

## **CAPITULO 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).

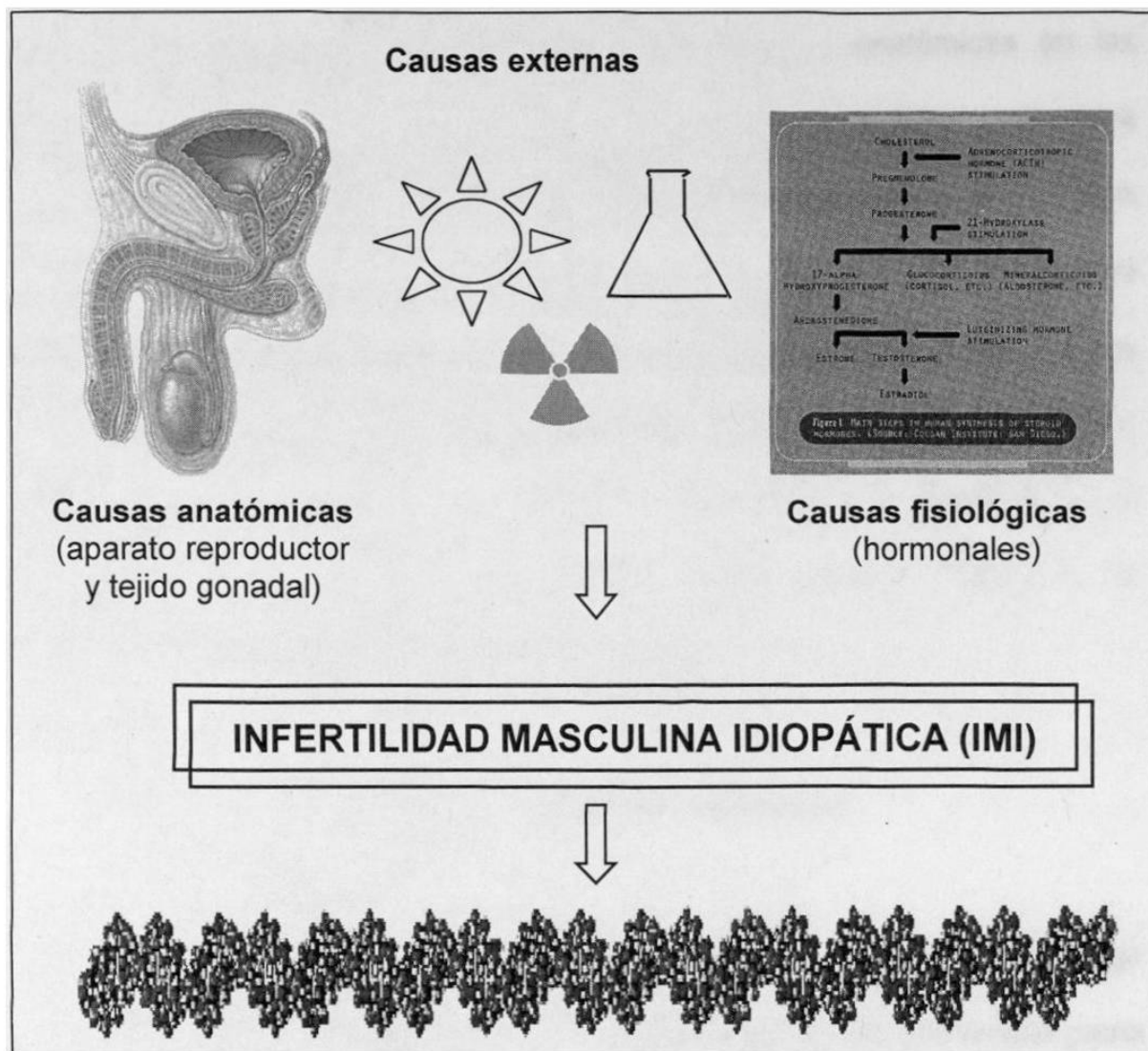
### **1.1.2 Infertilidad en la pareja**

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.



**Figura 1. Representación esquemática de las diferentes causas de infertilidad masculina idiopática.** Entre los principales factores a descartar se encuentran las causas anatómicas (aparato reproductor), causas fisiológicas (hormonales), causas infecciosas, exposición al calor, solventes químicos y radiación, entre otros.

Además de estas causas enumeradas, pueden haber problemas relacionados con el coito, debido a insuficiencia eyaculatoria o a impotencia (8). Las investigaciones modernas también han revelado que un número sorprendentemente alto de parejas sufren de esterilidad inmunológica, que consiste en el rechazo del esperma masculino por la mujer (9). Finalmente, existe también aquella infertilidad que aun después de haber descartado las

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 esperma (ICSI).

