

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).

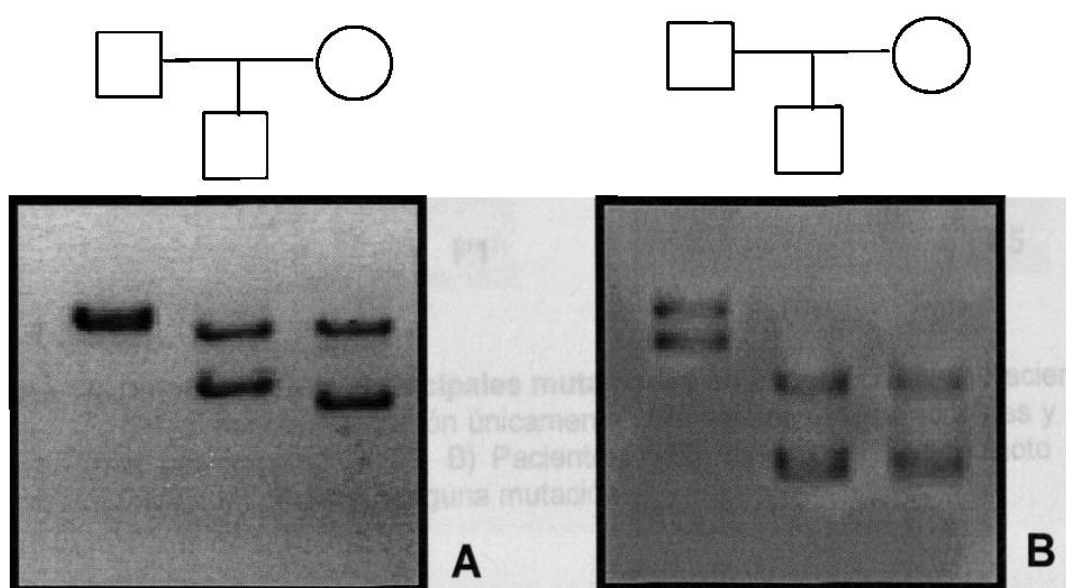


Figura 13. Exclusión para pruebas de paternidad con los marcadores Apo B y D1S80. A) Amplificación con el marcador Apo B, B) Amplificación con el marcador D1S80. En ambas amplificaciones se puede observar que ninguno de los alelos del hijo proviene de este supuesto padre.

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).

