

# Recomendaciones para el estudio genético de la pareja con alteraciones en la reproducción

Elena Buces González

# Definición esterilidad

- **Primaria:**
  - Ningún embarazo.
  - 1 año.
  - Sin métodos anticonceptivos.
  
- **Secundaria:**
  - Una gestación conseguida.
  - 1 año
  - Sin métodos anticonceptivos.

La esterilidad primaria o secundaria afecta a cerca del 15% de las parejas en los países industrializados.

# Causas de infertilidad

- No genéticas
  - Anomalías en el tracto genital.
  - Secuela por enfermedad, cirugía o trauma.
  - Agentes tóxicos (quimioterapia, medioambientales).
  - Endometriosis, varicocele.
  - Causas endocrinas.
  - Disfunción sexual.
  - Menopausia precoz

# Causas de infertilidad

- Causas genéticas
  - Causas monogénicas de infertilidad.
  - Causas cromosómicas.

European Journal of Human Genetics (2006) 14, 588–645

**Problemas de fertilidad con origen genético:**

15% varones.

10% mujeres.

Eur J Hum Genet. 2002;10:303-12.

# Historia clínica

- **ÁRBOL GENEALÓGICO.**
  - 3 generaciones.
  - Consanguinidad.
  - Antecedentes familiares de:
    - Menopausia precoz.
    - Aborto espontáneo (tiempo de gestación y sexo, si se conoce).
    - Muerte neonatal (datos autopsia).
    - Malformaciones.
    - Esterilidad.
    - Retraso mental o en el desarrollo.
    - Coagulopatías.
    - Enfermedades genéticas.

# Historia clínica

- **ANTECEDENTES PERSONALES.**
  - Malformaciones en el nacimiento.
  - Desarrollo psicomotor.
  - Menarquia.
  - Duración y características de los ciclos.
  - Edad de aparición de caracteres sexuales secundarios.
  - Anosmia. Síndrome Kallmann.

# Historia clínica

## ■ EXPLORACIÓN:

- Estatura.
- Aspecto fenotípico.
- Distribución del cabello.
- Distribución del vello.
- Genitales externos.
- Ginecomastia.
- Hombre: Cara alargada, pabellones auriculares despegados y grandes, prognatismo. S. X frágil. Macroorquidismo.
- Mujer: Cuello alado (pterygium colli), Teletelia y tórax en escudo. S. de Turner.



## Table 6 Classification of genetic causes of female infertility

---

### Chromosomal aberrations (homogenous or mosaicism)

#### Sex chromosomes

Turner syndrome and gonadal dysgenesis with short stature  
(45,X; mosaicisms such as 45,X/46,XX and 45,X/47,XXX;

Xq isochromosome; del(Xq); del(Xp); r(X); etc)

Gonadal dysgenesis with Y-cell line

Mixed dysgenesis (45,X/46,XY)

46,XY gonadal dysgenesis (Swyer syndrome)

True hermaphroditism with Y-cell line

X-autosomal translocation

47,XXX and mosaicisms

#### Autosomes

Robertsonian translocations

Reciprocal translocations

Inversions

### Gene mutations

#### X-linked

Fragile X syndrome (FRAXA)

Kallmann syndrome

Complete androgen insensitivity syndrome

#### Autosomal

Complex genetic syndromes in which fertility is a minor  
manifestation<sup>a</sup>

Infertility as major manifestation

Genes for  $\beta$ -subunit of FSH and genes for LH and FSH  
receptors

Gene for GnRH receptor

BPES (blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus)

Danys-Drash syndrome

Fresier syndrome

### Chromosomal aberrations confined to oocytes

Advanced age

---

# Cariotipo en sangre periférica

- **Altamente recomendable:**
  - Reserva ovárica inadecuada para la edad de la paciente.
  - Fenotipo sugestivo de cromosomopatía.
  - Dos o más abortos.
  - Antecedentes familiares de primer grado de cromosomopatía.
  - Fracaso reiterado de FIV o ICSI, sin causa aparente que lo justifique.
- **Recomendable:**
  - Desconocimiento de antecedentes familiares.
  - Antecedentes de cromosomopatías en abortos espontáneos anteriores.
  - Diagnóstico de esterilidad idiopática.

