

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Detección molecular de microdeleciones del
cromosoma Y a partir de hisopado de cavidad bucal
en pacientes con oligozoospermia severa o
azoospermia**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
Analucia González Chávez
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala
2022

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Detección molecular de microdeleciones del
cromosoma Y a partir de hisopado de cavidad bucal
en pacientes con oligozoospermia severa o
azoospermia**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
Analucia González Chávez
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y
Microbiología

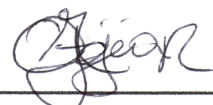
Guatemala
2022

Vo.Bo.:

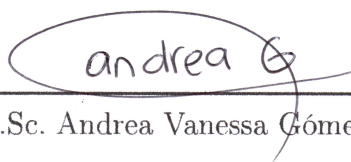
(f) 

Lic. Fredy Omar Mejía Rodríguez

Tribunal Examinador:

(f) 

Lic. Fredy Omar Mejía Rodríguez

(f) 

M.Sc. Andrea Vanessa Gómez Barillas

(f) 

Ph.D. Krisztina Rios-González

Fecha de aprobación: Guatemala, 14 de enero de 2022.

Este trabajo de investigación se llevó a cabo con financiamiento y en las instalaciones de Centro Procrea como parte del proyecto de implementación de un laboratorio de genética. Una excelente iniciativa, de un equipo de profesionales guatemaltecos, para poder brindar atención médica de calidad a todas aquellas parejas que buscan cumplir el sueño de formar una familia. Y aunque esta oportunidad surgió de manera inesperada, en medio de mucha incertidumbre a nivel mundial, y su culminación no fue fácil no quiero dejar de agradecer a todas aquellas personas que me acompañaron y contribuyeron de algún modo durante el camino.

Le agradezco a Dios, por darme la fortaleza, paciencia y motivación cada día de mi carrera universitaria y trabajo de graduación.

A mi familia por su paciencia y amor. Pero principalmente a mi mamá, por darme la vida y ser mi ejemplo a seguir. Gracias por siempre creer en mi, apoyarme incondicionalmente y motivarme todos los días.

A la Fundación Juan Bautista Gutiérrez por la confianza depositada al becarme y darme la oportunidad de ser uno de los privilegiados en Guatemala en tener acceso a educación superior, especialmente de tan buena calidad. A Majito, Karin, Gloria, Evelyn Estrada y Evelyn Barrascouth quienes durante estos cinco años confiaron en mis capacidades, y me regalaron los mejores consejos.

A mi asesor, Lic. Fredy Mejía, por abrirme las puertas al mundo de la reproducción asistida, darme la oportunidad de realizar esta investigación y mis prácticas profesionales y responder mis dudas sin importar la hora.

A la Dra. Pamela Pennington por su asesoría, apoyo y comprensión a lo largo de esta tesis.

A la Licda. Andrea Gómez por su positivismo, confianza, paciencia y apoyo incondicional.

A la Dra. Krisztina Rios-Gonzalez por sus consejos y siempre motivarme a dar lo mejor de mí.

A todos mis catedráticos, excelentes científicos y profesionales, que con sus cátedras, dedicación, entusiasmo y constancia me inspiraron a llegar alto.

A la Lic. María Cristina Bolaños por sus palabras de aliento, apoyo y asesoría. Pero sobre todo por su amistad y enseñanzas de vida.

A mis amigos, ya que sin ellos la universidad no hubiera sido tan divertida. Gracias por todas las escapadas por café, desvelos, risas y consejos. Por motivarme y darme la fuerza para seguir adelante.

Y a la vida por haberme permitido conocer a tantas excelentes personas.

Prefacio	III
Lista de figuras	VI
Lista de cuadros	VII
Resumen	VIII
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. Justificación	4
4. Marco teórico	6
4.1. Infertilidad masculina	6
4.1.1. Microdeleciones del cromosoma Y	6
4.2. Espermograma	9
4.2.1. Parámetros normales	9
4.2.2. Condiciones asociadas a parámetros patológicos	10
4.3. Diagnóstico de microdeleciones	11
5. Metodología	12
5.1. Variables	13
5.2. Hipótesis	13
5.3. Bioética	14
5.3.1. Aprobación por comité de ética	14
5.3.2. Reclutamiento y obtención de muestras	14
5.3.3. Proceso de reclutamiento	14
5.3.4. Tamaño de muestra	15
5.3.5. Riesgos y beneficios	16
5.4. Materiales y métodos	17
5.4.1. Obtención de muestras de semen	17
5.4.2. Procesamiento de muestras de semen	17
5.4.3. Selección de sujetos de estudio	18
5.4.4. Obtención de muestras para análisis molecular	18

5.4.5.	Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN)	18
5.4.6.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	18
5.4.7.	Revelación por electroforesis en gel de agarosa	19
5.4.8.	Descarte de muestras	19
5.4.9.	Análisis de datos	19
6.	Resultados	20
6.1.	Extracción de ADN	20
6.2.	Optimización de reacción en cadena de la polimerasa	22
6.3.	Comparación de eficiencia de muestras	23
6.4.	Detección de microdeleciones del cromosoma Y	25
7.	Análisis de resultados	31
8.	Conclusiones	34
9.	Recomendaciones	35
10.	Referencias	36
	36
11.	Anexos	39

Lista de figuras

1.	Prevalencia de microdeleciones de AZF en hombres infértiles a nivel mundial	7
2.	Representación esquemática del cromosoma Y con localización de subregiones AZF .	8
3.	Diagrama de flujo de la metodología propuesta	12
4.	Procedimiento de tinción para análisis de morfología espermática	17
5.	Validación de cebadores diseñados para los marcadores sY84 y sY86 de la región AZFa	22
6.	Validación de cebadores diseñados para los marcadores sY127 y sY134 de la región AZFb	22
7.	Validación de cebadores diseñados para los marcadores sY254 y sY255 de la región AZFc	23
8.	Validación de los cebadores diseñados para los marcadores control sY14 (SRY) y ZFX/ZFY	23
9.	PCR Multiplex A para validación de tipo de muestra utilizado para extracción de ADN	24
10.	PCR Multiplex B para validación de tipo de muestra utilizado para extracción de ADN	25
11.	PCR Multiplex A en individuos normospermicos (NO-06 a NO-19)	26
12.	PCR Multiplex B en individuos normospermicos (NO-06 a NO-19)	26
13.	PCR Multiplex A en individuos normospermicos (NO-20 a NO-32)	27
14.	PCR Multiplex B en individuos normospermicos (NO-20 a NO-32)	27
15.	PCR Multiplex A para pacientes diagnosticados con oligozoospermia severa	28
16.	PCR Multiplex B para pacientes diagnosticados con oligozoospermia severa	28
17.	PCR Multiplex A y B para pacientes diagnosticados con oligozoospermia severa . . .	29
18.	PCR Multiplex A y B realizado a pacientes con azoospermia no obstructiva	29
19.	PCR Multiplex A y B realizado a pacientes con azoospermia no obstructiva	30

Lista de cuadros

1.	Conceptualización, clasificación y operacionalización de las variables del estudio . . .	13
2.	Distribución de condiciones a correlacionar en pacientes con oligozoospermia severa .	16
3.	Distribución de condiciones a correlacionar en pacientes azoospermicos	16
4.	Programa de termociclado utilizado para PCR multiplex en EdvoCycler™ Jr. Personal PCR (EDVOTEK®), Washington, DC, EE. UU.)	19
5.	Estadística descriptiva de concentraciones y razones de absorbancia para ADN genómico aislado de muestra de sangre completa de pacientes normospérmicos	20
6.	Estadística descriptiva de concentraciones y razones de absorbancia para ADN genómico extraído a partir de hisopado de cavidad bucal de pacientes normospérmicos . .	21
7.	Estadística descriptiva de concentraciones y razones de absorbancia para ADN genómico extraído a partir de hisopado de cavidad de pacientes oligozoospermicos severos	21
8.	Estadística descriptiva de concentraciones y razones de absorbancia para ADN genómico aislado de células de cavidad bucal pertenecientes a pacientes con azoospermia no obstructiva	21
9.	Prueba de igualdad de proporciones de dos muestras	30
10.	Secuencia de cebadores para detección de STS para microdeleciones del cromosoma Y	39
11.	Concentraciones y razones de pureza obtenidas con NanoDrop OneC para ADN genómico extraído a partir de hisopado de cavidad bucal a individuos normospérmicos	43
12.	Concentraciones y razones de pureza obtenidas con NanoDrop OneC para ADN genómico extraído a partir de sangre de individuos normospérmicos	44
13.	Concentraciones y razones de pureza obtenidas con NanoDrop OneC para ADN genómico extraído a partir de hisopado de cavidad bucal a pacientes con oligozoospermia severa	44
14.	Concentraciones y razones de pureza obtenidas con NanoDrop OneC para ADN genómico extraído a partir de hisopado de cavidad bucal a pacientes con azoospermia no obstructiva	45
15.	Panel extenso de marcadores STS propuesto por EAA/EMQN para la detección de microdeleciones del cromosoma Y	46

La infertilidad es un problema de salud que afecta a más del 10% de las parejas en edad reproductiva a nivel mundial. Entre 40 - 50% de los casos se deben a un factor masculino, siendo las microdeleciones del cromosoma Y la segunda causa genética más común. Durante la última década, diversos estudios han asociado la ocurrencia de microdeleciones en la región del Factor de Azoospermia (AZF por sus siglas en inglés) con oligozoospermia severa y azoospermia. Sin embargo, estas investigaciones no abordan la prevalencia de esta alteración cromosomal en la población latinoamericana. Por lo que se implementó el método de PCR multiplex recomendado por EAA/EMQN para la detección de las seis microdeleciones de mayor relevancia clínica. Este método fue modificado exitosamente para el utilizar muestras de hisopado de cavidad para la extracción de ADN genómico en lugar de punción venosa. Se identificaron microdeleciones en ocho de los 24 participantes con problemas de fertilidad, 5 de ellos con oligozoospermia severa y 3 con azoospermia no obstructiva. Las microdeleciones más comunes se identificaron en AZFa, mientras que solo se identificó un paciente con delección de AZFb. Durante este estudio no se detectaron deleciones en AZFc a pesar de ser las más comunes a nivel mundial, por lo que se recomienda ampliar del panel de marcadores STS evaluados. Además, debido a la incidencia de esta patología se sugiere ampliar el tamaño de la muestra analizada con tal de reclutar una mayor cantidad de individuos con problemas de fertilidad.

La infertilidad es un problema de salud pública que afecta entre el 10 % al 15 % de las parejas en edad reproductiva a nivel mundial (Ambulkar y cols., 2014). Aunque esta condición se puede deber a muchas causas, se ha identificado que el 50 % de los casos presentan un problema de factor masculino. Por lo que, en cualquier clínica de fertilidad, previo a iniciar un tratamiento con técnicas de reproducción asistida (TRA), se debe realizar con un estudio andrológico que incluye el análisis de semen para orientar el diagnóstico del paciente a un problema anatómico o endocrino (Dominguez y Reijo Pera, 2013). Sin embargo, la infertilidad masculina también puede presentar causas genéticas como las microdeleciones del cromosoma Y. Esta es la segunda causa genética de infertilidad masculina más común, con una prevalencia promedio de 7.5 % e incidencia de hasta 10 % a nivel mundial (Colaco y Modi, 2018). Se define como pequeñas pérdidas submicroscópicas de ADN en el brazo largo del cromosoma Y, específicamente en la región del Factor de Azoospermia (AZF). Durante la última década, la pérdida de segmentos y genes específicos de las secciones activas de AZF se ha asociado con dos condiciones clínicas: oligozoospermia severa y azoospermia (Sha y cols., 2020; Krausz, Escamilla, y Chianese, 2015)

La azoospermia se define como la ausencia total de espermatozoides en el eyaculado, donde el 7 – 23 % de los casos a nivel mundial se atribuyen a deleciones en el cromosoma Y. Mientras que la oligozoospermia severa, condición en que la concentración de espermatozoides por mililitro de eyaculado es menor a 5 millones y la movilidad espermática se encuentra reducida, está asociada hasta con el 8 % de los casos causados por esta condición genética (Alonso-Cerezo y cols., 2018). Hasta la fecha se han identificado tres tipos básicos de microdeleciones completas del cromosoma Y, clasificadas según la región del factor de azoospermia afectada. Estas pueden ser microdeleciones en la subregión AZFa, AZFb o AZFc. Siendo estas últimas las más frecuentes (80 %), seguidas por AZFa (0.5 – 4%), AZFb (1 – 5 %) y por último AZFbc (1 – 3 %) (Alonso-Cerezo y cols., 2018; Johnson y cols., 2019)

Durante la última década, múltiples investigadores han descrito la ocurrencia de las microdeleciones del cromosoma Y en hombres infértiles en todo el mundo. Sin embargo, la mayoría de los estudios abordan poblaciones asiáticas y europeas, pero no latinoamericanas. Por lo que tomando esto en cuenta, junto al alto costo de los TRA en Guatemala y que las microdeleciones del cromosoma Y son una condición completamente heredable entre la descendencia masculina (Rodríguez Salvador, 2018). En este trabajo se plantea el implementar y optimizar un método molecular para la detección de las seis microdeleciones del cromosoma Y más comunes, por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) multiplex, a partir de células de la cavidad bucal recolectadas mediante hisopado.

Esto no solo con el fin de establecer relaciones genotipo – fenotipo, entre el diagnóstico andrológico del paciente y las microdeleciones detectadas. Sino también para ofrecer al paciente un método de alta precisión a partir de una toma de muestra más rápida y menos invasiva.

2.1. Objetivo general

Implementar un método de diagnóstico molecular para la detección de microdeleciones del cromosoma Y a partir de hisopado de cavidad bucal, en pacientes con azoospermia u oligozoospermia severa.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar un estudio piloto para comparar la efectividad del uso de muestras de hisopado de cavidad bucal versus muestras de sangre periférica para la detección de microdeleciones en el cromosoma Y mediante reacción en cadena de la polimerasa multiplex.
- Optimizar una PCR multiplex, para la detección de microdeleciones del cromosoma Y en pacientes con azoospermia u oligozoospermia severa a partir de hisopado de cavidad bucal.
- Correlacionar las microdeleciones del cromosoma Y detectadas con las manifestaciones clínicas observadas en los sujetos del estudio.

La infertilidad es definida por la Organización Mundial de la Salud (2021) como la incapacidad de una pareja, en edad reproductiva, para concebir un embarazo luego de 12 meses continuos de relaciones sexuales sin utilizar métodos anticonceptivos. Este problema afecta alrededor del 15 % de las parejas a nivel mundial, y aunque se puede deber a diversos factores hasta el 50 % de los casos suelen presentar una causa masculina (Krausz y Riera-Escamilla, 2018). Actualmente, se reconoce que entre el 15 – 20 % de estos casos se deben a razones genéticas como anormalidades cromosómicas, mutaciones en genes autosómicos o microdeleciones del cromosoma Y (Akınsal, Baydilli, Dündar, y Ekmekçioğlu, 2018). Estas últimas se definen como pequeñas pérdidas de ADN del brazo largo del cromosoma Y, las cuales no son visibles bajo el microscopio y corresponden a la segunda causa genética de infertilidad más común con una incidencia global de 2 – 10 % (Riquenes, Teruel, Mesa, Peña, y Heredia, 2017).

En el alelo 11 del brazo largo del cromosoma Y (Yq11) se encuentra el locus, factor de azoospermia (AZF). Este se encuentra conformado por tres regiones (AZFa, AZFb y AZFc) de diferentes longitudes que albergan más de 14 genes fundamentales para el control de la espermatogénesis (Pérez y Pérez, 2013). Cada una de estas regiones puede ser eliminada de forma independiente o en combinación, por lo que estas microdeleciones han sido identificadas como la causa de una espermatogénesis defectuosa en el 1 – 8 % de los hombres que presentan oligozoospermia severa y en el 7 – 23 % de los hombres con azoospermia no obstructiva (Akınsal y cols., 2018; Rodríguez Salvador, 2018). La azoospermia, una condición fácilmente diagnosticable a partir de un espermograma, se define como la ausencia total de espermatozoides en el eyaculado. A esta se le atribuyen entre 2 – 3 % de los trastornos masculinos vistos en la consulta de infertilidad (Pérez y Pérez, 2013; Kleiman y cols., 2012). Mientras que a la oligozoospermia severa, condición diagnosticada cuando el recuento de espermatozoides es menor a 5 millones por mililitro de eyaculado, se le atribuyen el 30 % de los casos de microdeleciones a nivel mundial (Jensen, Fode, Østergren, y Sønksen, 2019).

Aunque con el avance y mejora de las técnicas de reproducción asistida (TRA) ha sido posible la reproducción para hombres con las condiciones antes mencionadas, esto también ha provocado un mayor interés en el papel que desarrollan las microdeleciones del cromosoma Y en este problema. Ya que se conoce que los distintos fenotipos histopatológicos se correlacionan con el sitio de la microdelección, pues las deleciones completas de AZFa y AZFb se suelen asociar con azoospermia, mientras que la delección completa de AZFc se relaciona con hipoespermatoogénesis que conduce a criptozoospermia, oligozoospermia o azoospermia (Sha y cols., 2020; Colaco y Sakkas, 2018). Por lo que, la detección de microdeleciones en AZF antes de someterse a tratamientos con TRA es una

herramienta de diagnóstico fundamental para el pronóstico del procedimiento. Por esto, el diagnóstico molecular de dichas alteraciones es primordial. Sobre todo, en la sociedad guatemalteca donde el costo de las TRA es considerablemente alto para la mayoría de la población. Además, que las microdeleciones del cromosoma Y son una condición completamente heredable entre la descendencia masculina (Rodríguez Salvador, 2018).

Por lo tanto, se plantea optimizar un método de diagnóstico molecular de las microdeleciones del cromosoma Y por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) multiplex con sequence-tagged sites (STSs) específicos, a partir de células de la cavidad bucal recolectadas mediante hisopado. Esto para demostrar que la efectividad y precisión de la técnica con ADN extraído de células recolectadas por medio de hisopado es la misma que para leucocitos extraídos de sangre venosa como ha sido previamente validado. Y así establecer un método de toma de muestra menos invasivo para el paciente, que brinde un diagnóstico de la misma calidad, en un menor tiempo. Además, los resultados de este estudio servirán para establecer la prevalencia de las microdeleciones en AZF en una población diferente a las previamente analizadas, y junto a esto, correlacionar la incidencia y tipo de deleción con las condiciones clínicas observadas en los sujetos.

4.1. Infertilidad masculina

La infertilidad es definida por la Organización Mundial de la Salud (2021) como la incapacidad de una pareja, en edad reproductiva, para concebir un embarazo luego de 12 meses continuos de relaciones sexuales regulares sin utilizar métodos anticonceptivos. Este es un problema de salud pública, con impacto psico-socioeconómico, que actualmente afecta entre el 10 – 15 % de las parejas a nivel mundial (Ambulkar y cols., 2014). Aunque se considera que este es un problema con diversas causas, se ha identificado que el 50 % de los casos se deben a un factor de infertilidad masculina. Esta condición se puede clasificar como no idiopática cuando se conoce la causa como componentes congénitos, endócrinos, inmunológicos o incluso por el estilo de vida; mientras que se considera un caso de infertilidad idiopática cuando no se conoce qué la provoca (Colaco y Sakkas, 2018).

