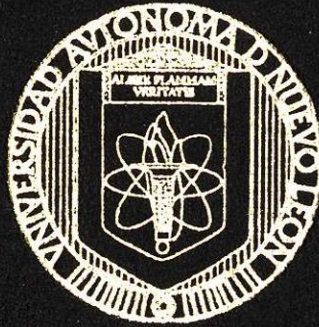


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



ESTANDARIZACIÓN DE UNA PRUEBA DE
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE
MICRODELECCIONES EN EL INTERVALO 6 DEL
CROMOSOMA "Y" EN VARONES INFERTILES.

TESIS
QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO DE
BIOLOGO

PRESENTA:

ABRAHAM MANUEL CASTRO PÉREZ

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.
DICIEMBRE DEL 2001

TL

RC889

.C37

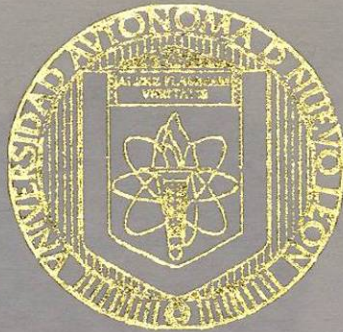
2001

c.1



1080117240

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



ESTANDARIZACION DE UNA PRUEBA DE
REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA
PARA LA DETECCION MOLECULAR DE
MICRODELECCIONES EN EL INTERVALO 6 DEL
CROMOSOMA "Y" EN VARONES INFERTILES.

TESIS
QUE EN OPCION AL TITULO DE
BIOLOGO

PRESENTA:

ABRAHAM MANUEL CASTRO PEREZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.
DICIEMBRE DEL 2001



F72

RC889

.C37

2001



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA



**ESTANDARIZACIÓN DE UNA PRUEBA DE REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA DETECCIÓN
MOLECULAR DE MICRODELECCIONES EN EL INTERVALO 6 DEL
CROMOSOMA "Y" EN VARONES INFÉRTILES.**

TESIS

**Que en opción al título de
BIÓLOGO**

PRESENTA

Abraham Manuel Castro Pérez

**San Nicolás de los Garza N. L.
Diciembre 2001**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
LABORATORIO DE INMUNOLOGIA Y VIROLOGIA**

TESIS

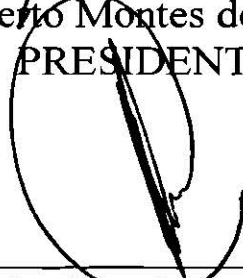
Que en opción al título de
Biólogo

PRESENTA
Abraham Manuel Castro Pérez

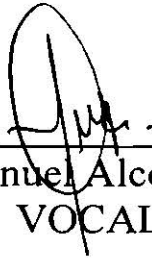
COMISION DE TESIS



Dr. Roberto Montes de Oca Luna
PRESIDENTE



M.C. Carlos Humberto Leal Garza
SECRETARIO



Dr. Juan Manuel Alcocer González
VOCAL



Dra. Lydia Rivera Morales
SUPLENTE

AREA DE TRABAJO

La realización del presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Roberto Montes de Oca Luna.

DEDICATORIA

A Dios:

Que nos da la oportunidad de tener dos manos y una cabeza para poder realizar todas las cosas que uno se propone.

A mis padres:

Inés Manuel y Ma. Esthela que siempre me dieron su apoyo en todas las decisiones de la vida que para bien o para mal, he decidido tomar.

Y, a ti Vero:

Por todo el apoyo y cariño que de ti recibo. Por ser tú, mi fuente de inspiración. Por ser mi punto de partida en todas las cosas que pienso y que hago.

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Roberto Montes de Oca por darme la oportunidad de participar en su grupo de trabajo, por sus grandes enseñanzas y por la gran confianza que puso en mí para la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros de carrera: Juan Alberto García Solís, Salvador Arias Rodríguez, Lucía E. Cuellar, Nancy Torres, Gerardo Ramos, Armando Elizondo y Darwin Elizondo, que durante el transcurso de la carrera me brindaron su amistad incondicional.

