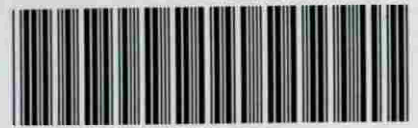


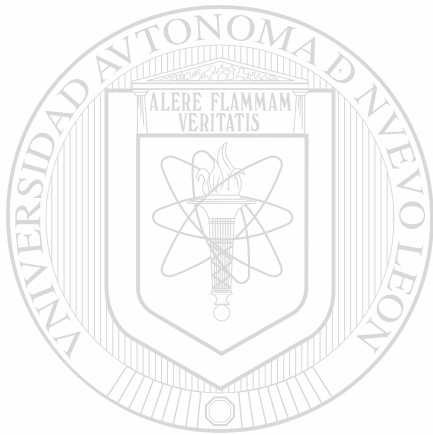
20

TITULO: "DETERMINACION DE FACTORES
GENETICOS EN INFERTILIDAD MASCU-
LINA IDIOPATICA"
Q.F.B. Itzel Evelyn Calleja Macías

TM
RC889
.C3
c.1



1080095021



UANL

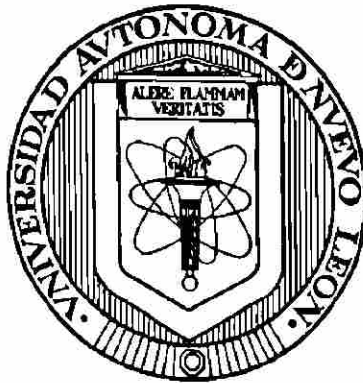
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DETERMINACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS EN
INFERTILIDAD MASCULINA IDIOPÁTICA**

POR:

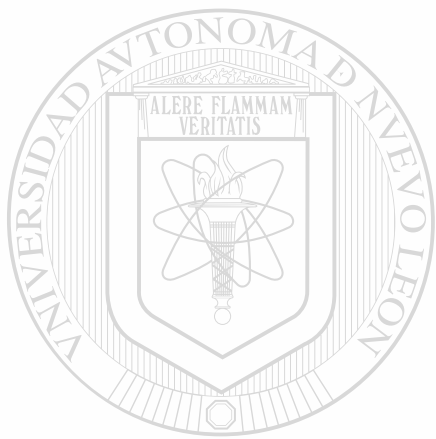
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECTORA Q.F.B. ITZEL EVELYN CALLEJA MACIAS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en Biología
Molecular e Ingeniería Genética**

Noviembre, 2000

TM
RC889
.C3




UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



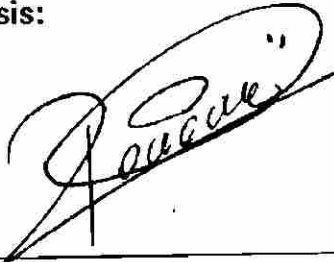


El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Rocío Ortiz López y co-dirección del Dr. Hugo Barrera Saldaña y el Dr. Lauro Gómez Guerra.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**"DETERMINACION DE FACTORES GENETICOS EN INFERTILIDAD
MASCULINA IDIOPATICA"**


Aprobación de la Tesis:



DRA. ROCIO ORTIZ LOPEZ
Director de Tesis




DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



DR. LAURO SALVADOR GOMEZ GUERRA
Co-Director de Tesis

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
De Investigación y Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

A Dios

Por ser la luz que siempre me guía, estar presente y sentirte aun sin verte.

A mi abuelito

Luis Macias Lobato

He tratado de aceptar tu ausencia, pero sigues viviendo en mí. Recuerdo tus enseñanzas y me vitaliza el amor que me prodigaste. Por lo que fuiste, por lo que eres, este avance de mi vida es por tí.

A mi abuelita y mamá

Evelia Hernández de Macias y Laura I. Macias

Por todo el amor y la comprensión que siempre me han tenido. Por estar conmigo en los momentos alegres y tristes, por cuidarme y enseñarme que la vida es hermosa.

A mis hermanas

Wendy y Lyrsa Callejas

Por todo el cariño que siempre me han dado. Por las peleas y alegrías que siempre hemos disfrutado. Por todo el apoyo con el que siempre cuento.

A mi tía y primo

Lidia Macias y Alberto Vargas

Por su apoyo incondicional, por quererme como a una hija y hermana. Por darme todo su cariño.

A mi nueva familia de Monterrey

Familia Reyes Ruiz

Por aceptarme tal y como soy, por darme todo su amor cariño y quererme como a una hija.

A toda mi familia

Por acompañarme y apoyarme siempre en todo momento. Mil gracias.

A todos mis amigos

Todos los pandillistas (Xalapa), Grizzlies (Monterrey) y compañeros de carrera (UV).

Por todos los momentos que reímos y disfrutamos mucho, porque siempre estarán en mi corazón.

A mi gran amor:

Mauricio Reyes

Por ser mi mejor amigo y compañero, por apoyarme y brindarme todo tu amor.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rocío Ortiz López mi directora y asesora de tesis, que antes que todo fue una amiga, gracias por su amistad y enseñanza.

Al Dr. Augusto Rojas quien desinteresadamente siempre me apoyo y ayudo en todo momento.

Al Dr. Hugo A. Barrera por invitarme a emprender este maravilloso viaje, por la oportunidad de superarme y aceptarme en la ULIEG.

A la Dra. Herminia G. Martínez y la Dra. Agnes Revol de Mendoza por sus enseñanzas, consejos y apoyo que siempre me brindaron durante toda la maestría.

Al Dr. Lauro Gómez Guerra por su ayuda y colaboración para la realización de este sueño.

Al Dr. Antonio Gutiérrez Gutiérrez quien siempre puso lo mejor de si para la realización de este proyecto. Gracias por su cooperación.

Al Departamento de Genética del Instituto de Biomédicas del IMSS, especialmente al maestro Carlos, Elba y Martita.

A todos lo pacientes que desinteresadamente contribuyeron con su material genético para que esta investigación se realizara.

Al grupo de los 12 Virgilio, Nancy, Polo, Clarisa, Sergio, Lulú, Aurelio, Malena, Prisco, Lety y Mauricio por el tiempo que compartimos, disfrutamos, sufrimos, porque siempre los recordaré.

A mis compañeros de laboratorio Sergio Salazar y Luis Miguel C. Gracias por apoyarme y aguantarme durante todo este tiempo.

A la Unidad de Diagnóstico Molecular, Carmelita, Arturo y Eli gracias por ayudarme, por sus consejos y su grata compañía.

A todas las secretarias de la ULIEG, Raquel, Vicky, Ale, Paty y Elsa por su disponibilidad y sin fin de atenciones.

A todo el personal de la ULIEG, Don Panchito, Don Pedrito, Don Ponchito, Daniel, Sandra, Edu, Gera. En especial a Eduviges quien siempre estuvo conmigo en las buenas y en las malas.

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO

PAGINA

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

NOMENCLATURA

RESUMEN

I.-INTRODUCCIÓN

1.1 Infertilidad masculina.

1

1.1.1 La infertilidad: un problema real.

1

1.1.2 Infertilidad en la pareja.

2

1.1.3 Causas de la infertilidad masculina.

2

1.1.4 Tratamientos aplicables a la infertilidad masculina.

5

1.1.4.1 Técnicas de Microinyección (ICSI).

6

1.2 Genética molecular de la infertilidad masculina.

8

1.2.1 Alteraciones cromosómicas.

9

1.2.2 El papel del gen regulador de conductancia transmembranal de fibrosis quística (RTFQ) en la infertilidad.

10

1.2.2.1 La ausencia bilateral congénita de las vías deferentes y su relación con el gen RTFQ.

13

1.2.3 Diagnóstico molecular directo de mutaciones en genes del cromosoma "Y" asociados con la infertilidad masculina.	15
1.2.3.1 Tamizaje de microdeleciones en el cromosoma Y.	16
1.3 El riesgo de las nuevas técnicas de reproducción asistida.	19

II.-JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN.	21
2.2 OBJETIVO.	21
2.2.1 Objetivo General.	21
2.2.2 Objetivos Específicos.	22

III.-ESTRATEGIA GENERAL

IV.-MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Área de trabajo, reactivos y equipo.	
4.1.1 Área de trabajo.	26
4.1.2 Material Biológico.	26
4.1.3 Reactivos químicos.	26
4.1.4 Material.	28
4.1.5 Equipo.	28
4.1.6 Apoyo computacional.	29
4.2 Métodos.	30
4.2.1 Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes.	30
4.2.2 Grupo experimental y grupo control.	30
4.2.3 Extracción de DNA genómico a partir de muestras de sangre.	31
4.2.4 Verificación de la calidad y la concentración del DNA en gel de agarosa.	32

4.2.5 Realización de Cariotipo a partir de sangre periférica con heparina.	32
4.2.6 Pruebas de paternidad.	33
4.2.6.1 Amplificación de las muestras para el marcador Apo B.	33
4.2.6.2 Verificación de la amplificación en un gel de agarosa.	34
4.2.6.3 Marcador génico D1S80.	35
4.2.7 Tamizaje para 16 mutaciones en Fibrosis quística.	36
4.2.7.1 Amplificación de las muestras.	38
4.2.7.2 Hibridación y detección de las mutaciones.	39
4.2.8 Detección de mutaciones en el gen RTFQ.	40
4.2.8.1 Optimización de las condiciones de amplificación.	42
4.2.8.2 Análisis de mutaciones mediante polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP).	43
4.2.8.3 Purificación de las bandas anormales.	45
4.2.8.4 Secuenciación.	46
4.2.9 Detección de microdeleciones en el cromosoma Y.	46
4.2.9.1 Amplificación de las muestras con los marcadores STS en el cromosoma Y.	46
4.2.9.2 Verificación de la amplificación en un gel de agarosa.	48
4.2.9.3 Análisis de los patrones electroforéticos.	49
V.-RESULTADOS	50
5.1 Extracción y cuantificación del DNA.	50
5.2 Realización del cariotipo.	50
5.3 Pruebas de paternidad.	51

5.3.1 Marcadores Apo B y D1S80.	51
5.4 Detección de 16 principales mutaciones para fibrosis quística mediante sondas alelos específicas.	53
5.5 Diseño de oligonucleótidos y estandarización.	54
5.5.1 Resultado del análisis de mutaciones mediante SSCP.	55
5.6 Purificación de las bandas anormales.	57
5.7 Secuenciación de las bandas anormales.	57
5.8 Microdelecciones del cromosoma Y.	59
5.8.1 Análisis del paciente 26.	60
5.8.2 Análisis del paciente 28.	61
5.8.3 Análisis del paciente 32.	62

VI.-DISCUSIÓN

64

VII.-CONCLUSIONES

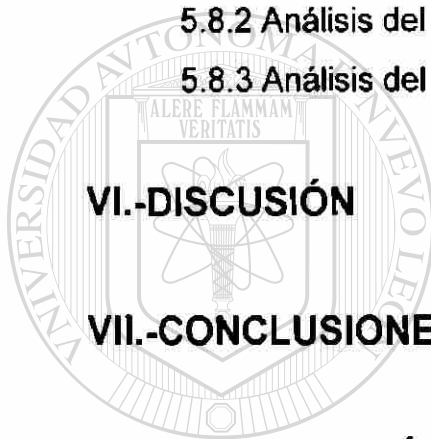
68

VIII.-BIBLIOGRAFÍA

69

IX.-RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

74[®]



UANL

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Representación esquemática de las diferentes causas de infertilidad masculina idiopática.	4
Figura 2. Pasos involucrados en la técnica inyección intracitoplasmática (ICSI).	8
Figura 3. Principales factores estudiados en la infertilidad masculina.	9
Figura 4. Gen regulador de la conductancia transmembranal de Fibrosis Quística.	12
Figura 5. Análisis mediante la técnica SSCP del exón 8 (A) y 15 (B) del gen RTFQ en pacientes con ABCCD.	14
Figura 6. Mapa de los STS a lo largo del cromosoma Y indicando su posición.	17
Figura 7. Análisis de la amplificación de 4 múltiplex (A, B,C y D) para STS en el cromosoma Y.	18
Figura 8. Análisis de la amplificación de 4 reacciones múltiplex para STS en el cromosoma Y en hombres control y hombres con microdeleciones.	18
Figura 9. Estrategia experimental general.	25
Figura 10. DNA genómico en gel de Agarosa al 0.8%.	50
Figura 11. Observación de cariotipos por técnicas de bandeado G.	51
Figura 12. Gel de agarosa al 2% mostrando los productos amplificados Apo B y D1S80.	52
Figura 13. Exclusión para pruebas de paternidad con los marcadores Apo B y D1S80.	52
Figura 14. Detección de las principales mutaciones en el gen RTFQ.	53

Figura 15.	Amplificación de las regiones analizadas del gen RTFQ implicados en el padecimiento ABCCD.	54
Figura 16.	Gel de poliacrilamida al 10% mostrando el corrimiento por SSCP.	55
Figura 17.	Polimorfismos del exón 9 en el gen RTFQ.	56
Figura 18.	Representación esquemática del número de polimorfismos encontrados en los 50 controles estudiados.	56
Figura 19.	Resultados de la secuenciación de las bandas obtenidas por SSCP.	58
Figura 20.	Prueba del estuche para detectar microdeleciones del cromosoma Y en un control fértil.	59
Figura 21.	Observación de un paciente con microdeleciones en la zona AZF b.	60
Figura 22.	Detección de un paciente con microdeleciones en 3 STSs.	61
Figura 23.	Gel de agarosa al 2% mostrando la delección de 2 STSs.	62
Figura 24.	Mapa representativo de los diferentes pacientes y su correspondientes STSs deletados.	63

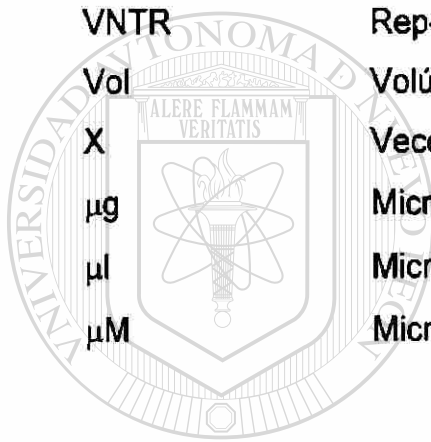
LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Condiciones de reacción de la PCR para el marcador genético Apo B.	34
Tabla 2 Condiciones de amplificación para Apo B.	34
Tabla 3 Condiciones de reacción de PCR para el marcador genético D1S80.	36
Tabla 4 Condiciones de amplificación para D1S80.	36
Tabla 5 Mutaciones detectadas mediante el estuche "Ensayo de investigación de FQ".	38
Tabla 6 Reacción de PCR para la detección de 16 mutaciones para la FQ.	38
Tabla 7 Condiciones de amplificación para 16 mutaciones en FQ.	39
Tabla 8 Oligonucleótidos diseñados en este trabajo para amplificar ciertas regiones del gen RTFQ.	41
Tabla 9 Condiciones de reacción de la PCR para los 23 exones y el promotor del gen RTFQ.	42
Tabla 10 Condiciones de amplificación de PCR de las regiones del gen RTFQ.	42
Tabla 11 Condiciones de reacción de PCR para la amplificación de los 18 STSs del cromosoma Y.	47
Tabla 12 Condiciones de amplificación para detectar microdeleciones.	48
Tabla 13 Secuencias del exón 6a obtenidas de las bandas generadas por SSCP.	57
Tabla 14 Secuencias del exón 12 obtenidas de las bandas generadas por SSCP.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCCD	Ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes
AID	Inseminación artificial proveniente de un donador
ApoB	Apolipoproteína B
AZF	Factor azoospermico
RTFQ	Gen regulador de conductancia transmembranal de fibrosis quística
D1S80	Repetición en tandem de número variable D1S80
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Trifosfatos de desoxinucleósidos
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
FQ	Fibrosis quística
g	Gramos
h	Hora
hrs	Horas
ICSI	Inyección intracitoplasmática de esperma
IMI	Infertilidad masculina Idiopática
FIV	Fertilización in vitro
kda	Kilodaltones
M	Molar
MESA	Aspiración microepididima de esperma
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
°C	Grados centígrados
p	Brazo corto de un cromosoma

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
q	Brazo largo de un cromosoma
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
STS	Secuencia de sitio identificado
Taq	DNA polimerasa de <u>Thermophylus aquaticus</u>
TESE	Extracción testicular de esperma
V	Voltios
VNTR	Repeticiones en tandem de número variable
Vol	Volúmen
X	Veces la concentración
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	Micromolar



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Itzel Evelyn Calleja Macías
Fecha de graduación: Noviembre, 2000
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio: "DETERMINACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS EN INFERTILIDAD MASCULINA IDIOPÁTICA"

Número de páginas: 68

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Área de estudio: Diagnóstico Molecular

Propósito y Método de estudio: La identificación de las causas genéticas de la infertilidad masculina tiene mucha relevancia, si se considera que ésta es responsable de un 30-50% de los problemas de procreación en las parejas. Es por ello que el conocer cuales son los factores genéticos implicados en la infertilidad masculina es de gran interés en nuestra población.

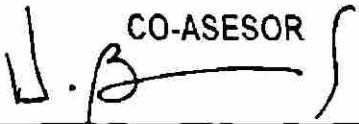
En este trabajo se analizaron 50 varones (grupo control) cuya fertilidad fue validada con pruebas de genotipificación (marcadores Apo B y D1S80) y 48 hombres infértiles (pacientes) divididos en 3 grupos: azoospermicos no obstructivos (N=30), oligozoospermicos (N=16) y con ABCCD (N=2). A partir de sangre anticoagulada con EDTA o con heparina de cada individuo se extrajo el DNA genómico y se realizó el cariotipo, respectivamente. Este último fue analizado por técnicas de bandas G. Para los pacientes con ABCCD se analizaron los 18 exones y el promotor del gen RTFQ mediante la técnica del polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP) y por secuenciación. Con cada muestra de DNA, mediante PCR se amplificaron 18 marcadores (STSs) a lo largo del brazo largo del cromosoma Y (zonas AZFa, b, c y d) en pacientes azoospermicos, oligozoospermicos y controles.

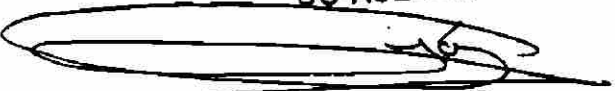
Contribuciones y Conclusiones: No se detectaron alteraciones cromosómicas en los pacientes, ni tampoco microdeleciones del cromosoma Y en los controles. En 3 pacientes infértiles con azoospermia (6.97%) se encontraron microdeleciones correspondientes a las zonas AZFb, c y d. Los 2 pacientes con ABCCD presentaron mutaciones en el gen RTFQ: uno resultó ser homocigoto para la mutación V232D, mientras que el otro presentó la mutación L568X y el polimorfismo 5T, este último relacionado con el padecimiento.

Los métodos moleculares detectaron alteraciones genéticas en el 10.41% de los pacientes estudiados. Este trabajo contribuyó a integrar un banco de DNA de pacientes con infertilidad masculina de utilidad en la búsqueda de las causas de esta afección.

ASESOR

Dra. Rocio Ortiz López

CO-ASESOR

Prof. Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

CO-ASESOR

Dr. Lauro Gómez Guerra

CAPÍTULO I

1 INTRODUCCIÓN

1.1 INFERTILIDAD MASCULINA

1.1.1 La infertilidad: un problema real

La infertilidad es motivo de angustia y desesperación para muchas parejas que anhelan un hijo biológico. La probabilidad de concebir de una pareja fértil normal con edad entre 20 y 30 años y con una vida sexual activa es de 25% cada mes. Esto significa que aproximadamente ocho o nueve de cada diez parejas que buscan tener un bebé, logran concebir en un plazo de un año y una pareja fracasará, considerándola subfértil o infértil (1).