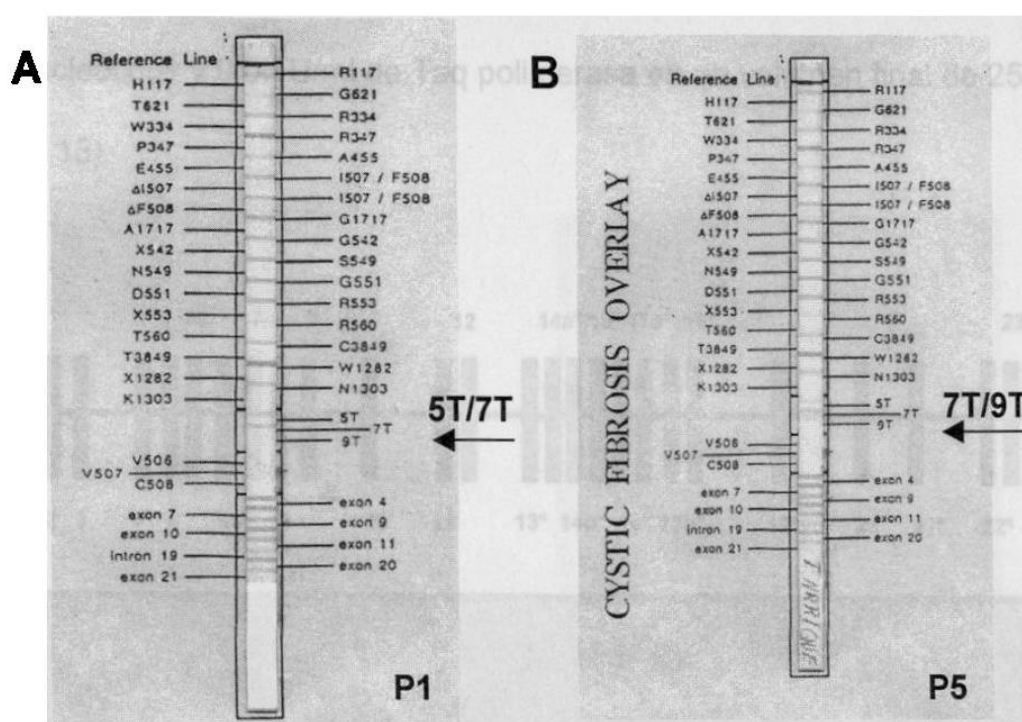


Figura 14. Detección de las principales mutaciones en el gen RTFQ. A) Paciente 1 (P1) presenta hibridación únicamente para las secuencias normales y para el polimorfismo 5T/7T, B) Paciente 5 (P5) resultó ser heterocigoto para 7T/9T, no presentó ninguna mutación.

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).

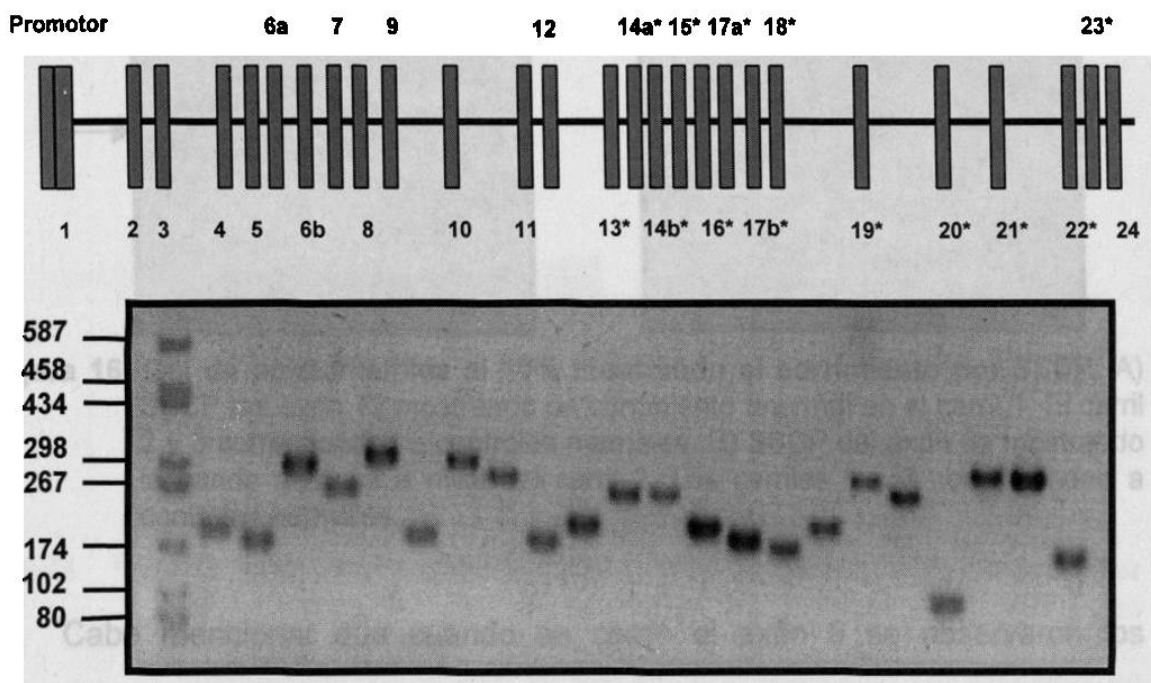


Figura 15. Amplificación de las regiones analizadas del gen RTFQ, implicados en el padecimiento ABCCD. Gel de agarosa al 2% mostrando los 19 productos de PCR analizados en este trabajo. Los tamaños de los productos variaban de 100 a 320 pb.

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).