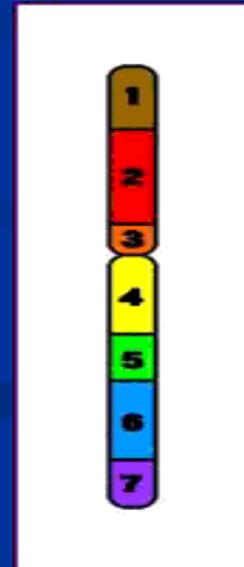
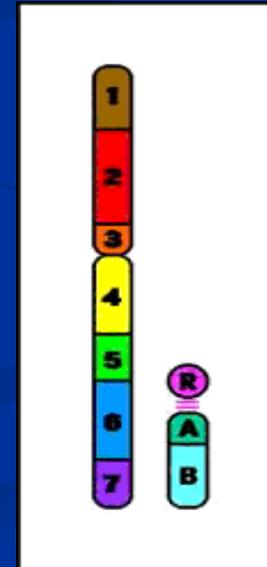
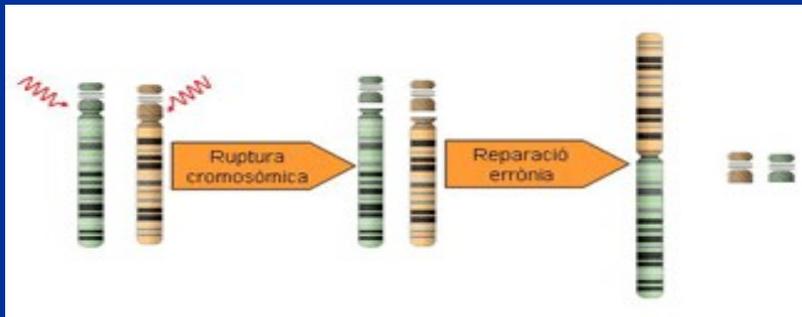
Riccaboni et al. Fertil Steril. 2008;89:800-8.

Soini S et al. Eur J Hum Genet. 2006;14:588-645.

# Cariotipo en sangre periférica

## ■ Buscamos:

- Alteraciones estructurales o numéricas en el cromosoma X.
- Presencia de cromosoma Y.
- Alteraciones estructurales de los autosomas.
  - Translocaciones recíprocas.
  - Translocaciones robertsonianas.
  - Inversiones.



# Fibrosis quística

- Autosómica recesiva.
- 1500 Mutaciones gen CFTR: regulador conductancia transmembrana de la FQ (7q31.2).
- Mutación deltaF508 la más prevalente (70%).
- Pulmones y páncreas exocrino órganos más afectados.
  - Secreciones espesas e infecciones recurrentes.
  - Alteraciones digestivas por la deficiencia de enzimas pancreáticas.
- 98% Incremento de concentraciones de Na y Cl en el sudor.
- Las mujeres con FQ muestran solo una cierta reducción de la fertilidad.

# Fibrosis quística

- Prevalencia:
  - Afectos: 1/2500 RN vivos de raza blanca.
  - Heterocigotos (Portadores): 1/25.
- Recomendación estudio molecular FQ altamente recomendable:
  - Pareja portadora de FQ.
  - Antecedentes familiares de FQ.

Dequeker E et al. Eur J Hum Genet. 2009;17:51-65.