Previamente, Gholami y colaboradores (2017) estimaron que más de 30 % de los casos de infertilidad masculina se deben a anomalías en la producción de espermias por un defecto genético. Ya que estos alteran los parámetros normales del semen o causan condiciones como azoospermia. Las anomalías cromosómicas causantes de estos defectos presentan una alta incidencia (12.7 %), donde las anomalías estructurales (11.7 %) y numéricas (0.94 %) se suelen detectar mediante cariotipo (Chabchoub, Kdous, Zhioua, Gaied, y Merdassi, 2019; Gonçalves y cols., 2017). Sin embargo, existe otra causa genética de infertilidad masculina, las microdeleciones del brazo largo del cromosoma Y.

4.1.1. Microdeleciones del cromosoma Y

Durante la última década, varios autores han reportado una estrecha relación entre la infertilidad masculina y las microdeleciones del cromosoma Y. Estas se definen como pérdidas submicroscópicas de ADN en la región proximal del brazo largo del cromosoma Y (Akınsal y cols., 2018). Y debido a que su incidencia en hombres infértiles es más de 10 veces mayor que en la población general, también se le considera la segunda causa genética de infertilidad masculina más común (Rives, 2014).

El cromosoma Y es uno de los más pequeños en el genoma humano, correspondiendo a 2 – 3 % del genoma haploide. En gran parte este es heterocromático, pobre en genes y únicamente se recombina con su homólogo en sus regiones pseudoautosómicas (5 %). Al resto del cromosoma se le conoce como región Y específica para hombres o MSY, donde aproximadamente dos tercios están

compuestos por tres bloques de secuencias altamente repetitivas llamadas subregiones del Factor de Azoospermia (AZF, por sus siglas en inglés) (Kohn, Kohn, Owen, y Coward, 2019; Colaco y Sakkas, 2018).

Este locus se encuentra en el alelo 11 del brazo largo del cromosoma Y. A sus subregiones se les denomina AZFa, AZFb y AZFc, y son conocidas por contener múltiples sitios frágiles altamente susceptibles a deleciones, posiblemente causadas por errores durante su auto-recombinación (Colaco y Modi, 2019). Estas regiones difieren en sus longitudes, mientras albergan más de 14 genes que son críticos para la correcta espermatogénesis y desarrollo de gónadas masculinas (Pérez y Pérez, 2013). Cada una de estas regiones puede ser eliminada de forma independiente o en combinación, causando la remoción completa o parcial de secciones de AZF. Un metaestudio realizado por (Colaco y Modi, 2018) identificó la prevalencia promedio de microdeleciones del cromosoma Y en aproximadamente el 7.5% de los hombres infértiles a nivel mundial, siendo posible observar variaciones de su frecuencia según la ubicación geográfica y grupo étnico al que pertenecen como se muestra en la Figura 1.

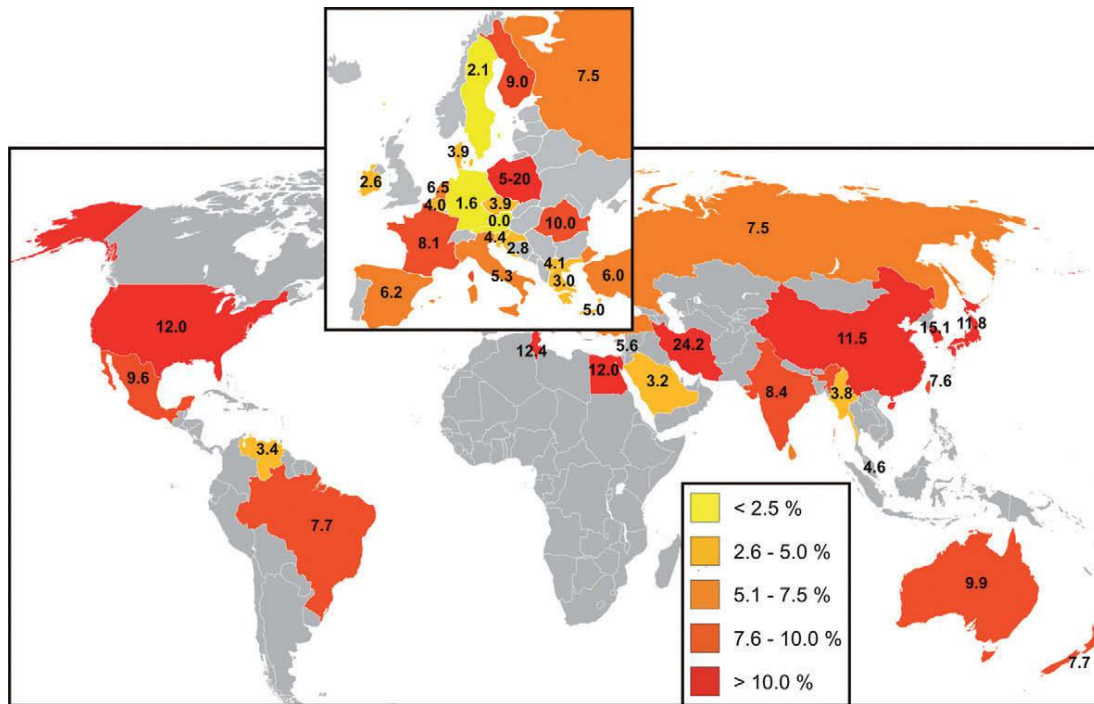


Figura 1: Prevalencia de microdeleciones de AZF en hombres infértiles a nivel mundial (Simoni y cols., 1999).

Factor de azoospermia

Como los demás cromosomas, el cromosoma Y está compuesto por un brazo corto (p) y un brazo largo (q) que se unen por una región centrónica (P. H. Vogt, Bender, Zimmer, y Strowitzki, 2017). Sin embargo, este cromosoma presenta una estructura única y compleja a la vez, porque no se recombina con su homólogo, el cromosoma X, durante la meiosis masculina. Dentro del brazo largo se ubica el factor de azoospermia (AZF) que previamente ha sido asociado con pacientes azoospermicos. Este se compone por tres subregiones: AZFa, AZFb y AZFc. Originalmente se creía que estas regiones no se encontraban sobrepuestas, pero en los últimos años se ha observado lo contrario para las dos últimas como se muestra en la Figura 2 (Krausz, Hoefsloot, Simoni, y Tüttelmann, 2013; Kleiman y cols., 2012).

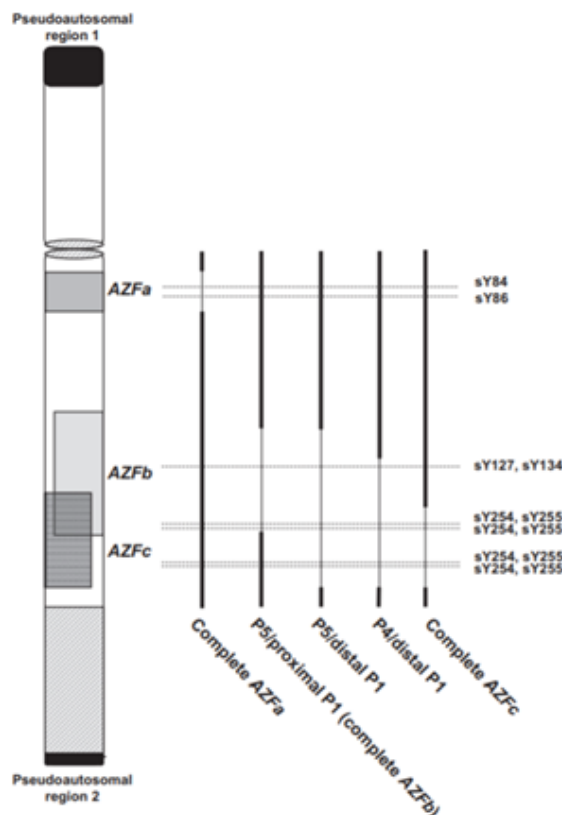


Figura 2: Representación esquemática del cromosoma Y con localización de subregiones AZF (Krausz y cols., 2013).

AZFa, un locus de 1.1 megabases ubicado en la región proximal de Yq11, está compuesta por 15 genes donde tres son codificantes para proteínas, DDX3Y, UTY y USP9Y; uno codifica una unidad de transcripción testicular específica, TTY15, y los otros 11 son pseudogenes. Mientras que AZFb, ubicada en la región central de Yq, compone sus 3.2 Mb con 132 genes donde 15 codifican proteínas, 17 no codifican ARNs y 100 son pseudogenes. Finalmente, AZFc contiene 97 genes y 7 factores de transcripción testicular específicos en 3.5 megabases. 11 de estos genes codifican proteínas, 10 no codifican ARNs y 76 son pseudogenes. Esta es la subregión en la que se detectan más deleciones en hombres infértiles (Krausz y cols., 2015; Navarro-Costa, Plancha, y Gonçalves, 2010).

Las microdeleciones en AZFa ocurren debido a la recombinación de dos direcciones, donde repeticiones de 10 kilobases (kb) con una distancia de 800 kb entre sí causan el síndrome de Sertoli solo (Gholami, Jafari-Ghahfarokhi, Nemati-Dehkordi, y Teimori, 2017). Mientras que las microdeleciones en AZFb se asocian con alteraciones en la maduración de espermatozoides (Sha y cols., 2020). Y las deleciones más comunes en AZFc son parciales e involucran la pérdida de 2 copias del gen DAZ, una copia de CDY1 y BPY2 (Colaco y Modi, 2018; Rodríguez Salvador, 2018).

Estas microdeleciones no se asocian únicamente con pacientes azoospermicos, sino también a aquellos con concentración y movilidad espermática reducida (Sen y cols., 2015). Como lo demostró Akinsal y colaboradores (2018), donde la incidencia de microdeleciones en el cromosoma Y se identificó como la causa de espermatogénesis defectuosa en 1 – 8% de los hombres que presentan oligozoospermia severa y en 7 – 23% de los hombres con azoospermia no obstructiva. Por lo tanto, la ruptura de AZF puede considerarse como la causa más común de falla espermatogénica diagnosticable molecularmente en el contexto de las dos condiciones clínicas ya mencionadas.

4.2. Espermograma

El espermograma o análisis de semen es una prueba de laboratorio simple que se utiliza para evaluar la calidad del semen y los espermatozoides. Por lo que resulta básica para conocer la condición de los pacientes masculinos que asisten a una clínica de reproducción asistida ya que brinda una visión más amplia de su capacidad reproductiva. Esta se compone de dos etapas, una evaluación macroscópica que permite valorar las características generales del semen como volumen, color, pH, viscosidad y licuefacción. Mientras que en la etapa microscópica se realiza el recuento de los espermatozoides presentes por mililitro de eyaculado, el tipo de motilidad que presentan, además de su morfología y vitalidad (World Health Organization, 2021).

La evaluación de los dos primeros parámetros microscópicos es útil para evaluar la capacidad del espermatozoide para llegar al ovocito y fecundarlo, mientras que la morfología espermática se asocia a la capacidad de fertilización (Vásquez y Echeverri, 2007). Además, ya que el semen además de los espermatozoides presenta el líquido seminal conformado por la secreción de las vesículas seminales, la próstata, el epidídimo y las glándulas bulbouretrales también permite evaluar la condición de las glándulas. Por esto, el análisis de varios parámetros en conjunto presenta un mayor valor predictivo que el uso de los parámetros individuales. Sin embargo, el que los resultados sean confiables no solo depende del correcto análisis de la muestra sino también de su correcta recolección. Ya que la muestra seminal debe ser tomada con un período de abstinencia sexual de 3 a 5 días, depositada en un recipiente nuevo y estéril con boca ancha y correctamente rotulado con la información del paciente. Además, se debe recuperar todo el volumen de la eyaculación ya que la primera porción puede contener hasta el 50 % del total de espermatozoides (World Health Organization, 2021).

4.2.1. Parámetros normales

El análisis macroscópico de la muestra de semen se debe iniciar a los 20 minutos de haberla recibido para poder valorar su licuefacción que debe ser completa. Luego se evalúa la apariencia del semen, esperando que sea homogénea y con color entre blanco, gris claro o ligeramente amarilloso. Además, se debe observar la presencia de gránulos de gel y la viscosidad del semen. Posteriormente, se determina el volumen de la muestra por diferencia de peso, asumiendo una densidad de 1 g/ml. El volumen normal del eyaculado, para un mínimo de dos días de abstinencia, debe ser igual o mayor a 1.2 mililitros. Y por último se mide el pH con tiras reactivas, donde los valores normales se encuentran entre 7.2 - 8.0 (World Health Organization, 2021).

Durante el examen microscópico del semen se evalúan los parámetros antes mencionados, pero también se busca la presencia de otros elementos celulares diferentes a los espermatozoides como bacterias, leucocitos o restos subcelulares (Vásquez y Echeverri, 2007). Este se debe realizar sin diluir la muestra, en duplicado e idealmente a 37°C.

El recuento de espermatozoides se realiza en cámara Makler, tomando en cuenta únicamente a espermatozoides completos con cabeza y cola. Se reporta la concentración total como millones de espermatozoides por eyaculado, y la concentración espermática como millones por mililitro. Los valores de referencia brindados por la Organización Mundial de la Salud (2021) para estos parámetros son 18×10^6 espermatozoides por ml y 38×10^6 espermatozoides por eyaculado. Con esta misma cámara y muestra se evalúa la motilidad espermática, la cual se clasifica como movilidad progresiva (MP), motilidad no progresiva (MNP) y espermatozoides inmóviles (IM). La unión de las dos primeras categorías determina los espermatozoides móviles en la muestra y debe ser igual o mayor al 43 %, mientras que solo la primera categoría debe representar al menos 27 %. Por otra parte, la vitalidad espermática permite saber si los espermatozoides inmóviles están vivos o no. Esta se analiza con eosina al 0.5 % a 400X debido a que pierden su capacidad de permeabilidad de membrana, y debe ser igual o mayor a la movilidad total observada siendo el valor mínimo de referencia 53 %. La morfología espermática se evalúa a partir del examen detallado de 200 espermatozoides

por laminilla con tinción de Papanicolaou. Estos se pueden clasificar como normales ($\geq 4\%$) o con defecto de cabeza, cola y/o pieza intermedia, también se valora la presencia de gotas citoplásmicas (World Health Organization, 2021).

4.2.2. Condiciones asociadas a parámetros patológicos

El volumen del eyaculado es un parámetro que depende de los días de abstinencia sexual, la excitación al tomar la muestra, edad del paciente y actividad de la próstata y glándulas seminales. Por lo que volúmenes menores a 1.2 ml, hipospermia, se asocian con una deficiencia en la secreción de las vesículas seminales o eyaculación retrógrada, pero también con niveles bajos de testosterona (Balitán Amoretty, Blanco Knotek, y Hernández, 2018). Por otro lado, el pH seminal se ve influenciado por las secreciones de las glándulas sexuales accesorias. Cuando este es ácido, menor a los valores indicados, se produce mortalidad de los espermatozoides. Un pH ácido y volumen menor a 1.20 ml se asocia con agenesia de las vesículas seminales, mientras que valores de pH mayores a 8.0 son indicativos de procesos inflamatorios e infecciones crónicas. La mucólisis o licuefacción del líquido seminal se debe a la secreción de la próstata, mientras que la coagulación se da por acción de las secreciones de las vesículas seminales. Por lo tanto, una licuefacción incompleta y aumento de la viscosidad de la muestra se asocian con procesos inflamatorios de las glándulas sexuales accesorias. Esto impide el libre desplazamiento de los espermatozoides y causa astenozoospermia (Vásquez y Echeverri, 2007). Alteraciones en el color del semen pueden ser indicativos de la presencia de sangre cuando es café, o problemas hepáticos cuando es amarillo (World Health Organization, 2021).

La estructura flagelar del espermatozoide es clave, ya que permite su desplazamiento en el líquido seminal, cavidad vaginal, útero y trompas uterinas. Cuando una muestra no cuenta con movilidad progresiva igual o mayor al 43%, donde al menos el 27% se debe a movilidad progresiva rápida esta se diagnostica como astenozoospermia. Aunque esta alteración es frecuente en los varones infértiles, se debe tomar en cuenta que la movilidad disminuida también puede deberse a infecciones de transmisión sexual, varicocele testicular, días de abstinencia prolongados y consumo de tabaco o alcohol (Vásquez y Echeverri, 2007). La infertilidad en humanos se explica al presentar 70% o más de sus espermatozoides con alteraciones. Por lo que se clasifica como teratozoospermia cuando no se cumple con el porcentaje de formas normales (4%), esta puede ser leve cuando sí se presenta una cantidad de formas normales o grave cuando ninguno de los 200 espermatozoides observados presenta morfología normal (World Health Organization, 2021). Este parámetro puede ser alterado por infecciones de transmisión sexual, altas temperaturas, estrés, varicocele, tóxicos del ambiente, antibióticos o consumo de drogas, tabaco y alcohol. Sin embargo, también existen factores genéticos como la agenesia del acrosoma y la ausencia de brazos de dineína en el flagelo que pueden alterar estos dos parámetros microscópicos (World Health Organization, 2021).

Existen muchas condiciones diagnosticadas a partir del recuento de espermatozoides. Cuando la concentración es mayor a 250 millones por ml, polizoospermia, se sospecha de anomalías cromosómicas. Mientras que la oligozoospermia, recuento igual o menor a 20 millones/ml, no solo se puede atribuir a alteraciones cromosómicas sino también a varicocele, problemas endocrinos, orquitis por paperas o factores externos como medicamentos u otros productos químicos (Vásquez y Echeverri, 2007). Esta se puede clasificar como severa cuando el recuento es menor a 5×10^6 espermatozoides por mililitro (Kohn y cols., 2019). Finalmente, la azoospermia o ausencia total de espermatozoides en el semen puede deberse a una obstrucción de los canales que impide la liberación de los espermatozoides en el eyaculado, o ser no obstructiva producto de una falla testicular severa o microdeleciones en el cromosoma Y (Akinsal y cols., 2018).

4.3. Diagnóstico de microdeleciones

Generalmente, las microdeleciones de AZF son demasiado pequeñas para ser detectadas mediante un cariotipo (Chabchoub y cols., 2019). Por esto, la biología molecular es útil para la clara identificación de microdeleciones del cromosoma Y en poco tiempo. Según el protocolo establecido por la Academia Europea de Andrología (EAA) y la Red Europea de Calidad de Genética Molecular (EMQN), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex para detectar sequence tagged-sites (STS) es el mejor método para el cribado de microdeleciones de AZF. Esta es una prueba recomendada para hombres infértiles con recuentos de espermatozoides menores a 5 millones por mililitro, se deben utilizar al menos seis STS para detectar la eliminación de subregiones de AZF y puede identificar más del 95 % de las deleciones (Gholami y cols., 2017).

