destacar que ninguno de los tipos celulares mencionados resultan aptos para procedimientos de fertilización asistida. El diagnóstico de deleción completa de las regiones AZFb o AZFbc implica que en estos pacientes no será posible recuperar espermatozoides mediante biopsia o TESE (Hopps *et al* 2003). Si bien la bibliografía internacional sugiere la asociación de la deleción AZFb con los escenarios espermatogénicos mencionados, se han reportado casos aislados de criptozoospermia u oligozoospermia en presencia de deleción completa de la región AZFb (Longepied *et al* 2010, Soares *et al* 2012). En su conjunto, ante el diagnóstico de deleciones completas de las regiones AZFa, AZFb o AZFbc, y por lo tanto de imposibilidad de recuperar espermatozoides, el procedimiento de biopsia testicular o TESE no se realizaría en estos pacientes.

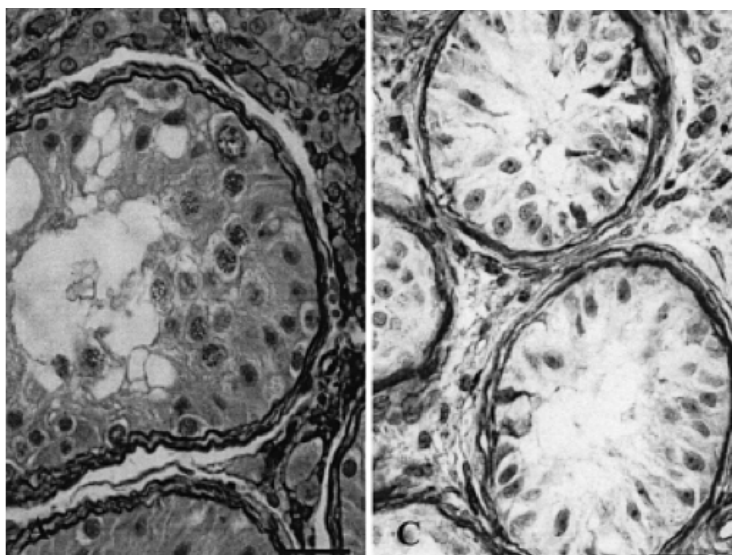


Figura 1.3.4b. Características histológicas del arresto espermatogénico (izquierda) y del síndrome de solo-células Sertoli (derecha) (Blagosklonova *et al* 2000).

Por el contrario, la región AZFc es la más frecuentemente deletada entre los pacientes con azoospermia, alcanzando un 80% de prevalencia. A pesar de ser la región más

estudiada, es la que presenta mayor nivel de incertidumbre acerca de las consecuencias fenotípicas de sus deleciones. Su deleción completa abarca 3,5 Mb, eliminando 12 familias de genes/unidades de transcripción, y surge de la recombinación homóloga entre los amplicones b2 y b4. La deleción completa de la región AZFc o b2/b4⁹ se ha asociado a un amplio espectro de fenotipos que van desde hipoespermatogénesis a detención completa de la misma. A partir de los resultados obtenidos por numerosos grupos a nivel mundial, aún no fue posible determinar los genes localizados en dicha región que están involucrados en la espermatogénesis ni establecer la implicancia de los mismos en la infertilidad masculina.

Como se mencionó previamente, las microdeleciones de las regiones AZFa, AZFb o AZFbc determinan un mal pronóstico para la recuperación de espermatozoides por TESE o biopsia testicular. Por esto, permiten adoptar una conducta médica apropiada, evitando un procedimiento invasivo innecesario en pacientes con azoospermia secretora. Por el contrario, en aproximadamente el 50% de los hombres con deleción completa de la región AZFc es posible recuperar espermatozoides mediante TESE para el procedimiento de ICSI. Es por esto que, hasta el momento, el diagnóstico de deleción completa de la región AZFc no permite tomar una decisión médica precisa, a diferencia de las otras deleciones descritas (Ferlin *et al* 2006, Krausz *et al* 2014).

1.3.5. Microdeleciones parciales de la región AZFc

En la región AZFc, además de la deleción b2/b4 que elimina completamente esta región, también se han descrito deleciones parciales tanto entre hombres infértiles como fértiles. Los tipos de deleción más frecuentemente encontrados en las poblaciones estudiadas son gr/gr, b1/b3 y b2/b3. Las mismas se analizan mediante marcadores STSs localizados en las regiones AZFb y AZFc (Figura 1.3.5.1). La nomenclatura de dichas deleciones se debe a los amplicones intervinientes en la recombinación y posterior eliminación del segmento intermedio entre ambos. Por ejemplo, la deleción b2/b3 se refiere a la recombinación homóloga entre los amplicones b2 y b3 con la consecuente eliminación de los amplicones intermedios.

⁹ La nomenclatura b2/b4 surge de los amplicones incluidos en la deleción, que se explicará más adelante en detalle

Dado que determinadas deleciones no pueden ser explicadas mediante un único mecanismo de recombinación-delección, es necesario plantear un paso previo de inversión, como se enunciará más adelante. Todas las deleciones anteriormente mencionadas determinan la eliminación de una o más copias de genes candidatos de la espermatogénesis localizados en la región AZFc, cuyas funciones individuales son aún poco claras (Figura 1.3.5.1).

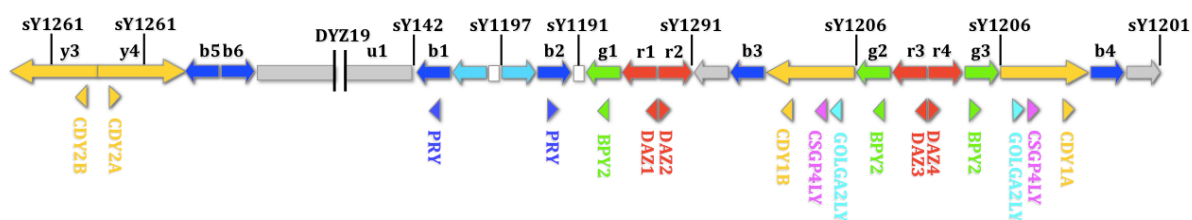


Figura 1.3.5.1. Esquema de los marcadores utilizados para el diagnóstico de deleciones parciales en la región AZFc y los genes incluidos en las mismas.

La primera deleción parcial descubierta, la deleción gr/gr (ausencia del marcador sY1291), ha sido descrita como una deleción de 1,6 Mb entre los palíndromos P1 y P2 (Figura 1.3.4a) (Repping *et al* 2003). Ésta determina la eliminación de dos copias del gen DAZ, una copia de los genes CDY1, BPY2, GOLGA2LY y CSGP4LY, y se considera que predispone a falla espermatogénica en algunas poblaciones (Krausz *et al* 2014). Sin embargo, numerosos trabajos de investigación han estudiado dicha asociación potencial presentando resultados contradictorios. Dependiendo de la composición étnica de la población analizada, y de los criterios de inclusión y exclusión de los pacientes en los trabajos, se encontró una fuerte asociación de la deleción gr/gr con falla espermatogénica en algunas poblaciones (como por ejemplo italiana, española y portuguesa), mientras que en otras se evidenció que su prevalencia era similar en hombres fértiles e infértiles (como en la población brasilera y chilena) (Navarro-Costa *et al* 2010). Un caso particular se evidenció en el grupo étnico Han, en China, donde se vio que la deleción gr/gr era un polimorfismo característico de los hombres que pertenecen al Hg Q1, descartando su asociación con falla espermatogénica (Navarro-Costa *et al* 2010, Yang *et al* 2010). Repping *et al* (2003) postularon que la deleción gr/gr se genera mediante el mecanismo de NAHR entre los amplicones verde y rojo, según se esquematiza en la Figura 1.3.5.2. Si bien se han descrito diferentes sub-tipos de

deleciones gr/gr, que incluyen diferentes copias del gen *DAZ*, aún no ha sido posible identificar la implicancia clínica de cada una de ellas (Ye *et al* 2013).

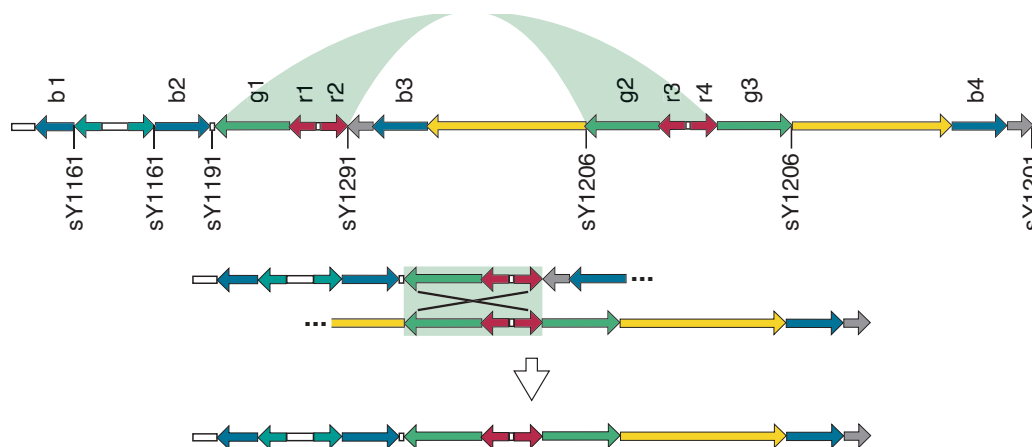


Figura 1.3.5.2. Mecanismo de generación de la deleción gr/gr (Repping *et al* 2003)

La deleción b1/b3 (ausencia de los marcadores sY1197, sY1191 y sY1291) es una deleción de 1,6 Mb (Repping *et al* 2003). Incluye la pérdida de dos copias de los genes *DAZ*, de la totalidad de las copias del gen *PRY*, y una copia del gen *BPY2*, y se encuentra asociada con un aumento del riesgo de falla espermatogénica (Rozen *et al* 2012). Repping *et al* (2003) postularon que, al igual que la deleción gr/gr, la deleción b1/b3 se genera mediante el mecanismo de NAHR entre los amplicones azules b1 y b3, según se esquematiza en la Figura 1.3.5.3.

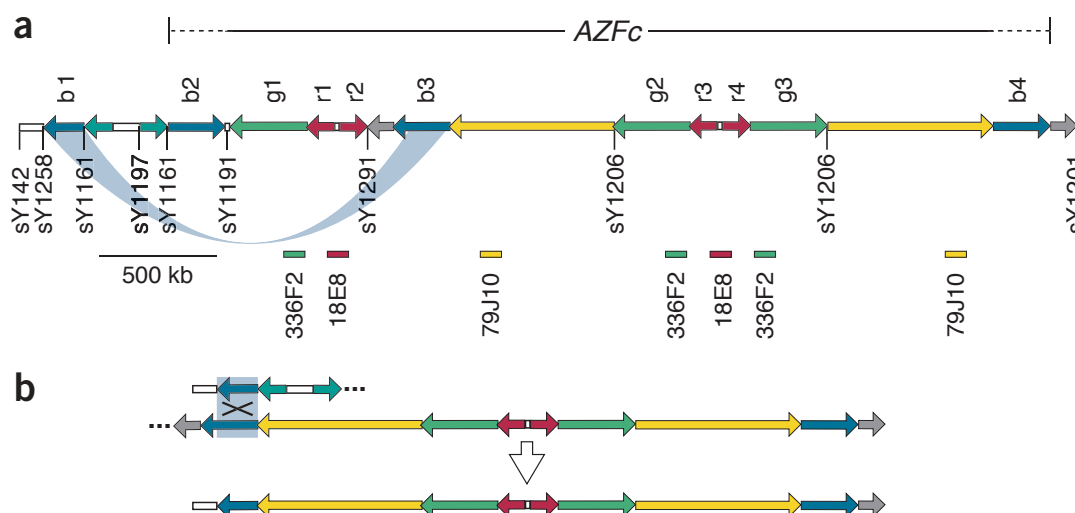


Figura 1.3.5.3. Mecanismo de generación de la deleción b1/b3 (Repping *et al* 2003)

Por último, la deleción b2/b3 (ausencia del marcador sY1191) es una deleción de 1,8 Mb que ha sido identificada tanto en hombres fértiles como infértiles. Determina la eliminación de dos copias de los genes *DAZ* y *BPY2*, y una copia de los genes *CDY1*, *GOLGA2LY* y *CSGP4LY*. Si bien la deleción b2/b3 parece estar fijada en el Hg N, no estaría asociada con una disminución en la producción de espermatozoides en este Hg (Repping *et al* 2004). La deleción fijada en el Hg N se detectó también en el Hg Q3, presentando consecuencias fenotípicas desconocidas (Repping *et al* 2006). Repping *et al* (2004) postularon que la deleción b2/b3 se genera mediante el mecanismo de NAHR entre los amplicones azules b2 y b3, con un paso intermedio de inversión, según se esquematiza en la Figura 1.3.5.4.

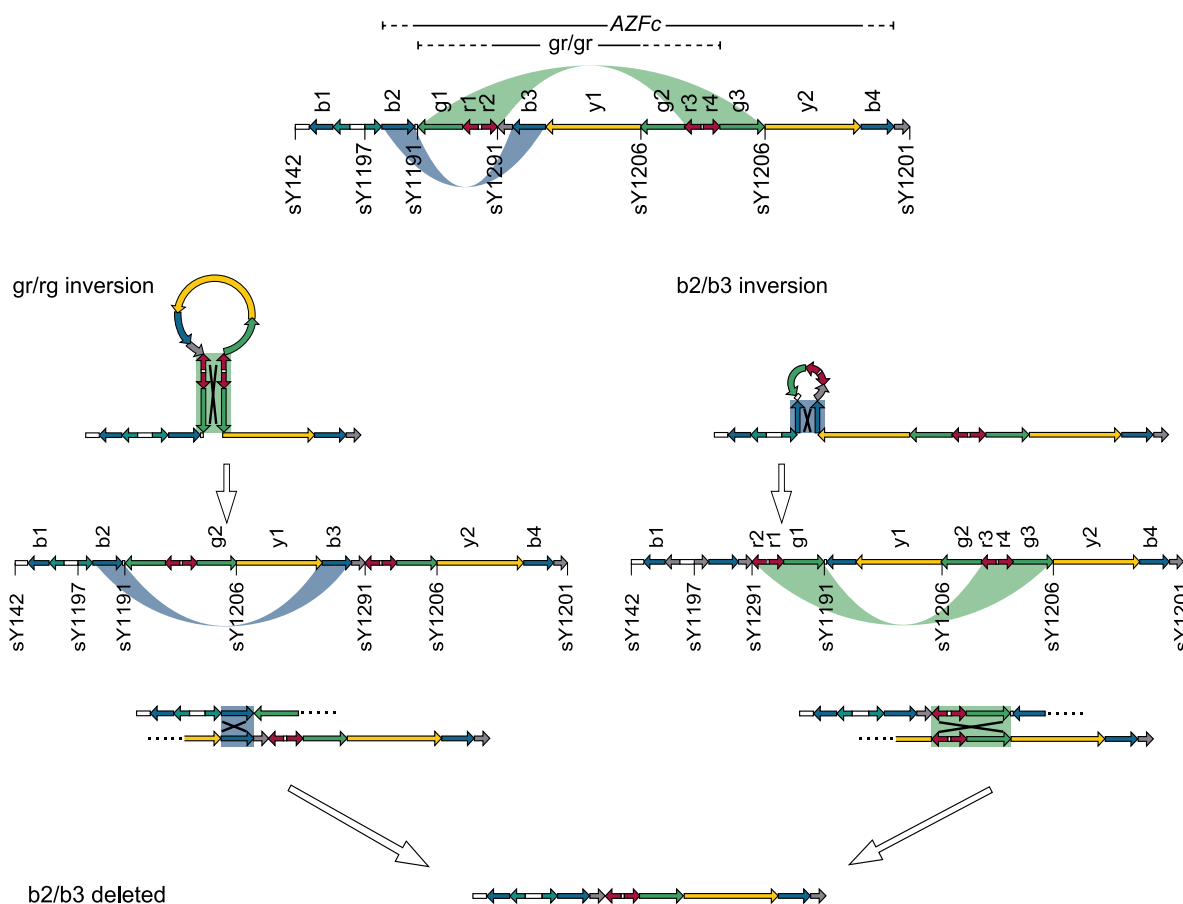


Figura 1.3.5.4. Mecanismo de generación de la deleción b2/b3 (Repping *et al* 2004)

1.3.6. Recomendaciones internacionales para el estudio de microdeleciones

La Academia Europea de Andrología (EAA) junto con la Red de Calidad en Genética Molecular (EMQN), establecieron en el año 2004 los lineamientos para la evaluación genética de pacientes infértiles mediante análisis de microdeleciones en las regiones AZFa, AZFb y AZFc. Dichos lineamientos sugieren el análisis de dos marcadores STSs por cada región estableciendo así una batería mínima conformada por los marcadores sY84, sY86, sY127, sY134, sY254 y sY255, además de los controles internos SRY y ZRY (Figura 1.3.4a) (Simoni *et al* 2004). La actualización de dichos lineamientos, sugiere el análisis de pacientes azoospermicos u oligozoospermicos severos únicamente, cuyos recuentos sean menores a 1×10^6 espermatozoides/mL (Krausz *et al* 2014). Con respecto a los requerimientos mínimos de marcadores para el análisis, se sugiere la adición del marcador sY1291 para la detección de la deleción parcial gr/gr, a la batería de marcadores básicos ya empleados. Se seleccionó únicamente esta deleción parcial, y no las deleciones b1/b3 y b2/b3, debido a que demostró ser la única que aumenta el riesgo de falla espermatogénica. Sin embargo, se hizo hincapié en la necesidad de determinar el Hg al cual pertenece el paciente ya que la deleción gr/gr se encontraría fijada como deleción constitutiva entre la población fértil en ciertos Hgs (v.g. Hgs D2b, Q3 y Q1) (Krausz *et al* 2014).

1.3.7. Meta-análisis de otras poblaciones

A partir de las sugerencias establecidas por la EAA/EMQN, numerosos estudios se llevaron a cabo en diferentes poblaciones con el objetivo de establecer la relación entre las microdeleciones en la región AZF y la falla espermatogénica, teniendo en cuenta la composición étnica de la población en estudio. A partir del año 2004, con la caracterización tanto de las microdeleciones clásicas como parciales, las mismas se analizaron en hombres fértiles y pacientes infértiles con el objetivo de determinar su carácter patogénico o polimórfico (Simoni *et al* 2004, Repping *et al* 2004). Por ejemplo, en India, los resultados obtenidos en pacientes infértiles indican que empleando únicamente los marcadores recomendados por la EAA/EMQN, solo es posible detectar el 30% de los pacientes con deleciones reales en la región AZF. Por lo tanto, se sugiere el empleo de marcadores étnico-específicos para el estudio de poblaciones cuya composición difiera de la población de referencia europea (Sachdeva *et al* 2011).

Tabla 1.3.7. Estudios de asociación entre deleciones en la región AZFc e infertilidad masculina (adaptado y actualizado de Navarro-Costa et al (2010)).

	Deleción	Población	Referencia
Asociación	gr/gr	Holandesa	(Repping et al 2003)
	gr/gr	Española	(de Llanos et al 2005)
	gr/gr	Italiana	(Ferlin et al 2005)
	gr/gr	Italiana	(Giachini et al 2005)
	gr/gr	Australiana	(Lynch et al 2005)
	gr/gr	Portuguesa	(Navarro-Costa et al 2007)
	gr/gr	China	(Yang et al 2008)
	gr/gr	Italiana	(Giachini et al 2008)
	b1/b3, b2/b3	India	(Shahid et al 2011)
	gr/gr	Europea	(Fernandes et al 2004)
	gr/gr	China	(Wu et al 2007)
	b2/b3	Marroquí	(Eloualid et al 2012)
No asociación	gr/gr	Francesa	(Machev et al 2004)
	gr/gr, b1/b3, b2/b3	Alemana	(Hucklenbroich et al 2005)
	gr/gr	Mestiza	(Ravel et al 2006)
	gr/gr	Sri Lanka	(Fernando et al 2006)
	gr/gr	China	(Zhang et al 2006)
	gr/gr	Brasilera	(Carvalho et al 2006)
	gr/gr	Japonesa	(De Carvalho et al 2006)
	gr/gr	China	(Zhang et al 2007)
	gr/gr	China	(Wu et al 2007)
	gr/gr	China	(Lin et al 2007)
	gr/gr	Chilena	(Lardone et al 2007)
	gr/gr	Marroquí	(Imken et al 2007)
	gr/gr	Mestiza	(Stouffs et al 2008)
	gr/gr	Mestiza	(Ravel et al 2009)
	gr/gr	Europea	(Krausz et al 2009)
	gr/gr	Malasia	(Almeamar et al 2013)
	gr/gr	India	(Shahid et al 2011)
	gr/gr, b1/b3, b2/b3	Chilena	(Lardone et al 2013)
	gr/gr	Palestina	(Shaqalaih et al 2009)
	gr/gr	Marroquí	(Eloualid et al 2012)
	gr/gr, b2/b3	China	(Lu et al 2009)
	b2/b3	Italiana	(Giachini et al 2008)
	b2/b3	Europea	(Fernandes et al 2004)
b2/b3	China	(Wu et al 2007)	

Como puede observarse a partir de los estudios previos, dependiendo de la población estudiada, las deleciones parciales se han asociado o no a falla espermatogénica. Los resultados obtenidos dependen tanto de la composición étnica de la población estudiada, como de los criterios de selección de pacientes y controles, y de la complementación del estudio con la determinación de Hg. Sin embargo, hasta el momento no ha sido posible establecer de manera inequívoca la correlación entre las microdeleciones parciales de la región AZFc y la infertilidad masculina.

Además de los estudios de asociación entre deleciones parciales e infertilidad masculina, se observó que la arquitectura del cromosoma Y varía entre haplogrupos en términos de deleciones constitutivas y de longitud de la región heterocromática. En particular, se estudiaron las 47 ramas principales de la genealogía del cromosoma Y, y se observó que no solo la heterocromatina distal (Yq12) varía en su longitud entre Hgs, sino que también se observaron patrones de deleción característicos en determinados Hgs (v.g. Hg Q3 y N presentan la arquitectura c35, determinada por la deleción b2/b3 en la región AZFc). Las variaciones detectadas no se encontraban asociadas con aparentes consecuencias fenotípicas (Figura 1.3.7.2) (Repping *et al* 2006).

La variabilidad que demostraron los estudios de la región AZF del cromosoma Y en diferentes poblaciones y haplogrupos, generan la necesidad de analizar la frecuencia de las microdeleciones (tanto completas como parciales) y su asociación con falla espermatogénica en cada población, en el contexto de su composición étnica y del Hg al cual pertenece el paciente. Dado que la composición étnica de cada población es diferente, es necesario el estudio tanto de hombres fértiles como infértiles de dicha población, para poder diferenciar entre microdeleciones constitutivas que se presenten como polimorfismos en la población de aquellas deleciones que afecten la fertilidad y la espermatogénesis.

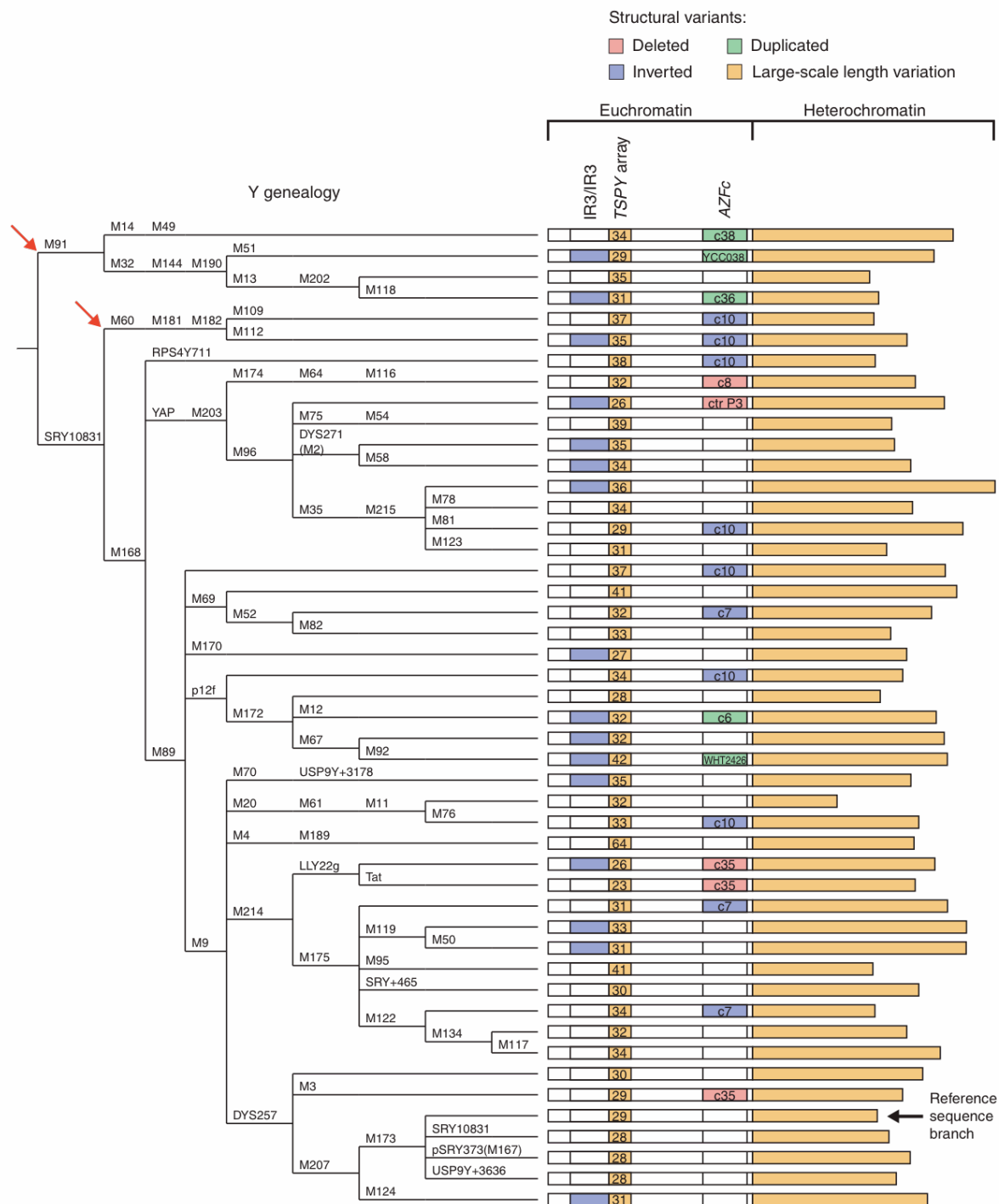


Figura 1.3.7.2. Variación de la longitud de la heterocromatina y arquitectura cromosómica en la genealogía del cromosoma Y (Repping et al 2006)

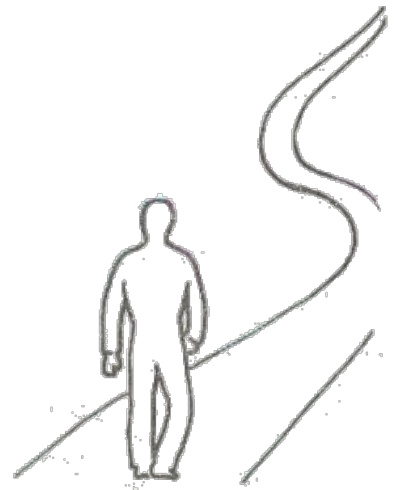
1.3.8. AZF en Argentina y la medicina traslacional

En nuestro país, el análisis de microdelecciones clásicas en la región AZF es solicitado prácticamente de rutina por médicos andrólogos, y evaluada de la misma manera por centros de análisis genético-molecular tanto públicos como privados. Sin embargo,

dichos análisis se llevan a cabo siguiendo estrictamente las recomendaciones de la EAA, derivadas de estudios realizados en población europea. Como se mencionó anteriormente, la variación en la composición étnica de la población no solo repercute en la frecuencia y tipo de deleciones detectadas, sino también en la correlación de las misma con el fenotipo del paciente. Si bien nuestra población es mayoritariamente europea, desde el punto de vista de los linajes masculinos, presenta el aporte del Hg nativo americano Q1a2a1a1 que la diferencia de las poblaciones estudiadas hasta la actualidad. Por lo tanto, resulta necesario el estudio en la población argentina tanto de hombres fértiles como infértiles. Esta situación determina la necesidad de caracterizar las deleciones presentes de manera polimórfica en nuestra población y también determinar la correlación con falla espermatogénica en pacientes infértiles. En el marco de la medicina traslacional, dicha investigación permitirá aplicar los hallazgos de laboratorio al diagnóstico y asesoramiento del paciente, en cuanto a su capacidad reproductiva y la posible transmisión de su patología a la descendencia.

- Introducción -

Hipótesis y Objetivos



“Solo sé que no sé nada”

Sócrates

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A partir de lo expuesto anteriormente, se plantearon las siguientes **hipótesis** de trabajo:

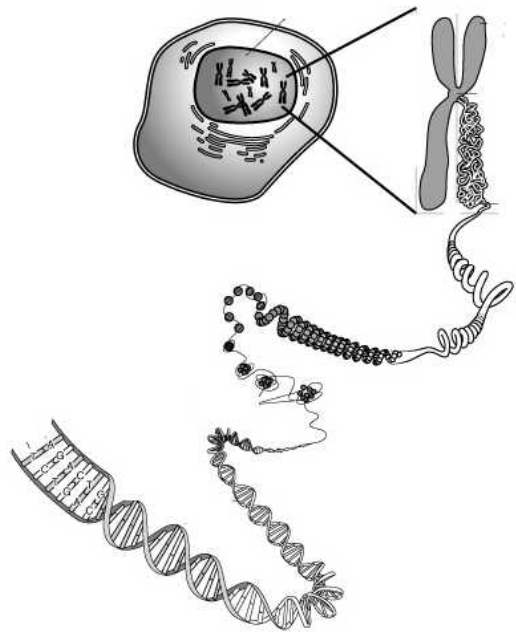
- ✓ Las características intrínsecas del cromosoma Y en el Hg nativo americano Q1a2a1a1 predisponen a deleciones y/o duplicaciones en la región AZF
- ✓ La presencia de deleciones constitutivas en la región AZF en hombres pertenecientes al Hg nativo americano Q1a2a1a1 afecta su fertilidad
- ✓ La prevalencia de microdeleciones en la población argentina depende de su composición étnica y es diferente de lo descrito para otras poblaciones
- ✓ El efecto de las deleciones sobre la calidad espermática y la falla espermatogénica depende del haplogrupo al que pertenece el paciente
- ✓ Los marcadores recomendados para el análisis de microdeleciones no serían informativos para la población argentina dada la diferencia en su composición étnica
- ✓ La identificación de nuevos marcadores permitirá correlacionar las deleciones en la región AZFc con falla espermatogénica

A partir de las hipótesis planteadas, el **objetivo general** del presente trabajo de tesis fue estudiar microdeleciones de la región AZF del cromosoma Y en hombres fértiles e infértiles pertenecientes a diferentes Hgs de la población argentina. Para llevar a cabo este objetivo, se diseñó un trabajo experimental observacional, prospectivo y transversal, basándose en los siguientes **objetivos específicos**:

- ✓ Determinar presencia de microdeleciones constitutivas en hombres fértiles del Hg nativo americano Q1a2a1a1
- ✓ Determinar presencia de microdeleciones en pacientes de la población argentina con infertilidad idiopática
- ✓ Determinar presencia de microdeleciones en pacientes de la población argentina con azoospermia no obstructiva u oligozoospermia severa
- ✓ Correlacionar las deleciones halladas con el efecto sobre la espermatogénesis
- ✓ Asociar las alteraciones halladas con los haplogrupos de cromosoma Y
- ✓ Diferenciar microdeleciones polimórficas de aquellas que afectan la espermatogénesis, para su posterior utilidad en el diagnóstico de pacientes infértiles
- ✓ Desarrollar un sistema que permita mejorar el diagnóstico genético-molecular de los pacientes con infertilidad idiopática

- Hipótesis y Objetivos -

Materiales y Métodos



*“El hombre nunca sabe de lo que es capaz
 hasta que lo intenta”
 Charles Dickens*

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras analizadas

Para abarcar el estudio de los objetivos planteados se analizaron 500 muestras de individuos no relacionados de sexo masculino, que se agruparon según los siguientes criterios:

- ✓ Controles comerciales con deleciones en la región AZF (N=7)
- ✓ Hombres fértiles pertenecientes al Hg Q3 de poblaciones nativo americanas, y de la población urbana de Argentina y países limítrofes (N=240), que se analizaron con el objetivo de evaluar posibles polimorfismos en este haplogrupo
- ✓ Pacientes en consulta por infertilidad con indicación para la realización de espermograma (N=170), que se analizaron con el objetivo de evaluar microdeleciones asociadas a infertilidad masculina
- ✓ Pacientes en tratamiento por infertilidad que hayan sido diagnosticados como azoospermicos u oligozoospermicos severos (N=90), que se analizaron con el objetivo de evaluar microdeleciones asociadas a falla espermatogénica

Además se incluyeron muestras femeninas como controles negativos y de especificidad (N=10).

Tabla 2.1. Resumen de las muestras analizadas

Grupo	Origen	N	Origen
Hombres fértiles	Paternidades confirmadas	37	Buenos Aires, Salta, Formosa, Chaco, Santa Fe, Corrientes, Misiones, Neuquén, Río Negro y Chubut
	Donantes de sangre	44	Bolivia, Perú, Paraguay y Argentina
	Poblaciones aborígenes	159	Wichí, Toba, Pilagá, Mocoví, Tehuelche, Mapuche y Mbyá-Guaraní
Pacientes infértiles	Infertilidad general	170	Población urbana de Argentina
	Azo/Oligozoospermicos	90	Población urbana de Argentina

Todas las muestras se tomaron de manera voluntaria, previa explicación al donante sobre los objetivos y alcances del estudio, mediante la firma de un consentimiento informado. Todas las investigaciones se llevaron a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki 2008.

2.1.1. Características de las muestras analizadas

2.1.1.1. Muestras control

Las muestras que se emplearon como controles de deleciones para la puesta a punto de las reacciones y la confirmación de los resultados, fueron previamente caracterizadas por Sun *et al* (2000) y Repping *et al* (2002, 2003, 2004 y 2006). El ADN extraído a partir de las líneas celulares NA18332, NA18333, NA20434, NA15503, NA15594 y NA15683, fue adquirido a Coriell Cell Repository. El ADN extraído a partir de la línea celular GM20433 fue cortesía del laboratorio del Dr. David Page (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA). La Tabla 2.1.1.1 resume las características de las muestras control analizadas.

Tabla 2.1.1.1. Características de las muestras control

ID Coriell	ID Publicación	Delección	Hg	Referencia
NA18332	WHT4396	P5/P1 proximal (AZFb)	R1b	Repping <i>et al</i> 2002
NA18333	WHT2943	P5/P1 distal (AZFbc)	K*	Repping <i>et al</i> 2002
NA20434	WHT3453	b1/b3	R1a	Repping <i>et al</i> 2003
NA20433	WHT2996	AZFa	L	Sun <i>et al</i> 2000
NA15503	PD066	b2/b3	Q3	Repping <i>et al</i> 2004
NA15594	PD024	b2/b3	Q3	Repping <i>et al</i> 2004
NA15683	PD296	gr/gr	Q3	Repping <i>et al</i> 2003

2.1.1.2. Población urbana fértil

Las muestras de hombres pertenecientes a la población urbana de Argentina fueron divididas en 2 grupos, según su procedencia:

- A. Individuos cuyas muestras fueron remitidas o que concurrieron al Servicio de Huellas Digitales Genéticas (SHDG) para la realización de estudios de paternidad, ya sea en forma privada o por medio de orden judicial. En todos los casos, las muestras analizadas fueron sangre en papel de filtro Whatman® 3MM o hisopado bucal. Los criterios de inclusión de las muestras fueron la pertenencia al Hg Q3, y la confirmación del vínculo biológico de paternidad mediante análisis genético. Para ello, se seleccionaron 37 muestras según tipo de causa (paternidad), resultado del estudio (inclusión) y Hg (Q3) a partir de un total de 658 muestras de hombres no

relacionados analizadas en el SHDG en el período 2009-2011. El número de muestras y su procedencia se resume en la Tabla 2.1. Este grupo se denominó PATERNIDADES CONFIRMADAS dentro del grupo de hombres fértiles.

B. Individuos cuyas muestras fueron tomadas en el Servicio de Hemoterapia del Hospital Materno-Infantil “Ramón Sarda” en el período 2012-2013 y fueron remitidas al SHDG por intermedio de la Dra. Julieta Trinks en el marco del proyecto “Predictores genéticos del tratamiento y persistencia de los virus de la hepatitis B (HBV) y C (HCV) en una población representativa de la población argentina”. Dichas muestras fueron tomadas a donantes hombres (no infectados/ni enfermos), y remitidas a nuestro laboratorio como ADN extraído. En todos los casos fueron individuos de sexo masculino presumiblemente fértiles que expresaron ser las parejas sexuales de las embarazadas hospitalizadas en dicha institución, y que descartaron haber requerido técnicas de reproducción asistida para lograr el embarazo. En relación a las condiciones socioeconómicas, la población que asiste a dicho hospital se compone de individuos de escasos recursos, 30% de los cuales habita en villas de emergencia de la Ciudad o del Gran Buenos Aires, y el 85% corresponde a inmigrantes provenientes de otros países latinoamericanos: 75% bolivianos, 7% paraguayos y 3% peruanos.

Del total de las muestras remitidas a nuestro laboratorio (N=220), se realizó el análisis del Hg de cromosoma Y, seleccionándose para su posterior análisis únicamente aquellas muestras que pertenecen al Hg Q (N=44). Este grupo se denominó DONANTES dentro del grupo de hombres fértiles.

2.1.1.3. Poblaciones nativo americanas

Las muestras de individuos no relacionados de sexo masculino pertenecientes a poblaciones nativo americanas fueron tomadas en los asentamientos permanentes de dichas poblaciones por integrantes del SHDG o remitidas al mismo en el período 1992-2010. Las poblaciones que se emplearon en el presente trabajo fueron: Wichí, Toba (de Chaco y Santa Fé), Pilagá, Mocoví (Mataco-Guaicurú), Tehuelches y Mapuches (Mapudungun), y Mbyá-Guaraní (Tupí-Guaraní). La ubicación geográfica de las poblaciones estudiadas se encuentra esquematizada en la Figura 2.1.1.2. Dependiendo

de la procedencia, se tomaron muestras de saliva en buffer para extracción salina, o fueron remitidas al SHDG como sangre en papel de filtro o FTA®. A partir del total de muestras de comunidades aborígenes (N=256), se seleccionaron únicamente aquellas pertenecientes al Hg Q (N=159). Los individuos incluidos en el estudio fueron tanto hombres con hijos declarados como de la población general con fertilidad desconocida. Este grupo se denominó ABORÍGENES dentro del grupo de hombres fértiles.

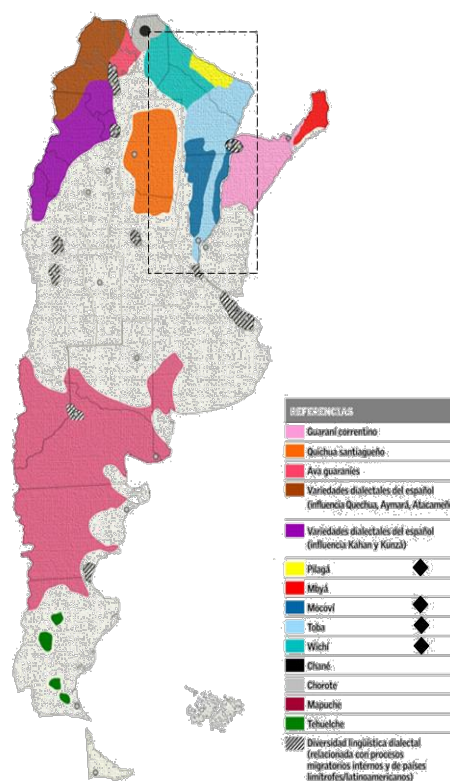


Figura 2.1.1.3. Mapa de Argentina representativo de la localización de las comunidades aborígenes muestreadas

2.1.1.4. Pacientes del laboratorio de fertilidad

Las muestras provenientes del laboratorio de fertilidad se tomaron en la Sección de Citología del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), ubicado en el Hospital de Clínicas “José de San Martín”. La toma de muestra se realizó en el marco del proyecto “El Laboratorio de Fertilidad en el desarrollo y aplicación de la tecnología bioquímica en la era del ICSI” dirigido por la Dra. Gabriela Mendeluk. Los pacientes se reclutaron en forma consecutiva durante el período 12/2011-08/2012 según el siguiente criterio de inclusión: consulta por infertilidad primaria sin causa aparente (v.g. vasectomía, infección seminal, radio o quimioterapia).

Los criterios de exclusión de los pacientes se basaron en la causa de la derivación para la el espermograma: de rutina, pre-ocupacional, pre-operatoria por varicocele, pre o post vasectomía, infección seminal, impotencia sexual o infertilidad secundaria. A todos los pacientes se les realizó el espermograma completo (volumen de eyaculado (mL), recuento espermático (espermatozoides/mL), movilidad (%), vitalidad (%), morfología (%)) según los criterios OMS 2010. Los valores de referencia internacionales fueron confirmados para la población argentina por el Laboratorio de Fertilidad y se detallan en la Tabla 2.1.1.3. Los parámetros citológicos del semen se analizaron en el Laboratorio de Fertilidad del Hospital de Clínicas, por personal del mismo.

Para el análisis molecular, se tomaron muestras de semen remanentes de la labor asistencial (aprox. 50 µL) que fueron colocadas sobre papel de filtro Whatman® 3MM o hisopo, y secados a temperatura ambiente. Todas las muestras fueron tratadas de manera anónima mediante un código numérico asignado por el Laboratorio de Fertilidad. Todas las muestras derivadas fueron analizadas para microdeleciones del cromosoma Y (N=170). Se estableció un tamaño muestral mínimo de 139 pacientes sobre la base del número de hombres en edad reproductiva (15-64 años) de la población argentina (censo INDEC 2010) y el porcentaje de estos hombres con alteración de la fertilidad (15%) (www.netquest.com). Este grupo se denominó INFERTILIDAD.

Tabla 2.1.1.4. Límite inferior de referencia según OMS 2010 (percentilo 5 y confianza del 95%).

Parameter	Lower reference limit
Semen volume (ml)	1.5 (1.4–1.7)
Total sperm number (10 ⁶ per ejaculate)	39 (33–46)
Sperm concentration (10 ⁶ per ml)	15 (12–16)
Total motility (PR + NP, %)	40 (38–42)
Progressive motility (PR, %)	32 (31–34)
Vitality (live spermatozoa, %)	58 (55–63)
Sperm morphology (normal forms, %)	4 (3.0–4.0)
Other consensus threshold values	
pH	≥7.2
Peroxidase-positive leukocytes (10 ⁶ per ml)	<1.0
MAR test (motile spermatozoa with bound particles, %)	<50
Immunobead test (motile spermatozoa with bound beads, %)	<50
Seminal zinc (µmol/ejaculate)	≥2.4
Seminal fructose (µmol/ejaculate)	≥13
Seminal neutral glucosidase (mU/ejaculate)	≥20

2.1.1.5. Pacientes azoospermicos y oligozoospermicos severos

Las muestras de pacientes azoospermicos no obstructivos u oligozoospermicos severos fueron tomadas a pacientes que concurrieron al Servicio de Fertilidad Matrimonial, bajo la dirección del Dr. Ernesto Gómez Pasanante, o de Urología, bajo la Dirección del Dr. Osvaldo Mazza, en colaboración con el Dr. Mariano Cohen y la Dra. Florencia Fulco. Ambas unidades asistenciales pertenecen al Hospital de Clínicas “José de San Martín” de la Universidad de Buenos Aires. Las muestras fueron tomadas durante el período 12/2012 y 12/2013. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado autorizando el análisis genético de la muestra. El criterio de inclusión de los pacientes en el estudio fue al menos dos resultados de recuento espermático menor a 2×10^6 espermatozoides/mL de eyaculado. Se excluyeron del estudio aquellos pacientes con condiciones preexistentes que afectaran la fertilidad (v.g. vasectomía, infección seminal, radioterapia, entre otros). A partir de la historia clínica de los pacientes, se registraron los siguientes parámetros: resultado del espermograma (recuento, morfología y movilidad), resultado de la biopsia testicular (en caso de haber sido realizada), cariotipo, u otra información relevante a la posible causa de falla espermatogénica. Para el análisis molecular, se tomaron muestras de sangre por punción digital que fueron colocadas sobre papel de filtro Whatman® 3MM y secadas a temperatura ambiente. Todas las muestras fueron tratadas de manera anónima mediante el empleo de un código numérico. Este grupo se denominó AZOOSPERMIA.

