

Aspectos moleculares de la azoospermia

Molecular aspects of the azoospermia

Dr. Rey Valzacchi, Gastón

La potencialidad reproductiva de los pacientes azoospermicos ha profundizado la identificación de factores genéticos en estos pacientes a fin de poder tener un diagnóstico etiológico más claro y sobre esta base poder comunicar posibles riesgos genéticos en la descendencia. Si bien se conoce desde hace años que aproximadamente el 10 a 15% de los hombres con azoospermia no obstructiva presentan alguna alteración cromosómica⁽¹⁾, poco era conocido sobre alteraciones génicas. Actualmente se conocen genes que participan en la espermatogénesis, en la formación de la vía espermática, en la diferenciación testicular, y en la regulación hormonal de la espermatogénesis. Actualmente muchos de estos genes pueden ser evaluados, pudiendo identificar una etiología en los trastornos reproductivos masculinos.

Genes relacionados con la espermatogénesis

Si bien desde hace muchos años se relacionó al cromosoma Y con la formación de espermatozoides, recién en 1976 Tiepolo y Zufardi utilizando técnicas de citogenética describieron en 6 hombres azoospermicos la delección de una porción del brazo largo del cromosoma Y (Yq11)⁽²⁾. Debido a que el estudio del cromosoma Y de los padres de cuatro de ellos era normal, infirieron que estas delecciones eran *de novo* y que el ADN de esa región del cromosoma Y debía llevar factores genéticos relacionados con la espermatogénesis. Esta región fue denominada AZF (Factor de la azoospermia, en inglés *Azoospermia Factor*) y recién con el advenimiento de las técnicas de biología molecular pudo ser profundizado su estudio.

Como parte del Proyecto Genoma Humano, en 1992 se mapeó parte del cromosoma Y describiéndose en esta región AZF múltiples STS (sitios conocidos de secuencia rotulados, en inglés *sequence tagged sites*)^(3,4). Estos STS corresponden a fragmentos grandes de ADN, pudiendo contener cada STS varios genes (o quizás ninguno).

El desarrollo de las técnicas de Biología Molecular, como la PCR (cadena en reacción de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*) permitió el estudio de estos STS en hombres con constitución cromosómica aparentemente normal a las técnicas citogenéticas en busca de microdelecciones. Vogt fue quien realizó uno de los estudios que incluyó mayor número de hombres, estudiando 370 pacientes infértiles y sugirió la existencia de 3 regiones dentro de AZF⁽⁵⁾. Esas regiones las llamó AZFa (proximal), AZFb (central) y AZFc (distal). Sus estudios correlacionaban las delecciones de cada una de estas regiones con la histología testicular y sugirió que la expresión de genes de AZFa se requieren para la proliferación de las células germinales, genes de AZFb para la progresión meiótica, y los genes de AZFc serían activos durante la meiosis tardía o en las espermátidas, lo que originaba que las delecciones en AZFa ocasionen un cuadro de Sertoli solo, las de AZFb una detención en espermatocito, y las de AZFc una detención en espermátida. Si bien esta nomenclatura de regiones se mantuvo, la correlación con la histología testicular no se pudo comprobar.

Si bien múltiples genes mapeados en AZF han sido propuestos como posiblemente

te relacionados con la regulación de la espermatogénesis⁽⁶⁾, (Tabla 1) solamente 2 familias de genes (RBM y DAZ) son considerados actualmente como intervinientes en este proceso.

Genes RBM

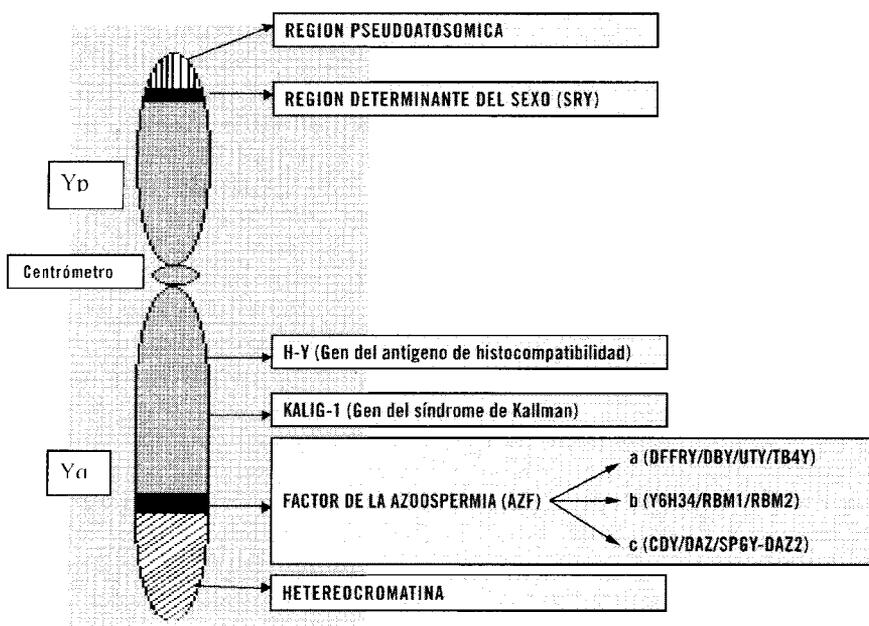
Los genes RBM (motivo de unión al ARN), RBM1 y RBM2 fueron identificados en 1993⁽⁷⁾. Aproximadamente 15 a 30 copias de estos genes están dispersas a lo largo de los brazos corto y largo del cromosoma Y⁽⁸⁾. Posiblemente muchas copias sean funcionales y otras no^(9,10). Un estudio reciente usando anticuerpos contra la proteína de RBM en testículos de hombres infértiles con deleciones del cromosoma Y, localizan las copias activas en la región AZFb⁽¹¹⁾.

El RBM produce una proteína (RBMp) que tiene expresión específica en las células germinales localizándose en sus núcleos, y que posee una secuencia de aminoácidos que une específicamente al ARN (motivo de reconocimiento del ARN) teniendo posiblemente un rol en el *splicing* del ARN⁽¹²⁾. Es posible que los genes RBM1 sean requeridos para una normal fertilidad en el hombre. Sin embargo, no es claro si la pérdida de estos genes causan infertilidad masculina. La deleción de las regiones que contienen el RBM1 se acompaña de detención temprana de la espermatogénesis a nivel de espermatocitos. El eyaculado de estos pacientes habitualmente es azoospermico, pero también se han descrito severamente oligozoospermicos. El mecanismo por el cual puede haber espermatogénesis en algunos casos no está claro.

Nomenclatura	Nombre del gen	Intervalo en Yq11
BPY2	<i>Basic protein Y</i>	AZFc
DAZ	<i>Deleted in azoospermia</i>	AZFc
DBY	<i>DEAD-box Y</i>	AZFa
PRY	<i>PTP-BL related Y</i>	AZFc
RBM	<i>RNA binding motif</i>	AZFb
SMCY	<i>Selected mouse C DNA Y</i>	AZFb
TSPY	<i>Testis specific protein Y encoded</i>	AZFb
TTY1	<i>Testis transcript Y1</i>	AZFc
TTY2	<i>Testis transcript Y2</i>	AZFc
UTY	<i>Ubiquitous transcribed Y</i>	AZFa
DFFRY	<i>Drosophila fat facets related Y</i>	AZFa
EIF1AY	<i>Essential initiation traslation factor 1A Y</i>	AZFb

Tabla 1. Genes mapeados en el cromosoma Y humano en AZFa, AZFb, AZFc.