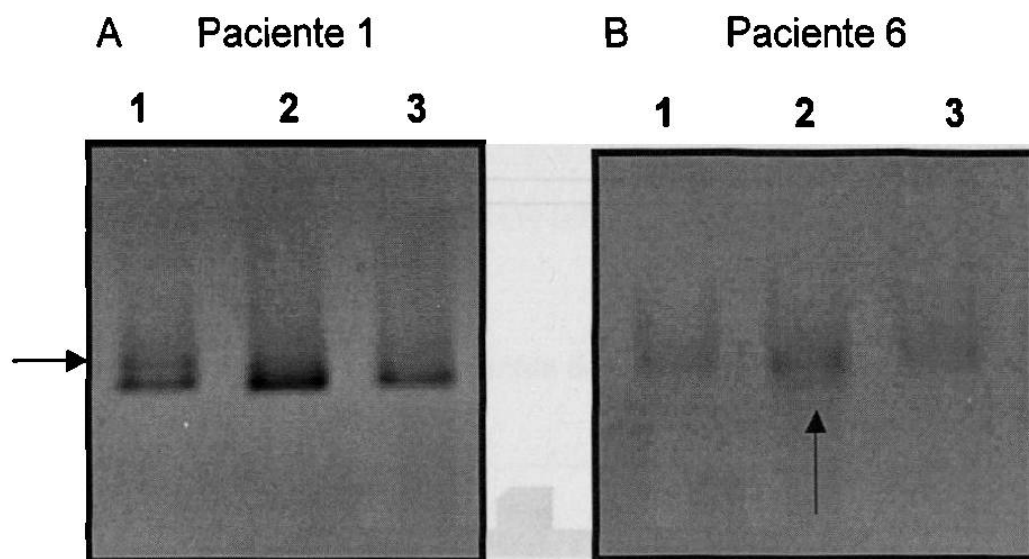


Figura 16. Gel de poliacrilamida al 10% mostrando el corrimiento por SSCP. A) SSCP del exón 12 mostrando un corrimiento anormal en el carril 1. El carril 2 y 3 corresponden a controles normales. B) SSCP del exón 6a mostrando la banda anormal a nivel del carril 2. Los carriles 1 y 3 corresponden a controles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

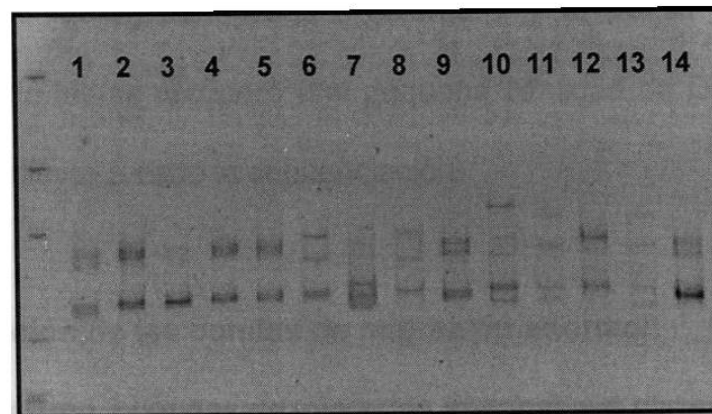


Figura 17. Polimorfismos del exón 9 en el gen RTFQ. Los carriles 1 al 14 corresponden a controles. Los carriles 2,4 y 5 tienen el polimorfismo 9T, los carriles 6 y 8 el 5T/7T, el carril 7 el 7T/9T y todos los demás son desconocidos.