2.2. Métodos

A partir de los grupos definidos en el punto anterior, se diagramó un flujo de trabajo que permita diferenciar aquellas microdeleciones del cromosoma Y que se encuentran como polimorfismos de aquellas que están asociadas a infertilidad masculina y/o falla espermatogénica en nuestra población. La Figura 2.2 esquematiza el diagrama de flujo propuesto para el análisis. A partir de las muestras seleccionadas, con la finalidad de analizar marcadores moleculares, se seleccionó el método de extracción de ADN más adecuado de acuerdo a cada tipo de muestra (sangre, saliva o semen). El ADN extraído se cuantificó mediante PCR cuantitativa en Tiempo Real. Las muestras se sometieron a un análisis sistemático para determinar el Hg al cual pertenecen, la presencia/ausencia de deleciones completas de las regiones AZFa, AZFb y AZFc, y de deleciones parciales de la región AZFc. Aquellas muestras que presentaron deleción se analizaron en profundidad con respecto a su composición génica, número y tipo de copias de los principales genes, y extensión de la deleción detectada. A continuación se describen los fundamentos, aplicación y resultados posibles de los métodos empleados. Los protocolos para cada uno de los métodos se detallan en el Anexo I: Protocolos.

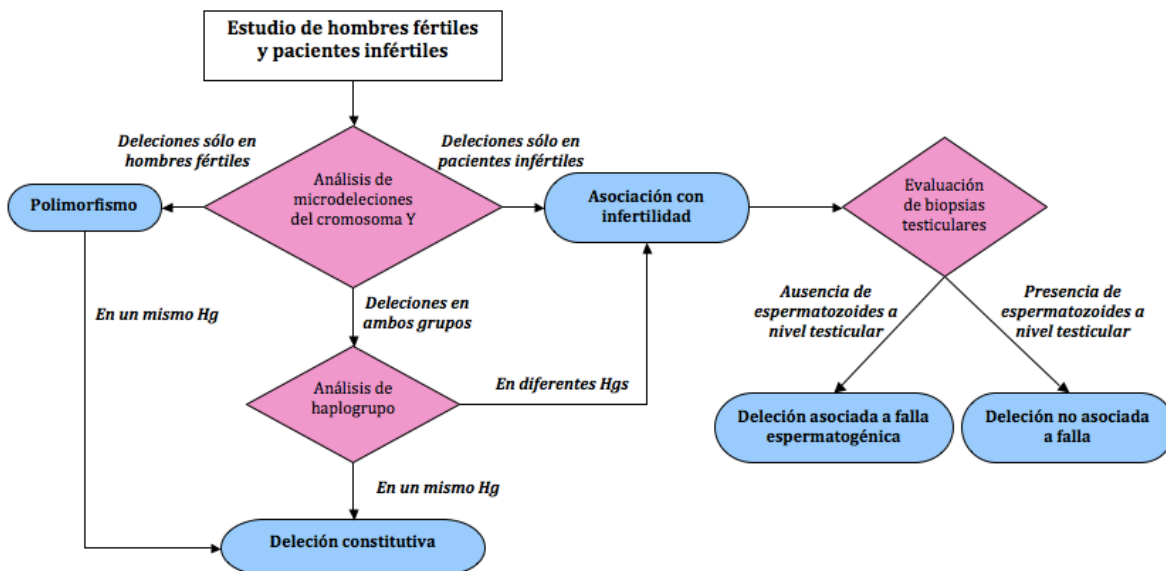


Figura 2.2. Diagrama de flujo para el estudio de hombres fértiles y pacientes infértiles.

2.2.1. Extracción de ADN

El método más adecuado para la extracción de ADN fue determinado por el tipo de muestra biológica.

Las muestras de sangre depositadas sobre papel de filtro Whatman® 3MM o hisopado bucal fueron extraídas mediante un método semi-automatizado con el sistema Maxwell®, según las indicaciones del fabricante. Este sistema purifica y concentra el ADN a partir de células previamente lisadas con TEC-SDS 0,5% y Proteinasa K. El fundamento del método es el empleo de partículas paramagnéticas que adhieren el ADN en las condiciones iónicas generadas por el Buffer de Lisis. El ADN es liberado, luego de lavados consecutivos, en un Buffer de Elusión de menor fuerza iónica. Esta metodología permite obtener ADN con alto grado de pureza y en un rango acotado de concentraciones (dado que las partículas magnéticas limitan la cantidad de ADN extraído).

A partir de las muestras de semen depositadas sobre papel de filtro Whatman® 3MM o hisopo, el ADN fue extraído mediante el método semi-automatizado Maxwell® con el agregado previo de DTT 1M, con el objetivo de romper las células espermáticas durante la fase de lisis celular.

Las muestras de semen de pacientes azoospermicos, debido a su menor contenido celular, fueron extraídas mediante extracción orgánica y concentradas por columnas Microcon, que permiten recuperar la totalidad del ADN extraído.

La extracción de ADN a partir de muestras de saliva se realizó de manera manual con la técnica de “salting out” previamente descripta (Quinque *et al* 2006).

2.2.2. Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN extraído se realizó mediante PCR en Tiempo Real usando los sistemas comerciales Plexor® HY o Quantifiler® Human en el equipo Rotor-Gene 6000, según los protocolos sugeridos por el fabricante. El fundamento de la cuantificación por PCR en Tiempo Real es la duplicación de un determinado fragmento de ADN y la detección del producto generado en cada ciclo. De esta manera, se puede inferir la

concentración de ADN inicial en la reacción mediante el empleo de patrones de concentración conocida. Los sistemas comerciales empleados en el presente trabajo de tesis emplean marcación con diferentes fluorocromos, y permiten la cuantificación simultánea de ADN autosómico, masculino y presencia de inhibidores (Plexor®) ó ADN autosómico e inhibidores (Quantifiler®).

2.2.3. Análisis de marcadores autosómicos para estudios de paternidad

Con el objetivo de confirmar fehacientemente la fertilidad de los hombres incluidos en el grupo control PATERNIDADES CONFIRMADAS, se utilizaron marcadores STRs distribuidos por todo el genoma. El análisis de dichos marcadores permite, al compartir una variante alélica entre padre e hijo, evaluar estadísticamente la probabilidad de que exista un vínculo biológico de paternidad. Para la determinación de paternidad las muestras se amplificaron utilizando el sistema comercial PowerPlex® 16 que analiza simultáneamente 15 marcadores autosómicos (CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX y VWA). Una vez obtenidos los electroferogramas para los STRs analizados, los resultados se evaluaron estadísticamente para determinar si las variantes alélicas pueden ser compartidas por azar. Para ello se calculó el Índice de Paternidad (IP) y la Probabilidad de Paternidad (PP), que son los parámetros que cuantifican la probabilidad de que exista un vínculo biológico de paternidad. Se considera un IP mayor a 1×10^6 y una PP mayor a 99,99% para confirmar este vínculo.

2.2.4. Determinación del Hg de cromosoma Y

2.2.4.1. Análisis de Hgs en multiplex mediante HRM

2.2.4.1.1. Hgs Q, R e I: Para la determinación de los Hgs Q1a2a1a1, R1b1a2 e I mediante el análisis de los SNPs que los determinan (M3, M269 y U179, respectivamente), se desarrolló un sistema multiplex que emplea la técnica de PCR en Tiempo Real seguida de Desnaturalización Térmica de Alta Resolución (HRM). El protocolo completo de la técnica empleada en el presente trabajo, incluyendo las secuencias de los primers utilizados, fue publicado y se adjunta en el Anexo II del presente trabajo de tesis (Zucarelli, Alechine *et al* 2011). A modo de ejemplo, la Figura 2.2.4.1.1. muestra el

resultado obtenido mediante dicha técnica. Este sistema se diseñó para un rastreo más rápido y eficiente de los principales Hgs de interés de la población argentina.

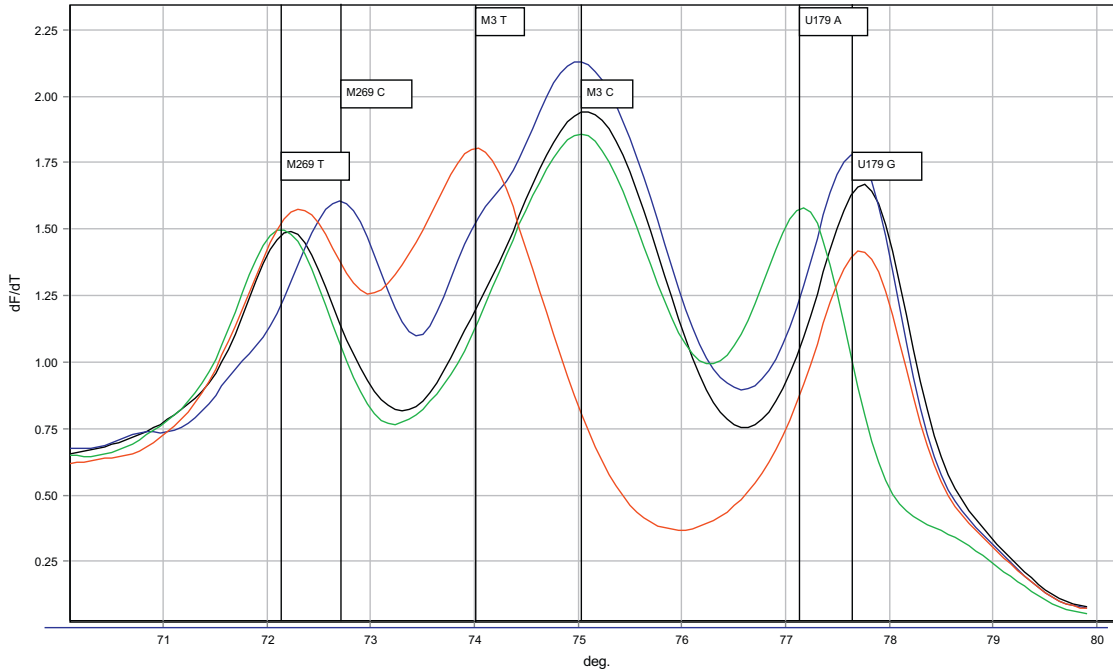


Figura 2.2.4.1.1. Perfil de HRM representando la derivada dF/dT de la desnaturalización térmica de alta resolución de los fragmentos de amplificación de los marcadores M3, M269 y U179. Se observan 2 picos posibles para cada marcador, determinando cada uno de ellos la pertenencia a un Hg. La figura ejemplifica los resultados obtenidos en muestras pertenecientes a los Hgs Q1a2a1a1 (rojo), R1b1a2 (azul), I (verde) y no determinada (negro)(Zuccarelli, Alechine et al 2011).

2.2.4.1.2. Hgs J, G y E: La metodología descrita en el punto 2.2.4.1.1. también se utilizó en una segunda etapa para la determinación de los Hgs J2, G2a y E1b1b mediante el análisis en múltiplex de los SNPs M172, P15 y M35, respectivamente. Dicha adaptación se puso a punto en nuestro laboratorio para el haplogrupado de muestras de interés forense (Cecilia Bobillo, comunicación personal). A modo de ejemplo, la Figura 2.2.4.1.2. muestra el resultado obtenido para dichos Hgs.

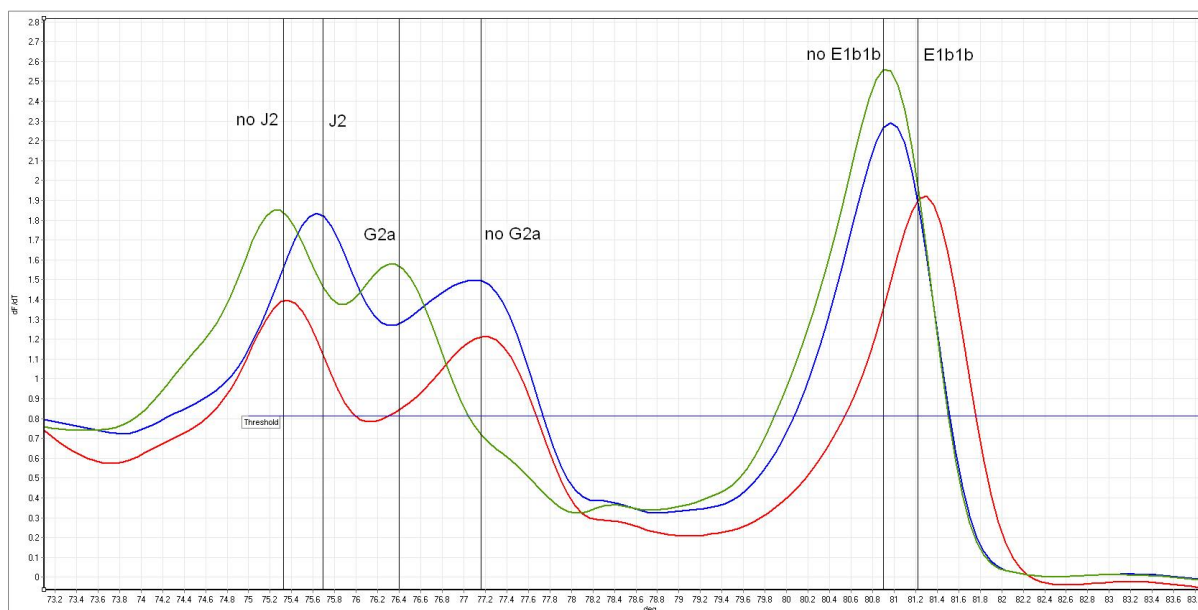


Figura 2.2.4.1.2. Perfil de HRM representando la derivada dF/dT de la desnaturalización térmica de alta resolución de los fragmentos de amplificación de los marcadores M35, M172 y P15 en muestras pertenecientes a los Hgs G2a (verde), J2 (azul) y E1b1b (rojo).

2.2.4.2. Análisis de SNPs adicionales: M242, M378, M120, MEH2 y M346

De manera complementaria al análisis del Hg Q1a2a1a1 (M3) descrito en el punto 2.2.4.1.1, se analizaron marcadores adicionales que permiten determinar la pertenencia al Hg Q (M242) o a los sub-Hgs Q1a (MEH2), Q1b1 (M378), Q1a2a1 (M346) y Q1a1a1 (M120). La amplificación de dichos marcadores se realizó de manera individual.

Luego de la amplificación, los marcadores M242 y M378 se analizaron mediante HRM. Los marcadores MEH2, M346 y M120 se analizaron mediante secuenciación con primers forward y reverse, debido a su mayor tamaño y ausencia de controles para ambas variantes alélicas. La aplicación de la técnica de HRM para el análisis de SNPs en formato individual o simplex se basó en el mismo principio que el desarrollado por nuestro laboratorio para la tipificación de este tipo de polimorfismos en el diagnóstico genético de Distonías de Torsión DYT1 (Caputo *et al* 2013).

2.2.4.3. Análisis de STRs de cromosoma Y

Se analizaron STRs ubicados a lo largo de toda la región eucromática del cromosoma Y (Figura 2.2.4.3a) mediante los sistemas comerciales PowerPlex® Y23 o AmpFLSTR®

Yfiler®, según disponibilidad. El primer kit incluye un total de 23 STRs, mientras que el segundo incluye 17 STRs. El objetivo del análisis de marcadores STRs fue, por un lado predecir el Hg en los casos en los que no se contaba con los primers para definir los Hg minoritarios en la población, y por otro lado, definir la extensión de las deleciones encontradas. La Figura 2.2.4.3b muestra, a modo de ejemplo, un electroferograma obtenido con el kit PowerPlex® Y23.

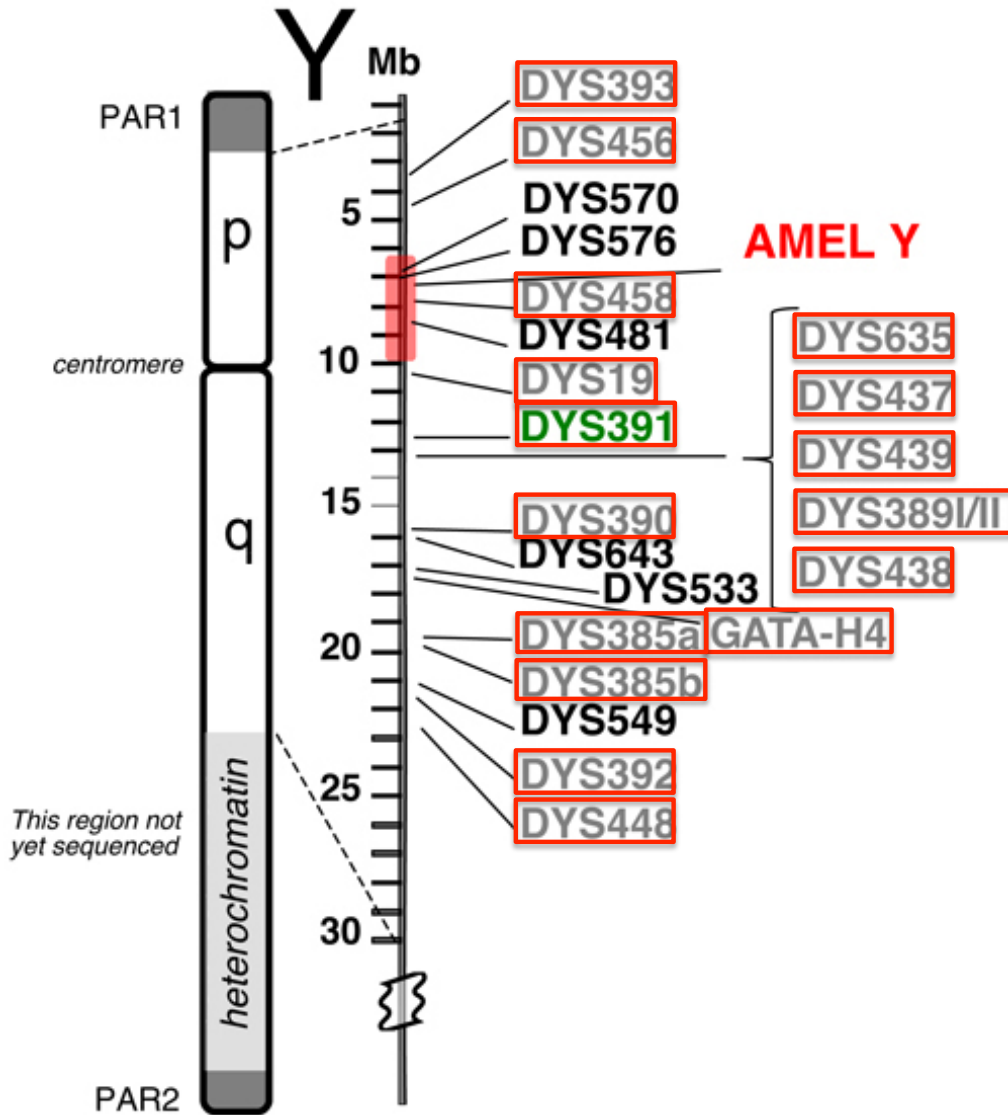


Figura 2.2.4.3a. Localización a lo largo del cromosoma Y de los STRs incluidos en los sistemas comerciales PowerPlex® Y23 y AmpFLSTR® Yfiler® (señalados en rojo).

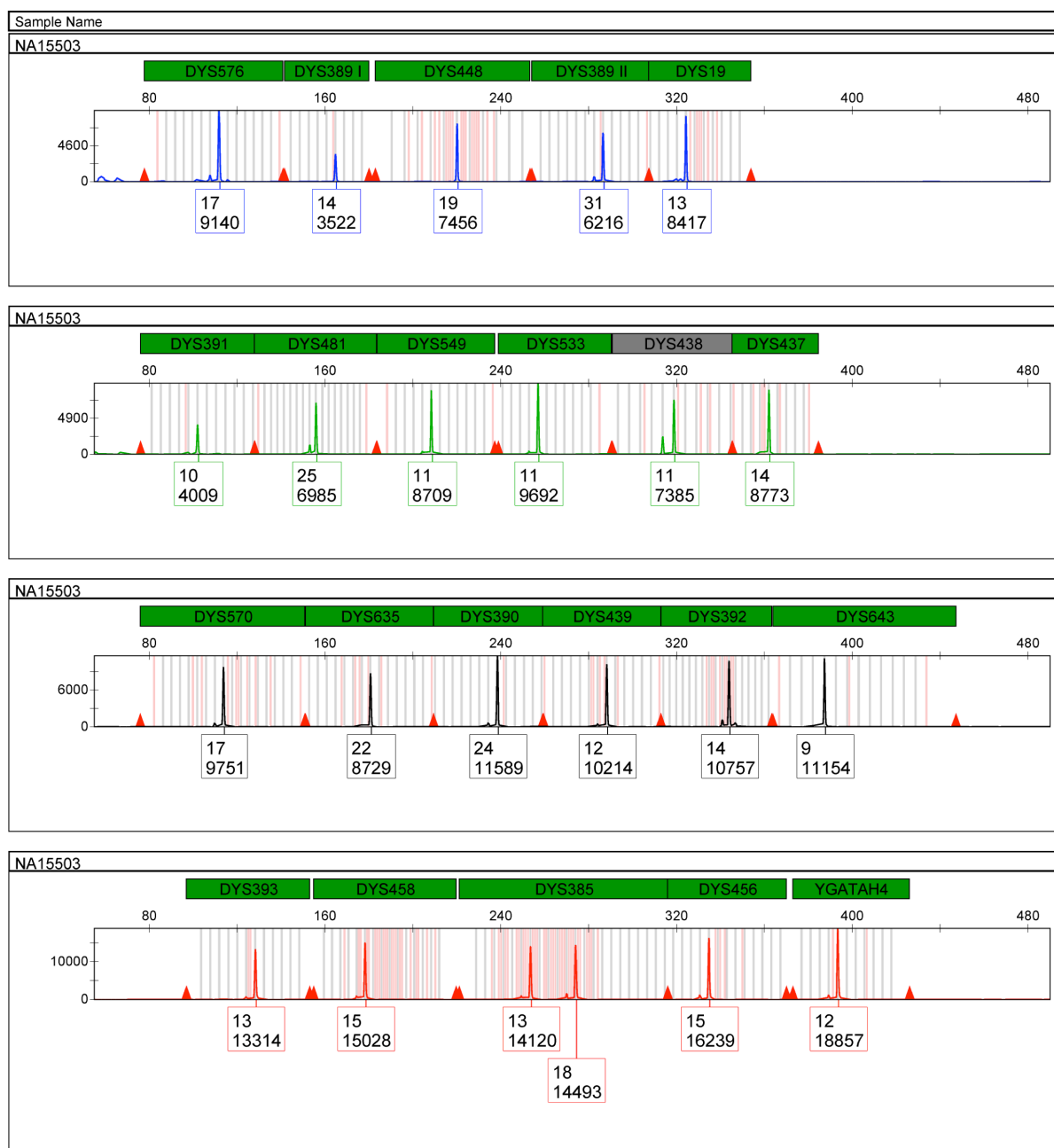


Figura 2.2.4.3b. Resultado de STRs de cromosoma Y obtenido con el sistema PowerPlex® Y23, analizado con el programa GeneMapper® ID-X en el secuenciador automático Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer.

2.2.4.4. Predicción de Hgs a partir de haplotipos de STRs de cromosoma Y

A partir de los haplotipos de STRs obtenidos, se emplearon los programas on-line de uso libre Whit Athey's Haplogroup Predictor e YPredictor para predecir los Hgs a los que pertenecen aquellas muestras que no pudieron ser definidas mediante las técnicas descritas en los puntos 2.2.4.1 y 2.2.4.2. La exactitud del programa se evaluó en una

primera instancia mediante el análisis de muestras control cuyo Hg fuera definido previamente mediante secuenciación. Se consideraron porcentajes superiores al 90% para asignar un determinado Hg. La Figura 2.2.4.4 muestra la interfaz del programa YPredictor y el resultado obtenido a partir de un haplotipo de STRs de cromosoma Y.

YPredictor by Vadim Urasin v1.5.0

offline version ydna.ru (RU haplotypes) molgen.org (RU DNA forum) RJJGG (EN/RU DNA journal) genofond.ru (RU DNA lab)

Instructions | Principles | Links | Options | FTDNA; DYS 389-2 += -DYS 389-1

Enter haplotypes:
13 24 13 10 14 19 x x 11 14 14 31 15 x x x x x 14 x x x x x x 12

Convert to table Clear

N	DYS 393	DYS 390	DYS 19/3	DYS 301	DYS 385	DYS 426	DYS 388	DYS 439	DYS 389-1	DYS 392	DYS 389-2	DYS 458	DYS 459	DYS 459	DYS 455	DYS 454	DYS 447	DYS 437	DYS 446	DYS 449	DYS 464	DYS 464	DYS 464	DYS 464	DYS 460	GAT A	YCA IIa	YCA IIb	DYS 456	DYS 607	DYS 578	DYS 570	CDY a	CDY b	DYS 442	DYS 438	DYS 531	DYS 578	DYS 395	DYS 395	DYS 590	DYS 537	DYS 641
1	13	24	13	10	14	19		11	14	14	17	15						14			a	b	c	d	12	A	IIa	IIb	456	607	578	570	a	b	442	438	531	578	395	395	590	537	641

Predict

N	Haplogroup	Probability
1	Q1a-MEH2	93%

Figura 2.2.4.4. Ejemplo de la predicción de Hg a partir de un haplotipo de STRs de cromosoma Y mediante el programa YPredictor. Se asigna a la muestra el Hg Q1a con una probabilidad del 93%.

2.2.5. Análisis de microdeleciones clásicas en la región AZF

Las microdeleciones clásicas de las regiones AZFa, AZFb y AZFc se analizaron mediante la adaptación del protocolo sugerido por la EAA/EMQN (Simoni *et al* 2004, Krausz *et al* 2014) para PCR en Tiempo Real (Kozina *et al* 2011). Se analizaron los marcadores sY85 (AZFa), sY127 (AZFb), sY255 (AZFc) y AMELxy (control interno), cuyas secuencias se describen en la Tabla I del Anexo I. La reacción se modificó para el empleo de SYTO® 9 como colorante intercalar. El sistema de análisis se validó mediante la participación en el control de calidad organizado por la EAA/EMQN, cuyas muestras fueron analizadas en paralelo por la técnica adaptada para PCR en Tiempo Real empleada en el presente trabajo y por la metodología recomendada en bibliografía que emplea PCR seguida de separación en geles de agarosa (ver punto 2.2.12). La Figura 2.2.5 muestra un ejemplo del perfil de HRM de una muestra control (sin deleciones).

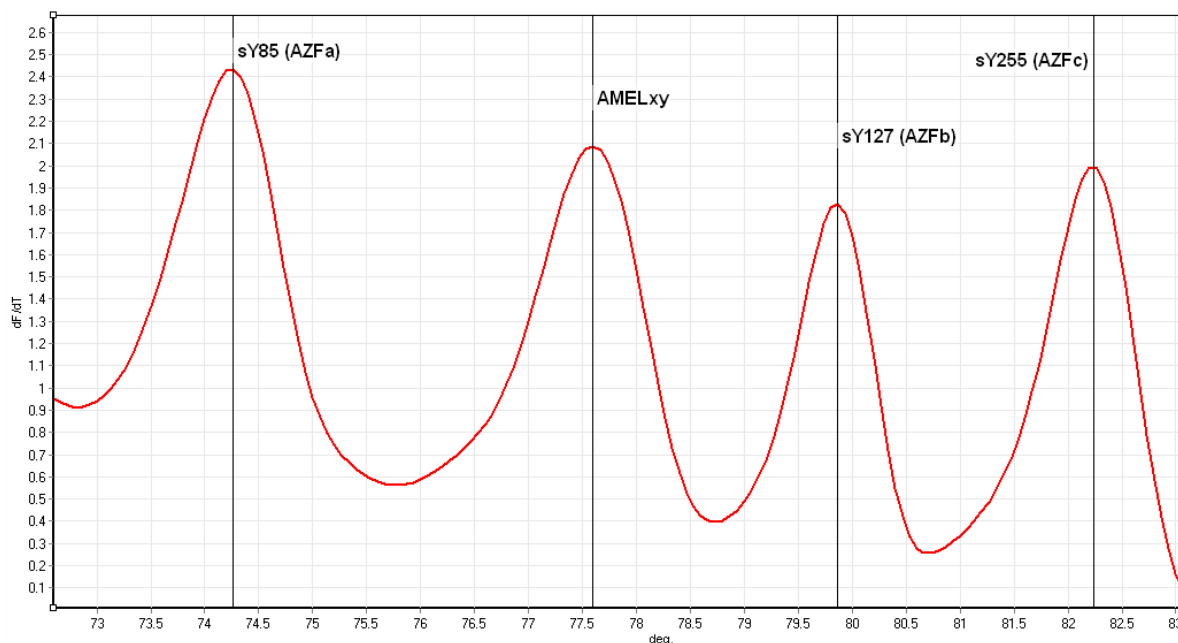


Figura 2.2.5. Perfil de HRM del análisis de microdeleciones AZF para una muestra sin deleción.

2.2.6. Análisis de microdeleciones parciales en la región AZFc

Para el análisis de microdeleciones parciales en la región AZFc, se desarrolló un protocolo para la determinación simultánea de 7 marcadores STSs localizados en dicha región, mediante PCR seguida de electroforesis capilar. La amplificación de Y-STSs se realizó mediante PCR múltiplex empleando un método económico de marcación fluorescente descrito previamente (Oklander *et al* 2007). Los primers forward se sinterizaron con colas de 5' M13, complementarias a oligonucleótidos marcados con el colorante fluorescente 6-FAM. Esto permite la detección de todos los productos de PCR mediante un secuenciador automático, sin la necesidad de marcar cada uno de los primers empleados, lo cual incrementaría los costos del análisis (Schuelke 2000). Los marcadores que se analizaron fueron: sY142, sY1197, sY1191, sY1201, sY1206, sY1261 y sY1291, cuyas secuencias se describen en la Tabla I. La Figura 2.2.6 muestra el resultado del análisis de Y-STSs para una muestra sin deleciones.

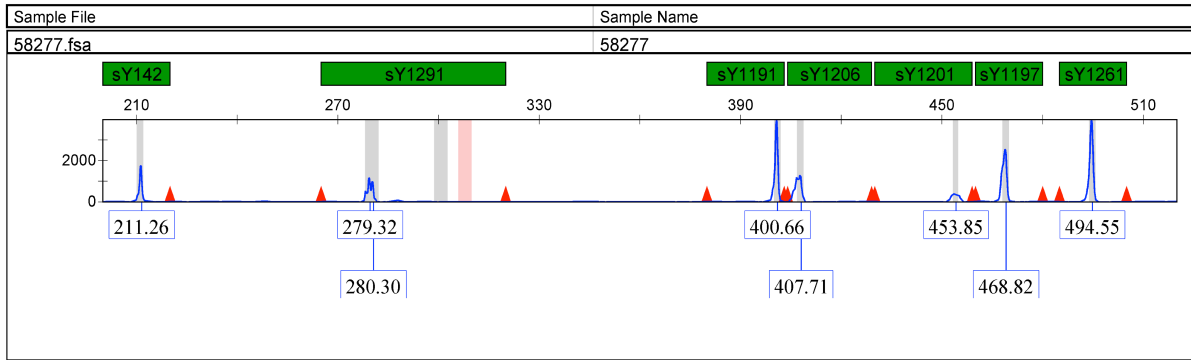


Figura 2.2.6. Resultado del análisis de Y-STRs para una muestra sin deleciones.

2.2.7. Identificación de la presencia de los genes de la región AZFc

Con el objetivo de evidenciar la presencia o ausencia de los genes *DAZ*, *CDY*, *BPY2*, *PRY*, *GOLGA2LY* y *CSGP4LY*, se desarrolló una técnica que emplea amplificación por PCR en Tiempo Real seguida de HRM. La amplificación se realizó en formato multiplex con primers para los genes mencionados, además de la amplificación de *AMEL* y *SRY* como controles internos de la reacción. La Figura 2.2.7 muestra el resultado obtenido para una muestra control sin deleciones. El desarrollo que se llevó a cabo se describe en detalle en el capítulo 6, y la publicación que surgió del mismo se adjunta en el Anexo II (Alechine y Corach 2014).

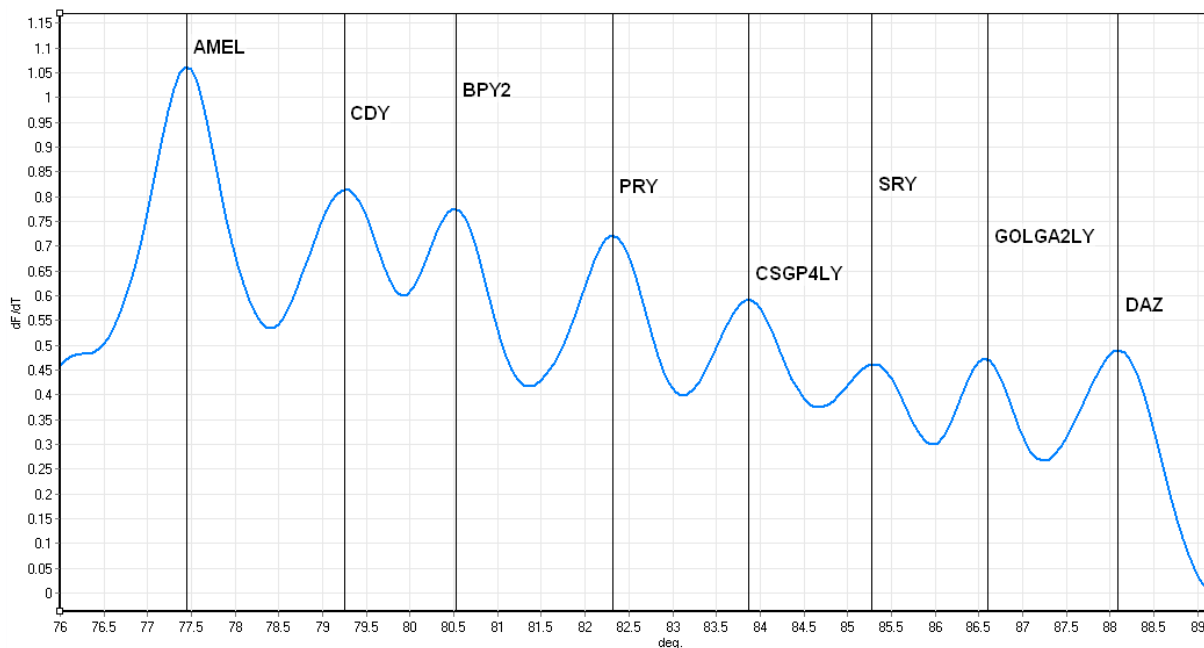


Figura 2.2.7. Resultado del análisis de genes en la región AZFc por HRM para una muestra sin deleción.

2.2.8. Cuantificación del número de copias de los genes *DAZ*, *CDY* y *CDY1*

La cuantificación del número de copias de *DAZ*, *CDY* y *CDY1* se realizó mediante PCR cuantitativa (qPCR). Se empleó el mismo principio que para la cuantificación relativa de ARNm, puesta a punto en nuestro laboratorio (Quevedo *et al* 2010), utilizando en este caso el *SRY* como gen de referencia de copia única. La puesta a punto de la reacción se basó en la cuantificación del número de copias de estos mismos genes en cromosoma Y de primates (Chimpancé y Bonobo) para la confirmación de los resultados de la técnica de FISH (Greve *et al* 2011). Los cálculos del número de copias se realizaron mediante el programa del equipo, empleando el método Delta Delta Ct (Livak *et al* 2001).

2.2.9. Identificación de variantes de *DAZ* y *CDY*

Para identificar las copias presentes de los genes *DAZ* y *CDY*, se analizaron variantes familiares de secuencia (SFVs) de estos genes. Los siguientes SNPs fueron analizados: *sY587* (diferencia *DAZ1/2* de *DAZ 3/4*), *SNV-I* (diferencia *DAZ4*) y *SNV-II* (diferencia *DAZ1*) para la familia de genes *DAZ*; y *CDY1-7750* (diferencia *CDY1A* de *CDY1B*) y *CDY1/2* (diferencia *CDY1* de *CDY2*) para la familia de genes *CDY* (Fernandes *et al* 2002, Machev *et al* 2004). Se emplearon 2 métodos diferentes para el análisis de dichos SNPs:

2.2.9.1. Para el análisis de *sY587*, *CDY1-7750* y *CDY1/2* los productos de amplificación se digirieron con enzimas de restricción según el siguiente esquema: *sY587* con *DraI*, *CDY1-7750* con *PvuII*, y *CDY1/2* con *BstEII* (Tabla 2.2.9.1), y los productos se separaron mediante electroforesis en gel de Agarosa al 4%. Se utilizó un marcador de peso molecular de 25 pb. La Figura 2.2.9.1 muestra el resultado del análisis de dichos polimorfismos a modo de ejemplo.

Tabla 2.2.9.1. SNPs empleados para el análisis de las variantes de *DAZ* y *CDY* presentes

SNP	Variantes	Enzima	Resultado	Interpretación
<i>sY587</i>	T	<i>DraI</i>	C	<i>DAZ1/DAZ2</i>
	C		NC	<i>DAZ3/DAZ4</i>
<i>CDY1-7750</i>	G	<i>PvuII</i>	C	<i>CDY1B</i>
	T		NC	<i>CDY1A</i>
<i>CDY1/2</i>	C	<i>BstEII</i>	C	<i>CDY2</i>
	A		NC	<i>CDY1</i>

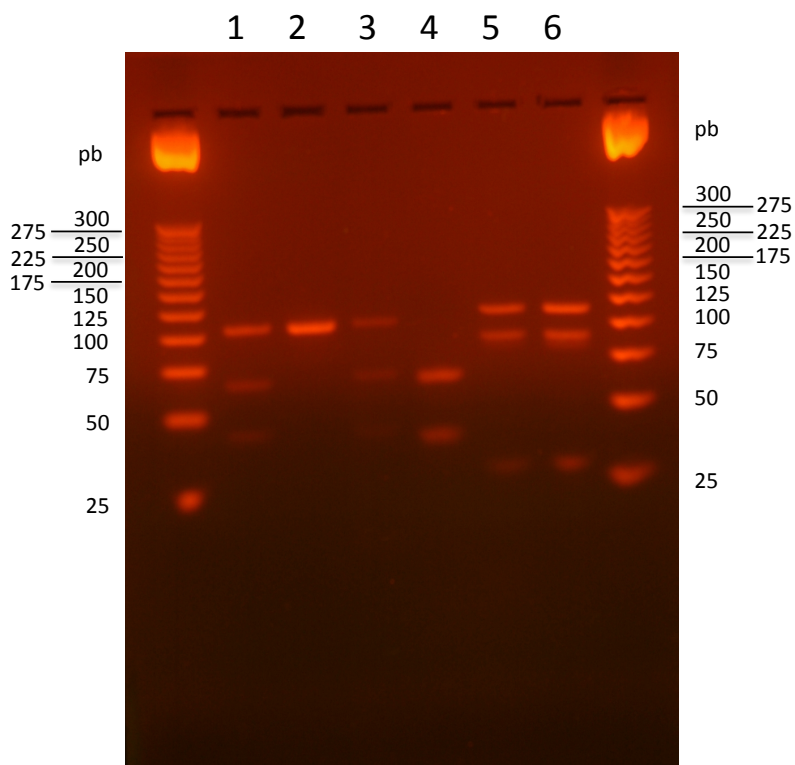


Figura 2.2.9.1. Resultado del corte con las enzimas de restricción *DraI*, *PvuII* y *BstEII*. La Figura muestra los siguientes resultados *DraI* C/NC (1), *DraI* NC/NC (2), *PvuII* C/NC (3), *PvuII* C/C (4) y *BstEII* C/NC (5 y 6). C: corta, NC: no corta.

2.2.9.2. Para el análisis de *SNVI* y *SNVII*, luego de la amplificación, los productos se secuenciaron siguiendo el protocolo descrito en la sección “Secuenciación” del Anexo I, obteniéndose los resultados presentados en la Figura 2.2.9.2. Luego de la secuenciación se identificaron las variantes alélicas descritas para cada copia del gen *DAZ*, según lo descrito en la Tabla 2.2.9.2.

Tabla 2.2.9.2. SNPs empleados para el análisis de las variantes de *DAZ* presentes

SNP	Variantes	Interpretación
SNVI	A	<i>DAZ1/DAZ2/DAZ3</i>
	G	<i>DAZ4</i>
SNVII	G	<i>DAZ1</i>
	A	<i>DAZ2/DAZ3/DAZ4</i>

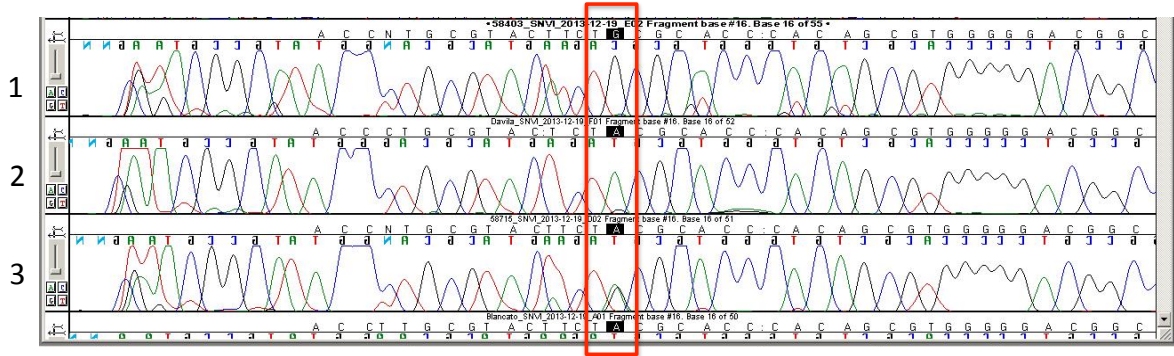


Figura 2.2.9.2. Resultados de la secuenciación del polimorfismo SNVI. En el recuadro rojo se señala el polimorfismo de interés con las siguientes variantes alélicas: GG (1), AA (2) y GA (3).

2.2.10. Análisis de variantes alélicas de DYS464

El STR DYS464 se encuentra localizado en el amplicón “r” adyacente a cada copia del gen *DAZ*. Previamente, se había descrito su utilidad en la determinación indirecta del número de copias de este gen (Balaresque *et al* 2008). La amplificación del STR DYS464 se diseñó con primers unidos a colas de M13, y primers complementarios a M13 marcados con el colorante fluorescente 6-FAM. La Figura 2.2.10 muestra el resultado obtenido en muestras sin deleciones que mantienen las 4 copias del gen *DAZ*.

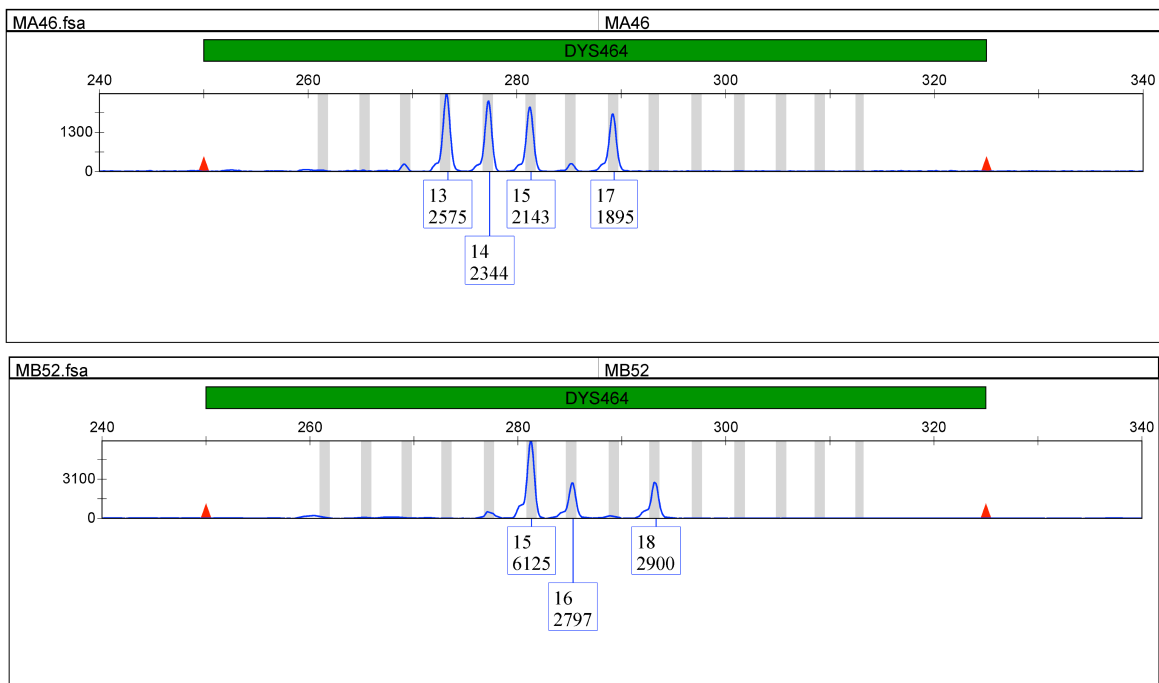


Figura 2.2.10. Resultado de la amplificación del STR DYS464 en muestras sin deleción, con 4 copias del gen *DAZ*. En la muestra MA46 se observan 4 alelos diferentes (13-14-15-17), y en la MB52 2 alelos iguales y 2 diferentes (15-15-16-18).