Generalmente los médicos definen la infertilidad como: "la incapacidad para concebir después de por lo menos un año de intentarlo"(2). Las parejas que no pueden concebir acuden a su médico especialista en busca de orientación y asesoría. En ocasiones acuden al especialista para someterse a un tratamiento denominado concepción asistida (3).

1.1.2 Infertilidad en la pareja

En la mayoría de los casos, la causa de la infertilidad puede determinarse mediante estudios que realizan los médicos especialistas. Sólo en aproximadamente un 20% de los casos no puede determinarse la causa de la infertilidad, pero incluso en dichos casos el tratamiento puede tener éxito (4). La infertilidad de la pareja es atribuible a la mujer aproximadamente en el 40% de los casos (5), y en otro 40% al varón, siendo el 20% restante problemas de ambos (6). En las pruebas requeridas para determinar una causa específica se evalúan en la pareja los antecedentes infecciosos, la exposición a agentes químicos o físicos, los factores endocrinológicos, etc.(ver figura 1); en la mujer se investiga además la ovulación y el estado anatómico de las trompas de Falopio; mientras que en el varón la producción de espermatozoides (número, movilidad y forma), la anatomía del aparato reproductor y su vasculatura (5).

Esto último a través de la valoración clínica, un análisis de semen, niveles hormonales, estudios de imagen y otros estudios específicos.

1.1.3 Causas de la infertilidad masculina

Las estimaciones correspondientes indican que aproximadamente uno de cada tres casos de infertilidad masculina se deben a algún problema asociado a la calidad y a la cantidad de esperma (7). Las pruebas para la infertilidad masculina pueden revelar las siguientes anomalías:

- **Anatómicas.** Muchas veces la exploración del paciente revela varicoceles o criptorquidia, los cuales explican la infertilidad. La obstrucción o ausencia de los conductos para el transporte espermático también afecta la función reproductiva. Como se verá más adelante, esta condición puede tener una causa genética.
- **Endócrinas.** Los niveles anormales hormonales de FSH, LH, testosterona e hidroxitestosterona causan infertilidad por hipogonadismo.
- **Infecciosas.** Algunos agentes como papovavirus, clamidia, micoplasma, *mycobacterium tuberculosis*, etc., pueden producir infertilidad.
- **Producción insuficiente de esperma.** Normalmente los hombres producen por lo menos 20 millones de espermatozoides/ml (aproximadamente la sexta parte del total de la eyaculación) de semen. Una cuenta menor es indicativa de subfertilidad.
- **Poca motilidad de los espermatozoides.** Alteraciones del cuello y flagelo del espermatozoide pueden afectar la fertilidad al dificultar el desplazamiento de los espermatozoides en el tracto genital femenino.
- **Morfología espermática inadecuada.** Estas alteraciones disminuyen las posibilidades de penetración del espermatozoide en la capa externa del óvulo.

causas fisiológicas (particularmente las hormonales) y anatómicas en las estructuras del aparato reproductivo y el tejido gonadal, no tiene una causa aparente, la cual se conoce como infertilidad masculina idiopática (IMI). Varios factores etiológicos de la IMI han sido identificados y en algunos de éstos se ha determinado una base genética (10). En los últimos años, las clínicas especializadas para el tratamiento de la infertilidad han utilizado adicionalmente la fertilización in vitro (FIV) como prueba de diagnóstico (11), debido a que la fecundación de óvulos por este método puede fracasar debido a un funcionamiento anormal de los espermatozoides.

1.1.4 Tratamientos aplicables a la infertilidad masculina

Según la naturaleza y la gravedad del trastorno, los médicos pueden elegir entre una variedad de tratamientos (12). Debido a que existe una amplia gama de opciones terapéuticas y en vista de que algunos tratamientos no tienen una disponibilidad amplia, los médicos y los pacientes se enfrentan a la necesidad de tomar una serie de decisiones considerables. Si el tratamiento se considera apropiado, las opciones disponibles son:

- Farmacoterapia.
- Fertilización in vitro (FIV).
- Inseminación artificial proveniente de un donador (IAD o ID).
- Inseminación intrauterina (IIU).
- Fertilización mediante la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

1.1.4.1 Técnicas de Microinyección (ICSI - Intra Cytoplasmatic Sperm Injection)

En la concepción normal, una sola eyaculación de semen puede contener más de 200 millones de espermatozoides viables, sin embargo solo algunos cientos de ellos llegarán al óvulo liberado en la trompa de Falopio y tendrán oportunidad de fertilizarlo (13). Antes se pensaba que era imposible tratar a los hombres que presentaban una cuenta muy baja de espermatozoides; actualmente, la ICSI permite la fertilización con un solo espermatozoide (14) (ver figura 2). En la actualidad aún las causas más difíciles de esterilidad masculina han podido tratarse con éxito mediante las técnicas de microinyección de esperma (ICSI) (15).

En el procedimiento de la ICSI se utilizan los más potentes instrumentos de manipulación microscópica. Los embriólogos, por ejemplo, pueden sostener un sólo huevo humano en la punta de una pipeta de succión fina y penetrarlo con una aguja siete veces más delgada que el diámetro de un cabello. Con la aguja se introduce un solo espermatozoide en el citoplasma del óvulo. En la mayoría de los casos (60-70%) el espermatozoide logra fecundar el óvulo que tres días después puede transferirse al útero como un embrión (16-20).

Hasta ahora se han obtenido resultados notables con la ICSI, con éxito aún en el caso de hombres con una cuenta muy baja de espermatozoides

o mala calidad del espermatozoide. En Bruselas, donde la ICSI se ha aplicado con mayor éxito, hasta el 70% de los óvulos inyectados mediante este método pudieron fertilizarse, a menudo con espermatozoides obtenidos de muestras que no parecían contener suficientes especímenes viables. Al transferir los óvulos fertilizados mediante la ICSI, se obtuvieron índices de embarazo y nacimiento tan altos como los registrados con la FIV (13). Actualmente estas microtécnicas se han desarrollado para tratar la infertilidad no sólo en los hombres que producen espermatozoides de mala calidad, sino también en los pacientes con ausencia total de producción de espermatozoides debido a un bloqueo ó a algún otro trastorno testicular (o vasectomía) (21).

Adicionalmente existen dos técnicas, la aspiración microepididimaria de espermatozoides (MESA) y la extracción testicular de espermatozoides (TESE), que se utilizan con regularidad para retirar los espermatozoides del epidídimo (situado en la parte superior de los testículos) o de una biopsia de tejido testicular. Los espermatozoides obtenidos se utilizan para fertilizar el óvulo mediante la ICSI. Se han obtenido resultados muy alentadores lo que permitirá que los hombres que por distintas causas no pueden eyacular, o cuyos testículos no producen espermatozoides maduros, podrían proporcionar el espermatozoide necesario para fertilizar los óvulos de su pareja (22-26). Sin embargo, los varones infértiles por alguna causa genética pueden superar estos obstáculos a través del ICSI, aunque heredan el defecto genético a sus hijos varones.

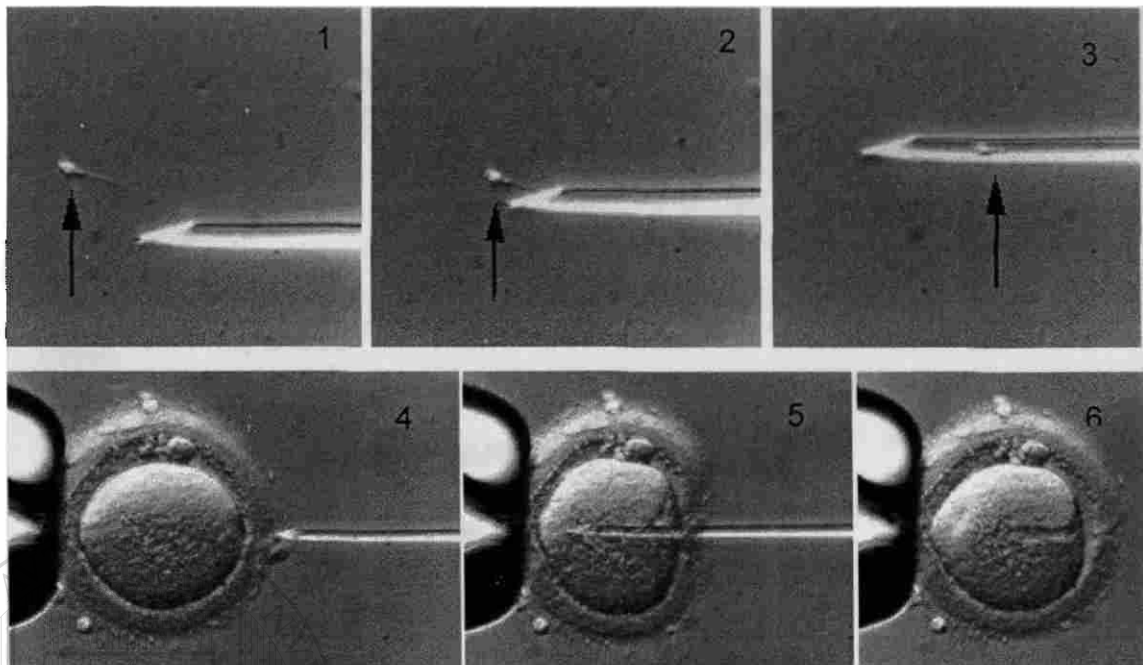


Figura 2. Pasos involucrados en la técnica de inyección intracitoplasmática (ICSI). Las flechas (1, 2 y 3) muestran un espermatozoido siendo cuidadosamente tomado con una aguja de microinyección e insertado en el huevo (4, 5 y 6).

1.2 GENÉTICA MOLECULAR DE LA INFERTILIDAD MASCULINA

Los factores genéticos más comúnmente asociados a la infertilidad masculina son: (1) anomalías en el cariotipo, (2) mutaciones en el gen de la fibrosis quística (RTFQ) que producen ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes (ABCCD), y (3) microdeleciones en el cromosoma "Y" que llevan a un debilitamiento espermatogénico (ver figura 3). El cariotipo puede desenmascarar anomalías genéticas potencialmente transmisibles en el hombre infértil, incluyendo desórdenes numéricos y estructurales de los cromosomas. Cuando se observa una falla testicular por azoospermia o por oligozoospermia severa, las microdeleciones en el cromosoma Y pueden estar presentes entre el 10 al 15% de estos pacientes.

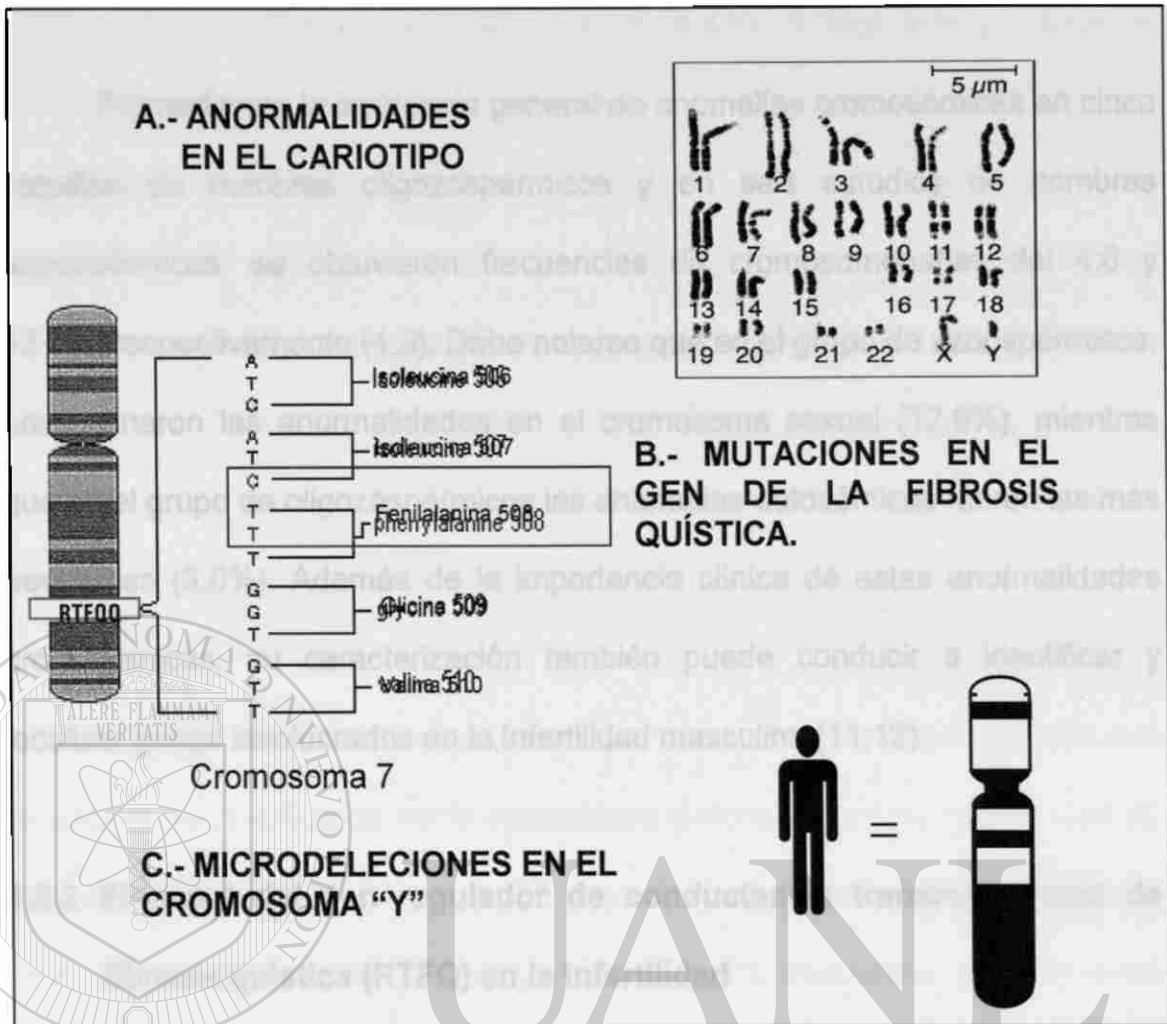


Figura 3. Principales factores estudiados en la infertilidad masculina. Dentro de estos factores se encuentran A) Microdeleciones en el cromosoma Y, las cuales llevan a un debilitamiento espermatogénico, B) Mutaciones en el gen RTFQ que llevan al padecimiento conocido como ABCCD y C) Anormalidades en el cariotipo.

1.2.1 Alteraciones cromosómicas

La existencia de anomalías cromosómicas en pacientes atendidos en clínicas de fertilidad masculina se sospechó desde 1957, cuando se observó que pacientes con azoospermia o oligozoospermia severa tenían un cariotipo 47,XXY (síndrome de Klinefelter) (27). Desde entonces, se han realizado varios estudios para determinar el factor cromosómico en la infertilidad masculina.

Promediando la incidencia general de anomalías cromosómicas en cinco estudios de hombres oligozospermicos y en seis estudios de hombres azospermicos, se obtuvieron frecuencias de cromosomopatías del 4.6 y 13.7%, respectivamente (4,9). Debe notarse que en el grupo de azospermicos, predominaron las anormalidades en el cromosoma sexual (12.6%), mientras que en el grupo de oligozospermicos las anomalías autosómicas fueron las más frecuentes (3.0%). Además de la importancia clínica de estas anormalidades cromosómicas, su caracterización también puede conducir a identificar y localizar genes involucrados en la infertilidad masculina (11,12).

1.2.2 El papel del gen regulador de conductancia transmembranal de fibrosis quística (RTFQ) en la infertilidad

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva más común en las poblaciones caucásicas (28,29). El desorden afecta alrededor de uno de cada 2500 nacimientos y uno de cada 25 individuos es un portador asintomático. La forma típica de la enfermedad se caracteriza por obstrucción crónica e infección del tracto respiratorio, insuficiencia pancreática exócrina (alrededor del 85% de los pacientes) y una elevada concentración de cloro en el sudor (arriba de 60 mEq/l).

Las manifestaciones clínicas de FQ resultan de mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembranal de fibrosis quística (RTFQ), que

codifica para una proteína de 1480 residuos de aminoácidos, involucrada en la conducción del ión cloro a través de la membrana celular epitelial (28,29). El gen contiene 27 exones, esparcidos sobre 250 kb de DNA y está localizado en el cromosoma 7 (ver figura 4). Más de 800 mutaciones y unos cuantos cientos de polimorfismos han sido identificados en el gen RTFQ (30). La FQ tiene una amplia variación en la presentación clínica. Desde la identificación del gen RTFQ, muchos reportes han sido publicados en un intento de establecer las correlaciones entre el genotipo y el fenotipo (28,29,31-34).

Algunas enfermedades genéticas que presentan diferentes fenotipos son generalmente clasificadas como desórdenes distintos antes de que su defecto molecular sea revelado, como ocurrió después del entendimiento de la biología molecular de la fibrosis quística y de una forma obstructiva de infertilidad conocida como ABCCD. La mayoría de los hombres con ABCCD tienen un defecto en una sola copia del gen RTFQ y por lo tanto representan un fenotipo distinto del de FQ. Estos pacientes no presentan ninguna sintomatología característica de FQ a lo largo de su vida y consultan al médico en la edad adulta por un problema de infertilidad (23).

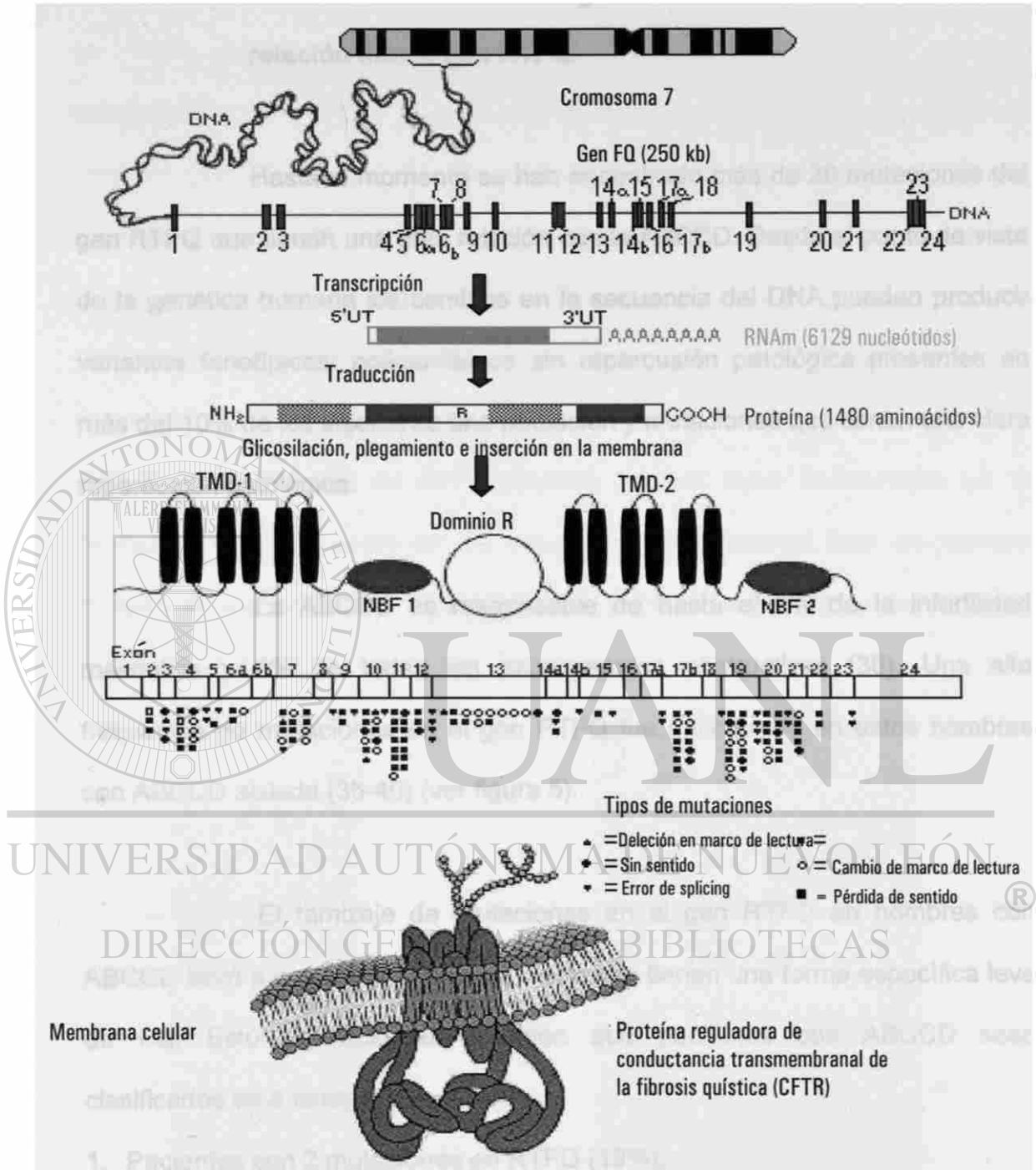


Figura 4.- Gen regulador de la conductancia transmembranal de Fibrosis Quística. Se esquematiza su localización en el cromosoma 7, así como su producto: la proteína RTFQ.