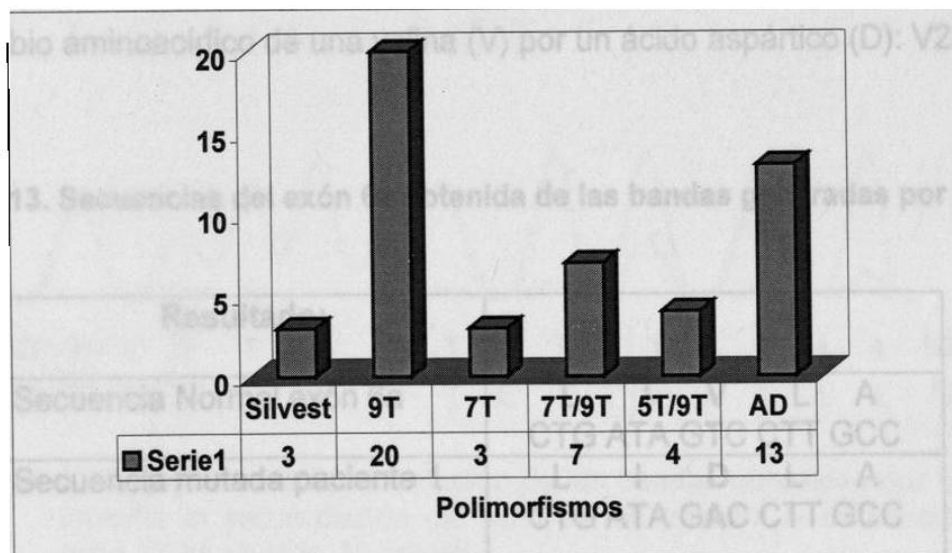


Figura 18. Representación esquemática del número de polimorfismos encontrados en los 50 controles estudiados. Solamente tres controles tenían la forma silvestre, veinte se encontraban con el polimorfismo 9T, el cual parece ser el polimorfismo predominante en esta población. Trece de estos alelos quedaron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

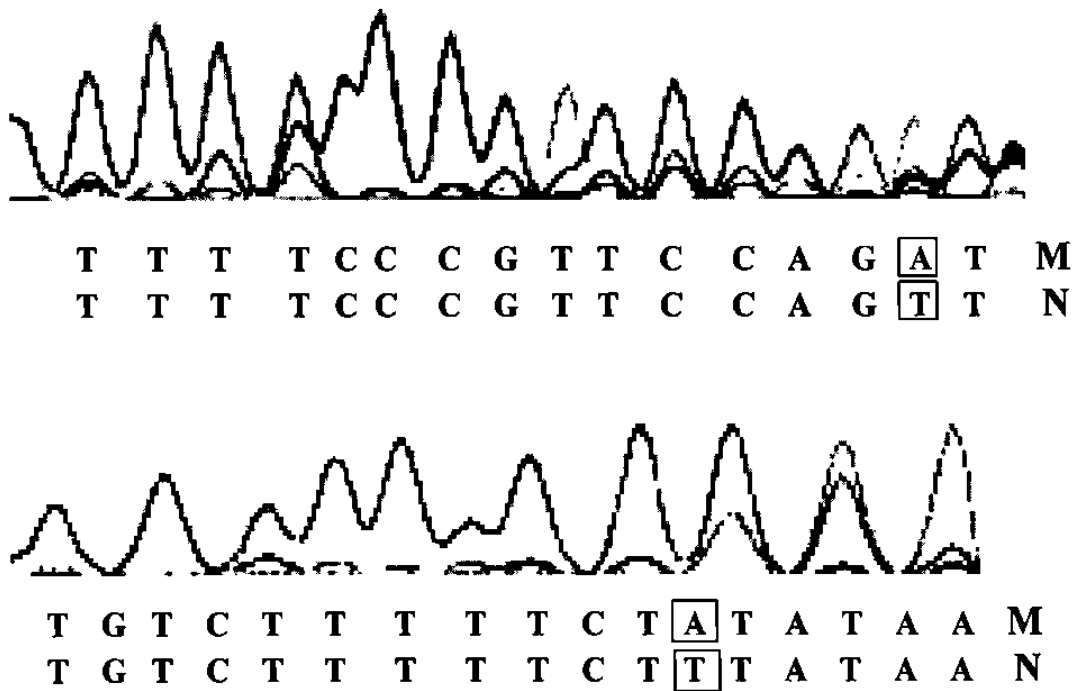


Figura 19. Resultados de la secuenciación de las bandas obtenidas por SSCP. A) muestra la secuenciación del exón 6a, B) muestra la secuenciación del exón 12. M: mutado, N: normal.

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.