2.2.11. Análisis de STRs de alta tasa de mutación (RM-STRs)

Se analizaron STRs de alta tasa de mutación localizados en el cromosoma Y, para discriminar entre individuos de la misma patrilinea. Estos STRs fueron descritos previamente para su empleo en estudios forenses y poblacionales (Ballantyne *et al* 2012).

2.2.12. Confirmación de las microdeleciones clásicas

La confirmación de las microdeleciones clásicas encontradas en los pacientes se llevó a cabo mediante el protocolo estricto sugerido por la EAA/EMQN (Krausz *et al* 2014). Se evaluó la capacidad analítica de las técnicas diagnósticas empleadas en el presente trabajo, mediante la participación en el control de calidad organizado por dicha institución (EAA 2014). Las muestras del control de calidad se analizaron mediante ambos métodos, obteniéndose los mismo resultados.

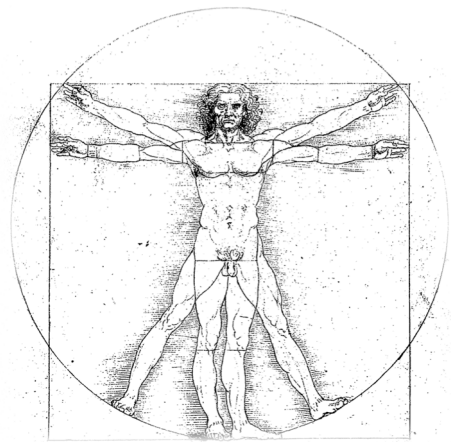
2.2.13. Herramientas bioinformáticas

Con el objetivo de definir la extensión de las deleciones halladas y las regiones afectadas, se emplearon las herramientas bioinformáticas MSY Breakpoint Mapper (Lange *et al* 2008) y Sequence Viewer v3.4 (disponible en NCBI) (Tabla III del Anexo I).

2.2.14. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados para la comparación entre poblaciones se llevó a cabo mediante tablas de contingencia y Test Exacto de Fisher, considerando estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$ (Kirkman 1996).

Resultados



*“Duda siempre de ti mismo,
hasta que los datos no dejen lugar a dudas”*

Louis Pasteur

RESULTADOS

3. Caracterización de hombres fértiles pertenecientes al haplogrupo nativo americano Q1a2a1a1

Sinopsis

A partir de las características descritas en otras poblaciones sobre la predisposición a microdeleciones en la región AZF entre diferentes Hgs de cromosoma Y, este capítulo del presente trabajo expone las características observadas en el cromosoma Y de hombres fértiles pertenecientes al Hg nativo americano Q1a2a1a1.

3.1. Características polimórficas del Hg Q1a2a1a1

3.1.1. Polimorfismo de longitud del marcador sY1291 característico del Hg Q1a

Al analizar los marcadores STSs que determinan las deleciones parciales de la región AZFc, se detectó un polimorfismo de longitud del marcador sY1291. Este marcador presentó una longitud de 280 pb en las muestras del Hg Q3, siendo este tamaño menor a lo descrito *in silico* para dicho producto de amplificación. Con el objetivo de confirmar esta diferencia, se amplificaron y separaron mediante electroforesis capilar muestras de otros Hgs. Los resultados obtenidos evidenciaron que el marcador sY1291 presentó una longitud de 280 pb únicamente en las muestras del Hg Q3, de 307 pb en el Hg G2a y 300 pb para todos los demás Hgs (incluido el Hg R1b cuya secuencia se encuentra publicada en GenBank). La Figura 3.1.1a muestra los resultados obtenidos para muestras pertenecientes a los Hgs Q1a2a1a1, R1b1a2 y G2a. La diferencia de 21 pb en el Hg Q3 (con respecto al Hg R1b) fue consistente entre todas las muestras analizadas. El polimorfismo de longitud del marcador sY1291 había sido previamente descrito por Lin *et al* (2006), pero no había sido vinculado a ningún Hg.

Mediante el análisis de las muestras pertenecientes a otras ramas del Hg Q, ancestrales al Q1a2a1a1 (M3), se encontró que este polimorfismo no se encuentra presente ni en el sub-Hg Q1b1 ni en el Q1a1a1, ambos Hgs asiáticos. Sin embargo, sí aparece en individuos con la variante derivada para M242 y MEH2, pero la variante ancestral para M346 (que define al Hg Q1a2). Esto significa que la mutación que genera una disminución en el número de repeticiones de T dentro del fragmento de amplificación del marcador sY1291, se produce en algún momento posterior a la separación del sub-Hg Q1a en Q1a1 y Q1a2. Este evento tiene como consecuencia que la totalidad de los individuos del Hg nativo americano Q1a2a1a1 (posterior a Q1a) presenten dicho polimorfismo de longitud (Figura 3.1.1c).

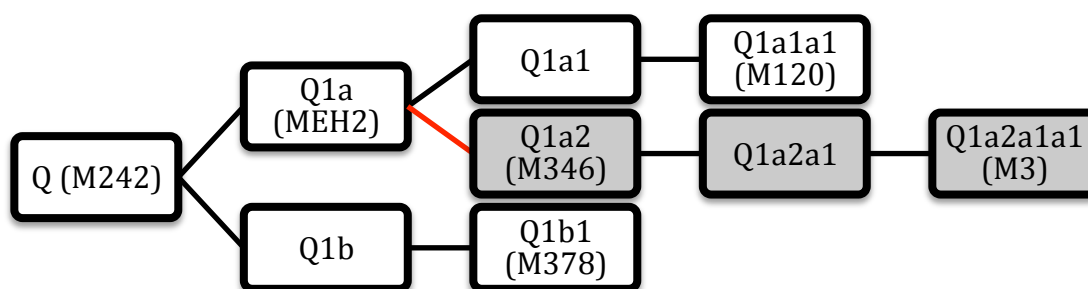


Figura 3.1.1c. Filogenia del Hg Q y sus sub-Hg que participaron en la fijación del polimorfismo de longitud sY1291. Con sombreado gris se visualizan los Hgs que presentan el polimorfismo. En rojo se señala el punto de mutación hipotetizado.

3.2. Confirmación de los resultados obtenidos para muestras del Hg Q3 caracterizadas en publicaciones previas

Aunque el Hg Q3 ha sido poco estudiado en cuanto a la región AZF, publicaciones anteriores (Repping *et al* 2003, Repping *et al* 2004, Repping *et al* 2006) han descrito una pocas muestras perteneciente al Hg Q3 provenientes de la Colección de Recursos para el Descubrimiento de Polimorfismos en el ADN (DNA Polymorphism Discovery Resource Collection) de Coriell Cell Repository. Estas publicaciones caracterizaron muestras del Hg Q3 como portadoras de la deleción parcial b2/b3, localizada en la región AZFc. Dado que sólo una de las 240 muestras pertenecientes al Hg Q3 analizadas en el presente trabajo presentó la deleción b2/b3 (ver punto 3.4.2), como un control de

los experimentos realizados y de los resultados obtenidos, adquirimos las muestras control mencionadas. Se analizaron en nuestro laboratorio las muestras NA15503, NA15594 (Repping *et al* 2004) y NA15683 (Repping *et al* 2003), previamente caracterizadas como portadoras de las deleciones b2/b3 y gr/gr, respectivamente. Las deleciones b2/b3 y gr/gr, así como el Hg Q3 se confirmaron para los controles comerciales mencionados (Figura 3.2). Esto significa, por un lado que la metodología empleada en el presente trabajo es adecuada y cuenta con la misma capacidad de resolución que la empleada en los trabajos de Repping *et al* (2003 y 2004). Por otro lado, en cuanto a la caracterización de las muestras, se descarta un posible error metodológico en ambos trabajos.

Sin embargo, un análisis más detallado de las muestras NA15503 y NA15594 (ambas con deleción b2/b3) mediante Y-STRs y RM-STRs, evidenciaron que ambas muestras pertenecían a la misma patrilinea, dado que compartían el haplotipo completo para 23 STRs del cromosoma Y. Para diferenciar si se trataba de individuos del mismo linaje o de una muestra replicada, se analizaron STRs autosómicos, obteniéndose perfiles diferentes. Esto indica que se trata de individuos diferentes de una misma patrilinea. Con el objetivo de aumentar el poder resolutivo dentro del linaje de cromosoma Y, se analizaron 13 RM-STRs del cromosoma Y adicionales, cuya tasa de mutación es superior a 1×10^{-2} . Este análisis confirmó que las muestras analizadas presentaban haplotipos de cromosoma Y idénticos, salvo por una posible mutación de un paso en el marcador DYF403S1a, el cual presenta una tasa de mutación de $3,1 \times 10^{-2}$ (Ballantyne *et al* 2010). La importancia de este descubrimiento reside, por un lado en que las muestras de un panel internacional para análisis de polimorfismos no debería estar compuesto por individuos relacionados, ya que esto produce un sesgo en el análisis. Por otro lado, al ser las únicas muestras pertenecientes al Hg Q3 caracterizadas para la detección de microdeleciones, se arriba a conclusiones erróneas con respecto a deleciones constitutivas presentes en este Hg. Como fue mencionado previamente, Repping *et al* (2004 y 2006) caracterizaron numerosos Hgs a nivel mundial y determinaron que la deleción b2/b3 se presenta tanto en el Hg N como en el Hg Q3, empleando las muestras de individuos relacionados mencionadas. De la misma manera, al estudiar la arquitectura de los cromosomas en cada haplogrupo, Repping *et al* (2006) sugieren que el Hg Q3 presenta el mismo patrón de deleción en la región AZFc que el Hg N.

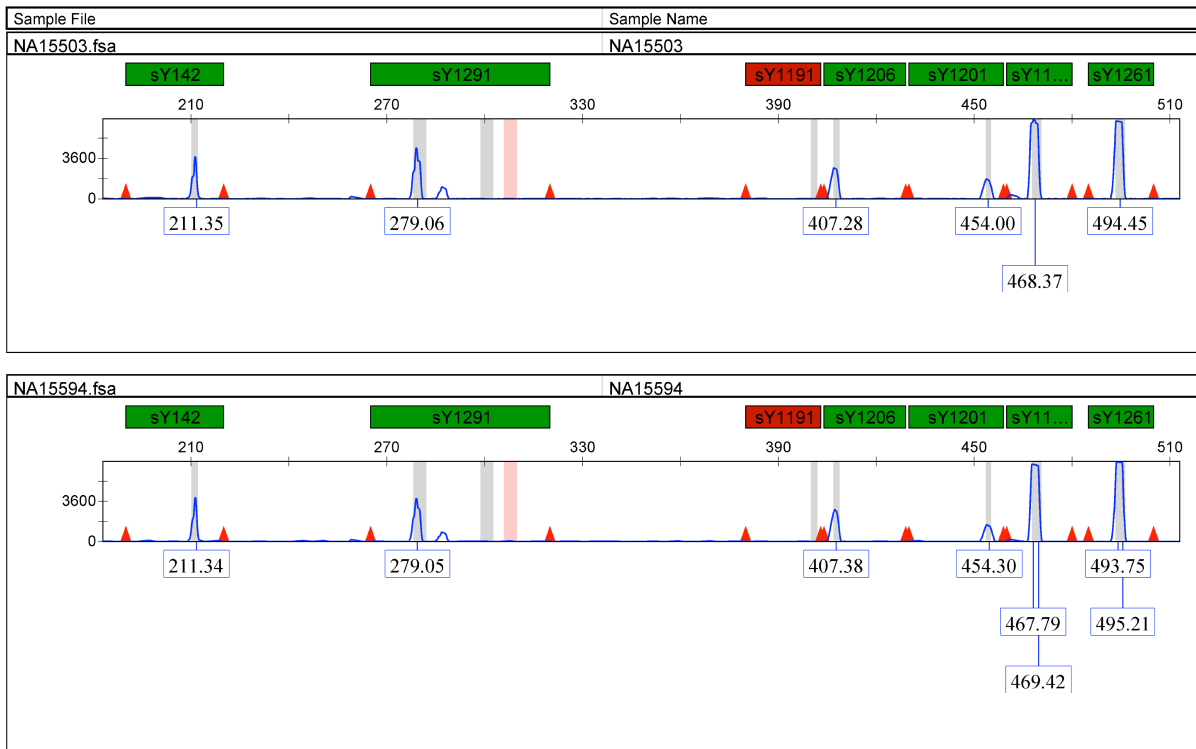


Figura 3.2. Resultado de Y-STSs para las muestras de Coriell Cell Repository pertenecientes al Hg Q3 analizadas en los trabajos de Repping *et al* (2004 y 2006).

3.3. Comparación del Hg nativo americano Q1a2a1a1 con el Hg asiático Q1

Contrario a lo descrito por Yang *et al* (2010) para el Hg Q1 (actualmente Q1a1a1, definido por el estado derivado para el marcador M120), no encontramos ninguna deleción constitutiva en el Hg Q1a2a1a1. Yang *et al* definieron la presencia de la deleción gr/gr de manera constitutiva en el Hg Q1, ancestral al Hg Q1a2a1a1. Esta deleción no se correlaciona con consecuencias patológicas sobre la fertilidad en la población china Han (Yang *et al* 2010). Esta diferencia entre sub-Hgs de Q podría deberse a la divergencia entre estos sub-Hgs desde el momento en que se produjo la entrada a América. Posiblemente, en algún momento luego de la división del Hg Q en Q1a1 (asiático) y Q1a2 (ancestral al Hg nativo americano), la deleción gr/gr se haya establecido en el Hg asiático Q1a1, no así en el Q1a2. En este punto, también podríamos postular que estos dos linajes del Hg Q podrían ser diferenciados por el polimorfismo de longitud de sY1291 descrito en el punto 3.1.

En cuanto a la delección gr/gr, aunque el efecto de la delección sobre la fertilidad depende en gran medida del origen étnico y geográfico de la población estudiada, a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, podríamos descartar que el Hg Q3 haya fijado delecciones gr/gr. Es por esto que, contrario a lo establecido por Krausz *et al*, quienes postulan que el análisis de la delección gr/gr no es de utilidad en pacientes pertenecientes a los Hgs Q1 y Q3 dado su carácter constitutivo, el análisis de dicha delección en pacientes infértiles del Hg Q3 sí tendría un potencial interés clínico dado que no se presenta en hombres fértiles de este último Hg (Krausz *et al* 2014).

3.4. La prevalencia de microdelecciones como característica polimórfica de los hombres fértiles pertenecientes al Hg Q1a2a1a1

Con el objetivo de evaluar la presencia polimórfica de delecciones tanto completas como parciales de la región AZF, se evaluó la prevalencia de las mismas en un grupo de hombres fértiles pertenecientes al Hg Q1a2a1a1. Para ello, se seleccionaron 240 muestras de hombres fértiles que exhibían la variante T para el marcador M3, que define dicho Hg. Las muestras seleccionadas pertenecen tanto a comunidades aborígenes como a población urbana de Argentina y países limítrofes. Las características de las poblaciones analizadas se describieron en detalle en el capítulo 2 (puntos 2.1.1.2 y 2.1.1.3).

3.4.1. Delecciones completas de AZFa, AZFb o AZFc

Al analizarse las delecciones clásicas de la región AZF, no se detectó ninguna muestra con delección completa de alguna sub-región de AZF. Únicamente, se detectaron dos muestras con delección del marcador sY127, el cual define la presencia de la región AZFb. Sin embargo, al confirmar dicha delección mediante el marcador sY134, también presente en la misma región, se comprobó que se trataba de una falsa delección. Este artefacto pudo deberse a una mutación en el sitio de reconocimiento del primer o a una delección menor de dicha región, y por lo tanto se descartó la presencia de delección completa de la región AZFb en ambas muestras.

La ausencia de delecciones completas en hombres fértiles del Hg Q1a2a1a1, indicaría que no existe ninguna delección constitutiva en dicho Hg. Por lo tanto, la presencia de

deleciones completas en pacientes con infertilidad se podría atribuir a la causa de la falla espermatogénica. Hasta el momento, la única investigación llevada a cabo en pacientes infértiles pertenecientes al Hg Q1a3a se realizó en Chile, donde detectaron un aumento de la prevalencia de deleciones de la región AZFb en pacientes infértiles pertenecientes a este Hg (Lardone *et al* 2013). Este grupo describe un aumento de la predisposición del Hg Q1a3a a microdeleciones de la región AZFb, en pacientes infértiles de la población chilena, las cuales son poco frecuentes a nivel mundial. Sin embargo, al estudiar un bajo número de casos (2 deleciones AZFb en un total de 32 pacientes del Hg Q1a3a), los resultados obtenidos podrían estar sesgados por un error de muestreo y por lo tanto es necesario confirmarlo con una muestra poblacional de mayor tamaño. Nuestros resultados, obtenidos a partir del análisis de 240 hombres fértiles del Hg Q1a2a1a1 sin deleciones clásicas, avalan lo descripto en población chilena sobre el efecto deletéreo de la deleción de la región AZFb y su mayor incidencia en el Hg Q1a3a, dada la ausencia de deleciones AZFb en controles fértiles de dicho Hg. Para evaluar la prevalencia aumentada de dicha deleciones en pacientes infértiles, sería necesario analizar un mayor número de pacientes pertenecientes al Hg Q, tanto de Argentina como de otros países de Sudamérica, además de confirmar los resultados mediante marcadores adicionales en la región AZFb.

3.4.2. Deleciones parciales de AZFc

A partir del análisis de deleciones parciales en la región AZFc, detectamos microdeleciones en 8 de 240 hombres fértiles, siendo la prevalencia de deleciones parciales en el Hg Q1a2a1a1 de 3,3% (8/240). La Tabla 3.4.2a resume las deleciones detectadas. La deleción más frecuente fue aquella que elimina el marcador sY1291, seguida por la deleción conjunta de los marcadores sY1197 y sY1191, en el extremo proximal de la región AZFc. La deleciones halladas se detectaron tanto en población urbana de Argentina (cuyo lugar de nacimiento fuera el territorio argentino o de países limítrofes) como en poblaciones aborígenes aisladas (Tablas 3.4.2 b y c).

Tabla 3.4.2a. Prevalencia de deleciones en el Hg Q

Marcador ausente	N	Frecuencia (%)
sY1291	4	4/240 (1,66%)
sY1197 y sY1191	2	2/240 (0,83%)
sY1191	1	1/240 (0,42%)
sY1206	1	1/240 (0,42%)

Tabla 3.4.2b. Deleciones encontradas en el Hg Q en población urbana

Marcador ausente	N	Población
sY1291	3	Argentina (N=1) y Bolivia (N=2)
sY1197 y sY1191	1	Bolivia
sY1191	1	Bolivia
sY1206	1	Paraguay

Tabla 3.4.2c. Deleciones encontradas en comunidades aborígenes aisladas

Marcador ausente	N	Población
sY1291	1	Tehuelche
sY1197 y sY1191	1	Guaraní

Según la nomenclatura utilizada para las deleciones más frecuentemente descritas, la ausencia del marcador sY1291 (y presencia de todos los demás) determina la deleción gr/gr (Figura 3.4.2a); mientras que la ausencia del marcador sY1191 determina la deleción b2/b3 (Figura 3.4.2b) (Repping *et al* 2004). Si bien no se trata de deleciones reportadas en forma recurrente, la ausencia del marcador sY1206 podría explicarse mediante la recombinación entre los amplicones b3 y b4, determinando así la deleción b3/b4 (Figura 3.4.2c). De igual manera, la ausencia de los marcadores sY1197 y sY1191 sería consecuencia de la deleción b1/b2 (Figura 3.4.2d). En el punto 3.4.4 se describen los posibles mecanismos que explicarían las deleciones halladas.

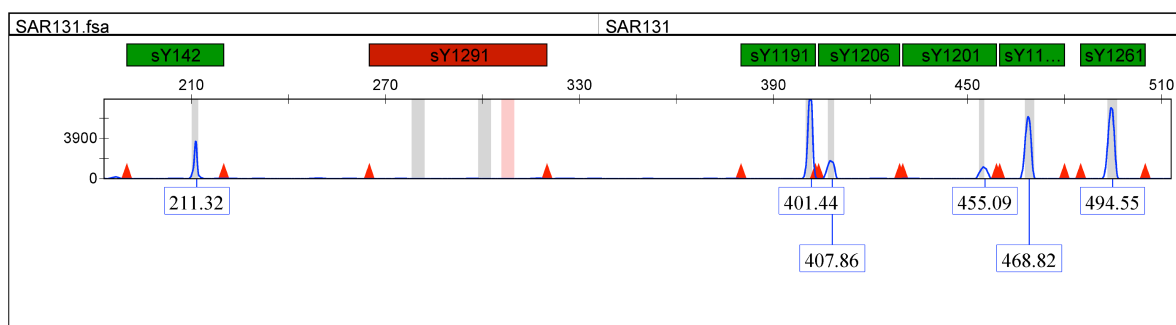


Figura 3.4.2a. Resultado de una muestra con deleción gr/gr mediante análisis de Y-STs.

- Resultados -

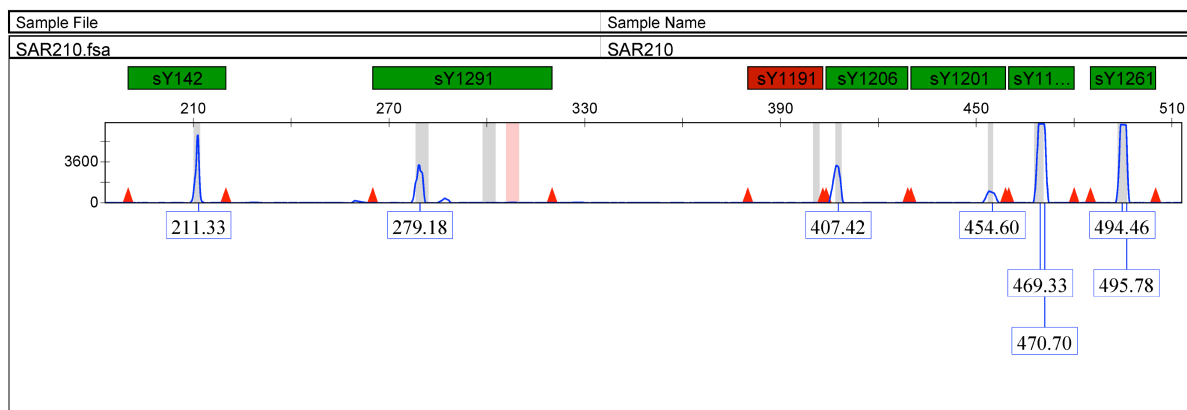


Figura 3.4.2b. Resultado de una muestra con delección b2/b3 mediante análisis de Y-STSs.

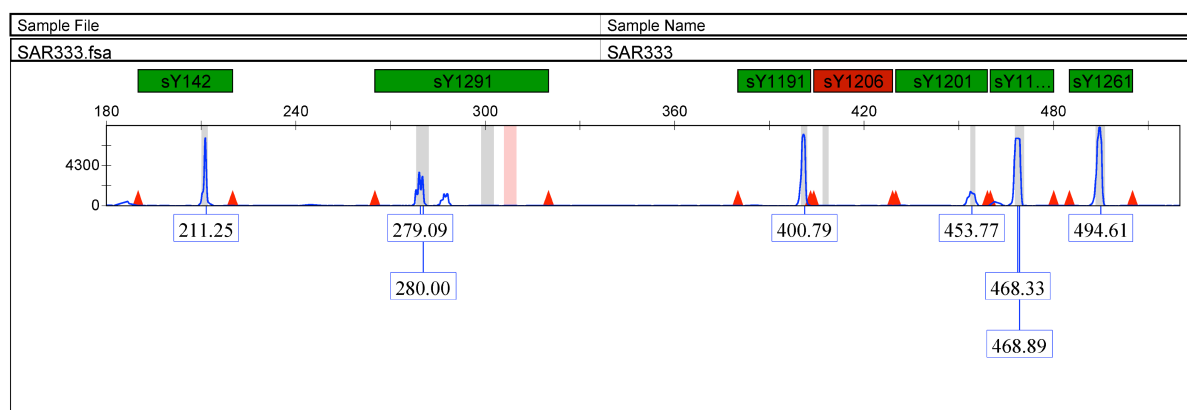


Figura 3.4.2c. Resultado de una muestra con delección b3/b4 mediante análisis de Y-STSs.

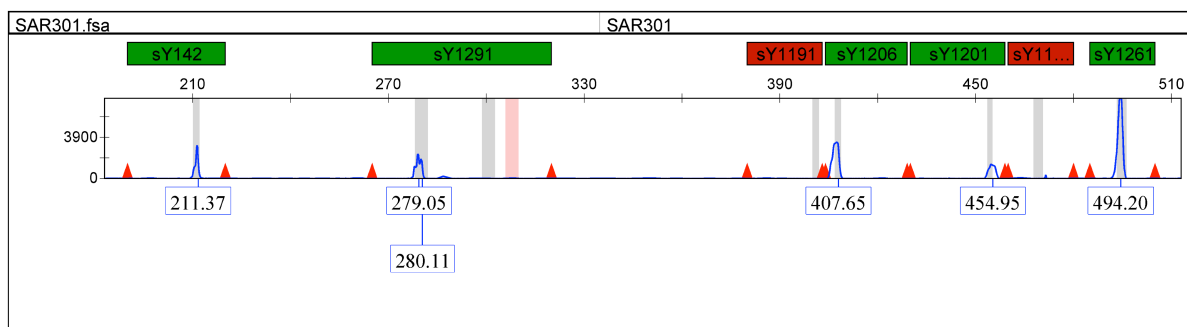


Figura 3.4.2d. Resultado de una muestra con delección b1/b2 mediante análisis de Y-STSs.

3.4.3. Mecanismos de delección postulados para las delecciones parciales

Para evaluar los posibles mecanismos de las delecciones parciales de la región AZFc halladas, se analizó la presencia de los principales genes localizados en dicha región (*DAZ*, *CDY*, *BPY2*, *PRY*, *GOLGA2LY* y *CSGP4LY*) y los SFVs de los genes *DAZ* y *CDY1*, que permiten conocer los genes remanentes de la delección. Las Tablas 3.4.3a y 3.4.3b resumen los resultados obtenidos a partir de las muestras con delecciones parciales. A

partir de los genes ausentes y de los haplotipos de los genes *DAZ* y *CDY1* remanentes de la deleción, fue posible establecer los posibles mecanismos de deleción. Los mecanismos postulados, se esquematizan en la Figura 3.4.3, como así también los amplicones, genes y marcadores incluidos.

Tabla 3.4.3a. Presencia de genes en muestras con deleción

Deleción	<i>DAZ</i>	<i>CDY</i>	<i>BPY2</i>	<i>PRY</i>	<i>GOLGA2LY</i>	<i>CSGP4LY</i>
gr/gr	presente	presente	presente	presente	presente	presente
b2/b3	presente	presente	presente	presente	presente	presente
b3/b4	presente	presente	presente	presente	ausente	ausente
b1/b2	presente	presente	presente	ausente	presente	presente

Tabla 3.4.3b. Tipificación de *DAZ* y *CDY* en muestras con deleción

Deleción	<i>DAZ1</i>	<i>DAZ2</i>	<i>DAZ3</i>	<i>DAZ4</i>	<i>CDY1A</i>	<i>CDY1B</i>	Subtipo	N
gr/gr*	ausente	ausente	presente	presente	presente	ausente	g1/g3	2
	ausente	ausente	ausente	presente	presente	presente	r1/r3	1
b2/b3	presente	presente	ausente	ausente	ausente	presente	NC	1
b3/b4	presente	presente	ausente	ausente	presente	presente	NC	1
b1/b2	presente	presente	presente	presente	presente	presente	NC	2

*Debido a la escasez de la muestra no fue posible determinar SFVs en una de las muestras con deleción gr/gr. NC: no corresponde

3.4.3.1. Subtipos de deleción gr/gr

Los subtipos de deleción gr/gr que encontramos entre los descendientes de nativo americanos fueron *DAZ1/2+CDY1B* (N=2) y *DAZ1/2/3+CDY1A* (N=1). En una de las muestras no fue posible realizar la tipificación debido a la escasez de la misma.

El primer subtipo (g1/g3) que incluye a los genes *DAZ1/2+CDY1B* podría explicarse por una inversión b3/b4 seguida por una deleción gr/gr (Figura 3.4.3a). Las muestras que presentaron dicha deleción fueron de hombres fértiles provenientes de Bolivia y de la comunidad Tehuelche. La deleción g1/g3 había sido previamente descrita en población Yi de China, únicamente en hombres infértiles (Ye *et al* 2013). Sin embargo, en población europea (de Alemania, Dinamarca, España, Italia y Hungría) y australiana, se encontró tanto en pacientes con recuento de espermatozoides normal como anormal (Krausz *et al* 2009). En población asiática, el subtipo g1/g3 se asoció con un efecto deletéreo sobre la espermatogénesis y no se encontró en población fértil; a diferencia del subtipo r2/r3 que se encontró en forma constitutiva en el Hg Q1 (Yang *et al* 2010).

El segundo subtipo (r1/r3) (Figura 3.4.3b) se encontró en un hombre fértil proveniente de Perú. Dicha deleción podría haber ocurrido por recombinación homóloga entre los amplicones r1 y r3, eliminándose así los genes *DAZ1*, *DAZ2* y *DAZ3*. La deleción r1/r3 se ha descrito en estudios de susceptibilidad a cáncer testicular aunque no fue asociada a su patogénesis (Ferlin *et al* 2007).

3.4.3.2. Deleción b2/b3

La deleción b2/b3 con ausencia de *DAZ3/4+CDY1A*, se ha detectado en un hombre fértil proveniente de Bolivia. El mecanismo por el cual pudo haber ocurrido dicha deleción fue propuesto como un mecanismo de dos pasos producido por una inversión gr/gr seguida de deleción b2/b3 (Figura 3.4.3c) (Repping *et al* 2004).

3.4.3.3. Deleción P1.1/P1.2

La ausencia de sY1206 como único marcador STS faltante y de los genes *DAZ3/4+CSGP4LY+GOLGA2LY* se ha detectado en un hombre fértil proveniente de Paraguay. Esta deleción podría explicarse por una recombinación homóloga entre los amplicones b3 y b4. Dicho patrón de deleción, si bien es poco frecuente, fue descrito previamente en población china e italiana, y designada como deleción b3/b4 (Ferlin *et al* 2005, Choi *et al* 2012). Sin embargo, la deleción detectada en el presente trabajo fue positiva para los genes *CDY1A* y *CDY1B*, según lo demostrado por el análisis SFVs. Esto sugiere la presencia de, por lo menos un fragmento de los amplicones amarillos y1 y y2. Por lo tanto, es más probable que la deleción se haya producido entre los palíndromos P1.1 y P1.2, localizando el punto de ruptura entre los genes *CDY1* y *CSGP4LY*, dentro del amplicón amarillo, según el mecanismo previamente propuesto (Figura 3.4.3d) (Repping *et al* 2002, Ye *et al* 2013).

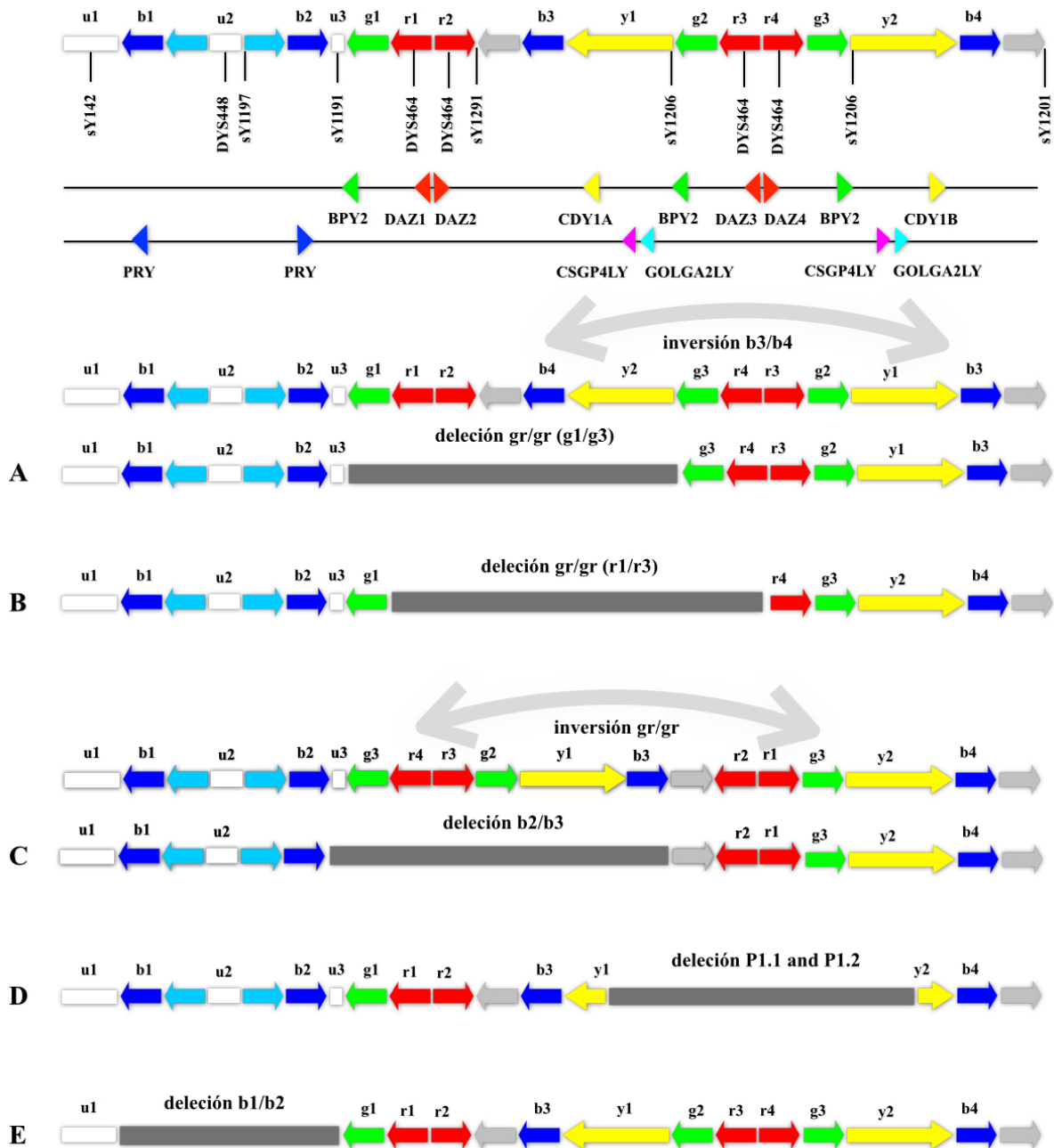


Figura 3.4.3. Posibles mecanismos que explicarían las deletiones encontradas. A. Delección gr/gr subtipo g1/g3 (N=2) B. Delección gr/gr subtipo r1/r3 (N=1) C. Delección b2/b3 (N=1) D. Delección P1.1/P1.2 (N=1) E. Delección b1/b2 (N=2)

3.4.3.4. Delección b1/b2

Encontramos también un tipo de delección parcial que abarca los marcadores sY1197 y sY1191 (en dos hombres provenientes de Bolivia y de la comunidad Guaraní) que también carecían del STR DYS448 y de ambas copias del gen PRY. El patrón descrito sugiere que se trata de una delección b1/b2. El mecanismo de la delección b1/b2 ha sido

postulado mediante un primer paso de inversión gr/gr, seguido de un paso de eliminación mediado por recombinación no homóloga o unión de extremos no homólogos (NHEJ), que incluye la delección de dos copias del gen *DAZ* (*DAZ3* y *DAZ4*) (Noordam *et al* 2011). Dicho genotipo fue asociado a un aumento del recuento espermático en pacientes pertenecientes al Hg I1*. Sin embargo, según el análisis de SFVs en las muestras del Hg Q, no se observó delección de al menos una de las copias del gen *DAZ*, ni de ningún marcador fuera del intervalo b1/b2. Por lo tanto, se sugiere que el mecanismo involucrado en la delección descrita es mediado por recombinación homóloga o NAHR entre los amplicones azules b1 y b2 (Figura 3.4.3e). Dicha delección fue descrita únicamente en población china, aunque no fue posible conocer su correlación con infertilidad o con un Hg específico dado que se trata de un trabajo en una revista china y únicamente el resumen se encuentra disponible en inglés (Cong *et al* 2010).

3.4.4. Duplicaciones posteriores a las delecciones parciales en el Hg Q

Al realizarse la cuantificación del número de copias de los genes *DAZ* y *CDY*, se observó que en todas las muestras del Hg Q, la delección fue seguida por una duplicación de los amplicones remanentes. El número de copias del gen *DAZ* varió entre 4 y 8 copias, de *CDY* de 4 a 12 copias, y de *CDY1* de 2 a 10 copias (Tabla 3.4.4). Esto sugiere la duplicación de los amplicones remanentes luego de la delección. Dicho mecanismo fue descrito previamente tanto en pacientes como en controles y, por lo tanto, se encuentra asociado tanto a la restauración del número de copias y de la función espermatogénica normal (Noordam *et al* 2011), como a falla espermatogénica (Lu *et al* 2011). Hasta el momento, se había descrito el mecanismo de duplicación como consecuencia de las delecciones parciales gr/gr y b2/b3. A partir de las muestras pertenecientes al Hg Q, se vio que como consecuencia de la totalidad de las delecciones parciales halladas, ocurrieron duplicaciones posteriores. Las duplicaciones fueron tanto del par de genes *DAZ1/DAZ2*, como de *DAZ3/DAZ4*. Las mismas no fueron asociables a alteraciones de la fertilidad, ya que todas las muestras pertenecían a la población fértil. Estos resultados contradicen lo expuesto por de Lu *et al* (2011), quienes asocian la duplicación de *DAZ1/DAZ2* con falla espermatogénica, observada en los Hgs N y O. Por el contrario, nuestros resultados evidencian que en el Hg Q, si bien ocurre dicha duplicación, ésta no

se asocia con alteración de la espermatogénesis, sugiriendo algún tipo de mecanismo compensatorio en este último Hg.

Cabe destacar que se evidenció una alta variabilidad en el número de copias de los genes *DAZ* y *CDY* específicamente en hombres pertenecientes al Hg nativo americano Q, lo cual puede deberse a la inestabilidad generada por la delección parcial previa o bien a factores intrínsecos a la estructura del cromosoma Y de este Hg. En ninguno de los casos previamente descritos, se detectaron estos mecanismos en relación a una alteración de la fertilidad y por lo tanto se sugiere que la variabilidad detectada se debe a características polimórficas del Hg Q.

Tabla 3.4.4. Resultado de la cuantificación de los genes *DAZ* y *CDY* en muestras del Hg Q con delecciones parciales de *AZFc*

ID	Delección	<i>DAZ</i>	<i>CDY</i>	<i>CDY1</i>
SAR 131	gr/gr	8	12	10
SAR342	gr/gr	4	3	3
TE56	gr/gr	4	8	6
29Q	gr/gr	6	5	ND
SAR 210	b2/b3	4	4	2
MB52	b1/b2	4	6	4
SAR 301	b1/b2	8	8	8
SAR 333	P1.1/P1.2	6	10	8

ND: no determinado por escasez de la muestra

3.5. Conclusiones

- ✓ Se caracterizó un polimorfismo de longitud en el marcador sY1291 específico del Hg Q1a2
- ✓ Se descartó la delección constitutiva gr/gr en el Hg Q1a2a1a1 (M3), en contraste con lo descrito por Yang *et al* (2010) para el Hg asiático Q1a1a1 (M120)
- ✓ Se descartó la presencia de la delección b2/b3 como constitutiva en el Hg Q3 descrita por Repping *et al* (2004), y se detectó la existencia de muestras relacionadas en el panel para detección de polimorfismos de Coriell Cell Repository, empleado para su caracterización
- ✓ No se encontraron delecciones completas de las regiones *AZFa*, *AZFb* o *AZFc* en hombres fértiles pertenecientes al Hg Q1a2a1a1

- Resultados -

- ✓ En hombres fértiles pertenecientes al Hg Q1a2a1a1, se encontraron 4 tipos de deleciones parciales en la región AZFc (gr/gr, b2/b3, b1/b2 y P1.1/P1.2) sin efecto deletéreo sobre la fertilidad
- ✓ La prevalencia de deleciones parciales polimórficas de la región AZFc en población fértil del Hg Q fue del 3,3%
- ✓ Se evidenció la existencia de duplicaciones posteriores a todas las deleciones detectadas en el Hg Q1a2a1a1

4. Prevalencia y efecto de microdeleciones en pacientes infértiles de la población argentina

Sinopsis

A partir del estudio de la composición étnica de la población argentina, y de los resultados obtenidos en otras poblaciones, este capítulo presenta la prevalencia y tipo de microdeleciones en la región AZF del cromosoma Y en una cohorte de 170 pacientes infértiles de la población argentina. Se abarcó el análisis de microdeleciones en la región AZF y determinación del Hg de cromosoma Y, correlacionando estos datos con los aportados sobre la calidad espermática de los pacientes.

4.1. Descripción de la población estudiada

Con el objetivo de correlacionar los hallazgos moleculares con los parámetros de calidad espermática, se obtuvo del laboratorio de Fertilidad del Hospital de Clínicas una caracterización completa de las 170 muestras analizadas con respecto a los parámetros incluidos en el espermograma completo. Todos los análisis citológicos se llevaron a cabo en dicho laboratorio, por personal del mismo, y fueron derivados mediante codificación numérica salvaguardando la identidad del paciente.

4.1.1. Recuento espermático

De la información aportada sobre el recuento espermático de las muestras recolectadas, se obtuvieron los resultados que se detallan en la Tabla 4.1.1. De las muestras remitidas, el 68% (N=116) presentaron un recuento normal de espermatozoides, mientras que únicamente el 14% (N=24) tuvieron alteraciones severas como azoospermia o recuento menor a 2×10^6 espermatozoides/mL.

Tabla 4.1.1. Resumen de los resultados del recuento espermático

Recuento espermático	N	Prevalencia (%)
Azoospermia	10	5,9
Criptoospermia	3	1,8
Oligozoospermia severa (<2x10 ⁶ /mL)	11	6,5
Oligozoospermia (<15x10 ⁶ /mL)	29	17,2
Normozoospermia (>15x10 ⁶ /mL)*	116	68,6
Total	169	

*En este punto se evaluó únicamente el recuento normal de espermatozoides, abarcando estrictamente el termino *normozoospermia* todos los parámetros del semen tanto cuantitativos como cualitativos, que se desarrollará más adelante

4.1.2. Movilidad espermática

Para evaluar la movilidad espermática, se tomaron únicamente aquellas muestras con presencia de espermatozoides en el eyaculado, por lo que en pacientes azoospermicos y criptoospermicos dicha determinación no fue realizada. Según las recomendaciones de la OMS 2010, se consideraron la totalidad de los espermatozoide móviles (progresivos y no progresivos), y se tomó como límite inferior de referencia el 40% de espermatozoides móviles. Los resultados, que se detallan en la Tabla 4.1.2, evidencian que aprox. el 50% de los pacientes presentaron alteraciones de la movilidad.

Tabla 4.1.2. Resumen de resultados de la movilidad espermática

Movilidad (PR+NP)	N	Prevalencia (%)
Normal (>40%)	72	46,2
Astenoospermia (<40%)	84	53,8
Total	156	

4.1.3. Morfología espermática

De igual manera que para los demás parámetros cualitativos del semen, para evaluar la morfología espermática se tomaron únicamente aquellas muestras con presencia de espermatozoides en el eyaculado. Según las recomendaciones de la OMS 2010, se tomó como límite inferior de referencia el 4% de espermatozoides con formas normales. Los

resultados obtenidos ponen de manifiesto que el 20% de los pacientes presentan alteración de la morfología espermática (Tabla 4.1.3).