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

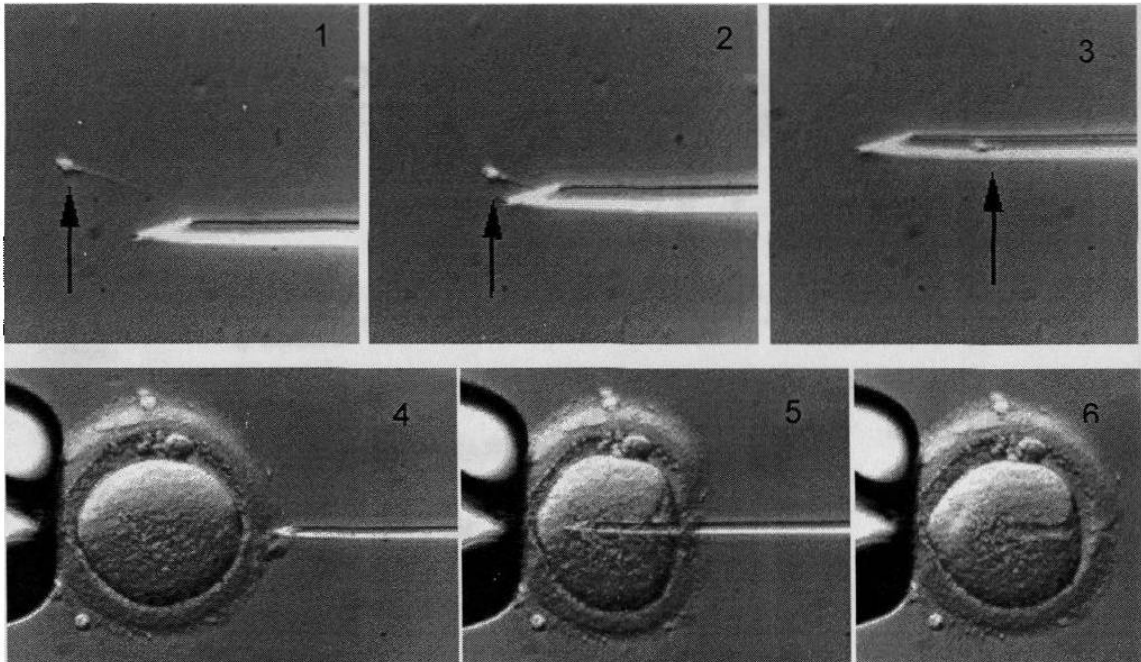
En la concepción normal, una sola eyaculación de semen puede contener más de 200 millones de espermatozoides viables, sin embargo solo algunos cientos de ellos llegarán al óvulo liberado en la trompa de Falopio y tendrán oportunidad de fertilizarlo (13). Antes se pensaba que era imposible tratar a los 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.