1.2.2.1 La ausencia bilateral congénita de las vías deferentes y su relación con el gen RTFQ.

Hasta el momento se han encontrado más de 30 mutaciones del gen RTFQ que tienen una gran relación con la ABCCD. Desde el punto de vista de la genética humana los cambios en la secuencia del DNA pueden producir variantes fenotípicas: polimorfismos sin repercusión patológica presentes en más del 10% de los sujetos de una población y mutaciones que tienen una clara repercusión patológica.

La ABCCD es responsable de hasta el 2% de la infertilidad masculina y 6% de todas las azoospermias obstructivas (36). Una alta frecuencia de mutaciones en el gen RTFQ fue encontrada en estos hombres con ABCCD aislada (36-40) (ver figura 5).

El tamizaje de mutaciones en el gen RTFQ en hombres con ABCCD llevó a especular que estos pacientes tienen una forma específica leve de FQ. Estudios recientes permiten que pacientes con ABCCD sean clasificados en 4 categorías:

1. Pacientes con 2 mutaciones en RTFQ (19%);
2. Pacientes con una mutación con el alelo 5T en trans (33%);
3. Pacientes con una sola mutación en RTFQ o solo el alelo 5T (27%);
4. Pacientes sin mutaciones en RTFQ ni en alelo 5T (21%).

La alta proporción de pacientes con ABCCD que no tienen mutaciones en RTFQ permite sugerir dos hipótesis: la existencia de otros cambios indetectables en RTFQ o la existencia de otro gen o genes responsables de ABCCD (26). En un estudio de pacientes con azoospermia obstructiva de etiología desconocida, ha sido descrita una alta incidencia de polimorfismos en el gen RTFQ, incluyendo la variante 5T (24). En otro estudio de pacientes con una calidad y cantidad reducida de espermatozoides pero sin ABCCD, también se encontró una alta frecuencia de mutaciones en RTFQ (25). Estos resultados sugieren que defectos en RTFQ también podrían estar involucrados en la producción y maduración de los espermatozoides. Sin embargo sólo un número limitado de pacientes han sido estudiados y por lo tanto estas observaciones requieren confirmación.

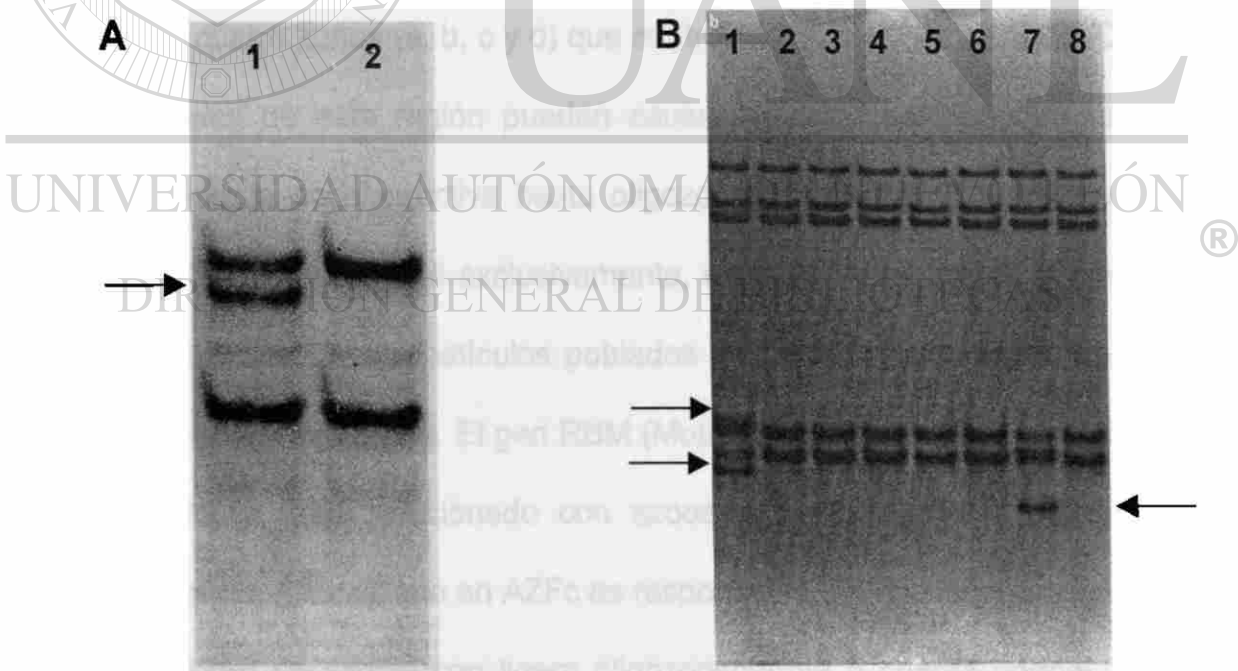


Figura 5. Análisis mediante la técnica SSCP del exón 8 (A) y 15 (B) del gen RTFQ en pacientes con ABCCD. A) tamizaje de una mutación en el exón 8 del gen RTFQ por SSCP. En la línea 1 se observa un paciente con ABCCD, en la línea 2 un control normal. B) Análisis de SSCP del exón 15 mostrando en la línea 1 y 7 migraciones aberrantes de pacientes con ABCCD, en la línea 8 se encuentra un control.

1.2.3 Diagnóstico molecular directo de mutaciones en genes del cromosoma "Y" asociados con la infertilidad masculina

El cromosoma Y es necesario para la fertilidad masculina (41). La infertilidad masculina se ha asociado con alteraciones estructurales del cromosoma Y en hombres azoospermicos y severamente oligozoospermicos (42). Este tipo de análisis se puede realizar de dos formas: Análisis directo sobre los genes involucrados en infertilidad masculina y tamizando el cromosoma Y en busca de microdeleciones.

El intervalo 5-6 de la banda Yq11 de este cromosoma contiene un "factor de infertilidad" o "factor azoospermico" (AZF) (43). Esta región consta de por lo menos cuatro zonas (a, b, c y d) que controlan la espermatogénesis. Diferentes deleciones de esta región pueden causar defectos severos que van desde azoospermia no obstructiva hasta oligozoospermia (44). Por ejemplo, el gen SCO (Células de Sertoli exclusivamente, en inglés) ubicado en la zona AZFa, está relacionado con testículos poblados únicamente con células de Sertoli y severa oligozoospermia. El gen RBM (Motivo de unión al RNA) localizado en la zona AZFb, está relacionado con azoospermia. El gen DAZ (Deletado en Azoospermia) localizado en AZFc es responsable de hipoespermatogénesis. La zona AZFd se asocia con ligera oligozoospermia o cuenta normal, pero con anomalía de la morfología del espermatozoide. Hasta la fecha no se ha determinado ninguna correlación clara entre el tamaño y/o la localización de la mutación con la severidad del defecto espermatogénico (45).

Se han realizado varios intentos por dilucidar esta correlación. Grosch y cols en el 1999, en el Departamento de Ginecología y Obstetricia de la Universidad de Wisconsin (43), analizaron una serie de 136 marcadores genéticos localizados a lo largo de la región AZF en 278 pacientes con IMI. En el 30% de los sujetos estudiados se detectaron microdeleciones, pero no se logró establecer correlación genotipo/fenotipo.

Fuera de esta región, existen otros genes que también se han relacionado con IMI. Entre ellos está la familia génica TSPY (proteína específica de testículo codificada por Y, constituida por 30-60 genes) localizada en Yp11.2, y que podría estar relacionada con los fenotipos de azoospermia y oligospermia.

1.2.3.1 Tamizaje de microdeleciones en el cromosoma Y.

Una de las formas más eficientes y sensibles para tamizar microdeleciones en cromosomas pequeños es el análisis de STS (del inglés sequence-tagged sites) (46). Estas son secuencias de copia única que se encuentran a lo largo del genoma y sirven como marcadores de posición cromosómica. La detección de la deleción en sujetos afectados dependería de la carencia de amplificación por PCR de uno o más de estos STS en un segmento cromosómico continuo de "Y" (45). La figura 6 ilustra la distribución de STS a lo largo del cromosoma "Y".

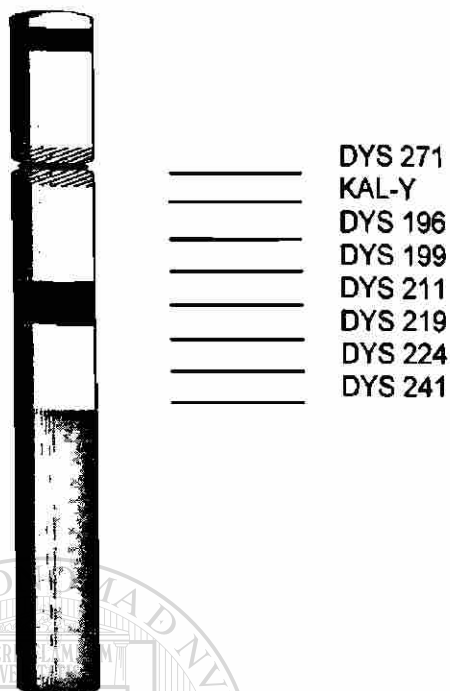


Figura 6. Mapa de los STS a lo largo del cromosoma Y indicando su posición. El estuche comercial distribuido por la compañía Promega, permite la amplificación de regiones que flanquean AZFa, y cubren AZFb, AZFc, AZFd incluyendo DAZ, Kal-Y, SMCY y loci que flanquean otros genes claves relacionados con espermatogénesis (RBM1, DFFRY y DBY)

Los STS tienen la ventaja de poder ser analizados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo cual posibilita una alta sensibilidad, rapidez y el análisis simultáneo de un gran volumen de muestras en el estudio. La frecuencia de microdeleciones varía considerablemente de estudio a estudio y tiene un rango de 1 al 30%. Esta variabilidad refleja los diferentes criterios usados para seleccionar pacientes y el número de STS estudiados. También, mediante la PCR es posible realizar la amplificación simultánea de varios STS. Esta metodología se denomina PCR múltiplex. Existen estudios reportados donde utilizan esta misma metodología para el

análisis de microdeleciones y el diagnóstico se realiza observando la ausencia o presencia de bandas en comparación con un control normal. (Ver figuras 7 y 8).

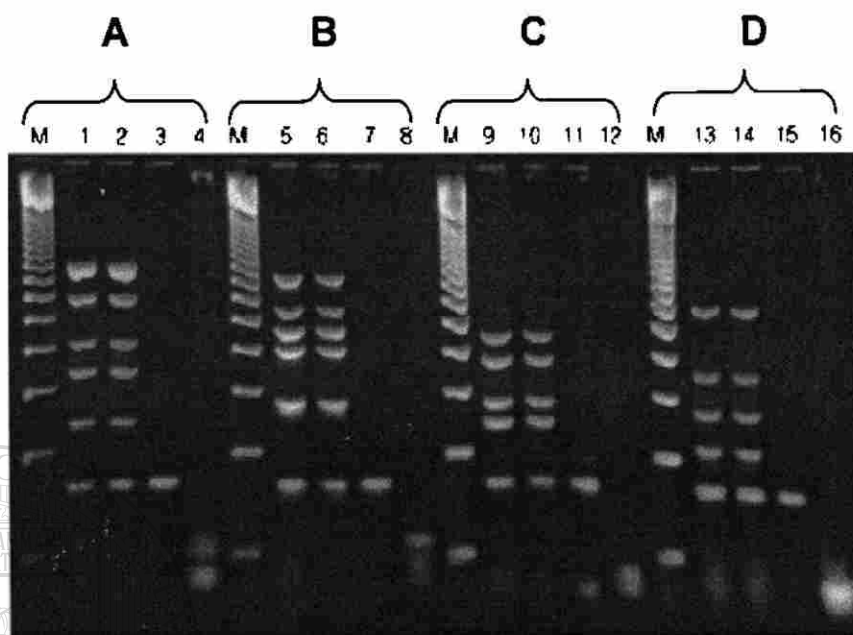


Figura 7. Análisis de la amplificación de 4 múltiplex (A, B, C y D) para STS en el cromosoma Y. M: marcador, 1,2,5,6,9,10,13,14: DNA de hombres, 3,7,11,15: DNA de mujeres, 4,8,12,16: control negativo. (www.promega.com)

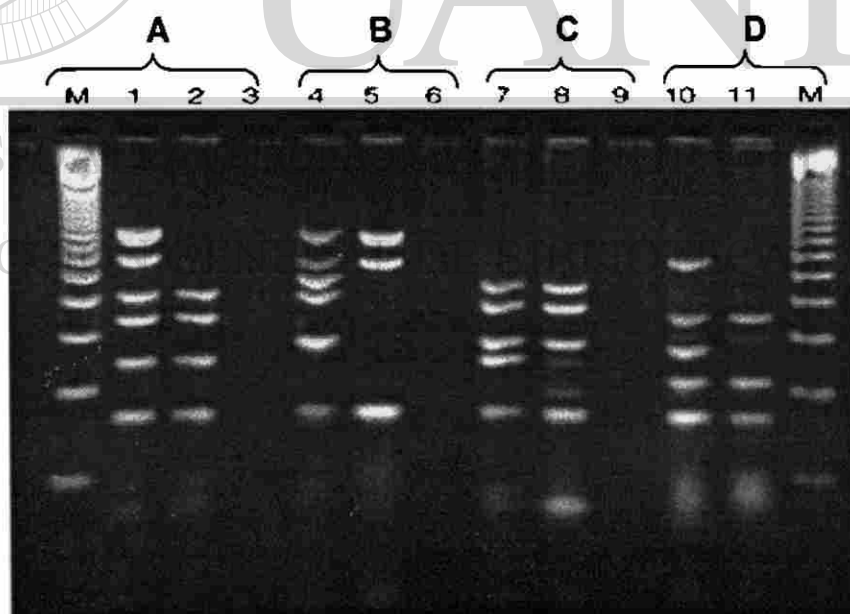


Figura 8. Análisis de la amplificación de 4 reacciones múltiplex para STS en el cromosoma Y en hombres control y hombres con microdeleciones. M: marcador, carriles 1,4,7 y 10 = hombres control, carriles 2,5,8 y 11 = hombres con microdeleciones, carriles 3,6 y 9 = sin muestra (www.promega.com).

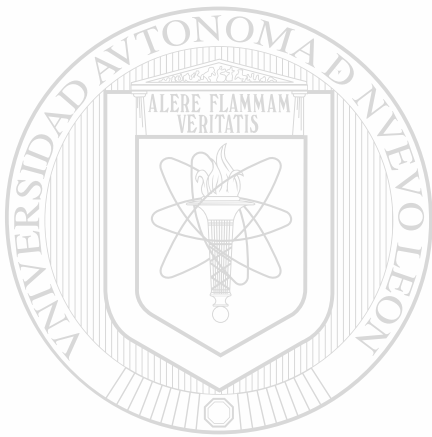
1.3 El riesgo de las nuevas técnicas de reproducción asistida

Aunque el ICSI aparentemente no representa ningún riesgo para los productos, en éstos se han observado un ligero incremento en el número de anomalías cromosómicas. En varios casos se ha demostrado la transmisión paterna de alteraciones genéticas que inicialmente no habían sido detectadas en el donador del esperma (47). Por ejemplo, se han demostrado microdeleciones del cromosoma Y (no detectables por métodos citogenéticos tradicionales), las cuales están presentes en por lo menos un 10-30% de varones con azoospermia no obstructiva o con severa oligozoospermia. En estos casos la infertilidad es explicada por la pérdida de genes involucrados en la espermatogénesis y la aplicación del método reproductivo implica la transmisión artificial de una anomalía genética ligada al cromosoma Y, las cuales aún no se han descrito en nuestra especie(48).

Estos resultados también sugieren la posibilidad de que los nuevos métodos de FIV permitan la transmisión de genes defectuosos del cromosoma Y y de genes autosómicos mutados, como el RTFQ (49) o de alteraciones cromosómicas que no ocurrirían en condiciones naturales (27). Estas alteraciones genéticas repercutirán 20 ó 30 años, en la edad reproductiva del hijo que ha heredado el problema de infertilidad, lo cual implica un seguimiento y posibles nuevas intervenciones en él. De manera que las anomalías genéticas relacionadas a la infertilidad necesitan ser consideradas, porque (1)

son la causa del problema y (2) porque son potencialmente transmisibles a las siguientes generaciones.

Por esta razón, muchos centros de ICSI insisten en la asesoría exhaustiva y en la práctica de algunas pruebas genéticas antes del tratamiento, así como en el seguimiento durante y después del embarazo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO II

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN

El siguiente estudio pretende determinar las causas genéticas de un grupo de pacientes con infertilidad masculina en el cual se han descartado las causas anatómicas y fisiológicas que puedan conducir a infertilidad. La determinación de las causas genéticas de la infertilidad es de mucha importancia desde el punto de vista de que los nuevos métodos de FIV, particularmente el ICSI, permiten la transmisión del defecto genético a la nueva generación. De no tomar ninguna medida sobre este problema, en el transcurso de los próximos 15 ó 20 años nos encontraremos en una sociedad con un número incrementado de varones infértiles.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo General:

Detectar mutaciones en el gen regulador de conductancia transmembranal de fibrosis quística (RTFQ) y microdeleciones en el

cromosoma Y en pacientes con infertilidad masculina idiopática y ABCCD.

2.2.2 Objetivos específicos

1. Establecer un banco de DNA genómico a partir de la extracción de sangre periférica de los pacientes y de un grupo control constituido por varones con fertilidad comprobada.

2. Realizar el cariotipo a partir de sangre periférica a los pacientes.

3. Realizar pruebas de paternidad al grupo control con la finalidad de validar su fertilidad.

4. Determinar las mutaciones en los exones 2, 4, 6a, 7, 8, 9 10, 11, 12, 13, 14b, 15, 16, 17a y 17b, 18, 22, 23 y el promotor del gen RTFQ en pacientes con ABCCD mediante SSCP y secuenciación.

5. Detectar mediante STSs microdeleciones en el cromosoma Y en varones con azoospermia y oligospermia.

6. Determinar la prevalencia de mutaciones en el gen RTFQ, así como de microdeleciones en el cromosoma Y, tratando de relacionarlas con el fenotipo clínico.

CAPITULO III

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir los objetivos planteados, se siguió la estrategia detallada e ilustrada a continuación (Figura 9).