Tabla 4.1.3. Resumen de resultados de morfología

Morfología	N	Prevalencia (%)
Normal (>4%)	119	79,9
Teratozoospermia (<4%)	30	20,1
Total	149	

4.1.4. Evaluación cuali/cuantitativa del semen

Para evaluar los parámetros espermáticos en forma conjunta, los mismos se agruparon según los parámetros afectados en normozoospermia (todos los parámetros normales), oligoastenoteratozoospermia (alteración de la cantidad, movilidad y morfología), astenoteratozoospermia (movilidad y morfología), oligoastenozoospermia (cantidad y movilidad) y oligoteratozoospermia (cantidad y morfología). Los resultados obtenidos, que se detallan en la Tabla 4.1.4, muestran que únicamente el 24% (N=41) de los pacientes presentó características cuali/cuantitativas del semen normales, mientras que el 76% (N=128) presentó algún tipo de alteración.

Tabla 4.1.4. Resultados de la evaluación cuali/cuantitativa del semen

Fenotipo espermático	N	Prevalencia (%)
Normozoospermia	41	24,3
Oligoastenoteratozoospermia	14	8,3
Astenoteratozoospermia	9	5,3
Oligoastenozoospermia	6	3,5
Otros	99	58,6
Total	169	

El análisis de los fenotipos espermáticos de los pacientes permitió correlacionar la presencia de microdeleciones con alteraciones cualitativas o cuantitativas específicas, lo cual se desarrollará más adelante en este capítulo.

4.2 Análisis Molecular

Para todas las muestras se analizaron microdeleciones completas y parciales de la región AZF y el haplogrupo de cromosoma Y. Aquellas muestras que presentaron deleciones, se analizaron, en una segunda etapa para determinar la extensión de la deleción y el contenido génico, en cuanto a su tipo y número de genes.

4.2.1 Prevalencia de Hgs

A partir del análisis de SNPs diagnósticos de Hg, se determinó que la mayoría de los pacientes pertenecen al Hg europeo R1b, en concordancia con lo previamente descrito para la población urbana argentina (Corach *et al* 2010). Sin embargo, la distribución de Hgs fue significativamente diferente entre la población urbana previamente estudiada y la población de pacientes infértiles analizada en el presente trabajo ($p=0,01$) (Figura 4.2.1).

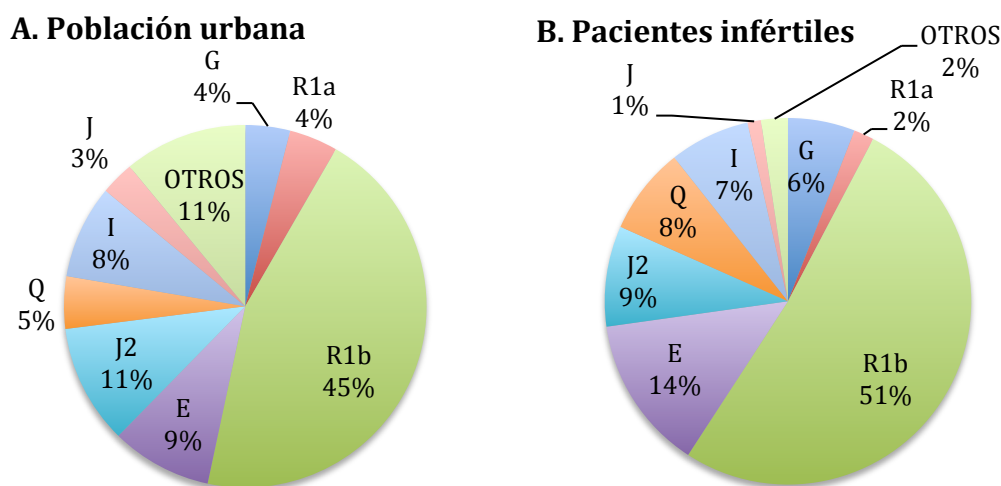


Figura 4.2.1. Frecuencias de Hgs en la población urbana (A) y pacientes infértiles (B).

Este efecto puede deberse a una predisposición de ciertos Hgs a tener dificultades para concebir y por lo tanto acudir a la consulta médica, a una diferencia significativa respecto al origen étnico de los pacientes que concurren al Hospital de Clínicas o bien un error de muestreo debido al relativamente bajo número de pacientes estudiados. Dado que el número de pacientes estudiados fue mayor al tamaño muestral mínimo ($170 > 139$), se descartó que la diferencia se deba a un error de muestreo. Para discriminar entre las dos situaciones restantes, a partir de las muestras incluidas en el trabajo de Corach *et al* (2010), se tomaron únicamente aquellas provenientes de la

Provincia de Buenos Aires y Capital Federal (CENTRO), representando las mismas una población étnicamente similar a la que concurre al Hospital de Clínicas. A partir del análisis de las muestras del “centro”, se vio que la diferencia en la distribución de los Hgs resultaba no significativa ($p=0,394$) (Figura 4.2.2). Por lo tanto, concluimos que la diferencia observada se debería a la diferencia en la distribución de Hgs entre las distintas regiones de nuestro país, y no a una predisposición de ciertos haplogrupos a padecer infertilidad.

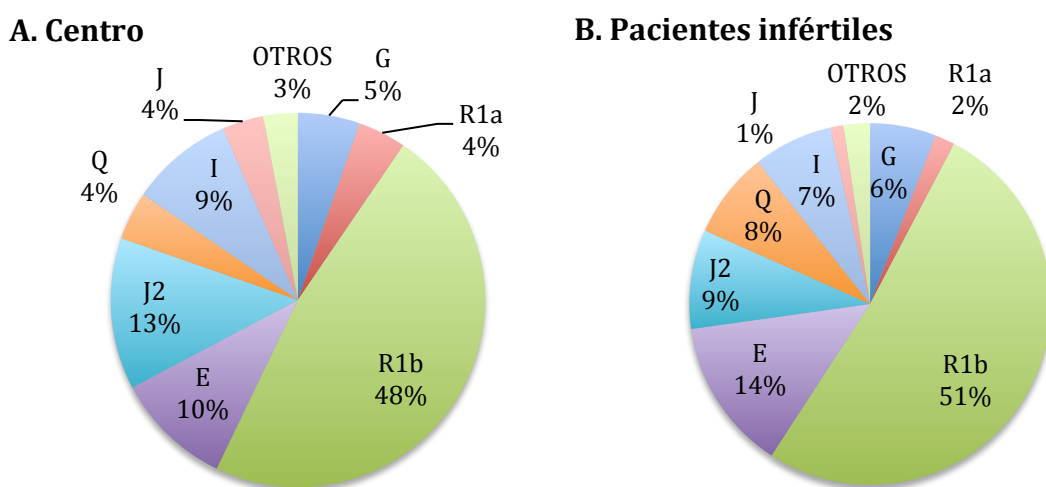


Figura 4.2.2. Frecuencias de Hgs en la población del centro de Argentina (A) y en pacientes infértiles (B).

A partir de los resultados obtenidos, se evidenció que la frecuencia del Hg nativo americano Q3 se encontraba aumentada en pacientes infértiles con respecto a la población control. Sin embargo, al comparar estadísticamente dicha diferencia, la misma resultó no significativa ($p=0,177$ para Argentina y $p=0,171$ para el centro).

4.2.2. Prevalencia de microdeleciones

4.2.2.1. Microdeleciones completas y parciales

De la totalidad de las muestras analizadas, se detectaron 6 pacientes con microdeleciones parciales de la región AZFc y 1 paciente con delección completa de dicha región. No se detectó ningún paciente con delección de las regiones AZFa o AZFb. Las

muestras con delección representaron el 4,1% (7/170) de las muestras analizadas. Las delecciones caracterizadas incluyeron los 4 tipos de delecciones más frecuentemente descritos en la población mundial: las delecciones parciales gr/gr, b1/b3 y b2/b3, y la delección completa de AZFc o b2/b4 (Rozen *et al* 2012). La Figura 4.2.2.1 muestra los resultados obtenidos en pacientes con delección y la Tabla 4.2.2.1 detalla las delecciones encontradas en los pacientes infértiles.

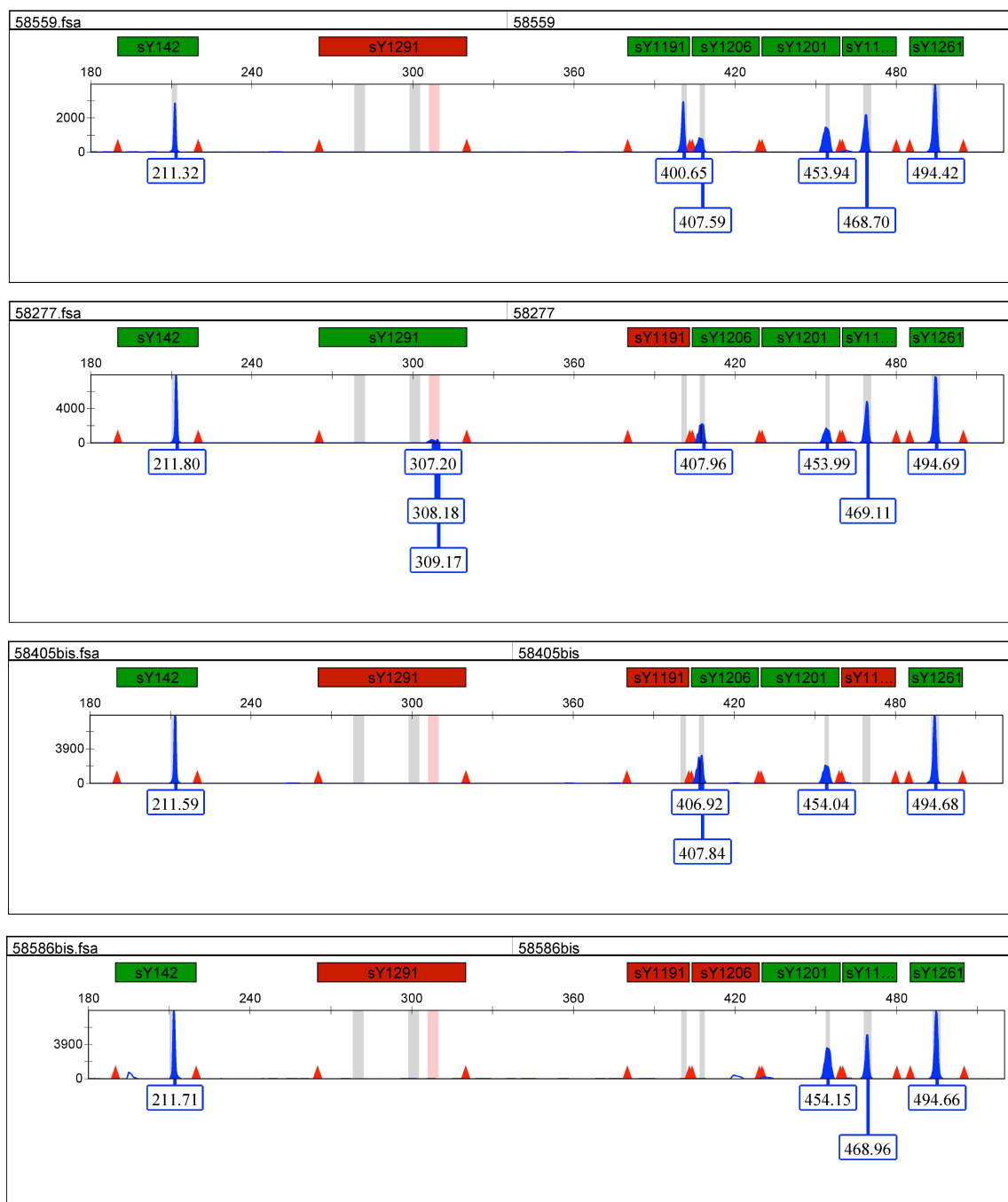


Figura 4.2.2.1. Resultados de STSs para muestras con delección gr/gr (ID=58559), b2/b3 (ID=58277); b1/b3 (ID=58405) y b2/b4 (ID=58586).

Tabla 4.2.2.1. Resultados de las deleciones encontradas en pacientes infértiles

ID	AZF	Y-STs	Delección
58403	Sin deleciones	del sY1291	gr/gr
58533	Sin deleciones	del sY1291	gr/gr
58559	Sin deleciones	del sY1291	gr/gr
58277	Sin deleciones	del sY1191	b2/b3
58715	Sin deleciones	del sY1191	b2/b3
58405	Sin deleciones	del sY1291/1191/1197	b1/b3
58586	delAZFc	del sY1291/1191/1206	b2/b4

del: delección

4.2.2.2. Tipificación de microdeleciones parciales

Dentro de las deleciones parciales gr/gr, se evidenció que todas las muestras presentaban subtipos de delección diferentes. Mediante el análisis de SFVs de los genes *DAZ* y *CDY* en los pacientes con deleciones gr/gr, se diferenciaron 3 subtipos de delección previamente descritos (Krausz *et al* 2009). El primer subtipo incluye la eliminación de los genes *DAZ1* y *DAZ2* junto con el gen *CDY1A*, lo cual puede explicarse mediante recombinación entre los amplicones g1/g2 o r1/r3 (subtipo I según Krausz *et al*). El segundo subtipo incluye la eliminación de los genes *DAZ3* y *DAZ4* junto con el gen *CDY1A*, que puede explicarse por recombinación entre los amplicones r2/r4 (subtipo II). Sin embargo, el tercer subtipo de delección de los genes *DAZ1* y *DAZ2* junto con el gen *CDY1B* no puede explicarse mediante un único evento de recombinación, siendo necesaria la inversión previa b3/b4 seguida de recombinación y eliminación g1/g3 o r1/r3 (subtipo III). Los resultados obtenidos de la tipificación de los genes remanentes de las deleciones se resumen en la Tabla 4.3.2 y los mecanismos de delección propuestos por Ye *et al* (2013) y que justifican los haplotipos hallados en los pacientes estudiados se esquematizan en la Figura 4.3.2.1.

En ambas muestras con delección b2/b3, mediante el análisis de SFVs, se determinó que presentan el mismo subtipo de delección eliminándose en ambos casos los genes *DAZ1*, *DAZ2* y *CDY1B*. En este caso el mecanismo de delección podría haber involucrado dos etapas: la primer etapa de inversión y1/y2 o conversión génica de las copias del gen *CDY1*, y una segunda etapa de recombinación seguida de delección entre los amplicones gr/gr. Dicho subtipo de la delección b2/b3 fue previamente descrito en población china

en un único hombre con fertilidad normal (Wu *et al* 2007). El mecanismo propuesto se esquematiza en la Figura 4.3.2.2.

Tabla 4.3.2. Resultado de la tipificación de microdeleciones parciales

ID	Deleción	Genes AZFc	SFVs
58403	gr/gr	SD	DAZ1/2+CDY1A
58533	gr/gr	SD	DAZ3/4+CDY1A
58559	gr/gr	SD	DAZ1/2+CDY1B
58277	b2/b3	SD	DAZ1/2+CDY1B
58715	b2/b3	SD	DAZ1/2+CDY1B

SD: sin deleciones

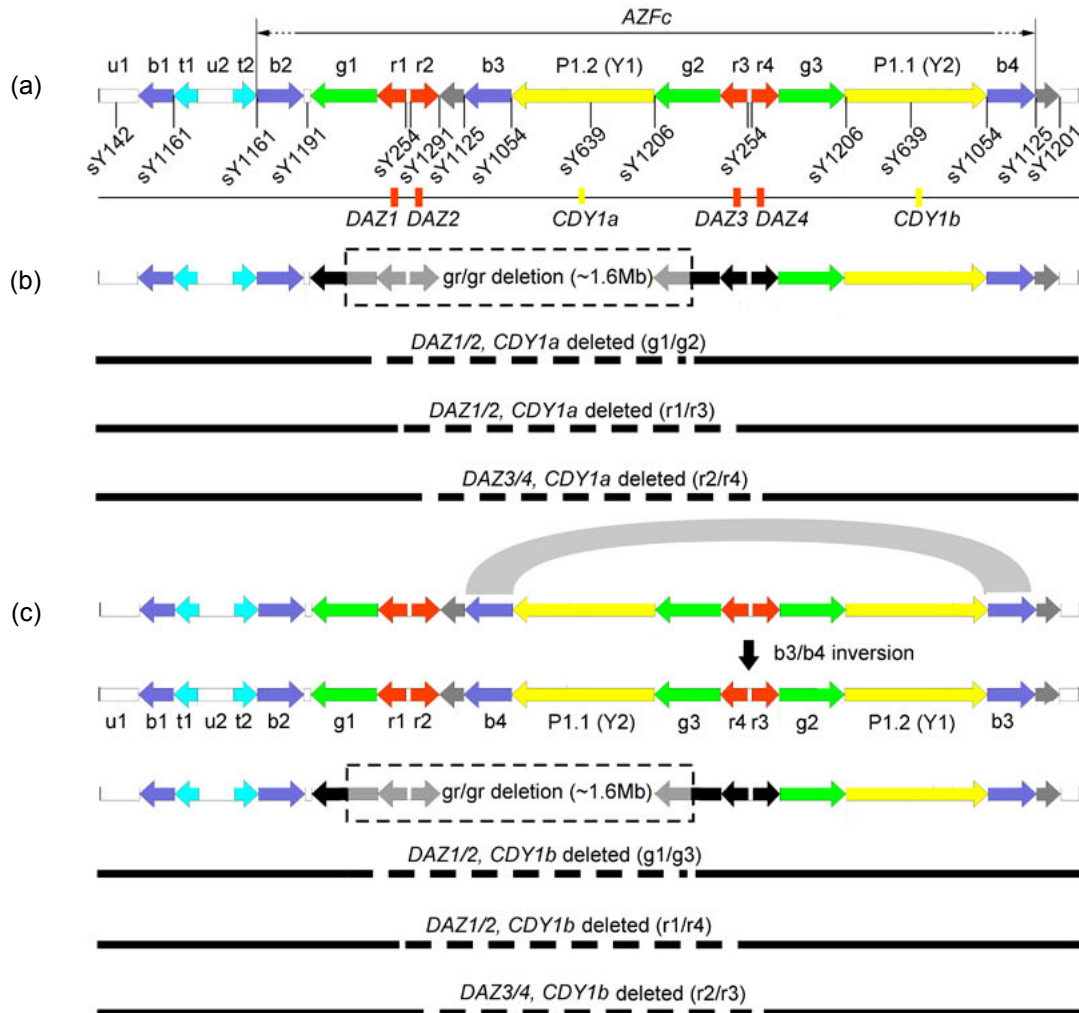


Figura 4.3.2.1. Mecanismo molecular de los sub-tipos de deleción gr/gr (Ye *et al* 2013).

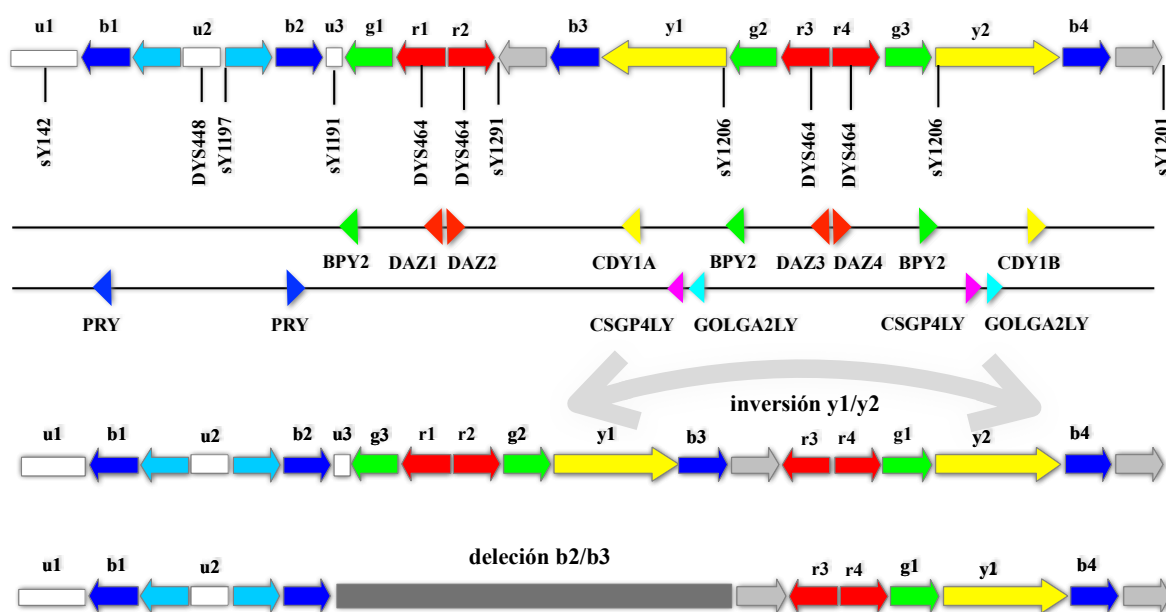


Figura 4.3.2.2. Mecanismo propuesto para la delección b2/b3 abarcando los genes *DAZ1*, *DAZ2* y *CDY1B*.

4.2.3. Duplicación de los genes *CDY1* y *CDY2* luego de la delección

Mediante la cuantificación del número de copias de los genes *DAZ* y *CDY*, se identificó una duplicación del gen *CDY1* posterior a la delección. Se observó una disminución de la dosis del gen *DAZ* (de 4 a 2 copias), en concordancia con la delección detectada. Por el contrario, no se observó disminución del número de copias del gen *CDY1*, que parece haber restaurado su estado normal de número de copias (2) (Krausz *et al* 2009). La cronología de la duplicación posterior a la delección se confirmó mediante el análisis del haplotipo remanente en el cual se evidencia que ambas copias del gen *CDY1* son iguales (*CDY1A* ó *CDY1B*), sugiriendo duplicación de la única copia remanente. También se vio en dos casos un aumento del número de copias del gen *CDY* a causa del gen *CDY2* (aumento de *CDY* de 4 a 6 copias).

El análisis de las variantes alélicas del STR *DYS464* permitió estimar y confirmar el número de copias del gen *DAZ*. Los resultados obtenidos indicarían, que los fragmentos donde se localiza tanto el gen *DAZ* como el STR *DYS464* se encuentran repetidos como mínimo 2 veces. La presencia de 1 o 2 variantes alélicas, adicionalmente a la cuantificación del gen *DAZ*, confirman la delección de amplicones rojos (r) en las muestras analizadas. Las características de cada muestra con delección se describen en la Tabla 4.2.3.

Tabla 4.2.3. Resultado de la cuantificación y tipificación de los genes *DAZ* y *CDY* en muestras con microdeleciones parciales

ID	Delección	DAZ	CDY	CDY1	DYS464	Subtipo
58403	gr/gr	2	4	2	13-15	DAZ1/DAZ2+CDY1B
58533	gr/gr	2	6	2	15	DAZ1/DAZ2+CDY1A
58559	gr/gr	2	4	2	13	DAZ3/DAZ4+CDY1A
58277	b2/b3	2	4	2	13	DAZ1/DAZ2+CDY1B
58715	b2/b3	2	6	2	11-13	DAZ1/DAZ2+CDY1B

4.2.4. Asociación entre microdeleciones y Hgs

Si bien la composición étnica del grupo de pacientes estudiado no fue estadísticamente diferente a la población urbana del centro de Argentina, las deleciones encontradas en estos pacientes se circunscribieron particularmente a los Hgs G2a, E1b1b y J2 (en orden decreciente de prevalencia)(Tabla 4.2.4). Como se detalló previamente, el Hg G2a se encuentra en alta proporción en medio oriente y en la región del Mediterráneo, especialmente en Italia. El Hg E1b1b proviene de África y también se encuentra altamente distribuido en la región del Mediterráneo. El Hg J2 es característico de población judía. Dado el origen de la población argentina, es probable que los Hgs G2a y E1b1b en nuestra población provengan de Italia o España. Dentro de la totalidad de las muestras pertenecientes a dichos Hgs, las muestras con delección presentaron una prevalencia aumentada de estos Hgs (36% del Hg G2a y 9% del Hg E1b1b). Estos resultados sugieren que los Hgs mencionados podrían presentar factores que predisponen a microdeleciones parciales de la región AZFc.

Tabla 4.2.4. Hgs de las muestras con microdeleciones

ID	Delección	Hg
58403	gr/gr	G2a
58533	gr/gr	G2a
58559	gr/gr	E1b1b
58277	b2/b3	G2a
58715	b2/b3	G2a
58405	b1/b3	J2
58586	b2/b4	E1b1b

4.2.5. Asociación entre las deleciones y la calidad espermática en diferentes Hgs

A partir de la correlación entre las microdeleciones y el fenotipo espermático, se detectaron deleciones parciales de la región AZFc en pacientes normozoospermicos u oligozoospermicos con distinto grado con alteración de la movilidad y/o morfología (oligoastenoteratozoospermia), y no en pacientes azoospermicos. Por el contrario, la deleción completa de la región AZFc se detectó únicamente en un paciente con criptozoospermia. La frecuencia global de deleciones en pacientes azoospermicos o criptozoospermicos fue del 7,7% (1/13), de 7,5% en oligozoospermicos (3/40) y de 2,6% en normozoospermicos (3/116). La diferencia en la prevalencia de deleciones entre pacientes azoospermicos y normozoospermicos, así como entre oligozoospermicos y normozoospermicos fue estadísticamente no significativa ($p=0,3496$ y $p=0,1759$ respectivamente), sugiriendo que no existe asociación entre microdeleciones y recuento espermático en pacientes con infertilidad idiopática (no seleccionada según recuento espermático).

Dentro del sub-grupo de pacientes azoospermicos, la deleción AZFc presentó una prevalencia del 10% (1/10), encontrándose este valor en el límite superior descrito a nivel mundial (2,5-10%)(Simoni *et al* 2008). Sin embargo, es necesario el estudio de un mayor número de pacientes azoospermicos para confirmar dicho valor, lo cual será expuesto en el capítulo 5 del presente trabajo.

Si bien se observó disminución de la movilidad y morfología en pacientes con deleciones parciales, dado que en su gran mayoría dichas alteraciones se encuentran asociadas a factores ambientales y no genéticos, no resulta posible sacar conclusiones al respecto. Sería necesario evaluar los factores ambientales en dichos pacientes para asociar o descartar el efecto específico de las deleciones parciales sobre la calidad espermática.

Los resultados de los perfiles espermáticos de los pacientes con deleciones se detallan en la Tabla 4.2.5.

Tabla 4.2.5. Resultados de los parámetros espermáticos y étnicos en pacientes con microdeleciones

ID	Recuento (x10 ⁶ Ez/ml)	Movilidad a+b (%)	Morfología (%)	Hg	Delección
58533	27,3	40,9	7	G2a	gr/gr
58559	37,4	33,6	4	E1b1b	gr/gr
58403	5,2	11,2	5	G2a	gr/gr
58277	108,0	37,7	1	G2a	b2/b3
58715	2,7	12,2	1	G2a	b2/b3
58405	0,6	6	0	J2	b1/b3
58586	0,000001	ND	ND	E1b1b	b2/b4

ND: no determinado

4.2.6. Distribución de Hgs en pacientes azoospermicos sin deleciones

Por otro lado, dentro de la categoría de pacientes azoospermicos sin deleciones, se vio un aumento de la prevalencia de los Hgs R1b1a2 (60%; 6/10), Q1a2a1a1 (30%; 3/10) y E1b1b (10%; 1/10). Si bien es esperable el aumento de prevalencia del Hg R1b1a2, dado que es el más frecuente en la población argentina, no ocurre lo mismo con el Hg Q1a2a1a1. Este último tiene una frecuencia del 5% en la población urbana y por lo tanto resulta llamativo el aumento de la prevalencia del Hg Q en los pacientes azoospermicos sin deleciones detectadas. Esta diferencia no resultó lo suficientemente significativa ($p=0,0556$), debido al bajo número de pacientes azoospermicos estudiados, sin embargo esto sugiere que en el Hg Q podrían estar actuando otros factores genéticos aún no estudiados, posiblemente asociadas al cromosoma Y, por lo cual sería necesario profundizar su estudio. Los resultados mencionados se detallan en la Tabla 4.2.6.

Tabla 4.2.6. Resultado de distribución de Hgs en pacientes azoospermicos

Hg	N	Prevalencia (%)
R1b	6	60
Q1a3a1	2	20
E1b1b	1	10
Q1a	1	10

4.3. Conclusiones

- ✓ A partir del análisis de pacientes con infertilidad sin causa aparente, no se observó una diferencia significativa en la distribución de Hgs con respecto a la población urbana de Argentina, indicando que no existe una predisposición intrínseca de determinados Hgs a padecer infertilidad
- ✓ La prevalencia de microdeleciones en pacientes infértiles con causa idiopática fue de 4,1%, representando los tipos de delección más frecuentes a nivel mundial (gr/gr, b2/b3, b1/b2 y AZFc)
- ✓ No se encontró una diferencia significativa en la prevalencia de microdeleciones entre pacientes normozoospermicos y aquellos con recuento espermático disminuido, descartándose la asociación entre las microdeleciones y la disminución de recuento espermático en el grupo de pacientes infértiles estudiados
- ✓ Se evidenció la duplicación de los genes *CDY1* y *CDY2*, no así del gen *DAZ*, posterior a la delección parcial detectada
- ✓ Las muestras con deleciones se circunscribieron específicamente a los Hgs G2a, E1b1b y J2, sugiriendo un aumento de la predisposición de estos Hgs a deleciones parciales sin una clara consecuencia patogénica
- ✓ Se observó un aumento de la prevalencia del Hg Q en pacientes azoospermicos sin deleciones (30%) con respecto a la población urbana argentina (5%), sugiriendo la existencia de otro factor genético asociado al cromosoma Y aún no estudiado en dicho Hg

5. Prevalencia y efecto de microdeleciones en pacientes azoospermicos y oligozoospermicos severos de la población argentina

Sinopsis

A partir de los resultados descriptos en el capítulo anterior, dada la baja prevalencia de microdeleciones en pacientes con esterilidad sin causa aparente y recuento espermático variable, se propuso acotar el análisis a una población de pacientes azoospermicos y oligozoospermicos severos. Según lo inferido a partir de la población europea, dicha población de pacientes presenta la mayor prevalencia de microdeleciones del cromosoma Y. El presente capítulo describe los resultados de la caracterización de la región AZF y Hgs del cromosoma Y en una cohorte de 90 pacientes azoospermicos u oligozoospermicos severos, y su correlación con los parámetros espermáticos y resultados de biopsias testiculares.

5.1. Descripción de la población estudiada

Con el objetivo de correlacionar los hallazgos moleculares con los parámetros de calidad espermática y resultados de biopsias testiculares, se solicitaron las historias clínicas de los 90 pacientes incluidos en el estudio. Se registraron los resultados del recuento espermático y los resultados de las biopsias testiculares (en caso de haberse realizado).

5.1.1. Recuento espermático

Los pacientes analizados se agruparon según su recuento espermático en azoospermicos (que incluyeron azoospermicos y criptozoospermicos) y oligozoospermicos (que incluyeron todos aquellos con recuento espermático menor a 2×10^6 espermatozoides/mL). De los 90 pacientes estudiados, 5 fueron excluidos debido a condiciones preexistentes, no detectadas al momento de la toma de muestra. Teniendo en cuenta esta clasificación, la distribución de los pacientes estudiados entre ambos grupos se detalla en la Tabla 5.1.1.

Tabla 5.1.1. Resumen de resultados del recuento espermático

Perfil espermático	N
Azoospermicos	60
Oligozoospermicos	25
Total	85

5.1.2. Biopsias testiculares

En aquellos pacientes en los que la biopsia testicular fue indicada por el médico tratante, se recolectaron los resultados de dichas biopsias para evaluar si la espermatogénesis ocurre de manera normal (presencia de espermatozoides en el testículo) o existe falla espermatogénica (ausencia de espermatozoides y presencia de serie germinal inmadura y/o solo células de Sertoli). Se obtuvieron resultados de biopsias para 25 pacientes, los cuales se detallan en la Tabla 5.1.2.

Tabla 5.1.2. Resumen de resultados de biopsias testiculares y/o TESE

Resultado de la biopsia	N
Espermatogénesis normal	12
Falla espermatogénica – SCOS	7
Falla espermatogénica – serie inmadura	6
Total	25

5.2. Análisis molecular

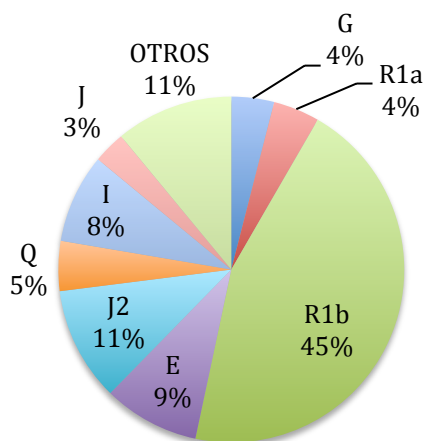
Para todas las muestras se analizaron, microdeleciones completas y parciales de la región AZF, y el haplogrupo de cromosoma Y. Las muestras que presentaron deleciones, se analizaron, en una segunda etapa para determinar la extensión de la deleción y el contenido génico de la región AZFc, en cuanto al tipo y número de genes.

5.2.1. Distribución de Hgs

A partir del análisis de los SNPs diagnósticos de Hg, se determinó que la mayoría de los pacientes azoospermicos y oligozoospermicos estudiados pertenecen al Hg europeo R1b1a2, en concordancia con los resultados descriptos tanto para la población urbana de la República Argentina (Corach *et al* 2010), como para la población infértil de Argentina (descrita en el capítulo 4). La distribución de Hgs fue significativamente diferente entre la población urbana descrita por Corach *et al* (2010) y la población de pacientes azoospermicos/oligozoospermicos analizada en el presente trabajo ($p=0,024$)

(Figura 5.2.1). Este resultado fue concordante con el obtenido para pacientes infértiles, mencionado en el capítulo 4.

A. Población control



B. Pacientes Azoospermicos

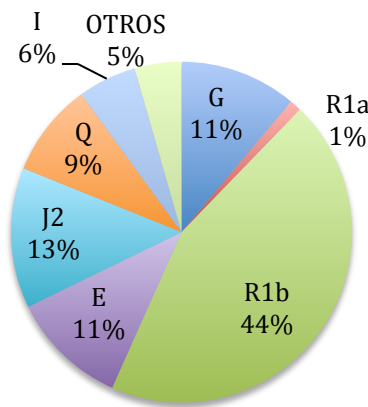
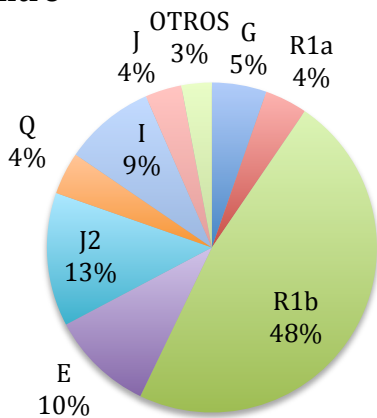


Figura 5.2.1. Frecuencias de los Hgs en la población urbana (A) y pacientes azoospermicos u oligozoospermicos (B).

Al igual que en el capítulo anterior, al acotar el análisis y comparar únicamente con las muestras del “centro”, se vio que la diferencia en la distribución de los Hgs resultaba no significativa ($p=0,187$) (Figura 5.2.2). Por lo tanto, la diferencia observada se debería a la distribución diferencial de Hgs entre las distintas regiones de nuestro país, y no a una susceptibilidad de ciertos grupos étnicos a falla espermatogénica.

A. Centro



B. Pacientes Azoospermicos

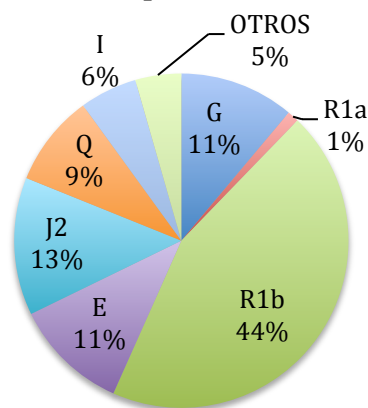


Figura 5.2.2. Frecuencias de los Hgs en la población del urbana del centro de Argentina (A) y pacientes azoospermicos u oligozoospermicos (B)

A partir de los resultados obtenidos, se evidenció una frecuencia aumentada del Hg nativo americano Q en pacientes azoospermicos con respecto a la población urbana. Sin embargo, al evaluar estadísticamente dicha diferencia, la misma resultó no significativa ($p=0,128$ para Argentina y $p=0,122$ para el centro), descartándose una mayor predisposición a la falla espermatogénica de hombres pertenecientes al Hg Q, al igual que lo expuesto en el capítulo anterior.

5.2.2. Caracterización de microdeleciones

5.2.2.1. Prevalencia de microdeleciones completas y parciales

De la totalidad de las muestras analizadas, 11 presentaron microdeleciones de la región AZF. De ellas, 8 fueron deleciones de una o varias sub-regiones completas (AZFc, AZFb y AFZbc), y 2 deleciones parciales de la región AZFc (gr/gr)(Figuras 5.2.2.1a y 5.2.2.1b). En total, las muestras con deleción representaron el 11,1% de las muestras analizadas (10/90). La deleción más frecuente en pacientes azoospermicos fue la deleción completa de la región AZFc (7%; 6/85), seguida por la deleción parcial gr/gr (2,4%; 2/85). Las deleciones de la regiones AZFb y AZFbc fueron las menos frecuentes (1,2%; 1/85, en ambos casos).

Teniendo en cuenta la totalidad de las deleciones detectadas, la proporción de las mismas fue: 60% deleciones de AZFc, 20% deleciones gr/gr, y 10% de deleciones AZFb y AZFbc. Esta distribución se condice con lo descrito por Krausz *et al* (2014), sin bien el bajo número de pacientes analizados hace que aumente la prevalencia de las deleciones menos frecuentes.

No se encontraron deleciones completas de la región AZFa, ni deleciones parciales b1/b3 o b2/b3. La deleción de la región AZFabc completa no ha sido incluida en el cálculo de prevalencia y será considerada específicamente en el punto 5.2.2.5. La Tabla 5.2.2.1 detalla las deleciones encontradas en pacientes azoospermicos y oligozoospermicos severos. La Figura 5.2.2.1c esquematiza la localización y extensión de las deleciones AZFb, AZFbc y AZFc, junto con su contenido génico (Navarro-Costa *et al* 2010).

- Resultados -

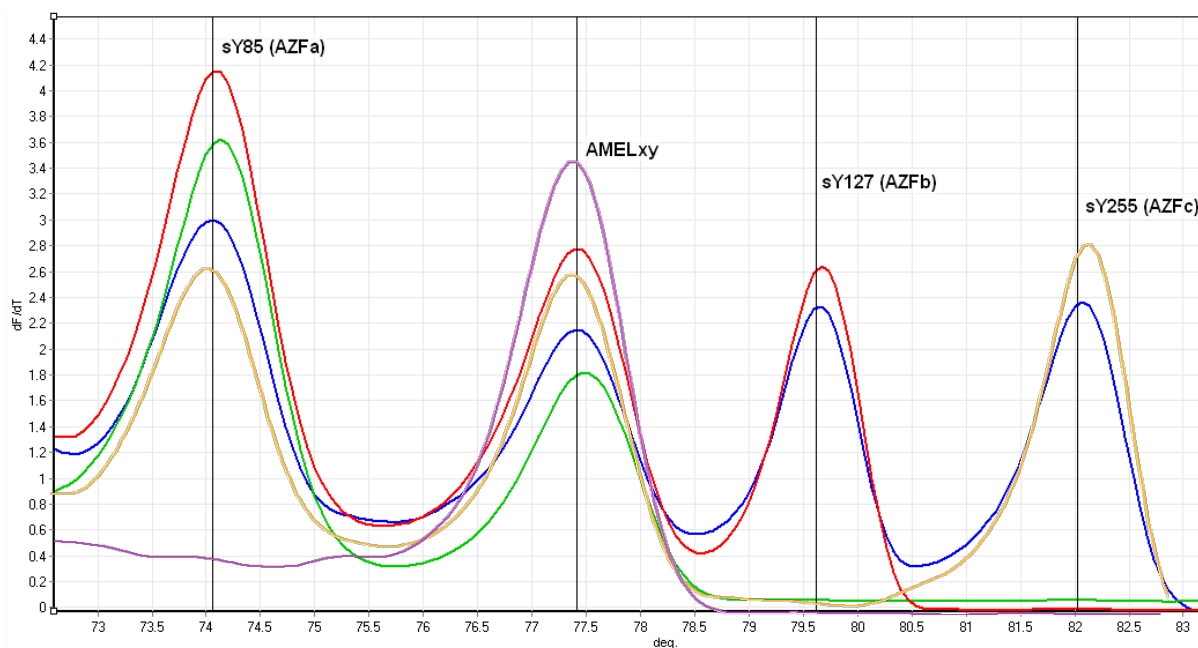


Figura 5.2.2.1a. Resultado de deleciones clásicas para muestras con deleción AZFc (ID=47; rojo), AZFb (ID=91; naranja), AZFbc (ID=46; verde), AZFabc (ID=56) y gr/gr (ID=81; azul).

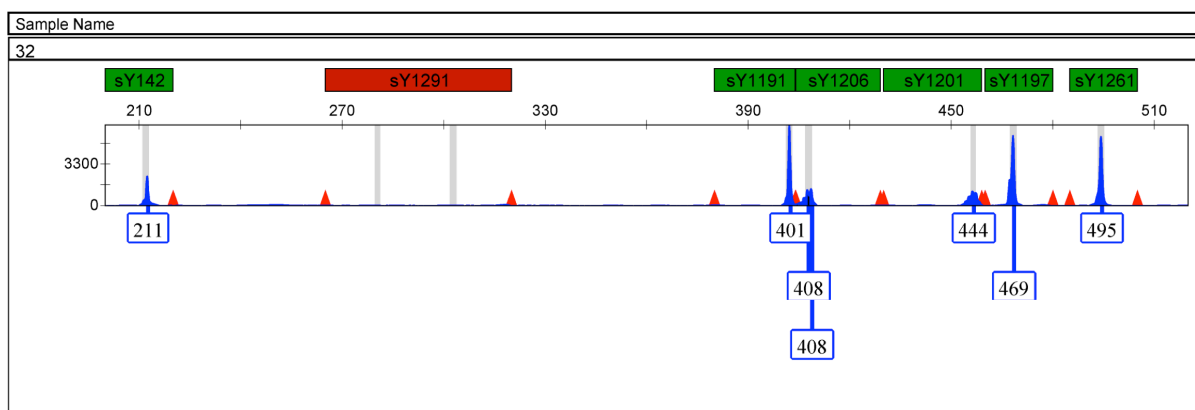


Figura 5.2.2.1b. Resultado de STSs para una muestra con deleción parcial gr/gr (ID=32).

Tabla 5.2.2.1. Resultados de deleciones en pacientes azoospérmicos y oligozoospérmicos severos

Deleción	AZF	AZFc	Prevalencia
AZFabc	del sY85/sY127/sY255	deleción de todos los marcadores	1,2% (1/85)
AZFbc	del sY127/sY255	del sY142/1197/1191/1291/1206	1,2% (1/85)
AZFb	del sY127	del sY1261	1,2% (1/85)
AZFc	del sY255	del sY1191/1291/1206	7% (6/85)
gr/gr	SD	del sY1291	2,4% (2/85)

del: deleción; SD: sin deleción

- Resultados -

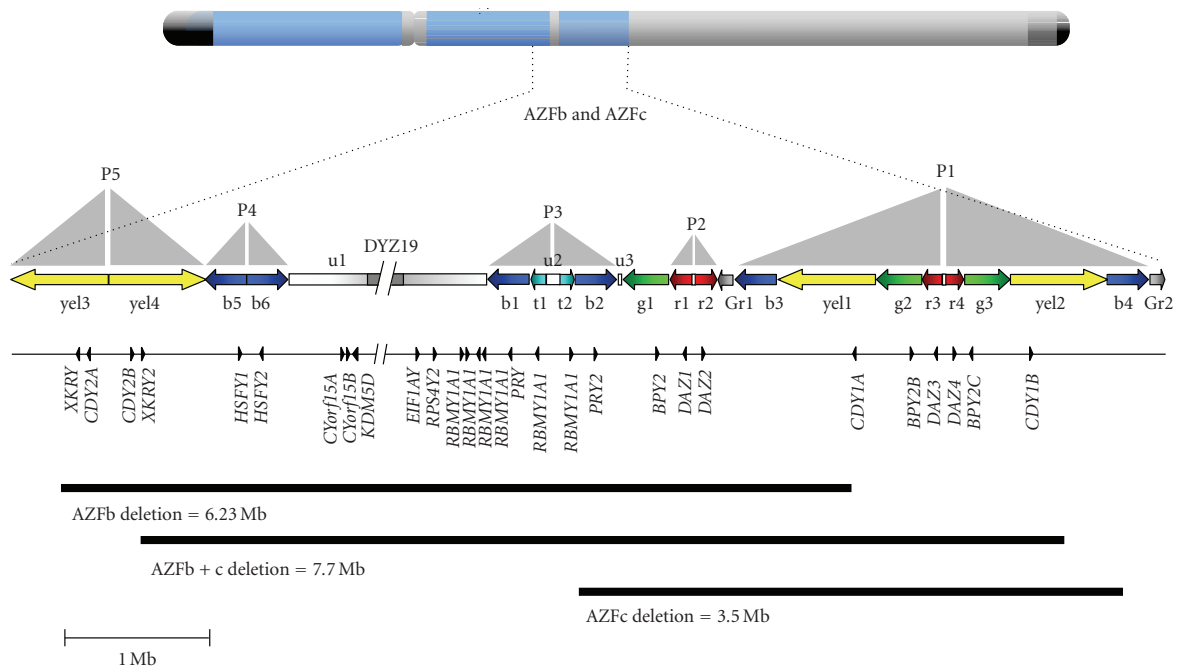


Figura 5.2.2.1c. Localización y extensión de las deleciones AZFb, AZFbc y AZFc (Navarro-Costa et al 2010).

