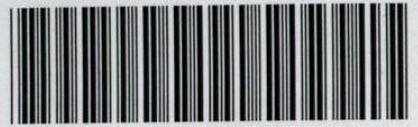


20

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

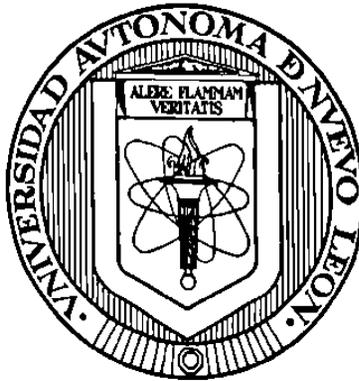
TM
RC889
.C3
c.1



1080095021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



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

POR:

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

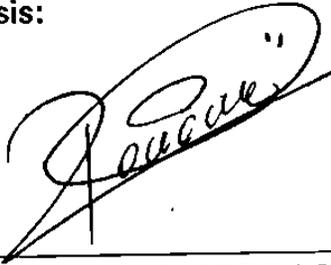
TM
RC889
.C3



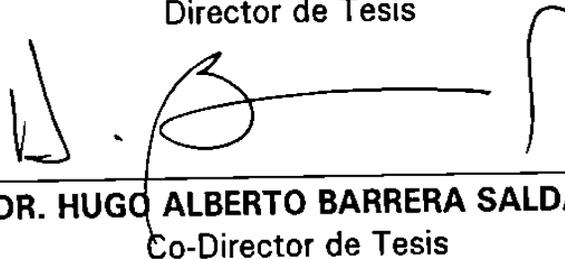
El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Rocío Ortiz López y co-dirección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

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

Aprobación de la Tesis:



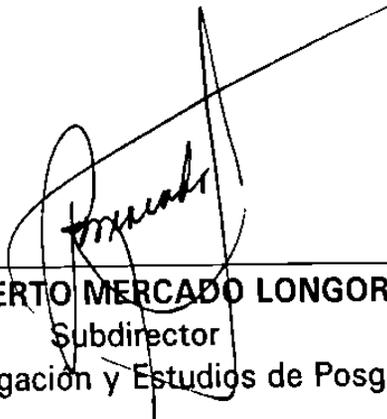
DRA. ROCIO ORTIZ LOPEZ
Director de Tesis



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



DR. LAURO SALVADOR GOMEZ GUERRA
Co-Director de Tesis



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 los 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	23
IV.-MATERIAL Y MÉTODOS	26
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 Microdeleciones 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

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
RNAm	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

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

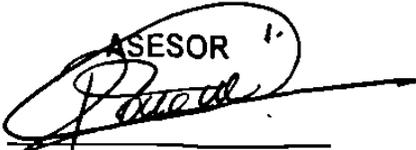
Área de estudio: Diagnóstico Molecular

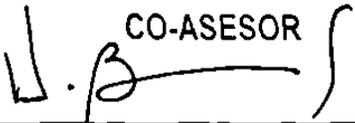
Propósito y Método de estudio: La identificación de las causas genéticas de la infertilidad masculina tiene mucha relevancia, si se considera que ésta es responsable de un 30-50% de los problemas de procreación en las parejas. Es por ello que el conocer cuales son los factores genéticos implicados en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

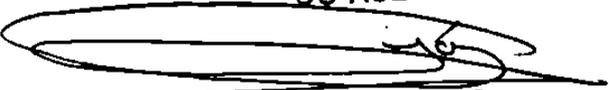
En este trabajo se analizaron 50 varones (grupo control) cuya fertilidad fue validada con pruebas de genotipificación (marcadores Apo B y D1S80) y 48 hombres infértiles (pacientes) divididos en 3 grupos: azoospermicos no obstructivos (N=30), oligozoospermicos (N=16) y con ABCCD (N=2). A partir de sangre 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