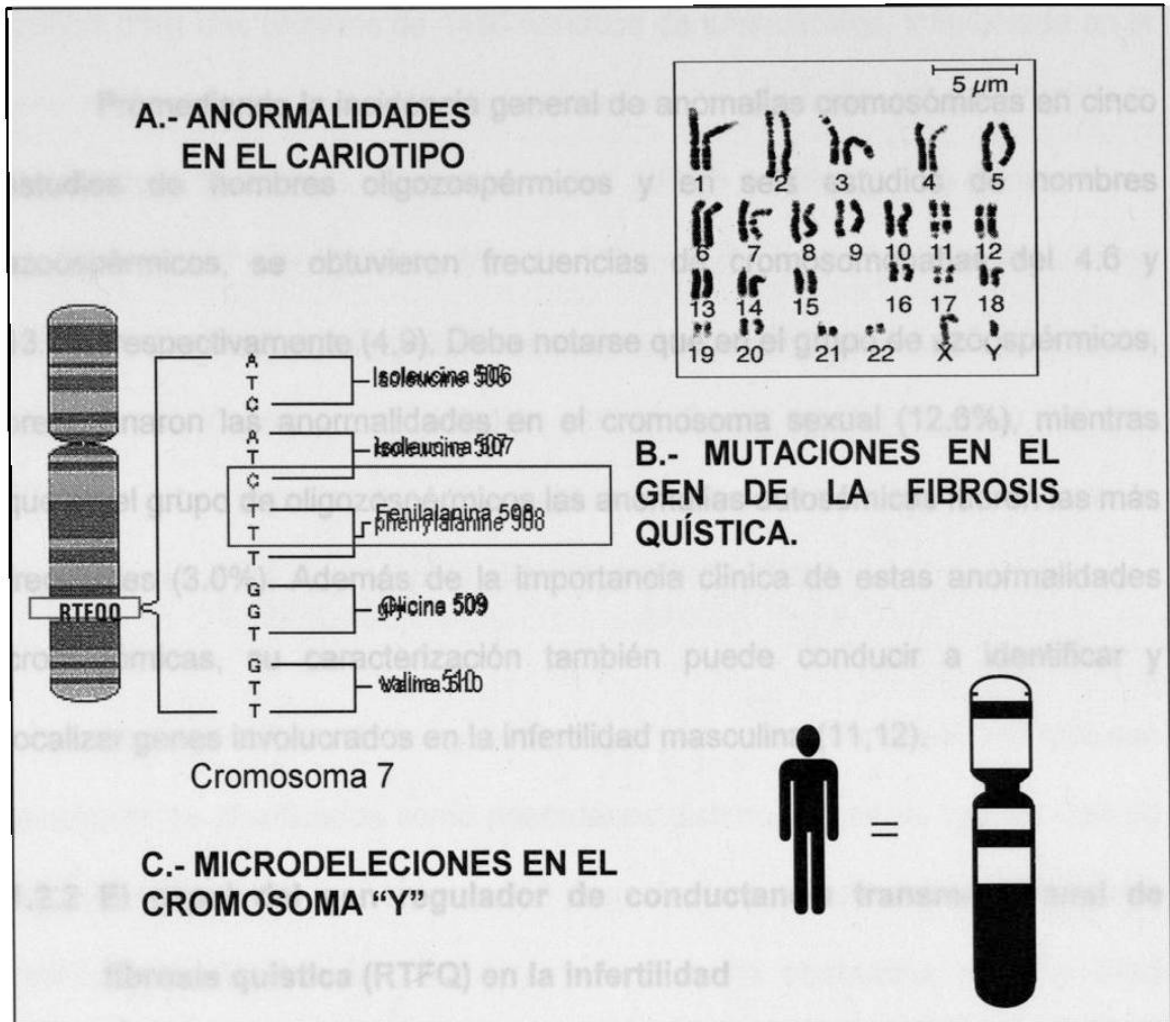


Figura 3. Principales factores estudiados en la infertilidad masculina. Dentro de estos factores se encuentran A) Microdeleciones en el cromosoma Y, las cuales llevan a un debilitamiento espermatogénico, B) Mutaciones en el gen RTFQ que llevan al padecimiento conocido como ABCCD y C) Anormalidades en 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 azoospermicos, se obtuvieron frecuencias de cromosomopatías del 4.6 y 13.7%, respectivamente (4,9). Debe notarse que en el grupo de azoospermicos, 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).