Para esto se utilizan cebadores específicos para los STS en MSY, los cuales amplifican secuencias anónimas del cromosoma o genes. Aunque actualmente se conoce el mapa de MSY, aun no se conoce por completo el papel de los genes individuales y las unidades de transcripción en la espermatogénesis y su papel causal en la infertilidad (Simoni y cols., 1999). Por esto, no es tan relevante si los cebadores utilizados amplifican regiones o genes específicos en MSY; sino que es más importante que el panel de cebadores por utilizar se derive de regiones del cromosoma Y que no sean polimórficas, pero que sí se eliminen específicamente en hombres afectados por oligozoospermia y azoospermia (Krausz y cols., 2013).

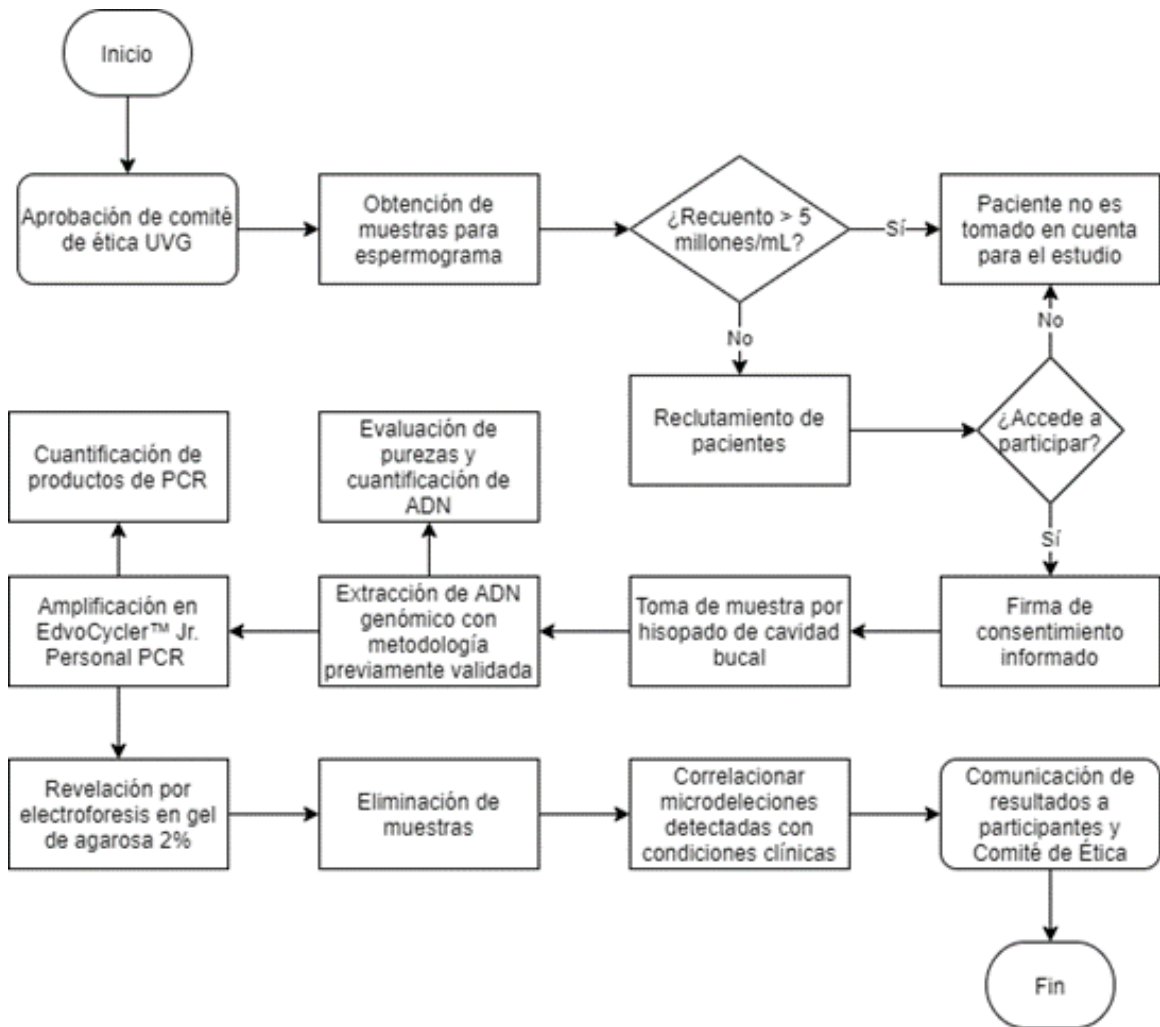


Figura 3: Diagrama de flujo de la metodología propuesta

5.1. Variables

Cuadro 1: Conceptualización, clasificación y operacionalización de las variables del estudio

Variable	Clasificación	Definición conceptual	Definición operacional
Edad	Cuantitativa Continua	Tiempo que ha vivido una persona al día de realizar el estudio (OMS, 2010).	Obtenida del historial médico del paciente.
Tiempo de abstinencia	Cuantitativa Discreta	Tiempo transcurrido desde la última eyaculación previa a la toma de muestra (OMS, 2010).	Obtenida del historial médico del paciente.
Uso de medicamentos	Cuantitativa Nominal	Consumo de medicamentos que puedan alterar a los espermatozoides o algún otro parámetro evaluado en el espermograma (OMS, 2010).	Obtenida del historial médico del paciente.
Condición de infertilidad	Cuantitativa Nominal	Manifestación clínica de infertilidad diagnosticada que lo haya incluido en el estudio, oligozoospermia severa o azoospermia (OMS, 2010).	Determinada durante espermograma donde recuento de espermatozoides nulo corresponde a azoospermia, mientras que menor o igual a 5 millones por ml se clasifica como oligozoospermia severa.
Región de microdeleciones detectada	Cuantitativa Nominal	El locus AZF se conforma por 3 regiones AZFa, AZFb y AZFc (Sha <i>et. al</i> , 2019).	Realizando PCR multiplex con cebadores específicos para dos loci dentro de cada subregión.
Concentración de ADN	Cuantitativa Razón	Cantidad de ADN extraído a partir de muestra de participante en el estudio, con kit comercial.	Absorbancia @ 260 nm en espectrofotómetro.
Pureza de ADN	Cuantitativa Razón	Limpieza e integridad del ADN extraído a partir de muestras biológicas, indicativo de contaminación.	Absorbancia @ 280, 260 y 230 nm en espectrofotómetro para determinación de razones A 260/280 y A 260/230.

5.2. Hipótesis

- Las microdeleciones en AZF detectadas a partir de sangre venosa de un paciente son las mismas que se detectan a partir de células de la cavidad bucal.
- La cantidad de microdeleciones el cromosoma Y detectadas será mayor en los hombres con oligozoospermia severa y azoospermia no obstructiva que en aquellos sin condiciones clínicas preexistentes y fertilidad comprobada.

5.3. Bioética

5.3.1. Aprobación por comité de ética

El protocolo de investigación y el consentimiento informado utilizados en este trabajo de graduación fueron previamente revisados y autorizados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias y Humanidades de la Universidad del Valle de Guatemala. Este aval fue solicitado debido a que se realiza un estudio que requiere de la recolección y análisis metódico de muestras biológicas. Por lo que involucra interacción e intervención física con sujetos humanos, además de la solicitud de información sensible e identificable y la realización de pruebas genéticas. Este proyecto no incluye poblaciones vulnerables ya que el grupo de interés son individuos masculinos, guatemaltecos, mayores a 18 años, y seleccionados a partir de un espermograma previamente analizado en Centro Procrea® que haya sido diagnosticado como: normozoospermia, oligozoospermia severa o azoospermia por causas naturales. El dictamen de aprobación brindado el 15 de noviembre, 2021 se presenta en el anexo 1.

5.3.2. Reclutamiento y obtención de muestras

El estudio piloto se conformó por cinco individuos de sexo masculino que contaran con hijos propios concebidos de manera natural. Previo a la toma de muestras, se les solicitó llenar y firmar un consentimiento informado, en el cual se les brindó información del proyecto y se les garantizó que no habría represalias por su renuencia al estudio. A cada uno de estos individuos se les tomó dos tipos de muestras, raspado de cavidad bucal recolectado con hisopos con fibras de nylon (Global Roll®, Hangzhou, China) y 1.5 ml de sangre venosa del antebrazo (Liu, Song, y Jiang, 2019). Esto con el fin de comparar los resultados de la extracción de ADN y amplificación molecular de ambas muestras, para validar el uso de hisopado de cavidad bucal para los sujetos de la siguiente fase del estudio.

5.3.3. Proceso de reclutamiento

Criterios de inclusión

Individuo de sexo masculino, con 18 años o más, hablante de español y cuyo espermograma haya sido previamente analizado en Centro Procrea®. La muestra brindada debe ser producto de 3 a 5 días de abstinencia y el individuo debe no haber consumido cualquier medicamento contraproducente para la espermatogénesis. Además, no debe presentar enfermedades bucales o en garganta, y acceder a no fumar, lavarse los dientes, masticar chicle, comer o beber agua u otro líquido durante al treinta minutos previo a la toma de muestra. Idealmente debe ser capaz de leer y firmar el consentimiento informado de manera autónoma, pero se contempla el uso de un testigo para individuos analfabetas anuentes a participar.

Criterios de exclusión

Individuo de sexo masculino menor a la mayoría de edad (18 años), con infección en la boca y/o garganta y cuyo espermograma no haya sido evaluado en Centro Procrea®. Tampoco serán incluidos aquellos individuos que hayan fumado, masticado chicle, comido, lavado los dientes o bebido agua u otro líquido 30 minutos antes del muestreo. La restricción de edad, sexo y salud bucal es necesaria para la validación del método ya que se requiere de individuos con madurez reproductiva, capaces

de brindar su consentimiento y que no introduzcan variables confusoras durante la experimentación como la contaminación por microorganismos.

Para todo individuo que cumpliera con los criterios de inclusión, se extrajo su información de contacto de la base de datos llenada al momento de brindar su muestra para espermograma. Esto fue realizado por el Lic. Fredy Mejía para resguardar la privacidad de los individuos renuentes a participar. Por medio de un mensaje de texto o correo electrónico, según la información de contacto que brindó, se le solicitó a cada paciente participar en una videollamada en línea no grabada con los coinvestigadores para que explicarle el proyecto de investigación y el consentimiento informado del estudio. Durante esta sesión se hizo énfasis en que este es un proyecto de investigación que forma parte de un trabajo de graduación realizado por una alumna de la Universidad del Valle de Guatemala en conjunto con Centro Procrea®. En caso de que el individuo aceptara a participar, se programó una cita para firmar el consentimiento informado y recolectar la muestra de hisopado de cavidad bucal.

Durante la cita programada, dentro del área de toma de muestras de Centro Procrea® para brindar privacidad y resguardar el anonimato del participante, se le solicitó leer nuevamente el consentimiento informado y realizar todas las preguntas necesarias para que el estudio y sus procedimientos le fueran completamente aclarados previo a firmar del documento. En este mismo momento se le recalcó que su participación era completamente voluntaria, por lo que podría retirar su consentimiento en cualquier etapa del estudio. Además de que el diagnóstico realizado no representaría ningún riesgo o costo para su persona. Cuando todas las dudas fueron contestadas de manera satisfactoria y el paciente haya firmado el consentimiento, se procedió con la toma de muestra de células de la cavidad bucal con el procedimiento indicado en la sección “Obtención de muestras para análisis molecular”. A cada individuo se le asignó un identificador anónimo compuesto por 2 letras - 2 dígitos para relacionar el consentimiento informado, información de contacto y la muestra. Todos los documentos fueron almacenados en un archivo bajo llave, con acceso restringido para el licenciado y la coinvestigadora.

5.3.4. Tamaño de muestra

Para este estudio se decidió utilizar una razón de probabilidad, o en inglés odds ratio, para calcular el tamaño de la muestra. Esta es una medida de asociación entre la presencia o ausencia de dos propiedades en la población analizada, y es comúnmente utilizada para comunicar los resultados de una investigación en salud (Cerda, Vera, y Rada, 2013). En esta investigación las propiedades por correlacionar son infertilidad y la presencia de microdeleciones del cromosoma Y, por lo que en los Cuadros 2 y 3 se presentan los datos utilizados para calcular esta razón según cada condición analizada.

Un factor limitante para determinar el tamaño de la muestra es la cantidad de pacientes previamente diagnosticados con azoospermia u oligozoospermia severa en la clínica de fertilidad, Centro Procrea®. Ya que en la base de datos de espermogramas previamente realizados se encuentran 13 pacientes azoospermicos y 25 pacientes oligozoospermicos severos. Tomando en cuenta la posible renuencia de algunos individuos, se estimó que el estudio podría contar con 8 y 16 pacientes para cada condición respectivamente. Esto permitió calcular el tamaño del grupo control, conformado por individuos normospermicos, en 32 individuos para cada condición. Estos valores han sido calculados con una precisión relativa del 95 %, nivel de confianza del 90 %, prevalencia esperada de microdeleciones del cromosoma Y en el grupo de ausencia de 1 %, una proporción 2:1 de presencias a ausencias, y las razones de probabilidad mostradas en los cálculos 1 y 2. Ya que el grupo control no presenta criterios de inclusión diferentes para cada condición, se planteó el uso de únicamente 32 pacientes normospermicos para ambas condiciones. Por lo que en total el estudio requirió de la participación de 56 individuos de sexo masculino.

Cuadro 2: Distribución de condiciones a correlacionar en pacientes con oligozoospermia severa

		Infertilidad	
		Presente	Ausente
Microdeleciones del cromosoma Y en paciente oligozoospermico severo	Presente	8 %	1 %
	Ausente	35 %	100 %

Cálculo 1. Razón de probabilidad para tamaño de muestra de grupo control de pacientes diagnosticados con oligozoospermia severa.

$$\text{Razón de probabilidad} = \frac{8 \% \times 100 \%}{35 \% \times 1 \%} = 23 \% \quad (1)$$

Cuadro 3: Distribución de condiciones a correlacionar en pacientes azoospermicos

		Infertilidad	
		Presente	Ausente
Microdeleciones del cromosoma Y en paciente azoospermico	Presente	15 %	1 %
	Ausente	35 %	100 %

Cálculo 2. Razón de probabilidad para tamaño de muestra de grupo control de pacientes diagnosticados con azoospermia no obstructiva.

$$\text{Razón de probabilidad} = \frac{15 \% \times 100 \%}{35 \% \times 1 \%} = 43 \% \quad (2)$$

5.3.5. Riesgos y beneficios

Para los participantes del estudio piloto existe la posibilidad de desarrollar hematomas posteriores a la extracción de sangre venosa debido a que es un procedimiento invasivo. Sin embargo, esto se previno al utilizar jeringas de 3.0 ml y que la muestra fueran recolectada por una enfermera, trabajadora de Centro Procrea®[®], capacitada para la correcta toma de muestra. En caso de presentar mareo o somnolencia el individuo sería recostado con las piernas hacia arriba durante 15 minutos. Posteriormente se le realizará una toma de presión sanguínea, y en caso presente valores anormales sería evaluado por el médico de turno en Centro Procrea®[®]. Con respecto a los demás participantes, la toma de muestra mediante hisopado de cavidad bucal no implica un riesgo para su salud o integridad dado que es una técnica no invasiva. Sin embargo, es posible que posterior al hisopado el participante presente comezón o resequedad en los labios y boca, lo cual es fácilmente remediable con tomar agua que le será brindada en caso la solicite.

En cuanto a los beneficios del estudio, a cada paciente participante se le otorgarán sus resultados de detección de microdeleciones del cromosoma Y al finalizar la investigación. Se estima que será cuatro meses después de la toma de muestra, tiempo razonable para aquellos pacientes que consideren iniciar un tratamiento de reproducción asistida. Sin embargo, una vez implementado el método de diagnóstico en Centro Procrea®[®] la realización del análisis tomaría un máximo de 5 días hábiles. Para la comunidad científica, el establecimiento de relaciones entre las microdeleciones del cromosoma Y detectadas y las condiciones de infertilidad diagnosticadas mediante espermograma, permite generar información para mejorar los tratamientos de reproducción asistida realizados a la población guatemalteca.

En cuanto al investigador, uno de los posibles riesgos es la probabilidad de contaminación con semen, sangre o saliva por lo que se utilizaron guantes de nitrilo sin polvo y bata en todo momento dentro del laboratorio. Los riesgos asociados con el uso de objetos punzocortantes y reactivos de laboratorio fue previsto con el cumplimiento exitoso del Curso de Bioseguridad en el Laboratorio de la Oficina Regional de CDC para Centro América y Panamá, pero también se contró con protocolos de desinfección y limpieza en caso de accidentes. Para reducir la posibilidad de exposición a Covid-19, la persona encargada de la toma de hisopados de cavidad bucal contaba con esquema de vacunación completo al menos dos meses previos al inicio del estudio y utilizó equipo de protección personal completo. Además, los microtubos plásticos con hisopos en su interior fueron desinfectados externamente con etanol al 70% y encuarentenados a temperatura ambiente por 72 horas. El beneficio del estudio para el investigador fue generar los datos requeridos para su trabajo de graduación, y para Centro Procrea® fue la implementación de un laboratorio de biología molecular capaz de realizar PCR punto final además de la detección de microdeleciones del cromosoma Y.

5.4. Materiales y métodos

5.4.1. Obtención de muestras de semen

Las muestras de semen se obtuvieron en frascos plásticos estériles mediante masturbación, por hombres entre 18 y 50 años, dentro de la clínica de fertilidad en un espacio privado designado para ello. Cada muestra fue rotulada con un código anónimo, desligado de la identidad de los sujetos, asignado en Centro Procrea® por la recepcionista al recibir la muestra. Esta persona también fue la encargada de brindar una encuesta para que el paciente registrara su edad, número de días de abstinencia previo a la toma de la muestra, consumo de medicamentos contraproducentes para la espermatogénesis e información de contacto. Los frascos fueron almacenadas dentro de una incubadora, sin control de niveles de dióxido de carbono, a 36.5 °C hasta ser analizadas (World Health Organization, 2010).

5.4.2. Procesamiento de muestras de semen

Las muestras de semen se analizaron en base al procedimiento y parámetros establecidos en la 5ta edición del *Manual de laboratorio de la OMS para el examen y procesamiento de semen humano* (2010). Por lo que se realizó un espermograma con evaluación macroscópica que determinó el volumen, pH, viscosidad, licuefacción y color de la muestra. Además de un análisis microscópico en el cual se obtuvo la concentración de espermatozoides (millones por mililitro de semen) al analizar 10 μ l de muestra en la cámara de recuento Makler con magnificación 20x. Posteriormente, se determinó la vitalidad de los espermatozoides, contenidos en el mismo volumen de muestra, a partir de un frote en lámina portaobjetos con Sperm VitalStain™ Nidacon® evaluado en 40x. Finalmente se realizó un análisis de morfología espermática utilizando un frote de 10 μ l de semen teñido con metanol, Hemacolor® reactivo de coloración rojo y Hemacolor® reactivo de coloración azul como se muestra en la Figura 4. Este último parámetro se evaluó con aceite de inmersión a 100x.