5.2.2.2. Tipificación de microdeleciones completas

5.2.2.2.1. Delección AZFbc

A partir del análisis de marcadores STSs y STRs localizados en regiones no codificantes distribuidas a lo largo del cromosoma Y, se determinó que la delección AZFbc abarca aproximadamente 8,3 Mb entre las posiciones 18.499.245 (sY1261) y 26.867.379 (sY1201) (NCBI36/hg18). La delección de la región AZFbc incluye los genes *DAZ*, *CDY1*, *BPY2*, *PRY*, *CSGP4LY* y *GOLGA2LY*. La delección de las 4 copias del gen *DAZ* se determinó por qPCR y se confirmó mediante la ausencia de amplificación del STR *DYS464*. Además, se determinó que la disminución en el número de copias del gen *CDY* fue a expensas del gen *CDY1*. La caracterización de la delección se esquematiza en la Figura 5.2.2.2.1 y los análisis realizados se detallan en la Tabla 5.2.2.2.

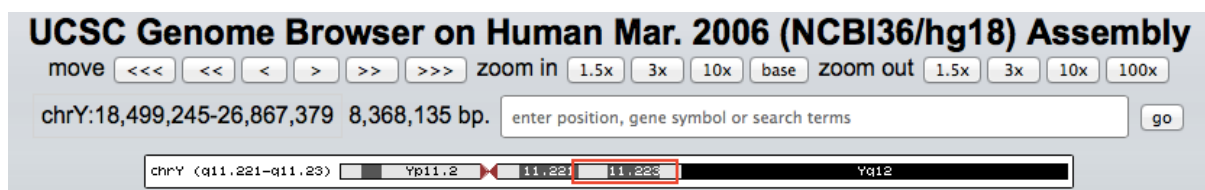


Figura 5.2.2.2.1. Localización y tamaño de la delección AZFbc empleando MSY Breakpoint Mapper (Lange et al 2008).

Según clasificaciones previas, la delección AZFbc presenta dos patrones diferentes: P5/P1 distal y P4/P1 distal (Figura 1.3.4 del capítulo 1)(Repping *et al* 2002). La delección descrita en la presente tesis corresponde al patrón P4/P1 distal, dado que dicha delección no abarca al gen *CDY2* (a diferencia del patrón P5/P1 distal). Sin embargo, ambos patrones de delección previamente descritos eliminan una única copia del gen *CDY1*, dejando copias remanentes del mismo. En el caso aquí descrito, se determinó que no existen copias remanentes del gen *CDY1*. Esto puede explicarse mediante un mecanismo alternativo de delección de la totalidad del palíndromo P1, o mediante la conversión génica de la copia remanente del gen *CDY1* a *CDY2*, ocurrida previa o posteriormente a la delección. Dado que la delección aquí descrita abarca un tamaño mayor a la descrita por Repping *et al* (2002)(8,3 Mb vs. 7 Mb), y que elimina la totalidad de las copias del gen *CDY1*, sería más probable que dicha delección elimine completamente el palíndromo P1.

5.2.2.2.2. Delección AZFb

Mediante el análisis de marcadores STSs y STRs se determinó que la delección AZFb detectada abarca aproximadamente 7 Mb, entre los marcadores DYS390 y sY142 (GRCh38). Llamativamente, esta delección no concuerda con el patrón descrito por Repping *et al* (2002) para la delección AZFb o P5/P1 proximal, dado que los marcadores sY142 y DYS448 (localizados en la región AZFc) se encuentran presentes. Esto indicaría que la delección que presenta el paciente (ID=91), incluye únicamente la porción de la región AZFb que no se superpone con la región AZFc. A partir del análisis de los principales genes candidatos de la espermatogénesis, se observó que dicha delección incluye únicamente el gen *CDY*, produciendo una disminución del número de copias del mismo a expensas del gen *CDY2*. También se observó una disminución del número de copias de gen *DAZ* (N=2).

Al comparar el contenido génico de la delección hallada con el de las delecciones AZFb previamente descritas en bibliografía, se evidenció que ambas delecciones no abarcaban la misma región ni los mismos genes. La delección AZFb descrita por Repping *et al* incluye la delección completa del gen *PRY*, mientras que la delección detectada en el presente trabajo incluye el gen *CDY2* (Repping *et al* 2002). Si bien, los marcadores

diagnósticos de delección de la región AZFb, sY127 y sY134, se encuentran ausentes en ambos casos, las delecciones se extienden hacia extremos opuestos. La extensión de ambas delecciones se determinó mediante el empleo de marcadores STRs localizados a lo largo de todo el cromosoma. Tal como se muestra en la Figura 5.2.2.2, la región deletada que no es compartida con la delección P5/P1 proximal incluye los genes *XKRY*, *CDY2*, *HSFY*, entre otros; pero no al gen *PRY*.



Figura 5.2.2.2. Identificación de la región AZFb deletada entre los marcadores *DYS390* y *sY142*. El recuadro rojo señala la región de la delección que no es compartida con la delección P5/P1 proximal descrita por Repping et al (2002).

5.2.2.2.3. Delección AZFc

Se determinó que la delección AZFc abarca aproximadamente 3,9 Mb entre las posiciones 22.933.005 (sY1197) y 26.867.379 (sY1201) (NCBI36/hg18). A partir del análisis de los principales genes candidatos de la espermatogénesis se observó que la delección AZFc incluye los genes *DAZ*, *CDY1*, *BPY2*, *CSGP4LY* y *GOLGA2LY*. La delección de las 4 copias del gen *DAZ* se determinó por qPCR y se confirmó mediante la ausencia de amplificación del STR *DYS464*. La caracterización de la delección se esquematiza en la Figura 5.2.2.3 y los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 5.2.2.2.

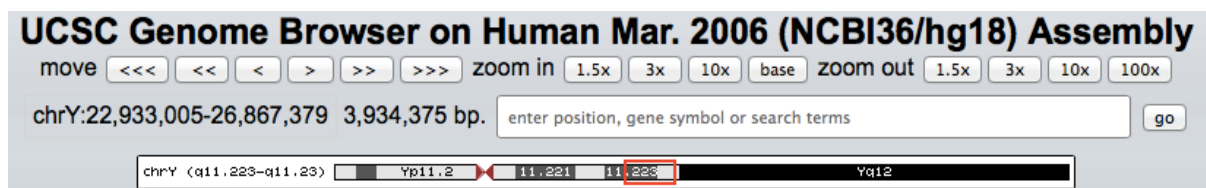


Figura 5.2.2.3. Localización y tamaño de la delección AZFc empleando MSY Breakpoint Mapper (Lange et al 2008)

Tabla 5.2.2.2. Resultados de la caracterización de microdeleciones completas

ID	AZF	Genes	DAZ	CDY1	DYS464	Y-STRs
46	delAZFbc	delBPY2/PRY/CSGP4LY GOLGA2LY/DAZ	0	0	del	delDYS448/DYS549/ DYS392/DYS385
91	delAZFb	sin deleciones	2	2	13	delDYS549/DYS533/ DYS392/DYS385 GATAH4
1	delAZFc	delBPY2/CSGP/DAZ/GOLGA	0	0	del	sin deleciones
41	delAZFc	delBPY2/CSGP/DAZ/GOLGA	0	0	del	sin deleciones
47	delAZFc	delBPY2/CSGP/DAZ/GOLGA	0	0	del	sin deleciones
53	delAZFc	delBPY2/CSGP/DAZ/GOLGA	0	0	del	sin deleciones
61	delAZFc	delBPY2/CSGP/DAZ/GOLGA	0	0	del	sin deleciones
70	delAZFc	delBPY2/CSGP/DAZ/GOLGA	0	0	del	sin deleciones

del: deleción

5.2.2.3. Tipificación de microdeleciones parciales

5.2.2.3.1. Deleción gr/gr

A partir del análisis de SFVs, se determinó que ambas muestras con deleción gr/gr pertenecían al mismo subtipo, eliminando la dupla de genes *DAZ1/DAZ2* además del gen *CDY1A*. El mecanismo probable de dicha deleción se detalla en la Figura 5.2.2.3.1. Mediante el análisis de los principales genes de la región AZFc no se evidenció la ausencia completa de ninguno de los genes analizados. La cuantificación de los genes *DAZ* y *CDY* permitió determinar que en una de las muestras (ID=32) había una marcada disminución del número de copias de ambos genes. Sin embargo, la otra muestra con la misma deleción (ID=81) no evidenció una disminución del número de copias de los mismos. Esto último puede deberse a una falsa deleción del marcador sY1291 (que define la deleción gr/gr) debido a una mutación en el sitio de anclaje del primer, o a una duplicación posterior a la deleción. Si bien han sido descriptos casos de falsas deleciones en la literatura (Krausz *et al* 2009, Krausz *et al* 2014), mediante el análisis de SFVs y del STR *DYS464* se puso de manifiesto que las 4 copias del gen *DAZ* correspondían a las variantes *DAZ1* y *DAZ2*, y las 2 copias del gen *CDY1* a la variante *CDY1A*. Estos resultados apoyan la hipótesis de una duplicación de dicha región luego de la deleción.

Tabla 5.2.2.3.1. Resultados de la tipificación de microdeleciones parciales

ID	Delección	Genes AZFc	DAZ	CDY	CDY1	DYS464	SFVs
32	gr/gr	SD	1	1	1	15-17	DAZ1/2+CDY1A
81	gr/gr	SD	4	4	2	15	DAZ1/2+CDY1A

SD: sin deleciones

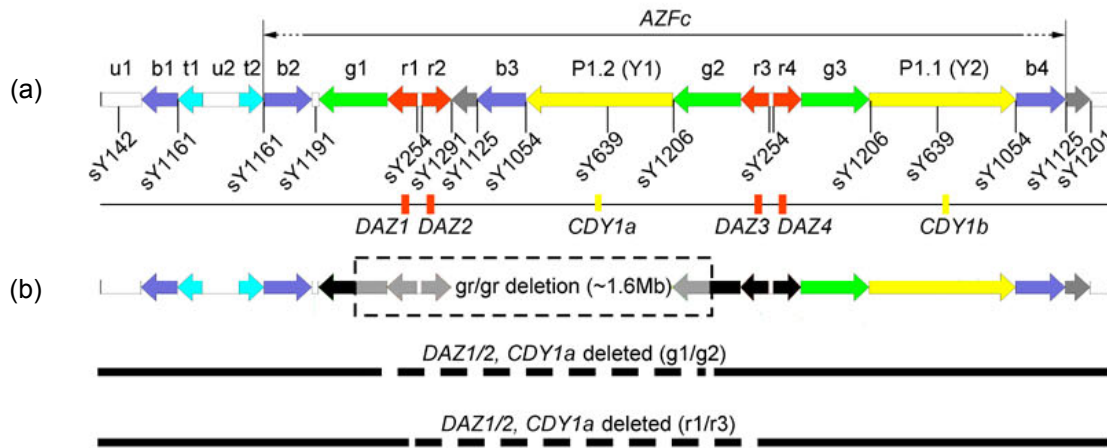


Figura 5.2.2.3.1. Mecanismo molecular de los sub-tipos de delección gr/gr (Ye et al 2013)

5.2.2.5. Delección completa del brazo largo del cromosoma Y: descripción del caso

En un paciente (ID= 56) se detectó una delección completa de la región AZF, abarcando las tres sub-regiones AZFa, AZFb y AZFc. Este paciente fue analizado en profundidad para determinar la extensión de dicha delección. Mediante el estudio de marcadores STRs ubicados a lo largo de todo el cromosoma Y, se determinó que no se encontraban presentes ninguno de los marcadores localizados en el brazo largo de dicho cromosoma, mientras que sí se encontraban presentes aquellos localizados en el brazo corto (Figura 5.2.2.5a). En una segunda etapa, a partir del estudio citogenético solicitado por el médico tratante, se determinó que el paciente presentaba un cariotipo 46, X, +mar, 21ps+, 22ps+. Las alteraciones cromosómicas 21ps+ y 22ps+ se consideran polimorfismos cromosómicos, mientras que +mar se describe como un cromosoma marcador del cual se detecta únicamente la presencia del centrómero (según el informe citogenético)(ejemplo en Figura 5.2.2.5b). A partir de los análisis genéticos y citogenéticos realizados, se podría concluir que el paciente presenta una delección completa de Yq. Esta delección estaría afectando la fertilidad del paciente a causa de la

ausencia de la función espermatogénica (que se describirá con mayor detalle en el punto 5.2.5).

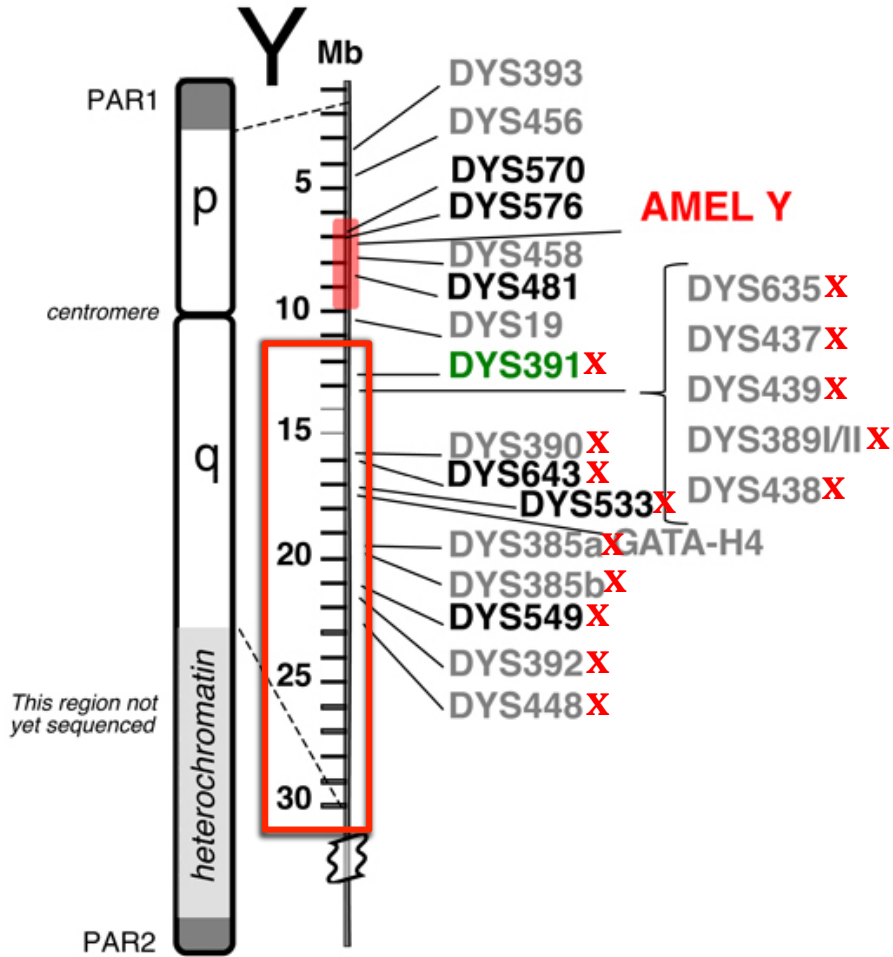


Figura 5.2.2.5a. Esquema de los marcadores STRs del cromosoma Y ausentes (marcados en rojo) en el paciente con deleción completa del brazo largo de cromosoma Y (ID=56).

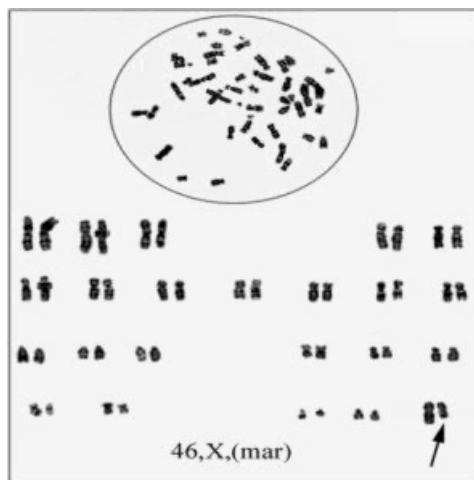


Figura 5.2.2.5b. Ejemplo de un cariotipo 46X con la presencia de un cromosoma marcador (mar).

5.2.3. Asociación entre microdeleciones y Hgs

Si bien la composición étnica del grupo de pacientes estudiados no fue significativamente diferente de la población urbana del centro de Argentina, las deleciones encontradas en estos pacientes se circunscribieron a los Hgs R1b, G2a, E1b1b, J2 y Q3 (en orden decreciente de prevalencia). El Hg R1b, además de ser el más frecuente en la población argentina, fue el que más frecuentemente se asoció con deleciones; el 54% (6/11) de los pacientes con deleciones pertenecen al Hg R1b, mientras que el 46% restante se divide entre los 4 Hgs restantes (9% cada uno). En el paciente con deleción completa de Yq no fue posible determinar el Hg al cual pertenece, dado que los marcadores SNPs diagnósticos de Hg se localizan en Yq. La distribución de Hgs entre los pacientes con deleción sigue una distribución similar a la población urbana de Argentina, indicando que la frecuencia de aparición de deleciones no estaría asociada al origen étnico.

Tabla 5.2.3. Hgs de las muestras con microdeleciones

ID	Deleción	Hg
1	AZFc	R1b
32	gr/gr	R1b
41	AZFc	E1b1b
46	AZFbc	J2
47	AZFc	Q3
53	AZFc	R1b
56	AZFabc	ND
61	AZFc	R1b
70	AZFc	R1b
81	gr/gr	R1b
91	AZFb	G2a

ND: no determinado

5.2.4. Asociación entre microdeleciones y recuento espermático en diferentes Hgs

A partir del análisis de asociación entre microdeleciones y fenotipo espermático, se vio que las deleciones AZFabc, AZFbc y gr/gr se encontraron exclusivamente en pacientes azoospermicos. Tal como fue mencionado previamente, la deleción de la región AZF completa, al remover la totalidad de los genes necesarios para la espermatogénesis, se correlaciona con azoospermia en la totalidad de los casos. Por otro lado, la deleción

conjunta de las regiones AZFbc también se ha asociado con falla espermatogénica presentando arresto espermatogénico a nivel testicular, y por lo tanto azoospermia.

Diferente es el caso de la deleción parcial gr/gr. Esta deleción elimina únicamente parte de la región AZFc, conservando al menos 2 copias del gen *DAZ*. Más aún, como fuera mencionado en el punto 5.2.2.3.1, en uno de los pacientes (ID=81) se detectó una duplicación del gen *DAZ* posterior a la deleción parcial. Los resultados presentados no se correlacionan con el fenotipo esperado para esta deleción, ya que en presencia de al menos 2 copias del gen *DAZ* es de esperar que haya algún grado de espermatogénesis residual. Sin embargo, en ambos casos con deleción gr/gr los pacientes presentaron azoospermia, lo que sugiere que la causa de la azoospermia no sería atribuible únicamente a la deleción detectada, sino a otro factor genético o ambiental (Navarro-Costa *et al* 2010). Por otro lado, si bien la deleción gr/gr existe de manera constitutiva en los Hgs D2b y Q1, el análisis del Hg determinó que estos pacientes pertenecen al Hg R1b1a2, y hasta el momento no se han descrito deleciones constitutivas en este Hg (Krausz *et al* 2014).

La deleción AZFb, si bien se ha asociado previamente a SCOS o a arresto espermatogénico pre-meiótico, se ha detectado en un paciente oligozoospermico. Esta situación había sido descrita previamente en dos pacientes con oligozoospermia severa. Sin embargo, no fue posible explicar el mecanismo por el cual se completa la espermatogénesis en ausencia de la región AZFb (Longepied *et al* 2010, Soares *et al* 2012). A diferencia de las deleciones descritas previamente, la detectada en el presente trabajo presenta una extensión y localización diferentes. Tal como se ha detallado en el punto 5.2.2.2.2, en la deleción aquí analizada el gen *PRY* no se elimina completamente a diferencia del gen *CDY2*. Además, dicha deleción abarca otros genes cuya función aún no ha sido confirmada (v.g. *XKRY*, *HSFY*, *EIF1AY* y *RBMV*, entre otros). Estas diferencias en el contenido génico podrían explicar la diferencia en el fenotipo espermático observado (azoospermia vs. oligozoospermia) que presentan las deleciones de la región AZFb.

Las deleciones de la región AZFc se detectaron tanto en pacientes azoospermicos como oligozoospermicos. Esto confirma lo observado por Ferlin *et al* en población italiana, en la cual el efecto sobre la espermatogénesis de la deleción AZFc es más leve o variable que el producido por las deleciones de las regiones AZFbc (Ferlin *et al* 2007).

Con respecto al análisis de los Hgs de cromosoma Y, no se observó asociación entre las microdeleciones de la región AZF y el haplogrupo del paciente en relación al efecto sobre el fenotipo espermático. La deleción más frecuente, AZFc, se observó en 4 pacientes del Hg R1b1a2, un paciente del Hg Q1a2a1a1 y un paciente del Hg E1b1b, todos con diferente fenotipo espermático (azoospermia u oligozoospermia severa). Si bien la deleción gr/gr, se detectó únicamente en pacientes azoospermicos del Hg R1b1a2, el bajo número de casos estudiados (N=2) no permite realizar un análisis concluyente.

Tabla 4.5. Resultados de los parámetros espermáticos y étnicos en pacientes con microdeleciones

ID	AZF	Hg	Fenotipo espermático
1	AZFc	R1b1a2	Oligo
47	AZFc	Q1a2a1a1	Oligo
70	AZFc	R1b1a2	Oligo
53	AZFc	R1b1a2	Cripto
91	AZFb	G2a	Oligo
32	gr/gr	R1b1a2	Azo
41	AZFc	E1b1b	Azo
46	AZFbc	J2	Azo
56	AZFabc	ND	Azo
61	AZFc	R1b1a2	Azo
81	gr/gr	R1b1a2	Azo

ND: no determinado

5.2.5. Asociación entre microdeleciones y falla espermática

Para evaluar la falla espermática es necesario conocer lo que está ocurriendo a nivel testicular: si el paciente presenta espermatozoides a nivel testicular, si la maduración de los mismos ocurre de manera normal o anormal, o si hay ausencia total de células espermáticas. Para ello se evaluaron los resultados de biopsias testiculares o TESE en pacientes azoospermicos. De los pacientes analizados, hasta el momento de la escritura del presente trabajo, se habían realizado biopsias testiculares y/o TESE a 25 pacientes. A partir de los resultados obtenidos, se vio que la deleción gr/gr se asoció con presencia de espermatozoides, mientras que la deleción AZFc se presentó tanto en pacientes con ausencia como con presencia de espermátogenesis. Las deleciones AZFabc y AZFbc detectadas en los pacientes analizados en el presente trabajo, se condicen con lo sugerido por las recomendaciones internacionales sobre la

ausencia de espermatozoides a nivel testicular en pacientes con deleciones AZFabc, AZFa, AZFb y AZFbc (Hopps *et al* 2003).

Tabla 5.2.2. Resultados de biopsias testiculares en pacientes con microdeleciones

ID	Deleción	Hg	Fenotipo	Biopsia
32	gr/gr	R1b	Azoospermia	Espermatozoides
41	AZFc	E1b1b	Azoospermia	Espermatozoides
46	AZFbc	J2	Azoospermia	Serie germinal inmadura
53	AZFc	R1b	Criptoospermia	SCOS
56	AZFabc	Neg	Azoospermia	SCOS
61	AZFc	R1b	Azoospermia	ND
81	gr/gr	R1b	Azoospermia	ND

ND: no determinado¹⁰

5.2.6. Distribución de Hgs en pacientes azoospermicos sin deleciones

A diferencia de lo descripto para pacientes azoospermicos en el capítulo 4, la distribución de Hgs en esta cohorte de pacientes fue similar tomando el conjunto de pacientes con y sin deleciones. A su vez, la distribución de Hgs en pacientes sin deleciones fue similar a la distribución observada en la población urbana de Argentina. Esto sugiere que la diferencia observada en los pacientes azoospermicos de la cohorte de pacientes infértiles se debe a un error de muestreo, dado el bajo número de pacientes azoospermicos analizados (10 vs. 85). Los resultados mencionados se detallan en la Tabla 5.2.6.

Tabla 5.2.6. Resultado de distribución de Hgs en pacientes azoospermicos sin deleciones

Hg	N	Porcentaje (%)
R1b	27	51
J2	6	11
G2a	5	9
E1b1b	5	9
Q3	3	6
I	2	4
T	2	4
E1b1a	1	2
G	1	2
Total	53	100

¹⁰ Hasta el momento de la escritura del trabajo no se habían realizado las biopsias testiculares en estos pacientes

5.2.7. Distribución de Hgs en pacientes sin deleciones, con y sin falla espermatogénica

A partir de los resultados de las biopsias testiculares en pacientes sin microdeleciones, se vio que el 50% de los pacientes azoospermicos sin microdeleciones tienen alteraciones de la espermatogénesis, tanto por ausencia total de progenie espermatogénica como por arresto de la espermatogénesis en el estadio de espermatogonias. Esto sugiere que existen otros factores genéticos o ambientales que actúan de forma deletérea en estos pacientes causando la falla espermatogénica.

A partir de la distribución de Hgs en estos pacientes se observó que, si bien los pacientes con espermatogénesis normal siguen una distribución de Hgs similar a la de la población urbana (Tabla 5.2.7.1), hay un aumento de hombres pertenecientes al Hg Q con arresto de la espermatogénesis en el estadio de espermatogonias (Tabla 5.2.7.2). De los pacientes con arresto espermatogénico, dos pertenecen al Hg Q1a y uno al Hg Q1a2a1a1. Esto sugiere que estaría actuando otro factor que limita la progresión normal de la espermatogénesis posiblemente ligado al cromosoma Y.

Tabla 5.2.7.1. Resultados normales en biopsias testiculares de muestras sin microdeleciones

Hg	Biopsia	N
R1b	Espermatozoides	6
G	Espermatozoides	2
Q3	Espermatozoides	1
E1b1a	Espermatozoides	1
Total		10

Tabla 5.2.7.2. Resultados anormales en biopsias testiculares de muestras sin microdeleciones

Hg	Biopsia	N
Q1a2a1a1	Espermatogonias	1
Q1a	Espermatogonias	2
J2	Espermatogonias	2
R1b	SCOS	4
G2a	SCOS	1
E1b1b	SCOS	1
Total		11

5.3. Conclusiones

- ✓ Al estudiar un grupo de pacientes exclusivamente azoospermicos u oligozoospermicos severos, no se observó una diferencia significativa en la distribución de Hgs con respecto a la población urbana de Argentina, indicando que no existe una predisposición de determinados Hgs a padecer azoospermia
- ✓ Se observó una alta prevalencia de microdeleciones completas y parciales de la región AZF en la población argentina (11,1%)
- ✓ Los tipos de deleción hallados en pacientes azoospermicos fueron principalmente deleciones completas de las regiones AZFb y AZFc, y deleciones parciales gr/gr
- ✓ Se detectó la deleción completa del brazo largo del cromosoma Y empleando marcadores STRs
- ✓ La deleción AZFc presentó una prevalencia del 10% en pacientes azoospermicos y representó el 60% de las deleciones halladas
- ✓ Se descartó la asociación entre el Hg y la prevalencia de microdeleciones como así también el efecto de las mismas sobre la espermatogénesis en pacientes azoospermicos
- ✓ La deleción de la región AZFc se presentó tanto en pacientes con azoospermia secretora como en oligozoospermicos y azoospermicos sin falla espermatogénica (presencia de espermatozoides a nivel testicular)
- ✓ La deleción AZFb, si bien se asocia a arresto espermatogénico, se detectó en un paciente oligozoospermico. Dicha deleción presentó una extensión diferente a la descripta en las recomendaciones internacionales
- ✓ La deleción parcial gr/gr se presentó únicamente en pacientes azoospermicos, sin embargo en uno de los casos se recuperaron espermatozoides
- ✓ Únicamente las deleciones AZFbc y AZFabc se asociaron con falla espermatogénica y ausencia de espermatozoides a nivel testicular
- ✓ Se observó una posible asociación entre el Hg Q y el arresto espermatogénico en el estadio de espermatogonias en ausencia de microdeleciones, que deberá ser confirmado con el estudio de un mayor número de pacientes azoospermicos pertenecientes a dicho Hg
- ✓ Se evidenció una clara utilidad de los marcadores STRs de cromosoma Y para determinar la extensión de las deleciones detectadas

6. Desarrollo de un sistema de identificación de genes potencialmente asociados a infertilidad masculina

Sinopsis

A partir de los resultados descritos en el capítulo anterior, y dado que no se observó correlación entre las deleciones en la región AZFc y la falla espermatogénica, enfatizamos la búsqueda de nuevos marcadores que permitan predecir mejor el fenotipo espermático a partir de análisis de los genes localizados en la región AZFc. Este capítulo describe el diseño experimental, el desarrollo, la puesta a punto y validación de un método molecular para la detección de deleciones de genes vinculados con el proceso de espermatogénesis. La utilidad del mismo reside en una mejor predicción de recuperación espermática en pacientes azoospermicos u oligozoospermicos severos. El presente trabajo fue recientemente publicado en PLoS ONE (Alechine and Corach 2014).

Como fue descrito en el capítulo 1, la región AZF, y sus sub-regiones AZFa, AZFb y AZFc son los principales objetivos del diagnóstico molecular de la infertilidad masculina (Kumari *et al* 2012). Estos loci son estudiados mediante PCR para detectar posibles microdeleciones empleando marcadores STSs localizados en regiones no codificantes, según lo recomendado por la EAA (Krausz *et al* 2014). La secuenciación y mapeo de la región MSY evidenció que muchos de los marcadores STSs empleados para dicho análisis son polimórficos, ambiguos, heterogéneos y poco fiables, con tendencia a producir problemas técnicos y falsos resultados (Skaletsky *et al* 2003). El uso de primers que hibridan en lugares específicos del cromosoma permite obtener información sobre los mecanismos potenciales y la extensión de las deleciones. Sin embargo, numerosos estudios resaltaron la importancia de la inclusión de marcadores específicos de genes en el análisis, que permitan correlacionar la función de dichos genes con la falla espermatogénica (Ferlin *et al* 2007).

A partir de lo descrito en los capítulos anteriores, concluimos que no es posible predecir la recuperación de espermatozoides a partir de biopsia testicular o TESE, si se

detecta una deleción de las regiones AZFb y AZFc, ni de la deleción gr/gr. Es por esto que el diagnóstico de dichas deleciones no resulta una prueba diagnóstica de utilidad clínica ni tampoco permite determinar la función de los genes localizados en dichas. Con el fin de aportar una estrategia molecular que permita acelerar la identificación de genes candidatos de la espermatogénesis, nuestro objetivo fue desarrollar un método que permita la detección a gran escala de los principales genes localizados en las regiones AZFb y AZFc. El protocolo del método desarrollado se describe en detalle en los Anexos I y II.

6.1. Desarrollo teórico y diseño experimental

6.1.1. Selección de los genes a analizar

Con el objetivo de desarrollar un sistema multiplex para PCR en Tiempo Real seguida de HRM para la detección de los principales genes localizados en la región AZFc, se diseñaron primers que permiten la amplificación específica de todas las copias de seis genes que se localizan en esta región. Los genes fueron seleccionados sobre la base de su ubicación en la región AZFc del cromosoma Y, su expresión testicular específica, y la codificación de productos proteicos (aislados o no). El conjunto de genes que cumplían con éstas condiciones fueron: *DAZ*, *CDY*, *BPY2*, *PRY*, *GOLGA2LY* y *CSGP4LY* (Tabla 6.2.1). Dado que existe un solapamiento de las regiones AZFb y AZFc, se incluyeron en el análisis los genes localizados principalmente en la región AZFc, aunque también aquellos localizados en la región AZFb (Navarro-Costa *et al* 2010). El gen SRY fue seleccionado como control interno de amplificación, y el gen de la amelogenina AMELxy (localizado tanto en el cromosoma Y como en el X) como control interno de amplificación y de especificidad. Los primers se combinaron para poner a punto una única reacción en multiplex que permita la amplificación simultánea de los ocho genes.

Tabla 6.2.1. Descripción de los genes seleccionados (Vogt et al 2008)

Gen	Denominación	Copias	Homología	Expresión	Homólogo
DAZ	<i>deleted in azoospermia</i>	<i>DAZ1</i> <i>DAZ2</i> <i>DAZ3</i> <i>DAZ4</i>	Proteína de reconocimiento y unión a ARN	Testicular	<i>DAZL</i>
CDY	<i>chromodomain protein Y</i>	<i>CDY1A</i> <i>CDY1B</i> <i>CDY2A</i> <i>CDY2B</i>	Cromatina e histonas acetiltransferasa	Testicular	<i>CDYL</i>
BPY2	<i>testis-specific basic protein Y 2</i>	<i>BPY2.1</i> <i>BPY2.2</i> <i>BPY2.3</i>	Ninguna	Testicular	No
PRY	<i>PTPBL-related gene on Y</i>	<i>PRY.1</i> <i>PRY.2</i>	Tirosina fosfatasa	Testicular	No
GOLGA2LY	<i>golgi autoantigen, golgi subfamily a, 2-like, Y-linked</i>	<i>GOLGA2LY.1</i> <i>GOLGA2LY.2</i>	Proteína de la matriz del Golgi	Testicular	<i>GOLGA2</i>
CSPG4LY	<i>chondroitin sulfate proteoglycan 4 pseudogene 1, Y-linked</i>	<i>CSPG4LY.1</i> <i>CSPG4LY.2</i>	Cadherinas	Testicular	<i>CSPG4</i>

6.1.2. Diseño de primers

A partir de la secuencia de referencia del cromosoma Y en NCBI se localizaron los genes de interés. Los primers fueron diseñados utilizando el programa Primer3 (Rozen y Skaletsky 2000). Las secuencias y localización de los productos de amplificación se obtuvieron mediante la herramienta UCSC In-Silico. A partir de este análisis, se seleccionaron únicamente aquellos primers que amplifican todas las copias de cada gen de interés. Con el fin de obtener mayor divergencia entre los picos de desnaturalización o “melting”, la Tm de los productos de amplificación se predijo usando el programa Oligo Calculator v3.26. La localización de todos los fragmentos de amplificación se muestra en la Figura 6.1.2. La localización de todas las secuencias de amplificación a lo largo del cromosoma Y se pueden observar on-line mediante el uso del programa Sequence Viewer 3.4 del NCBI (<http://tinyurl.com/lzwmcwh>).

6.1.3. Muestras de ADN empleadas para la puesta a punto del método

Para poner a punto la reacción, se emplearon muestras de ADN extraídas de sangre periférica de mujeres y hombres normales sin deleciones, provenientes del trabajo de

rutina del laboratorio. Como controles de muestras con microdelecciones, se adquirieron controles comerciales para las siguientes deleciones: P5/P1 proximal o AZFb (NA18332), P5/P1 distal o AZFbc (NA18333), y b1/b3 (NA20434) a Coriell Cell Repository. El ADN control con deleción AZFa (WHT2996) fue cortesía del Dr. David C. Page del Whitehead Institute for Biomedical Research (Sun *et al* 2000). Para la validación clínica del método, se analizaron las muestras descritas en los puntos 2.1.1.4 y 2.1.1.5.

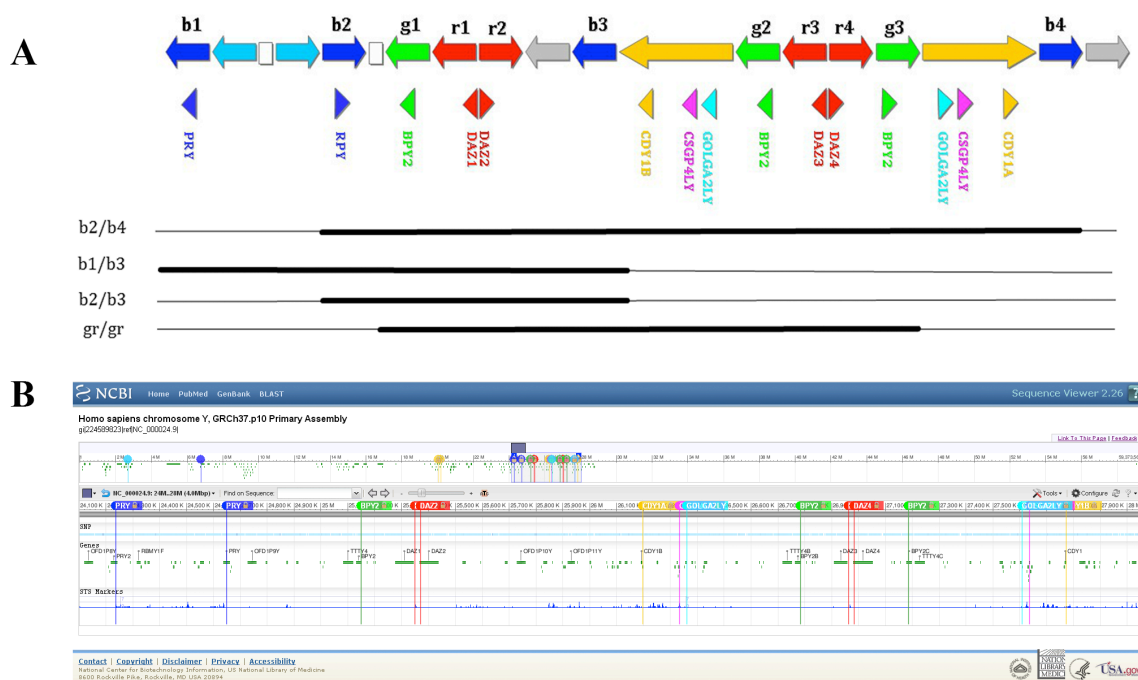


Figura 6.1.2. Localización de los principales genes candidatos de la espermatogénesis. (A) Localización esquemática de los amplicones de la región AZFc, de sus respectivos genes y de las deleciones en los que estos se encuentran involucrados. (B) Ubicación de los fragmentos de amplificación diseñados a lo largo del cromosoma Y, empleando Sequence Viewer v3.2 (Alechine y Corach 2014).

6.2. Puesta a punto y especificidad

Como primer paso, se amplificaron muestras masculinas normales (sin deleciones) y muestras femeninas (control de especificidad). Las muestras masculinas alcanzaron altos niveles de amplificación para todos los genes seleccionados, mientras que en las muestras femeninas no se observó amplificación, salvo para el gen AMELx que se localiza tanto en el cromosoma Y como en el X (Figura 6.2). Esta condición óptima se

logró debido al alto nivel de astringencia como consecuencia del aumento de la temperatura de reasociación (annealing) a 62°C. Con el fin de confirmar la especificidad de la amplificación, todos los productos de PCR fueron secuenciados y alineados con la secuencia de referencia de GenBank, coincidiendo con los genes de interés. La inclusión en la puesta a punto del gen AMELxy, y de muestras femeninas fue de vital importancia para descartar la amplificación inespecífica de genes homólogos (v.g. *DAZL*) localizados tanto en el cromosoma X como en cromosomas autosómicos. La ausencia de amplificación de los genes específicos del cromosoma Y en muestras femeninas (excepto AMELxy) aseguran que la observación de un pico se debe exclusivamente a la presencia del gen específico del cromosoma Y.

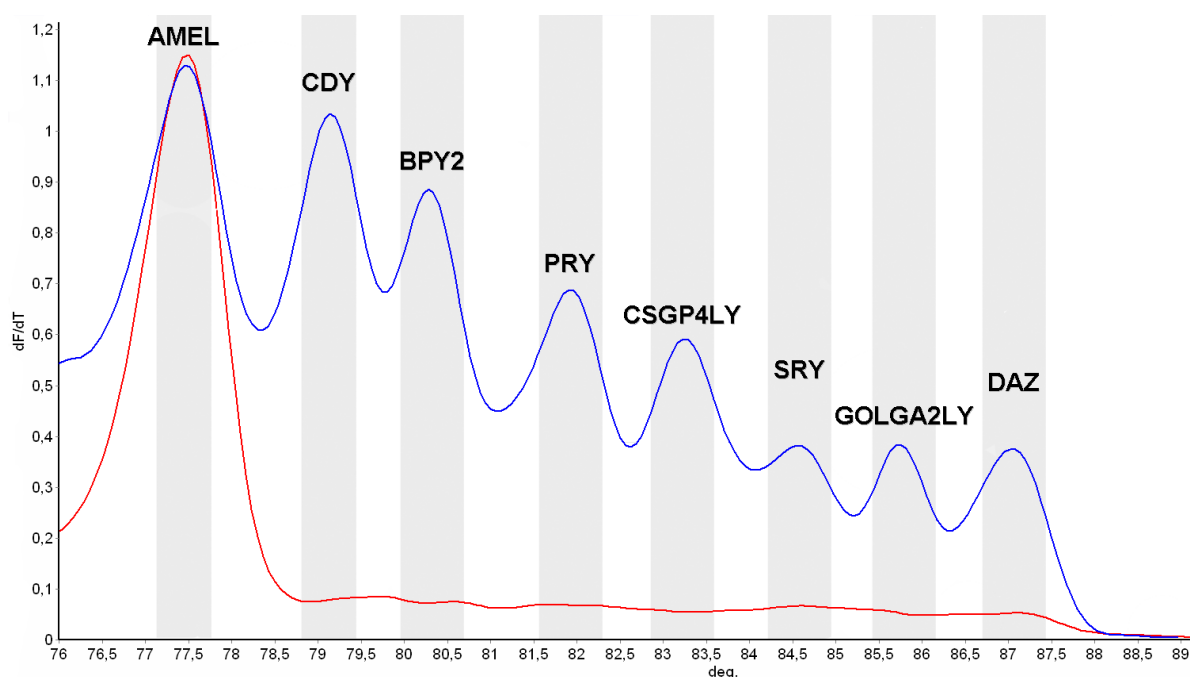


Figura 6.2. Resultado de la puesta a punto. La figura muestra el resultado para una muestra masculina normal sin deleciones (azul) y una muestra femenina (rojo)(Alechine y Corach 2014).

6.3. Validación analítica del método

6.3.1. Exactitud

6.3.1.1. Microdeleciones completas

Se analizaron muestras control con deleciones AZFa, AZFb, y AZFbc con el fin de caracterizar la capacidad del sistema para identificar la deleción específica de los genes

ubicados en dichas regiones. Las deleciones de los controles fueron previamente confirmadas mediante el protocolo para detección de microdeleciones clásicas de AZF modificado para PCR en Tiempo Real (Kozina *et al* 2011).

Se detectaron las deleciones de los genes localizados en cada región particular según la secuencia de referencia del cromosoma Y en GenBank. La muestra con deleción AZFa no evidenció deleción de ninguno de los genes analizados dado que los mismos no se localizan en dicha región. Sin embargo, la muestra control con deleción AZFb mostró la ausencia de amplificación del gen *PRY*, y la muestra control con deleción AZFbc evidenció ausencia de amplificación de los genes *PRY*, *BPY2*, *DAZ*, *GOLGA2LY* y *CSGP4LY* (Figura 6.3.1.1).