El gen RBM parece derivar de un gen autosómico, el hnRNPG, ubicado en el cromosoma 6 con quien presenta una similitud de secuencia del 67%⁽¹³⁾. La duplicación y transposición de este gen al Y debe haber ocurrido hace más de 130 millones de años, previo a la divergencia de los marsupiales .



Genes DAZ (Deleción en azoospermia)

Inicialmente se identificó una familia de genes denominados DAZ (delecionados en azoospermia) ubicados en la región AZFc, constituido por un número de 6 a 10 copias⁽¹⁴⁾. Otra familia de genes inicialmente denominados SPGY (genes de la espermatogénesis en el Y, del inglés *spermatogenesis gene on the Y*)⁽¹⁵⁾, se sabe actualmente que forman parte de la familia de genes DAZ, y por lo tanto el DAZ actualmente se denomina DAZ1, y al SPGY, DAZ2⁽¹⁶⁾.

A diferencia de los genes RBM que están dispersos por el cromosoma Y, los genes DAZ mapean todos en la región AZFc (se encuentran agrupados), por lo que la deleción de todas sus copias es más factible. Mientras que el 6 al 13% de los hombres infértiles presentan deleción de DAZ, esta situación no se observa en hombres fértiles, apoyando su posible rol en la esterilidad^(17,18). Asimismo la disrupción en modelos animales de genes relacionados con el DAZ (denominados DAZL de *DAZ like*) ocasiona infertilidad⁽¹⁹⁾.

Así como el RBM, el DAZ parece haber evolucionado de un gen autosómico. El DAZ tiene una similitud de secuencia del 89% respecto del DAZL que se ubica en el cromosoma 3. La duplicación y transposición del DAZL al cromosoma Y ha ocurrido antes de la divergencia de los monos del viejo mundo, y después de la divergencia de los monos del nuevo mundo, entre 36 y 55 millones de años⁽²⁰⁾.

El DAZ produce una proteína fijadora de ARN, con ubicación en el citoplasma de células germinales, actuando posiblemente en la regulación del transporte y almacenamiento del ARN mensajero⁽²¹⁾.

Los hombres con deleción de AZFc pueden presentar cuadros desde la azoospermia hasta oligozoospermias extremas, lo que hace pensar que el DAZ no ha de ser fundamental para la formación espermática, y que los diferentes fenotipos se deban a diferentes grados de penetración de la mutación.

¿Qué porcentaje de hombres infértiles presentan deleciones de AZF?

La frecuencia de microdeleciones de la región AZF varía ampliamente entre los estudios con un rango entre 1 a 28% (media de 10%) (Tabla 2). Esta variabilidad probablemente refleja el criterio diferente utilizado en la selección de los pacientes y el número y tipo de STS utilizados.

¿Qué pacientes deben ser evaluados para microdeleciones del Y?

Si bien no existe un consenso la mayoría de los trabajos avalan el estudio en los pacientes con azoospermia no obstructiva y con oligozoospermia severa. Un estudio en 202 hombres subfértiles y 101 controles fértiles examinando 16 STS detectó una microdeleción en el 6,8% de los azoospermicos y en el 3,5% de los oligo-

Autor	Azoospermia			Oligozoospermia			% total con deleción
	N estudiados	N con deleción	% con deleción	N estudiados	N con deleción	% con deleción	
Reijo ⁽¹⁴⁾	14	89	12	13	—	—	13
Foresta ⁽²²⁾	16	5	31	23	6	26	28
Kent-First ⁽²³⁾	3	0	0	19	1	5	5
Najmabad ⁽²⁴⁾	50	10	20	10	1	10	18
Qureshi ⁽²⁵⁾	51	4	8	47	4	9	8
Reijo ⁽¹⁸⁾	18	—	—	35	2	6	6
Stuppia ⁽²⁶⁾	19	4	21	14	2	14	18
Vogt ⁽²⁷⁾	370	7	2	—	6	2	4
Girard ⁽²⁸⁾	108	7	6	42	3	7	7
Kreme ⁽²⁹⁾	19	0	0	111	7	6	5
Simon ⁽³⁰⁾	74	3	4	94	2	2	3
Pryor ⁽³¹⁾	26	6	23	72	7	10	13
Vereb ⁽³²⁾	43	5	12	115	0	0	3

Tabla 2. Deleciones de la región AZF en pacientes infértiles.

zoospermicos severos, sin detectarse deleciones en los hombres con más de 500.000 espermatozoides/ml, ni en los controles fértiles⁽³³⁾. Sin embargo, el trabajo que tiene evaluados más hombres (514 infértiles y 920 controles fértiles), demuestra la existencia de deleciones en un 20,5% de los 278 azoospermicos o severamente oligozoospermicos, en un 7% de los 200 pacientes infértiles no seleccionados por sus valores espermáticos, y en el 0,87% de los 920 controles fértiles⁽³⁴⁾.

Estos datos posiblemente hagan pensar que sean necesarios mayores estudios poblacionales para definir en quien efectuar una evaluación, lo mismo que el valor que puedan tener esas microdeleciones de STS en hombres fértiles. Lo cierto es que la proporción de hombres azoospermicos y oligozoospermicos severos tienen un riesgo incrementado de presentar una microdelección, y por otra parte son los pacientes candidatos a una técnica de ICSI, donde el médico intervendrá activamente en el logro del embarazo y por lo tanto debe poder informar de los posibles riesgos genéticos.

¿Cómo se debe efectuar el estudio?

Actualmente el estudio se realiza en linfocitos de sangre periférica, utilizando la técnica de PCR. Seguramente cuantos más STS puedan evaluarse más completa será ésta. Sin embargo, esto también puede llevar a un mayor margen de error y por otro lado que no siempre se conoce el valor que tiene la pérdida de un STS en relación con la espermatogénesis, y por lo tanto puede ser dificultoso interpretar si éste sea o no un polimorfismo. Lo cierto es que al día de hoy existen dos familias de genes (RBM y DAZ) que han sido identificados como relacionados con el proceso de espermatogénesis y por lo tanto su deleción puede ser responsable de la alteración espermática. Estos son los genes que estudiamos actualmente y que nos permite evaluar a las regiones AZFb (RBM1 y RBM2) y AZFc (DAZ1 y SPGY o DAZ2).

Algunos trabajos actuales publican la posibilidad de mosaicismo y que estos genes pueden expresarse en sangre periférica, pero no en las células testiculares, por lo que son hombres que pueden transmitir una microdelección, aunque su estudio sea normal⁽³⁵⁾. Esto posiblemente haga plantear la orientación hacia la búsqueda de mosaicismos estudiando células germinales.

¿Se debe pedir si existe otra patología detectada?

La posibilidad de encontrar una microdelección parece ser independiente de la presencia de otra patología, tal como fue mostrado en una comunicación del grupo de Cornell, en quienes las respuestas a los tratamientos convencionales (ej. varicocelectomías, estimulaciones

hormonales) eran mucho peor cuando se encontraba presente una microdelección del cromosoma Y⁽³⁶⁾.

Esto tiene 2 aspectos prácticos, el primero que no siempre encontrar una patología (ej. varicocele) significa que ésta sea la causa principal y que por lo tanto el hombre debe ser evaluado completamente; segundo que al tener más datos uno puede predecir mejor la posibilidad de respuesta a una terapéutica.