# Estudio de X frágil

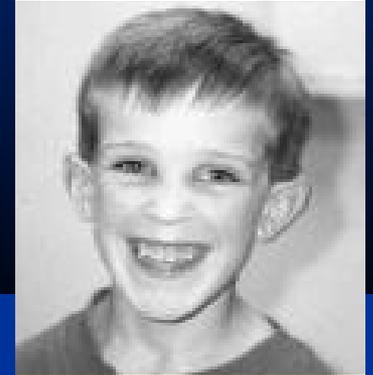
- RM ligado al cromosoma X por mutaciones en el gen FMR1 (Xq27.3) (*fragile X mentalretardation 1*).
- Dominante con penetrancia reducida.
  - 80% hombres.
  - 30% mujeres.

# Estudio X frágil

## ■ CLÍNICA:

### ■ Varones:

- RM
- Cara estrecha orejas grandes, prognatismo.
- Hiperactividad, ansiedad.
- 25% rasgos autistas.
- Macroorquidismo. Muchos estériles.



### ■ Mujeres:

- 35-50% CI<70 RM leve. (media CI 100)
- 50-70% CI<85.
- No reducción de fertilidad.
- Las mujeres portadoras de premutación en el gen FMR1 tienen 20% riesgo de insuficiencia ovárica prematura (< 40 años).

# Estudio de X frágil

- Se produce una expansión masiva de repeticiones inestables del triplete CGG en el gen FMR1. La expansión inestable o la metilación anormal del gen da lugar a la supresión de la transcripción del FMR1 y a niveles cerebrales disminuidos de la proteína que codifica.
- Repeticiones del triplete CGG:
  - Número normal: menor de 60.
  - Premutación: 61-200.
  - Mutación completa: más de 200 repeticiones que da lugar a una hipermetilación inactiva en el promotor del gen FMR1.

El número de repeticiones aumenta el riesgo de insuficiencia ovárica prematura.

# Estudio X frágil

- **Prevalencia**
  - **Mutación completa** 1/4000 RN varones caucásicos y la mitad en mujeres.
  - **Premutación**
    - En mujeres 1/250-1/450.
    - En varones 1/1000.
- **Altamente recomendable:**
  - Antecedentes familiares de varones con retraso mental no filiado.
  - Antecedentes familiares de X frágil.
  - Antecedentes familiares de fallo ovárico precoz.
  - Fallo ovárico precoz idiopático.

# Trombofilias: Opcional

- Las trombofilias se han asociado a abortos recurrentes.
- Mutaciones en factores de la coagulación:
  - Factor V Leiden:
    - El factor V de Leiden se desactiva a un ritmo 10 v más lento que el factor V normal y persiste más tiempo en la circulación. Estado leve de hipercoagulabilidad.
    - Mutación genética puntual.
    - La proteína alterada puede activarse correctamente, pero es resistente a la degradación por la Proteína C Activada (PCA) .
    - Test:
      - Cribado:
        - Resistencia a la PCA. La 2ª G del test tiene una especificidad diagnóstica equivalente al estudio del DNA y es menos costoso.

Press RD et al. Arch Pathol Lab Med.2002;126:1304-1318.

- Diagnóstico:
  - Estudio de la mutación
    - 3-5% en heterocigosis.
    - 1% en homocigosis.

# Trombofilias

- Mutaciones en factores de la coagulación:
  - Protrombina 20210:
    - Mutación genética puntual.
    - Se asocia a un riesgo elevado de TEV.
    - Test:
      - Cribado
        - Cuantificar protrombina (la concentración de protrombina está moderadamente aumentada en esta mutación).
      - Diagnóstico
        - Estudio de la mutación Mutación G20210A de la protrombina.
          - 2-3 % en heterocigosis.
          - Infrecuente en homocigosis.

# Trombofilias

- Otras deficiencias de proteínas anticoagulantes:
  - Proteína C y Proteína S.
    - La Proteína C y la Proteína S frenan la cascada de la coagulación.
    - La Proteína C Activada (PCA) se combina con la Proteína S (cofactor) actuando conjuntamente para degradar los factores VIIIa y Va.
  - Antitrombina III.
    - Inhibe la acción de varios factores (entre ellos, la trombina y los factores X, IX, XI, XII).
- Se han implicado como causa de abortos recurrentes con una frecuencia menor y se recomienda estudiarlas cuando exista una historia familiar o personal de TEV.