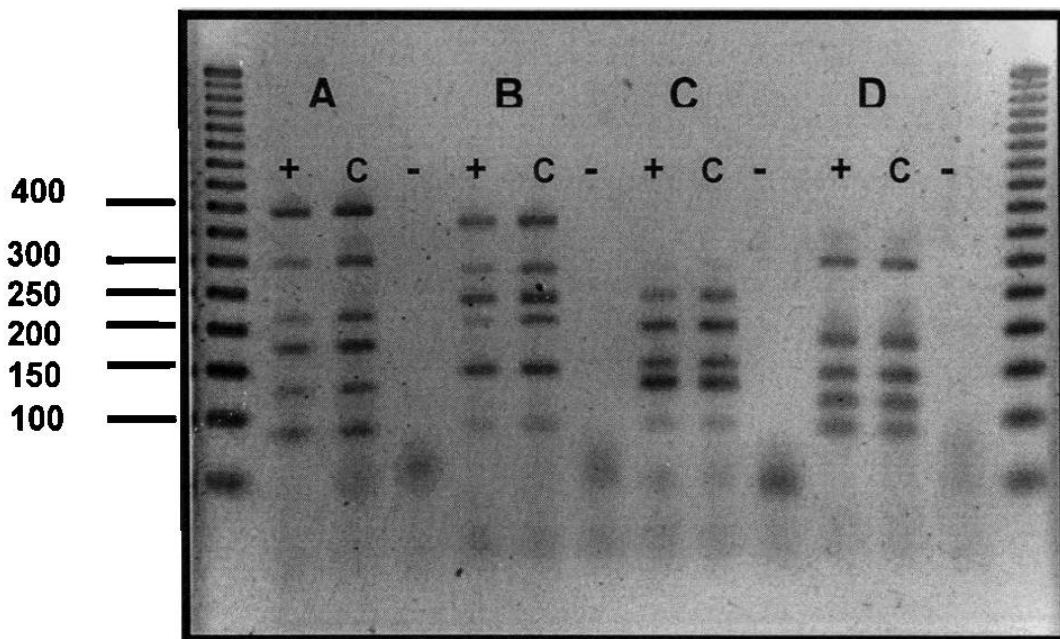


Figura 20. Prueba del estuche para detectar microdeleciones del cromosoma Y en un control fértil. Se pueden observar los diferentes STSs amplificados a lo largo del brazo largo del cromosoma Y, en un control fértil (C) comparado con el positivo del estuche comercial (+) donde tampoco hay microdelección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

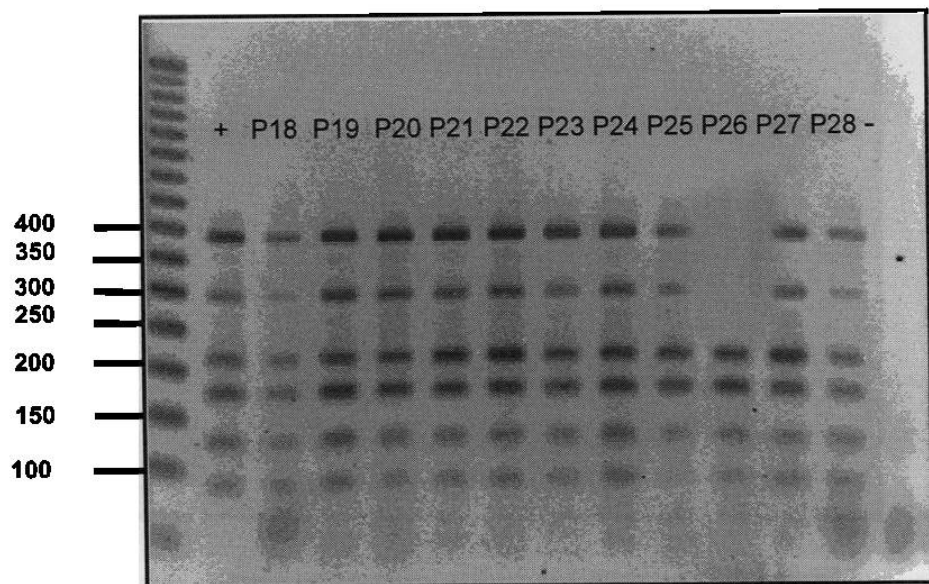


Figura 21. Observación de un paciente con microdeleciones en la zona AZFb. Los símbolos + y - representan los controles positivos y negativos para la reacción respectivamente. Los carriles P18 – P28 representan los pacientes estudiados. En el carril P28 se puede observar al paciente con dos STSs deletados.

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.