Figura 4: Procedimiento de tinción para análisis de morfología espermática

5.4.3. Selección de sujetos de estudio

Se realizó en base a los resultados del espermograma evaluado. La concentración de los espermatozoides en el eyaculado fue el principal criterio de inclusión, ya que permitió clasificar al paciente como normospermico (20 – 120 millones espermatozoides por ml de eyaculado), oligozoospermico severo (< 5 millones/ml) o azoospermico (0 millones/ml) (Krausz y cols., 2013). Siendo de interés para este estudio aquellos incluidos en las últimas dos categorías. Posteriormente, en la base de datos recolectada, se comprobó que el paciente haya contado con 3 – 5 días de abstinencia previos a la obtención de la muestra y que no consumiera medicamentos contraproducentes causantes del bajo conteo espermático (World Health Organization, 2010).

5.4.4. Obtención de muestras para análisis molecular

Con hisopos con fibras de nylon perpendiculares (Global Roll®), Hangzhou, China), se realizó la toma de muestra de células de cavidad bucal. Esto mediante el roce seguido, pero delicado de la parte interna de cada mejilla del paciente con 10 movimientos circulares o durante 30 segundos. Posteriormente, la cabeza del hisopo se cortó dentro de un microtubo Eppendorf® de 1.5 ml y se dejó secar. Luego se añadió 0.4 ml de buffer PBS 1X para liberar las células del soporte y se centrifugó por 20 segundos a velocidad máxima. Posteriormente, cada tubo se almacenó a -20 °C hasta su extracción de ADN (Liu y cols., 2019; QIAGEN, 2016; Akinin-Seifer y cols., 2003).

5.4.5. Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN)

A partir de las células de cavidad resuspendidas 0.4 ml de buffer PBS 1X, o 1.5 ml de sangre venosa para el estudio piloto, se extrajo ADN genómico utilizando el kit comercial QIAmp® DNA Blood Mini (QIAGEN®, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y calidad del ADN aislado se estimó midiendo en duplicado 1.5 µl de los ácidos nucleicos eluidos de la columna, mediante el espectrofotómetro NanoDrop OneC® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

5.4.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A cada muestra de ADN genómico extraído se le realizaron dos reacciones de PCR multiplex, con el kit Multiplex PCR (QIAGEN®, Alemania) para el análisis de microdeleciones del cromosoma Y en las regiones AZFa, AZFb y AZFc (Colaco y Modi, 2019; Kleiman y cols., 2012). Cada reacción generó 5 fragmentos de material genético de interés, donde uno corresponde a la proteína cromosómica del dedo de zinc ligada a X o Y (ZFX/ZFY) y otro al gen SRY (sY14), ya que serían utilizados como controles internos de la reacción (Liu y cols., 2019). La PCR multiplex A está conformada por los STSs sY86, sY127, sY254, sY14 y ZFX/ZFY, mientras que la PCR multiplex B contiene los últimos dos STSs previamente mencionados, además de sY84, sY134 y sY255 (Krausz y cols., 2013). El tamaño esperado, en pares de bases, de los fragmentos amplificados y las secuencias de los cebadores utilizados para cada marcador se encuentran en el Cuadro 10 en la sección de anexos. Utilizando el programa de termociclado presentado en el Cuadro 4 se realizan 35 ciclos de amplificación (Krausz y cols., 2013).

Cuadro 4: Programa de termociclado utilizado para PCR multiplex en EdvoCycler™ Jr. Personal PCR (EDVOTEK®), Washington, DC, EE. UU.)

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	15 minutos
Desnaturalización	94 °C	30 segundos
Alineamiento	57 °C	90 segundos
Elongación	72 °C	60 segundos
Extensión final	72 °C	10 minutos

5.4.7. Revelación por electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR se revelaron a temperatura ambiente en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EE. UU.) 2% (m/v), teñido con GelRed® 1X, utilizando tampón TBE 1X (Tris, Borato, EDTA) a 50 voltios por 90 minutos en el sistema de electroforesis RunOne™ (EmbiTec®, California, EE. UU.). Los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron con el transiluminador UV BioDoc-It® 220 Imaging System (UVP® LLC, Upland, CA, EE. UU.) a 302 nanómetros (Behulova y cols., 2011). Se empleó la escalera de peso molecular PerfectDNA™ 50 bp Ladder (MilliporeSigma™ Novagen™, California, EE. UU.) para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados.

5.4.8. Descarte de muestras

Al terminar los análisis, cada muestra y los suministros utilizados con esta fueron inmediatamente desechados en una bolsa roja para material bioinfeccioso para su eliminación. La empresa Ecotermo® fue la encargada de recolectarlas para descartarlas e incinerarlas según las disposiciones vigentes en la ley de Guatemala.

5.4.9. Análisis de datos

Inicialmente se realizó estadística descriptiva para los datos de concentración y pureza de ADN extraído, obtenidos del espectrofotómetro NanoDrop OneC®. Luego, de manera cualitativa se realizó una correlación entre las microdeleciones detectadas y la condición diagnosticada a partir de espermograma. Posteriormente, se realizaron pruebas de proporciones múltiples utilizando el software RStudio versión 4.0.3 (Boston, MA, EE. UU.) para analizar la frecuencia de las deleciones identificadas en los grupos de pacientes y control.

6.1. Extracción de ADN

El método de extracción con el kit comercial QIAmp® DNA Blood Mini (QIAGEN®, Alemania) fue estandarizado en el laboratorio de biología molecular de Centro Procrea®. Su eficacia fue comprobada a través de la cuantificación y determinación de pureza de cada muestra por medio de espectrofotometría. Se utilizó el NanoDrop OneC® para medir en duplicado la concentración y razones de absorbancia A260/280 y A260/230. Las lecturas individuales de cada muestra se presentan en la sección de anexos, cuadros 10 - 13.

La validación del método requirió de la comparación de los dos tipos de muestras de interés, sangre periférica y células de cavidad bucal, recolectadas de cinco individuos normospermicos con fertilidad comprobada. Además de un control interno de la analista. Se utilizaron 200 µl de cada analito, y 150 µl de buffer AE para la elución de los ácidos nucleicos retenidos en la columna de centrifugación.

A continuación en el Cuadro 5 se presenta la media, desviación estándar, valor mínimo y máximo de las cinco muestras de sangre analizadas. Mientras que en el Cuadro 6 se presentan los estadísticos para el ADN extraído a partir de los hisopados de cavidad bucal para los 32 individuos normospermicos del grupo control. En los cuadros 7 y 8 se presenta la estadística descriptiva para los 16 pacientes previamente diagnosticados con oligozoospermia severa y 8 pacientes azoospermicos respectivamente.

Cuadro 5: Estadística descriptiva de concentraciones y razones de absorbancia para ADN genómico aislado de muestra de sangre completa de pacientes normospermicos

	Concentración (ng/µl)	A 260/280	A 260/230
Media	26.96	1.79	2.10
Desviación estándar	3.07	0.02	0.03
Mínimo	22.60	1.77	2.07
Máximo	29.73	1.83	2.14

Cuadro 6: Estadística descriptiva de concentraciones y razones de absorbancia para ADN genómico extraído a partir de hisopado de cavidad bucal de pacientes normospermicos

	Concentración (ng/μl)	A 260/280	A 260/230
Media	16.25	1.77	2.10
Desviación estándar	1.85	0.03	0.05
Mínimo	13.81	1.71	2.01
Máximo	21.32	1.83	2.18

Al comparar los cuadros 5 y 6, se observa que el método de extracción es eficaz con ambos tipos de muestras utilizadas. Sin embargo, la concentración de ADN genómico (ADNg) aislado a partir de 200 μl de sangre es hasta 10 ng/μl mayor que a partir de células de cavidad bucal recolectadas mediante hisopado. Por otra parte, aunque la dispersión de las concentraciones de ADNg obtenido a partir de sangre completa es el doble de la desviación estándar del de las concentraciones de hisopado de cavidad bucal, se debe recordar que la diferencia de cantidad de muestras analizadas es mayor de 1:6. Respecto a las razones A260/280 y A260/230, los estadísticos para ambos analitos son considerablemente cercanos e indicativos de pureza óptima (Thermo Fisher Scientific, 2017).

Cuadro 7: Estadística descriptiva de concentraciones y razones de absorbancia para ADN genómico extraído a partir de hisopado de cavidad de pacientes oligozoospermicos severos

	Concentración (ng/μl)	A 260/280	A 260/230
Media	15.50	1.77	2.10
Desviación estándar	0.93	0.03	0.04
Mínimo	13.60	1.71	2.01
Máximo	17.15	1.80	2.17

Cuadro 8: Estadística descriptiva de concentraciones y razones de absorbancia para ADN genómico aislado de células de cavidad bucal pertenecientes a pacientes con azoospermia no obstructiva

	Concentración (ng/μl)	A 260/280	A 260/230
Media	15.85	1.76	2.11
Desviación estándar	0.83	0.04	0.05
Mínimo	14.45	1.73	2.04
Máximo	17.31	1.84	2.18

Luego de analizar los estadísticos presentados en los dos cuadros previos, Cuadro 7 y Cuadro 8, no se observa diferencia significativa entre la concentración, pureza o calidad del ADN aislado a partir de las muestras de hisopado de cavidad bucal de pacientes oligozoospermicos severos o azoospermicos. Además, ya que la extracción de ácidos nucleicos de las 61 muestras analizadas se realizó utilizando el mismo protocolo y bajo las mismas condiciones ambientales, junto con la baja variabilidad de la estadística descriptiva presentada, se valida el uso del kit comercial QIAmp® DNA Blood Mini para la obtención de ADNg de calidad a partir de sangre completa e hisopados de cavidad bucal. Pudiendo obtener concentraciones de hasta 10 ng/μl de ADNg más al aislarlo a partir de sangre completa.

6.2. Optimización de reacción en cadena de la polimerasa

Se evaluó el comportamiento de cada par de cebadores en las condiciones que se emplearían para la realización de cada PCR multiplex. Utilizando 8 mezclas de reacción diferentes, cada una compuesta por el par de cebadores de cada marcador, QIAGEN Multiplex PCR Master Mix y agua libre de ARNasas, además de 10 µl de ADN plantilla por muestra. Evaluando así a 5 individuos normospérmicos, además de un control negativo (ADN femenino) y un blanco. Los productos de PCR se revelaron por electroforesis en gel de agarosa (fig. 5 - 8). La estimación del tamaño de los fragmentos de ADN se realizó mediante el software GelAnalyzer 19.1, por lo que bajo las condiciones estándares de reacción se produjo una adecuada amplificación para los ocho marcadores seleccionados.

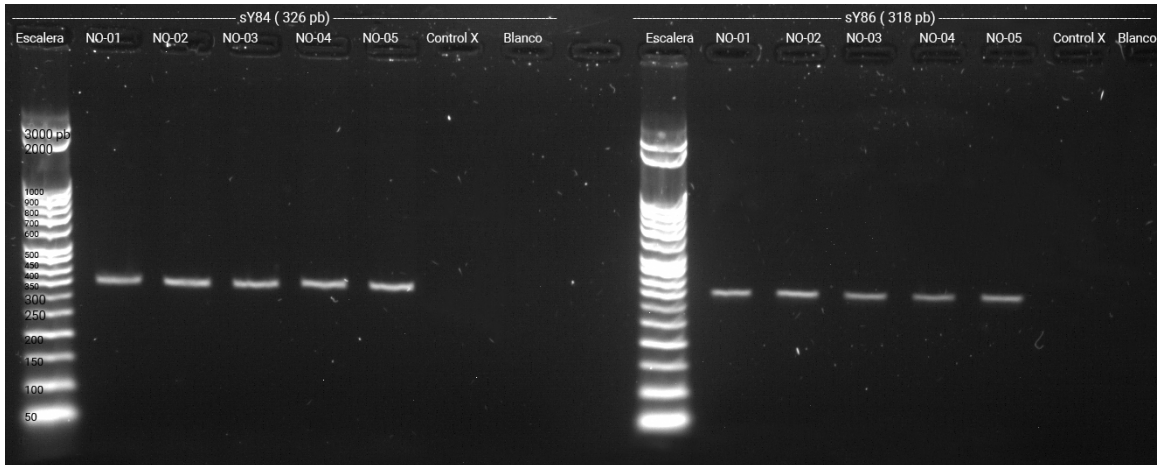


Figura 5: Validación de cebadores diseñados para los marcadores sY84 y sY86 de la región AZFa
Descripción: Gel de agarosa 2 % realizado con buffer TBE 1X y teñido con GelRed® - Biotium. Los carriles identificados como escalera en la parte superior corresponden al marcador de masa molecular Perfect DNA™ 50 bp ladder - Novagen. Se utilizó ADN aislado de pacientes normospérmicos (NO).

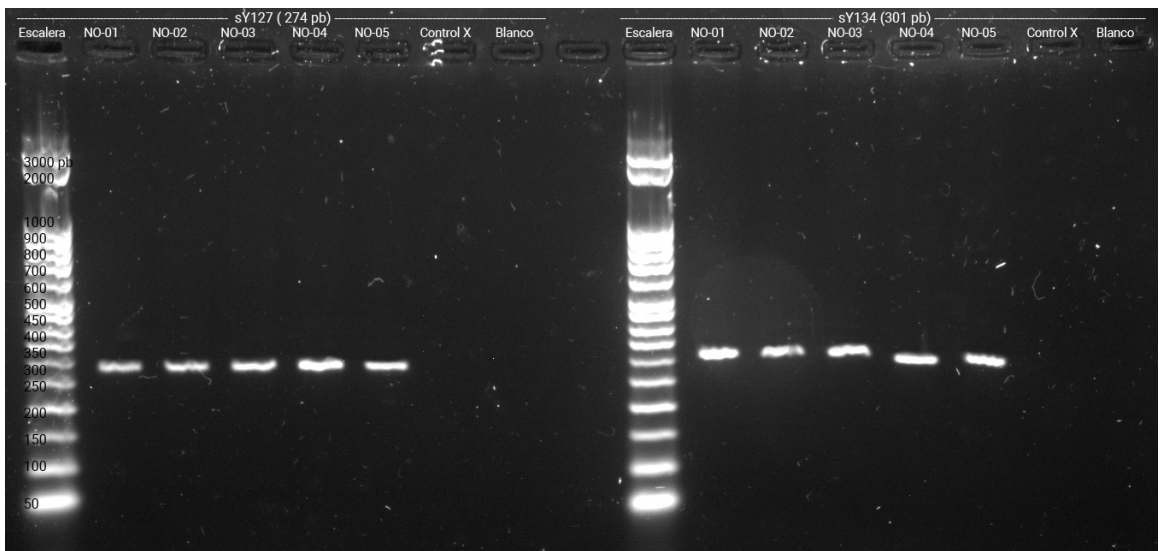


Figura 6: Validación de cebadores diseñados para los marcadores sY127 y sY134 de la región AZFb
Descripción: Gel de agarosa 2 % realizado con buffer TBE 1X y teñido con GelRed® - Biotium. Los carriles identificados como escalera en la parte superior corresponden al marcador de masa molecular Perfect DNA™ 50 bp ladder - Novagen. Se utilizó ADN aislado de pacientes normospérmicos (NO).

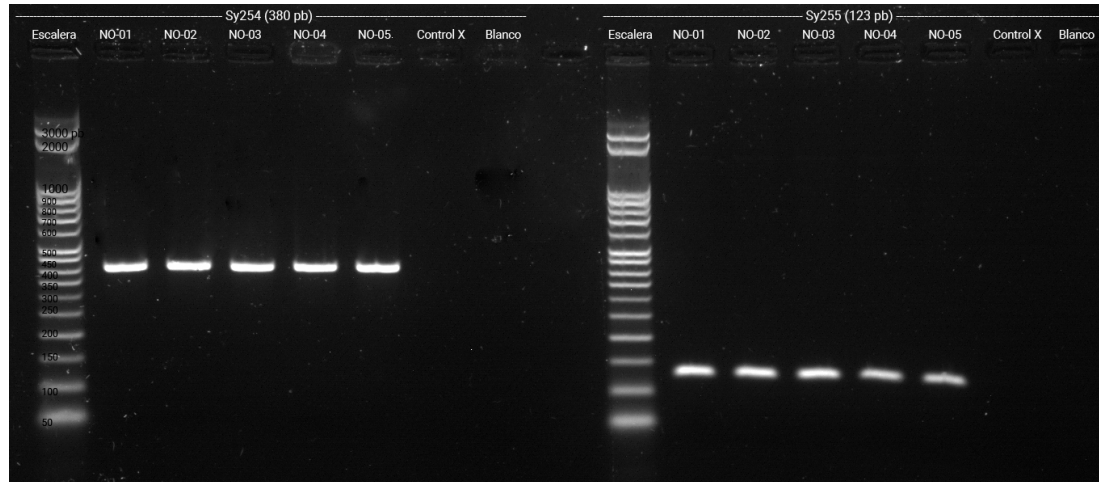


Figura 7: Validación de cebadores diseñados para los marcadores sY254 y sY255 de la región AZFc
 Descripción: Gel de agarosa 2% realizado con buffer TBE 1X y teñido con GelRed® - Biotium. Los carriles identificados como escalera en la parte superior corresponden al marcador de masa molecular Perfect DNA™ 50 bp ladder - Novagen. Se utilizó ADN aislado de pacientes normospérmicos (NO), por lo que el identificador del carril corresponde a un código compuesto entre la condición del individuo y número de participante.

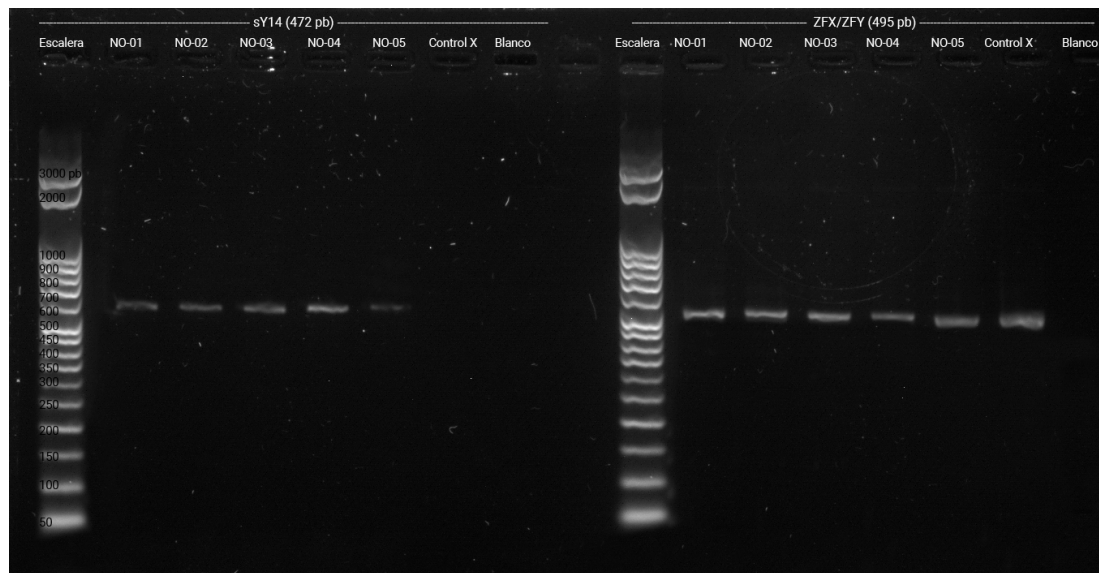


Figura 8: Validación de los cebadores diseñados para los marcadores control sY14 (SRY) y ZFX/ZFY
 Descripción: Gel de agarosa 2% realizado con buffer TBE 1X y teñido con GelRed® - Biotium. Los carriles identificados como escalera en la parte superior corresponden al marcador de masa molecular Perfect DNA™ 50 bp ladder - Novagen. Se utilizó ADN aislado de pacientes normospérmicos (NO).