¿Cómo se debe interpretar el resultado de este estudio?

Posiblemente ésta sea la respuesta más difícil de responder de todas las que estamos haciendo. Si el resultado es normal (no existen deleciones) deberemos pensar que no existen pérdidas de las secuencias de ADN estudiadas en las células somáticas. Sin embargo, pueden existir pérdida de otras secuencias que no estudiamos, o puede ser que el hombre tenga un mosaicismo y como consecuencia su estudio es normal pero en sus células germinales esa secuencia que estudiamos en sangre periférica no se exprese y por lo tanto se transmitirá ésta a la descendencia⁽³⁷⁾.

Si el resultado es positivo interpretaremos que se ha delecionado una secuencia del ADN del cromosoma Y y que esta región estudiada (AZF) está asociada con defectos de la espermatogénesis y por lo tanto esta alteración puede ser la causa de su alteración espermática. Sin embargo, como en muchos estudios se evalúan secuencias y no genes en algunos casos podrá corresponder a un polimorfismo. Ante esta duda puede ser importante efectuar estudios en el padre o en hermanos para evaluar la presencia o no de este cuadro y su posible alteración de la fertilidad. Ciertamente, como vimos previamente, la deleción de los genes DAZ y RBM se encuentra fuertemente asociada con la alteración germinal.

¿Existe correlación entre el fenotipo espermático y la deleción existente?

En un primer momento Vogt propuso la existencia de 3 regiones AZFa, AZFb, y AZFc y que cada una de ellas se correspondía con un cuadro histológico del testículo. Así, la deleción de la región "a" se correspondía con el cuadro de Sertoli solo, el de la "b" con una detención a nivel meiótico, y el de la "c" con una detención tardía (espermátida). Esto permitía interpretar la existencia de distintos genes en estas regiones relacionado cada uno de ellos con distintos pasos de la espermatogénesis. Sin embargo, esto no pudo ser confirmado.

Sabemos actualmente que un porcentaje de oligozoospermicos tienen deleción de AZF (habitualmente la región c) y que en un 50 % de los azoospermicos con deleciones de AZFc se pueden encontrar focos de es-

permatogénesis en el testículo^(38,39). Esto hace pensar que el fenotipo puede ser variado (desde azoospermico hasta oligozoospermico), y que esto se deba posiblemente a la existencia de interacciones entre distintos genes, o a la existencia de otras copias del mismo gen (recordar que son familias de genes) o genes autosómicos (como el DAZL) que puedan suplantar parcialmente estos genes delecionados.

Existen evidencias de que cuanto más extensa es la deleción y especialmente si compromete las regiones AZFa y AZFb las posibilidades de recuperar espermatozoides en el testículo son nulas⁽⁴⁰⁾. Esto es importante porque el estudio puede orientar previo a un TESE en pacientes que ingresaran a un ICSI, pudiendo evitar el procedimiento.

¿Pueden ser fértiles los pacientes con deleciones del cromosoma Y?

Desde el momento que algunos hombres con microdeleciones del Y tienen espermatozoides, tendrán la posibilidad de reproducirse, difícilmente por vía natural o asistida por las técnicas de reproducción asistida (ICSI).

Existen algunos pocos trabajos que comunican la paternidad de hombres con deleción del cromosoma Y, todos ellos logrados por ICSI ya sea utilizando espermatozoides eyaculados o recuperados del testículo^(41,42). En todos los casos donde los hijos son varones se detecta la misma deleción que tiene el padre, es decir tiene una transmisión del 100% para los hijos varones.

Tenemos 2 casos de embarazos en pacientes con deleción de la región AZF, uno de ellos es un paciente azoospermico con compromiso del DAZ1 al cual se le efectuó un TESE más ICSI obteniendo el embarazo y nacimiento de un hijo varón sano, quien realizará el estudio molecular. El otro paciente era un hombre con oligozoospermia marcada con una microdeleción de un STS de la región AZFb (Y6H34) quien logró un embarazo de un varón por vía natural. Posiblemente en este último caso será necesario aclarar la transmisión de esta deleción y su rol en la fertilidad.

Siempre se plantea si estos pacientes deben acceder a un procedimiento de reproducción asistida, ya que se está participando en la transmisión de una mutación que normalmente se perdería. Lo cierto es que el riesgo de incrementar significativamente la población de hombres estériles a través del ICSI de estos pacientes parece poco probable, teniendo en cuenta el porcentaje de hombres estériles (10%), el porcentaje de estos hombres que tienen microdeleciones del Y (5%), el porcentaje de éstos que tienen espermatozoides (menos del 50%), el porcentaje de hombres que tienen posibilidad de acceder a un ICSI (generalmente bajas por razones

sociales, económicas y personales), y el porcentaje de ICSI que llega a embarazo a término (30%). Si uno realiza esta cuenta, seguramente se daría cuenta de que la cantidad de niños nacidos en el mundo con microdeleción del Y será ínfima y poco posible que incremente la esterilidad en la población.

Asimismo, si bien éstas han de ser mutaciones que tenderían a perderse ya que son productoras de esterilidad, ha de existir un mecanismo de mantenimiento de estas deleciones en la población que hace que se mantengan generación tras generación.

Tal como fue presentado recientemente, se interrogó a un grupo de parejas portadoras de microdeleciones del Y sobre si deseaban hacer una ICSI, explicándoles el riesgo de transmisión, y el 85% de ellas aceptó efectuar el procedimiento.

Como vemos se ha producido un gran avance en este campo de genes relacionados con la espermatogénesis, quedando todavía muchas dudas por aclarar.

Genes relacionados con la formación de la vía espermática

La vía espermática está constituida por el epidídimo, el conducto deferente y el conducto eyaculador y deriva embriológicamente del conducto mesonéfrico de Wolff. La diferenciación de este conducto tiene una base hormonal; sin embargo, a partir de una patología como es la agenesia bilateral de la vía espermática (ABVE) se ha identificado la existencia de genes que intervienen en el proceso de formación de los conductos.

La ABVE es un desorden raro, que compromete al 2% de los hombres estériles⁽⁴³⁾. Se ha comprobado una asociación entre este último cuadro y la fibrosis quística⁽⁴⁴⁾.

La fibrosis quística es uno de los desórdenes genéticos más frecuentes en la población⁽⁴⁵⁾, transmitiéndose en forma autosómica recesiva, y afectando a 1 de cada 2.000 nacidos vivos y siendo transportada la mutación en 1 de cada 20 individuos. Es una enfermedad generalizada que afecta las glándulas exócrinas y las glándulas sudoríparas de todo el cuerpo, debida a un defecto del transporte de anión Cl⁻ en las membranas celulares de los epitelios glandulares. Sus principales manifestaciones clínicas son la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la insuficiencia del páncreas exócrino.

Más del 95% de los hombres con fibrosis quística son también estériles, debido a azoospermia obstructiva causada por un mal desarrollo de los conductos mesonéfricos que ocasiona una agenesia o atresia del epidídimo, conducto deferente y vesícula seminal.

La fibrosis quística se debe a una mutación en el gen que codifica una proteína denominada regulador transmembranoso de la fibrosis quística (RTFQ: CFTR en

inglés), que es un canal de cloro de la membrana plasmática. El gen de esta proteína se localiza en el cromosoma 7 (7q21), habiéndose descripto más de 500 mutaciones de este gen a lo largo de sus 27 exones, siendo la mutación más frecuente en la fibrosis quística la denominada delta F508 (70% de los pacientes).