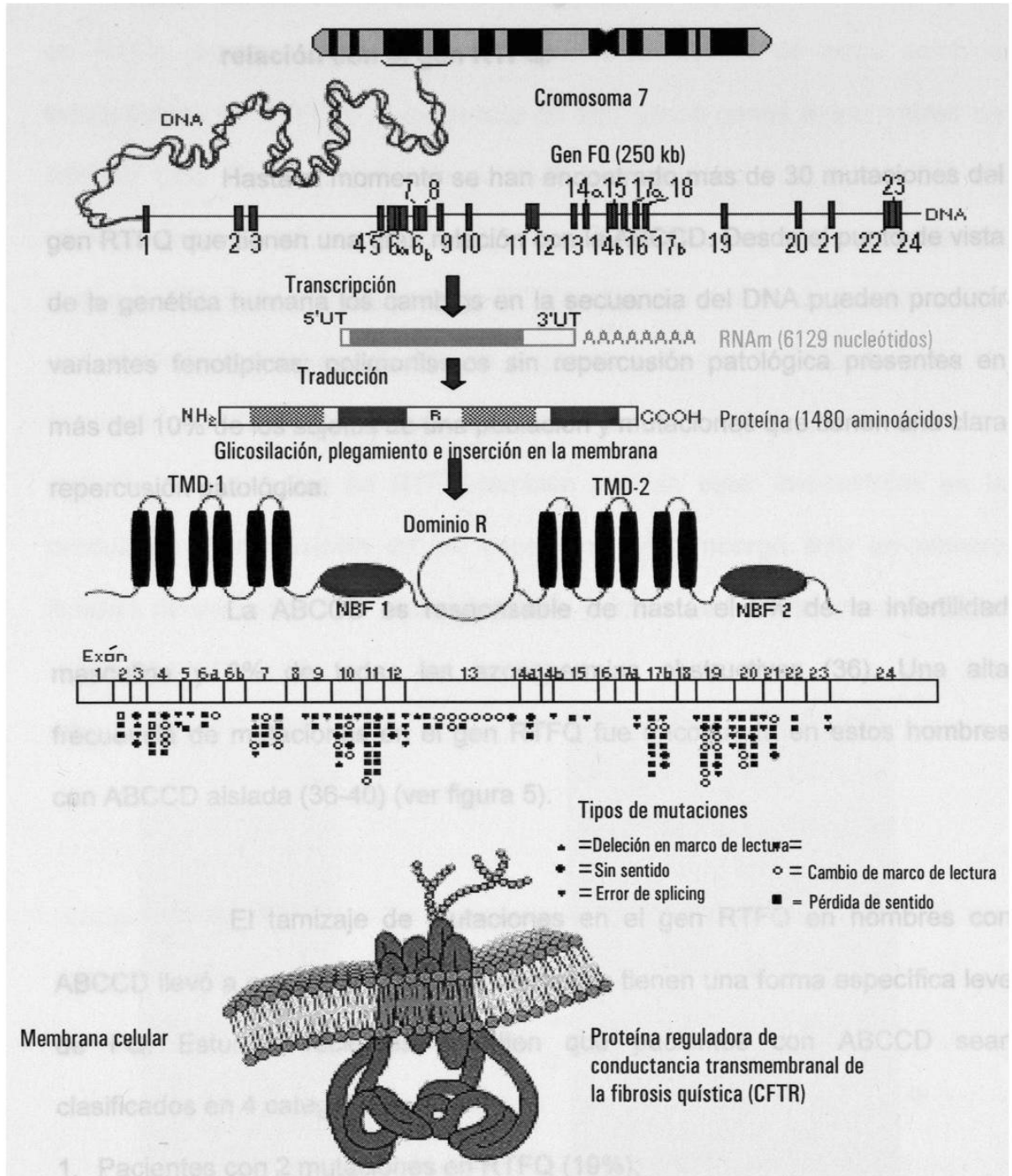
### **1.2.2 El papel del gen regulador de conductancia transmembranal de fibrosis quística (RTFQ) en la infertilidad**

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.**

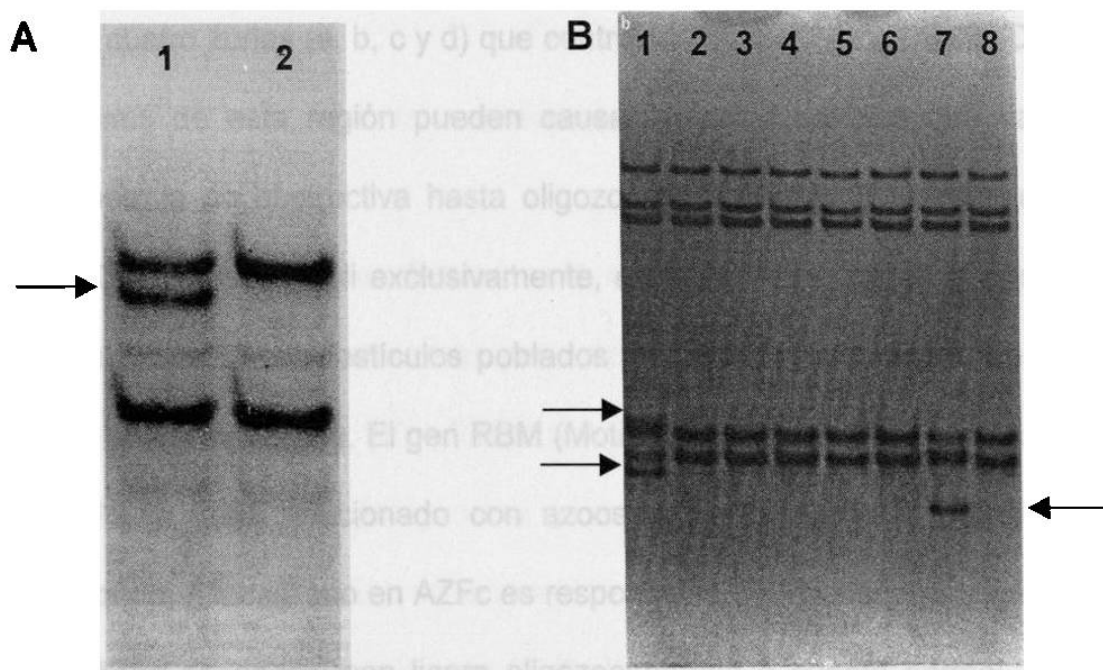
Hasta el momento se han encontrado más de 30 mutaciones del gen RTFQ que tienen una gran relación con la ABCCD. Desde el punto de vista de la genética humana los cambios en la secuencia del DNA pueden producir variantes fenotípicas: polimorfismos sin repercusión patológica presentes en más del 10% de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