6.3. Comparación de eficiencia de muestras

Posteriormente se evaluó de manera conjunta el funcionamiento de los cinco pares de cebadores que conforman cada PCR multiplex. La PCR A compuesta por los marcadores ZFX/ZFY, sY14,

sY86, sY127 y sY254, y la PCR B con los marcadores ZFX/ZFY, sY14, sY84, sY134 y sY255. La mezcla de reacción para cada PCR se realizó con Master Mix comercial, agua libre de ARNasas y una mezcla de cebadores 10X. Esta última contiene cada cebador a 2 μ M.

A la vez también se comparó el origen del ADN utilizado como plantilla. ADN genómico aislado a partir de sangre completa versus ADNg aislado a partir de células de cavidad bucal recolectadas mediante hisopado. Por lo que la efectividad de cada PCR multiplex se analizó con 12 muestras, cinco pacientes normospérmicos, un control negativo y un blanco. Los productos de PCR fueron revelados a través de electroforesis en gel de agarosa 2%. En cada pozo se cargó 4 μ l de producto de PCR mezclados con 2 μ l de 6X DNA Gel Loading Buffer - Novagen. La estimación del tamaño de los fragmentos de ADN se realizó mediante el software GelAnalyzer 19.1.

A continuación, en las figuras 9 y 10 se presentan los resultados de la electroforesis en gel de agarosa realizados para PCR multiplex A y PCR multiplex B, respectivamente. En ambas figuras se observan bandas específicas para cada marcador. Sin embargo, en ninguna de las dos se presenta superposición de las amplificaciones. Ninguno de los individuos normospérmicos, hombres fértiles reclutados como controles, presenta microdeleciones del cromosoma Y. Esto ya que el producto de PCR para cada uno presenta los cinco fragmentos de ADN, de distinto peso molecular, esperados. Por otra parte, la muestra de ADN femenino (control X) únicamente presenta la banda correspondiente a la pareja de cebadores del marcador ZFX/ZFY.

Respecto a la comparación del tipo de ADN plantilla utilizado, sí existe uniformidad entre los resultados de cada individuo como se observa en el patrón de fragmentos. Sin embargo, se observa una leve diferencia de intensidad de las bandas amplificadas según el origen de los ácidos nucleicos. Siendo más tenues aquellos pozos cuya reacción de PCR se realizó con ADN genómico aislado a partir de sangre completa.

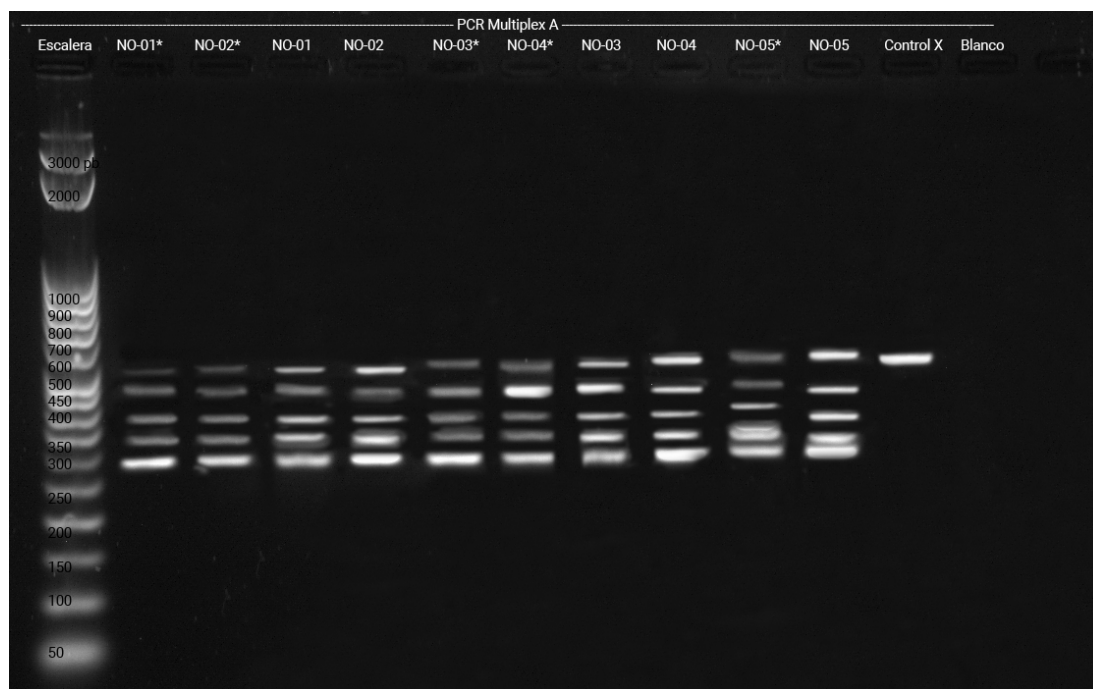


Figura 9: PCR Multiplex A para validación de tipo de muestra utilizado para extracción de ADN

Descripción: Gel de agarosa 2% realizado con buffer TBE 1X y teñido con GelRed® - Biotium. El carril identificado como escalera en la parte superior corresponde al marcador de masa molecular Perfect DNA™

50 bp ladder - Novagen. A continuación se presentan productos de PCR de pacientes normospérmicos (NO), aquellas marcadas con asterisco (*) corresponden a reacciones de PCR realizadas con ADN aislado a partir de sangre completa.

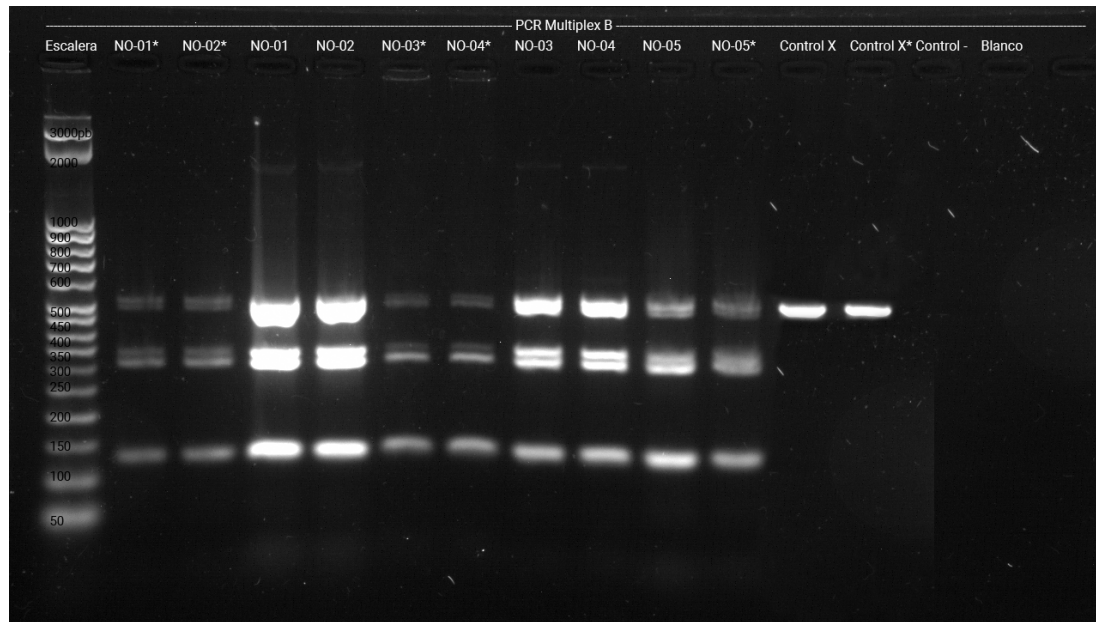


Figura 10: PCR Multiplex B para validación de tipo de muestra utilizado para extracción de ADN
 Descripción: Gel de agarosa 2% realizado con buffer TBE 1X y teñido con GelRed® - Biotium. El carril identificado como escalera en la parte superior corresponde al marcador de masa molecular Perfect DNA™ 50 bp ladder - Novagen. Además se presentan productos de PCR de pacientes normospermicos (NO), cuyas muestras marcadas con asterisco (*) corresponden a pruebas realizadas con ADN aislado de sangre completa.

6.4. Detección de microdeleciones del cromosoma Y

Contando con el método de diagnóstico validado se procedió a analizar las muestras de los demás individuos reclutados para el estudio. Se realizó una PCR multiplex A y una PCR multiplex B con el ADN genómico aislado de cada muestra de hisopado de cavidad bucal. El diseño de la prueba permite la confirmación simultánea de las microdeleciones detectadas en a las subregiones del Factor de Azoospermia (AZF). Ya que una microdelección en un PCR multiplex únicamente es válida si en el gel de electroforesis de la otra PCR multiplex también se encuentra.

Por lo tanto se confirmó que los 32 individuos normospermicos reclutados para participar en el grupo control del estudio no presentan microdeleciones del cromosoma Y. Esto se observa en las figuras 11 - 14, donde los productos de ambas reacciones de PCR multiplex fueron revelados. Los geles de agarosa presentan un perfil de cinco fragmentos de ADN coincidentes cada uno con el tamaño esperado de cada marcador STS analizado.

Entre los 24 participantes con problemas de fertilidad, 67% de ellos no presentaron microdeleciones del cromosoma Y. Las microdeleciones detectadas se reparten entre individuos de las dos condiciones evaluadas, azoospermia y oligozoospermia severa. Se detectó al menos una microdelección en la región AZF del cromosoma Y en 31% (5/16) de los pacientes oligozoospermicos severos y 38% (3/8) de los individuos con azoospermia no obstructiva. Estos valores corresponden al 9% y 5% de los individuos masculinos en la muestra total, incluyendo el grupo control (56 individuos).

Deleciones en AZFa se detectaron en los pacientes OL-01, OL-04, OL-09, OL-15, AZ-01, AZ-03 y AZ-07 con los marcadores sY84 y sY86 (Figuras 15 - 19). Mientras que el paciente OL-14 con oligozoospermia severa presenta delección de los marcadores sY127 y sY134, correspondientes con AZFb, como se observa en la Figura 17.

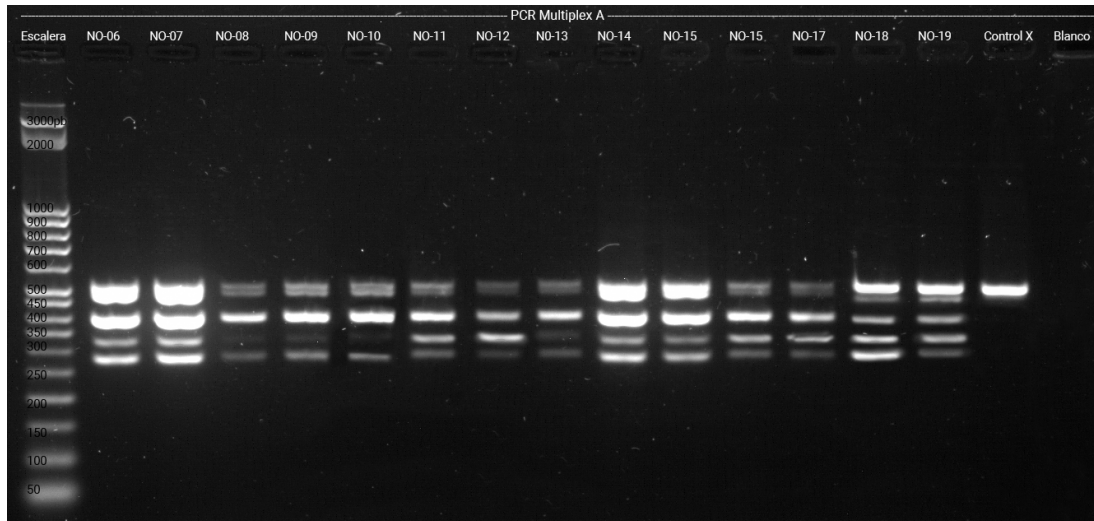


Figura 11: PCR Multiplex A en individuos normospérmicos (NO-06 a NO-19)
 Descripción: Gel de agarosa 2% realizado con buffer TBE 1X y teñido con GelRed® - Biotium. El carril identificado como escalera en la parte superior corresponde al marcador de masa molecular Perfect DNA™ 50 bp ladder - Novagen. Se utilizó ADN genómico aislado a partir de hisopado de cavidad bucal de pacientes normospérmicos (NO).

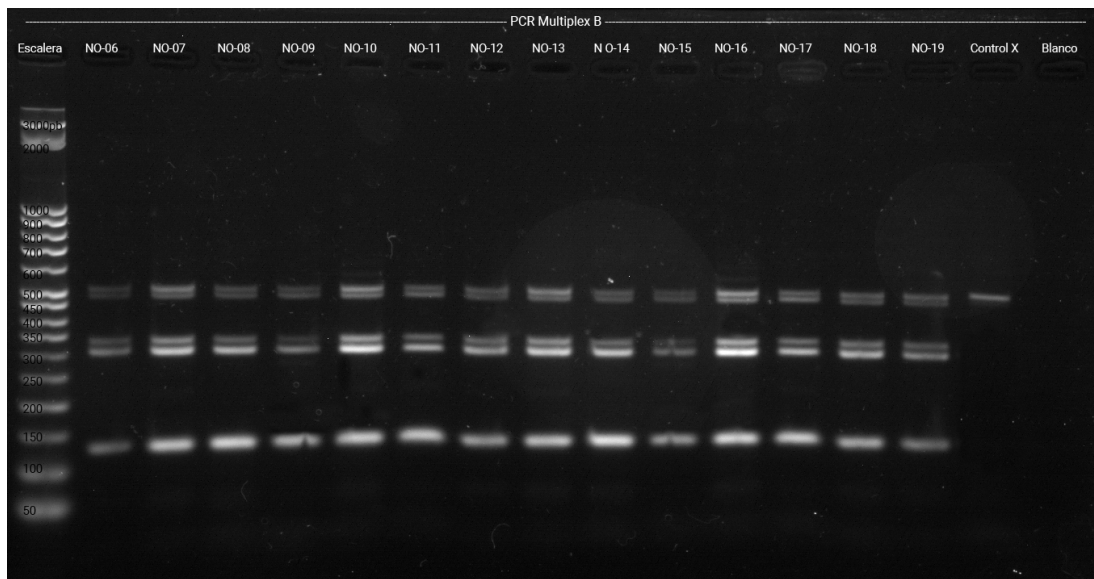


Figura 12: PCR Multiplex B en individuos normospérmicos (NO-06 a NO-19)
 Descripción: Gel de agarosa 2% realizado con buffer TBE 1X y teñido con GelRed® - Biotium. El carril identificado como escalera en la parte superior corresponde al marcador de masa molecular Perfect DNA™ 50 bp ladder - Novagen. Se utilizó ADN genómico aislado a partir de hisopado de cavidad bucal de pacientes normospérmicos (NO).

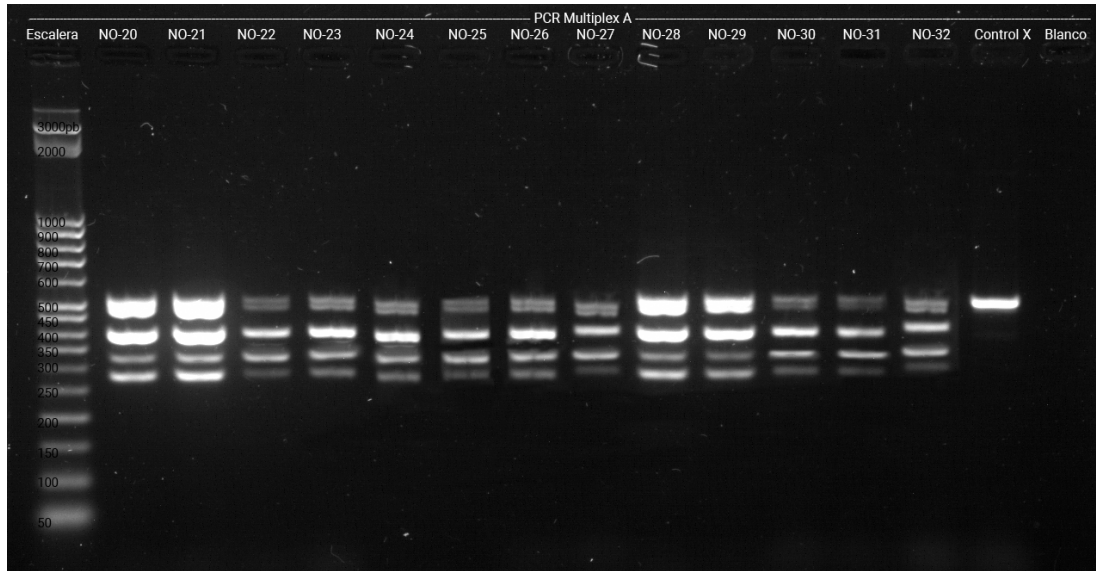


Figura 13: PCR Multiplex A en individuos normospermicos (NO-20 a NO-32)
 Descripción: Gel de agarosa 2% realizado con buffer TBE 1X y teñido con GelRed® - Biotium. El carril identificado como escalera en la parte superior corresponde al marcador de masa molecular Perfect DNA™ 50 bp ladder - Novagen. Se utilizó ADN genómico aislado a partir de hisopado de cavidad bucal de pacientes normospermicos (NO).

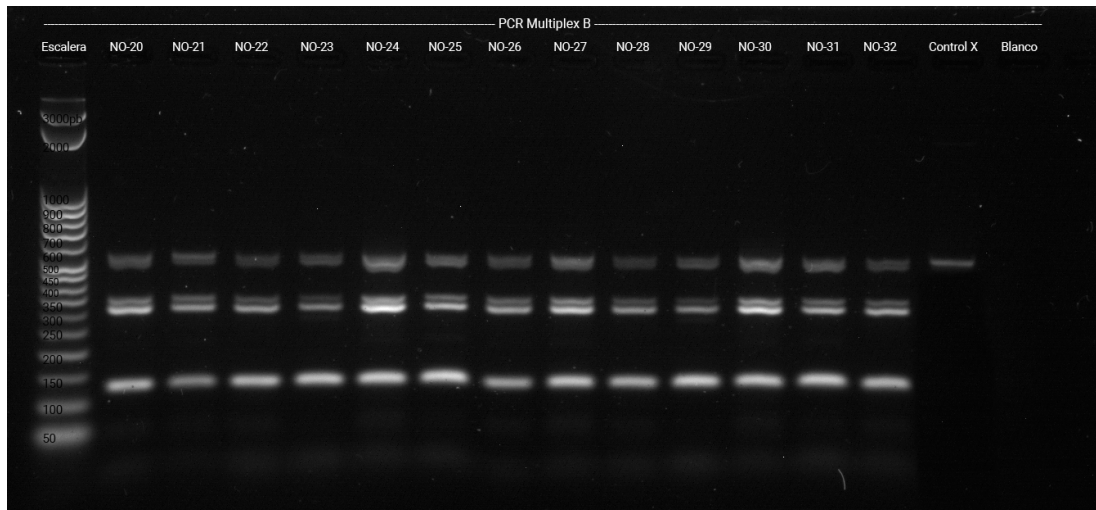


Figura 14: PCR Multiplex B en individuos normospermicos (NO-20 a NO-32)
 Descripción: Gel de agarosa 2% realizado con buffer TBE 1X y teñido con GelRed® - Biotium. El carril identificado como escalera en la parte superior corresponde al marcador de masa molecular Perfect DNA™ 50 bp ladder - Novagen. Se utilizó ADN genómico aislado a partir de hisopado de cavidad bucal de pacientes normospermicos (NO).