Debido a que la ABVE se presenta en la mayoría de los hombres con fibrosis quística, se sugirió que la ABVE como única manifestación sería una forma incompleta de la fibrosis quística, sin los síntomas pulmonares, pancreáticos o sudoríparos. Por lo tanto, se considera actualmente que la ABVE es la forma genital de la fibrosis quística⁽⁴⁶⁾.

Recientemente se ha identificado una estrecha asociación entre la ABVE y las mutaciones del gen CFTR^(47,48). El porcentaje de pacientes con ABVE y mutación en el CFTR varía ampliamente entre 38 y 81%⁽⁴⁹⁻⁵²⁾ (Tabla 3). En un estudio que realizamos en 17 pacientes con ABVE evaluamos 22 mutaciones del gen del CFTR, encontrando en 10 de ellos (58,8%) alguna de las mutaciones estudiadas. La mutación más frecuente (9 de los 10 hombres) fue la delta F508⁽⁵³⁾. Posiblemente la variación en los resultados dependa de las técnicas utilizadas para la detección de las mutacio-

Autor	Nº pacientes	2 mutaciones	1 mutación	Nº mutación
Zielenski	70	13%	57%	30%
Mercier	67	24%	42%	34%
Oates	49	18%	64%	18%
Jarvi	25	16%	20%	64%
Rey Valzacchi	17	6%	53%	41%
Cuiard	8	25%	50%	25%

Tabla 3. Frecuencia de mutación del CFTR en pacientes con ABVE.

Autor	Nº Pacientes	5 T	2 mutaciones	1 mutación	Nº mutación
Chillon	102	-	19%	53%	28%
		+	53%	25%	22%
Zielenski	70	-	13%	57%	30%
		+	59%	20%	21%
Costes	45	-	33%	56%	11%
		+	80%	9%	5%
Dumur	38	-	16%	39%	45%
		+	40%	26%	34%

Tabla 4. Frecuencia de mutación del CFTR incluyendo la variante 5T en pacientes con ABVE.

nes, la cantidad de mutaciones estudiadas y la población estudiada. Se sabe que la frecuencia y el tipo de mutaciones no se distribuye en forma igual en diferentes poblaciones. En nuestro estudio se evaluó un número grande de mutaciones (22), en comparación con la mayoría de los trabajos. Además, se estudió una población heterogénea en cuanto a sus orígenes como es la argentina, lo que posiblemente explique que el porcentaje de pacientes con mutaciones esté en un valor medio (58,8%) de lo encontrado en los diferentes trabajos.

¿Por qué no todos los pacientes con agencias de vías espermáticas tienen una mutación del CFTR?

La razón por la que más de un 40% de los hombres estudiados sean negativos para alguna de las mutaciones del CFTR puede deberse a distintas razones. Una posibilidad es que se encuentre modificado el gen en una porción no estudiada. Así se ha detectado que el intrón 8 (región no codificante) cuando presenta una secuencia denominada 5T puede causar niveles reducidos de la proteína CFTR normal. Chillon y col. han demostrado que la mayoría de los pacientes con ABVE tienen mutaciones en el gen de CFTR, siendo lo más frecuentemente hallado la combinación de una mutación del CFTR en una copia del gen con la secuencia 5T en la otra copia del gen⁽⁵⁴⁾ (Tabla 4). Esto permitiría explicar la base genética de la ABVE.

Otra posibilidad es que en algunos casos la ABVE puede no deberse a una mutación en el gen del CFTR, lo cual se puede inferir de los distintos cuadros de agencias de vías y de sus asociaciones con malformaciones del tracto urinario. El conducto mesonéfrico de Wolff se divide en la 7ma. semana dando sus porciones genital y urinaria. El primero originará los dos tercios distales del epidídimo, el conducto deferente, la vesícula seminal y el conducto eyaculador, mientras que la porción urinaria es necesaria para el desarrollo del riñón y de la vía excretora. Los pacientes con agnesia bilateral de las vías espermáticas suelen no tener malformaciones del aparato urinario, por lo que se interpreta que el conducto de Wolff debe estar sano en el desarrollo embrionario temprano, y que se afecta luego la parte genital por defecto en el funcionamiento del CFTR.⁽⁵⁵⁾ Se considera que el daño antes de la división del conducto mesonéfrico pueda ocasionar ABVE junto con agnesia renal bilateral, patología letal, o con agnesia unilateral de la vía espermática, que tiene una alta asociación con agnesia renal o ectopia renal (90 %).⁽⁵⁶⁾

¿Existe una relación entre el tipo de mutación y el fenotipo?

Al existir más de 500 mutaciones del gen y la posibili-

dad de alteraciones en las regiones no codificantes, es posible explicar que la combinación de distintas mutaciones en ambas copias del gen del CFTR dará los distintos cuadros de la fibrosis quística, desde formas leves como puede ser la ABVE en el caso que se combinen dos mutaciones moderadas o una mutación severa (ej $\Delta F508$) con la variante 5T, hasta los cuadros severos de fibrosis quística con insuficiencia pancreática en el caso que se combinen dos mutaciones severas, pasando por los cuadros de fibrosis quísticas con suficiencia pancreática en que se combinan una mutación severa con una moderada.

¿Cuáles son las posibilidades de reproducción en estos pacientes?

Estas consideraciones toman hoy relevancia desde el momento en que los hombres con ABVE pueden reproducirse, ya que sus testículos fabrican espermatozoides⁽⁵⁷⁾. Las técnicas de fertilización *in vitro* asistidas con micromanipulador, como es la inyección espermática intracitoplasmática (ICSI) ha permitido la reproducción en estos hombres utilizando espermatozoides recuperados de sus testículos o epidídimos⁽⁵⁸⁾. En nuestra experiencia los pacientes con ABVE pueden en estos momentos lograr descendencia gracias a las técnicas de reproducción asistida, con una tasa de nacimiento por paciente del 44% y una tasa de nacimiento por ciclo de 28,5%.

Si bien se había demostrado que los pacientes con ABVE y con la mutación $\Delta F508$ tenían una menor tasa de fertilización (al realizar fertilización *in vitro* - FIV) que aquéllos que no presentaban mutación del gen⁽⁵⁹⁾, nosotros pudimos demostrar que utilizando la técnica de ICSI no se evidencian estas diferencias, lo que estaría mostrando que los espermatozoides con mutación en el gen presentarían un defecto específico en el proceso de capacitación para ingresar al ovocito⁽⁶⁰⁾, pero que

una vez atravesadas las cubiertas ovocitarias la posibilidad de formar un embrión es similar, exista o no la mutación del gen de CFTR.

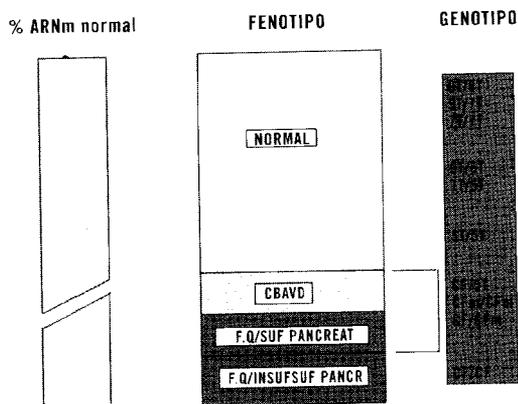
¿Cuáles son los riesgos genéticos en la reproducción de estos hombres?