# Trombofilias

## ■ Homocisteína:

- Existe un riesgo 3-4 v mayor de abortos recurrentes en las mujeres con hiperhomocisteinemia.

Nelen WL et al. Fertil Steril. 2000;74:1196-9.

- **Recomendación:** cribado de los niveles de homocisteína puede ser más relevante que el estudio de las mutaciones en el gen de la MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa).
- Las mujeres embarazadas portadoras de la mutación en el gen de la MTHFR pueden tener niveles normales de homocisteína, probablemente por el suplemento de folato en la dieta.

Powers R et al. Obstet Gynecol. 2003; 101:762-6.

**Table 4** Classification of genetic causes of male infertility

Chromosome aberrations (homogenous or mosaicism)

Sex chromosomes

- 47,XXY (Klinefelter syndrome)
- 47,XYY and other YY-aneuploidies
- 46,XX and 45,X males
- Structural Y chromosome aberrations
  - Deletions
  - Rings
  - Isochromosomes
  - Inversions
  - Translocations

Autosomes

- Translocations (Robertsonian, reciprocal)
- Inversions
- Other structural abnormalities (inversions, ESACs (Extra Satellite Marker Chromosomes))
- Clinical syndromes
  - Trisomy 21
  - Partial duplications and deletions

Chromosomal heteromorphisms

- Inv(9)
- Familial inversion of the Y
- Yq+
- Increased/reduced pericentromeric constitutive heterochromatin
- Large-sized/duplicated satellites on acrocentric chromosomes

Gene mutations

Y-linked

- Microdeletions Yq11

X-linked

- Kallmann syndrome
- Androgen insensitivity syndrome/Kennedy disease

Autosomal

- Complex genetic syndromes in which fertility is a minor manifestation (such as, myotonic dystrophy or 5  $\alpha$  reductase deficiency)<sup>a</sup>
- Infertility as major manifestation
  - CFTR
  - Genes for  $\beta$ -subunit of LH and FSH and genes for LH and FSH receptors

Chromosomal alterations confined to sperms

- Primary severe testicular pathologies
- Following radio-chemotherapy

# Cariotipo en sangre periférica

- **Análisis del semen.**
  - **Frecuencia de alteraciones cromosómicas:**
    - **Espermiograma normal:** < 1%.
    - **Oligospermia:** < 5%.
    - **Azoospermia:** 10-15%.
- **La prevalencia de cromosopatías:**
  - **Población general:** < 1%.
  - **Varones infértiles:**
    - **3.7% en cromosomas sexuales.**
    - **2.4% en otros cromosomas.**
  - **Pérdida gestacional recurrente:**
    - **Feto:**
      - **50% abortos espontáneos en el primer trimestre.**
      - **0.5% aborto espontáneo cerca del final de la gestación.**
    - **Progenitores:** 4%.

# Cariotipo en sangre periférica

- **Muy recomendable:**
  - Azoospermia u oligospermia grave .
  - Abortos de repetición.
  - Fenotipo sugestivo de cromosomopatía.
  - Antecedentes de cromosomopatías en familiares de primer grado.
- **Recomendable:**
  - Desconocimiento de antecedentes familiares.
  - Antecedentes de cromosomopatías en abortos espontáneos anteriores.
  - Diagnóstico de esterilidad idiopática.

Riccaboni et al. Fertil Steril. 2008;89:800-8.

Soini S et al. Eur J Hum Genet. 2006;14:588-645.

# Fibrosis quística

- Frecuente mutación del gen CFTR en las alteraciones en la reproducción de causa masculina por:
  - Azoospermia obstructiva.
  - Ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes (CBAVD).
- 1-2% de los varones estériles sin FQ presentan CBAVD.
- 99% de los varones adultos con diagnóstico de FQ presenta CBAVD.