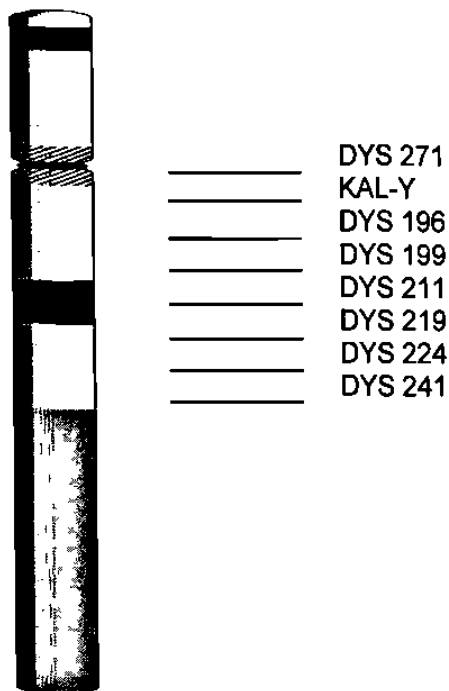
Se han realizado varios intentos por dilucidar esta correlación. Grosch y cols en el 1999, en el Departamento de Ginecología y Obstetricia de la Universidad de Wisconsin (43), analizaron una serie de 136 marcadores genéticos localizados a lo largo de la región AZF en 278 pacientes con IMI. En el 30% 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".