Debido a esta posibilidad de reproducción de estos pacientes es importante realizar la evaluación del estado del gen de CFTR en ambos miembros de la pareja, lo que permitirá estimar el riesgo genético de la descendencia. Los hombres con mutación del gen en estado homocigoto o en estado heterocigoto compuesto transmitirán la mutación a la totalidad de su descendencia, mientras que en el caso de hombres heterocigotos simples la transmisión se da al 50% de la descendencia. Teniendo en cuenta que la fibrosis quística se transmite en forma autosómica recesiva, si la mujer es portadora de una mutación del gen de CFTR, según las leyes de Mendel, los hijos estarán afectados en el 50% de los casos cuando el hombre es homocigoto o heterocigoto compuesto, y en el 25% de los casos cuando el hombre es heterocigoto. Si la mujer es negativa para la mutación y el esposo heterocigoto, se considera que las chances de tener un hijo con fibrosis quística es de 1 en 410.

En un futuro se podrá realizar en aquellas parejas con alto riesgo de transmisión de fibrosis quística un diagnóstico genético preimplantacional, y la posible terapia génica.

Genes relacionados con la diferenciación sexual

El proceso de diferenciación sexual en sentido masculino depende de la presencia de un gen localizado en el brazo corto del cromosoma Y denominado SRY (del inglés *Sex-determining Region Y*)⁽⁶¹⁾. El SRY es el gen que durante años se conoció como TDF (factor determinante testicular), siendo el gatillo que dispara la cadena de la diferenciación testicular. Este gen se ubica en el borde (a 5 kb) de la región pseudoautosómica del cromosoma Y (que es homóloga a la del X, apareándose y recombinando con ella), siendo pequeño y sin intrones, y codifica una proteína de 204 aminoácidos, que contiene en su parte media una región conservada en otras es-



Gen CFTR paterno	Gen CFTR materno			
	M severa	M media	Normal	5T
M severa	CF	CF/CBAVD	N	CBAVD/N
M media	CF/CBAVD	CF/CBAVD/N	N	CBAVD/N
5 T	CBAVD/N	CBAVD/N	N	CBAVD/N

Tabla 5. Riesgos genéticos según los genotipos de los progenitores

pecies denominada caja HMG (caja del grupo de proteínas de alta movilidad)⁽⁶²⁾. Esta proteína se liga al ADN teniendo un papel regulatorio de la actividad de otro u otros genes. Una hipótesis posible es que la acción inicial de la proteína de SRY es inhibitoria (cancela una transcripción) de un supuesto elemento Z, que a su vez inhibe el desarrollo de la gónada masculina, por lo cual su acción finalmente deja libre la formación del testículo. Sin embargo, todavía es desconocido el gen o los genes blancos inmediatos al SRY^(63,64).

Existen hombres que consultan por esterilidad con azoospermia y en los cuales se detecta una constitución cromosómica 46 XX, cuadro denominado Reversión sexual (*Sex reversal*). Este cuadro se registra en 1 de 20.000 nacidos vivos. Si bien presentan características generales completamente masculinas, con desarrollo sexual normal, como dijimos suelen consultar por esterilidad presentando azoospermia con hipotrofia testicular. El cariotipo evidencia el de una mujer normal, 46XX, pero el uso de sondas de ADN permitió demostrar que en un alto porcentaje de los casos (70%) se puede detectar un fragmento del cromosoma Y (el gen SRY) en uno de los cromosomas X⁽⁶⁵⁾.

El mecanismo de inserción del ADN del cromosoma Y en un cromosoma X se ha podido demostrar en una serie de estos pacientes, debiéndose a un error en la meiosis de su padre donde, al aparearse el cromosoma Y con el X (por su región pseudoautosómica), se produjo un *crossing over* o recombinación genética fuera de la región pseudoautosómica (que es la que normalmente la realiza). Entonces si la recombinación se extiende un poco por fuera de la región pseudoautosómica (hacia el centrómero) hay una gran posibilidad que involucre al gen SRY, dado que como dijimos está muy cerca de esta región, y el SRY se incorporará al cromosoma X⁽⁶⁶⁾.

Por lo tanto estos individuos 46XX más SRY co-

menzarán la cascada de diferenciación en sentido masculino, adquiriendo un fenotipo de tal; sin embargo, no poseerán los otros genes del cromosoma Y (previamente descritos) involucrados en la espermatogénesis y por lo tanto serán azoospermicos.

Sin embargo, hay una minoría de varones XX en los cuales las sondas del cromosoma Y no dan positivas. En este grupo se incluyen casos de incidencia familiar, lo cual sugiere la transmisión de un gen mutado. Casos similares se ven en algunos mamíferos y se ha sugerido que en ellos existe una mutación de otro gen –diferente al SRY– que está integrado a la cascada reguladora de la determinación sexual, posiblemente al supuesto gen Z previamente referido⁽⁶⁷⁾.

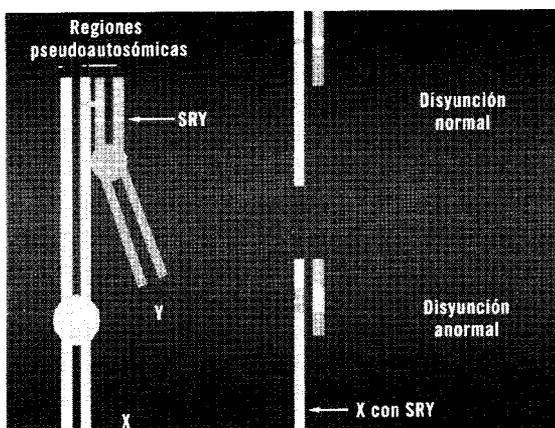
En la cascada de la diferenciación sexual se han identificado genes previos al SRY que estarían involucrados en la diferenciación temprana de la gónada indiferenciada, como son el gen del tumor de *Wilms* (WT-1)⁽⁶⁸⁾ y el gen del SF-1 (factor de la esteroideogénesis 1)⁽⁶⁹⁾ y genes posteriores al SRY que serían activados luego que el SRY se ha transcrito, como el DAX-1⁽⁷⁰⁾ y el SOX-9⁽⁷¹⁾. Posiblemente estos genes estén involucrados en algunos cuadros de alteraciones de la diferenciación sexual.

Genes relacionados con la regulación hormonal de la espermatogénesis

Para que se lleve a cabo una espermatogénesis cuali y cuantitativamente normal se requiere niveles adecuados de FSH, LH y testosterona. Algunos cuadros que pueden presentarse con azoospermia se deberán a defectos génicos en la síntesis de estas hormonas, sus factores reguladores o sus receptores.

Defectos del Factor liberador de gonadotropinas (LH-RH). Síndrome de Kallmann

Este síndrome es un desorden congénito manifestado por déficit aislado de LH y FSH asociado con hiposmia o anosmia debido a un desarrollo defectuoso del bulbo olfatorio. Se caracteriza por ser un hipogonadismo hipogonadotrófico debido a una deficiencia en el factor liberador de gonadotropinas (LH-RH). Por este déficit se produce una falta en la estimulación del gonadotropo hipofisario y por lo tanto hay secundariamente un déficit en los niveles de FSH y LH, lo que se traduce en una falta de estimulación de la espermatogénesis y de la esteroideogénesis testicular, con falta de virilización. Clínicamente se puede asociar con anosmia, asimetría facial, paladar hendido, labio leporino. El examen genital puede revelar micropene y criptorquidia, con hipotrofia testicular marcada. El tratamiento con testosterona permitirá la virilización, mientras que



la recuperación de la espermatogénesis puede lograrse con la administración de LH-RH en forma pulsátil o directamente con gonadotrofinas (FSH y HCG).