1. Se recolectaron un total de 48 muestras de sangre periférica con EDTA y heparina como anticoagulante. De cada una se extrajo DNA genómico con la técnica TSNT y se constituyó un banco. Las muestras con heparina sirvieron para realizar un cultivo de linfocitos y posteriormente realizar el cariotipo con bandas G.
2. Se estimó la calidad y cantidad de cada DNA en geles de agarosa al 0.8%.
3. Se realizó un tamizaje para las 16 principales mutaciones en el gen RTFQ mediante sondas oligo-alelo-específicas, para los pacientes con ABCCD.

4. Se diseñaron pares de oligonucleótidos para amplificar los exones 2,4, 6^a, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14b, 15, 16, 17a y 17b, 18, 22, 23 y el promotor del gen RTFQ.
5. Se verificaron los productos amplificados en geles de agarosa al 2%.
6. El análisis de las mutaciones se hizo por SSCP individuales de cada uno de los exones. Las bandas de migración anormal se secuenciaron para determinar presencia de mutaciones.
7. Se amplificaron 18 marcadores (STSs) del cromosoma Y, los cuales se encuentran en el brazo largo abarcando las zonas AZFa, b, c y d, para los pacientes con azoospermia y oligospermia.
8. Se detectaron las microdeleciones del cromosoma Y por la presencia o ausencia de la banda en un gel de agarosa al 2%.
9. Se analizaron todos los resultados y se realizó una correlación entre los hallazgos moleculares y clínicos.

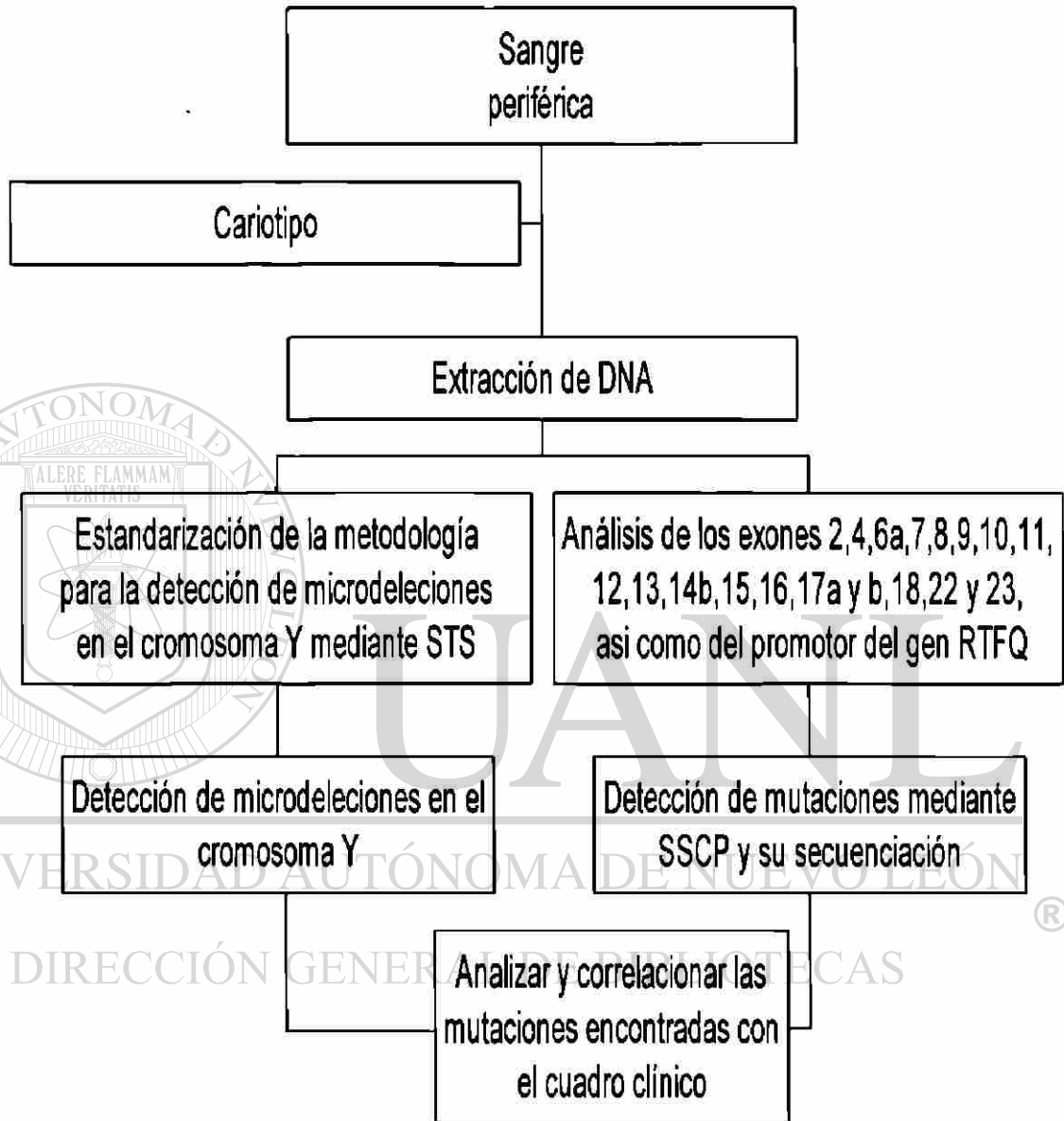


Figura 9 Estrategia experimental general. Se ilustran los pasos que comprenden la estrategia experimental realizada en este trabajo.

CAPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Área de trabajo, reactivos y equipo

4.1.1. Área de trabajo: El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

4.1.2. Material Biológico: De cada uno de los individuos a analizar se obtuvieron dos muestras de sangre periférica tratada una con EDTA y otra con heparina, como anticoagulantes.

4.1.3 Reactivos químicos: Para el aislamiento de DNA se utilizó EDTA, SDS, NaCl, trizma base, tritón X-100 y fenol, adquiridos de Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO, EUA), así como ácido clorhídrico, cloroformo, alcohol isoamílico y etanol, de la compañía Merk (México, D.F).

Los reactivos para la realización del cariotipo (medio RPMI 1640, Suero bovino fetal, fitohematoaglutinina, colchisina, antibiótico-antimicótico: penicilina G-sódica-estreptomicina-amfotericina B), la tripsina y los

oligonucleótidos se adquirieron de la compañía Gibco BRL (Gaithersburg, MD, EUA).

Se utilizó la enzima Biotaq producida en el Laboratorio de Biotecnología de la ULIEG, (UANL, Monterrey, MX), empleando una clona de *Escherichia coli*, portadora de un plásmido que expresa la enzima, donado por el Dr. Pedro León de la Universidad de Costa Rica. La solución amortiguadora de reacción, cloruro de magnesio y dNTPs se adquirieron de Promega (Madison, WI, EUA) y el aceite mineral de Sigma Chemical Company.

Para las electroforesis en geles de agarosa se utilizó agarosa, trizma base, EDTA, ácido bórico, azul de bromofenol, xilencianol y bromuro de etidio y para las electroforesis en geles de poliacrilamida se utilizó acrilamida, N,N-metilenbisacrilamida, TEMED, EDTA, trizma base, glicerol y bromuro de etidio, todos de Sigma Chemical Company. Como patrones de referencia de tamaño en las electroforesis, se utilizó al DNA del plásmido pUC, digerido con la enzima de restricción *Hae* III o *Alu* I. También para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó un marcador tipo escalera de 50 pb de Promega. Las enzimas de restricción fueron adquiridas en New England Biolabs (NEB, Beverly, MA EUA) y los DNAs plasmídicos se obtuvieron mediante protocolos estándares de extracción de DNA a mediana escala realizadas en la ULIEG descritos por Sambrook y cols, 1989.

El tamizaje de las 16 mutaciones para fibrosis quística se realizó con el estuche de investigación "Ensayo prototipo de investigación de FQ" de Roche

Molecular System, Inc. (Alameda, CA, EUA). Para la purificación de DNA a partir de geles de poliacrilamida obtenidas por SSCP se utilizó el estuche comercial QIAEX II de la compañía Qiagen (Alemania).

Las microdeleciones del cromosoma Y se realizaron mediante el estuche comercial "Y chromosome deletion system" de Promega.

4.1.4 Material: Los tubos de microcentrifuga (de 0.5, 1.5 y 2.0 ml), las puntillas (de 0.01, 0.2 y 1.0 ml) para las micropipetas de precisión, los tubos cónicos de polipropileno (de 15 y 50 ml) y los guantes de látex fueron comprados a Cell Associates (Houston, TX, EUA). Las micropipetas de precisión de volumen variable de 2, 10, 20 200 y 1000 μ l fueron obtenidos de Rainin Instruments (Woburn, MA, EUA).

4.1.5 Equipo: En el aislamiento de DNA se utilizó una centrifuga clínica de mesa Beckman TJ6, un vortex modelo 37600 de Thermolyne (Dubuque, IA, EUA), una balanza granataria Sartorius modelo 1206 MP (Cambh, Göttingen, Alemania) y una microcentrifuga Eppendorf modelo 5412 (Hamburg, Alemania). Los termocicladores utilizados fueron: Termociclador PTC-100 de 60 pozos JM-Research (Watertown, MA, EUA), Omni-E Haydbaid de 96 pozos (Reino Unido) y el modelo 24000 de Perkin Elmer (Norwalk, CT, EUA).

Para analizar los productos amplificados por la PCR, se utilizaron cámaras de electroforesis horizontal fotodyne (Hartland, WI, EUA), cámaras verticales de 20 x 20 cms y una fuente poder de Gibco-BRL modelo 250.

Para analizar los geles tanto de agarosa como de poliacrilamida, se utilizó el equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000 y el programa molecular Analyst de Bio Rad (Hercules, CA, EUA).

4.1.6 Apoyo computacional: El procesamiento de datos fue realizado en una computadora modelo Acer Power P75 y un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido de una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora (Gel Doc System, BIO RAD). El procesador de texto utilizado fue *Microsoft Word 97* (Microsoft Corporation), Procesadores gráficos *Microsoft Power Point 97* (Microsoft Corporation), Adobe Photoshop *Limited Edition 2.5.1* (Adobe System Incorporated) y UMAX Scan (UMAX Scanner Driver, Impact Research, Inc).

Los programas computacionales de Biología molecular empleados fueron: *Amplify* versión 1.2b (Bill Engels 1992, University of Wisconsin Genetics M, Madison, Wi. E.U.A.), *Oligo* versión 4.0 (Plymouth, Mn, E.U.A.) y Molecular Analyst (BIO RAD). Los programas utilizados por vía INTERNET fueron: *Entrez* (National Center for Biotechnology Information (NCBI); BLAST Network Service

(Blaster); *Gen Bank* (ICEBEG, Trieste, Italia). El programa utilizado para comunicación en la red fue el *Microsoft Internet Explorer* versión 4.0

4.2 Métodos

4.2.1. Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes. Se incluyeron en el estudio pacientes infértiles de origen idiopático que tuvieran azoospermia no obstructiva, oligozoospermia ($<5 \times 10^6/\text{ml}$) o azoospermia obstructiva (ABCCD) por agenesia de los conductos deferentes, de entre 20 y 40 años. Se excluyeron los pacientes con infertilidad de causa conocida: varicocele, hipogonadismo hipogonadotrópico, alteraciones cromosómicas u otra causa conocida de infertilidad.

4.2.2. Grupos experimental y grupo control. Se analizaron 48 pacientes, de los cuales 16 eran varones con oligozoospermia, 30 con azoospermia obstructiva y 2 con ABCCD. Estos pacientes fueron previamente examinados y valorados por el Urólogo Dr. Lauro Gómez Guerra del Centro de Especialidades Médicas, de Monterrey, N.L., así como por el Dr. Antonio Gutiérrez, del Hospital Aranda de la Parra de León Guanajuato. De cada uno de los individuos a analizar se obtuvieron muestras de sangre periférica con EDTA y heparina como anticoagulante.

El grupo control lo conformaron 50 varones con fertilidad comprobada con pruebas moleculares utilizadas para identificación de individuos empleando los

marcadores Apo B y D1S80. Los DNAs de este grupo fueron tomados del banco de DNA de la Unidad de Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, U.A.N.L.

4.2.3 Extracción de DNA genómico a partir de muestras de sangre.

Se extrajo el DNA genómico mediante la técnica "TSNT" en la cual la sangre se mezcla con una solución de lisis (1% Tritón, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) y posteriormente se añade fenol y SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1), se mezcla, se centrifuga y se separa el sobrenadante del cual se precipita el DNA con etanol y se reconstituye en TE (Tris 10 mM-EDTA 1 mM pH 7.4). El procedimiento que se siguió se describe a continuación.

Se colocaron 2.5 ml de sangre en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml. Las células se lisaron con 1 ml de solución de lisis TSNT, mezclando por varios segundos. Posteriormente se agregaron 2.5 ml de fenol saturado (con Tris-HCl 0.1M pH 8) y 1 ml de SEVAG; el contenido del tubo se homogenizó por completo utilizando un vortex. Enseguida se agregaron 2 ml de buffer TE y se centrifugó a 10,000 rpm por espacio de 15 min. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo de 15 ml. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se agitó lentamente por inversión hasta observar el DNA precipitado, como una hebra blanca. Utilizando una micropipeta (P-1000), el DNA se recuperó y se transfirió con cuidado a un tubo Eppendorf de 2 ml. Se centrifugó a 14,000 rpm en una microcentrifuga y la

pastilla obtenida se lavó con etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente, se decantó el etanol, se secó el DNA y finalmente se resuspendió en TE.

4.2.4. Verificación de la calidad y la concentración del DNA en gel de agarosa. Se realizaron diluciones 1:10 de cada DNA extraído para verificar su cantidad e integridad en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio. Utilizando estándares de DNA de concentración conocida se estimó la concentración de DNA de cada paciente.

4.2.5. Realización de cariotipo a partir de sangre periférica con heparina. Este procedimiento se realizó en condiciones de absoluta esterilidad y consistió en lo siguiente:

Se sembraron 10 gotas de sangre periférica (anticoagulada con heparina) en un frasco de cultivo con 0.2 ml de fitohemaglutinina, 4 ml de medio RPMI 1640, 1 ml de suero fetal y 0.1 ml de la solución de antibiótico-antimicótico comercial que contiene una mezcla de Penicilina G (10000 Unidades/ml), estreptomina (10000 Unidades/ml) y el antimicótico amfotericina B (25 µg/ml), durante 72 hrs a 37°C. Transcurrido este tiempo las células se detuvieron en mitosis mediante la adición de 2 gotas de colchicina (10 µg/ml), durante 40 min. Las muestras se sacaron e incubaron durante 1 hr con una solución hipotónica de KCl (0.075 M) a 37°C. Una vez desintegradas las células, estas se pusieron en contacto con 4 ó 5 ml de una solución fijadora

a base de metanol:ácido acético (3:1) y se lavaron varias veces con esta misma solución. Se tomó una gota de la suspensión de células y se dejó caer sobre un portaobjetos desde una altura suficiente (aprox. 50 cm) para lograr una dispersión adecuada de los cromosomas. Inmediatamente después, las laminillas se tiñeron con colorante Giemsa (0.28%) por espacio de 3 min y se observaron al microscopio en el objetivo de inmersión para detectar las metafases. Las laminillas seleccionadas se incubaron por 1 hr en una estufa a 100°C. Una vez transcurrido este tiempo, las laminillas se trataron con solución de tripsina al 0.025% a 37°C en baño maría por espacio de 10 a 20 seg, controlando la actividad de la tripsina mediante la observación de éstas al microscopio. Se lavaron en solución salina fisiológica y se tiñeron con Giemsa en amortiguador de fosfatos a pH 6.8 durante 3 min. Se observaron al microscopio con el objetivo de inmersión y se realizó el análisis.

4.2.6. Pruebas de paternidad con marcadores ApoB y D1S80.

4.2.6.1. Amplificación de las muestras para el marcador Apo B.

Para la reacción de amplificación de la región del minisatelite del gen Apo B se siguió la técnica descrita por Villalobos y cols. (50) y se utilizaron los iniciadores descritos por Boerwinkle y cols (51), estos fueron los siguientes:

Oligo Apo B sentido: 5'- atggaacggagaaattatg -3'

Oligo Apo B antisentido: 5'- ccttctcacttgcaaac -3'

Las muestras se amplificaron en las condiciones óptimas encontradas experimentalmente y descritas en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Condiciones de reacción de la PCR para el marcador genético Apo B.

Reactivo	Cantidad (μ l)	Concentración final
Buffer DNA pol Taq 10X	2.5	1X
Primer sentido 10 μ M	2.5	1 μ M
Primer antisentido 10 μ M	2.5	1 μ M
MgCl ₂ 25mM	1.5	1.5mM
dNTPs 10mM	0.5	0.2mM
Bio taq 5U/ μ l	.3	0.06U/ μ l
DNA 50 ng/ μ l	2.0	100 ng
Volumen final	50	

Tabla 2. Condiciones de amplificación para Apo B.

PASOS	ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
1	Desnaturalización inicial	94°C	4 min
2	Desnaturalización	94°C	30 seg
3	Alineamiento	58°C	30 seg
4	Extensión de oligos	70°C	45 seg
5	Repetir el paso 2, 30 ciclos		
6	Extensión final	65°C	7 min
7	Fin		

4.2.6.2. Verificación de las muestras de amplificación. Cinco μ l del producto amplificado mas 1 μ l de jugo azul al 6X (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%) se sometieron a electroforesis junto con un marcador de peso molecular adecuado (pUC digerido con *Hae* III) para verificar el tamaño de la banda obtenida. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2% en TBE 1X (tris-borato 0.89 M, ácido bórico 0.89 M, EDTA 1 mM). La electroforesis se realizó en una cámara Mini Single Cell (E) 1-1408 (FOTODYNE) a 60 Volts (V) al principio hasta que la muestra entrara y luego a 100 V por un tiempo aproximado de 45 min. El buffer utilizado tanto para

preparar el gel como para llenar la cámara de electroforesis fue TBE 1X. Después de la corrida se procedió a teñir el gel en bromuro de etidio (al 0.3 $\mu\text{g/ml}$) por un tiempo de 10 min y 5 de enjuague con agua corriente. Transcurrido este tiempo, el gel se observó en el aparato Gel Doc 1000 a través del programa computacional Molecular Analyst 1.5.

4.2.6.3 Marcador génico D1S80:

Para la amplificación de la región VNTR D1S80 se siguió la técnica descrita por Villalobos (50), utilizando los primers descritos por Kasai y col. (52) siguientes:

Oligo D1S80 sentido: 5'- gaaactggcctccaacactgccc -3'

Oligo D1S80 antisentido: 5'- gtctgttgagatccacgtgccc -3'

Dicha amplificación se realizó bajo las condiciones óptimas de reacción descritas en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Condiciones de la PCR para el marcador genético D1S80

Reactivo	Cantidad (μl)	Concentración final
Buffer DNA pol Taq 10X	2.5	1X
Primer sentido 10 μM	2.5	1 μM
Primer antisentido 10 μM	2.5	1 μM
MgCl ₂ 25mM	1.5	1.5 mM
dNTPs 10mM	0.5	0.2mM
DNA pol taq 5U/ μl	03	0.06U/ μl
DNA 50 ng/ μl	2	4 ng/ μl
Volumen final	25	

Tabla 4. Condiciones de amplificación para D1S80.

PASOS	ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
1	Desnaturalización inicial	94°C	5 min
2	Desnaturalización	94°C	1 min
3	Alineamiento	65°C	1 min
4	Extensión de oligos	72°C	1 min
5	Repetir el paso 2, 30 ciclos		
6	Extensión final	72°C	7 min
7	Fin		

La verificación de las muestras amplificadas se realizó como se describe

en el apartado 4.2.6.2.