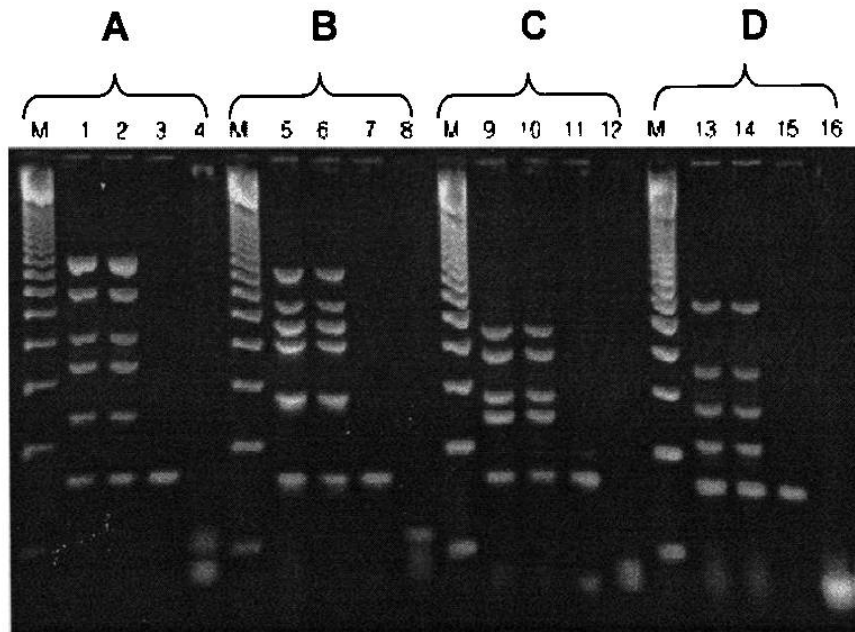




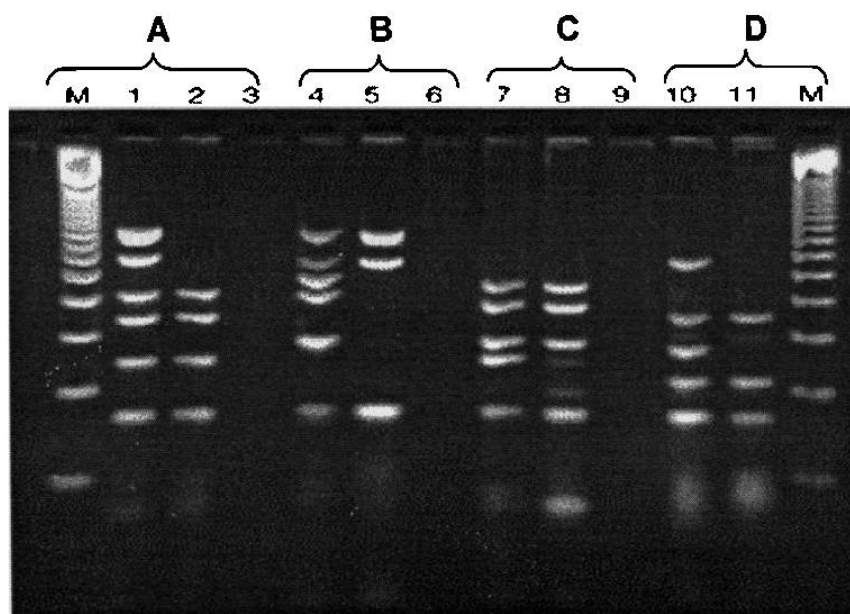
**Figura 6.** Mapa de los STS a lo largo del cromosoma Y indicando su posición. El estuche comercial distribuido por la compañía Promega, permite la amplificación de regiones que flanquean AZFa, y cubren AZFb, AZFc, AZFd incluyendo DAZ, Kal-Y, SMCY y loci que flanquean otros genes claves relacionados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

## **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**

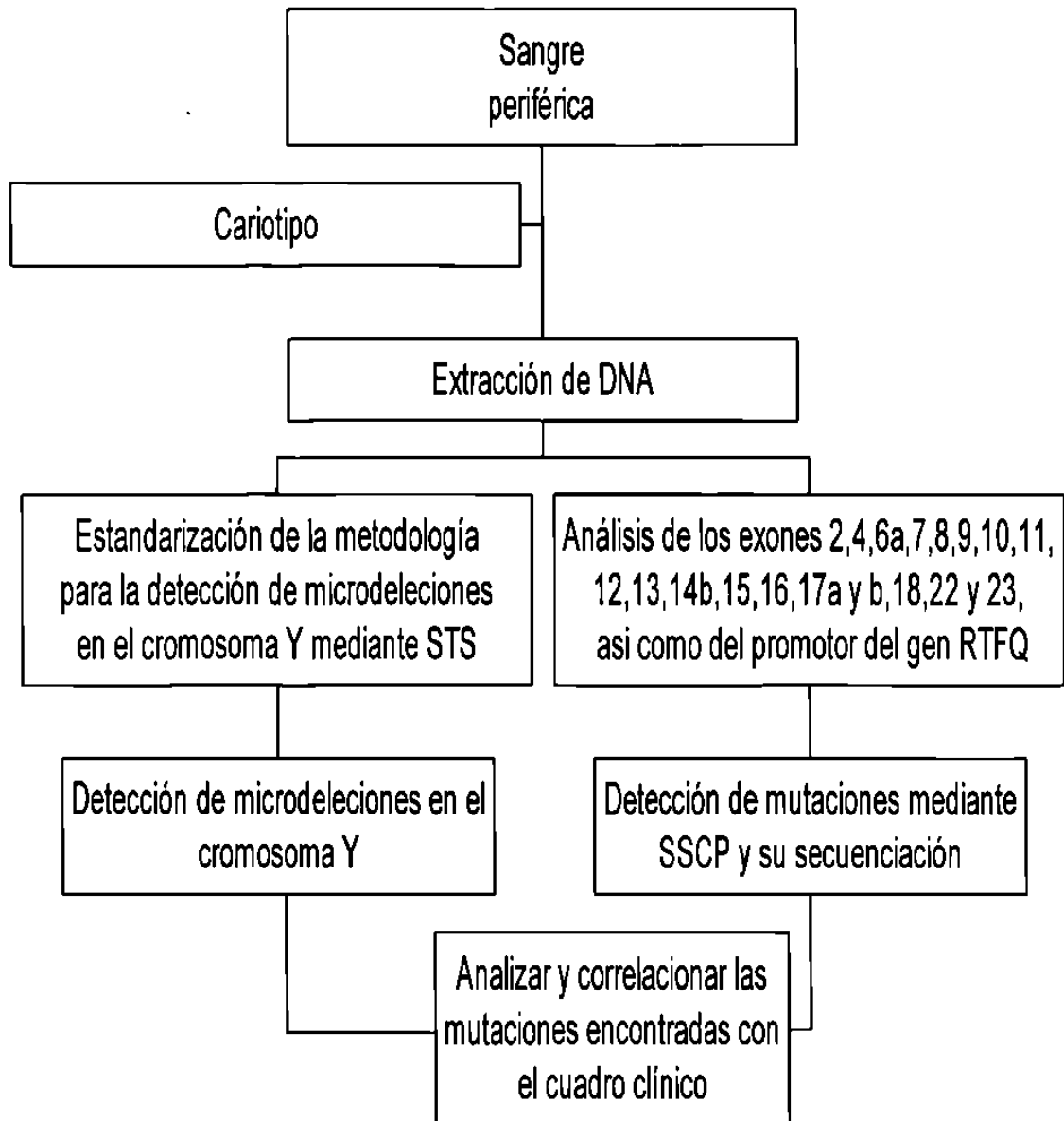
### **ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

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<sup>a</sup>, 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  $\mu$ l fueron obtenidos de Rainin Instruments (Woburn, MA, EUA).