A todos mis maestros de la carrera, que de cada uno de ellos aprendí algo muy valioso, que es el conocimiento.

A Areli Herrera Díaz por su gran ayuda en la realización del presente trabajo y en la labor de laboratorio.

Al Sistema de Investigación Alfonso Reyes, CONACYT, por otorgarme una beca para la realización de este proyecto.

Al Instituto de Estudios de la Concepción Humana (IECH) quienes decidieron participar en el proyecto al proporcionar las muestras.

Y, a mis compañeros de laboratorio: Analí, Luis, Naima, Jorge, Deyanira, Araceli, Elsa, Arnulfo, Armando, Humberto y compañía.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
1. RESUMEN	1
2. IMPORTANCIA	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1 MICRODELECCIONES EN EL CROMOSOMA Y	4
3.1.1 DELECCIONES	5
3.1.2 LOCALIZACION DE LAS MICRODELECCIONES	5
3.1.3 CORRELACION ENTRE EL FENOTIPO Y GENOTIPO	7
3.1.4 PATRONES EN LA FRECUENCIA DE MICRODELECCIONES EN VARONES INFÉRTILES	7
3.1.5 MECANISMOS DE LAS MICRODELECCIONES	8
3.2 GENES EN EL CROMOSOMA Y	9
3.2.1 LA FAMILIA DE GENES RBM	10
3.2.2 LA FAMILIA DE GENES DAZ	11
4. OBJETIVOS	13
4.1 OBJETIVO GENERAL	13
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	13
5. HIPÓTESIS	14
6. MATERIAL Y EQUIPO	15
6.1 EQUIPO	15
6.2 MATERIAL BIOLÓGICO	15
6.3 MATERIALES	15

7. METODOLOGÍA	17
7.1 AISLAMIENTO DE DNA	17
7.1.1 TECNICA DE “TSNT”	17
7.1.2 TÉCNICA DE “DE SALADO” (Salting-out)	18
7.2 PCR DE LOS MARCADORES STS’s.	20
7.2.1 PREPARACIÓN DE LAS REACCIONES DE PCR	20
7.2.2 CONDICIONES PARA LA REACCION DE PCR	20
7.3 PCR MÚLTIPLE	22
7.3.1 PREPARACIÓN DE LAS REACCIONES DE PCR MULTIPLE	23
7.4 PCR MÚLTIPLE EN VARONES INFÉRTILES.	23
8. RESULTADOS	24
8.1 AISLAMIENTO DE DNA	24
8.1.1 AISLAMIENTO DE DNA POR LA TECNICA DE “TSNT”	24
8.1.2 AISLAMIENTO DE DNA POR LA TÉCNICA DE “DE SALADO”	25
8.2 ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA DE PCR PARA MARCADORES STS’s.	26
8.3 ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA DE PCR MÚLTIPLE.	27
8.4 PRUEBAS DE PCR MÚLTIPLE EN VARONES INFÉRTILES.	20
9. DISCUSIONES	31
10. CONCLUSIONES	33
11. LITERATURA CONSULTADA	34

I

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AZF	Delección en Azoospermia
C	Citocina
dATP	Desoxiadenosintrifosfato
DAZ	Delección en Azoospermia
dCTP	Desoxicitidintrifosfato
dGTP	Desoxiguanosintrifosfato
DNA	Acido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleosintrifosfato
dTTP	Desoxitimidintrifosfato
EDTA	Acido Etilendiamino Tetraacético
G	Guanina
Mb	Megabases
NaCl	Cloruro de Sodio
NaHCO ₃	Hidróxido de Sodio
NH ₄ Cl	Cloruro de Amonio
mM	Milimolar
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Iones Hidrógeno
RBM	Motivo de Unión al RNA