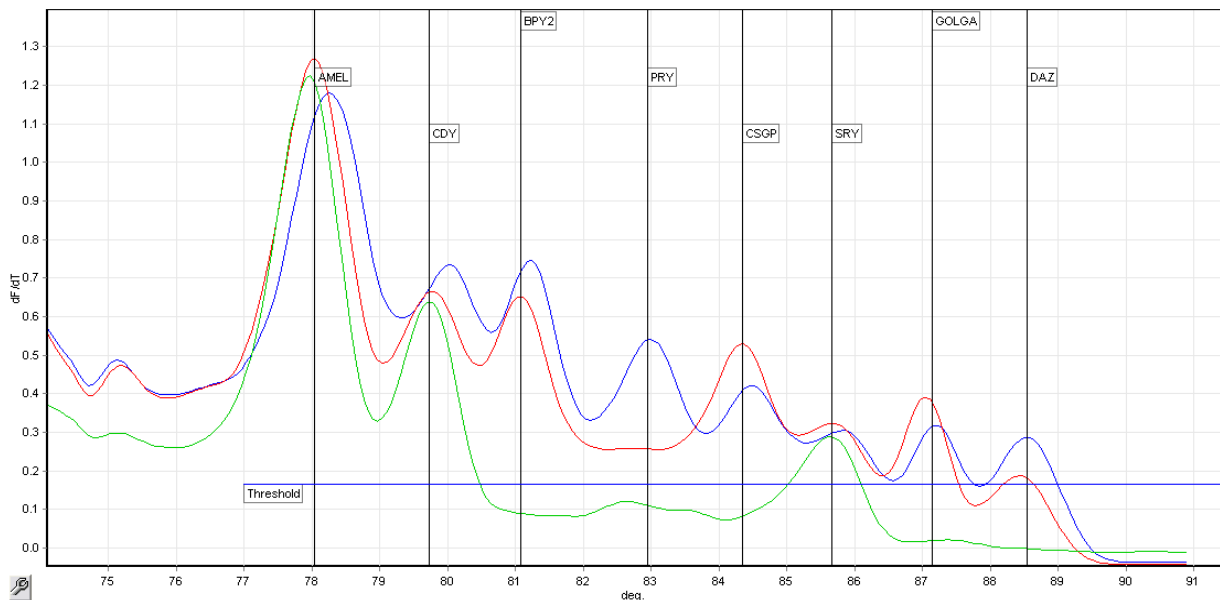


Figura 6.3.1.1. Resultados de la puesta a punto mediante análisis de muestras con deleciones. La figura muestra la derivada dF/dT para muestras con deleción AZFa (azul), AZFb (rojo) y AZFbc (verde), con la correspondiente ausencia de genes en cada caso.

6.3.1.2. Microdeleciones parciales

Se analizó un control con deleción parcial b1/b3 (NA20434) no observándose ausencia de picos debido a las copias remanentes de los genes amplificados. Considerando la presencia de copias remanentes de los genes analizados, el diagnóstico de deleciones parciales no puede ser realizado por esta técnica. Sin embargo, se observó una variación en la altura del pico en muestras con deleción parcial debido a la disminución de la dosis

de los mismos. En la muestra control con delección b1/b3 se observó una inversión de la altura del pico de los genes *BPY2*, *CSGP4LY* y *GOLGA2LY*, con respecto al control sin deleciones, que se encuentran dentro de la región deletada (Figura 6.3.1.2).

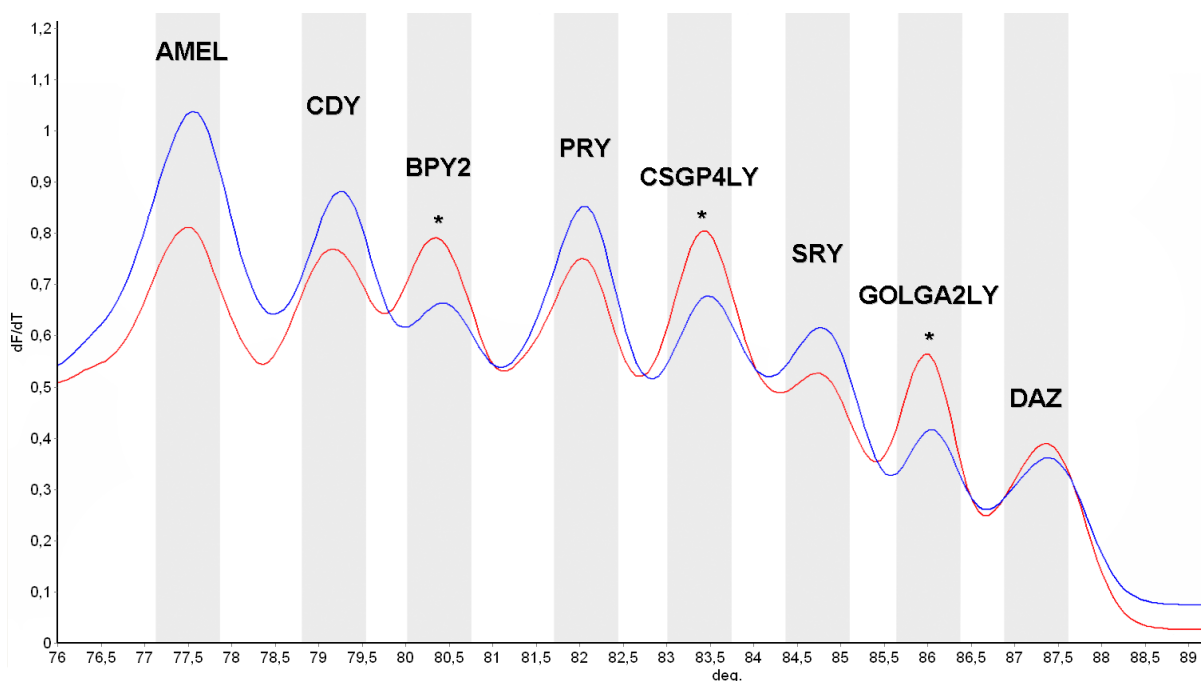


Figura 6.3.1.2. Resultado del análisis de controles con deleciones parciales. La figura muestra el resultado para una muestra masculina normal sin deleciones (rojo) y una muestra con delección b1/b3 (azul)(Alechine y Corach 2014).

6.3.2. Sensibilidad

La sensibilidad del sistema se evaluó mediante la amplificación de muestras control sin deleciones. Se realizó la reacción de PCR con diluciones 1/2 de la muestra control abarcando el rango entre 20 y 0,312 ng/ μ L. Los picos de melting pudieron ser identificados con precisión en concentraciones entre 1,25 y 20 ng/ μ L, aunque no se observó una correlación lineal entre la concentración de ADN y la intensidad de la señal. Todas las muestras extraídas por el método semi-automatizado (con un rendimiento entre 1 y 10 ng/ μ l de ADN) pudieron ser analizadas fácilmente, incluso evitando el paso previo de cuantificación.

6.3.3. Comparación del empleo de tres colorantes intercalares diferentes

Se comparó el empleo de tres colorantes intercalares: SYBR® Green I (incluido en el kit Quantitec® SYBR® Green PCR), EvaGreen® (incluido en el kit comercial Mezcla Real®) y SYTO® 9. La reacción multiplex se puso a punto con SYTO® 9 logrando una alta sensibilidad, resolución óptima de los picos de desnaturalización, y buena correlación entre las T_m teóricas y reales. Cuando la misma reacción se reprodujo con SYBR® Green I, se obtuvo alrededor de un 30% menos de fluorescencia que con SYTO® 9, comprometiendo la sensibilidad del sistema, y se observó la pérdida de algunos picos (Figura 6.3.3; verde). Cuando la reacción se llevó a cabo con el colorante EvaGreen®, se observó un cambio en las temperaturas de melting teóricas hacia temperaturas más altas (Figura 6.3.3; azul). Ambos kits comerciales evaluados son más costosos y requieren mayor cantidad de ADN templado, en contraste con el empleo de SYTO® 9 que permite una rápida puesta a punto de la reacción en múltiplex con costos mínimos. Por lo tanto, se eligió poner a punto la reacción utilizando un colorante intercalar universal como SYTO® 9, primers carentes de marca fluorescente, y concentraciones de ADN y primers mínimas sin compromiso de la sensibilidad.

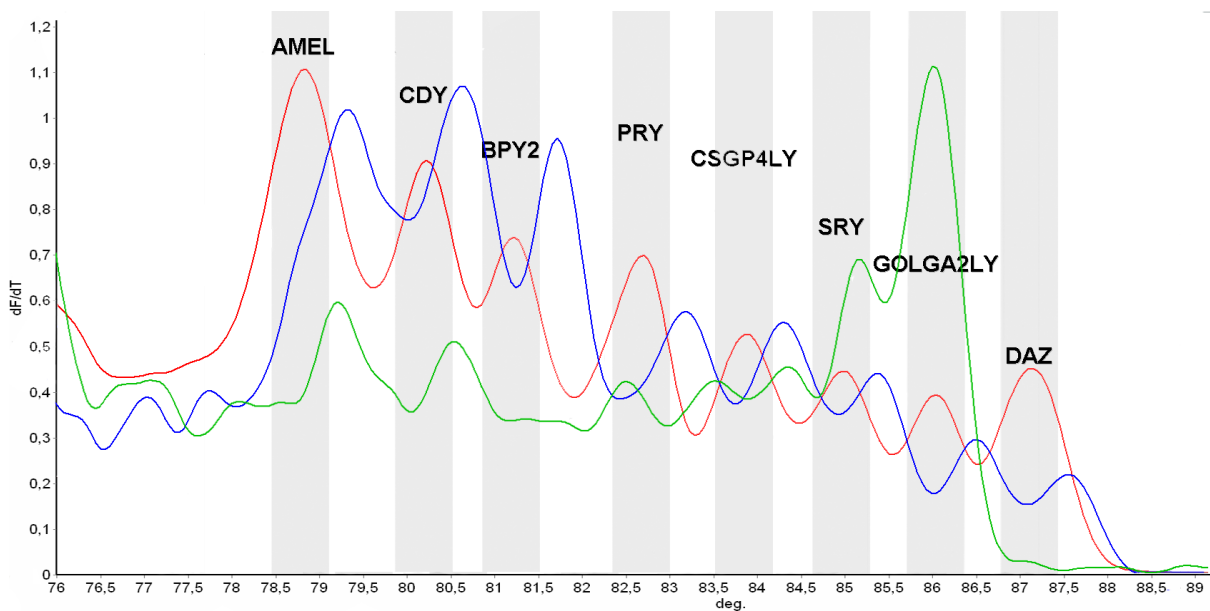


Figura 6.3.3. Resultado de la comparación entre diferentes colorantes intercalares. La figura muestra el resultado obtenido con SYTO® 9 (rojo), SYBR® Green I (verde) y EvaGreen® (azul) (Alechine y Corach 2014).

6.3.4. Portabilidad

Dado que la puesta a punto del sistema de análisis se llevó a cabo únicamente en el equipo Rotor-Gene 6000, era necesario evaluar la portabilidad del sistema diseñado a otro equipo con diferentes principios de calentamiento y detección. Por lo tanto, además de emplear el sistema de rotor y calentamiento por aire caliente (Rotor-Gene 6000), se evaluó la reproducibilidad en un equipo basado en calentamiento por bloque (StepOnePlus™). Este último se basa en un bloque de calentamiento con detección óptica de 4 colores a base de LED. La reacción multiplex fue reproducida exactamente como ha sido puesta a punto para Rotor-Gene. Empleando el equipo StepOnePlus™ se obtuvo separación óptima, aunque el análisis de los resultados se pudo realizar únicamente de manera cualitativa y manual debido a la limitación del programa para asignar múltiples picos, lo cual dificulta el análisis simultáneo de todos los genes y de un número elevado de muestras (Figura 6.3.4).

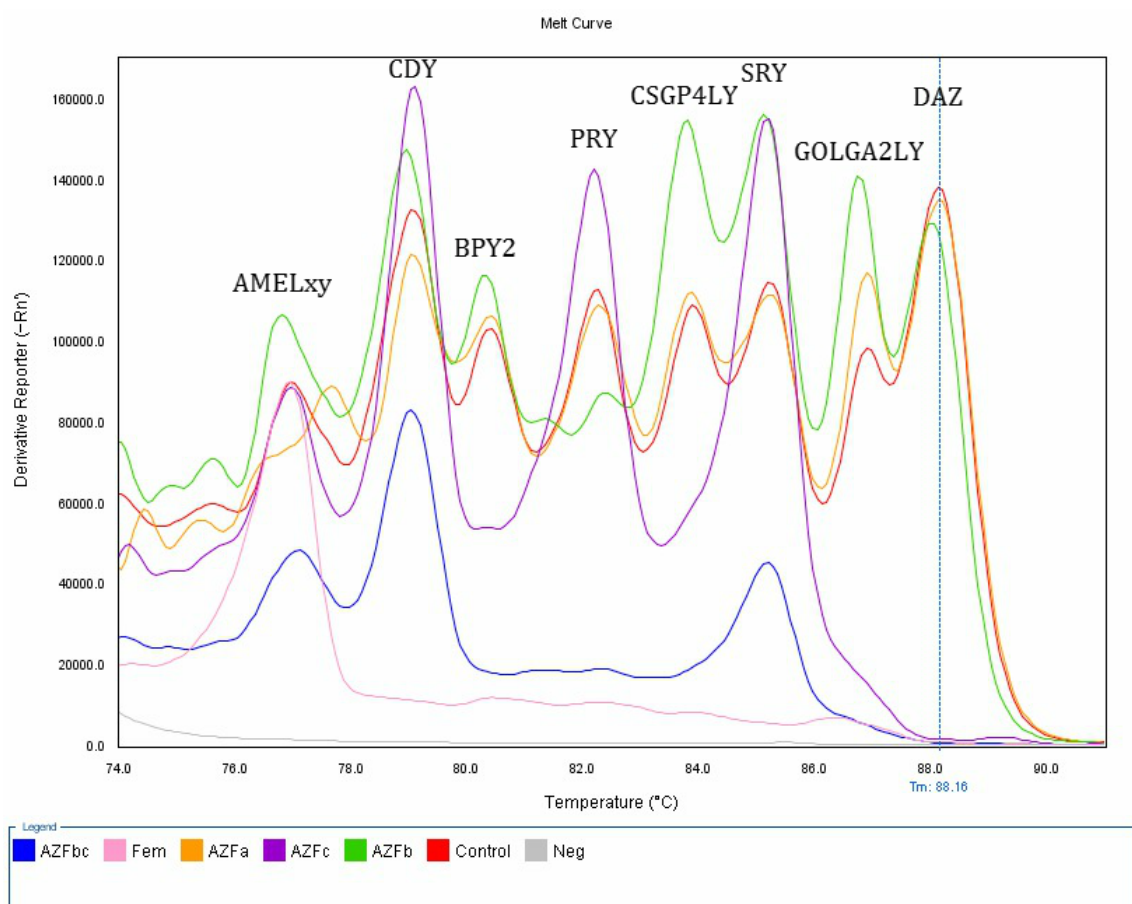


Figura 6.3.4. Resultado obtenido mediante el equipo StepOnePlus™. La figura muestra el resultados obtenido para una muestra femenina (rosa), masculina sin delección (roja), masculina con delección AZFa (naranja), AZFb (verde), AZFc (violeta) y AZFbc (azul) (Alechine y Corach 2014).

6.4. Validación clínica del método

La validación clínica del método se realizó mediante el análisis de 140 muestras de pacientes que consultaron por infertilidad (ver punto 2.1.1.4), y 90 muestras de pacientes con azoospermia u oligozoospermia severa (ver punto 2.1.1.5). Del grupo “infertilidad”, un sólo paciente con deleción completa de la región AZFc mostró ausencia de los genes *DAZ*, *GOLGA2LY*, *CSGP4LY* y *BPY2*. Del grupo “azoospermia”, aquellos con deleción completa de la región AZFc carecían de los genes localizados en la misma, a saber *DAZ*, *GOLGA2LY*, *CSGP4LY* y *BPY2*. Sin embargo, el paciente con deleción de la región AZFb presentó únicamente disminución del pico de *CDY* debido a la ausencia del gen *CDY2* (determinado mediante análisis de SFVs). El paciente con deleción de ambas regiones, o AZFbc, evidenció ausencia de los genes *DAZ*, *GOLGA2LY*, *CSGP4LY*, *BPY2* y *PRY*. El paciente con deleción completa AZFabc mostró la ausencia de todos los genes analizados, con excepción de los genes control *AMELxy* y *SRY*. Los resultados obtenidos a partir de las muestras con deleción se muestran en la Figura 6.5. Todas las muestras con deleciones de genes corresponden a pacientes azoospérmicos o severamente oligozoospérmicos, y ninguna de ellas presenta un recuento espermático mayor a $5 \times 10^6/\text{mL}$.

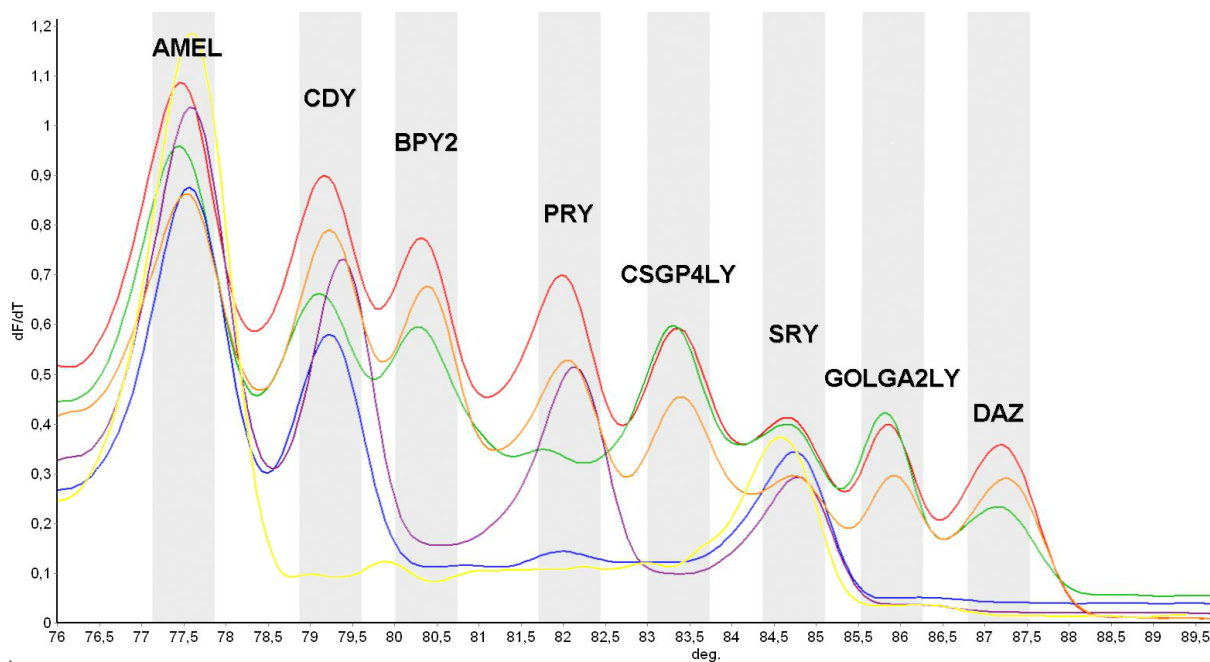


Figura 6.4. Resultado de la validación clínica del método. La figura muestra el resultado obtenido para una muestra masculina sin deleción (roja), con deleción AZFa (naranja), AZFb (verde), AZFc (violeta), AZFbc (azul) y AZFabc (amarillo) (Alechine y Corach 2014).

6.5. Utilidad del método

La identificación y caracterización de los genes candidatos de la espermatogénesis permitirá mejorar el diagnóstico y tratamiento de pacientes con infertilidad. Existen varios métodos para la identificación de los genes implicados en las microdeleciones del cromosoma Y, aunque hasta el momento la mayoría no permite el análisis de un número elevado de pacientes de manera simultánea.

Hasta la actualidad, se han desarrollado diversos métodos de detección para PCR en Tiempo Real que pueden ser empleados para análisis por HRM. Existen sondas o primers marcados con fluorocromos disponibles comercialmente, sin embargo los colorantes intercalares no específicos de secuencia son menos costosos e igualmente empleados. Entre estos últimos, el colorante SYBR® Green I se ha empleado ampliamente a pesar de presentar desventajas como la inhibición de la Taq polimerasa y la redistribución del colorante. Otras alternativas son el SYTO® 9 o Eva Green que pueden ser usados en concentraciones saturantes sin comprometer la eficiencia de la reacción y permitir el análisis por HRM (Eischeid 2011). Los resultados aquí obtenidos evidencian que, en contraste con SYBR® Green I, los colorantes EvaGreen® y SYTO® 9 presentan mayor sensibilidad y separación entre los picos. Se observó que en presencia de SYBR® Green I afectó la amplificación de alguno de los productos incluidos en la reacción multiplex, efecto previamente descrito para dicho colorante (Monis *et al* 2005). Empleando SYTO® 9 se observó una mejor correlación entre las temperaturas de desnaturalización teóricas y las reales de cada producto de amplificación, mientras que empleando EvaGreen® se observó un aumento de las temperaturas de desnaturalización de los productos con respecto al T_m teórico. Este efecto puede deberse a interacciones estabilizantes entre el colorante EvaGreen® y el ADN. Utilizando los colorantes SYTO® 9 y EvaGreen® es posible obtener altos niveles de eficiencia y sensibilidad, como así también reducir al mínimo la concentración tanto del ADN templado como de los primers.

Desde el punto de vista de la utilidad diagnóstica, la controversia acerca de la región AZFc se ve reflejada en la relación poco clara entre el genotipo y el fenotipo para las deleciones localizadas en esta región. La región AZFc presenta genes cuya función aún se desconoce, sin embargo las microdeleciones que se analizan en forma rutinaria emplean

marcadores STSs de regiones no codificantes. Estos marcadores no representan una relación directa con los genes de la espermatogénesis. Entre los marcadores incluidos en el protocolo recomendado por la EAA, el único marcador gen-específico se localiza dentro del gen DAZ (sY254 y sY255) (Simoni *et al* 2004). Por lo tanto, sugerimos el análisis del cromosoma Y empleando marcadores específicos de genes, de manera complementaria al análisis de marcadores STSs clásicos, para un diagnóstico más preciso. Además, con excepción de los genes *DAZ*, *RBMV*, *USP9Y* y *DBY*, se conoce muy poco sobre los restantes genes localizados en la región AZF. Este tipo de estudios podría ser una herramienta útil para clarificar cuales son los genes involucrados en la espermatogénesis y en la infertilidad masculina. Es por esto que el protocolo que hemos desarrollado incluye genes poco estudiados hasta el momento como son *PRY*, *GOLGA2LY* y *CSGP4LY*. Es importante destacar, que la mayoría de los descubrimientos alcanzados en este campo, no hubieran sido posibles si el análisis de pacientes con infertilidad se llevara a cabo únicamente empleando sistemas comerciales o las recomendaciones internacionales (Foresta *et al* 2000, Moro *et al* 2000, Foresta *et al* 2001).

Existen otras metodologías que permiten el estudio, identificación y caracterización de los genes localizados en la región AZFc, y que han sido ampliamente empleados en protocolos de investigación. Un ejemplo de las metodologías empleadas es la PCR cuantitativa o qPCR. Si bien el dosaje de genes mediante qPCR permite la cuantificación de genes específicos, y por lo tanto también identifican la ausencia completa de los mismos, este tipo de reacción se lleva a cabo en simplex. La limitación de este tipo de análisis es que se puede analizar un gen único por muestra y por reacción. Esto se debe a que la unión inespecífica del colorante intercalarse al producto de amplificación no permite discriminar el aumento de señal para más de un producto. Esta limitación se podría solucionar marcando específicamente cada par de primers con diferentes fluorocromos, lo cual incrementaría significativamente el costo del análisis. Por el contrario, el análisis de perfiles de HRM de una reacción en multiplex permite detectar la ausencia de amplificación de genes específicos en un entorno de otros genes presentes. Más aún, se ha demostrado que la disminución en el número de copias de estos genes no se correlaciona con el fenotipo observado, posiblemente dado que el alto nivel de homología entre copias podría reemplazar la función de aquellos genes eliminados en la delección (Noordam *et al* 2011). Por lo tanto, sugerimos la identificación

de genes involucrados en la espermatogénesis basándose en la ausencia completa de dichos genes.

Por otro lado, la electroforesis capilar también ha sido ampliamente utilizada para la cuantificación relativa de los genes *DAZ* y *CDY*. En este caso, se emplea un gen autosómico homólogo que co-amplifica con el gen de interés y se evalúa la relación entre las alturas de los picos entre ambos genes. Esta metodología, si bien resulta útil, presenta dos desventajas principales: la necesidad de la amplificación simultánea del gen homólogo y el aumento de los costos del análisis (empleo de primers marcados y equipos de electroforesis capilar) (Krausz *et al* 2009). Teniendo esto en cuenta, tanto el dosaje de genes por qPCR como la electroforesis capilar son metodologías que se adaptan en menor medida al análisis de un número elevado de pacientes debido a sus altos costos y bajo rendimiento.

Si bien el método aquí desarrollado no permite detectar conversión génica, es importante conocer que este fenómeno puede llevar a la traslocación y variación las copias de los genes localizados en la región AZFc (Rozen *et al* 2003). Teniendo en cuenta que aún no queda claro cuál de las copias de estos genes se encuentra implicada en el proceso de espermatogénesis en mayor o menor medida, hacemos hincapié en la importancia de estudiar en primer lugar la ausencia/presencia de todas las copias. En aquellos pacientes donde se detecte al menos una copia remanente, se sugiere el análisis de SFVs de los genes en cuestión, con el objetivo de identificar cual de las copias del gen se encuentra involucrada en el fenotipo del paciente. Para poder realizar este análisis ya se encuentran disponibles una variedad de protocolos tendientes a identificar SNPs en los genes *DAZ* y *CDY* (Fernandes *et al* 2002, Yang *et al* 2010). Protocolos para otros genes de interés deberán ser desarrollados en el futuro.

Como fue previamente publicado por nuestro grupo, la aplicación de la herramienta de HRM es útil no solo para análisis de reacciones simplex, sino también multiplex. En nuestro trabajo anterior, desarrollamos una técnica para detectar simultáneamente entre tres y cinco SNPs mediante una única amplificación en multiplex y detección por HRM (Zucarelli, Alechine *et al* 2011). Teniendo en cuenta este antecedente, el análisis de presencia/ausencia de varios genes mediante una única reacción en multiplex y colorantes intercalares fue un objetivo alcanzable. Según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en analizar en una única reacción seis genes candidatos de la

espermatogénesis. Mediante el protocolo descrito, es posible analizar hasta 72 muestras en menos de 2 hs, resultando una excelente herramienta para el relevamiento poblacional o “screening” de un gran número de pacientes con infertilidad idiopática. El método desarrollado emplea reactivos de uso común en cualquier laboratorio de biología molecular, en vez de sistemas comerciales más costosos que emplean primers marcados y no siempre aportan información adicional al estudio.

Esta metodología es útil para el estudio de pacientes con azoospermia no obstructiva y oligozoospermia severa, de manera complementaria al análisis de deleciones clásicas de AZF y deleciones parciales de AZFc, para ser luego correlacionado con los resultados de las biopsias testiculares. Es por esto que resulta de gran importancia para investigadores enfocados tanto en la base molecular como el diagnóstico y tratamiento de la falla espermatogénica. Además, si bien este sistema se desarrolló específicamente para el campo de la infertilidad masculina, es una metodología que puede ser adaptada a cualquier campo de investigación donde es relevante el screening de varios genes de manera simultánea.

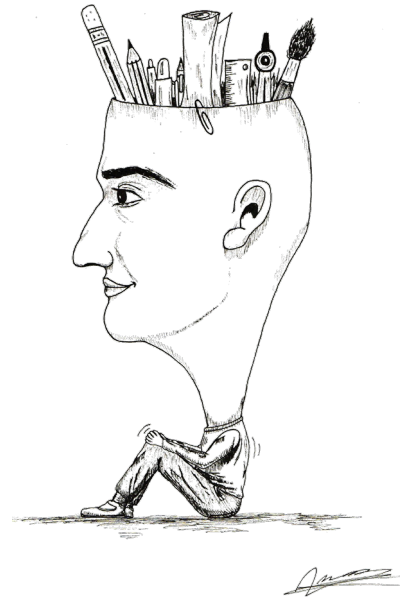
6.6. Conclusiones

- ✓ El método desarrollado para la detección de genes candidatos de espermatogénesis permite el análisis simultáneo de seis genes (y dos controles) con mínimos costos mediante PCR en Tiempo Real seguido de Desnaturalización Térmica de Alta Resolución
- ✓ Las herramientas bioinformáticas empleadas permitieron una correcta predicción de los productos de amplificación y sus correspondientes temperaturas de desnaturalización, minimizando el tiempo y esfuerzo requerido para la puesta a punto
- ✓ El empleo de controles femeninos, masculinos normales y con deleciones previamente confirmadas permitió validar analítica y clínicamente el método
- ✓ El método desarrollado requiere un consumo mínimo de reactivos disponibles en cualquier laboratorio de biología molecular, análisis de muestras sin necesidad de cuantificación previa y portabilidad a otros equipos de PCR en Tiempo Real, permitiendo fácilmente su reproducción

- Resultados -

- ✓ Se observó una clara ventaja del empleo de SYTO® 9 con respecto a otros colorantes para el análisis de resultados mediante HRM
- ✓ El método desarrollado presenta considerables ventajas con respecto a otros previamente descritos como dosaje de genes por qPCR o electroforesis capilar en la identificación de los genes la región AZFc
- ✓ La aplicabilidad de la detección de genes mediante PCR multiplex en Tiempo Real seguida de HRM puede extenderse a otros campos de investigación tanto básica como aplicada

Discusión



*“No hay barrera, cerradura, ni cerrojo
que puedas imponer a la libertad de mi mente”*

Virginia Wolf

DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis tuvo por objetivo estudiar la prevalencia y efecto de las microdeleciones en la región AZF del cromosoma Y en hombres fértiles e infértiles de la población argentina. Se hizo especial hincapié en la comparación con los haplogrupos de cromosoma Y, estudiando de manera particular al haplogrupo nativo americano Q1a2a1a1. Los resultados expuestos sugieren claras diferencias en cuanto a la prevalencia y tipos de estas deleciones, y el efecto de las mismas sobre las espermatogénesis.

Si bien en cada capítulo se discutió el impacto de los resultados obtenidos, es relevante comparar las diferentes características observadas en cada uno de los grupos analizados. En primer lugar, al estudiar hombres fértiles pertenecientes al Hg nativo americano Q3, se vio que éstos presentaron deleciones parciales de la región AZFc como polimorfismos dentro de la población masculina. Estas deleciones fueron de diferentes tipos, incluyendo tanto las deleciones parciales comúnmente estudiadas a nivel mundial (gr/gr y b1/b3), como deleciones poco frecuentes (P1.1/P1.2 y b1/b2). Las deleciones gr/gr y b2/b3 se discutirán en profundidad más adelante. Cabe destacar que la deleción b1/b2 (que se caracteriza por la ausencia de los marcadores sY1191 y sY1197), ha sido descrita previamente por Noordam *et al* (2011) en asociación con un aumento del recuento espermático. Sin embargo, la extensión de la deleción detectada en los dos hombres fértiles fue diferente a la descrita previamente, dado que no abarcaba ninguna de las copias del gen *DAZ*. Podría postularse que la región involucrada en el aumento del recuento espermático se encuentra localizada estrictamente entre los amplicones b1 y b2, ausentes en ambos tipos de deleción. Por otro lado, la deleción P1.1/P1.2 (ausencia del marcador sY1206) elimina 2 copias de los genes *DAZ*, *GOLGA2LY* y *CSGP4LY* sin incluir a ambas copias del gen *CDY*. La deleción del marcador sY1206 había sido descrita previamente en un paciente con oligozoospermia severa, si bien la misma involucraba la eliminación de 2 copias del gen *DAZ*, únicamente (Ye *et al* 2013). Dado que no se cuenta con el fenotipo espermático del hombre fértil analizado en el presente trabajo, ni tampoco la extensión de las deleciones es igual, no es posible comparar el efecto de dicha deleción. Sin embargo, esto resalta la importancia de tipificar los puntos de ruptura de la deleción y los genes involucrados, dado que las características patológicas de una misma deleción podrían ser diferentes.

La prevalencia de deleciones en hombres fértiles del Hg Q3 fue del 3,3%. Estos resultados fueron compatibles con lo descrito por Lardone *et al* (2013) en población chilena, en cuanto a la ausencia de asociación entre las deleciones parciales (gr/gr, b1/b3 y b2/b3) y falla espermatogénica severa en el Hg Q3. En ambas poblaciones las deleciones parciales de la región AZFc se presentarían como polimorfismos sin efecto deletéreo sobre la fertilidad. La prevalencia de estas deleciones en el Hg Q3, sumado a la alta frecuencia de duplicaciones identificadas en el presente trabajo (que se discutirá más adelante), sugieren que las características del cromosoma Y en el Hg Q3 haría que este sea más propenso a eventos de recombinación generando mutaciones, deleciones, inversiones y duplicaciones, sin implicancias patológicas.

Se descartaron deleciones constitutivas en el Hg Q3, contrario a lo descrito por Krausz *et al* (2014), quien afirma que la deleción gr/gr se encuentra fijada en los Hgs D2b, Q3 y Q1, sin presentar efectos deletéreos sobre la espermatogénesis. Las recomendaciones de la EAA sugieren que el diagnóstico de la deleción gr/gr en pacientes pertenecientes al Hg Q3 no es de utilidad diagnóstica dado su carácter constitutivo (Krausz *et al* 2014). Si bien, la presencia constitutiva de la deleción gr/gr ha sido descrita en los Hgs D2b y Q1 (Sin *et al* 2010, Yang *et al* 2010), en el presente trabajo se descarta que la deleción gr/gr se haya fijado en el Hg Q3. Esto plantea una discrepancia con respecto a las recomendaciones internacionales para el análisis de microdeleciones en el Hg Q3.

Además de la deleción constitutiva gr/gr, que diferencia los Hgs Q1 y Q3, en el presente trabajo se demuestra la existencia de un polimorfismo de longitud del marcador sY1291 que diferencia estos linajes. Tal como fuera mencionado previamente, la actualización de la nomenclatura del Hg Q redefinió las antiguas ramas Q1 y Q3 como Q1a1a1 y Q1a2a1a1, respectivamente. Como puede deducirse de la nomenclatura actual, ambos sub-Hgs presentan como último ancestro común al Hg Q1a, el cual habría sufrido divergencia fijando en el Hg Q1a1 la deleción gr/gr y en el Q1a2 el polimorfismo de longitud del marcador sY1291. Este polimorfismo de longitud había sido detectado previamente, sin embargo no fue asociado a ningún Hg (Lin *et al* 2006).

Por otro lado, la deleción parcial b2/b3 había sido descrita como característica constitutiva del Hg asiático N (Repping *et al* 2004). En el mismo trabajo se caracterizaron por primera vez las microdeleciones parciales de la región AZFc en el Hg Q3. Los resultados obtenidos indicaban que la deleción b2/b3 caracteriza también al Hg Q3 estando presente en 2 de 9 muestras analizadas. Las muestras analizadas provenían

de la Colección para el Descubrimiento de Polimorfismos en el ADN de Coriell Cell Repository. Tal como fue descrito en el capítulo 3, en el presente trabajo se analizaron ambas muestras del Hg Q3 con deleción b2/b3 incluidas en el trabajo de Repping *et al* (2004), obteniéndose los mismos resultados en cuanto a la presencia de la deleción y al haplogrupo de cromosoma Y. Sin embargo, se demostró que ambas muestras provienen de individuos relacionados, lo cual genera un sesgo en la frecuencia de las deleciones detectadas asociando erróneamente la deleción b2/b3 al Hg Q3. Teniendo en cuenta su baja frecuencia (frec=0,42%), dicha deleción representaría más bien una mutación (frec<1%) heredable dentro del mismo linaje paterno que una deleción que caracteriza al Hg Q3.

En una segunda fase del trabajo, se estudiaron pacientes con ESCA (con fenotipos espermáticos que variaron desde normozoospermia hasta azoospermia). Dentro de este grupo, únicamente un paciente con criptoospermia presentó una deleción completa de la región AZFc, mientras que otros seis presentaron deleciones parciales (gr/gr, b1/b3 y b2/b3). De ellos, aquellos con deleciones gr/gr y b2/b3 fueron tanto oligozoospermicos leves como normozoospermicos. Únicamente un paciente con deleción b1/b3 presentó un cuadro de oligozoospermia severa con recuento menor a 1×10^6 espermatozoides/mL.

En contraste con publicaciones previas, los pacientes con deleciones gr/gr no se asociaron con una marcada disminución del recuento espermático, ya que dos de ellos eran normozoospermicos y uno oligozoospermico leve (Visser *et al* 2009). Del mismo modo, la deleción b2/b3 tampoco se asoció con falla espermatogénica, dado que estos pacientes presentaron normozoospermia y oligozoospermia leve (Rozen *et al* 2012). Más aún, las deleciones gr/gr y b2/b3 se encontraron tanto en hombres fértiles como en pacientes infértiles sin falla espermatogénica, reforzando la ausencia de asociación entre estas deleciones parciales e infertilidad masculina.

Por otro lado, la deleción completa de la región AZFc sí se asoció a falla espermatogénica y alteración del recuento espermático dado que se detectó únicamente en un paciente con criptoospermia. Estos resultados se condicen con los obtenidos a partir del análisis de 20.000 hombres fértiles e infértiles en 5 poblaciones, que demostraron que la deleción completa de la región AZFc presenta un efecto significativo sobre la falla espermatogénica severa (Rozen *et al* 2012). Sin embargo, en este último trabajo, no se asocia la deleción b1/b3 con falla espermatogénica, mientras que en nuestro trabajo el

único paciente con esta delección presenta oligozoospermia severa. Esta discrepancia puede deberse a la existencia de otros factores que estén afectando la espermatogénesis del paciente o bien a un error de muestreo dado el bajo número de pacientes con delección b1/b3 detectados. Además, cabe mencionar que si bien en el trabajo de Rozen *et al* (2012) detectan 10 pacientes con falla espermatogénica y delección b1/b3, al evaluar estadísticamente la diferencia de prevalencia de esta delección entre hombres fértiles e infértiles, ésta resultó no significativa, descartándose así la asociación.

En contraste con lo descrito en hombres fértiles del Hg Q3, los pacientes infértiles presentaron únicamente delecciones previamente detectadas en otra poblaciones y que fueron ampliamente caracterizadas (AZFc o b2/b4, gr/gr, b1/b3 y b2/b3). Ninguno de los pacientes de este grupo evidenció delecciones de las regiones AZFa o AZFb, coherente con la baja prevalencia de las mismas en pacientes azoospermicos, y su virtual ausencia en pacientes con recuento mayor a 1×10^6 espermatozoides/mL. En total, los pacientes con delecciones representaron el 4,1% de los hombres analizados.

Se observó que las delecciones encontradas se circunscribieron a los Hgs G2a, E1b1b y J2, si bien las diferencias en la distribución de haplogrupos no fueron significativas, debido al bajo número de pacientes con delecciones. Los resultados del presente trabajo ponen en evidencia que el 36% de los pacientes del Hg G2a y el 9% del Hg E1b1b presentan delecciones. Esto se condice con el aumento de predisposición de ciertos Hgs a microdelecciones parciales y a la modulación del fenotipo espermático por otros factores presentes en un determinado linaje (Navarro-Costa *et al* 2007, Yang *et al* 2008, Shahid *et al* 2011). En comparación, se vio un aumento significativo de la frecuencia de microdelecciones en la población italiana perteneciente al Hg E, coherente con los resultados aquí obtenidos (Arredi *et al* 2007). Si bien en la población europea se descartó la asociación entre delecciones parciales (al menos para la delección gr/gr) y la variabilidad del fenotipo espermático (Krausz *et al* 2009), es posible que en los Hgs G2a y E1b1b existan factores predisponentes a eventos de recombinación intracromosómica sumado a la transmisión conjunta de factores moduladores sobre la espermatogénesis.

Por otro lado, los Hgs R1b y Q abarcaron la mayoría de los pacientes azoospermicos sin delecciones. Tal como se discutió en el capítulo 4, el Hg R1b es el más frecuente en la población argentina, a diferencia del Hg Q que fue más frecuente entre pacientes azoospermicos sin delecciones que en la población general (30% vs 5%). Esto podría estar indicando que en este último la causa de la azoospermia no estaría asociada a los

marcadores analizados, sino a otras causas genéticas aún no estudiadas, probablemente ligadas al cromosoma Y. Más adelante se retomará la discusión de este punto.

Al analizar específicamente pacientes azoospermicos y oligozoospermicos severos (tal como sugieren las recomendaciones internacionales), se detectaron tanto deleciones completas de las regiones AZFb, AZFbc y AZFc, como deleciones parciales gr/gr. La prevalencia global de microdeleciones en este grupo fue de 11,1%. Según este valor, la población argentina se encontraría entre las poblaciones de mayor prevalencia de microdeleciones reportados a nivel mundial (>10%) (Simoni *et al* 2008). Dado que el grupo analizado cumple con las sugerencias en cuanto a los criterios de inclusión de pacientes azoospermicos y oligozoospermicos severos (<2×10⁶ espermatozoides/mL) (Lo Giacco *et al* 2013), los valores obtenidos estarían representando un aumento real de la prevalencia de microdeleciones en la población argentina. En comparación con las poblaciones ancestrales que dieron origen a la actual población argentina, en su mayoría italianos y españoles, la prevalencia de microdeleciones en nuestra población fue mayor a la descripta tanto en población italiana (6,7%; N=97/1436; p=0,0808) como en población española (4,9%; N=9/183; p=0,0711), sin embargo dicha diferencia estadística no fue lo suficientemente significativa. En ambos estudios se analizó un número adecuado de pacientes y se consideraron los mismos criterios de inclusión para una correcta comparación (Ferlin *et al* 2007, Lo Giacco *et al* 2013). Al comparar la prevalencia de microdeleciones con otros grupos de Latinoamérica, se vio que Brasil y Chile también presentaron frecuencias comparativamente superiores de microdeleciones en pacientes azoospermicos y oligozoospermicos severos (aunque no incluidas en la revisión llevada a cabo por Simoni *et al* 2008). En población chilena, la prevalencia de microdeleciones clásicas fue de 11% en pacientes azoospermicos u oligozoospermicos, mientras que en población brasilera se describe un 11,5% en pacientes azoospermicos (Pieri Pde *et al* 2002, Lardone *et al* 2013). Esto indicaría que en las poblaciones latinoamericanas estarían actuando otros factores sobre la generación de deleciones en la región AZF, no contemplados en los trabajos sobre población europea. Éstos podrían estar asociados a factores ambientales, o al aporte de haplogrupos de origen no europeo.

Con respecto a la asociación entre el genotipo y el fenotipo, vale la pena remarcar que únicamente las deleciones AZFabc y AZFbc se correlacionaron con ausencia de espermatozoides a nivel testicular, mientras que las deleciones AZFc y gr/gr

presentaron espermatozoides. Al no detectarse ningún paciente con delección AZFa, no fue posible sacar conclusiones con respecto a la misma. Sin embargo, se obtuvo un resultado muy claro al detectarse la delección de la región AZFb en un paciente con oligozoospermia. A pesar de que la delección AZFb se asocia con arresto espermatogénico y ausencia de espermatozoides a nivel testicular, la delección AZFb en pacientes oligozoospermicos había sido previamente descrita en 2 pacientes con oligozoospermia (Longepied *et al* 2010, Soares *et al* 2012). El patrón de delección caracterizado mediante STRs localizados a lo largo de todo el cromosoma Y puso en evidencia que el patrón de delección, si bien involucró a los marcadores sY127 y sY134 que determinan la región AZFb, fue diferente a las deleciones previamente descritas (Repping *et al* 2002, Ferlin *et al* 2003, Costa *et al* 2008). Los tres grupos describieron deleciones de la región AZFb con diferente extensión y puntos de ruptura, sin embargo la delección detectada en el presente trabajo no había sido descrita previamente. Dicha delección abarcó una región más distal, incluyendo ambas copias del gen *CDY2* y no eliminando completamente el gen *PRY*. Aunque no es posible explicar la progresión normal de la espermatogénesis en ausencia de la región AZFb, las recomendaciones internacionales sugieren la asociación entre la delección AZFb y la falta de recuperación de espermatozoides a nivel testicular. De acuerdo a la evidencia expuesta, la correlación de la delección AZFb con ausencia de espermatozoides plantea un falso positivo en el diagnóstico de una delección que no se asocia con falla espermatogénica. Según los lineamientos internacionales, los pacientes no deberían ser biopsiados si se detecta una delección de la región AZFb (Krausz *et al* 2014). Esto plantea una discrepancia en cuanto al valor diagnóstico de estos marcadores, ya que no permiten correlacionar con los resultados de biopsia testicular (Hopps *et al* 2003). Más aún, las deleciones parciales de la región AZFc se evidenciaron tanto en hombres fértiles como en pacientes infértiles con presencia de espermatozoides en el eyaculado y/o a nivel testicular. Por lo tanto, no solo es cuestionable la utilidad diagnóstica de dichos marcadores y la implicancia de su delección en el fenotipo espermático del paciente, sino que además las deleciones AZFb, AZFc, gr/gr, b2/b3 y b1/b3 podrían transmitirse de forma natural a la progenie masculina.