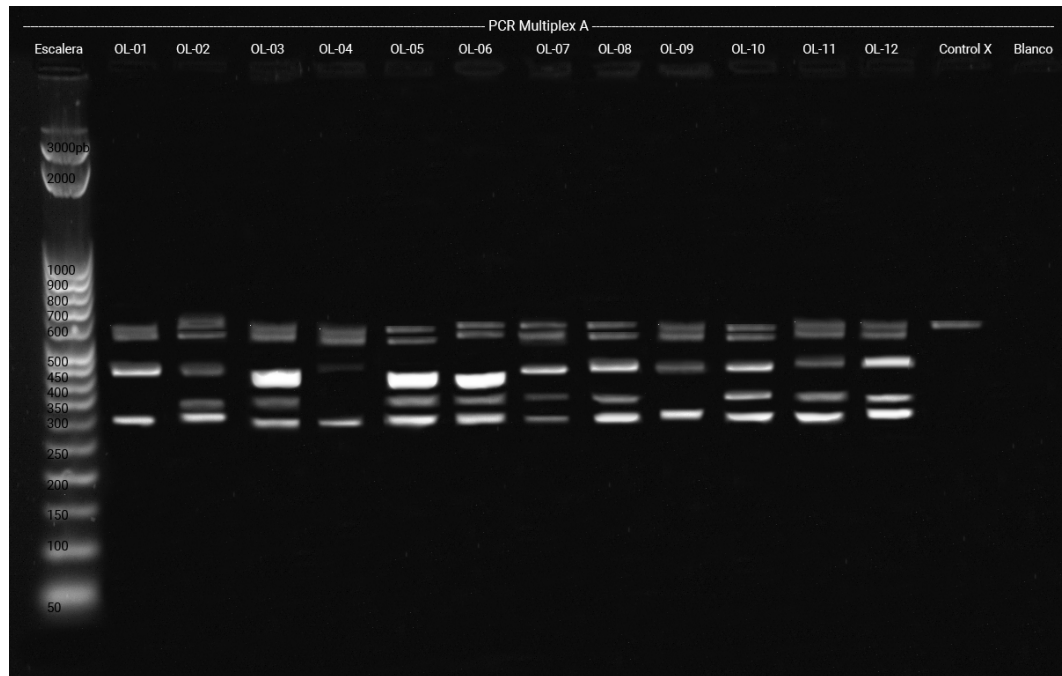


Figura 15: PCR Multiplex A para pacientes diagnosticados con oligozoospermia severa
 Descripción: Gel de agarosa 2% realizado con buffer TBE 1X y teñido con GelRed® - Biotium. El carril del lado izquierdo corresponde al marcador de masa molecular Perfect DNA™ 50 bp ladder - Novagen. Se utilizó ADN aislado a partir de hisopado de cavidad bucal de pacientes con oligozoospermia severa (OL).

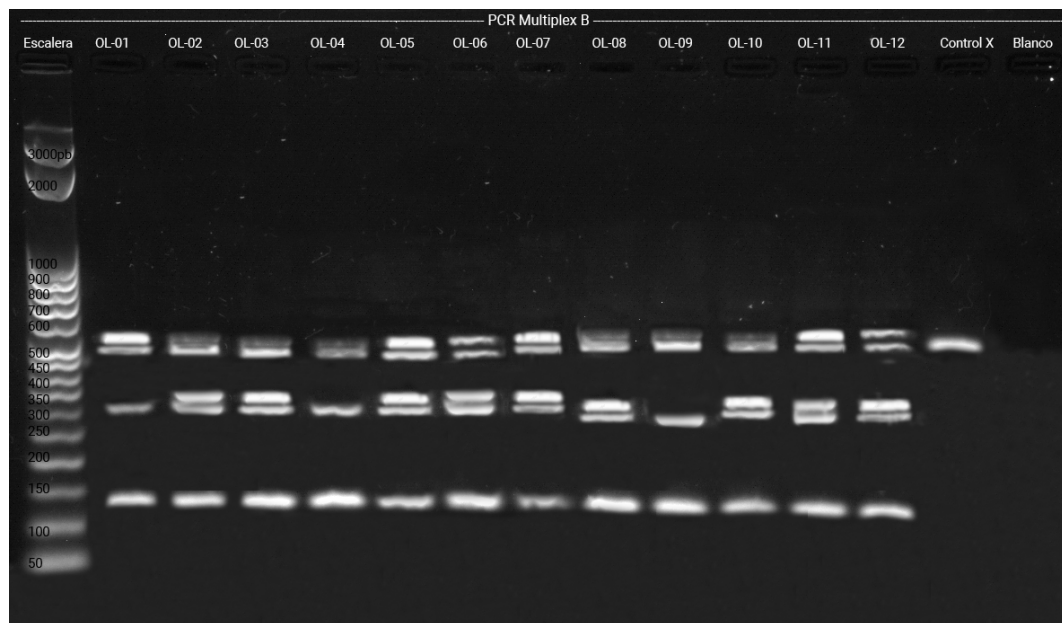


Figura 16: PCR Multiplex B para pacientes diagnosticados con oligozoospermia severa
 Descripción: Gel de agarosa 2% realizado con buffer TBE 1X y teñido con GelRed® - Biotium. El carril del lado izquierdo corresponde al marcador de masa molecular Perfect DNA™ 50 bp ladder - Novagen. Se utilizó ADN aislado a partir de hisopado de cavidad bucal de pacientes con oligozoospermia severa (OL).

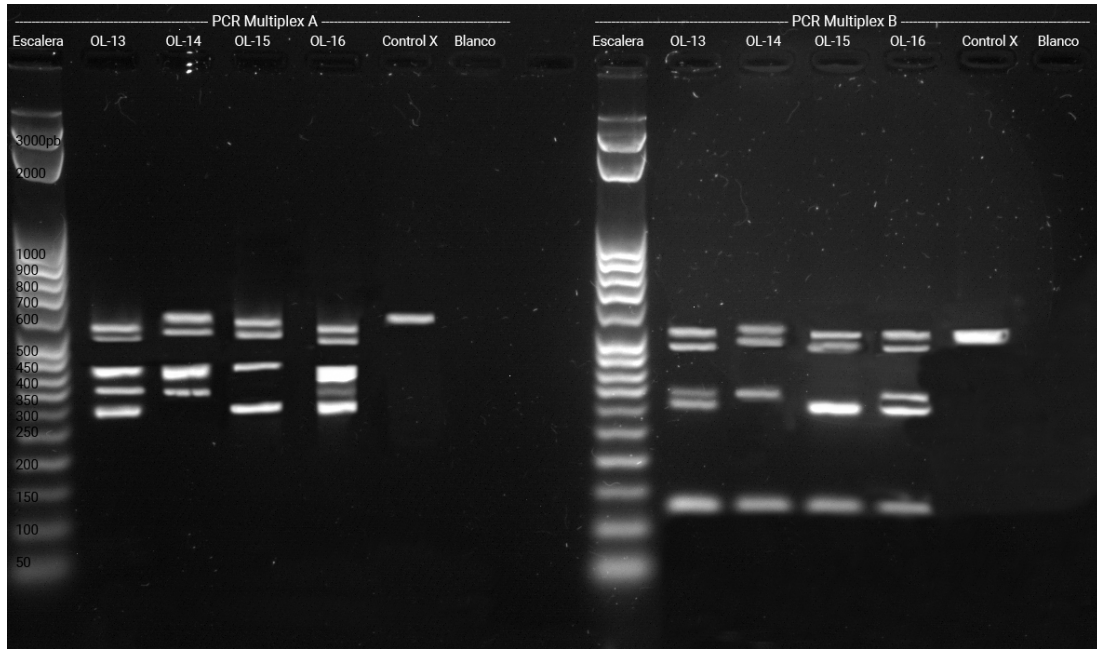


Figura 17: PCR Multiplex A y B para pacientes diagnosticados con oligozoospermia severa
 Descripción: Gel de agarosa 2% realizado con buffer TBE 1X y teñido con GelRed® - Biotium. El carril identificado como escalera en la parte superior corresponde al marcador de masa molecular Perfect DNA™ 50 bp ladder - Novagen. Se utilizó ADN genómico aislado a partir de hisopado de cavidad bucal de pacientes previamente diagnosticados con oligozoospermia severa (OL).

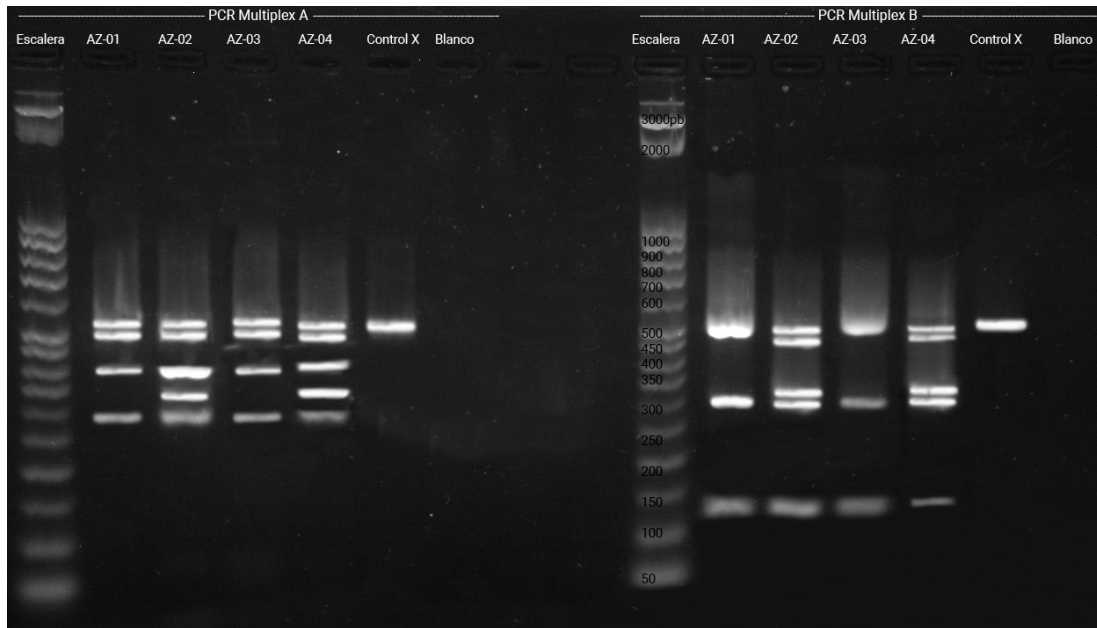


Figura 18: PCR Multiplex A y B realizado a pacientes con azoospermia no obstructiva
 Descripción: Gel de agarosa 2% realizado con buffer TBE 1X y teñido con GelRed® - Biotium. El carril identificado como escalera en la parte superior corresponde al marcador de masa molecular Perfect DNA™ 50 bp ladder - Novagen. Se utilizó ADN genómico aislado a partir de hisopado de cavidad bucal de pacientes previamente diagnosticados con oligozoospermia severa (OL).

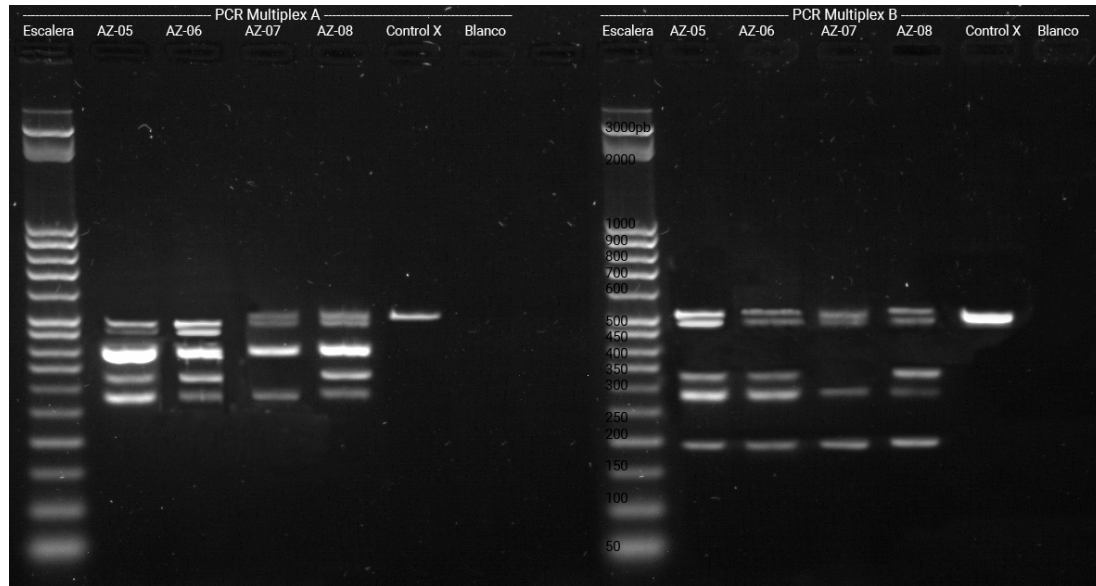


Figura 19: PCR Multiplex A y B realizado a pacientes con azoospermia no obstructiva
 Descripción: Gel de agarosa 2% realizado con buffer TBE 1X y teñido con GelRed® - Biotium. Los carriles identificados como escalera en la parte superior corresponden al marcador de masa molecular Perfect DNA™ 50 bp ladder - Novagen.

Cuadro 9: Prueba de igualdad de proporciones de dos muestras

Microdeleciones	Oligozoospermia severa	Azoospermia no obstructiva	X ²	Valor-P
AZFa	0.2500	0.3750	0.02521	0.8738
AZFb	0.0625	0.0000	3.90×10^{-32}	1
Total	0.3125	0.3750	2.22×10^{-31}	1

Utilizando Rstudio versión 4.0.3 se realizaron pruebas de igualdad de proporciones para dos colas con un nivel de significancia α de 0.05. En cada una se comparó la proporción de microdeleciones en pacientes oligozoospermicos severos y azoospermicos en el tamaño total de la muestra de cada grupo. Con base en el valor - P presentado, en ninguna de las tres pruebas realizadas se rechaza la hipótesis nula. Por lo que no se detectó una mayor frecuencia de microdeleciones del cromosoma Y asociada a oligozoospermia severa en comparación con azoospermia.

Análisis de resultados

Previo a la validación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex se realizó la extracción de ADN de dos tipos de muestras, sangre periférica e hisopado de cavidad bucal. Esto con el fin de validar la segunda toma de muestra como el método estándar para la prueba de detección de microdeleciones del cromosoma Y. El interés en esto se debe a que su recolección requiere de menos insumos, pero también porque reduce el tiempo, incomodidad e invasión para el paciente (Ghatak, Muthukumaran, y Nachimuthu, 2013). Por lo que inicialmente se realizó la extracción de ADN con el kit comercial QIAmp® DNA Blood Mini, seleccionado por su versatilidad y alto rendimiento para la obtención de ácidos nucleicos con los dos tipos de muestra ya mencionados.

QIAmp® DNA Blood Mini utiliza un método de extracción de fase sólida que emplea columnas de centrifugación basadas en sílice para la inmovilización de ácidos nucleicos. Pero previo a esto las células recolectadas deben ser lisadas mediante un tampón de lisis nombrado por el fabricante como buffer AL (QIAGEN, 2016). Al realizar la extracción de ADN como es indicado en los protocolos del fabricante se debe duplicar el volumen del tampón de lisis para trabajar con muestras de hisopado de cavidad bucal, lo que implica la adquisición adicional de un buffer cuyo costo es elevado. Debido a esto se optó por la modificación del protocolo del fabricante, combinando el protocolo de extracción de ADN de hisopado de cavidad bucal con el protocolo para purificación de ADN a partir de sangre y otros fluidos corporales.

Los eluidos de las columnas de centrifugación de cada muestra fueron analizados mediante espectrofotometría para comparar la eficacia del kit utilizado. Los valores previamente presentados en los cuadros 5 y 6 indican que sí se obtuvo ADN de alta pureza para ambos tipos de muestras a pesar de la modificación del protocolo del fabricante. Se debe aclarar que la diferencia de concentración de ADN genómico obtenido según el tipo de muestra empleada ha sido previamente indicada por la casa comercial en su manual de usuario. QIAmp® DNA Blood Mini permite la obtención de 0.5 - 3.5 µg de ADN (3 - 23 ng/µl) a partir de un hisopado de cavidad bucal, mientras que a partir de 200 µl de sangre humana completa se pueden obtener hasta 6 µg (30 ng/µl) de ADN (QIAGEN, 2016). Esta diferencia se atribuye a la baja concentración de células recolectadas mediante el hisopado en comparación con la cantidad recogida de la capa leucocitaria que se genera por la centrifugación de sangre periférica completa. A pesar de ello, las 61 muestras analizadas presentan concentraciones dentro de los rangos indicados previamente.

El método de PCR multiplex utilizado fue publicado por la Academia Europea de Andrología (EAA por sus siglas en inglés) y la Red Europea de Calidad de Genética Molecular (EMQN en inglés) durante 2013 en su “Guía de mejores prácticas para el diagnóstico molecular de microdeleciones del cromosoma Y”. Por lo que para proceder de acuerdo con las directrices europeas se realizó el panel básico de detección de microdeleciones. Se utilizaron dos reacciones de PCR multiplex para el análisis de seis STS en total. Estos se encuentran distribuidos entre las tres subregiones del factor de azoospermia (AZF), y fueron complementados con dos marcadores control. sY14 para el gen SRY que debe incluirse como control del factor determinante del testículo, ubicado en el brazo corto del cromosoma Y, pero también para la detección de casos de varones XX. Y ZFX/ZFY para el control de ADN femenino, además de los varones SRY negativos (46, XX) (Krausz y cols., 2013).

Mediante electroforesis en gel de agarosa 2% (30 minutos, 100 V) se revelaron los productos de PCR de la validación individual de cada marcador STS. En las figuras 5 - 8 se puede observar que los pozos correspondientes al blanco de cada reacción se presentan completamente limpios, lo cual indica que las bandas amplificadas con ADN de individuos normospermicos en los demás pozos no se deben a contaminación de los reactivos. Además, la presencia de una sola banda por carril, coincidente con el peso molecular esperado de cada marcador sustenta que no existió amplificación cruzada entre los cebadores. Por otra parte, como se esperaba siete de los ocho marcadores no amplificaron el ADN femenino utilizado en la mezcla de reacción para control del cromosoma X. Ya que únicamente los cebadores para el marcador ZFX/ZFY fueron diseñados para la amplificación de dicho cromosoma. Por ello, en el lado derecho de la Figura 8 se aprecian 6 bandas en lugar de solo 5 como en el resto de figuras mencionadas.