Su frecuencia es aproximadamente de 1:10.000 a 1:60.000 nacidos vivos. Puede ser debido a una mutación aislada o a una forma transmisible. Esta última forma puede tener una forma de transmisión autosómica dominante, aunque algunas familias demuestran un modelo autosómico recesivo o recesivo ligado al X. La forma ligada al X es atribuible al gen KALIG-1 (*Kallmann's syndrome interval gene 1*), localizado en el brazo corto del cromosoma X (Xp22.3)⁽⁷²⁾. El gen KALIG-1 es responsable, junto con otros genes, de la elaboración de una proteína que es similar en estructura a otras moléculas de adhesión de células neurales⁽⁷³⁾. Este tipo de proteínas desempeñan un rol crítico en dirigir el crecimiento y desarrollo de los axones. Los resultados sugieren que la mutación del gen causa un defecto en la migración neuronal durante el desarrollo embrionario, involucrando la orientación espacial del crecimiento de las neuronas que contienen LH-RH, luego que emergen del área olfatoria para migrar al hipotálamo. Posiblemente la asociación con otros síntomas se deba a defectos en la migración celular de esa región embrionaria.

Defectos en la actividad de las gonadotrofinas

La LH y la FSH son moléculas conformadas por dos subunidades (alfa y beta); la subunidad alfa es común a ambas, mientras que la beta es específica a cada una, por lo que las anomalías en esta subunidad conducirán a hormonas biológicamente inactivas. El gen de la subunidad alfa ha sido localizada en el cromosoma 6⁽⁷⁴⁾ mientras que el de la subunidad beta de LH está ubicada en 19q13.2⁽⁷⁵⁾ y el de beta FSH ha sido localizado en 11pter-p11.2⁽⁷⁶⁾. El gen humano del receptor de LH ha sido mapeado en 2p21.

Se ha diagnosticado un cuadro de LH inactiva por una sustitución en una base del gen de la subunidad beta, que resultó en la conversión de glutamina a arginina en el aminoácido 54 de la subunidad beta de LH⁽⁷⁷⁾. En el estado homocigota el efecto fue la ausencia de desarrollo puberal normal e infertilidad, y en el estado heterocigota sólo hubo infertilidad. El paciente homocigota tenía un retraso puberal con testículos hipotróficos descendidos y con LH inmunoactiva elevada, pero con bioactividad disminuida. Esto haría pensar que la LH no es imprescindible para la diferenciación sexual masculina, y que los andrógenos prenatales se produjeron por la estimulación de la hCG placentaria. El paciente fue tratado con hCG logrando un conteo espermático de 11 millones de espermatozoides-ml con 50% de movilidad.

Un déficit en FSH ha sido descrito en una mujer que era homocigota para una delección en dos pares de bases en el exón 3 del gen de la subunidad beta de FSH. La FSH era anormal funcionalmente⁽⁷⁸⁾. Si bien se han descrito hombres con déficit aislado de FSH que tienen desarrollo puberal normal (pues tienen LH) con azoospermia u oligozoospermia severa, no se ha comunicado en ninguno alguna mutación en el gen de la subunidad β de FSH.⁽⁷⁹⁾

Defecto en el receptor de andrógenos

Los andrógenos permiten la diferenciación genital durante el desarrollo embrionario en sentido masculino y luego el desarrollo puberal y el mantenimiento de los caracteres sexuales. La testosterona actúa a nivel de los tubos seminíferos manteniendo la espermatogénesis, y a nivel epididimario induciendo la síntesis de moléculas que intervienen en el proceso de maduración espermática. Estas hormonas actúan por su unión con receptores específicos (receptor de andrógenos), que son proteínas que se encuentran en el citoplasma de la célula blanco, y que al unirse a la hormona, se desplazan al núcleo celular acoplándose a regiones promotoras de genes hormonodependientes. Los defectos en el receptor de andrógenos compromete la acción fisiológica de la testosterona. Estos defectos producen el cuadro denominado síndrome de insensibilidad a los andrógenos, que se presenta en 1 de cada 60.000 nacidos vivos.

El receptor de andrógenos tiene un peso molecular de 90 kDa, con 919 aminoácidos y una compleja estructura de 3 dominios. Estos incluyen el dominio aminoterminal que actúa en la regulación transcripcional, el de dedos de zinc que es el responsable del reconocimiento y la unión del complejo proteína/andrógeno al ADN, y el carboxilo terminal que es el de unión al andrógeno⁽⁸⁰⁾.

El gen de esta proteína tiene una longitud de 90 kb y se localiza en Xq 11.2 y tiene 8 exones, separados por algunos intrones extensos y otros menores. El exón 1 tiene 1.586 pares de bases y codifica para el dominio aminoterminal. Este exón contiene una repetición de tripletes CAG (normalmente entre 11-35 veces). El aumento en las veces que se repite este triplete (entre 40-62) origina una proteína que liga normalmente andrógenos, pero falla en su actividad de regulación transcripcional, y de una forma desconocida, resulta deletéreo para las motoneuronas de la médula espinal y el bulbo, originando la Enfermedad de *Kennedy*, conocida como atrofia muscular espinobulbar^(81,82). Esta es una afección progresiva, y los pacientes pueden inicialmente ser fértiles, pero con el correr del tiempo presentarán ginecomastia y atrofia testicular con azoospermia u oli-

gozoospermia. Actualmente se observó en algunos paciente con espermatogénesis disminuida una reducción de la repetición del triplete CAG.⁽⁸³⁾

El exón 2 de 152 pares de bases, y el exón 3 de 117 pares de bases codifican para el dominio de unión al ADN. El dominio de unión al andrógeno es codificado por los exones 4 de 288 pares de bases, el 5 de 145, el 6 de 131, el 7 de 185, y el 8 de 153.

Los defectos del receptor de andrógenos se debe a mutaciones, deleciones, *splicing* aberrante del ARNm, y terminación prematura. Las mutaciones resultarán en cambios de la cantidad de receptores, cambios en la afinidad de unión del andrógeno al receptor, o en la capacidad del receptor de unión al ADN.

Los cambios en el receptor de andrógenos causan una amplia variedad de anomalías fenotípicas, que van desde individuos con un fenotipo femenino, hasta hombres con defectos menores.⁽⁸⁴⁾ Los cuadros más severos corresponden al síndrome de feminización testicular, en el cual por la falta de acción de los andrógenos durante la vida fetal se produce una diferenciación sexual en sentido femenino, con gónadas masculinas intraabdominales. El síndrome de *Reifenstein* se describió como un cuadro incompleto de feminización testicular, que clínicamente incluye un espectro que varía en diferentes grados de virilización incompleta con o sin ginecomastia y esterilidad. El grupo menos afectado son aquéllos que se presentan sólo con deficiencias de la espermatogénesis, o con poca virilización, pero fértiles.