**4.1.5 Equipo:** En el aislamiento de DNA se utilizó una centrífuga 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'- atggaaacggagaaattatg -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 ( $\mu$ l)	Concentración final
Buffer DNA pol Taq 10X	2.5	1X
Primer sentido 10 $\mu$ M	2.5	1 $\mu$ M
Primer antisentido 10 $\mu$ M	2.5	1 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1.5	1.5mM
dNTPs 10mM	0.5	0.2mM
Bio taq 5U/ $\mu$ l	.3	0.06U/ $\mu$ l
DNA 50 ng/ $\mu$ 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  $\mu$ l del producto amplificado mas 1  $\mu$ 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'- gaaactggcctccaaacactgccc -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 ( $\mu\text{l}$ )	Concentración final
Buffer DNA pol Taq 10X	2.5	1X
Primer sentido 10 $\mu\text{M}$	2.5	1 $\mu\text{M}$
Primer antisentido 10 $\mu\text{M}$	2.5	1 $\mu\text{M}$
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1.5	1.5 mM
dNTPs 10mM	0.5	0.2mM
DNA pol taq 5U/ $\mu\text{l}$	03	0.06U/ $\mu\text{l}$
DNA 50 ng/ $\mu\text{l}$	2	4 ng/ $\mu\text{l}$
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 esta 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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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"**

<b>Amplicón</b>	<b>Región de RTFQ</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Mutaciones</b>
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  $\mu\text{l}$  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 ( $\mu\text{l}$ )
Maxter mix	25
Buffer de dilución de DNA 1X	11.5
MgCl <sub>2</sub> 25mM	12.5
DNA pol taq 5U/ $\mu\text{l}$	0.3
DNA 100 ng/ $\mu\text{l}$	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  $\mu$ l de solución desnaturizante 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  $\mu$ l de la mezcla del producto amplificado en la solución desnaturizante. 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.



**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	GAATATCTGTTCCCTCCTCTTTAT	53°C
	Ex2F	GAATTTCTCTCTTCAACTAAACAAT	
Exón 3	Ex3R	CAACTTATTGGTCCCACCTTTT	53°C
	Ex3F	CATAATGAATGTACAAATGAGATCC	
Exón 4	Ex4R	GAAATTTAATTTCTCTGTTTTTCCC	55°C
	Ex4F	TACGATACAGAATATATGTGCCATG	
Exón 5	Ex5R	GTTGAAATTAATCTAACTTTCCATTTTT	53°C
	Ex5F	CAATAGTGCCTAAAAGATTAATCAAT	
Exón 6a	Ex6aR	CAATGACACCTGTTTTTGCTG	55°C
	Ex6aF	GGGCTTTTTGAAAACATAATTTTTA	
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	CTATTGAAAATATCTGACAACTCAT	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	GGTGAAGGTCTCAGTTAGG	
Exon13B	Ex13bR	CCAATTTAGTCCAGAAAGAAG	55°C
	Ex13bF	GGACAGCCTACTCTCTAAAG	
Exón13C	Ex13cR	GAAGAGGATTCTGATGAGCC	55°C
	Ex13cF	CACTTTTCGTGTGGATGCTG	
Exón13D	Ex13dR	CAGAACATTCACCGAAAGAC	55°C
	Ex13dF	GCATTCTGTGGGTGAAATA	
Exón 14b	Ex14bR	GGGAGGAATAGGTGAAGATG	53°C
	Ex14bF	GATTACAATACATACAAACATAG	
Exón 15	Ex15R	ACGATTTCCATTTGCTTTAC	55°C
	Ex15F	GCAGTTTCATTTCTTAGACC	
Exón 16	Ex16R	GTCATCTTGATATTATAGG	52°C
	Ex16F	CGGTACTTATTTTACATAC	
Exón 17 <sup>a</sup>	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	TGATTCTGTTCCCACTGTGC	
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 MgCl<sub>2</sub>, 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 <sub>2</sub> 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  $\mu$ 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 $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l de TE para tener un volumen de aproximadamente 100  $\mu$ l. Se adicionaron 100  $\mu$ l de fenol y se