4.2.7. Tamizaje para 16 mutaciones en Fibrosis quística. Para la amplificación de las muestras se utilizó el estuche "Ensayo prototipo de investigación de FQ" de Roche Inc. Este estuche está basado principalmente en 3 procesos: amplificación de la secuencia blanco mediante la PCR, hibridación de los productos amplificados a sondas alelo-oligo específicas, y detección del producto amplificado unida a las sondas, mediante una reacción de formación de color. El desarrollo de este ensayo de PCR involucra regiones particulares del gen de interés (RTFQ), y parejas de oligonucleótidos biotinilados que son complementarios y flanquean estas regiones. En la reacción de amplificación, cada pareja de oligos biotinilados se une a la región blanco y después, catalizados por la polimerasa usando un exceso de desoxinucleosidos tri-fosfatados (dNTPs) en la mezcla de reacción, se extienden en la dirección 5' a 3'. De esta manera, por cada pareja de

oligonucleótidos se generan copias del DNA flanqueado por los oligos, una secuencia llamada amplicón. Por otro lado, sondas oligonucleotídicas específicas para las regiones génicas de RTFQ, están unidas a una membrana de nylon para capturar los amplicones correspondientes. El sistema de detección usado en el ensayo es un conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano (SA-HRP) que se une a los amplicones biotinilados capturados en la membrana por la sondas. Los sustratos usados para la formación de color en el ensayo son el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y la tetrametilbencidina (TMB). Con este estuche, se amplifican los siete exones y el intrón del gen RTFQ donde se encuentran las principales mutaciones causantes de esta enfermedad en la población mundial, así como también algunos polimorfismos importantes para esta enfermedad (ver tabla 5).

Tabla 5 Mutaciones detectadas mediante el estuche "Ensayo de investigación de FQ"

Amplicón	Región de RTFQ	Tamaño	Mutaciones ®
1	Exón 9	548	A455E; polimorfismos 5/7/9 T
2	Exón 10	482	ΔI507, ΔF508, polimorfismos F508C, I507V, I506V.
3	Exón 11	433	1717-1 G>A, G542X, S549N, G551D, R553X, R560T
4	Exón 21	397	N1303K
5	Exón 20	359	W1282X
6	Exón 7	328	R334W, R347P
7	Exón 4	263	R117H, 621+1 G □ T
8	Intrón 19	237	3849 + 10Kb C>YT

4.2.7.1 Amplificación de las muestras. Se realizó la reacción de PCR en una campana en condiciones de esterilidad como se describe en la tabla 6. Se mezcló el DNA, el buffer, la mezcla maestra y la DNA polimerasa taq en un volumen final de 50 μl y se llevó a cabo la amplificación bajo las condiciones descritas en la tabla 7 en un termociclador Perkin Elmer mod. 24000.

Tabla 6. Reacción de PCR para la detección de 16 mutaciones para la FQ.

Reactivo	Cantidad (μl)
Maxter mix	25
Buffer de dilución de DNA 1X	11.5
MgCl ₂ 25mM	12.5
DNA pol taq 5U/ μl	0.3
DNA 100 ng/ μl	1
Volumen final	50

Tabla 7. Condiciones de amplificación para 16 mutaciones en FQ

PASOS	ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
	Pre-calentamiento	42°C	10 min
1	Desnaturalización inicial	93°C	1 min
2	Desnaturalización	93°C	30 seg
3	Alineamiento	60°C	30 seg
4	Extensión de oligos	72°C	30 seg
5	Repetir el paso 2, 30 ciclos		
6	Extensión final	72°C	5 min
7	Fin		

La verificación de las muestras amplificadas se realizó como se describe en el apartado 4.2.6.2.

4.2.7.2. Hibridación y detección de las mutaciones. Al producto amplificado se le adicionaron 100 μ l de solución desnaturalizante y se calentó a 94°C por 10 min, inmediatamente transcurrido este tiempo se guardó en refrigeración. Por otro lado, la tirilla fue marcada con el nombre del paciente o con la clave y depositada en la charola donde se llevó a cabo la hibridación. A cada tirilla se le agregaron 5 ml de la solución de hibridación previamente calentada a 37°C, así como 70 μ l de la mezcla del producto amplificado en la solución desnaturalizante. Se incubaron en un baño de 50°C a 60 rpm por 20 min. Transcurrido este tiempo se agregó la solución de lavado (5 ml) por 12 min también a 50°C y a 60 rpm. Mientras este tiempo transcurría se preparó la solución de conjugado (debe de prepararse en el momento). Una vez que pasó este tiempo, se agregó la solución de conjugado dejándola bajo las mismas condiciones de tiempo, velocidad y temperatura. Luego se agregó la solución de lavado (a temperatura ambiente, 60 rpm, durante 10 min). Al término de esta se agregó la solución de citratos (10 min a 60 rpm a temperatura ambiente). Después de cada lavado se aspiró perfectamente y se enjuagó la tirilla. Se agregaron 5 ml de la solución de desarrollo de color y se dejó incubar durante 10 a 20 min, a 60 rpm a temperatura ambiente. Finalmente las tiras se enjuagaron con agua, se aspiró el exceso de ésta y se dejaron secar por espacio de una hora o hasta la aparición de color tapando la charola con papel aluminio.

4.2.8. Detección de mutaciones en el gen RTFQ. Para el análisis directo de mutaciones en el gen RTFQ se utilizaron 30 juegos de oligonucleótidos que cubrían al promotor y a 23 exones de éste gen. De los cuales, dieciséis juegos fueron diseñados por Salazar (1999) correspondientes a los exones 13-23 y catorce juegos por Calleja (1999) correspondientes al promotor, así como del exón 1 al 12 mediante el programa computacional OLIGO versión 4.0 y el programa Amplify versión 1.2 los cuales tenían las características mostradas en la tabla 8.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados en este trabajo para amplificar ciertas regiones del gen RTFQ.

Promotor	Oligo	Secuencia	Tm
	PromAF	GCCGCTAGAGCAAAATTGGG	62°C
	PromAR	GCCAAAGACCTACTACTCTGGGTGC	
Exón			
Exón 1	Ex1R	CCTAGCAGGGACCCCAGCG	62°C
	Ex1F	CTTTCCGAAGCTCGGTTGGC	
Exón 2	Ex2R	GAATATCTGTTCTCCTCTCTTTAT	53°C
	Ex2F	GAATTTCTCTCTTCAACTAAACAAT	
Exón 3	Ex3R	CAACTATTGGTCCCACCTTTT	53°C
	Ex3F	CATAATGAATGTACAAATGAGATCC	
Exón 4	Ex4R	GAAATTTAATTTCTCTGTTTTTCCC	55°C
	Ex4F	TACGATACAGAATATATGTGCCATG	
Exón 5	Ex5R	GTTGAAATTAATCTAACTTTCCATTTT	53°C
	Ex5F	CAATAGTGCCTAAAAGATTAATCAAT	
Exón 6a	Ex6aR	CAATGACACCTGTTTTGCTG	55°C
	Ex6aF	GGGCTTTTTGAAAACATAATTTTAA	
Exón 6b	Ex6bR	GAGCAGTTCTTAATAGATAATTTGACT	53°C
	Ex6bF	AAATTAAGGACAGAATTAACAATATT	
Exón 7	Ex7R	ACATCCTGAATTTTATTGTTATTGTTT	55°C
	Ex7F	TCATAGTATAAATGCAGCATTATGGT	
Exón 8	Ex8R	GCTATTCTGATTCTATAAATGTTTTTGC	53°C
	Ex8F	GAAAACAGTTAGGTGTTTAGAGCAA	
Exón 9	Ex9R	CTATTGAAAATATCTGACAAACTCAT	53°C
	Ex9F	GACATGGACACCAAATTAAGTT	
Exón 10	Ex10R	TTGATAATGACCTAATAATGATGGGT	55°C
	Ex10F	AGTGTGAAGGGTTCATATGCA	
Exón 11	Ex11R	GAGCATACTAAAAGTGACTCTCTAATTT	53°C
	Ex11F	CATTTACAGCAAATGCTTGC	
Exón 12	Ex12R	GATGACCAGGAAATAGAGAGGA	52°C
	Ex12F	GATGGGACAGTCTGTCTTTCTT	
Exón 13A	Ex13aR	GATTATATATCTTAAAGCTGTGTC	53°C
	Ex13aF	GGTGTAAGGTCTCAGTTAGG	
Exon13B	Ex13bR	CCAATTTAGTCCAGAAAGAAG	55°C
	Ex13bF	GGACAGCCTACTCTCTAAAG	
Exón13C	Ex13cR	GAAGAGGATTCTGATGAGCC	55°C
	Ex13cF	CACTTTTCGTGTGGATGCTG	
Exón13D	Ex13dR	CAGAACATTACCCGAAAGAC	55°C
	Ex13dF	GCATTCTGTGGGTGAAATA	
Exón 14b	Ex14bR	GGGAGGAATAGGTGAAGATG	53°C
	Ex14bF	GATTACAATACATACAAACATAG	
Exón 15	Ex15R	ACGATTTCCATTTTGCTTTAC	55°C
	Ex15F	GCAGTTTCATTTCTTAGACC	
Exón 16	Ex16R	GTCATCTTGATATTATAGG	52°C
	Ex16F	CGGTACTTATTTTACATAC	
Exón 17 ^a	Ex17aR	CAATGTGAAAATGTTTACTC	53°C
	Ex17aF	AATAAAGAATCTCAAATAGC	
Exón 17b	Ex17bR	ATTTTGTGTTTATGTTATTTGC	53°C
	Ex17bF	TGAGTTCATAGTACCTGTTG	
Exón 18	Ex18R	TCACAGAAGAGAGAAATAAC	52°C
	Ex18F	CATACTTTGTTACTTGTCTG	
Exón 22	Ex22R	CTCCTGTGTTTATTTTAGAATG	55°C
	Ex22F	TGATTCTGTTCCCCTGTGC	
Exón 23	Ex23R	TATGTGTGGTATTTTCTTTC	52°C
	Ex23F	ATTACAAGGGCAATGAGATC	

4.2.8.1 Optimización de las condiciones de amplificación. Para la amplificación por PCR de los diferentes exones y promotor, primeramente se realizó la optimización de los parámetros de PCR como son concentración de DNA, temperaturas y tiempos óptimos, concentración de MgCl₂, concentración de oligonucleótidos, etc, en diferentes experimentos, manteniendo constantes las concentraciones de buffer de la enzima, dNTPs, Bio-Taq DNA polimerasa y oligonucleótidos, variando la concentración de DNA y el rango de temperatura, iniciando con su temperatura teórica hasta obtener la idónea. Una vez encontrado ésta, se procedió a ajustar la concentración de DNA de 600ng/μl hasta 25ng/μl. Los resultados se analizaron en un gel de agarosa al 2%.

Tabla 9. Condiciones de la reacción de PCR para los 23 exones y el promotor del gen RTFQ.

Reactivo	Cantidad (μl)	Concentración final
Buffer DNA pol Taq 10X	2.5	1X
Primer sentido 10μM	2.5	1μM
Primer antisentido 10μM	2.5	1μM
MgCl ₂ 25mM	1.5	1.5 mM
dNTPs 10mM	0.5	0.2mM
DNA pol taq 5U/μl	03	0.06U/μl
DNA 50 ng/μl	2	4 ng/μl
Volumen final	25	

Tabla 10. Condiciones de amplificación para las regiones del gen RTFQ

PASOS	ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
1	Desnaturalización inicial	94°C	1 min
2	Desnaturalización	94°C	30 seg
3	Alineamiento	52-62°C*	30 seg
4	Extensión de oligos	72°C	30 seg
5	Repetir el paso 2, 30 ciclos		
6	Extensión final	72°C	5 min
7	Fin		

*dependiendo del juego de oligo utilizado

La verificación de las muestras amplificadas se realizó en gel de agarosa al 2% como se describe en el apartado 4.2.6.2.

4.2.8.2 Análisis de mutaciones mediante polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP, por sus siglas en inglés). El análisis de las mutaciones se realizó mediante el método de Orita y cols. (52), el cual es una de las metodologías más utilizadas para detección de mutaciones puntuales, y se estima que tiene una sensibilidad de detección de entre un 85 a un 90%. Se basa en el hecho de que, los cambios en la secuencia del DNA, inclusive en una sola base, resultan en alteración de la estructura conformacional de la hebra sencilla del DNA, comparada con aquella original (no mutada). De esta manera, para el análisis de las mutaciones, se amplifican mediante PCR, los fragmentos de DNA candidatos al análisis y los respectivos controles normales, y estos productos de PCR se desnaturalizan para separar el DNA en cadenas sencillas. Los cambios en la conformación del DNA, pueden ser detectados y analizados mediante electroforesis en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida.

Como estrategia general, todas las muestras de afectados y sus controles normales correspondientes se sometieron a un análisis individual por SSCP, del promotor y de cada uno de los exones del gen de la fibrosis quística, utilizando los mismo oligonucleótidos descritos de la tabla 8. Después de la

amplificación, las muestras se desnaturalizaron agregando 5 μ l de solución desnaturalizante (formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0.05% y xilencianol al 0.05%) y calentando a 95°C durante 5 min. Las muestras se transfirieron inmediatamente a 4°C.

Para realizar la electroforesis de SSCP se utilizó una cámara de vertical de 20 x 20 cm con peine de teflón de 20 carriles y 0.8 mm de espesor. Los vidrios utilizados se lavaron perfectamente con jabón, etanol y agua destilada. Una vez secos, se colocó una capa de silicón (sigmacote) utilizando una torunda de algodón y se dejó secar al aire. Se acomodaron los vidrios y los separadores y se sellaron los lados con cinta plástica. Se preparó la mezcla (13 ml) y se vació rápidamente, se colocó el peine y se dejó polimerizar.

De cada una de las muestras se cargaron 15 μ l en un gel no desnaturalizante de poliacrilamida:bisacrilamida (50:1) al 10%. Los geles se corrieron en amortiguador TBE al 0.5% durante 10 h a 170 V en una cámara de electroforesis vertical modelo V16 de Gibco BRL. Una vez terminado el corrimiento el gel se tiñó con bromuro de etidio recién preparado durante 10 min y luego se enjuagó en agua por 5 min. Transcurrido este tiempo, el gel se observó en el aparato Gel Doc 1000 a través del programa computacional Molecular Analyst 1.5

Para el análisis del gel se compararon los patrones de bandas resultantes de los controles contra las bandas resultantes de los afectados. Cualquier migración diferente (anormal) dentro del grupo de los pacientes se consideró candidata para análisis de mutación. Las bandas con patrones diferentes (anormales) de los afectados, se cortaron directamente de los geles de poliacrilamida, el DNA se eluyó de éste y se purificó para secuenciarlos.

4.2.8.3 Purificación de las bandas de migración anormal: Se

utilizaron dos métodos para extraer el DNA del gel: a) Mediante el estuche comercial de extracción a partir de un gel de agarosa de QIAEX II . Una vez amplificado y verificado el producto deseado, lo que sobra de éste (aproximadamente 20 μ l) se somete a una electroforesis en un gel de agarosa al 2%, con peines de dientes grandes y a partir de aquí se cortó la banda con navaja de acero inoxidable, previamente desinfectada con etanol al 100%. Este pedazo de agarosa se puso en un tubo Ependorff de 1.5 ml estéril para transportarlo a la mesa de trabajo. En ésta se extendió un cuadrado de papel aluminio y con mucho cuidado el pedazo de agarosa se cortó en pedacitos muy pequeños y se volvió a regresar al tubo Ependorff, en donde se continuó con la técnica descrita y empleando el mismo estuche. b) La segunda técnica consistió en extraer el DNA directamente del producto amplificado por Fenol-SEVAG. Una vez amplificado y verificado el producto, se tomó el resto eliminando el aceite primeramente y luego se agregaron 70 μ l de TE para tener un volumen de aproximadamente 100 μ l. Se adicionaron 100 μ l de fenol y se

agitó por espacio de unos 30 segundos. Se agregaron 100 μ l de SEVAG y se mezcló en vortex durante 5 min. Posteriormente se centrifugó durante 10 min a 14000 r.p.m., se extrajo la fase acuosa y se agregaron 50 μ l de TE. Se adicionó 0.1 vol de acetato de sodio, continuando con 2.5 vol de etanol al 100% y precipitando toda la noche a -70°C . Se eliminó el etanol centrifugando a 14000 r.p.m. durante 10 min. Se lavó con 100 μ l de etanol al 70%, se secó la pastilla y se resuspendió en 10 μ l de TE. Una vez concluida cualquiera de las 2 técnicas, se verificó el DNA en un gel de agarosa al 2% poniendo 1 μ l del DNA y 1 μ l de jugo azul.

4.2.8.4 Secuenciación. La secuenciación automática se llevó a cabo en un secuenciador automatizado DNA Sequencer 4200 de LICOR. La preparación de las muestras se realizó con el estuche comercial IR Dye 800, usando mezclas de terminadores marcados y 33 ng de producto purificado.

4.2.9 Detección de microdeleciones en el cromosoma Y.

4.2.9.1 Amplificación de las muestras con los marcadores STS

en el cromosoma Y. La tipificación de los STS se realizó con el estuche comercial *"The Y Chromosome Deletion Detection System, version 1.1"* de Promega, amplificando 18 STS que se encuentran en el brazo corto del cromosoma Y.

Cada muestra se cuantificó en un gel de agarosa al 0.8% considerando como estándar un DNA de concentración conocida (50 ng/ μ l) con

la ayuda del Gel Doc, para que la concentración final de cada muestra estuviera a 30 ng en 2.5 μ l. Se prepararon cuatro tubos que incluían las diferentes mezclas de reacción para amplificar los STS (reacción A, B, C y D). Siempre que se realizaba una PCR todo el material utilizado (pipetas, puntillas, tubos, etc) se exponía a luz ultravioleta al menos 15 minutos, en una campana de flujo laminar misma donde se montaba la reacción para evitar el riesgo de contaminación. Una vez transcurrido este tiempo se procedía a rotular los tubos (siempre con guantes) y a depositar la muestra de DNA en el tubo correspondiente. En ese momento todos los demás reactivos eran traídos en hielo y siempre la enzima era la última en agregarse. Siempre se consideraba el control negativo (todos los reactivos excepto DNA), un control positivo (DNA Control), así como un volumen extra para evitar el error de pipeteo. Una vez lista la mezcla correspondiente, se repartió en los diferentes tubos utilizando una puntilla nueva para cada tubo, tratando de no introducir mucho la puntilla en el cóctel para evitar pérdidas de volumen. Una vez concluido esto, se le agregó el aceite mineral para evitar pérdidas por evaporación durante la PCR. Las condiciones de amplificación se describen en las tablas 11 y 12.

Tabla 11. Condiciones de la reacción de la PCR para la amplificación de los 18 STSs del cromosoma Y.

Reactivo	Cantidad en μl
DNA 10ng/ μ l	2.5
Mezcla de reacción	10
Taq DNA polimerasa	0.2
Volumen final	12.7

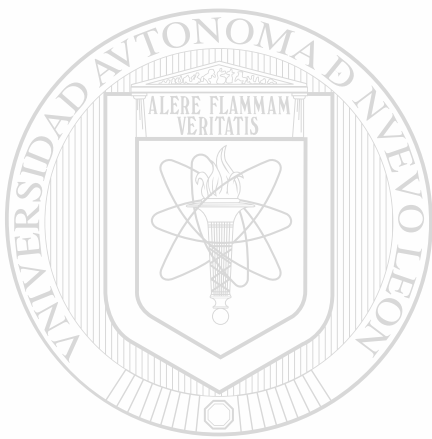
Durante todo el montaje de la PCR los tubos se mantuvieron en hielo y se introdujeron al termociclador (previamente verificado el programa) PTC-100 (MJ Research). La tabla 13 muestra las condiciones del programa de PCR.