Blau H et al. Arch Dis Child. 2002;87:135-8.

# Fibrosis quística

- Se recomienda el estudio molecular del gen CFTR:
  - Ausencia unilateral o bilateral de conductos deferentes.
  - Pareja portadora de mutación de FQ.
  - Antecedentes familiares de FQ.
  - Alteraciones en la ecografía transrectal.
  - Azoospermia.
  - Bajo volumen de líquido seminal (menos 2 mL).
  - Pbas BQ características (pH < 7.2, ausencia o disminución de fructosa y de  $\alpha$  1-4 glucosidasa).

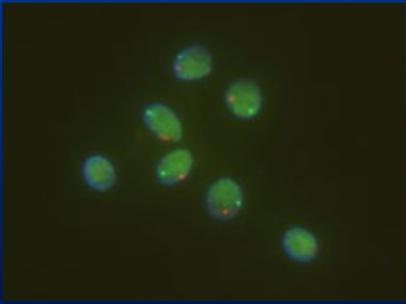
Dequeker et al. Eur J Hum Genet. 2009;17:51-65.

# Microdelección del cromosoma Y

- Microdelecciones en la región para el Factor de Azoospermia (AZF) que incluye varios genes esenciales en la espermatogénesis.
- Tres regiones:
  - AZFa:
    - Delecciones de esta región poco frecuentes. Cuando se pierde toda la región se produce un cuadro de azoospermia, mientras que la pérdida de uno solo de los genes originará solo una oligozoospermia.
    - Mutación puntual en el gen USP9Y(reg AZFa) gen necesario para la espermatogénesis normal.
  - AZFb.
  - AZFc: la más extensa y en donde más frecuentemente se producen delecciones. Se han identificado varias familias de genes, una de ellas es la familia DAZ que está formada por cuatro copias del gen agrupadas de a dos. La delección de esta región puede dar fenotipos distintos, desde oligozoospermia hasta azoospermia, pudiendo deberse esto al número de copias involucradas.

# Microdelección del cromosoma Y

- La microdelección del cromosoma Y puede acompañarse de:
  - Azoospermia no obstructiva.
  - Oligospermia
    - Grave de tipo secretor (FSH baja, menos de 1 millón espermatozoides/mL).
    - Moderada (1-5 millones espermatozoides /mL).
    - Leve (5-20 millones espermatozoides/mL). Raro.
- Se recomienda estudio molecular en azoospermia no obstructiva y oligospermia grave.



# FISH en espermatozoides

- La inadecuada recombinación meiótica y las aneuploidías en los cromosomas del espermatozoide, aumentan el riesgo de letalidad del embrión o de alteraciones fetales.
- Se recomienda:
  - En varones portadores de translocaciones cromosómicas.
  - Abortos recurrentes.
  - Inexplicables fracasos de FIV.

Carrel DT et al. J Androl. 2008;29:124-133.

# Estudio de meiosis en tejido testicular

- Las anomalías en la meiosis están relacionadas con la falta de disyunción de cromosomas homólogos y la producción de gametos aneuploides.
- Si estos gametos participan en la fertilización, el embrión resultante puede ser aneuploide, ya sea trisómico o monosómico.
- Dado que el estudio de la meiosis en tejido testicular no modifica el pronóstico se recomienda como estudio **OPCIONAL**.