No se ha demostrado una localización preferencial de las mutaciones del gen del receptor de andrógenos. La mayoría de las alteraciones que causan síndromes son mutaciones puntuales, mientras que son poco frecuentes las deleciones de regiones largas del gen. La sustitución de simples nucleótidos se encuentra tanto en cuadros de insensibilidad a los andrógenos completos y parciales. La manifestación fenotípica dependerá del punto de afectación del gen. Sin embargo, la misma mutación en dos individuos diferentes no necesariamente resultará en el mismo cuadro clínico.

La identificación de estas mutaciones tendrá aplicación clínica en la identificación etiológica de pacientes estériles y también servirá para el diagnóstico prenatal, aunque como expresamos previamente, por más que conozcamos la mutación transmitida, no es posible predecir el fenotipo que tendrá.

Conclusiones

En los últimos años se ha producido un gran conocimiento en factores genéticos involucrados en la esterilidad masculina. Muchos de estos factores están bien caracterizados por la identificación de los genes y sus

productos, mientras que en otros casos sólo se reconocen regiones en el cromosoma, y en otros apenas se sospecha su origen genético. Sin lugar a dudas este conocimiento es muy importante para todos aquellos relacionados con los pacientes estériles, a fin de poder efectuar diagnósticos etiológicos y poder comunicarles riesgos posibles, especialmente a partir del desarrollo de las técnicas de reproducción asistida. Sin lugar a dudas en poco tiempo será imprescindible manejar los conocimientos moleculares de la esterilidad para poder ejercer adecuadamente nuestra práctica diaria.

Bibliografía

1. De Braeckeler M, Dao TM: Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 6: 245-250, 1991.
2. Tiepolo L, Zuffardi O: Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 34: 119-124, 1976.
3. Foote S, Vollrath D, Hilton A, y col.: The human Y chromosome: overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. *Science* 259: 60-66, 1992.
4. Vollrath D, Foote S, Hilton A, y col.: The human Y chromosome: a 43 interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 258: 52-59, 1992.
5. Vogt P, Chandley AC, Hargreave T, y col.: Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet* 89: 491-496, 1992.
6. Vogt P, Adelman A, Habermann B, y col.: Y chromosome and male fertility genes. En *Fertility and Reproductive Medicine*. Editores: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Tounger JB. Editorial Elsevier, 1998.
7. Ma K, Sharkey A, Kirsch S, y col.: Towards the molecular localisation of the AZF locus: mapping of microdeletions in azoospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 1: 29-33, 1992.
8. Delbridge ML, Harry JL, Toder R, y col.: A human candidate spermatogenesis gene RBM1, is conserved and amplified on the marsupial Y chromosome. *Nat Genet* 15: 131-136, 1997/
9. Chai NN, Salido EC, Yen PH: Multiple functional copies of the RBM gene family, a spermatogenesis candidate of the human Y chromosome. *Genomics* 45: 355-361, 1997.
10. Prosser J, Inglis JD, Condie A, y col.: Degeneracy in human multicopy RBM (YRRM), a candidate spermatogenesis gene. *Mamm Genome* 7: 835-842, 1996
11. Elliot DJ, Millar MR, Oghene K, y col.: Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3848-3853, 1997.
12. Elliot DJ, Ma K, Kerr SM, y col.: An RBM homologue maps to the mouse Y chromosome and is expressed in germ cells. *Hum Mol Genet* 5: 869-874, 1996.
13. Chai NN, Zhou H, Hernandez J, y col.: Structure and organization of the RBMY genes on the human Y chromosome: transposition and amplification of an ancestral autosomal hnRNP gene. *Genomics* 49: 283-299, 1998.

14. Reijo R, Lee TY, Salo P, y col.: Diverse spermatogenic defects in human caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA binding protein gene. *Nat Genet* 10: 383-393, 1995.
15. Vogt PH: Human Y chromosome function in male germ cell development. *Adv Dev Biol* 4: 193-258, 1996.
16. Vogt PH, Affara N, Davey P, y col.: Report of the third international workshop on human Y chromosome mapping. *Cytogenet Cell Genet* 79: 1-20, 1997.
17. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, y col.: Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med* 336: 534-539, 1997.
18. Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, y col.: Severe oligospermia resulting from deletions of the Azoospermia Factor gene on the Y chromosome. *Lancet* 347: 1290-1293, 1996.
19. Ruggiu M, Speed R, Taggart M, y col.: The mouse Dazl gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389: 73-77, 1997.
20. Seboun E, Barbaux S, Burgeon T, y col.: Gene sequence, localisation, and evolutionary conservation of DAZLA, a candidate male sterility gene. *Genomics* 41: 227-235, 1997.
21. Kleene KC: Patterns of translational regulation in the mammalian testis. *Molec Reprod Devel* 43: 268-281, 1996.
22. Foresta C, Rossato M, Garolla A, y col.: Male infertility and ICSI: are there limits? *Hum Reprod* 11: 2347-2348, 1996.
23. Kent-First MG, Kol S, Muallem A, y col.: Infertility in intracytoplasmic sperm injection derived sons. *Lancet* 348: 332, 1996.
24. Najmabadi H, Huang V, Yen P, y col.: Substantial prevalence of microdeletions of the Y chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence-tagged site-based mapping strategy. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1347-1352, 1996.
25. Qureshi SJ, Ross AR, Ma K y col.: Polymerase chain reaction screening for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis of genetically determined spermatogenic failure in men. *Mol Hum Reprod* 2: 775-779, 1996.
26. Stuppia L, Mastroprimiano G, Calabrese G y col.: Microdeletions of interval 6 of the Y chromosome detected by STS-PCR in 6 of 33 patients with idiopathic oligo or azoospermia. *Cytogenet Cell Genet* 72: 155-158, 1996.
27. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S y col.: Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5: 933-943, 1996.
28. Girardi SK, Mielnik A, Schlegel P: Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum Reprod* 12: 1635-1641, 1997.
29. Kremer J, Tuerlings J, Meuleman E y col.: Microdeletions of the Y chromosome and intracytoplasmic sperm injection: from gene to clinic. *Hum Reprod* 12: 687-691, 1997.
30. Simoni M, Gromoll J, Dworniczak B, y col.: Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in Azoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil Steril* 67: 542-547, 1997.
31. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, y col.: Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med* 336: 534-539, 1997.
32. Vereb M, Agulnik AI, Houston JT, y col.: Absence of DAZ gene mutations in cases of no-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 3: 55-59, 1997.
33. Liow SL, Ghadessy FJ, Ng SC, y col.: Y chromosome microdeletions in azoospermic or near azoospermic subjects, are located in the AZFc (DAZ) subregion. *Mol Hum Reprod* 4: 763-768, 1998.
34. Kent-First M, Muallem A, Schultz J, y col.: Defining regions of the Y chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev* 53: 27-41, 1999.
35. Ferlin A, Moro E, Onisto M, y col.: Absence of testicular DAZ gene expression in idiopathic severe testiculopathies. *Hum Reprod* 14: 2286-2292, 1999.
36. Brandell RA, Mielnik A, Liotta Z, y col.: Effect of partial Y chromosome deletions on results of treatment for severe male factor infertility. *Am Soc Reprod Med* 1998 O-021.
37. Kent-First MJ, Muallem A, Memilli E, y col.: Inheritance of Y linked deletions in infertile males: cryptic mosaicism as a new etiology of idiopathic male infertility. *Am Soc Reprod Med* 1999 O-018.
38. Mulhall JP, Reijo R, Alagappan R, y col.: Azoospermic men with deletion of the DAZ cluster are capable of completing spermatogenesis: fertilization, normal embryonic development and pregnancy occur when retrieved testicular spermatozoa are used for intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12: 503-508, 1997.
39. Silber SJ, Alagappan R, Brown LG, y col.: Testicular histology of men with non obstructive azoospermia or severe oligospermia caused by Y chromosome deletions. *Am Soc Reprod Med* 1999 P-184.
40. Brandell RA, Mielnik A, Liotta D, y col.: AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test. *Hum Reprod* 10: 2812-2815, 1998.
41. Jiang MC, Lien YR, Chen SU, y col.: Transmission of the novo mutations of deleted in azoospermia genes from a severely oligozoospermic male to a son via intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 71: 1029-1032, 1998.
42. Silber SJ, Brown LG, Page DC: Transmission of Y deletion to male offspring by ICSI. *Am Soc Reprod Med* 1999 P-183.
43. Dubin L, and Amelar RD: Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fertil Steril* 22: 469-474, 1971.
44. Holsclaw DS, Lober B, Jockin H y Schwachman H: Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis. *J Urol* 106: 568-574, 1971.
45. Zielenski J and Tsui LC: Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 29: 777-807, 1995.
46. Oates RD, Amos JA: The genetic basis of congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis. *J Androl* 15: 1-8, 1994.
47. Anguiano A, Oates RD, Amos JA y col.: Congenital bilateral absence of the vas deferens: a primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA* 267: 1794-1797, 1992.
48. Dumur V, Gervais R, Rigot JM y col.: Abnormal distribution of CF Delta F 508 allele in azoospermic men with congenital aplasia of epididymis and vas deferens. *Lancet* 336: 512, 1990.