Mediante el análisis de la distribución de Hgs tanto en pacientes con ESCA como en pacientes azoospermicos u oligozoospermicos, no se observó una diferencia significativa en cuanto a su composición étnica con respecto a la población urbana de Argentina. Esto

sugiere que la pertenencia a un determinado linaje o Hg, por sí solo, no representa una predisposición aumentada a padecer infertilidad. Sin embargo, es necesario el aumento del número de pacientes estudiados para confirmar o descartar dicha hipótesis, ya que se vio una ligera diferencia que no fue significativa.

Al compararse el tipo de deleciones halladas en cada uno de los grupos estudiados, se vio que únicamente los hombres fértiles del Hg Q3 presentaron tipos de deleción poco frecuentes o no descriptos en otras poblaciones (b1/b2 y P1.1/P1.2). Las deleciones mencionadas no se asociaron con falla espermatogénica, dado que se presentaron en hombres fértiles. Por el contrario, ambos grupos de pacientes infértiles presentaron deleciones frecuentes a nivel mundial, tanto completas como parciales, siendo en su mayoría deleciones parciales en pacientes infértiles idiopáticos (gr/gr, b2/b3, b1/b3 y AZFc) y completas en pacientes azoospermicos (AZFc, AZFb, AZFbc y gr/gr). Con el objetivo de realizar la comparación entre las deleciones halladas en los tres diferentes grupos estudiados, la Tabla 7.1 resume los resultados descriptos para cada uno de los grupos analizados y discutidos de manera individual en los capítulos correspondientes. Esto permite comparar la prevalencia, tipificación y efecto de cada una de las deleciones halladas sobre la espermatogénesis, descartando aquellas que se presentan como polimorfismos en la población fértil.

Tabla 7.1. Comparación de las deleciones halladas en los diferentes grupos estudiados

Grupo	Deleción	N	Fenotipo espermático	Falla espermatogénica
Fértiles	gr/gr	4	ND	NO
	b2/b3	1	ND	NO
	b1/b2	2	ND	NO
	P1.1/P1.2	1	ND	NO
Infértiles	gr/gr	3	Normo/oligozoospermia	NO
	b2/b3	2	Normo/oligozoospermia	NO
	b1/b3	1	Oligozoospermia severa	NO
	AZFc	1	Criptozoospermia	NO
Azoospermicos	AZFb	1	Oligozoospermia	NO
	AZFc	6	Oligo/azoospermia	SI/NO
	AZFbc	1	Azoospermia	SI
	AZFabc	1	Azoospermia	SI
	gr/gr	2	Azoospermia	NO

Al compararse la prevalencia de microdeleciones entre los diferentes grupos analizados, se vio que la diferencia entre hombres fértiles y pacientes con ESCA no fue significativa (3,3% vs. 4,1% respectivamente; $p=0,7910$). Sin embargo, al comparar ambos grupos con pacientes azoospermicos y oligozoospermicos severos (11,1%), pudo demostrarse un aumento significativo de la prevalencia de deleciones en este último grupo ($p=0,0138$ y $p=0,0387$; respectivamente) (Tabla 7.2). Esto indicaría que existe una asociación entre estas microdeleciones y la infertilidad masculina, correlacionándose con alteraciones severas del recuento espermático. A su vez, confirma lo sugerido en las recomendaciones internacionales sobre el análisis de microdeleciones únicamente en pacientes con recuento menor a 1×10^6 espermatozoides/mL (Krausz *et al* 2014).

La deleción completa de la región AZFc no fue detectada en hombres fértiles, y se vio un aumento significativo de su prevalencia en pacientes azoospermicos y oligozoospermicos severos con respecto al grupo de pacientes con ESCA (7% vs. 0,6%; $p=0,0062$) (Tabla 7.2). Esto sugiere una asociación de dicha deleción con alteraciones severas. La prevalencia de deleciones de la región AZFc en pacientes azoospermicos fue consistente entre ambos grupos estudiados (10% en ambos grupos). La proporción de dicha deleción entre la totalidad de las deleciones detectadas fue del 60%, siendo levemente menor a la prevalencia descripta a nivel mundial (aproximadamente 80%), probablemente debido al bajo número de pacientes analizados o a la composición étnica de la población estudiada (Simoni *et al* 2008).

La deleción gr/gr, si bien es lo suficientemente frecuente en la población general para ser considerada un polimorfismo, se considera como factor de riesgo para falla espermatogénica (Repping *et al* 2003). Se considera que dicha observación puede justificarse por un balance entre la selección natural negativa de aquellos cromosomas con deleciones gr/gr y la recombinación homóloga que continúa generando nuevas deleciones. Al comparar la prevalencia de dicha deleción entre los diferentes grupos (1,6% en fértiles; 1,7% en infértiles y 2,6% en azoospermicos), se vio que la diferencia no era significativa ($p=0,600$) (Tabla 7.2). Esto descartaría la asociación entre la deleción gr/gr y la falla espermatogénica en la población argentina. Según lo descripto en población italiana, la deleción gr/gr se considera un factor de riesgo significativo para falla espermatogénica (Giachini *et al* 2005). Sin embargo, al igual que en la población argentina, en población alemana se considera que la deleción gr/gr no es suficiente para causar falla espermatogénica e infertilidad *per se*, dado que su frecuencia no se

encuentra significativamente aumentada en pacientes azo/oligozoospermicos con respecto a los normozoospermicos (Hucklenbroich *et al* 2005). Otros grupos presentan conclusiones mas conservadoras sugiriendo que aún no existe suficiente evidencia científica que justifique el análisis de rutina de la deleción gr/gr en parejas infértiles en tratamiento de reproducción asistida (Stouffs *et al* 2008). Más aún, revisiones sistemáticas de la bibliografía y meta-análisis de las poblaciones estudiadas a nivel mundial indican que la asociación entre deleciones gr/gr e infertilidad depende del origen étnico y de la región geográfica analizada (Navarro-Costa *et al* 2010, Stouffs *et al* 2011).

Tabla 7.2. Prevalencia de microdeleciones

Deleción	Fértiles (%)	ESCA (%)	Azoospermicos/oligozoospermicos (%)
Todas	3,3	4,1	11,1
AZFc	0	0,6	7,0
gr/gr	1,6	1,7	2,6

Por otro lado, se detectaron eventos de duplicación posteriores a las deleciones parciales en todos los grupos estudiados en el presente trabajo. La diferencia entre los grupos fue que en hombres fértiles del Hg Q se observaron duplicaciones tanto de los genes *DAZ* como *CDY*, y el número de copias de dichos genes aumentó hasta 8 copias para el gen *DAZ* y 12 copias para el gen *CDY*. Por el contrario, en pacientes con ESCA, se observó que únicamente se restauraba o aumentaba el número de copias del gen *CDY*, presentando un máximo de 6 copias (2 correspondientes a *CDY1* y 4 a *CDY2*). Se confirmó que la duplicación ocurrió en una etapa posterior a la deleción, dado que el número aumentado de copias fue a costa del mismo par de genes *DAZ* (*DAZ1/2* ó *DAZ3/4*) o de la misma copia del gen *CDY* (*CDY1A* ó *CDY1B*). Si bien se postula que la restauración del número normal de copias de los genes de la región AZFc también restaura el recuento espermático a su valor normal, los resultados del presente trabajo no muestran asociación entre el aumento del número de copias y del recuento espermático (Noordam *et al* 2011). Si bien se detectaron duplicaciones en hombres fértiles, se vio que pacientes infértiles con disminución del número de copias del gen *DAZ* eran normozoospermicos u oligozoospermicos leves. Además, de los dos pacientes azoospermicos con deleción gr/gr, uno presentó disminución del número de copias de

estos genes mientras que el otro restauró el número normal de copias. Cabe mencionar que la falta de análisis del número de copias de otros genes de la región como *BPY2*, *GOLGA2LY*, *PRY* y *CSGP4LY*, es una de las limitaciones del estudio, pudiendo ser analizados en el futuro (Noordam *et al* 2011, Lu *et al* 2014).

La delección diferencial de los genes *DAZ1/2* vs *DAZ3/4* y *CDY1A* vs *CDY1B*, fue asociando a falla espermatogénica ó detectada como una delección polimórfica en diferentes poblaciones, sin embargo hasta el momento los resultados son contradictorios (Fernandes *et al* 2004, Machev *et al* 2004, Lardone *et al* 2007, Yang *et al* 2010, Li *et al* 2013). En el presente trabajo no se observó asociación entre los haplotipos eliminados y la falla espermatogénica, ya que las deleciones de las mismas copias de genes se vieron tanto en hombres fértiles, como en pacientes normozoospermicos, oligozoospermicos y azoospermicos.

Al evaluar la distribución de Hgs en los pacientes azoospermicos de ambos grupos, se vio una característica llamativa con respecto al Hg Q3. En pacientes azoospermicos (del grupo de pacientes con ESCA), se vio un aumento de la prevalencia del Hg Q3 en pacientes sin deleciones (30% en azoospermicos vs. 5% en la población general). Dentro del grupo de pacientes azoospermicos sometidos a biopsia testicular, el 30% de los pacientes con ausencia de espermatozoides y detención de la espermatogénesis en el estadio de espermatogonias, pertenecían al Hg Q. Si bien el número de pacientes biopsiados incluidos en el presente trabajo es bajo, estos resultados sugieren la necesidad de analizar en mayor profundidad otras posibles causas genéticas asociadas al cromosoma Y en individuos pertenecientes al Hg Q3. Tal como fuera descripto previamente, en poblaciones o individuos de origen étnico significativamente diferente con respecto a las recomendaciones internacionales, es necesario contemplar el empleo de marcadores étnico-específicos que permitan detectar aquellas deleciones o mutaciones específicamente asociadas a falla espermatogénica en un determinado Hg (Sachdeva *et al* 2011). Incluso, ya había sido descripto para el Hg Q1a3a1 una predisposición aumentada a deleciones de la región AZFb, y no de la región AZFc como se describe para la mayoría de la poblaciones estudiadas hasta el momento (Lardone *et al* 2013).

Como fue expuesto, no se observó correlación entre las deleciones detectadas y la falla espermatogénica en la población argentina mediante el empleo de los marcadores de rutina. Más aún, el haplogrupo nativo americano Q3 evidenció características

particulares que sugieren la presencia de otros factores genéticos asociados que aún no fueron estudiados. Es por esto que se planteó la necesidad de un diagnóstico complementario que aporte información sobre los genes implicados en la espermatogénesis que puedan ser asociados a falla espermatogénica. En el presente trabajo se desarrolló una técnica de diagnóstico molecular por PCR multiplex en Tiempo Real para 6 de los principales genes candidatos de la espermatogénesis. La técnica desarrollada permite el análisis de un gran número de muestras de manera rápida y económica. Mediante el análisis de los genes candidatos de la espermatogénesis en un mayor número de pacientes con azoospermia no obstructiva de origen idiopático, será posible correlacionar los defectos génicos con los fenotipos observados en los pacientes. La ausencia de correlación de deleciones en la región AZFc con falla espermatogénica presenta la necesidad de analizar marcadores específicos de genes, de manera complementaria al análisis de marcadores STSs localizados en su mayoría en regiones inter-génicas (Foresta *et al* 2001). Este análisis permitirá afinar el diagnóstico genético de ausencia de espermatozoides a nivel testicular, permitiendo de esta manera tomar una decisión clínica adecuada y evitar así un procedimiento invasivo para el paciente.

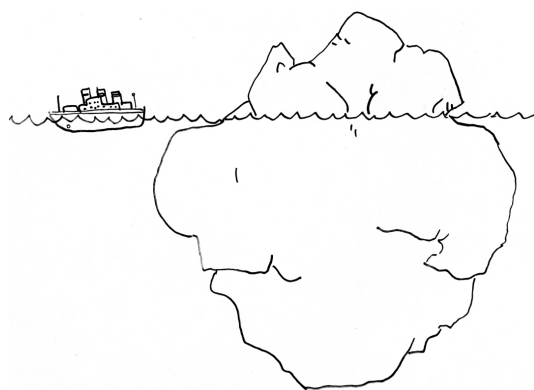
Si bien es necesario contar con lineamientos para el diagnóstico genético de la infertilidad masculina, es esencial la complementación de dichos análisis de rutina con investigación básica con el objetivo de trasladar estos conocimientos al diagnóstico y tratamiento de los pacientes. En los últimos años, con el advenimiento del concepto de medicina traslacional, cada vez más investigaciones básicas de laboratorio se ponen al servicio del diagnóstico, asesoramiento y tratamiento de los pacientes, en numerosas áreas biomédicas. En el campo de la infertilidad masculina, la caracterización de la función de los genes involucrados en la espermatogénesis permitirá evaluar mejor la patogenia del paciente. Sin embargo, para llegar a determinar la función de un determinado gen, de la proteína que codifica y su mecanismo de acción, es necesario identificar previamente mutaciones específicas en estos genes que causan la infertilidad masculina (Vogt *et al* 2008).

Además de su función en la espermatogénesis, el cromosoma Y recientemente ha cobrado interés como modulador de la predisposición diferencial del hombre y la mujer a una variedad de enfermedades multifactoriales. Como fue mencionado al comienzo del presente trabajo de tesis, durante muchos años el cromosoma Y se consideró como un “terreno baldío” genético que no cumplía más que unas pocas funciones en el hombre.

Sin embargo, investigaciones recientes indicarían que los genes localizados en el cromosoma Y codifican para factores reguladores de la transcripción, traducción y estabilidad proteica de una gran variedad de genes, muchos de los cuales se encuentran involucrados en el mantenimiento de la salud del paciente (Bellott *et al* 2014).

Por otro lado, la disponibilidad de la secuencia del cromosoma Y de un único hombre de origen europeo y la enorme variabilidad que presenta el cromosoma Y a nivel mundial, hacen que la extrapolación de la información genética de este cromosoma a diferentes poblaciones y haplogrupos no sea precisa ni adecuada (Skaletsky *et al* 2003, Repping *et al* 2006). Aunque aún queda mucho por conocer sobre el cromosoma Y, sus funciones y su variabilidad, el presente trabajo de tesis sienta los precedentes de la investigación de los factores genéticos relacionados a la infertilidad masculina específicamente en la población argentina, y en las diferencias que presenta el haplogrupo nativo americano Q1a2a1a1 dentro de la misma.

Conclusiones y Perspectivas Futuras



*"Sólo cerrando las puertas detrás de uno
se abren ventanas hacia el porvenir"*

Françoise Sagan

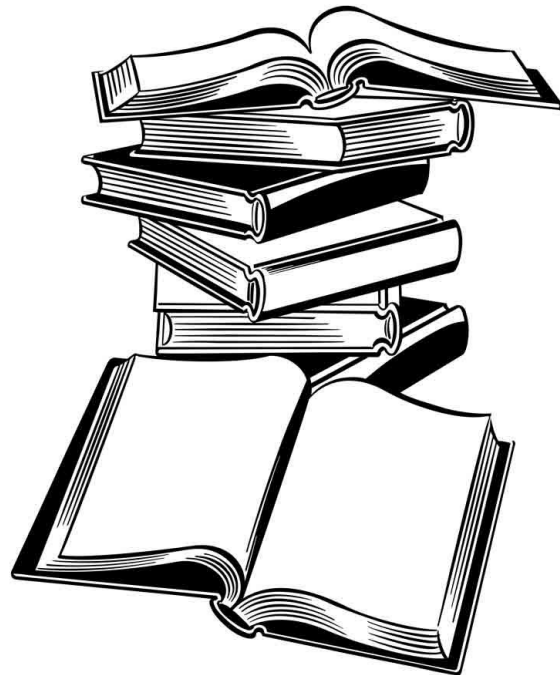
CONCLUSIONES

- ✓ El presente trabajo de tesis es el primero en estudiar las microdeleciones del cromosoma Y en la región AZF tanto en pacientes infértiles de la población argentina como en hombres fértiles pertenecientes al Hg nativo americano Q1a2a1a1
- ✓ Los hombres fértiles pertenecientes al Hg nativo americano Q1a2a1a1 presentaron una prevalencia del 3,3% de microdeleciones parciales en la región AZFc descartándose deleciones constitutivas en este Hg y se observó un aumento de duplicaciones post-delección. Se descartó una predisposición aumentada a microdeleciones clásicas
- ✓ Las deleciones parciales de la región AZFc no afectan la espermatogénesis en hombres pertenecientes al Hg Q, mientras que el aumento de la prevalencia de este Hg en pacientes con arresto espermatogénico sugiere la existencia de otro factor genético asociado a la falla espermatogénica
- ✓ En la población argentina, se observó una alta prevalencia de microdeleciones en pacientes con menos de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL (11,1%), sin embargo las mismas no se correlacionaron con ausencia de espermatozoides a nivel testicular
- ✓ Si bien ciertos Hgs podrían estar asociados a deleciones parciales, los mismos no producen una disminución del recuento espermático ni falla espermatogénica. Las deleciones clásicas de la región AZF se correlacionan con alteraciones severas del recuento espermático independientemente del haplogrupo del paciente. Las deleciones AZFbc y AZFabc se correlacionaron con ausencia de espermatozoides a nivel testicular, no así las deleciones AZFb y AZFc
- ✓ Si bien las recomendaciones internacionales sugieren el análisis de deleciones de las regiones AZFb y AZFc, y la delección parcial gr/gr, éstas no presentan un claro valor diagnóstico en la población argentina dada la ausencia de correlación con la recuperación espermática
- ✓ El desarrollo de la técnica de HRM en multiplex para evaluar genes candidatos de la espermatogénesis permitiría evaluar la implicancia de los mismos en la infertilidad masculina y desarrollar un algoritmo diagnóstico adecuado para la población argentina

PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Es necesario profundizar el estudio de la región AZFc, tanto de su delección completa, como de las diferentes deleciones parciales, y evaluar su implicancia en la espermatogénesis
- ✓ Dada la ausencia de microdeleciones clásicas en pacientes con arresto espermatogénico, es necesario estudiar otras posibles causas genéticas tanto en el cromosoma Y como en otras partes del genoma. Específicamente en el Hg Q3, sería de interés evaluar otras posibles causas ligadas al cromosoma Y que permitan explicar las causas de las azoospermias y arrestos espermatogénicos hallados
- ✓ A partir de la técnica desarrollada para el análisis de genes candidatos de la espermatogénesis, el estudio de un mayor número de pacientes con esterilidad sin causa aparente permitirá evaluar la implicancia real de los mismos en la espermatogénesis. Posteriormente será necesario la complementación con estudios de expresión y funcionalidad de estos genes
- ✓ Dado que se evidenció la presencia de microdeleciones del cromosoma Y en hombres fértiles o con infertilidad leve/moderada, sería de interés evaluar si estas deleciones se transmiten naturalmente a la progenie masculina
- ✓ El desarrollo de la técnica de HRM en multiplex para el estudio de ausencia de genes específicos podrá ser empleada no solo en el campo de la infertilidad masculina, sino también para el estudio de otras patologías con base genético-molecular

Referencias Bibliográficas



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alechine, E. and D. Corach (2014). "High-Throughput Screening for Spermatogenesis Candidate Genes in the AZFc Region of the Y Chromosome by Multiplex Real Time PCR Followed by High Resolution Melting Analysis." *PLoS One* **9**(5): e97227.

Almeamar, H. A., V. Ramachandran, P. Ismail, P. Nadkarni and N. Fawzi (2013). "Analysis of partial AZFc deletions in Malaysian infertile male subjects." *Syst Biol Reprod Med* **59**(2): 99-107.

Arredi, B., A. Ferlin, E. Speltra, C. Bedin, D. Zuccarello, F. Ganz, E. Marchina, L. Stuppia, C. Krausz and C. Foresta (2007). "Y-chromosome haplogroups and susceptibility to azoospermia factor c microdeletion in an Italian population." *J Med Genet* **44**(3): 205-208.

Ballantyne, K. N., M. Goedbloed, R. Fang, O. Schaap, O. Lao, A. Wollstein, Y. Choi, K. van Duijn, M. Vermeulen, S. Brauer, R. Decorte, M. Poetsch, N. von Wurmb-Schwark, P. de Knijff, D. Labuda, H. Vezina, H. Knoblauch, R. Lessig, L. Roewer, R. Ploski, T. Dobosz, L. Henke, J. Henke, M. R. Furtado and M. Kayser (2010). "Mutability of Y-chromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications." *Am J Hum Genet* **87**(3): 341-353.

Ballantyne, K. N., V. Keerl, A. Wollstein, Y. Choi, S. B. Zuniga, A. Ralf, M. Vermeulen, P. de Knijff and M. Kayser (2012). "A new future of forensic Y-chromosome analysis: rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages." *Forensic Sci Int Genet* **6**(2): 208-218.

Bellott, D. W., J. F. Hughes, H. Skaletsky, L. G. Brown, T. Pyntikova, T. J. Cho, N. Koutseva, S. Zaghlul, T. Graves, S. Rock, C. Kremitzki, R. S. Fulton, S. Dugan, Y. Ding, D. Morton, Z. Khan, L. Lewis, C. Buhay, Q. Wang, J. Watt, M. Holder, S. Lee, L. Nazareth, S. Rozen, D. M. Muzny, W. C. Warren, R. A. Gibbs, R. K. Wilson and D. C. Page (2014). "Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators." *Nature* **508**(7497): 494-499.

Berta, P., J. R. Hawkins, A. H. Sinclair, A. Taylor, B. L. Griffiths, P. N. Goodfellow and M. Fellous (1990). "Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor." *Nature* **348**(6300): 448-450.

Blagosklonova, O., F. Fellmann, M. C. Clavequin, C. Roux and J. L. Bresson (2000). "AZFa deletions in Sertoli cell-only syndrome: a retrospective study." *Mol Hum Reprod* **6**(9): 795-799.

Bortolini, M. C., F. M. Salzano, M. G. Thomas, S. Stuart, S. P. Nasanen, C. H. Bau, M. H. Hutz, Z. Layrisse, M. L. Petzl-Erler, L. T. Tsuneto, K. Hill, A. M. Hurtado, D. Castro-de-Guerra, M. M. Torres, H. Groot, R. Michalski, P. Nymadawa, G. Bedoya, N. Bradman, D. Labuda and A. Ruiz-Linares (2003). "Y-chromosome evidence for differing ancient demographic histories in the Americas." *Am J Hum Genet* **73**(3): 524-539.

Caputo, M., M. Irisarri, C. Perandones, E. Alechine, L. A. Pellene, C. U. Roca, F. E. Micheli and D. Corach (2013). "Analysis of D216H polymorphism in Argentinean patients with primary dystonia." *J Neurogenet* **27**(1-2): 16-18.

Carvalho, C. M. B., L. W. Zuccherato, L. Bastos-Rodrigues, F. R. Santos and S. D. J. Pena (2006). "No association found between gr/gr deletions and infertility in Brazilian males." *Molecular Human Reproduction* **12**(4): 269-273.

- Referencias Bibliográficas -

Cavalli-Sforza, L. L. and M. W. Feldman (2003). "The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution." Nat Genet **33 Suppl**: 266-275.

Choi, J., S. H. Song, C. W. Bak, S. R. Sung, T. K. Yoon, D. R. Lee and S. H. Shim (2012). "Impaired spermatogenesis and gr/gr deletions related to Y chromosome haplogroups in Korean men." PLoS One **7**(8): e43550.

Ciccodicola, A., M. D'Esposito, T. Esposito, F. Gianfrancesco, C. Migliaccio, M. G. Miano, M. R. Matarazzo, M. Vacca, A. Franze, M. Cuccurese, M. Cocchia, A. Curci, A. Terracciano, A. Torino, S. Cocchia, G. Mercadante, E. Pannone, N. Archidiacono, M. Rocchi, D. Schlessinger and M. D'Urso (2000). "Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region." Hum Mol Genet **9**(3): 395-401.

Cong, X. W., X. D. Tu, A. Z. Yan and J. Zeng (2010). "[Partial AZFc region deletions of the Y chromosome in spermatogenic dysfunction patients]." Zhonghua Nan Ke Xue **16**(7): 594-598.

Corach, D., O. Lao, C. Bobillo, K. van Der Gaag, S. Zuniga, M. Vermeulen, K. van Duijn, M. Goedbloed, P. M. Vallone, W. Parson, P. de Knijff and M. Kayser (2010). "Inferring continental ancestry of argentineans from Autosomal, Y-chromosomal and mitochondrial DNA." Ann Hum Genet **74**(1): 65-76.

Costa, P., R. Goncalves, C. Ferras, S. Fernandes, A. T. Fernandes, M. Sousa and A. Barros (2008). "Identification of new breakpoints in AZFb and AZFc." Mol Hum Reprod **14**(4): 251-258.

De Carvalho, C. M. B., L. W. Zuccherato, M. Fujisawa, T. Shirakawa, A. K. C. Ribeiro-Dos-Santos, S. E. B. Santos, S. D. J. Pena and F. R. Santos (2006). "Study of AZFc partial deletion gr/gr in fertile and infertile Japanese males." Journal of Human Genetics **51**(9): 794-799.

de Llanos, M., J. L. Balleca, C. Gazquez, E. Margarit and R. Oliva (2005). "High frequency of gr/gr chromosome Y deletions in consecutive oligospermic ICSI candidates." Hum Reprod **20**(1): 216-220.

Eisheid, A. C. (2011). "SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR." BMC Res Notes **4**: 263.

Eloulid, A., H. Rhaissi, A. Reguig, S. Bounaceur, B. El Houate, O. Abidi, M. Charif, N. Louanjli, E. Chadli, A. Barakat, A. Bashamboo, K. McElreavey and H. Rouba (2012). "Association of spermatogenic failure with the b2/b3 partial AZFc deletion." PLoS One **7**(4): e34902.

Ferlin, A., B. Arredi and C. Foresta (2006). "Genetic causes of male infertility." Reprod Toxicol **22**(2): 133-141.

Ferlin, A., B. Arredi, E. Speltra, C. Cazzadore, R. Selice, A. Garolla, A. Lenzi and C. Foresta (2007). "Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy." J Clin Endocrinol Metab **92**(3): 762-770.

Ferlin, A., E. Moro, A. Rossi, B. Dallapiccola and C. Foresta (2003). "The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men." J Med Genet **40**(1): 18-24.

- Referencias Bibliográficas -

- Ferlin, A., E. Speltra, A. Garolla, R. Selice, D. Zuccarello and C. Foresta (2007). "Y chromosome haplogroups and susceptibility to testicular cancer." Mol Hum Reprod **13**(9): 615-619.
- Ferlin, A., A. Tessari, F. Ganz, E. Marchina, S. Barlati, A. Garolla, B. Engl and C. Foresta (2005). "Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility." J Med Genet **42**(3): 209-213.
- Fernandes, S., K. Huellen, J. Goncalves, H. Dukal, J. Zeisler, E. Rajpert De Meyts, N. E. Skakkebaek, B. Habermann, W. Krause, M. Sousa, A. Barros and P. H. Vogt (2002). "High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia." Mol Hum Reprod **8**(3): 286-298.
- Fernandes, S., S. Paracchini, L. H. Meyer, G. Floridia, C. Tyler-Smith and P. H. Vogt (2004). "A large AZFc deletion removes DAZ3/DAZ4 and nearby genes from men in Y haplogroup N." Am J Hum Genet **74**(1): 180-187.
- Fernando, L., J. Gromoll, T. R. Weerasooriya, E. Nieschlag and M. Simoni (2006). "Y-chromosomal microdeletions and partial deletions of the Azoospermia Factor c (AZFc) region in normozoospermic, severe oligozoospermic and azoospermic men in Sri Lanka." Asian J Androl **8**(1): 39-44.
- Foresta, C., A. Ferlin and E. Moro (2000). "Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility." Hum Mol Genet **9**(8): 1161-1169.
- Foresta, C., E. Moro and A. Ferlin (2001). "Prognostic value of Y deletion analysis. The role of current methods." Hum Reprod **16**(8): 1543-1547.
- Giachini, C., E. Guarducci, G. Longepied, S. Degl'Innocenti, L. Becherini, G. Forti, M. J. Mitchell and C. Krausz (2005). "The gr/gr deletion(s): a new genetic test in male infertility?" J Med Genet **42**(6): 497-502.
- Giachini, C., I. Laface, E. Guarducci, G. Balercia, G. Forti and C. Krausz (2008). "Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population." Hum Genet **124**(4): 399-410.
- Greve, G., E. Alechine, J. J. Pasantes, C. Hodler, W. Rietschel, T. J. Robinson and W. Schempp (2011). "Y-Chromosome Variation in Hominids: Intraspecific Variation is Limited to the Polygamous Chimpanzee." PLoS One.
- Greve, G., E. Alechine, J. J. Pasantes, C. Hodler, W. Rietschel, T. J. Robinson and W. Schempp (2011). "Y-Chromosome variation in hominids: intraspecific variation is limited to the polygamous chimpanzee." PLoS One **6**(12): e29311.
- Hopps, C. V., A. Mielnik, M. Goldstein, G. D. Palermo, Z. Rosenwaks and P. N. Schlegel (2003). "Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions." Hum Reprod **18**(8): 1660-1665.

- Referencias Bibliográficas -

Hucklenbroich, K., J. Gromoll, M. Heinrich, C. Hohoff, E. Nieschlag and M. Simoni (2005). "Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis." Hum Reprod **20**(1): 191-197.

Imken, L., B. El Houate, A. Chafik, H. Nahili, R. Boulouiz, O. Abidi, E. Chadli, N. Louanjli, A. Elfath, M. Hassar, K. McElreavey, A. Barakat and H. Rouba (2007). "AZF microdeletions and partial deletions of AZFc region on the Y chromosome in Moroccan men." Asian Journal of Andrology **9**(5): 674-678.

ISOGG. (2014). "International Society of Genetic Genealogy (2014). Y-DNA Haplogroup Tree 2014, Version: 9.06, Date: 19 January 2014, <http://www.isogg.org/tree/> [Date of access: 22, January, 2014]."

Jobling, M. A. (2008). "Copy number variation on the human Y chromosome." Cytogenet Genome Res **123**(1-4): 253-262.

Jobling, M. A. and C. Tyler-Smith (2003). "The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age." Nat Rev Genet **4**(8): 598-612.

Karafet, T. M., F. L. Mendez, M. B. Meilerman, P. A. Underhill, S. L. Zegura and M. F. Hammer (2008). "New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree." Genome Res **18**(5): 830-838.

Kozina, V., H. Cappallo-Obermann, J. Gromoll and A. N. Spiess (2011). "A one-step real-time multiplex PCR for screening Y-chromosomal microdeletions without downstream amplicon size analysis." PLoS One **6**(8): e23174.

Krausz, C., C. Giachini, Y. Xue, M. K. O'Bryan, J. Gromoll, E. Rajpert-de Meyts, R. Oliva, I. Akin-Seifer, E. Erdei, N. Jorgensen, M. Simoni, J. L. Balleca, R. Levy, G. Balercia, P. Piomboni, E. Nieschlag, G. Forti, R. McLachlan and C. Tyler-Smith (2009). "Phenotypic variation within European carriers of the Y-chromosomal gr/gr deletion is independent of Y-chromosomal background." J Med Genet **46**(1): 21-31.

Krausz, C., L. Hoefsloot, M. Simoni and F. Tuttelmann (2014). "EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013." Andrology **2**(1): 5-19.

Kumari, A., S. K. Yadav and S. Ali (2012). "Organizational and functional status of the Y-linked genes and loci in the infertile patients having normal spermiogram." PLoS One **7**(7): e41488.

Kuroda-Kawaguchi, T., H. Skaletsky, L. G. Brown, P. J. Minx, H. S. Cordum, R. H. Waterston, R. K. Wilson, S. Silber, R. Oates, S. Rozen and D. C. Page (2001). "The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men." Nat Genet **29**(3): 279-286.

Lahn, B. T. and D. C. Page (1997). "Functional coherence of the human Y chromosome." Science **278**(5338): 675-680.

- Referencias Bibliográficas -

Lahn, B. T. and D. C. Page (1999). "Four evolutionary strata on the human X chromosome." Science **286**(5441): 964-967.

Lahn, B. T., Z. L. Tang, J. Zhou, R. J. Barndt, M. Parvinen, C. D. Allis and D. C. Page (2002). "Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8707-8712.

Lange, J., H. Skaletsky, G. W. Bell and D. C. Page (2008). "MSY Breakpoint Mapper, a database of sequence-tagged sites useful in defining naturally occurring deletions in the human Y chromosome." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D809-814.

Lardone, M. C., A. Marengo, A. Parada-Bustamante, L. Cifuentes, A. Piottante, M. Ebensperger, R. Valdevenito and A. Castro (2013). "Greater prevalence of Y chromosome Q1a3a haplogroup in Y-microdeleted Chilean men: a case-control study." J Assist Reprod Genet **30**(4): 531-538.

Lardone, M. C., D. A. Parodi, M. Ebensperger, P. Penaloza, V. Cornejo, R. Valdevenito, R. Pommer and A. Castro (2007). "AZFc partial deletions in Chilean men with severe spermatogenic failure." Fertil Steril **88**(5): 1318-1326.

Li, Q., D. Qiao, N. H. Song, Y. Ding, Z. J. Wang, J. Yang, W. Wang and C. J. Yin (2013). "Association of DAZ1/DAZ2 deletion with spermatogenic impairment and male infertility in the South Chinese population." World J Urol **31**(6): 1403-1409.

Lin, Y. W., C. L. Hsu and P. H. Yen (2006). "A two-step protocol for the detection of rearrangements at the AZFc region on the human Y chromosome." Mol Hum Reprod **12**(5): 347-351.

Lin, Y. W., L. C. L. Hsu, P. L. Kuo, W. J. Huang, H. S. Chiang, S. D. Yeh, T. Y. Hsu, E. H. Yu, K. N. Hsiao, R. M. Cantor and P. H. Yen (2007). "Partial duplication at AZFc on the Y chromosome is a risk factor for impaired spermatogenesis in Han Chinese in Taiwan." Human Mutation **28**(5): 486-494.

Lo Giacco, D., C. Chianese, J. Sanchez-Curbelo, L. Bassas, P. Ruiz, O. Rajmil, J. Sarquella, A. Vives, E. Ruiz-Castane, R. Oliva, E. Ars and C. Krausz (2013). "Clinical relevance of Y-linked CNV screening in male infertility: new insights based on the 8-year experience of a diagnostic genetic laboratory." Eur J Hum Genet.

Longepied, G., N. Saut, I. Akinin-Seifer, R. Levy, A. M. Frances, C. Metzler-Guillemain, M. R. Guichaoua and M. J. Mitchell (2010). "Complete deletion of the AZFb interval from the Y chromosome in an oligozoospermic man." Hum Reprod **25**(10): 2655-2663.

Lu, C., J. Jiang, R. Zhang, Y. Wang, M. Xu, Y. Qin, Y. Lin, X. Guo, B. Ni, Y. Zhao, N. Diao, F. Chen, H. Shen, J. Sha, Y. Xia, Z. Hu and X. Wang (2014). "Gene copy number alterations in the azoospermia-associated AZFc region and their effect on spermatogenic impairment." Mol Hum Reprod.

Lu, C., F. Zhang, H. Yang, M. Xu, G. Du, W. Wu, Y. An, Y. Qin, G. Ji, X. Han, A. Gu, Y. Xia, L. Song, S. Wang, L. Jin and X. Wang (2011). "Additional genomic duplications in AZFc underlie the b2/b3

- Referencias Bibliográficas -

deletion-associated risk of spermatogenic impairment in Han Chinese population." Hum Mol Genet **20**(22): 4411-4421.

Lu, C., J. Zhang, Y. Li, Y. Xia, F. Zhang, B. Wu, W. Wu, G. Ji, A. Gu, S. Wang, L. Jin and X. Wang (2009). "The b2/b3 subdeletion shows higher risk of spermatogenic failure and higher frequency of complete AZFc deletion than the gr/gr subdeletion in a Chinese population." Hum Mol Genet **18**(6): 1122-1130.

Lynch, M., D. S. Cram, A. Reilly, M. K. O'Bryan, H. W. Baker, D. M. de Kretser and R. I. McLachlan (2005). "The Y chromosome gr/gr subdeletion is associated with male infertility." Mol Hum Reprod **11**(7): 507-512.

Machev, N., N. Saut, G. Longepied, P. Terriou, A. Navarro, N. Levy, M. Guichaoua, C. Metzler-Guillemain, P. Collignon, A. M. Frances, J. Belougne, E. Clemente, J. Chiaroni, C. Chevillard, C. Durand, A. Ducourneau, N. Pech, K. McElreavey, M. G. Mattei and M. J. Mitchell (2004). "Sequence family variant loss from the AZFc interval of the human Y chromosome, but not gene copy loss, is strongly associated with male infertility." J Med Genet **41**(11): 814-825.

McLachlan, R. I. and M. K. O'Bryan (2010). "Clinical Review#: State of the art for genetic testing of infertile men." J Clin Endocrinol Metab **95**(3): 1013-1024.

Monis, P. T., S. Giglio and C. P. Saint (2005). "Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis." Anal Biochem **340**(1): 24-34.

Moore, J. K. and J. E. Haber (1996). "Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **16**(5): 2164-2173.

Moro, E., A. Ferlin, P. H. Yen, P. G. Franchi, G. Palka and C. Foresta (2000). "Male infertility caused by a de novo partial deletion of the DAZ cluster on the Y chromosome." J Clin Endocrinol Metab **85**(11): 4069-4073.

Nakahori, Y., O. Takenaka and Y. Nakagome (1991). "A human X-Y homologous region encodes "amelogenin"." Genomics **9**(2): 264-269.

Navarro-Costa, P., J. Goncalves and C. E. Plancha (2010). "The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility." Hum Reprod Update **16**(5): 525-542.

Navarro-Costa, P., L. Pereira, C. Alves, L. Gusmao, C. Proenca, P. Marques-Vidal, T. Rocha, S. C. Correia, S. Jorge, A. Neves, A. P. Soares, J. Nunes, C. Calhaz-Jorge, A. Amorim, C. E. Plancha and J. Goncalves (2007). "Characterizing partial AZFc deletions of the Y chromosome with amplicon-specific sequence markers." BMC Genomics **8**: 342.

Navarro-Costa, P. and C. E. Plancha (2011). "Heterochromatin: the hidden epigenetic geography of the Y chromosome." Hum Reprod Update **17**(3): 434.

- Referencias Bibliográficas -

Navarro-Costa, P., C. E. Plancha and J. Goncalves (2010). "Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility?" J Biomed Biotechnol **2010**: 936569.

Noordam, M. J., S. K. van Daalen, S. E. Hovingh, C. M. Korver, F. van der Veen and S. Repping (2011). "A novel partial deletion of the Y chromosome azoospermia factor c region is caused by non-homologous recombination between palindromes and may be associated with increased sperm counts." Hum Reprod **26**(3): 713-723.

Noordam, M. J., G. H. Westerveld, S. E. Hovingh, S. K. van Daalen, C. M. Korver, F. van der Veen, A. M. van Pelt and S. Repping (2011). "Gene copy number reduction in the azoospermia factor c (AZFc) region and its effect on total motile sperm count." Hum Mol Genet **20**(12): 2457-2463.

Oklander, L. I., G. E. Zunino, A. Di Fiore and D. Corach (2007). "Isolation, characterization and evaluation of 11 autosomal STRs suitable for population studies in black and gold howler monkeys *Alouatta caraya*." Molecular Ecology Notes **7**(1): 117-120.

Palacios, A. (2009). Espermatogénesis. Fertilidad y reproducción asistida. M. T. U. y. J. L. Biber. Buenos Aires, Argentina, Medica Panamericana.

Pieri Pde, C., D. H. Pereira, S. Glina, J. Hallak, K. McElreavey and C. A. Moreira-Filho (2002). "A cost-effective screening test for detecting AZF microdeletions on the human Y chromosome." Genet Test **6**(3): 185-194.

Quevedo, C., M. Perassolo, E. Alechine, D. Corach, A. M. Giulietti and J. R. Talou (2010). "Increasing anthraquinone production by overexpression of 1-deoxy-D: -xylulose-5-phosphate synthase in transgenic cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*." Biotechnol Lett **32**(7): 997-1003.

Quinque, D., R. Kittler, M. Kayser, M. Stoneking and I. Nasidze (2006). "Evaluation of saliva as a source of human DNA for population and association studies." Anal Biochem **353**(2): 272-277.

Ravel, C., S. Chantot-Bastarud, B. El Houate, H. Rouba, M. Legendre, D. Lorenco, J. Mandelbaum, J. P. Siffroi and K. McElreavey (2009). "Y-chromosome AZFc structural architecture and relationship to male fertility." Fertil Steril **92**(6): 1924-1933.

Ravel, C., S. Chantot-Bastarud, K. McElreavey and J. P. Siffroi (2006). "[Molecular anomalies of the Y chromosome: Consequences on male fertility]." Gynecol Obstet Fertil **34**(10): 885-893.

Reich, D., N. Patterson, D. Campbell, A. Tandon, S. Mazieres, N. Ray, M. V. Parra, W. Rojas, C. Duque, N. Mesa, L. F. Garcia, O. Triana, S. Blair, A. Maestre, J. C. Dib, C. M. Bravi, G. Bailliet, D. Corach, T. Hunemeier, M. C. Bortolini, F. M. Salzano, M. L. Petzl-Erler, V. Acuna-Alonzo, C. Aguilar-Salinas, S. Canizales-Quinteros, T. Tusie-Luna, L. Riba, M. Rodriguez-Cruz, M. Lopez-Alarcon, R. Coral-Vazquez, T. Canto-Cetina, I. Silva-Zolezzi, J. C. Fernandez-Lopez, A. V. Contreras, G. Jimenez-Sanchez, M. J. Gomez-Vazquez, J. Molina, A. Carracedo, A. Salas, C. Gallo, G. Poletti, D. B. Witonsky, G. Alkorta-Aranburu, R. I. Sukernik, L. Osipova, S. A. Fedorova, R. Vasquez, M. Villena, C. Moreau, R. Barrantes, D. Pauls, L. Excoffier, G. Bedoya, F. Rothhammer, J. M. Dugoujon, G. Larrouy, W. Klitz, D. Labuda, J. Kidd, K. Kidd, A. Di Rienzo, N. B. Freimer, A. L. Price and A. Ruiz-Linares (2012). "Reconstructing Native American population history." Nature **488**(7411): 370-374.

- Referencias Bibliográficas -

- Reijo, R., T. Y. Lee, P. Salo, R. Alagappan, L. G. Brown, M. Rosenberg, S. Rozen, T. Jaffe, D. Straus, O. Hovatta and et al. (1995). "Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene." *Nat Genet* **10**(4): 383-393.
- Reijo, R. A., D. M. Dorfman, R. Slee, A. A. Renshaw, K. R. Loughlin, H. Cooke and D. C. Page (2000). "DAZ family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice." *Biol Reprod* **63**(5): 1490-1496.
- Repping, S., H. Skaletsky, L. Brown, S. K. van Daalen, C. M. Korver, T. Pyntikova, T. Kuroda-Kawaguchi, J. W. de Vries, R. D. Oates, S. Silber, F. van der Veen, D. C. Page and S. Rozen (2003). "Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection." *Nat Genet* **35**(3): 247-251.
- Repping, S., H. Skaletsky, J. Lange, S. Silber, F. Van Der Veen, R. D. Oates, D. C. Page and S. Rozen (2002). "Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure." *Am J Hum Genet* **71**(4): 906-922.
- Repping, S., S. K. van Daalen, L. G. Brown, C. M. Korver, J. Lange, J. D. Marszalek, T. Pyntikova, F. van der Veen, H. Skaletsky, D. C. Page and S. Rozen (2006). "High mutation rates have driven extensive structural polymorphism among human Y chromosomes." *Nat Genet* **38**(4): 463-467.
- Repping, S., S. K. van Daalen, C. M. Korver, L. G. Brown, J. D. Marszalek, J. Gianotten, R. D. Oates, S. Silber, F. van der Veen, D. C. Page and S. Rozen (2004). "A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region." *Genomics* **83**(6): 1046-1052.
- Roewer, L., M. Nothnagel, L. Gusmao, V. Gomes, M. Gonzalez, D. Corach, A. Sala, E. Alechine, T. Palha, N. Santos, A. Ribeiro-Dos-Santos, M. Geppert, S. Willuweit, M. Nagy, S. Zweynert, M. Baeta, C. Nunez, B. Martinez-Jarreta, F. Gonzalez-Andrade, E. Fagundes de Carvalho, D. A. da Silva, J. J. Builes, D. Turbon, A. M. Lopez Parra, E. Arroyo-Pardo, U. Toscanini, L. Borjas, C. Barletta, E. Ewart, S. Santos and M. Krawczak (2013). "Continent-wide decoupling of Y-chromosomal genetic variation from language and geography in native South Americans." *PLoS Genet* **9**(4): e1003460.
- Rozen, S. and H. Skaletsky (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." *Methods Mol Biol* **132**: 365-386.
- Rozen, S., H. Skaletsky, J. D. Marszalek, P. J. Minx, H. S. Cordum, R. H. Waterston, R. K. Wilson and D. C. Page (2003). "Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes." *Nature* **423**(6942): 873-876.
- Rozen, S. G., J. D. Marszalek, K. Irenze, H. Skaletsky, L. G. Brown, R. D. Oates, S. J. Silber, K. Ardlie and D. C. Page (2012). "AZFc deletions and spermatogenic failure: a population-based survey of 20,000 Y chromosomes." *Am J Hum Genet* **91**(5): 890-896.
- Sachdeva, K., R. Saxena, A. Majumdar, S. Chadda and I. C. Verma (2011). "Use of ethnicity-specific sequence tag site markers for Y chromosome microdeletion studies." *Genet Test Mol Biomarkers* **15**(6): 451-459.