# Fragmentación del ADN

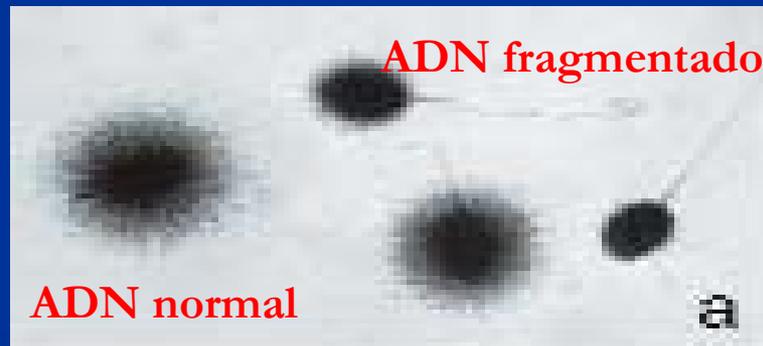
- Existen dos estrategias para estudiar la fragmentación del ADN en muestras de esperma:
  - Tecnologías que miden la capacidad diferencial que presenta el ADN, para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos.
    - Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA; Evenson et al., 1999).
    - DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization (DBDFISH; Fernández et al., 2000).
    - Ensayo cometa bajo condiciones desnaturalizantes (Singh et al., 1988).
    - Test Sperm Chromatin Dispersion (SCD; Fernández et al., 2003; Fernández et al., 2005)
  - Tecnologías que marcan las roturas en la cadena de ADN, tanto de cadena sencilla como de cadena doble, incorporando moléculas trazadoras en ciertos extremos de la rotura.
    - Terminal dUTP Nick-End Labeling (TUNEL; Lopes et al., 1998).
    - In Situ Nick Translation (ISNT; Gorczyca et al., 1993).

# SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY (SCSA)

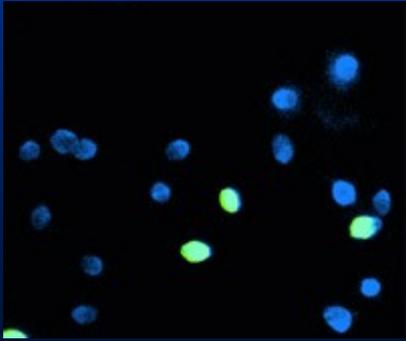
- El SCSA se basa en la susceptibilidad diferencial del ADN intacto o roto a ser **DESNATURALIZADO** por una solución ácida.
- Se utiliza una desnaturalización suave con una solución ácida. Una vez desnaturalizado el ADN, la muestra se tiñe con naranja de acridina. Este fluorocromo tiene la capacidad de intercalarse:
  - Entre las dos cadenas de ADN como un monómero, que al ser excitado, emite con una longitud de onda de 530 nm y se visualiza en **color verde**.
  - Al ADN de cadena sencilla, producto de la desnaturalización, emite en **rojo**, a una longitud de onda de 640 nm.
- Las células teñidas según este protocolo se hacen circular por un citómetro de flujo para discriminar entre ambos tipos de color.
- Aquellos individuos que presenten un porcentaje de fragmentación en su esperma, alrededor de un 30% o superior, tienen problemas de fertilidad.

# SPERM CHROMATIN DISPERSION TEST (SCD)

- Tratamiento ácido previo.
- Desproteínización.
- Tinción para la visualización de los resultados con microscopía.
  - Espermatozoides con ADN fragmentado no liberan bucles de ADN y no generan un halo de dispersión de la cromatina o si lo hacen este es de muy pequeño tamaño.
  - Espermatozoides sin fragmentación de su ADN generan halos amplios de dispersión de los bucles de cromatina, que se diferencian morfológicamente de los anteriores.



# Terminal dUTP Nick-End Labeling (TUNEL)



- La reacción se cataliza, in situ, mediante la acción de una transferasa terminal (TdT).
- Estas enzimas incorporan nucleótidos modificados con biotina en el extremo 3'-OH de la cadena afectada. Posteriormente, los nucleótidos modificados se detectarán tras una reacción con un anticuerpo conjugado con un fluorocromo como molécula trazadora. El nucleótido incorporado puede estar directamente marcado con el fluorocromo.
- La señal de marcado obtenida por cada espermatozoide, se incrementaría de acuerdo con el número de roturas que presente la cadena de ADN.

**¡¡Muchas gracias!!**