49. Augarten A, Yahav Y, Kerem BS y col.: Congenital bilateral absence of vas deferens in the absence of cystic fibrosis. *Lancet* 344: 1473-1474, 1994.
50. Durieux I, Bey-Omar F, Roller J y col.: Diagnostic criteria for cystic fibrosis in men with congenital absence of the vas deferens. *Medicine* 74: 42-47, 1995.
51. Casals T, Bassas L, Ruiz, Romero J y col.: Extensive analysis of 40 infertile patients with congenital absence of the vas deferens: in 50% of cases only one CFTR allele could be detected. *Hum Genet* 95: 205-211, 1995.
52. Osborne LR, Lynch M, Middleton PG y col.: Nasal epithelial ion transport and genetic analysis of infertile men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Mol Genet* 2: 1605-1609, 1993.
53. Rey Valzacchi G, Cohen M, Sod R, y col.: Agenesia bilateral de la vía espermática. Estudio molecular y posibilidades terapéuticas. *Rev Arg de Urol* 64: 128-132, 1999.
54. Chillon M, Casals T, Bernard M, y col.: Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 332: 1475-1480, 1995.
55. Tizzano EF, Silver MM, Chirayat D, y col.: Differential cellular expression of cystic fibrosis transmembrane regulator in human reproductive tissues. Clues for the infertility in patients with cystic fibrosis. *Am J Pathol* 144: 906-914, 1994.
56. Donohue RE, Fauver HE: Unilateral absence of the vas deferens: a useful clinical sign. *JAMA* 261: 1180-1182, 1989.
57. Silber SJ, Ord T, Borrero C y col.: New treatment for infertility due to congenital absence of vas deferens. *Lancet II*, 850-851, 1987.
58. Silber SJ, Nagy ZP, Liu J, y col.: Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod* 9: 1705-1709, 1994.
59. Patricio P, Ord T, Silber SJ, Asch RH: Cystic fibrosis mutations impair the fertilization rate of epididymal sperm from men with congenital absence of the vas deferens. *Human Reprod* 8: 1259-1263, 1993.
60. van der Ven K, Messer L, van der Ven H, y col.: Cystic fibrosis mutation screening in healthy men with reduced sperm quality. *Human Reprod* 5: 513-517, 1996.
61. Page DC, Mosher R, Simpson EM, y col.: The sex determining region of the human Y chromosome. *Cell* 51: 1091, 1987.
62. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, y col.: A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif. *Nature (London)* 346: 240-244, 1990.
63. Koopman P: The molecular biology of SRY and its role in sex determination in mammals. *Reprod Fertil Dev* 7: 713-722, 1995.
64. Haqq CM, Donahoe P: Regulation of sexual dimorphism in mammals. *Physiol Rev* 78: 1-33, 1998.
65. Page DC, de la Chapelle A, Weissenbach J: Chromosome Y specific DNA in related human XX males. *Nature* 315: 224, 1985.
66. Weil D, Wang I, Dietrich A, y col.: Highly homologous loci on the X and Y chromosome are hot spots for ectopic recombination resulting in XX males. *Nature Genet* 7: 414-419, 1994.
67. McElreavey K, Vilain E, Abbas, y col.: A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Nat Acad Sci USA* 90: 3368-3372, 1993.
68. Bruening W, Winnett E, Pelletier J: Wilms tumor, a paradigm for insights into development and cancer. *Cancer Invest* 13: 431-443, 1995.
69. Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, y col.: Developmental expression of mouse steroidogenic factor 1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Molec Endocrinol* 8: 654-662, 1994.
70. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, y col.: A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature Genet* 7: 497-501, 1994.
71. Wagner T, Wirth J, Meyer J, y col.: Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY - regulated SOX9. *Cell* 79: 1111-1120, 1994.
72. Franco B, Guioli S, Pragiola A, y col.: A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature (London)* 353: 529-536, 1991.
73. Legouis R, Hardelin JP, Leveilliers J, y col.: The candidate gene for the X-linked Kallman syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 67: 423-435, 1991.
74. Fiddes JC, Goodman HM: The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein genes. *J Appl Genet* 1: 3-18, 1981.
75. Talmadge K, Vanvakopoulos NC, Fiddes JC: Evolution of the genes for the b subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *Nature* 307: 37-40, 1984.
76. Watkins PC, Eddy R, Beck AE, y col.: DNA sequence and regional assignment of the human follicle stimulating hormone b subunit to the short arm of human chromosome 11. *DNA* 6: 205-212, 1987.
77. Weiss J, Axelrod L, Whitcomb RW, y col.: Hypogonadism caused by amino acid substitution in the b subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med* 326: 179-183, 1992.
78. Matthews CH, Borgato S, Beck-Peccoz P, y col.: Primary amenorrhea and infertility due to a mutation in the b subunit of follicle stimulating hormone. *Nat Genet* 5: 83-86, 1993.
79. Layman LC, Cohen DP: Study of the follicle stimulating hormone beta gene in males with oligospermia. *Am Soc Reprod Med* 1997; O-163:S80.
80. Griffin JE: Androgen resistance: the clinical and molecular spectrum. *N Engl J Med* 326: 611, 1992.
81. Kennedy WR, Alter M, Sung JH: Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset: a sex linked recessive trait. *Neurology* 18: 671-680, 1968.
82. MacLean HE, Choi WT, Rekaris G, y col.: Abnormal androgen receptor binding affinity in subjects with Kennedy disease (spinal and bulbar muscular atrophy). *J Clin Endocrinol Metab* 80: 508-516, 1995.
83. Komori S, Kasumi H, Kanazawa R, y col.: CAG repeat length in the androgen receptor gene of infertile Japanese males with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 5: 14-16, 1999.
84. Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, y col.: Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16: 271-321, 1995.