Tabla 12. Condiciones de amplificación para detectar microdeleciones

PASOS	ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
1	Desnaturalización inicial	94°C	2 min
2	Desnaturalización	94°C	1 min
3	Alineamiento	54°C	30 min
4	Extensión de oligos	72°C	1 min
5	Repetir el paso 2, 35 ciclos		
6	Extensión final	72°C	5 min
7	Fin		

4.2.9.2 Verificación de la amplificación en un gel de agarosa: Las muestras amplificadas se corrieron en un gel de agarosa al 2%. 10 μ l del producto amplificado mas 2 μ l de jugo azul/naranja al 6X (Promega) se sometieron a electroforesis junto con el marcador (escalera de 50 pb, Promega) para verificar el tamaño de las bandas obtenidas. La electroforesis se realizó en una cámara horizontal Modelo H5 (BRL) a 60 V al principio hasta que la muestra entrara y luego a 80 V por un tiempo aproximado de 4 h. El buffer utilizado tanto para preparar el gel como para llenar la cámara de electroforesis fue TBE 1X. Después de la corrida se procedió a teñir el gel en bromuro de etidio por un tiempo de 10 min y 5 min de enjuague con agua corriente. Transcurrido este tiempo el gel se observó en el aparato Gel Doc 1000 a través del programa computacional Molecular Analyst 1.5.

4.2.9.3 Análisis de los patrones electroforéticos. Para analizar los geles se generaron imágenes digitalizadas con el equipo gel Doc 1000 y el programa computacional Molecular Analyst. La delección se observó por la presencia o ausencia de cada banda.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO V

RESULTADOS

5.1 Extracción y cuantificación del DNA

Se procesaron de 2 hasta 6 ml de sangre por paciente dependiendo de la disponibilidad de la misma. A todas las muestras se les realizó extracción de DNA mediante la misma técnica de TSNT, excepto a aquellas consistentes en cejas o cabellos. Los DNAs cuantificados en el aparato de fotodocumentación Gel Doc con la ayuda de un DNA de concentración conocida como estándar, obteniéndose de 100 a 150 mg de DNA/ml de sangre (Ver figura 10).

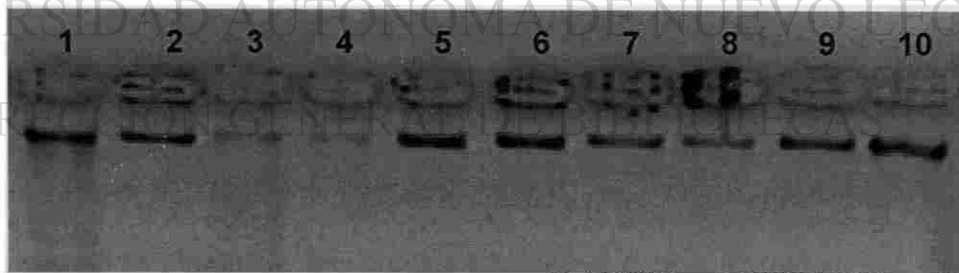


Figura 10. DNA genómico en gel de Agarosa al .8%. Los carriles 1 al 10 muestran DNAs que corresponden a diferentes pacientes.

5.2 Realización del Cariotipo:

Se realizaron 48 cariotipos mediante la técnica de bandas G. Todas las muestras procesadas fueron 46,XY normales. También se observaron

polimorfismos genéticos como cromosomas satelitados, núcleos muy grandes y condensados pero ninguna anomalía cromosómica (ver figura 11).

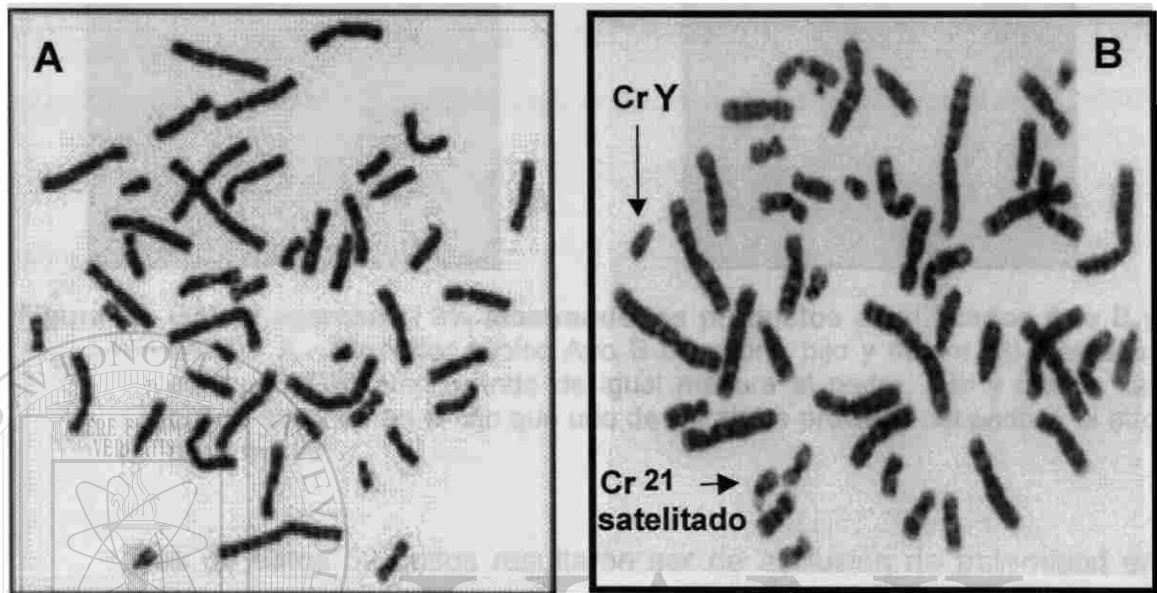


Figura 11. Observación de cariotipos por técnicas de bandas G. A) Fotografía de una metafase observada al microscopio. B) Cariotipo por bandas G de uno de los pacientes infértiles en donde se observan algunos polimorfismos genéticos como lo son los cromosomas satelitados.

5.3 Pruebas de paternidad

5.3.1 Marcadores Apo B y D1S80

Para el marcador génico Apo B, así como para el D1S80, se analizaron 52 familias, de las cuales 50 fueron casos no excluidos (es decir, paternidad confirmada y por lo tanto, se corroboró la fertilidad de los mismos), por lo que se utilizaron como controles fértiles a lo largo del estudio (ver figura 12).

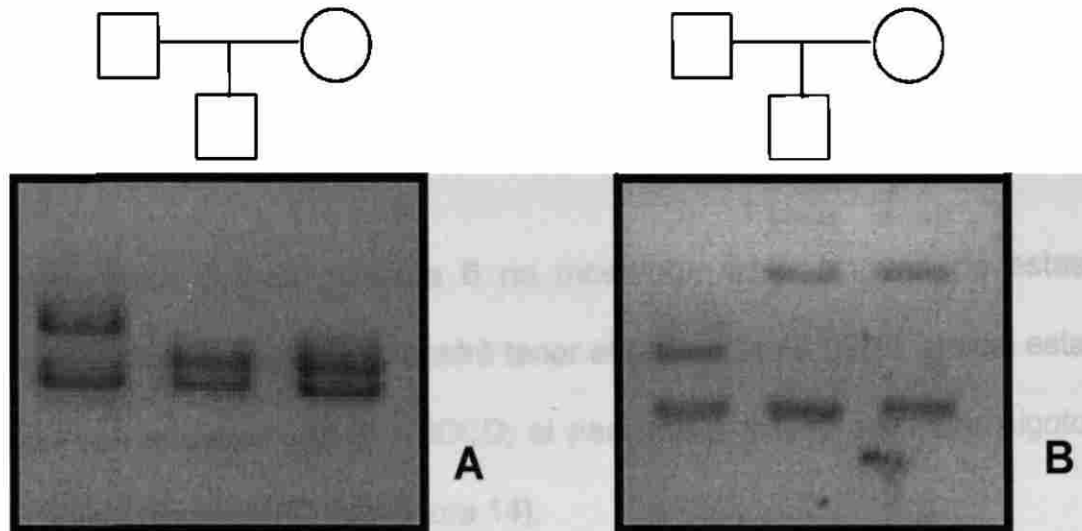


Figura 12. Gel de agarosa al 2% mostrando los productos amplificados Apo B y D1S80. A.- Marcador génico Apo B en padre, hijo y madre. B) Marcador génico D1S80 amplificando de igual manera al padre, hijo y madre. Se puede observar en el hijo que uno de los alelos proviene del padre y el otro de la madre.

Dos de estos 52 casos resultaron ser de exclusión de paternidad en estos varones y aunque no se puede descartar su fertilidad, tampoco se puede comprobar la misma, por lo que se decidió no incluirlos (ver figura 13).

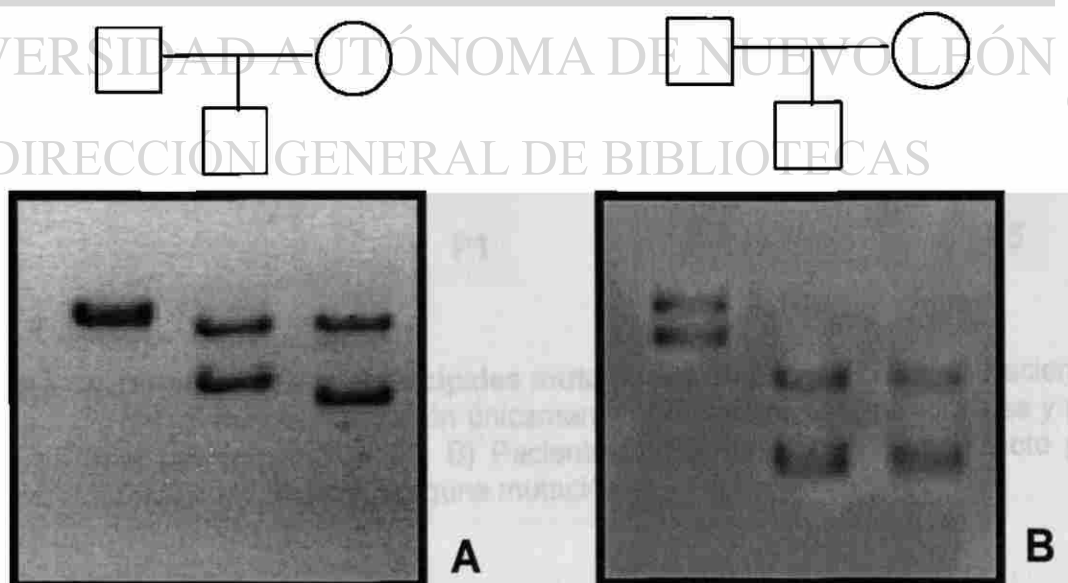


Figura 13. Exclusión para pruebas de paternidad con los marcadores Apo B y D1S80. A) Amplificación con el marcador Apo B, B) Amplificación con el marcador D1S80. En ambas amplificaciones se puede observar que ninguno de los alelos del hijo proviene de este supuesto padre.

5.4 Detección de 16 principales mutaciones para fibrosis quística mediante sondas alelos específicas.

El paciente 1 y el paciente 6 no mostraron tener ninguna de estas mutaciones, pero el paciente 1 mostró tener el polimorfismo 5T/7T el cual esta asociado con el padecimiento ABCCD; el paciente 6 resultó ser heterocigoto para el polimorfismo 7T/9T (ver figura 14).

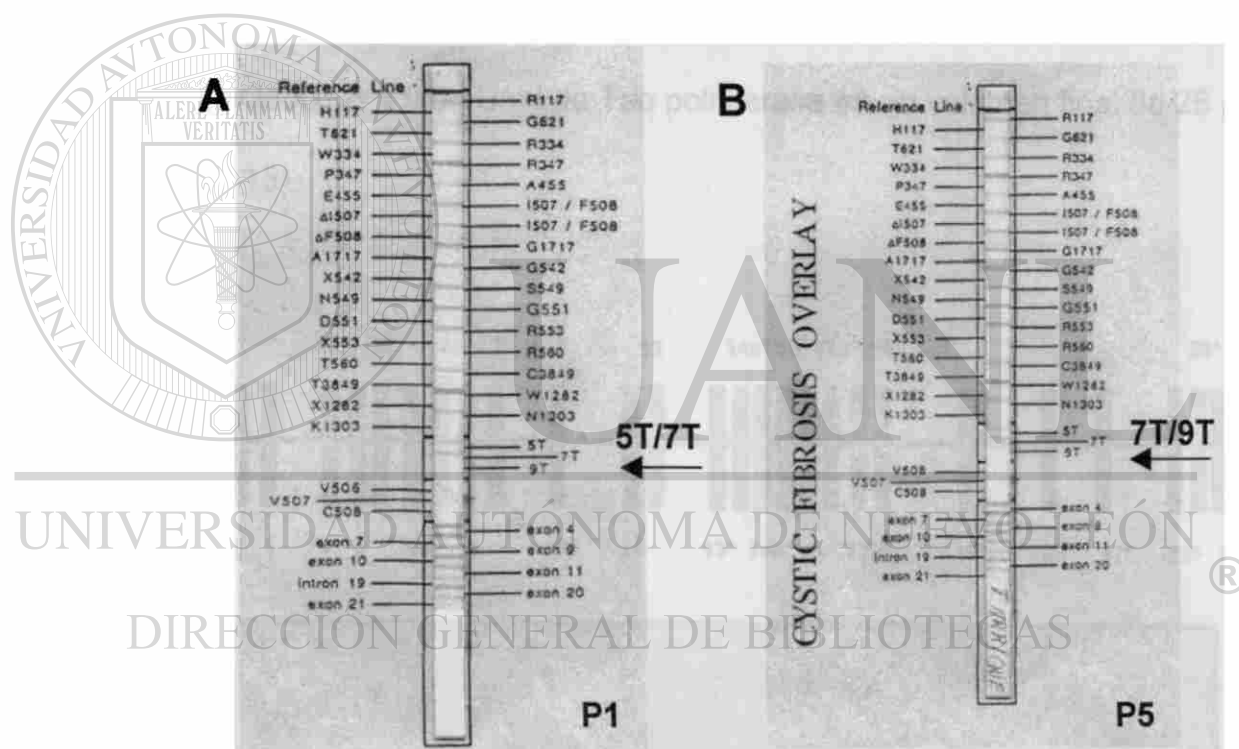


Figura 14. Detección de las principales mutaciones en el gen RTFQ. A) Paciente 1 (P1) presenta hibridación únicamente para las secuencias normales y para el polimorfismo 5T/7T, B) Paciente 5 (P5) resultó ser heterocigoto para 7T/9T, no presentó ninguna mutación.

5.5 Diseño de oligonucleótidos y estandarización.

Se diseñaron 12 pares de oligonucleótidos mediante la ayuda de los programas Oligo 4.0, Amplify 1.2, Blast 2.0, los cuales corresponden a los exones 1 al 12, así como al promotor del gen RTFQ (ver tabla 8).

Se procedió a estandarizar las diferentes reacciones de amplificación para cada exón con cada juego de oligonucleótidos, variando las concentraciones de DNA, Taq DNA polimerasa, oligonucleótidos, MgCl₂ y dNTPs. Finalmente, se estandarizaron reacciones que en general contenían: 200 ng de DNA, 1.5 µM de oligonucleótidos y 0.06 U/ml de Taq polimerasa en un volumen final de 25 µl (ver figura 15).

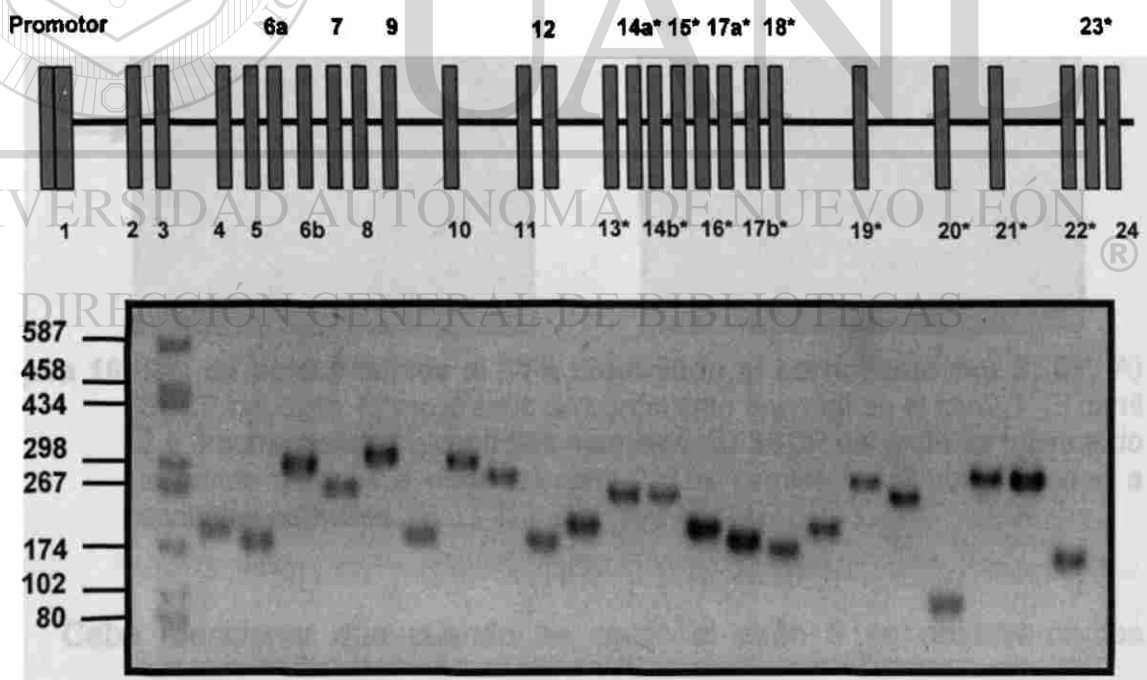


Figura 15. Amplificación de las regiones analizadas del gen RTFQ, implicados en el padecimiento ABCCD. Gel de agarosa al 2% mostrando los 19 productos de PCR analizados en este trabajo. Los tamaños de los productos variaban de 100 a 320 pb.

5.5.1 Resultado del análisis de mutaciones mediante SSCP

Se realizó análisis de SSCP a todos los productos de PCR de los exones individuales mencionados anteriormente, así como el promotor, encontrándose cambios los exones 6a y 12 (ver figura 16). El paciente 1 mostró tener un corrimiento diferente al de los controles a nivel del exón 6a, por lo que su banda fue cortada y procesada para secuenciación. El paciente 6 también mostró un corrimiento anormal para el exón 12 por lo que se cortó la banda del gel y el DNA extraído de este se sometió a secuenciación (ver figura 16).