La optimización de las PCR multiplex se concluyó al comparar la efectividad del uso de ADN purificado de diferentes tipos de muestras. Se determinó que los productos de PCR de las reacciones llevadas a cabo con ADN plantilla aislado de sangre periférica son los mismos que para las reacciones llevadas a cabo con ADN extraído de células de cavidad bucal recolectadas mediante hisopado. Los fragmentos de ADN revelados por electroforesis en gel de agarosa, figuras 9 y 10, únicamente varían en intensidad mas no en peso molecular. Validando así el uso de hisopados de cavidad bucal como método de toma de muestra para el diagnóstico de microdeleciones del cromosoma Y.

El método de diagnóstico implementado es efectivo para detección de microdeleciones del cromosoma Y. Ya que en una muestra de 56 individuos fue posible la identificación de ocho pacientes con deleciones, todos ellos con problemas de fertilidad. Ningún individuo del grupo control presentó microdeleciones del cromosoma Y en alguna de las tres subregiones. 25% de los 16 pacientes oligozoospermicos participantes presentan deleción de la subregión A del factor de azoospermia (AZFa), mientras el 6.25% presenta deleción de AZFb. En cuanto a los pacientes con azoospermia no obstructiva, no se detectaron deleciones de AZFb, pero el 37.5% de los individuos presentan deleción en AZFa. Por lo que las microdeleciones más detectadas en esta muestra se presentan en AZFa (37.5%).

No se detectó ninguna microdeleción en AZFc a pesar de ser las más prevalentes a nivel mundial (~ 80%) (Gholami y cols., 2017). La frecuencia de microdeleciones del cromosoma Y identificadas en este estudio es considerablemente mayor respecto a aquellas previamente publicadas. Siendo el tipo de deleción más frecuente aquellas en la región AZFc (80%) seguido de AZFa (0,5 a 4%), AZFb (1 a 5%) y AZFbc (1-3%) deleción (Han y cols., 2018; Krausz y cols., 2013; Simoni y cols., 1999). Sin embargo estas variaciones en las frecuencias de las microdeleciones podrían estar influenciadas por diferencias étnicas de las poblaciones analizadas, los criterios de selección de los hombres, el tamaño de la muestra y el conjunto de marcadores STS utilizados en los estudios.

Los individuos con deleciones en AZFa y AZFb tienden a manifestar fenotipos variables de infertilidad, pero más frecuentemente azoospermia (Gholami y cols., 2017; Liu y cols., 2019). Todas las deleciones observadas en individuos azoospermicos en este estudio ocurrieron en AZFa por lo que existe correlación entre el tipo de deleción y el fenotipo observado. Como ha sido previamente descrito por otros estudios realizados en poblaciones europeas y asiáticas, las deleciones de toda la región AZFa dan como resultado invariable el síndrome de solo células de Sertoli (SCOS por sus

siglas en inglés) y azoospermia (Colaco y Modi, 2018; P. H. Vogt y cols., 2017; Kleiman y cols., 2012). Por lo que el diagnóstico de una deleción completa de la región AZFa implica la imposibilidad de recuperar espermatozoides testiculares para inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Krausz y cols., 2013).

La detección de un solo paciente con deleción de AZFb en la muestra analizada es coincidente con otros estudios ya publicados, debido a que la deleción completa de esta subregión es la que presenta menor incidencia a nivel mundial (Han y cols., 2018; Krausz y cols., 2013; Martínez-Garza y cols., 2008). Por otra parte, el SCOS también es característico de aquellas deleciones localizadas en la región AZFb (P. H. Vogt y cols., 2017). Pero también han sido asociadas con la detención de la maduración espermática en la meiosis I, con frecuencia, pero no exclusivamente, en la etapa de espermatoцитos (Gonçalves y cols., 2017). Aunque esta región de AZF ha sido la menos estudiada, se conoce que las deleciones clásicas de AZFb, P5/proximal-P1, ocurren principalmente por cruzamiento desigual entre segmentos homólogos en sus extremidades (Soares y cols., 2012). Esta pérdida causa la deleción de seis genes que codifican proteínas Y, expresadas predominantemente solo en el tejido testicular; EIFA1Y, HSFY (2 copias funcionales), PRY (2 copias funcionales), RBMY1 (seis copias funcionales), RPS4Y y SMCY (P. Vogt y cols., 2021).

Una limitación del estudio es la cantidad de marcadores evaluados. A pesar de ser un método establecido por EAA/EMQN y utilizar los seis STSs de mayor relevancia clínica [AZFa (sY84, sY86), AZFb (sY127, sY134), y AZFc (sY254, sY255)]. Un estudio realizado por Han y colaboradores (2018) comprobó la posibilidad de que el panel de marcadores previamente mencionado no sea útil para la detección de todas las microdeleciones en AZFc. Pues en este estudio se utilizaron 15 marcadores STS adicionales que permitieron la detección tres pacientes adicionales con deleciones en la subregión C del factor de azoospermia. Un panel amplificado de 23 marcadores STS se presenta en la sección de anexos, Cuadro 15.

En base a la proporción de microdeleciones del cromosoma Y detectadas en individuos con oligozoospermia severa (31.25 %) respecto a aquellos con azoospermia no obstructiva (37.50 %) no es posible establecer una diferencia de frecuencia para su prevalencia. Es por ello que se recomienda ampliar el tamaño de la muestra del estudio para reclutar un mayor número de individuos con problemas de fertilidad que además incluya a más fenotipos y sectores de la población guatemalteca. Ya que en la población general, a nivel mundial, las microdeleciones en el cromosoma Y ocurren en aproximadamente 1 de 4000 hombres (Simoni, Tüttelmann, Gromoll, y Nieschlag, 2008).

La detección de microdeleciones del cromosoma Y en la población guatemalteca es importante. No solo por su principal propósito de identificar las causas de la infertilidad masculina, sino porque posee un fuerte valor pronostico que permite brindar el mejor consejo genético y tratamiento a la pareja. Sobre todo cuando se toman en cuenta los elevados costos de un tratamiento de reproducción asistida en el país. Ya que en Guatemala un ciclo de Fertilización *in vitro* tiene un costo mínimo de cuarenta y cuatro mil quetzales (Q 44,000.00), sin tomar en cuenta los análisis clínicos previos que se deben realizar. Por lo que un fallo del tratamiento representa la pérdida de una significativa inversión monetaria para la pareja. Por otra parte, en caso de que el tratamiento resulte exitoso, los pacientes deben tener en cuenta que la concepción de un hijo de sexo masculino a través de tratamientos de reproducción asistida no evita el que este individuo llegue a padecer los mismos defectos genéticos que su progenitor debido a que el cromosoma Y se hereda completamente del padre, por lo que se transmite de generación en generación prácticamente sin modificaciones.

1. Se modificó eficazmente el protocolo para extracción de ácidos nucleicos a partir de hisopado de cavidad bucal brindado por el fabricante del kit comercial utilizado. Esto permitió la optimización de reactivos sin comprometer la concentración o pureza del ADN genómico purificado.
2. Se optimizó el uso, individual o en PCR multiplex, de pares específicos de cebadores para la detección de microdeleciones del cromosoma Y mediante seis marcadores moleculares en la región del factor de azoospermia (AZF).
3. Se validó el uso de una toma de muestra menos invasiva para el paciente al detectar que la efectividad del uso de ADN plantilla aislado de muestras de hisopado de cavidad bucal es la misma que para aquellas pruebas realizadas con ADN genómico extraído a partir de sangre periférica.
4. Fue posible implementar el método de detección para microdeleciones del cromosoma Y diseñado por EAA/EMQN, para el diagnóstico de pacientes con azoospermia no obstructiva y oligozoospermia severa a partir de hisopado de cavidad bucal.
5. Este estudio detectó microdeleciones del cromosoma Y en las subregiones AZFa y AZFb de individuos previamente diagnosticados con azoospermia no obstructiva y oligozoospermia severa. Entre los 16 pacientes con oligozoospermia severa y 8 con azoospermia no obstructiva, 31 % 38 % respectivamente presentaron microdeleciones del cromosoma Y. Siendo más frecuentes las microdeleciones en AZFa (29.1 %) que en AZFb (4.2 %). Sin embargo, entre los 24 individuos analizados, no se detectaron microdeleciones en la subregión C del Factor de Azoospermia (AZF).
6. No se detectaron microdeleciones del cromosoma Y en ninguno de los hombres con fertilidad comprobada pertenecientes al grupo control del estudio, 32 individuos.

Recomendaciones

1. Para determinar con precisión el tipo de microdeleciones del cromosoma Y más frecuente en la población guatemalteca se recomienda ampliar el tamaño de la muestra de estudio para reclutar un mayor número de individuos con problemas de fertilidad debido a su baja incidencia.
2. Se recomienda utilizar un mayor número de marcadores STS para la detección de microdeleciones del cromosoma Y menos frecuentes.
3. Se recomienda la detección sistemática de microdeleciones de Y en pacientes varones previo al tratamiento con ICSI con el objetivo de brindar un mejor asesoramiento. Dado que la herencia del cromosoma Y es siempre de origen paterno, por lo que es probable que los hombres con deleciones del cromosoma Y tengan hijos con defectos genéticos similares después del tratamiento con reproducción asistida.

- Akmsal, E. C., Baydilli, N., Dündar, M., y Ekmekçiöğlü, O. (2018). The frequencies of y chromosome microdeletions in infertile males. *Turkish journal of urology*, 44(5), 389.
- Aknin-Seifer, I., Touraine, R., Lejeune, H., Laurent, J., Lauras, B., y Levy, R. (2003). A simple, low cost and non-invasive method for screening y-chromosome microdeletions in infertile men. *Human Reproduction*, 18(2), 257–261.
- Alonso-Cerezo, M. C., Ruiz, M. C., Chantada-Abal, V., de la Fuente-Hernández, L. A., García-Cobaleda, I., García-Ochoa, C., ... others (2018). Recomendaciones para el estudio genético e inmunológico en la disfunción reproductiva. *Medicina Clínica*, 151(4), 161–e1.
- Ambulkar, P. S., Sigh, R., Reddy, M., Varma, P. S., Gupta, D. O., Shende, M. R., y Pal, A. K. (2014). Genetic risk of azoospermia factor (azf) microdeletions in idiopathic cases of azoospermia and oligozoospermia in central indian population. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 8(3), 88.
- Balitán Amoretty, C. B., Blanco Knotek, S. A., y Hernández, Y. A. (2018). *Factores asociados a la baja calidad del esperma en estudiantes de la facultad de ciencias médicas de la unan-managua en el año 2017* (Tesis Doctoral no publicada). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua.
- Behulova, R., Varga, I., Strhakova, L., Bozikova, A., Gabrikova, D., Boronova, I., y Repiska, V. (2011). Incidence of microdeletions in the azf region of the y chromosome in slovak patients with azoospermia. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 155(1).
- Cerda, J., Vera, C., y Rada, G. (2013). Odds ratio: aspectos teóricos y prácticos. *Revista médica de Chile*, 141(10), 1329–1335.
- Chabchoub, I., Kdous, M., Zhioua, F., Gaied, A., y Merdassi, G. (2019). Y chromosome microdeletions screening in tunisian infertile men. En *Annales de biologie clinique* (Vol. 77, pp. 517–523).
- Colaco, S., y Modi, D. (2018). Genetics of the human y chromosome and its association with male infertility. *Reproductive biology and endocrinology*, 16(1), 1–24.
- Colaco, S., y Modi, D. (2019). Consequences of y chromosome microdeletions beyond male infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(7), 1329–1337.
- Colaco, S., y Sakkas, D. (2018). Paternal factors contributing to embryo quality. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(11), 1953–1968.

- Dominguez, A., y Reijo Pera, R. (2013). Infertility. En *Brenner's encyclopedia of genetics (second edition)* (Second Edition ed., p. 71-74). San Diego: Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00793-2>
- Ghatak, S., Muthukumaran, R. B., y Nachimuthu, S. K. (2013). A simple method of genomic dna extraction from human samples for pcr-rflp analysis. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 24(4), 224.
- Gholami, D., Jafari-Ghahfarokhi, H., Nemati-Dehkordi, M., y Teimori, H. (2017). Y chromosome microdeletions frequency in idiopathic azoospermia, oligoasthenozoospermia, and oligospermia. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 15(11), 703.
- Gonçalves, C., Cunha, M., Rocha, E., Fernandes, S., Silva, J., Ferraz, L., ... Sousa, M. (2017). Y-chromosome microdeletions in nonobstructive azoospermia and severe oligozoospermia. *Asian journal of andrology*, 19(3), 338.
- Han, S.-H., Bak, C.-W., Cho, H., Ban, G.-W., Kang, J.-S., Lim, H.-S., ... Hwang, S.-Y. (2018). Genetic screening for chromosomal abnormalities and y chromosome microdeletions in 846 infertile korean men. *Laboratory Medicine Online*, 8(4), 148–155.
- Jensen, C. F., Fode, M., Østergren, P. B., y Sønksen, J. (2019). *A refined view on the association between y-chromosome microdeletions and sperm concentration* (Vol. 76) (n.º 5).
- Johnson, M., Raheem, A., De Luca, F., Hallerstrom, M., Zainal, Y., Poselay, S., ... others (2019). An analysis of the frequency of y-chromosome microdeletions and the determination of a threshold sperm concentration for genetic testing in infertile men. *BJU international*, 123(2), 367–372.
- Kleiman, S. E., Almog, R., Yogev, L., Hauser, R., Lehavi, O., Paz, G., ... Botchan, A. (2012). Screening for partial azfa microdeletions in the y chromosome of infertile men: is it of clinical relevance? *Fertility and sterility*, 98(1), 43–47.
- Kohn, T. P., Kohn, J. R., Owen, R. C., y Coward, R. M. (2019). The prevalence of y-chromosome microdeletions in oligozoospermic men: a systematic review and meta-analysis of european and north american studies. *European urology*, 76(5), 626–636.
- Krausz, C., Escamilla, A. R., y Chianese, C. (2015). Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction*, 150(5), R159–R174.
- Krausz, C., Hoefsloot, L., Simoni, M., y Tüttelmann, F. (2013). Eaa/emqn best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*, 2(1), 5–19.
- Krausz, C., y Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature Reviews. Urology*, 15(6), 369–384.
- Liu, T., Song, Y.-X., y Jiang, Y.-M. (2019). Early detection of y chromosome microdeletions in infertile men is helpful to guide clinical reproductive treatments in southwest of china. *Medicine*, 98(5).
- Martínez-Garza, S. G., Gallegos-Rivas, M. C., Vargas-Maciél, M., Rubio-Rubio, J. M., de los Monteros-Rodríguez, M. E., González-Ortega, C., ... Gutiérrez-Gutiérrez, A. M. (2008). Genetic screening in infertile mexican men: chromosomal abnormalities, y chromosome deletions, and androgen receptor cag repeat length. *Journal of andrology*, 29(6), 654–660.
- Navarro-Costa, P., Plancha, C. E., y Gonçalves, J. (2010). Genetic dissection of the azf regions of the human y chromosome: thriller or filler for male (in) fertility? *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.
- Pérez, Y., y Pérez, R. R. (2013). Microdeleciones del cromosoma y como causa de infertilidad masculina. *Rev cienc med Habana*.
- QIAGEN. (2016). Qiaamp dnamini and blood mini handbook. *Forest Stewardship Council, Hilden*.
- Riquenes, E. V., Teruel, B. M., Mesa, T. C., Peña, G. M., y Heredia, M. G. (2017). Introducción del estudio molecular de la microdelección del cromosoma yq en hombres cubanos con azoospermia u oligozoospermia idiopática. *Revista Cubana de Genética Comunitaria*, 11(3), 32–37.
- Rives, N. (2014). Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis, patient approach and genetic counseling. En *Annales d'endocrinologie* (Vol. 75, pp. 112–114).
- Rodríguez Salvador, A. (2018). *Valoración del diagnóstico clínico de los factores genéticos implicados en la infertilidad masculina* (Tesis Doctoral no publicada). Universidad de Cantabria.

- Sen, S., Ambulkar, P., Hinduja, I., Zaveri, K., Gokral, J., Pal, A., y Modi, D. (2015). Susceptibility of gr/gr rearrangements to azoospermia or oligozoospermia is dependent on daz and cdy1 gene copy deletions. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(9), 1333–1341.
- Sha, J., Huang, G., Zhang, B., Wang, X., Xu, Z., y Zhai, J. (2020). Chromosomal abnormalities and y chromosome microdeletions in infertile men with azoospermia and oligozoospermia in eastern china. *Journal of International Medical Research*, 48(4), 0300060519896712.
- Simoni, M., Bakker, E., Eurlings, M., Matthijs, G., Moro, E., Muller, C., y Vogt, P. (1999). Laboratory guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. *International journal of andrology*, 22(5), 292–299.
- Simoni, M., Tüttelmann, F., Gromoll, J., y Nieschlag, E. (2008). Clinical consequences of microdeletions of the y chromosome: the extended münster experience. *Reproductive biomedicine online*, 16(2), 289–303.
- Soares, A. R., Costa, P., Silva, J., Sousa, M., Barros, A., y Fernandes, S. (2012). Azfb microdeletions and oligozoospermia—which mechanisms? *Fertility and sterility*, 97(4), 858–863.
- Thermo Fisher Scientific. (2017). Nanodrop one user guide [Manual de software informático]. Wilmington, Delaware, U.S.A.. Descargado de <https://vetmed.illinois.edu/wp-content/uploads/sites/19/2018/05/NanoDropOneUserManual.pdf>
- Vásquez, F., y Echeverri, D. V. (2007). Espermograma y su utilidad clínica. *Salud Uninorte*, 23(2), 220–230.
- Vogt, P., Bender, U., Deibel, B., Kiesewetter, F., Zimmer, J., y Strowitzki, T. (2021). Human azfb deletions cause distinct testicular pathologies depending on their extensions in yq11 and the y haplogroup: new cases and review of literature. *Cell & Bioscience*, 11(1), 1–13.
- Vogt, P. H., Bender, U., Zimmer, J., y Strowitzki, T. (2017). Human y chromosome and male infertility: forward and back from azoospermia factor chromatin structure to azoospermia factor gene function. En *Genetics of human infertility* (Vol. 21, pp. 57–73). Karger Publishers.
- World Health Organization. (2010). *Who laboratory manual for the examination and processing of human semen* (5.^a ed.). World Health Organization.
- World Health Organization. (2021). *Who laboratory manual for the examination and processing of human semen* (6.^a ed.). World Health Organization.