agitó por espacio de unos 30 segundos. Se agregaron 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se eliminó el etanol centrifugando a 14000 r.p.m. durante 10 min. Se lavó con 100  $\mu$ l de etanol al 70%, se secó la pastilla y se resuspendió en 10  $\mu$ l de TE. Una vez concluida cualquiera de las 2 técnicas, se verificó el DNA en un gel de agarosa el 2% poniendo 1  $\mu$ l del DNA y 1  $\mu$ 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/ $\mu$ l) con

la ayuda del Gel Doc, para que la concentración final de cada muestra estuviera a 30 ng en 2.5  $\mu$ 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 ésto, 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.**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad en <math>\mu</math>l</b>
DNA 10ng/ $\mu$ 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 µl del producto amplificado mas 2 µl 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.



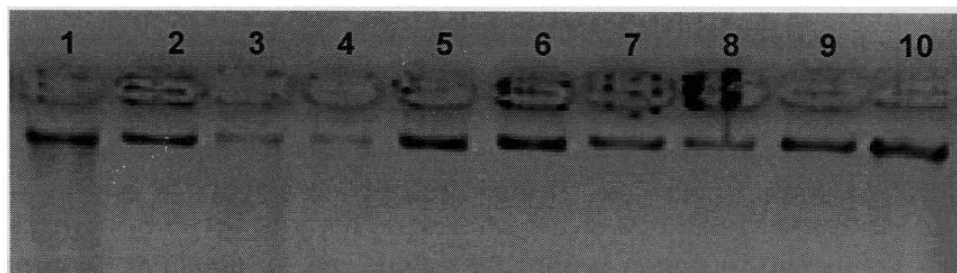
**4.2.9.3 Análisis de los patrones electroforéticos.** Para analizar los geles se generaron imágenes digitalizadas con el equipo gel Doc 1000 y el programa computacional Molecular Analyst. La delección se observó por la presencia o ausencia de cada banda.

## **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).

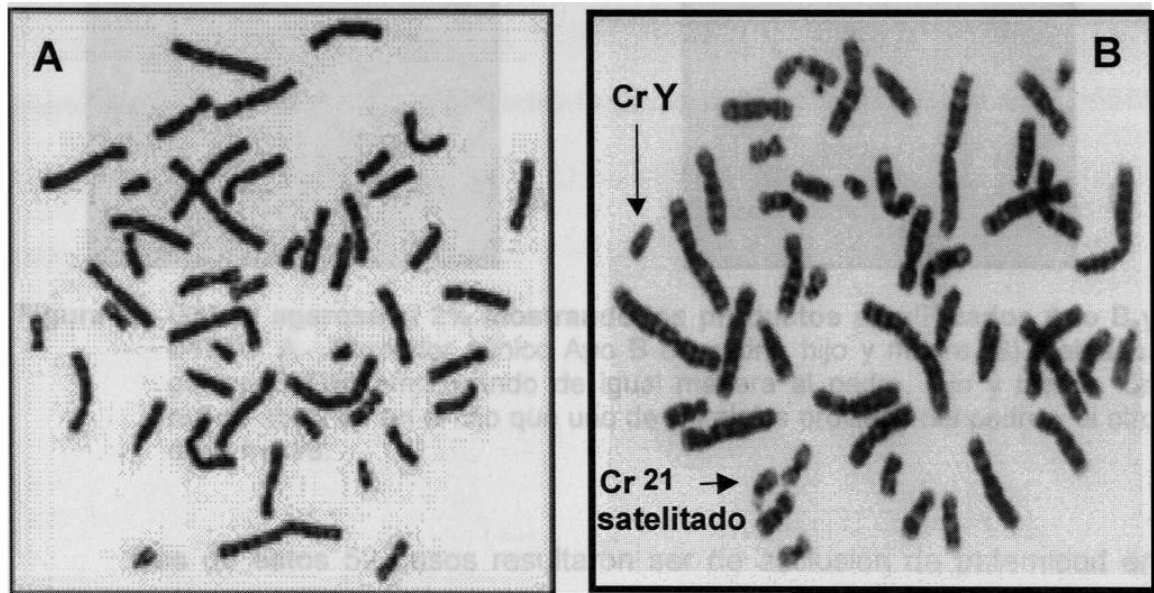


**Figura 10. DNA genómico en gel de Agarosa al .8%. Los carriles 1 al 10 muestran DNAs que corresponden a diferentes pacientes.**

#### **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).