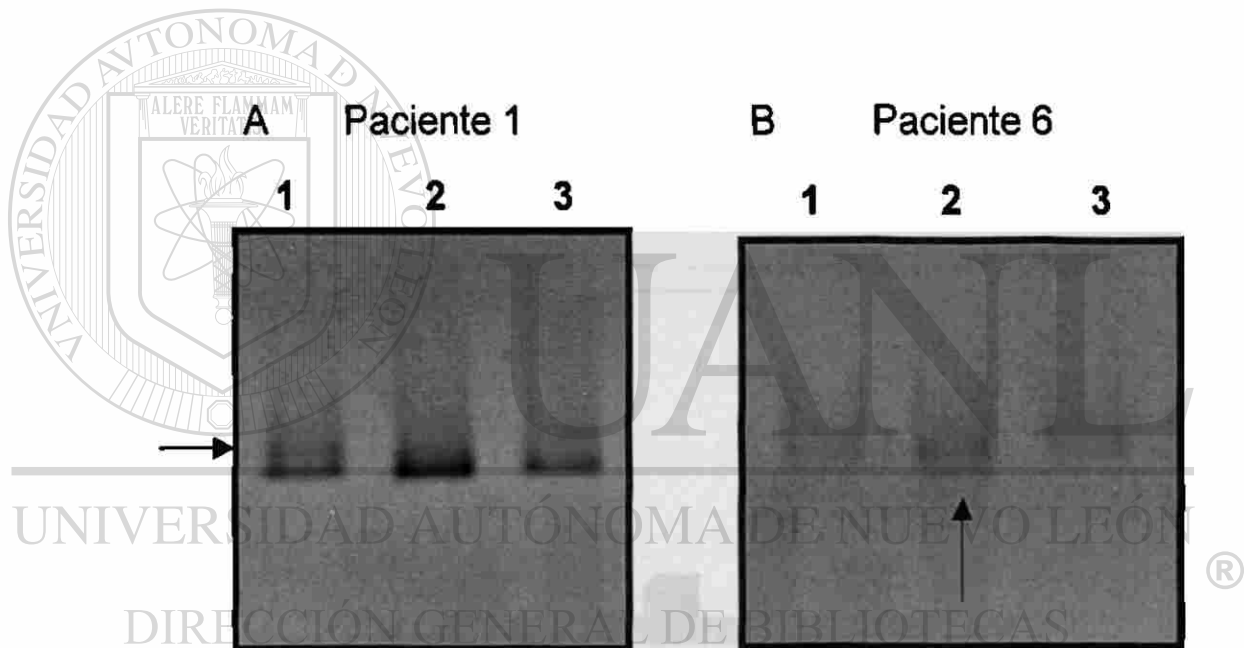


Figura 16. Gel de poliacrilamida al 10% mostrando el corrimiento por SSCP. A) SSCP del exón 12 mostrando un corrimiento anormal en el carril 1. El carril 2 y 3 corresponden a controles normales. B) SSCP del exón 6a mostrando la banda anormal a nivel del carril 2. Los carriles 1 y 3 corresponden a controles normales.

Cabe mencionar que cuando se corrió el exón 9 se observaron los diferentes polimorfismos ya esperados, más otros nuevos que no pudimos detectar inequívocamente, debido a la falta de controles positivos para dichos polimorfismos (ver figuras 17 y 18).



Figura 17. Polimorfismos del exón 9 en el gen RTFQ. Los carriles 1 al 14 corresponden a controles. Los carriles 2,4 y 5 tienen el polimorfismo 9T, los carriles 6 y 8 el 5T/7T, el carril 7 el 7T/9T y todos los demás son desconocidos.

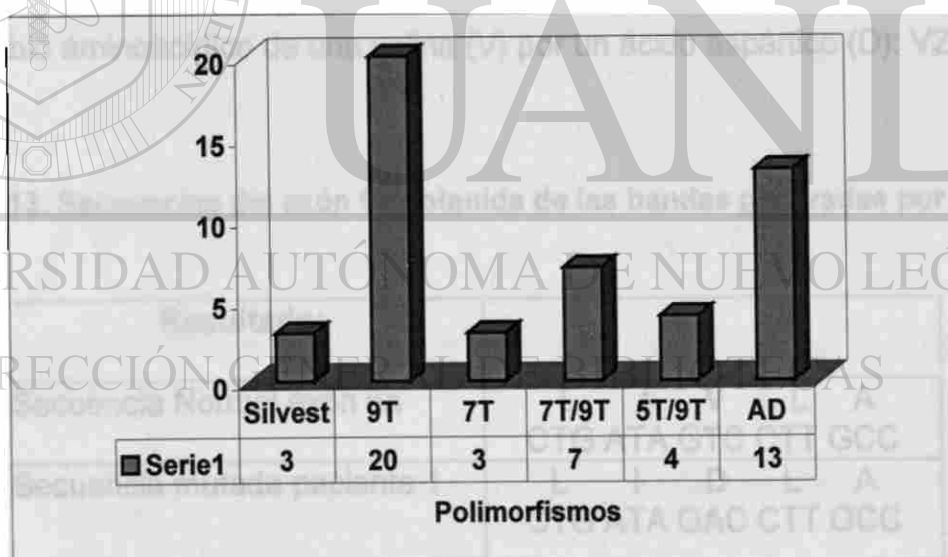


Figura 18. Representación esquemática del número de polimorfismos encontrados en los 50 controles estudiados. Solamente tres controles tenían la forma silvestre, veinte se encontraban con el polimorfismo 9T, el cual parece ser el polimorfismo predominante en esta población. Trece de estos alelos quedaron sin poderse determinar (AD).

5.6 Purificación de las bandas de migración anormal

Dos bandas fueron purificadas (Paciente 1 y 6) por la técnica descrita anteriormente de las se recuperó una pequeña cantidad de DNA (5 ng/ μ l), el cual sirvió para llevar a cabo la secuenciación.

5.7 Secuenciación de las bandas de migración anormal:

Se secuenciaron 2 bandas de migración anormal que correspondían al exón 6a en el caso del paciente 1 y el exón 12 en el caso del paciente 6.

La secuenciación automática reveló en el paciente 1 un cambio homocigoto de una T por una A (T→A) a nivel del exón 6a en la posición 232, provocando un cambio aminoacídico de una valina (V) por un ácido aspártico (D): V232D.

Tabla 13. Secuencias del exón 6a obtenida de las bandas generadas por SSCP.

Resultado:	
Secuencia Normal exón 6a	L I V L A CTG ATA GTC CTT GCC
Secuencia mutada paciente 1	L I D L A CTG ATA GAC CTT GCC

En el caso del paciente #6, éste resultó ser heterocigoto para un cambio en la posición 568, de una A por una T (A→T), cambiando de una leucina (L) por un codón de terminación (*), generando la mutación L568X (ver tabla 14).

Tabla 14. Secuencias del exón 12 obtenidas de las bandas generadas por SSCP.

Resultado:	
Secuencia normal exón 12	A D L Y L GCT GAT TTG TAT TTA
Secuencia mutada paciente 6	A D * Y L GCT GAT TAG TAT TTA

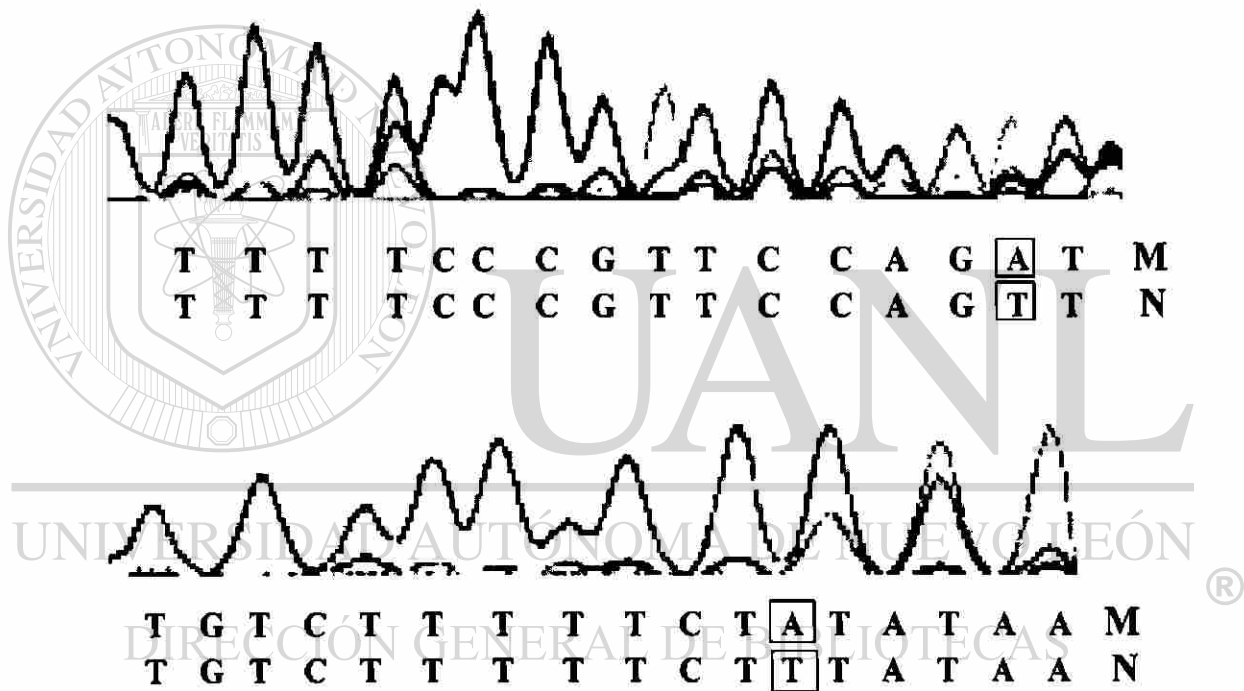


Figura 19. Resultados de la secuenciación de las bandas obtenidas por SSCP. A) muestra la secuenciación del exón 6a, B) muestra la secuenciación del exón 12. M: mutado, N: normal.

5.8 Microdeleciones del cromosoma Y

Se realizó la detección de las microdeleciones del cromosoma Y con el estuche comercial para los 50 controles y no se observaron microdeleciones en ninguno de los sujetos analizados (ver figura 20). Lo mismo se realizó con los 46 pacientes con azoospermia y oligozoospermia, resultando solo 3 pacientes con microdeleciones.

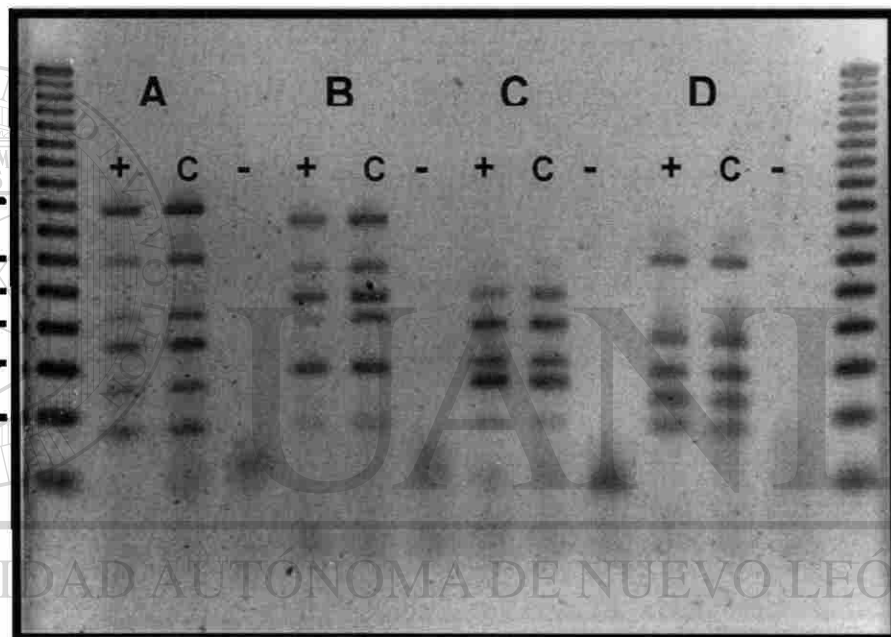


Figura 20. Prueba del estuche para detectar microdeleciones del cromosoma Y en un control fértil. Se pueden observar los diferentes STSs amplificados a lo largo del brazo largo del cromosoma Y, en un control fértil (C) comparado con el positivo del estuche comercial (+) donde tampoco hay microdelección alguna. (-) control negativo de la reacción.

5.8.1 Análisis del paciente 26. Este paciente resultó tener deletados los STSs: sYPR3 y sY124 los cuales se encuentran dentro de la zona AZFb.

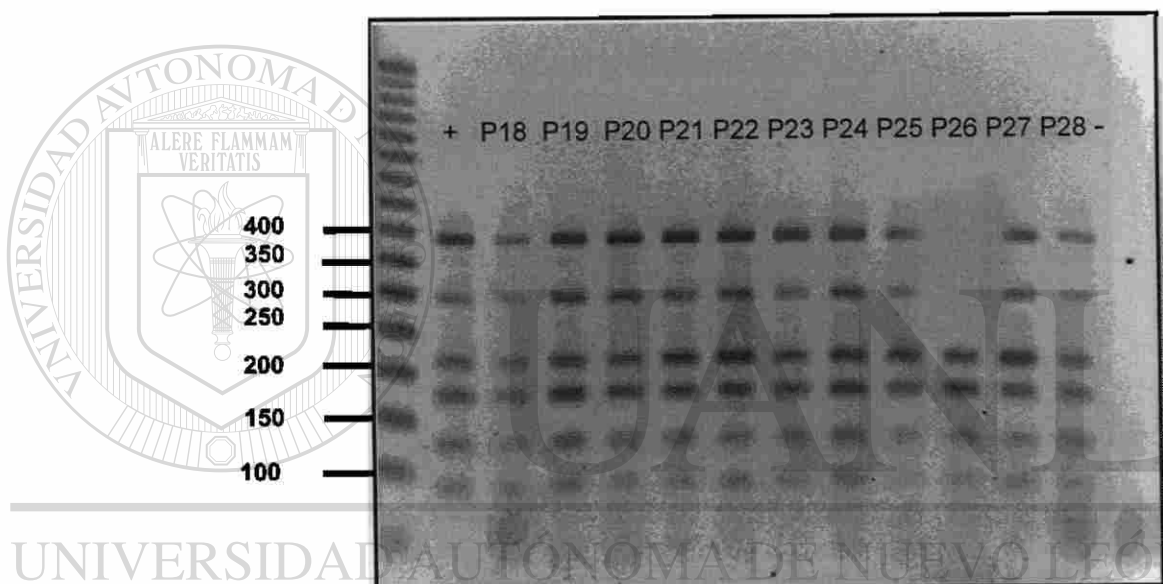


Figura 21. Observación de un paciente con microdeleciones en la zona AZFb. Los símbolos + y - representan los controles positivos y negativos para la reacción respectivamente. Los carriles P18 – P28 representan los pacientes estudiados. En el carril P28 se puede observar al paciente con dos STSs deletados.

5.8.2 Análisis del paciente 28. El paciente 28 presentó deleciones en los STSs: sY133, sY153 y sY152, los cuales se encuentran en la zona AZFd.

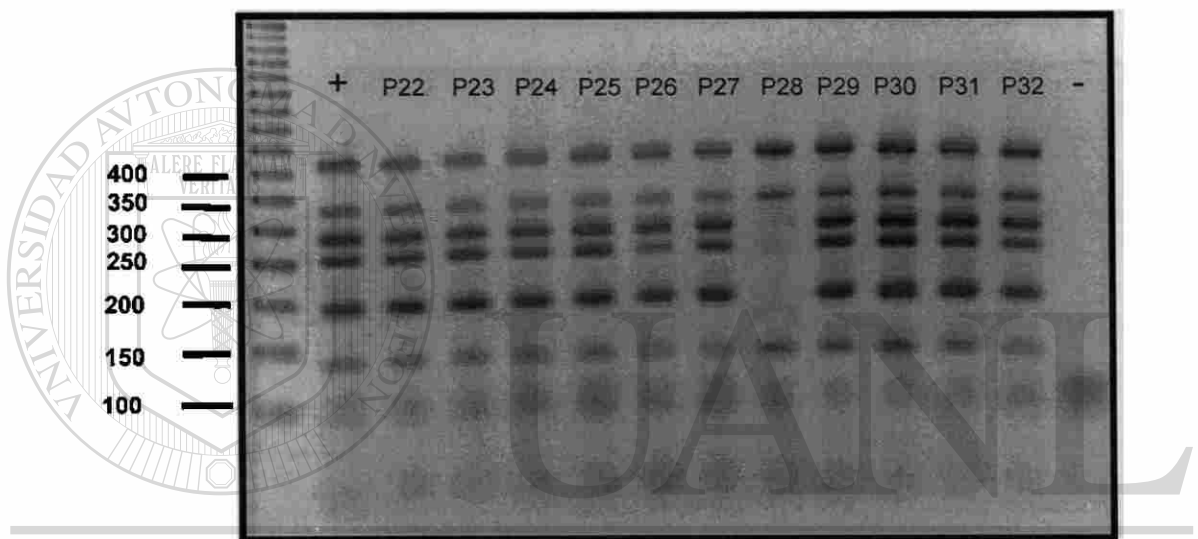


Figura 22. Detección de un paciente con microdeleciones en 3 STSs. Con el símbolo de + y - esta representado el control positivo y el control negativo, respectivamente, para la reacción. Con las siglas P22 al P32 están representados los diferentes pacientes analizados. El P28 presentó 3 microdeleciones

5.8.3 Análisis del paciente 32. En el caso del paciente 32 se pudieron detectar dos STSs deletados que corresponden a la zona AZFc y son sY255 y sY157.

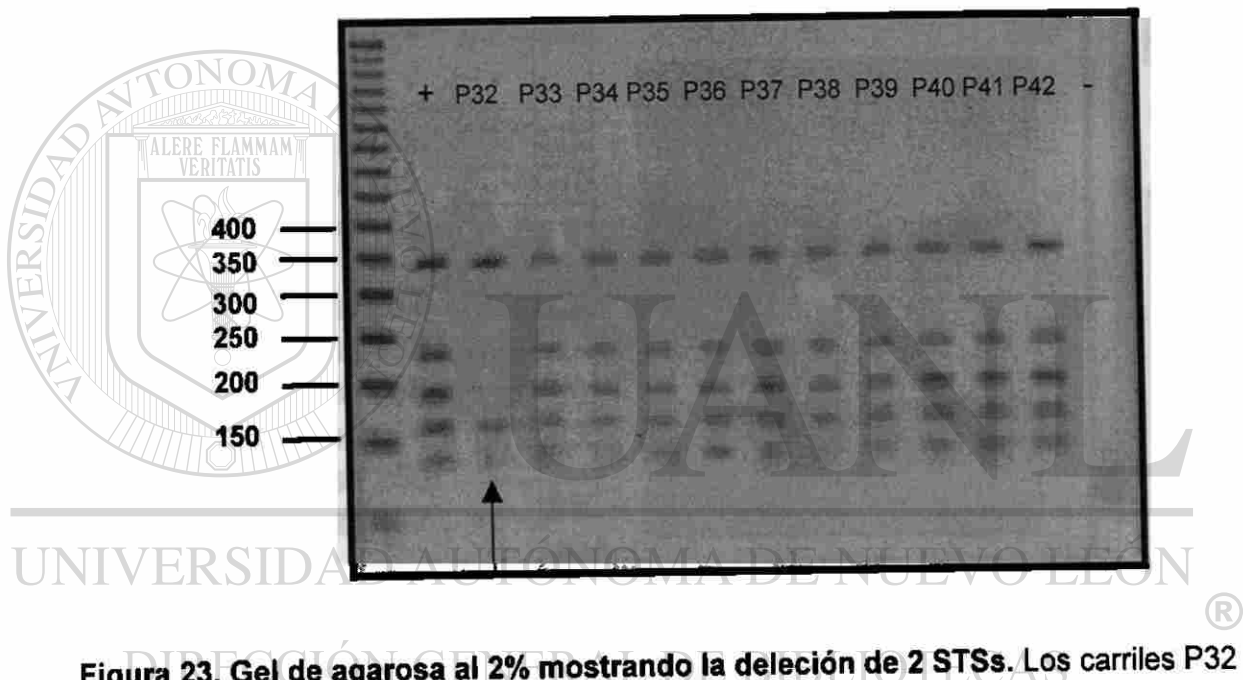


Figura 23. Gel de agarosa al 2% mostrando la delección de 2 STSs. Los carriles P32 al P42 representan a los pacientes estudiados. El símbolo + es el control positivo para esta reacción y el símbolo - es el control negativo. En el carril P32 se encuentra el paciente con la delección.