- Referencias Bibliográficas -

Sasaki, M., J. Lange and S. Keeney (2010). "Genome destabilization by homologous recombination in the germ line." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(3): 182-195.

Saxena, R., L. G. Brown, T. Hawkins, R. K. Alagappan, H. Skaletsky, M. P. Reeve, R. Reijo, S. Rozen, M. B. Dinulos, C. M. Disteche and D. C. Page (1996). "The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned." Nat Genet **14**(3): 292-299.

Schaller, F., A. M. Fernandes, C. Hodler, C. Munch, J. J. Pasantes, W. Rietschel and W. Schempp (2010). "Y chromosomal variation tracks the evolution of mating systems in chimpanzee and bonobo." PLoS One **5**(9).

Schuelke, M. (2000). "An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments." Nat Biotechnol **18**(2): 233-234.

Shahid, M., V. S. Dhillon, H. S. Khalil, A. Sexana and S. A. Husain (2011). "Associations of Y-chromosome subdeletion gr/gr with the prevalence of Y-chromosome haplogroups in infertile patients." Eur J Hum Genet **19**(1): 23-29.

Shaqalaih, A. J., M. S. Abu Halima, M. J. Ashour and F. A. Sharif (2009). "Screening for Y-chromosome microdeletions in a population of infertile males in the Gaza Strip." J Exp Clin Assist Reprod **6**: 7.

Simoni, M., E. Bakker and C. Krausz (2004). "EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004." Int J Androl **27**(4): 240-249.

Simoni, M., F. Tuttelmann, J. Gromoll and E. Nieschlag (2008). "Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Munster experience." Reprod Biomed Online **16**(2): 289-303.

Sin, H. S., E. Koh, K. Shigehara, K. Sugimoto, Y. Maeda, A. Yoshida, K. Kyono and M. Namiki (2010). "Features of constitutive gr/gr deletion in a Japanese population." Hum Reprod **25**(9): 2396-2403.

Sinclair, A. H., J. W. Foster, J. A. Spencer, D. C. Page, M. Palmer, P. N. Goodfellow and J. A. Graves (1988). "Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials." Nature **336**(6201): 780-783.

Skaletsky, H., T. Kuroda-Kawaguchi, P. J. Minx, H. S. Cordum, L. Hillier, L. G. Brown, S. Repping, T. Pyntikova, J. Ali, T. Bieri, A. Chinwalla, A. Delehaunty, K. Delehaunty, H. Du, G. Fewell, L. Fulton, R. Fulton, T. Graves, S. F. Hou, P. Latrielle, S. Leonard, E. Mardis, R. Maupin, J. McPherson, T. Miner, W. Nash, C. Nguyen, P. Ozersky, K. Pepin, S. Rock, T. Rohlfling, K. Scott, B. Schultz, C. Strong, A. Tin-Wollam, S. P. Yang, R. H. Waterston, R. K. Wilson, S. Rozen and D. C. Page (2003). "The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes." Nature **423**(6942): 825-837.

Soares, A. R., P. Costa, J. Silva, M. Sousa, A. Barros and S. Fernandes (2012). "AZFb microdeletions and oligozoospermia--which mechanisms?" Fertil Steril **97**(4): 858-863.

- Referencias Bibliográficas -

Stouffs, K., W. Lissens, H. Tournaye and P. Haentjens (2011). "What about gr/gr deletions and male infertility? Systematic review and meta-analysis." Hum Reprod Update **17**(2): 197-209.

Stouffs, K., H. Tournaye, J. Van der Elst, P. Haentjens, I. Liebaers and W. Lissens (2008). "Do we need to search for gr/gr deletions in infertile men in a clinical setting?" Hum Reprod **23**(5): 1193-1199.

Sun, C., H. Skaletsky, S. Rozen, J. Gromoll, E. Nieschlag, R. Oates and D. C. Page (2000). "Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses." Hum Mol Genet **9**(15): 2291-2296.

Tiepolo, L. and O. Zuffardi (1976). "Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm." Hum Genet **34**(2): 119-124.

Trinks, J., M. L. Hulaniuk, M. Caputo, L. Burgos Pratz, V. Re, L. Fortuny, A. Pontoriero, A. Frias, O. Torres, F. Nunez, A. Gadano, D. Corach and D. Flichman (2014). "Distribution of genetic polymorphisms associated with hepatitis C virus (HCV) antiviral response in a multiethnic and admixed population." Pharmacogenomics J.

Underhill, P. A., L. Jin, R. Zerniani, P. J. Oefner and L. L. Cavalli-Sforza (1996). "A pre-Columbian Y chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 196-200.

Visser, L., G. H. Westerveld, C. M. Korver, S. K. van Daalen, S. E. Hovingh, S. Rozen, F. van der Veen and S. Repping (2009). "Y chromosome gr/gr deletions are a risk factor for low semen quality." Hum Reprod **24**(10): 2667-2673.

Vogt, P. H., A. Edelmann, S. Kirsch, O. Henegariu, P. Hirschmann, F. Kiesewetter, F. M. Kohn, W. B. Schill, S. Farah, C. Ramos, M. Hartmann, W. Hartschuh, D. Meschede, H. M. Behre, A. Castel, E. Nieschlag, W. Weidner, H. J. Grone, A. Jung, W. Engel and G. Haidl (1996). "Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11." Hum Mol Genet **5**(7): 933-943.

Vogt, P. H., C. L. Falcao, R. Hanstein and J. Zimmer (2008). "The AZF proteins." Int J Androl **31**(4): 383-394.

Wong, E. Y., J. Y. Tse, K. M. Yao, V. C. Lui, P. C. Tam and W. S. Yeung (2004). "Identification and characterization of human VCY2-interacting protein: VCY2IP-1, a microtubule-associated protein-like protein." Biol Reprod **70**(3): 775-784.

Wu, B., N. X. Lu, Y. K. Xia, A. H. Gu, C. C. Lu, W. Wang, L. Song, S. L. Wang, H. B. Shen and X. R. Wang (2007). "A frequent Y chromosome b2/b3 subdeletion shows strong association with male infertility in Han-Chinese population." Hum Reprod **22**(4): 1107-1113.

Yang, Y., M. Ma, L. Li, D. Su, P. Chen, Y. Ma, Y. Liu, D. Tao, L. Lin and S. Zhang (2010). "Differential effect of specific gr/gr deletion subtypes on spermatogenesis in the Chinese Han population." Int J Androl **33**(5): 745-754.

- Referencias Bibliográficas -

Yang, Y., M. Ma, L. Li, W. Zhang, P. Chen, Y. Ma, Y. Liu, D. Tao, L. Lin and S. Zhang (2008). "Y chromosome haplogroups may confer susceptibility to partial AZFc deletions and deletion effect on spermatogenesis impairment." Hum Reprod **23**(9): 2167-2172.

Yang, Y., M. Ma, L. Li, W. Zhang, C. Xiao, S. Li, Y. Ma, D. Tao, Y. Liu, L. Lin and S. Zhang (2008). "Evidence for the association of Y-chromosome haplogroups with susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese Han population." J Med Genet **45**(4): 210-215.

YCC (2002). "A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups." Genome Res **12**(2): 339-348.

Ye, J. J., L. Ma, L. J. Yang, J. H. Wang, Y. L. Wang, H. Guo, N. Gong, W. H. Nie and S. H. Zhao (2013). "Partial AZFc duplications not deletions are associated with male infertility in the Yi population of Yunnan Province, China." J Zhejiang Univ Sci B **14**(9): 807-815.

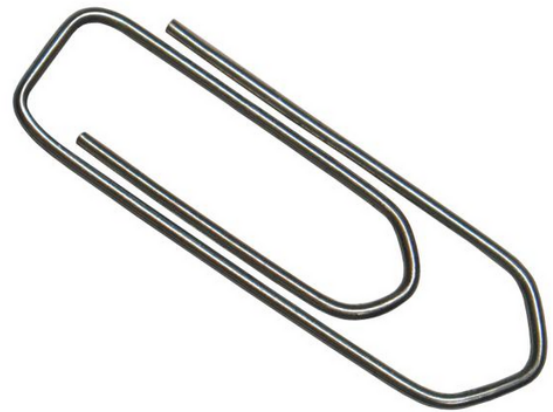
Zhang, F., Z. Li, B. Wen, J. Jiang, M. Shao, Y. Zhao, Y. He, X. Song, J. Qian, D. Lu and L. Jin (2006). "A frequent partial AZFc deletion does not render an increased risk of spermatogenic impairment in East Asians." Ann Hum Genet **70**(Pt 3): 304-313.

Zhang, F., C. Lu, Z. Li, P. Xie, Y. Xia, X. Zhu, B. Wu, X. Cai, X. Wang, J. Qian, X. Wang and L. Jin (2007). "Partial deletions are associated with an increased risk of complete deletion in AZFc: a new insight into the role of partial AZFc deletions in male infertility." J Med Genet **44**(7): 437-444.

Zuccarelli, G., E. Alechine, M. Caputo, C. Bobillo, D. Corach and A. Sala (2011). "Rapid screening for Native American mitochondrial and Y-chromosome haplogroups detection in routine DNA analysis." Forensic Sci Int Genet **5**(2): 105-108.

- Referencias Bibliográficas -

Anexos



ANEXOS

ANEXO I: Protocolos

1. Extracción de ADN a partir de sangre en papel de filtro o hisopados bucales

La extracción se realizó mediante el sistema semi-automatizado Maxwell® , según el siguiente protocolo:

- a. Se cortaron 4-5 círculos de aprox. 1mm de diámetro o media cabeza de hisopo y se incubó en presencia de 500µl de TEC-SDS 0,5% y 20µl de Proteinasa K a 56°C durante toda la noche en baño termostatizado con agitación.
- b. Se agregaron 250µl de Buffer de Lisis (provisto con el kit), se homogenizó mediante vórtex y se depositó en los cartuchos provistos. En el tubo de elución se colocaron 50µl de Buffer de Elusión (provisto).
- c. Se colocó el cartucho en el equipo según las indicaciones del fabricante y se procede a la extracción automatizada.

2. Extracción de ADN a partir de semen en papel de filtro/hisopo

Ídem punto 1. En el paso *a* se agregaron 50µl de DTT 1M.

3. Extracción de ADN a partir de semen de pacientes azoospermicos

La extracción se realizó mediante columnas de Microcon® 100, según el siguiente protocolo:

- a. Se cortaron 4-5 círculos de aprox. 1mm de diámetro o media cabeza de hisopo y se incubó en presencia de 500µl de TEC-SDS 2%, 20µl de Proteinasa K y 50µl de DTT 1M, a 56°C durante toda la noche en baño termostatizado con agitación.
- b. Se retiró el papel o hisopo y se realizó extracción orgánica con Fenol:Cloroformo:Isoamilico. Se agregó 1 volumen de Fenol:Cloroformo y se homogenizó por agitación. Se centrifugó a 11000rpm durante 10 min. Se descartó la fase orgánica.

- c. Se agregó 1 volumen de Cloroformo:Isoamilico y se homogeneizó por agitación. Se centrifugó a 11000rpm durante 10 min. Se descartó la fase orgánica.
- d. Se repitió el paso c.
- e. La fase acuosa se colocó sobre la membrana de un tubo Microcon® 100 y se centrifugó a 500g durante 25min.
- f. Se colocaron 500µl de agua destilada sobre la membrana y se repitió la centrifugación del punto e.
- g. Se repitió el paso f.
- h. Se colocaron 30µl de agua destilada sobre la membrana, se dio vuelta la misma y se centrifugó a 500g durante 20min, recuperando el eluído en un tubo nuevo.

4. Extracción de ADN a partir de saliva

La extracción de saliva se realizó empleando el protocolo de “Salting out” descrito por Quinque *et al* (2006). La recolección de la muestra de saliva se realizó directamente sobre el Buffer de Lisis (50mM Tris, pH 8.0, 50mM EDTA, 50mM sacarosa, 100mM NaCl, 1% SDS) en una proporción 1:1. Se agregaron 30µl de Proteinasa K y 150µl de SDS 10% a 2ml de la mezcla saliva/buffer de lisis, y fue incubada durante toda la noche a 53°C en un baño termostatzado con agitación. Luego del agregado de 400µl de NaCl 5M e incubación por 10 min sobre hielo, la mezcla se distribuyó de manera equitativa en tubos de 2 ml y se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm. El sobrenadante de cada tubo se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 800 µl de Isopropanol, incubándose durante 10 min a temperatura ambiente, y luego centrifugando durante 15min a 13000rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 500µl de Etanol 70%. Finalmente el pellet se secó y se resuspendió en 30µl de agua destilada.

5. Cuantificación de ADN mediante el sistema Plexor® HY

La cuantificación del ADN extraído a partir de muestras de sangre o hisopado bucal se llevó a cabo siguiendo el protocolo del sistema comercial Plexor® HY. Cada reacción de PCR se preparó con 10µl de Master Mix, 1µl de Primer Mix, 7µl de agua destilada y 2µl de muestra. La reacción de PCR en Tiempo Real se llevó a cabo en un termociclador

Rotor-Gene 6000. En cada tanda de amplificación se incluyó una curva de muestras de concentración conocida, un control positivo y un control negativo.

6. Cuantificación de ADN mediante el sistema Quantifiler® Human

La cuantificación del ADN extraído a partir de muestras de semen y saliva se llevó a cabo siguiendo el protocolo del sistema comercial Quantifiler® Human. Cada reacción de PCR se preparó con 12.5µl de Master Mix, 10.5µl de Primer Mix y 2µl de muestra. La reacción de PCR en Tiempo Real se llevó a cabo en un termociclador Rotor-Gene 6000. En cada tanda de amplificación se incluyó una curva de muestras de concentración conocida, un control positivo y un control negativo.

7. Análisis de STRs autosómicos

El análisis de STRs autosómicos para determinación de vínculos de paternidad se llevó a cabo mediante el sistema comercial PowerPlex® 16. Dicho sistema incluye 15 STRs autosómicos (CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX y VWA) y el marcador de sexo Amelogenina. La amplificación se realizó según las indicaciones del fabricante, con la única modificación de la disminución del volumen de reacción a la mitad. Todas las reacciones se llevaron a cabo en multiplex con 2µl de Master Mix, 1µl de Primer Mix y 1µl de ADN templado (0.5-2ng/µl) en un volumen final de reacción de 10µl. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes 95°C 1 min, 10 ciclos de 94°C 30seg – 60°C 30seg (rampa 29%) – 70°C 45seg (rampa 23%) y 22 ciclos de 90°C 30seg – 60°C 30seg (rampa 29%) – 70°C 45seg (rampa 23%). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700. El producto de amplificación se desnaturalizó en 9,5µl de Formamida y 0,5µl de marcador de peso molecular ILS 600 y se separó electroforéticamente en un secuenciador automático ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (capilar de 36cm, polímero POP4, voltaje de corrida 15kV y tiempo de corrida 1200 seg). El análisis de los resultados se realizó mediante el programa GeneMapper® ID-X v1.1.1.

8. Análisis de los Hgs Q, R e I

La determinación de los Hgs Q1a2a1a1, R1b1a2 e I se realizó mediante el análisis de los SNPs que determinan dichos Hgs (M3, M269 y U179 respectivamente) empleando la técnica de PCR en Tiempo Real seguida de Desnaturalización Térmica de Alta Resolución. Esta técnica fue desarrollada para el presente trabajo y oportunamente publicada (ver anexo II) (Zuccarelli *et al* 2011). La reacción se llevó a cabo con 5µl de Buffer 5X, 0.2µl de dNTPs, 0.75µl de SYTO 9, 0.4µl de Taq polimerasa, primers (según Tabla I), 2µl de ADN templado y agua c.s.p. 25µl. El perfil de ciclado fue el siguiente: 94°C 1min, 33 ciclos de 94°C 5seg - 55°C 10seg, y 72°C 2min de extensión final. La desnaturalización se realizó entre 70°C y 80°C a 0.2°C/2seg.

9. Análisis de los Hgs J, G y E

La determinación de los Hgs J2, G2a y E1b1b se realizó mediante el análisis en múltiplex de los SNPs M172, P15 y M35 respectivamente. La reacción se llevó a cabo con 5µl de Buffer 5X, 0.2µl de dNTPs, 0.75µl de SYTO 9, 0.4 de MgCl₂, 0.4µl de Taq polimerasa, primers (según Tabla I), 2µl de ADN templado y agua c.s.p. 25µl. El perfil de ciclado fue el siguiente: 94°C 1min, 35 ciclos de 95°C 20seg - 55°C 20seg - 72°C 20seg, y 72°C 2min de extensión final. La desnaturalización se realizó entre 73°C y 84°C a 0.2°C/2seg.

10. Análisis de los Hgs Q, Q1b1 y Q1a1a1

El análisis de marcadores adicionales de diferentes ramas del Hg Q se llevó a cabo mediante reacción simplex. Se analizaron los siguientes Hgs y sub-Hgs mediante los respectivos marcadores: Q (M242), Q1b1 (M378) y Q1a1a1 (M120). La reacción de amplificación se llevó a cabo con 5µl de Buffer 5X, 0.2µl de dNTPs, 0.75µl de SYTO 9, 0.4µl de MgCl₂, 0.4µl de Taq polimerasa, primers (según Tabla I), 2µl de ADN templado y agua c.s.p. 25µl. El perfil de ciclado fue el siguiente: 94°C 1min, 40 ciclos de 94°C 10seg - 54°C 20seg, y 72°C 2min de extensión final. Post-amplificación, los marcadores M242 y M378 se analizaron mediante HRM entre 69°C y 81°C a 0.2°C/2seg. El marcador M120 se analizó mediante secuenciación con primers forward y reverse, debido a su mayor tamaño y ausencia de controles para ambas variantes alélicas (ver punto 19).

11. Análisis de STRs de cromosoma Y

Se analizaron STRs de cromosoma Y mediante los kits comerciales PowerPlex® Y23 o AmpFLSTR® Yfiler®, según disponibilidad. El primer kit incluye un total de 23 STRs, mientras que el segundo incluye 17 STRs. Para la preparación de la reacción, amplificación y electroforesis capilar se siguieron los protocolos provistos por el fabricante. La reacción de amplificación se llevó a cabo de la siguiente manera según el kit utilizado:

- **PowerPlex® Y23:** 2.5µl de Master Mix, 1.25µl de Primer Mix, 1µl de ADN templado (0.25-0.5ng/µl) y agua c.s.p. 12.5µl. El perfil de ciclado fue 96 °C 2min, 30 ciclos de 94 °C 10 seg - 61 °C 1 min - 72 °C 30 seg, y 60 °C 20 min de extensión final.
- **AmpFLSTR® Yfiler®:** 4.6µl de Master Mix, 2.5µl de Primer Mix, 0.4µl de Taq Gold, 1µl de ADN templado (aprox 1ng/µl) y agua c.s.p. 12.5µl. El perfil de ciclado fue 95°C 11min, 30 ciclos de 94 °C 1min - 61 °C 1 min - 72 °C 30 seg, y 60 °C 80 min de extensión final.

La amplificación de ambos sistemas se realizó en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700. La electroforesis capilar se llevo a cabo en el secuenciador automático ABI 3100-*Avant* o 3500 Genetic Analyzers. Para el análisis de las corridas electroforéticas se utilizó el programa informático provisto por el fabricante del secuenciador, GeneMapper® ID-X v1.2. La asignación de alelos se realizó utilizando los paneles de análisis provistos por el fabricante del kit.

12. Análisis de microdeleciones clásicas en la región AZF

Las microdeleciones clásicas de las regiones AZFa, AZFb y AZFc se analizaron mediante la adaptación para PCR en Tiempo Real del protocolo sugerido por la EAA/EMQN (Kozina *et al* 2011). Se analizaron los marcadores sY85 (AZFa), sY127 (AZFb), sY255 (AZFc) y AMELxy (control interno), cuyas secuencias se describen en la Tabla I. La reacción se modificó para el empleo de SYTO® 9 como colorante intercalar. La reacción de amplificación se llevó a cabo con 5µl de Buffer 5X, 0.2µl de dNTPs, 0.75µl de SYTO 9, 0.4µl de Taq polimerasa, primers (según Tabla I), 2µl de ADN templado y agua c.s.p.

25µl. La amplificación se realizó en un ciclador Rotor-Gene 6000 según las siguientes condiciones de ciclado: 1 minuto a 95°C, 32 ciclos de 94°C 10 seg, 60°C 30 seg y 72°C 30 seg, seguido de una rampa de temperatura entre 72,5°C y 83.5°C 30 a 0,2°C/2 seg para el análisis de HRM.

13. Análisis de microdeleciones parciales en la región AZFc

Para el análisis de microdeleciones parciales en la región AZFc se desarrolló un protocolo para la determinación simultánea de 7 marcadores STSs localizados en dicha región mediante PCR seguida de Electroforesis Capilar. La amplificación de Y-STSs se realizó mediante PCR múltiplex con primers unidos a M13 y primers complementarios a M13 marcados con el colorante fluorescente FAM™, según descrito previamente (Oklander *et al* 2007). Los marcadores que se analizaron fueron: sY142, sY1197, sY1191, sY1201, sY1206, sY1261 y sY1291. La reacción de amplificación se llevó a cabo mediante el sistema comercial QIAGEN Multiplex PCR kit según el siguiente protocolo: 12,5µl de Master Mix, primers (según Tabla I), 2µl de ADN templado y agua (c.s.p. 25µl). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 15 minutos a 95°C, 30 ciclos de 95°C 30 seg, 60°C 30 seg y 72°C 30 seg, y 8 ciclos de 95°C 30 seg, 53°C 30 seg y 72°C 30 seg, seguido de 30 min de extensión a 72°C. La amplificación se realizó en un termociclador Verity® Thermal Cyclor, y la separación electroforética/detección de los fragmentos de amplificación se llevó a cabo mediante un secuenciador automático ABI 3100 *Avant* o ABI 3500 Genetic Analyzer. El análisis de los resultados se realizó mediante el software GeneMapper® ID-X.

14. Identificación de genes en la región AZFc

Para analizar la presencia/ausencia de genes localizados en la región AZFc se desarrolló el siguiente protocolo para PCR en Tiempo Real seguido de HRM que fue oportunamente publicado (Alechine y Corach 2014). Esta técnica permitió evidenciar la presencia de los genes *DAZ*, *CDY*, *BPY2*, *PRY*, *GOLGA2LY* y *CSGP4LY*. La amplificación se realizó en formato multiplex con primers para los genes arriba mencionados, además de la amplificación de AMELxy y SRY como controles internos de la reacción. La reacción de amplificación se llevó a cabo con 5µl de Buffer 5X, 0.2µl de dNTPs, 0.75µl de SYTO 9, 0.4µl de Taq

polimerasa, primers (según Tabla I), 2µl de ADN templado y agua c.s.p. 25µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Rotor-Gene 6000. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 1 min seguida de 30 ciclos de 94 °C 10 s/ 62 °C 30 s/ 72 °C 30 s. Luego de la amplificación, se realizó una curva de HRM entre 74 °C y 91 °C a 0.2 °C/s.

15. Cuantificación del número de copias de *DAZ*, *CDY* y *CDY1*

La cuantificación del número de copias de *DAZ*, *CDY* y *CDY1* se realizó mediante PCR en Tiempo Real. Se utilizó el gen SRY como referencia de gen de copia única. La reacción de amplificación se llevó a cabo en formato simplex con 5µl de Buffer 5X, 0.2µl de dNTPs, 0.75µl de SYTO® 9, 0.4µl de Taq polimerasa, primers (según Tabla I), 2µl de ADN templado y agua c.s.p. 25µl. Todas las muestras se analizaron en duplicado y una muestra control o calibrador fue incluida en cada tanda de amplificación. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 1 min seguido de 30 ciclos de 94 °C 10 s/ 62 °C 30 s/ 72 °C 30 s. Todas las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador StepOnePlus™. Los cálculos de número de copias se realizaron mediante el programa del equipo, empleando el método Delta Delta Ct (Livak 2001).

16. Identificación de variantes de *DAZ* y *CDY*

Para identificar las copias de los genes *DAZ* y *CDY* se analizaron los siguientes SNPs: sY587 (diferencia *DAZ1/2* de *DAZ3/4*), SNV-I (diferencia *DAZ4*) y SNV-II (diferencia *DAZ1*) para la familia de genes *DAZ*, y CDY1-7750 (diferencia *CDY1A* de *CDY1B*) y CDY1/2 (diferencia *CDY1* de *CDY2*) para la familia de genes *CDY*. La reacción se llevó a cabo con 5µl de Buffer 5X, 0.2µl de dNTPs, 0.75µl de SYTO 9, 0.4µl de Taq polimerasa, primers (según Tabla I), 2µl de ADN templado y agua c.s.p. 25µl.

16.1. Identificación de SNPs de *DAZ* y *CDY* mediante RFLP

Para el análisis de sY587, CDY1-7750 y CDY1/2, luego de la amplificación, los productos se digirieron con enzimas de restricción: sY587 con *DraI*, CDY1-7750 con *PvuII* y CDY1/2

con *BstEII*, y los productos se separaron mediante electroforesis en gel de Agarosa al 4%, en presencia de Bromuro de Etidio, durante 2h a 80 V. Se utilizó un marcador de peso molecular de 25 pb.

16.2. Identificación de SNPs de *DAZ* y *CDY* mediante secuenciación

Para el análisis de *SNVI* y *SNVII*, luego de la amplificación, los productos se secuenciaron con primers forward y reverse (ver punto 19).

17. Análisis del STR DYS464

Para la amplificación del STR DYS464 se desarrolló un sistema con primers unidos a colas de M13 y primers complementarios a M13 marcados con el colorante fluorescente FAM. Las secuencias de los primers empleados se detallan en la Tabla I. La reacción se llevó a cabo utilizando el sistema comercial QIAGEN Multiplex PCR kit según el siguiente protocolo: 12,5µl de Master Mix, 10pmol de primer forward, 40pmol de primer reverse, 10pmol de primer M13 marcado y agua (c.s.p. 25µl). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Verity® Thermal Cycler siguiendo el siguiente perfil de ciclado: 95°C 15 min, 30 ciclos de 95°C 30 seg – 60°C 30 seg - 72°C 30 seg, 8 ciclos de 95°C 30 seg – 53°C 30 seg – 72°C 30 seg, y 72°C 30 min de extensión final. El producto de amplificación se desnaturalizó con 9,5µl de Formamida y 0,5µl de marcador de peso molecular ILS 600 y se separó electroforéticamente en un secuenciador automático ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (capilar de 36cm, polímero POP4, voltaje de corrida 15kV y tiempo de corrida 1200 seg). El análisis de los resultados se realizó mediante el programa GeneMapper® ID-X.

18. Análisis de RM-STRs del cromosoma Y

El análisis de los marcadores RM-STRs de cromosoma Y se realizó siguiendo el protocolo de (Ballantyne *et al* 2012). La amplificación se llevó a cabo mediante el sistema comercial QIAGEN® Multiplex PCR kit en 3 reacciones en multiplex: RM1, RM2 y RM3 (Tabla 18), según el siguiente protocolo: 5µl de Master Mix, primers (según Tabla I) y agua (c.s.p. 10µl). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Verity® Thermal

Cycler siguiendo el siguiente perfil de ciclado: 94 °C 10 min, 10 ciclos de 94 °C 30 seg – 65 °C 30 seg - 72 °C 1 min, 25 ciclos de 94 °C 30 seg – 50 °C 30 seg – 72 1 min, y 60 °C 45 min de extensión final. El producto de amplificación se desnaturalizó en 9,5µl de Formamida y 0,5µl de marcador de peso molecular ILS 600 y se separó electroforéticamente en un secuenciador automático ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (capilar de 36 cm, polímero POP4, voltaje de corrida 15kV y tiempo de corrida 1200 seg). El análisis de los resultados se realizó mediante el programa GeneMapper® ID-X.

Tabla 18. Volumen utilizado y marcadores incluidos en las mezclas de primers.

RM1	RM2	RM3
1.1µl	1µl	2.625µl
DYF399S1	DYS518	DYF403-S1a+b
DYF387S1	DYS526a+b	DYF404S1
DYS570	DYS626	DYS449
DYS576	DYS627	DYS547
		DYS612

19. Secuenciación

Previo a la secuenciación de los productos de amplificación, los mismos se trataron con Illustra™ ExoStar o ExoSAP-IT con el objetivo de digerir el exceso de primers en la reacción. La secuenciación se llevó a cabo con primers forward y reverse mediante el kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing v3.1, siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador ABI 9700. La purificación de las secuencias se realizó mediante precipitación con Isopropanol 75%/Etanol 70%. Brevemente, el volumen total de la reacción de secuencia se incubó durante 20 min con 80 µL de Isopropanol 75%, se centrifugó a velocidad máxima durante 18 min y se descarto el sobrenadante con pipeta. Luego se agregaron 300 µL de Etanol 70% y se centrifugó a velocidad máxima por 5 min, se decantó la totalidad del sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco, se agregaron 22 µL de Formamida, resuspendiendo mediante vortex durante 1 min, y se traspasó a un tubo de 200 µL para su posterior desnaturalización (3 min a 95 C). La electroforesis capilar se llevó a cabo en un equipo ABI3500 o ABI3100 Genetic Analyzer. Los electroferogramas se analizaron empleando el programa Sequencher v4.8 software. Las secuencias se identificaron mediante alineamiento con la secuencia de referencia del cromosoma Y en GenBank.

Tabla I. Secuencias de los primers empleados

Marcador	Primer F	Conc. (pmol)	Primer R	Conc. (pmol)
M3	CCTGACAATGGGTCACCTCT	20	TTCATTTTAGGTACCAGCTCTTCC	20
M269	AAGGGGAATGATCAGGGTTT	15	GCCCGGCCACTATACTTCTT	30
U179	GGCTGTAATTCATAGCCTACCA	10	GTTGCCAGCTCCTCTTTTCA	10
P15	GAATAGAGGCAATGCTTGAGGT	15	TATGGGAATCACTTTTGCAACT	15
M35	CCTGATAATTACTCAGGAGGAAACTG	20	ACTAAGGAGCTGTGGTGAATG	20
M172	CACCTGCCTCTCAGTATCAACAG	10	GCCAGGTACAGAGAAAGTTGG	10
M242	CATAGAAAGTTTGTGCAAAAAGGT	10	AAAAACACGTTAAGACCAATGC	10
M378	TCAAATTTGTGACACTGCAATAGTT	10	GAAAAACCTCAGTTGATACTGGA	10
M120	GAGCTTGGACTTTAGGACGG	10	AACTTTAAGGCACTTCTGGC	10
sY85	GCTATTCCTCTCTGGCATCTGTATT	80	TGGCAATTTGCCTATGAAGT	80
sY127	GGCTCACAAACGAAAAGAAA	30	CTGCAGGCAGTAATAAGGGA	30
sY255	GTTACAGGATTCGGCGTGAT	10	CTCGTCATGTGCAGCCAC	10
AMELxy	ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG	10	CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG	10
sY142	ACATTTTGCTGCCGGTCA- AGCTTCTATTTCGAGGGCTTC	1.875	CTCTCTGCAATCCCTGACAT	7.5
sY1197	ACATTTTGCTGCCGGTCA- TCATTTGTGTCCTTCTCTTGGGA	5	CTAAGCCAGGAACCTTGCCAC	20
sY1191	ACATTTTGCTGCCGGTCA- CCAGACGTTCTACCCTTTCG	2.5	GAGCCGAGATCCAGTTACCA	10
sY1201	ACATTTTGCTGCCGGTCA- CCGACTTCACAATGGCT	7	CCGGCTAAAAACGGTGAAAC	28
sY1206	ACATTTTGCTGCCGGTCA- ATTGATCTCCTTGGTTCCCC	3.125	GACATGTGTGGCAATTTGA	12.5
sY1261	ACATTTTGCTGCCGGTCA- AAGGAGCTTGCCCTCATAACAATG	5	TTAGAGCTTGCAAGAAGAGTCTAGTAC	20
sY1291	ACATTTTGCTGCCGGTCA- TAAAAGGCAGAACTGCCAGG	7	AGACCATCCCGGCTAAAAAC	28
M13	FAM-ACATTTTGCTGCCGGTCA			10
DAZ	TCTGTGCCTGCCTCTCTGTA	15.5	GCCTTATCCTCGGTTTTTCTT	15.5
CDY	TGGAGAGGTTTCAGGCACATG	13.5	TCCAGCTCTTACCAGGTTTC	13.5
BPY2	GGCAAGGTTCTCCTTATCC	9	CACTTTCGAGGTTGGAAGGA	9
PRY	GCTGCCTCCTCTCATCTGTC	13.5	TGGAAACTTCATCCAGAGG	13.5
CSPG4LY	AGGCTGATGTTGGAGGATTG	9	TCATGCCAAGAAGACACCTG	9
SRY	GCCACACACTCAAGAATGGA	15.6	CCAATGTTACCGATTGTCC	15.6
GOLGA2LY	AGCCTTTTCTTGTGGAGGT	9	GTGGACTCTGAGCCTCTTGG	9
CDY1-7750	CGTGCTAACTCTGAATGCTTTTT	15.6	TTCATATTGCTCTTATTCAAAGTGCT	15.6
sY587	AAGTTGTGCAACCATGTCCA	10	CACAAGTTCCAGGAAAATAGCA	10
SNVI	ACGGCATAACCTGCGTACT	10	GTATCGGCCTGAGCCAATG	10
SNVII	CCATCATAACAGTACGTGGTTTCAG	10	GGATCTGTCATGTACATCTTAGCAA	10
CDY1/2	CGCACAAATTTTCACTACACCA	10	GTTTCAGTTGCGTCTCCACA	10
DYS464	ACATTTTGCTGCCGGTCA- TTACGAGCTTTGGGCTATG	10	CCTGGGTAACAGAGAGACTCTT	40

Tabla II. Reactivos, sistemas comerciales y equipos empleados

Reactivo	Proveedor
Tris Base	Promega Corp, Madison, USA
EDTA 0,5M pH=8.0	Promega Corp, Madison, USA
Ultra Pute™ SDS (dodecil sulfato de sodio)	Life Technologies, Foster City, USA
Proteinasa K	Promega Corp, Madison, USA
Fenol:Cloroformo:Isoamílico	Life Technologies, Foster City, USA
Cloroformo	Merck, Darmstadt, Alemania
Alcohol Isoamílico	Biopack, Buenos Aires, Argentina
DTT (ditiotreitól)	Promega Corp, Madison, USA
Etanol	Carlo Erba Reagents Group, Francia
Isopropanol	Carlo Erba Reagents Group, Francia
SYTO 9	Life Technologies, Foster City, USA

Buffer 5X	Promega Corp, Madison, USA
dNTPs	Promega Corp, Madison, USA
Taq Polimerasa	Promega Corp, Madison, USA
Primers	Integrated DNA Technologies, Inc.
Hi-Di Formamida	Life Technologies, Foster City, USA
DraI	Promega Corp, Madison, USA
PvuII	Promega Corp, Madison, USA
BstEII	Promega Corp, Madison, USA
Agarosa	Biodynamics, Buenos Aires, Argentina
Bromuro de Editio	Life Technologies, Foster City, USA
Illustra Exo Star	VWR International, LLC
ExoSAP-IT	Affymetrix, Inc

Sistema comercial	Proveedor
Maxwell® 16	Promega Corp, Madison, USA
Microcon®	Merck Millipore, Darmstadt, Alemania
Plexor® HY	Promega Corp, Madison, USA
Quantifiler® Human	Life Technologies, Foster City, USA
Qiagen® Multiplex PCR kit	QIAGEN, Hilden, Alemania
PowerPlex® 16	Promega Corp, Madison, USA
AmpFLSTR® Yfiler®	Life Technologies, Foster City, USA
PowerPlex® Y23	Promega Corp, Madison, USA
SYBR® Green Quantitec CPR kit	QIAGEN, Hilden, Alemania
Mezcla Real®	Biodynamics, Buenos Aires, Argentina
BigDye® Terminator Cycle Sequencing v3.1	Life Technologies, Foster City, USA

Equipo	Proveedor
Maxwell®	Promega Corp, Madison, USA
Rotor-Gene 6000	Corbett Life Sciences, Sydney, Australia
GeneAmp® PCR System	Life Technologies, Foster City, USA
Verity® Thermal Cycler	Life Technologies, Foster City, USA
3100-Avant Genetic Analyzer	Life Technologies, Foster City, USA
3500 Genetic Analyzer	Life Technologies, Foster City, USA
StepOnePlus™	Life Technologies, Foster City, USA

Tabla III. Programas bioinformáticos empleados

Programas	Proveedor o dirección web
GeneMapper® ID-X	Life Technologies, Foster City, USA
Sequencher v4.8	Gene Codes Corporation, USA
Rotor-Gene software	QIAGEN, Hilden, Alemania
StepOne software	Life Technologies, Foster City, USA
Primer3	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0
USCS in-silico PCR	http://genome.csdb.cn/cgi-bin/hgPcr
Oligo Calculator v3.26	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html
GraphPad	http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1
YPredictor	http://predictor.ydna.ru
Haplogroup Predictor	http://www.hprg.com/hapest5/hapest5a/hapest5.htm
Sequence Viewer v3.4	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/sviewer
MSY Breakpoint Mapper	http://breakpointmapper.wi.mit.edu/mapper.html

ANEXO II: Publicaciones

Los resultados de la presente Tesis de Doctorado fueron incluidos parcialmente en las siguientes publicaciones en revistas internacionales con referato y presentaciones a congresos nacionales e internacionales:

PUBLICACIONES

- (1) **Alechine E** and Corach D. *High-throughput screening for spermatogenesis candidate genes in the AZFc region of the Y chromosome by multiplex Real Time PCR followed by High Resolution Melting analysis*. PLoS ONE. 2014 May 14;9(5):e97227.
- (2) Roewer L, Nothnagel M, Gusmão L, Gomes V, González M, Corach D, Sala A, **Alechine E**, Palha T, Santos N, Ribeiro-Dos-Santos A, Geppert M, Willuweit S, Nagy M, Zweynert S, Baeta M, Núñez C, Martínez-Jarreta B, González-Andrade F, Fagundes de Carvalho E, da Silva DA, Builes JJ, Turbón D, Lopez Parra AM, Arroyo-Pardo E, Toscanini U, Borjas L, Barletta C, Ewart E, Santos S, Krawczak M. *Continent-wide decoupling of Y-chromosomal genetic variation from language and geography in native South Americans*. PLoS Genet. 2013 Apr;9(4):e1003460.
- (3) Greve G, **Alechine E**, Pasantes JJ, Hodler C, Rietschel W, Robinson TJ, Schempp W. *Y-Chromosome variation in hominids: intraspecific variation is limited to the polygamous chimpanzee*. PLoS One. 2011;6(12):e29311.
- (4) Zuccarelli G*, **Alechine E***, Caputo M, Bobillo C, Corach D, Sala A. *Rapid screening for Native American mitochondrial and Y-chromosome haplogroups detection in routine DNA analysis*. Forensic Sci Int Genet. 2011 Mar; 5(2):105-8.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- (1) **Alechine E**, Mendeluk G, Cohen M, Fulco F, Corach D. *Prevalencia y Efecto de Microdeleciones en la Región AZF en la Población Argentina: su Valor Predictivo Sobre la Recuperación Espermática*. XVI Congreso Argentino de Medicina Reproductiva. Buenos Aires, Argentina. 11-14 de Noviembre de 2014.
- (2) **Alechine E** and Corach D. *New Strategy For A Rapid And High-Throughput Assessment Of AZFc Spermatogenesis Candidate Genes Based On Real Time PCR*. 5th Utah-Florence Symposium on the Genetics of Male Infertility. Florence, Italy. September 19-21st 2013.
- (3) **Alechine E** and Corach D. *Native American Haplogroup Q-M3 Might Protect Against AZFc Microdeletions*. 5th Utah-Florence Symposium on the Genetics of Male Infertility. Florence, Italy. September 19-21st 2013.
- (4) Sala A, Bobillo C, Caputo M, Martí MC, **Alechine E**, Corach D. *Native American Y-STR Haplotyping: Its Forensic Relevance In Argentina*. 25th World Congress of the International Society for Forensic Genetics (ISFG). Melbourne, Australia. September 2-7th 2013.
- (5) **Alechine E**, Repetto H, Sardi-Segovia M, Ariagno J, Curi S, Palaoro L, Mendeluk G, Corach D. *Microdeletions in the AZF region of the Y chromosome associated to male infertility*. LVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Argentina. November 14-17th 2012.

- (6) **Alechine E**, Corach D. *Novel Y Chromosome Polymorphisms In Native American Haplogroup Q1a3a1*. DNA in Forensics 2012. Innsbruck, Austria. September 6-8th 2012.
- (7) Caputo M, Bobillo MC, **Alechine E**, Sala A, Corach D. *Evaluation Of Haplogroup Predicting Softwares*. DNA in Forensics 2012. Innsbruck, Austria. September 6-8th 2012.
- (8) Nothnagel M, Roewer L, Gusmao L, Gomes V, Gonzalez M, Corach D, Sala A, **Alechine E**, Palha T, Santos N, Ribeiro-dos-Santos A, Geppert M, Willuweit S, Nagy M, Zweynert S, Baeta M, Nuñez C, Martinez-Jarreta B, Gonzalez-Andrade F, Fagundes de Carvalho E, Aparecida da Silva D, Jose Builes J, Turbon D, Lopez Parra AM, Arroyo-Pardo E, Toscanini U, Borjas L, Barletta C, Ewart E, Santos S, Krawczak M. *Continent-Wide Decoupling Of Y-Chromosomal Genetic Variation From Language And Geography In Native South Americans*. DNA in Forensics 2012. Innsbruck, Austria. September 6-8th 2012.
- (9) Roewer L, Nothnagel M, Gusmao L, Gomes V, Gonzalez M, Corach D, Sala A, **Alechine E**, Palha T, Santos N, Ribeiro-dos-Santos A, Geppert M, Willuweit S, Nagy M, Zweynert S, Baeta M, Nuñez C, Martinez-Jarreta B, Gonzalez-Andrade F, Fagundes de Carvalho E, Aparecida da Silva D, Jose Builes J, Turbon D, Lopez Parra AM, Arroyo-Pardo E, Toscanini U, Borjas L, Barletta C, Ewart E, Santos S, Krawczak M. *Identification Of A Novel Native American Y Chromosome Founding Lineage In Northwest South America*. DNA in Forensics 2012. Innsbruck, Austria. September 6-8th 2012.
- (10) **Alechine E**. *The Argentinean Y Chromosome: Origins And Male Infertility*. 3rd IMBS Symposium Part B of the International Master Program in Biomedical Sciences. Freiburg, Germany. 27 de October 27th 2010.
- (11) Zuccarelli G, **Alechine E**, Caputo M, Bobillo C, Corach D and Sala A. *Rapid Screening For Mitochondrial And Y-Chromosome Haplogroups In Routine Dna Analysis*. Haploid DNA Markers in Forensic Genetics (YHRD Workshop). Berlin, Germany. April 22-24th 2010.

SEMINARIOS DICTADOS

- (1) Seminario del Departamento de Química Biológica – Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA – *“Análisis de microdeleciones del cromosoma Y en la población argentina y su posible asociación con infertilidad masculina”* – 25 de Julio de 2014
- (2) Seminario en el Area de Citología del Departamento de Bioquímica Clínica – Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA – *“Microdeleciones en la región AZF del cromosoma Y asociadas a infertilidad masculina”* – 15 de Mayo de 2013
- (3) Seminario del Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología – Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA – *“Polimorfismos estructurales del cromosoma Y en humanos y otros homínidos”* – 14 de Julio de 2011
- (4) Journal Club del Instituto de Genética Humana – Universidad de Freiburg, Alemania – *“Population Genetics in Argentina”* – 19 de Noviembre de 2010