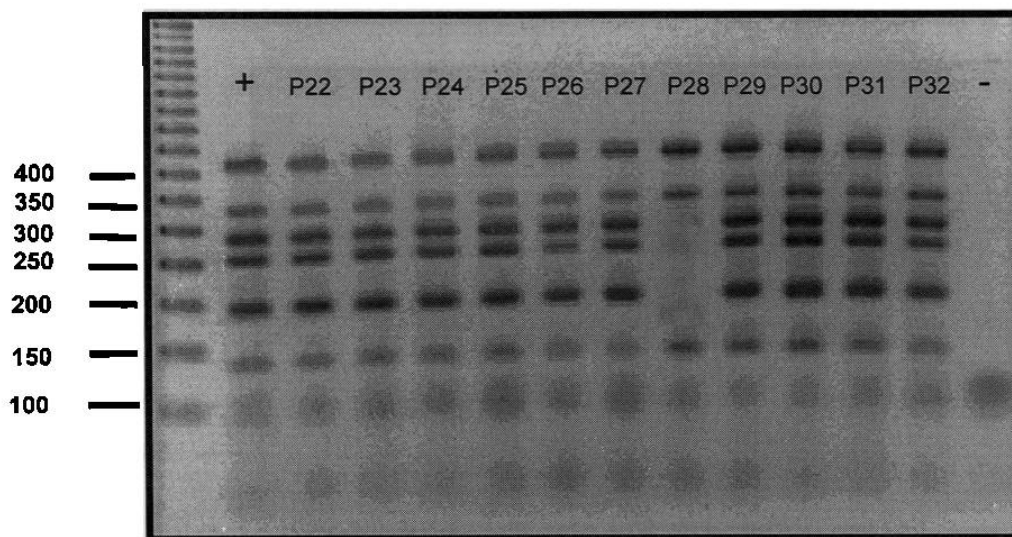


Figura 22. Detección de un paciente con microdeleciones en 3 STSs. Con el símbolo de + y - esta representado el control positivo y el control negativo, respectivamente, para la reacción. Con las siglas P22 al P32 están representados los diferentes pacientes analizados. El P28 presentó 3 microdeleciones

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.

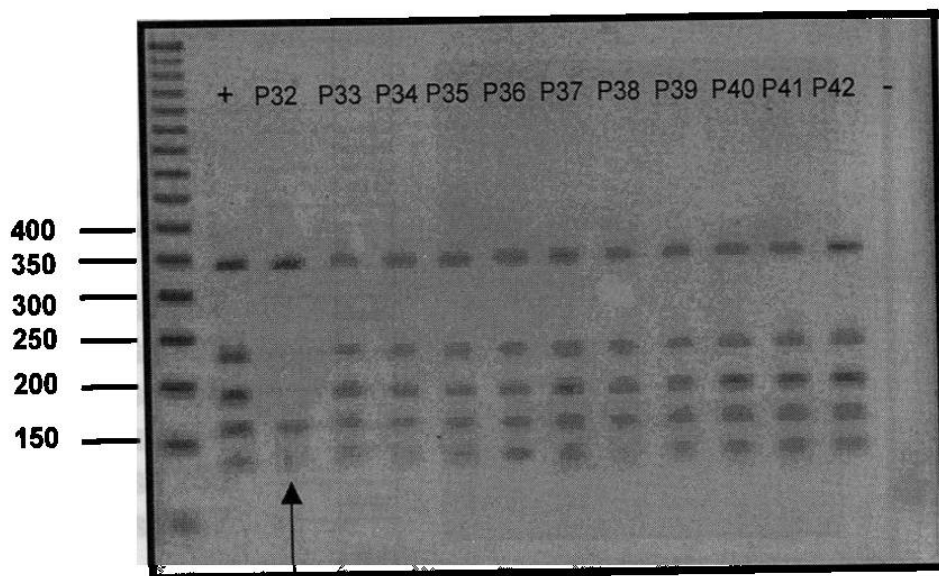


Figura 23. Gel de agarosa al 2% mostrando la delección de 2 STSs. Los carriles P32 al P42 representan a los pacientes estudiados. El símbolo + es el control positivo para esta reacción y el símbolo - es el control negativo. En el carril P32 se encuentra el paciente con la delección.