Cuadro 10: Secuencia de cebadores para detección de STS para microdeleciones del cromosoma Y

STS	Cebador A (5' - 3')	Cebador B (5' - 3')
sY84 (326 pb)	AGAAGGGTCCTGAAAGCAGGT	GCCTACTACCTGGAGGCTTC
sY86 (318 pb)	GTGACACACAGACTATGCTTC	ACACACAGAGGGACAACCCT
sY127 (274 pb)	GGCTCACAAACGAAAAGAAA	CTGCAGGCAGTAATAAGGGA
sY134 (301 pb)	GTCTGCCTCACCATAAAAACG	ACCACTGCCAAAACCTTTCAA
sY254 (380 pb)	GGGTGTTACCAGAAGGCAAA	GAACCGTATCTACCAAAGCAGC
sY255 (123 pb)	GTTACAGGATTCGGCGTGAT	CTCGTCATGTGCAGCCAC
sY14 (472 pb)	GAATATTCCCGCTCTCCGGA	GCTGGTGCTCCATTCTTGAG
ZFX/ZFY (495 pb)	ACCRCCTGACTGACTGTGATTACAC	GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT

Notas:

- Los STS sY84 y sY86 han sido diseñados para la región AZFa, sY127 y sY134 para AZFb, y sY254 y sY255 para AZFc.
- pb = abreviatura para pares de bases.

(Krausz y cols., 2013)



COMITÉ DE ETICA
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
RESULTADOS EVALUACION DE PROYECTO

QB-002-2021-17526

A: MSc. M.Sc. Andrea Vanessa Gómez Varillas Investigador Principal
Analucia González Chávez, Co-Investigador Principal

DE: Comité de Ética
Facultad de Ciencias y Humanidades
Universidad del Valle de Guatemala

FECHA: 15 de mes de Noviembre, 2021

ASUNTO: **Revisión Proyecto de investigación:** DETECCIÓN MOLECULAR DE MICRODELECIONES DEL CROMOSOMA Y A PARTIR DE HISOPADO DE CAVIDAD BUCAL EN PACIENTES CON OLIGOZOOSPERMIA SEVERA O AZOOSPERMIA.

VEREDICTO: Aprobado.

El Comité de Ética de la Facultad de Ciencias y Humanidades de la UVG ha revisado y aprobado el protocolo arriba indicado. Se le recuerda que el comité debe revisar y aprobar todos protocolos de investigación que utilicen la experimentación biomédica en seres humanos, en intervalos apropiados y de acuerdo al nivel de riesgo, por lo menos una vez al año. Si el proyecto dura más de un año, es responsabilidad del investigador, enviar al comité el protocolo de investigación para revisión y solicitud de aprobación de continuación del estudio.

Archive esta notificación como prueba de la aprobación. Para evitar atrasos en la aprobación de su investigación y la posible suspensión del estudio, por favor envíe su solicitud de continuación, por lo menos seis semanas antes de cumplirse seis meses después de haber sido autorizado por este comité.

Cualquier problema o evento serio relacionado con el estudio, deberá ser notificado inmediatamente al Comité.

Cualquier modificación al protocolo debe ser enviada al Comité para su aprobación antes de ser implementada.

Si tiene alguna duda o pregunta, por favor contactar a la Sra. Ana Lorena Ortiz, al teléfono 25071500, extensión 21448 o al correo electrónico faccch@uvg.edu.gt.

Dr. Elfego Rolando López
Presidente, Comité de Ética
Facultad de Ciencias y Humanidades
Universidad del Valle de Guatemala

ERLG/alo
c.c. Dirección de Departamento
expediente estudiante
archivo.

Identificador anónimo: _____
Grupo: _____

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de Investigación: Detección molecular de microdeleciones del cromosoma Y a partir de hisopado de cavidad bucal en pacientes con oligozoospermia severa o azoospermia

Esta investigación y consentimiento informado han sido previamente autorizados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias y Humanidades de la Universidad del Valle de Guatemala. Por dudas relacionadas a los temas de ética comunicarse con el Dr. Elfrigo Rolando López, presidente del comité, al correo erolando@uvg.edu.gt.

Yo soy Analucia González Chávez, estudiante de último año de la Licenciatura en Bioquímica y Microbiología en la Universidad del Valle de Guatemala. Este estudio forma parte de mi trabajo de graduación el cual realizo en conjunto a Centro Procrea®, una clínica de fertilidad privada ubicada en la Ciudad de Guatemala. El propósito de este proyecto es implementar un método de diagnóstico molecular, PCR, para la detección de microdeleciones del cromosoma Y en pacientes guatemaltecos diagnosticados con azoospermia u oligozoospermia severa, es decir, recuento de espermatozoides nulo o menor a 5 millones por mililitro de eyaculado respectivamente. Los resultados de esta investigación servirán para que los médicos que se dedican a ayudar a parejas con problemas de fertilidad cuenten con información acerca de la incidencia de esta condición en la población del país, y así puedan optar por una mejor vía de tratamiento. Además, se busca demostrar que una toma de muestra menos invasiva como el hisopado de cavidad bucal brinda resultados de la misma calidad y precisión que la extracción de sangre venosa.

Para este estudio se requiere de la participación de 56 individuos masculinos, mayores a 18 años y cuyo espermograma haya sido previamente analizado en Centro Procrea®. Por lo que usted está siendo invitado a participar de manera libre, completamente voluntaria y anónima en este estudio. Previo a brindar su consentimiento es importante que sepa que para participar en este estudio no debe presentar enfermedades bucales y que accederá a no fumar, lavarse los dientes, masticar chicle, comer o beber agua u otro líquido durante al menos media hora antes de la toma de muestra. Esto se debe a que estas actividades pueden comprometer los resultados de la prueba por fuentes de contaminación, lo cual podría generar resultados falsos en el análisis de laboratorio. Además, su participación es valiosa para nosotros, pero no será remunerada económicamente para evitar su coacción. Puede que no exista un beneficio directo de este estudio para usted. Sin embargo, cuatro meses luego de finalizar el proyecto se le enviarán sus resultados de detección de microdeleciones del cromosoma Y de manera electrónica.

Su participación no tomará más de 10 minutos entre la firma del consentimiento informado y la toma de muestra. Está última se realizará en el área de toma de muestras de Centro Procrea®, donde se recolectarán células del lado interno de cada una de sus mejillas mediante el frote suave y circular de un hisopo con fibras de nylon durante 30 segundos. Cabe aclarar que este procedimiento no representa un riesgo para su salud física o integridad. Sin embargo, es posible que posterior al hisopado usted presente comezón o resequedad en los labios y boca, lo cual es fácilmente remediable con tomar agua. Su aporte a este estudio es completamente anónimo, por lo que su muestra será identificada con un código único y se destruirá al concluir la investigación. Este código también será utilizado para archivar su consentimiento informado en un gabinete bajo llave, y para relacionar su información de contacto registrada en el formulario en línea. A estos datos y documentos únicamente tendrán acceso los investigadores de este proyecto, con quienes también puede comunicarse en caso de dudas o consultas respecto al estudio, Lic. Fredy Mejía (fmejia@centroprocrea.com), M.Sc. Andrea Gómez (avgomez@uvg.edu.gt) y Analucia González Chávez (gon17526@uvg.edu.gt).

Todos los datos y resultados generados durante la investigación se encontrarán en un archivo digital almacenado en una computadora resguardada por usuario y contraseña a la cual solo tendrán acceso los investigadores de este estudio. Los datos y resultados finales generados durante la investigación buscarán resguardar su identidad, por lo que en todo momento serán publicados únicamente bajo los identificadores anónimos asignados inicialmente. El informe del trabajo de graduación estará disponible en la biblioteca de la Universidad del Valle de Guatemala (18 Av. 11-95 zona 15 Vista Hermosa III) a partir de abril, 2022 en caso usted desee consultarlo.

Al firmar este consentimiento usted **no se encuentra comprometido a terminar todas las etapas del estudio**, y tiene la total libertad de revocar su autorización sin necesidad de explicación alguna. Se garantiza que no habrá castigo alguno, falta de beneficios médicos o consecuencias negativas para su persona. Solamente se solicita informar acerca de su decisión para que se le haga entrega de los resultados obtenidos a partir de su muestra hasta el momento, se le excluya de los resultados finales y su muestra se destruya inmediatamente.

La firma del consentimiento no implica la pérdida de los derechos individuales de acuerdo con las leyes de Guatemala.

Firma de testigo (en caso de que el donante sea analfabeto)

He leído la explicación de este estudio y doy fe que los procedimientos, riesgos y posibles beneficios fueron explicados de manera detallada al donante. A la vez declaro que yo no trabajo con el investigador principal u otras personas que trabajen con él, por lo que confirmo que el donante ha accedido de manera completamente voluntaria a participar en este estudio y que puede retirarse en cualquier momento que lo desee, sin brindar explicación ni verse expuesto a represalias.

Nombre de donante	DPI	Firma
Nombre de testigo	DPI	Firma
Nombre de investigador	DPI	Firma

Guatemala, ____ de _____ de 2021

Copia para participante del estudio

Identificador anónimo: _____

Declaración del Consentimiento Informado

He sido invitado a participar en el trabajo de investigación “Detección molecular de microdeleciones del cromosoma Y a partir de hisopado de cavidad bucal en pacientes con oligozoospermia severa o azoospermia”. Por lo que he leído y se me ha informado sobre los riesgos y beneficios del estudio, he tenido la oportunidad de realizar preguntas acerca de la investigación y estas se me han contestado satisfactoriamente. Soy consciente que no recibiré una remuneración por mi participación y he accedido voluntariamente a proporcionar una muestra de hisopado de cavidad bucal. Previo a esta me limité a no comer, fumar, masticar chicle y beber agua antes y durante la toma de muestra debido a que esto puede comprometer los resultados de su análisis. Por lo tanto, consiento voluntariamente participar en este estudio y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que se me afecte de ninguna manera.



Escanee para acceder a formulario de registro de información de contacto

Nombre de donante	DPI	Firma
Nombre de testigo	DPI	Firma
Nombre de investigador	DPI	Firma

Guatemala, ____ de _____ de 2021

Información de Coinvestigadores

Licenciado Fredy Mejía
Embriólogo
Correo electrónico: fmejia@centroprocrea.com

Analucia González Chávez
Estudiante de Bioquímica y Microbiología
Celular: 30672 2630
Correo electrónico: gon17526@uvg.edu.gt

Cuadro 11: Concentraciones y razones de pureza obtenidas con NanoDrop OneC para ADN genómico extraído a partir de hisopado de cavidad bucal a individuos normospérmicos

Muestra	Lectura 1			Lectura 2		
	Concentración (ng/µl)	A 260/280	A 260/230	Concentración (ng/µl)	A 260/280	A 260/230
NO-01	15.43	1.81	2.20	16.42	1.84	2.04
NO-02	16.16	1.83	2.10	15.61	1.77	2.19
NO-03	15.12	1.79	2.14	13.70	1.82	2.12
NO-04	13.30	1.70	2.02	14.69	1.80	2.04
NO-05	15.38	1.71	2.17	14.97	1.82	2.15
NO-06	17.40	1.73	2.17	17.91	1.75	2.02
NO-07	16.11	1.80	2.14	15.20	1.74	2.05
NO-08	13.86	1.70	2.00	13.76	1.72	2.05
NO-09	21.72	1.83	2.04	19.94	1.80	2.15
NO-10	15.27	1.74	2.14	14.37	1.75	2.08
NO-11	17.14	1.70	2.18	17.43	1.85	2.07
NO-12	14.57	1.85	2.11	15.64	1.78	2.07
NO-13	15.30	1.75	2.05	14.39	1.70	2.00
NO-14	15.76	1.77	2.20	14.57	1.83	2.15
NO-15	17.77	1.75	2.16	17.60	1.76	2.19
NO-16	16.45	1.71	2.20	17.67	1.81	2.04
NO-17	15.70	1.75	2.03	14.49	1.85	2.02
NO-18	15.26	1.74	2.01	15.59	1.85	2.01
NO-19	14.80	1.84	2.19	14.45	1.74	2.04
NO-20	17.99	1.73	2.05	16.39	1.82	2.07
NO-21	16.06	1.70	2.15	17.21	1.79	2.20
NO-22	18.83	1.78	2.08	20.76	1.81	2.16
NO-23	15.07	1.76	2.18	16.74	1.71	2.01
NO-24	18.23	1.74	2.04	19.04	1.70	2.03
NO-25	14.44	1.71	2.05	15.61	1.82	2.17
NO-26	14.24	1.81	2.14	15.83	1.72	2.11
NO-27	16.81	1.74	2.07	14.72	1.75	2.01
NO-28	17.99	1.78	2.15	16.25	1.72	2.16
NO-29	16.47	1.78	2.20	17.27	1.83	2.12
NO-30	16.14	1.81	2.08	15.34	1.80	2.01
NO-31	14.24	1.85	2.08	14.98	1.71	2.17
NO-32	20.79	1.78	2.00	21.85	1.80	2.06

Cuadro 12: Concentraciones y razones de pureza obtenidas con NanoDrop OneC para ADN genómico extraído a partir de sangre de individuos normospérmicos

Muestra	Lectura	Concentración (ng/μl)	A 260/280	A 260/230
NO-01	1	22.47	1.79	2.19
	2	22.72	1.79	2.03
NO-02	1	29.97	1.81	2.10
	2	29.49	1.84	2.17
NO-03	1	29.40	1.76	2.06
	2	27.24	1.80	2.09
NO-04	1	23.54	1.83	2.09
	2	26.38	1.75	2.15
NO-05	1	28.65	1.72	2.03
	2	29.76	1.81	2.11

Cuadro 13: Concentraciones y razones de pureza obtenidas con NanoDrop OneC para ADN genómico extraído a partir de hisopado de cavidad bucal a pacientes con oligozoospermia severa

Muestra	Lectura	Concentración (ng/μl)	A 260/280	A 260/230
OL-01	1	15.55	1.74	2.20
	2	13.87	1.76	2.05
OL-02	1	16.62	1.71	2.15
	2	16.25	1.71	2.06
OL-03	1	15.10	1.78	2.14
	2	15.85	1.79	2.01
OL-04	1	15.52	1.71	2.02
	2	15.63	1.81	2.19
OL-05	1	15.30	1.81	2.18
	2	16.40	1.78	2.15
OL-06	1	15.36	1.80	2.09
	2	16.47	1.78	2.14
OL-07	1	16.51	1.76	2.03
	2	14.98	1.81	2.16
OL-08	1	16.85	1.83	2.03
	2	17.45	1.75	2.15
OL-09	1	14.01	1.80	2.01
	2	14.46	1.73	2.01
OL-10	1	15.94	1.83	2.13
	2	16.15	1.77	2.19
OL-11	1	13.46	1.72	2.13
	2	13.73	1.71	2.05
OL-12	1	14.67	1.74	2.16
	2	15.75	1.84	2.08
OL-13	1	14.90	1.77	2.06
	2	13.89	1.82	2.08
OL-14	1	15.44	1.75	2.13
	2	16.13	1.83	2.13
OL-15	1	16.96	1.74	2.15
	2	16.42	1.76	2.12
OL-16	1	14.17	1.79	2.09
	2	16.08	1.78	2.06

Cuadro 14: Concentraciones y razones de pureza obtenidas con NanoDrop OneC para ADN genómico extraído a partir de hisopado de cavidad bucal a pacientes con azoospermia no obstructiva

Muestra	Lectura	Concentración (ng/μl)	A 260/280	A 260/230
AZ-01	1	16.39	1.72	2.05
	2	15.70	1.77	2.03
AZ-02	1	15.76	1.70	2.20
	2	17.07	1.78	2.16
AZ-03	1	14.34	1.77	2.00
	2	14.56	1.72	2.20
AZ-04	1	16.21	1.82	2.00
	2	15.45	1.71	2.20
AZ-05	1	14.66	1.85	2.20
	2	16.02	1.83	2.09
AZ-06	1	17.07	1.78	2.16
	2	17.54	1.76	2.17
AZ-07	1	15.41	1.73	2.13
	2	16.48	1.73	2.00
AZ-08	1	14.90	1.70	2.11
	2	16.05	1.78	2.01

Cuadro 15: Panel extenso de marcadores STS propuesto por EAA/EMQN para la detección de microdeleciones del cromosoma Y

STS	Cebador A (5' - 3')	Cebador B (5' - 3')
<i>Panel básico</i>		
sY84 (326 pb)	AGAAGGGTCCTGAAAGCAGGT	GCCTACTACCTGGAGGCTTC
sY86 (318 pb)	GTGACACACAGACTATGCTTC	ACACACAGAGGGACAACCCT
sY127 (274 pb)	GGCTCACAAACGAAAAGAAA	CTGCAGGCAGTAATAAGGGA
sY134 (301 pb)	GTCTGCCTCACCATAAAACG	ACCACTGCCAAAACCTTTCAA
sY254 (380 pb)	GGGTGTTACCAGAAGGCAAA	GAACCGTATCTACCAAAGCAGC
sY255 (123 pb)	GTTACAGGATTCGGCGTGAT	CTCGTCATGTGCAGCCAC
sY14 (472 pb)	GAATATCCCGCTCTCCGGA	GCTGGTGCTCCATTCTTGAG
ZFX/ZFY (495 pb)	ACCRCTGTA CTGACTGTGATTACAC	GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAAGT
<i>Panel extendido</i>		
sY82 (264 pb)	ATCCTGCCCTTCTGAATCTC	CAGTGTCCACTGATGGATGA
sY83 (275 - 277 pb)	CTTGAATCAAAGAAGGCCCT	CAATTTGGTTTGGCTGACAT
sY1064 (110 pb)	GGGTCCGGTGCACCTAAATAA	TGCACTAAAGAGTGATAATAAATTCTG
sY1065 (239 pb)	TCAGGTA CTGTGATGCCGTT	TGAAGAGGACACAAAGGGAAA
sY1082 (247 pb)	ATGGCTTCATCCCAACTGAG	CATTGGCCTCTCCTGAGACT
sY88 (123 pb)	TTGTAATCCAAATACATGGGC	CACCCAGCCATTTGTTTTTAC
sY105 (301 pb)	AAGGGCTTCTTCTTTGCTT	AGGGAGCTTAAACTCACCGT
sY121 (190 pb)	AGTTCACAGAATGGAGCCTG	CCTGTGACTCCAGTTTGGTC
sY1224 (640 pb)	GGCTTAAACTTGGGAGGGTG	CAAAGAGCCTCCCAGACCA
sY143 (311 pb)	GCAGGATGAGAAGCAGGTAG	CCGTGTGCTGGAGACTAATC
sY1192 (255 pb)	ACTACCATTTCTGGAAGCCG	CTCCCTTGGTTCATGCCATT
sY153 (139 pb)	GCATCCTCATTTTATGTCCA	CAACCCAAAAGCACTGAGTA
sY1291 (527 pb)	TAAAAGGCAGAACTGCCAGG	GGGAGAAAAGTTCTGCAACG
sY1191 (385 pb)	CCAGACGTTCTACCCTTTTCG	GAGCCGAGATCCAGTTACCA
sY160 (236 pb)	TACGGGTCTCGAATGGAATA	TCATTGCATTCTTTCCATT

Notas:

- Los cebadores de sY84, sY86, sY82, sY83, sY1064, sY1065, sY1182 y sY88 han sido diseñados para la región AZFa.
- Los cebadores de sY127, sY134, sY105, sY121, sY1224, sY143, sY1192 han sido diseñados para AZFb,
- Los cebadores de los STS sY254 y sY255 se diseñaron para AZFc.
- Los STS sY1291 y sY1191 han sido diseñados para la región gr/gr del cromosoma Y.
- Los cebadores del marcador sY160 se diseñaron para la heterocromatina del cromosoma Y.
- pb = abreviatura para pares de bases.

(Krausz y cols., 2013)