II

SCOS	Síndrome de Solo Células de Sertolli
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SGA	Arresto en la Espermatogénesis
STS	sequence-tagget site
T	Timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris- EDTA
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometono Hidroclorado
TSNT	Triton X-100, SDS, NaCl, Tris-HCl
ul	Microlitros
Yq11	Brazo Largo del Cromosoma Y

III

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema del cromosoma Y	21
Tabla 1. Marcadores moleculares STS del cromosoma Y (Yq11)	21
Tabla 2. Programa del Termociclador.	22
Figura 2. Aislamiento de DNA por la técnica de “TSNT”	24
Figura 3. Aislamiento de DNA por la técnica de Salting-out	25
Figura 4. Amplificación individual de los marcadores STS’s (a).	26
Figura 5. Amplificación individual de los marcadores STS’s (b).	27
Tabla 3. Distribución de los marcadores STS’s en las reacciones de PCR Múltiple	28
Figura 6. Estandarización de la reacción de PCR múltiple en el paciente No. 19	29
Figura 7. PCR Múltiple del paciente No. 16	29

1. RESUMEN

Recientes estudios han mostrado que las microdeleciones intersticiales en Yq11, principalmente en los intervalos 5 y 6, representa un factor etiológico de infertilidad en casos considerados idiopáticos. Alrededor del 10-15% en pacientes con azoospermia y del 5%-10% en pacientes con oligozoospermia severa. Se han detectado tres subregiones deletadas, recurrentemente no traslapadas, en Yq proximal, medio y distal, denominados “AZFa”, “AZFb” y “AZFc. Las formas más frecuentes de microdeleciones se han localizado en AZFc y un poco menos frecuente en AZFb, ambas subregiones se localizan principalmente en el intervalo 6 del cromosoma Y.

Para el análisis de detección de microdeleciones en el cromosoma Y del intervalo 6 se probaron un total de 16 marcadores moleculares STS (sequence-taget site) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Primeramente se probaron todos los diferentes marcadores por separado, utilizando DNA de individuos sin problemas aparentes de infertilidad. Posteriormente se estandarizó la prueba a través de reacciones de PCR múltiple (Multiplex-PCR) utilizando varios marcadores moleculares STS's en una misma reacción.

Se analizaron un total de 52 varones con diferentes grados de infertilidad, de los cuales, no se observó ninguna microdelección.

2. IMPORTANCIA

La población del país en edad reproductiva es de aproximadamente 23 millones de personas, de las cuales se calcula alrededor de 14 millones de parejas. Tomando como referencia que alrededor del 10% de las parejas tienen algún tipo de problema relacionado con la infertilidad a nivel mundial, se calcula que en el país existen aproximadamente 1.4 millones de parejas con problemas de infertilidad. Entre un 40% y 50% de los casos el varón tiene problemas cuantitativos o cualitativos en la producción de espermatozoides (1).

Recientemente investigaciones a través de la aplicación de técnicas de Ingeniería Genética en modelos experimentales en mamíferos y en humanos han contribuido a la comprensión de los mecanismos implicados en la espermatogénesis y espermiogénesis. Estudios moleculares han sugerido que estas microdeleciones intersticiales en la parte distal de la eucromatina del brazo largo del cromosoma Y (Yq11) representa un factor etiológico del 10-15% en pacientes con azoospermia y oligozoospermia severa idiopáticos, y esta prevalencia es igual de alta cuando más testiculopatías primarias severas son detectadas, tales como el síndrome de solo Células de Sertoli (2).

Unos de los beneficios de la aplicación de estos estudios son el poder diferenciar entre una esterilidad masculina idiopática y genética. Las personas con este padecimiento de tipo genético dispondrán de la información que les

permitirá medir el riesgo de transmitir su problema de infertilidad a su descendencia, como consecuencia de las técnicas de reproducción asistida.