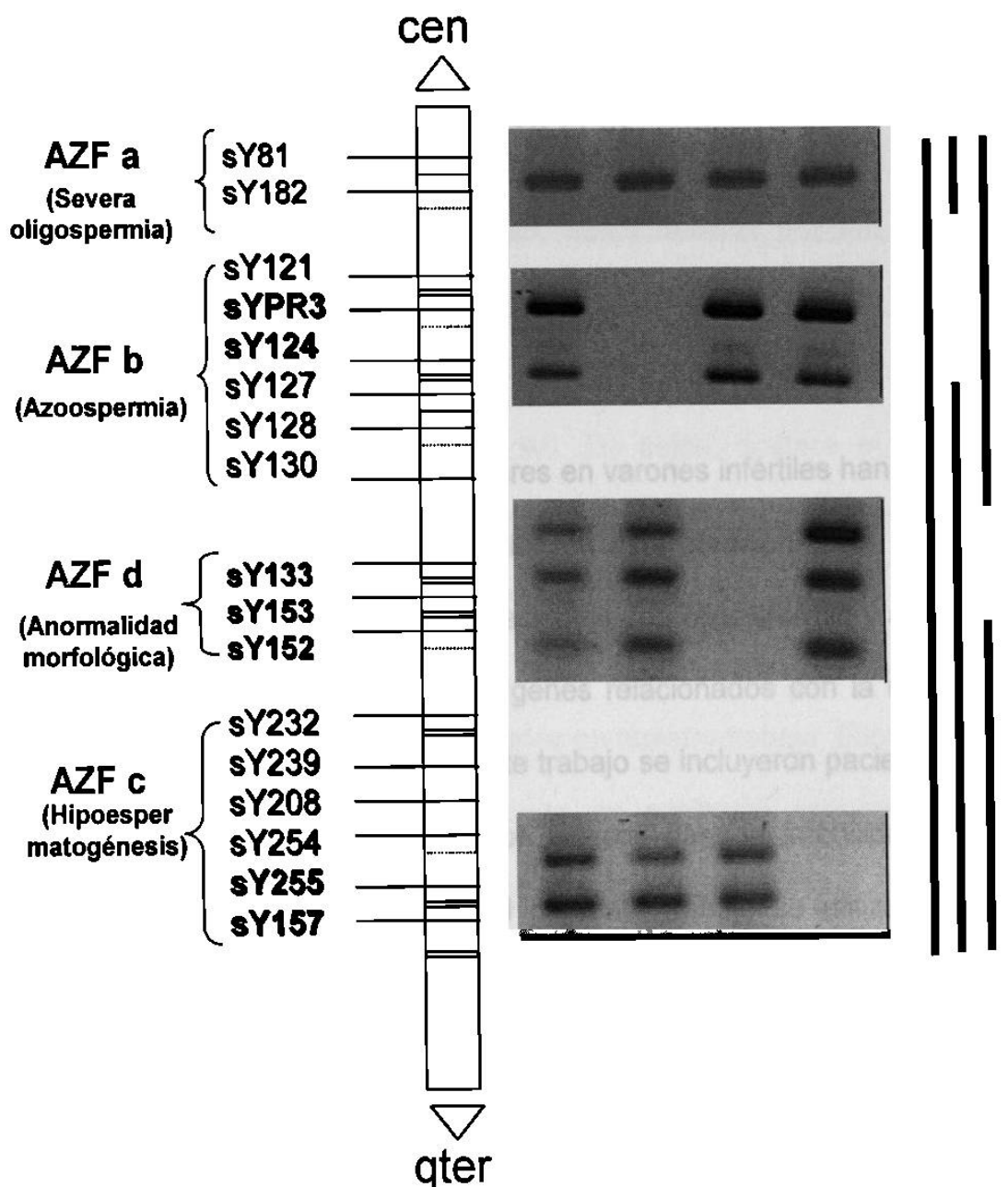


Figura 24. Mapa representativo de los diferentes pacientes y su correspondientes STSs deletados. Se puede observar las bandas faltantes en los geles que representan a los STSs deletados. A la izquierda se encuentra un mapa de las zonas AZFa, b, c y d y la posición de los STSs analizados en este trabajo. 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.

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, Tournaye 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, Mastropimiano 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

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

**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.**