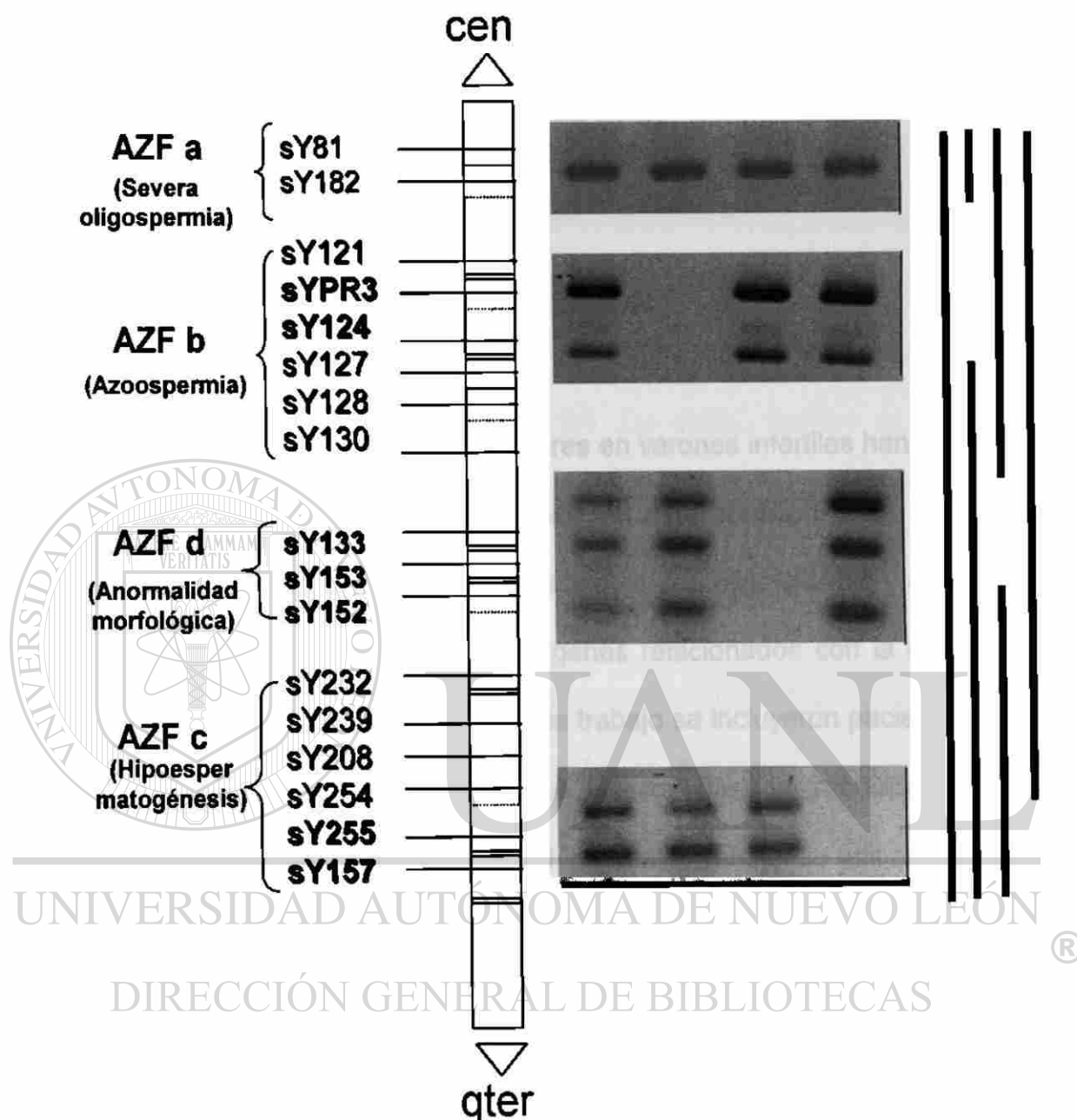


Figura 24. Mapa representativo de los diferentes pacientes y su correspondientes STSs deletados. Se puede observar las bandas faltantes en los geles que representan a los STSs deletados. A la izquierda se encuentra un mapa de las zonas AZFa, b, c y d y la posición de los STSs analizados en este trabajo. Lo que se encuentran en negritas representan a los STS que no se encontraron. A la izquierda se encuentran unas barras en negro representado la parte del cromosoma Y que falta para cada uno de los pacientes.

CAPITULO VI

DISCUSIÓN

Los recientes estudios moleculares en varones infértiles han demostrado la importancia del componente genético en esta afección. Este es el primer reporte de un análisis molecular en pacientes con oligospermia y azoospermia para la búsqueda de mutaciones en genes relacionados con la reproducción masculina realizado en México. En este trabajo se incluyeron pacientes con IMI y con ABCCD atendidos en servicios clínicos para la infertilidad en León, Guanajuato y Monterrey, N.L. En el presente trabajo se utilizaron criterios estrictos para la selección de pacientes, de tal manera que se eliminaron pacientes con infertilidad anatómica, diferente de la ABCCD, con alteraciones citogenéticas, con deficiencias hormonales y patología infecciosa por interrogatorio. En cuanto a los antecedentes familiares, los sujetos estudiados niegan antecedentes familiares de infertilidad masculina, por lo que se asumió la ocurrencia de novo de la patología.

Se detectaron 3 individuos con microdeleciones que afectan separadamente a las regiones b, c y d (6.7%). En los estudios de

microdeleciones del cromosoma Y en pacientes con IMI existen varios trabajos que reportan la presencia de microdeleciones en rangos que oscilan entre el 1 al 30%. Esta amplia variabilidad se debe a la diferencia en la selección de los grupos estudiados, principalmente en lo referente a los criterios de exclusión, y de los STS utilizados en cada estudio. Estos factores pueden explicar los escasos porcentajes de detección de microdeleciones (<3%) Hasta la fecha son muy escasos los reportes de estudios moleculares que tienen criterios rigurosos de exclusión para el diagnóstico de IMI. De éstos, destaca el de Seifer y cols.(53), quienes reportan microdeleciones en 14.7% de los pacientes. Nuestros resultados son similares a los reportados por Kleiman y cols.(54), en el cual siguen criterios de exclusión para IMI semejantes a los nuestros y analizan los mismos 18 STS considerados en nuestro trabajo. Ellos encuentran la misma frecuencia de microdeleciones en pacientes azoospermicos que determinamos en nuestro trabajo, pero adicionalmente ellos detectan una

frecuencia del 3.6% de microdeleciones en pacientes con oligospermia, mientras que en nuestro estudio no logramos determinar ninguna microdelección en este tipo de pacientes. En este trabajo, sólo se descartó la causa infecciosa por interrogatorio y por examen clínico, pero un análisis microbiológico tal vez hubiera limitado en forma más precisa nuestro grupo de estudio.

En cuanto a los pacientes con ABCCD, algunos estudios han calculado que el 75% de los casos tienen alteraciones en el gen RTFQ. En este trabajo se detectaron mutaciones en dicho gen en los 2 sujetos analizados. Las mutaciones encontradas han sido reportadas previamente como causa de

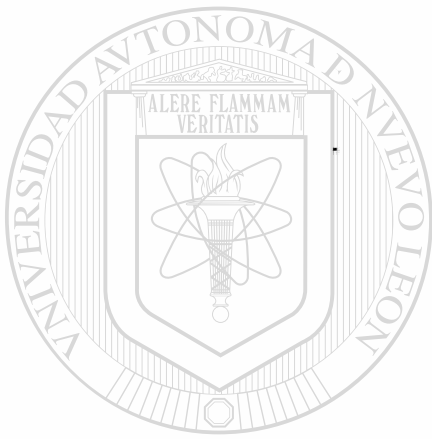
ABCCD (V232D) y FQ (L568X), lo cual corrobora el significado patológico de estas alteraciones genéticas. Es de notar que la mutación L568X sólo ha sido reportada en un paciente heterocigoto compuesto con cuadro clínico de FQ y que nunca ha sido asociada con ABCCD. El paciente reportado en este estudio también porta la mutación L568X en estado heterocigoto, pero no presenta ninguna sintomatología sistémica de FQ. Este paciente también presentó el polimorfismo 5T en el intrón 8 del gen CFTR el cual también ha sido asociado a ABCCD. Se requiere un estudio más detallado para determinar si este sujeto es heterocigoto compuesto o si las 2 alteraciones están en fase, para determinar el posible mecanismo genético responsable de la infertilidad.

Los métodos moleculares detectaron alteraciones genéticas en el 10.5% de todos los pacientes estudiados. Aunque consideramos que hay un margen de detección apreciable, aun queda un amplio porcentaje de casos sin diagnóstico. Aumentar el porcentaje de detección requerirá un conocimiento mayor de la región eucromática del cromosoma Y y la descripción de nuevas mutaciones en los diferentes genes ya ubicados en esta región. Además se requiere un conocimiento más amplio de los defectos en loci autosómicos que estén involucrados con la espermatogénesis y la función reproductiva en general.

La implementación del estudio y la utilidad demostrada tienen una clara relevancia para la práctica clínica, pero recalcamos su importancia para la selección de candidatos para el procedimiento ICSI, debido a las repercusiones

genéticas en la descendencia de los pacientes con alteraciones moleculares demostrables.

Finalmente la metodología de esta tesis queda implementada para ser trasladada al servicio de Diagnóstico Molecular para la atención de pacientes con infertilidad masculina del noreste de México.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

- Se estudiaron 50 controles fértiles con paternidad comprobada, 2 pacientes con ABCCD y 46 pacientes con infertilidad masculina idiopática.
- Se descartaron alteraciones cromosómicas en todos los pacientes.
- Los métodos moleculares detectaron alteraciones genéticas en el 10.5% de todos los pacientes estudiados.
- Se identificaron los defectos genéticos en los pacientes con ABCCD.
- Se identificaron 3 pacientes con IMI con microdeleciones en el cromosoma Y correspondientes a las zonas AZFb, c y d que corresponden al 6.52% de estos 46 pacientes estudiados.
- La implementación de este estudio y su utilidad demostrada tiene una clara relevancia y utilidad clínica, lo que permitirá la realización de un diagnóstico más certero de esta afección en nuestra población.

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFÍA

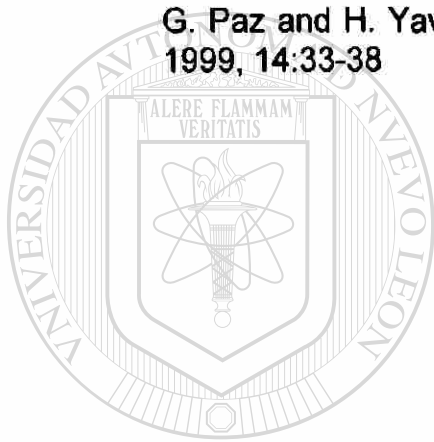
1. Trounson A, Bongso A, Fertilization and development in humans. *Curr topics Dev Biol* 1996 32:59-101
2. Guizar-Vázquez J. *Genética Clínica. 2ª Edición*. Editorial Manual Moderno. Pag 445-462 México 1994
3. Patricio P. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI): potential genetic concerns. *Hum Reprod* 1995 10: 335-368
4. American Society of human Genetics. Ad Hoc Committee on genetic Counseling. *Am J Genet* 1975 27:240-242
5. Fauser BCJM, Hsuch AJW. Genetic basis of human reproductive endocrine disorders. *Hum Reprod* 1995 10: 826-846.
6. Mark V, Jarvi KA. The genetics of male infertility. *J Urol* 1996 156: 1245-1257.
7. De kretser DM. Male infertility. *Lancet* 1997 349:787-790.
8. Silber SJ. A modern view of male infertility. *Reprod Fertil Dev* 1994 6:93-104.
9. Navarrete C, Salamanca F. Clinic, genetic and cytogenetic studies in couples attending an infertility clinic. *Ann Genet* 1985; 28(3): 183 -188.
10. Bhasin S, de Kretser DM, Baker HWG, Pathophysiology and natural history of male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 79: 1525 –1529.
11. Delhanty JDA, Harper J. Genetic diagnosis before implantation. *Br Med J* 1997 315:828-829.
12. Simpson JL. Genetic counseling and prenatal diagnosis. In Gabbe SG, Neibyl JR, Simpson JL, Eds. *Obstetrics Normal and Problem Pregnancies, 3rd end.* New York: Churchill Livingstone, 1996:215-248.

13. <http://imer.guadalajara.net/html/concepcion.html>
14. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Jois H et al. High fertilization and implantation rates intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993 8:1061-1066.
15. Testart J, Gautier E, Brami C et al. Intracytoplasmic sperm injection in infertile patients with structural chromosome abnormalities. *Hum Reprod* 1996 11:2609-2612.
16. Tesarik J, Rolet F, Brami C et al. Spermatic injection into human oocytes II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1996 11:780-783
17. Weiner Miller P, Hamosh A, Macek M et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in allergic broncho pulmonary aspergillosis. *Am J Human Genet* 1996 59:45-51.
18. Holsclaw DS, Lober B, Jockin H, Schwachman H. Genetical Abnormalities in male patients with cystic fibrosis. *J Urol* 1971 106: 568-574.
19. Dubin L, Amelar RD. Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fertil Steril* 1971 22:469-474.
20. Oates RD, Amos JA. The genetic basis of congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis. *J Androl* 1994 15:1-9.
21. Silber SJ. The use of epididymal sperm in assisted reproduction. In Tesarik J, ed. *Male Factor in Human Infertility*. Rome: Ares-Serono Symposia, 1994:335-368.
22. <http://www.ihr.com/bafertil/articles/azoosper.htm>
23. Lissens W, Liebaers I. The genetics of male infertility in relation to cystic fibrosis. *Bailliere's Clin Obstetric Gynaecol* 1997 11:797-817.
24. Jarvi K, Zielenski J, Wilschanski M et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and obstructive azoospermia. *Lancet* 1995 345:1578
25. Van der Ven K, Messer L, van der Ven H et al. Cystic fibrosis mutation screening in healthy men with reduce sperm quality. *Hum Reprod* 1996 11: 513-517.

26. Bienvenu T, Claustres M. Molecular basis of Cystic fibrosis and congenital bilateral agenesis of vas deferens. *Contracept Fertil Sex* 1996 Jun; 24 (6): 495-500
27. Gardner RJM, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. New York: Oxford University Press, 1989.
28. Welsh MJ, Tsui L-C, Boat TF, Beaudet AL. Cystic Fibrosis. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inheritance Disease*. New York: McGraw-Hill, 1995:3799-3876.
29. Zielenski J, Tsui L-C. Cystic Fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 1995 29:777-807.
30. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Population variation of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989 245:1073-1080.
31. Pignatti PF, Cystic Fibrosis. In Humphries SE, Malcolm SE. Eds. *From Genotype to Phenotype*. Oxford: BIOS Scientific Publishers 1994: 19-48.
32. Ferrari M, Cremonesi L. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients. *Ann Biol Clin* 1996 54:235-241.
33. Kerem B, Kerem E. The molecular bases for disease variability in cystic fibrosis. *Eur J Human Genet* 1996 4:65-73.
34. Kerem E, Rave-Havel N, Augarten A et al. A cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variant with partial penetrance associated with variable cystic fibrosis presentations. *Am Respir Crit Care Med* 1997 155: 1914-1920.
35. Lissens W, Mercier B, Toumaye H et al. Cystic fibrosis and infertility caused by congenital absence of the vas deferens and related clinical entities. *Hum Reprod* 1996 11(Suppl): 55-80.
36. Patrizio P, Zielenski J. Congenital absence of the vas deferens: a mild form of cystic fibrosis. *Mol Med Today* 1996 2:24-31.
37. Lissens W, Liebaers I. The genetics of male infertility in relation to cystic fibrosis. *Bailliere's Clin Obstet Gynaecol* 1997 11:797-817.
38. Jarvi K, Zielenski J, Wilschanski M et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and obstructive azoospermia. *Lancet* 1995 345:1578

39. Van der Ven K, Messer L, van der Ven H et al. Cystic fibrosis mutation screening in healthy men with reduce sperm quality. *Hum Reprod* 1996 11: 513-517.
40. Bienvenu T, Claustres M. Molecular basis of Cystic fibrosis and congenital bilateral agenesis of vas deferens. *Contracept Fertil Sex* 1996 Jun; 24 (6): 495-500
41. Krausz C, McElreavey K. Y chromosome and male infertility. *Front Biosci* 1999 Jan 15; 4:E1-8
42. Van der Ven K, Montag M, Peschka B, Leygraaf J, Schwanitz G et al. Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletions screening in males undergoing intracytoplasmatic sperm injection. *Mol Hum Reprod* 1997 Aug; 3 (8):699-704.
43. Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J et al. *Mol Reprod Dev* 1999 May;53 (1):27-41.
44. Qureshi SJ, Ross AR, Ma K, Cooke HJ et al. Polimerase chain reaction screening in Y chromosome deletions: a first step towards the diagnosis of genetically determined spermatogenic in failure in men. *Mol Hum Reprod* 1996 Oct; 2 (10):775-9
45. Vollrath D, Footh S, Hilton A et al. The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletings. *Science* 1992 258: 52.59.
46. Stuppia L, Mastroprimiano G, Calabrese G, Peila R, Tenaglia R, Palka G. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome detected by STS-PCR in 6 of 33 patients with idiopathic oligo- or azoospermia. *Cytogenet Cell Genet* 1996;72 (2-3):155-8.
47. Meschede D, De geyter C, Nieschlag E, Horst J. Genetic risk in micromanipulative assisted reproduction. *Hum Reprod* 1995 10:2880-2886.
48. Pryor JI, Kent-First M, Mualiem A et al. Microdetions in the Y-chromosome of infertile men. *N Engl J Med* 1997 336:534-539
49. De Braekeleer M, Fércé C. Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens: *Hum Mol Genet* 1996 5:2013-2017.
50. Villalobos Torres C. Frecuencias alélicas de 3 marcadores genéticos polimórficos en una muestra de la población del noreste de México. Tesis de maestría Facultad de Medicina, UANL México 1999

51. Boerwinkle E, Xiong W, Fourest E y Chan L. Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: Application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86:212-216
52. Kasai K, Nakamura Y and White R. Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science. *Journal of Forensic Sciences* 1990 35(5): 1196-1200
53. Seifer, S. Amat, P. Delgado, D. Boucher and Y.J. Bignon; Screening for microdeletions on the long arm of chromosome Y in 53 infertile men; *International journal of Andrology* 1999, 22:148-154
54. S.E. Kleiman, L. Yogev, R Gamzu, R. Hauser, A. Botchan, J.B. Lessing, G. Paz and H. Yavetz. Genetic evaluation of infertile men. *Hum Reprod* 1999, 14:33-38



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Itzel Evelyn Calleja Macias

Candidato para el Grado de

**Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería
Genética.**

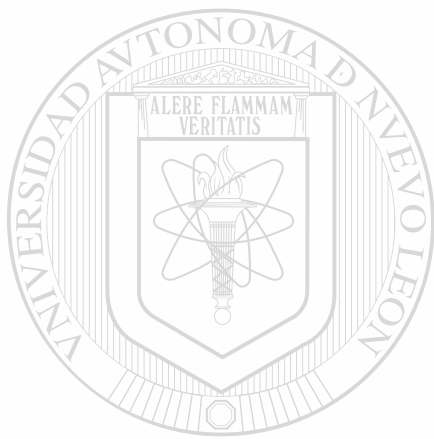
**Tesis: DETERMINACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS EN INFERTILIDAD
MASCULINA IDIOPÁTICA.**

Campo de estudio: Diagnóstico Molecular

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Biografía: Nacida en Xalapa, Veracruz el 14 de Diciembre de 1974, hija de
Laura Macias Hernández y Ricardo Calleja Arroyo.**

**Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad
Veracruzana, en Xalapa, Veracruz. Grado obtenido: Licenciatura en
Químico Farmacéutico Biólogo en 1998.**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