Debido al aumento de parejas con problemas de infertilidad que acuden a programas de reproducción asistida, es de gran importancia la implementación de técnicas de diagnóstico molecular para la detección de problemas genéticos. El no implementar este tipo de pruebas, conllevaría en este caso, al aumento en las alteraciones genéticas en nuestra población.

3. ANTECEDENTES

La infertilidad es un problema de salud que afecta a un sin número de las parejas que desean procrear. Un 25% de los varones presentan un claro defecto en la capacidad funcional de sus espermatozoides. Estos defectos se pueden deber a diferentes factores, tales como la disminución en la producción de espermatozoides (oligozoospermia), la ausencia completa de producción de espermatozoides (azoospermia), malformaciones en los espermatozoides (teratospermia) y a la muerte de estos (necrospermia). Las causas etiológicas de la espermatogénesis anormal han sido atribuidas a problemas endocrinos, infecciosos, anatómicos, congénitos o adquiridos. Sin embargo, en el 15% de los casos se desconoce su etiología, denominándolos como idiopáticos.

3.1 MICRODELECCIONES EN EL CROMOSOMA Y

Recientes estudios han mostrado que las microdeleciones intersticiales en Yq11 representa un factor etiológico en casos considerados idiopáticos. En promedio alrededor del 10-15% en pacientes con azoospermia y del 5% al 10% en pacientes con oligozoospermia severa.

Aunque se ha establecido desde los años setentas que deleciones en el brazo largo del cromosoma Y (Yq) están asociadas con fallas en el proceso de espermatogénesis, solo en los últimos años estas regiones han sido descritas a

nivel molecular. Además, se han identificados genes y familias de genes en el cromosoma Y que pueden explicar los fenotipos de los hombres que presentan estas deleciones.

3.1.1 DELECIONES

Delección es la pérdida de uno o más pares de bases en la secuencia de nucleótidos del DNA. Las deleciones representan una fracción considerable de las mutaciones espontáneas. La mayoría de las deleciones, aunque no todas, ocurren en secuencias repetidas. Las deleciones pueden originarse por errores en la replicación. Alternativamente, las deleciones pueden originarse por los mecanismos de recombinación empleados por uno o varios sistemas enzimáticos celulares que reconocen secuencias repetidas. Varias enfermedades genéticas estudiadas son causadas por deleciones o duplicaciones en las que están implicadas secuencias repetidas (3).

3.1.2 LOCALIZACION DE LAS MICRODELECIONES

La primera asociación entre fallas en la espermatogénesis y una subyacente causa genética fue demostrada por Tiepolo y Zuffardi (1976) en un reporte de seis pacientes azoospermicos portadores de deleciones microscópicamente detectables en la porción distal de Yq. En cuatro pacientes, la delección fue *de*

novo. Al analizar a sus padres estos presentaban intacto el cromosoma Y. Con estas bases, Tiepolo y Zuffardi (1976) propusieron la existencia de un factor de espermatogénesis, llamado “factor de azoospermia” (AZF), codificando para un gen en Yq en su parte distal (4). Sin embargo, la suposición de que AZF está representado por un simple gen ligado a Y fue refutado cuando Vogt et al. (1996) observó que microdeleciones en el cromosoma Y seguían un cierto patrón. Vogt detectó tres subregiones deletadas recurrentemente no traslapadas en Yq proximal, medio y distal, denominados “AZFa”, “AZFb” y “AZFc” respectivamente (5). Además, se ha visto que estas deleciones no solo están asociadas exclusivamente con la azoospermia (4). Se ha visto que están asociadas con un amplio rango de perfiles histológicos, desde Síndrome de solo células de Sertoli (SCOS) hasta arresto en la espermatogénesis (SGA) y hipoespermatogénesis severa. El tamaño físico de estas regiones se han estimado entre 1-3 Mb para AZFa y AZFb y alrededor de 1.4 Mb para AZFc. La localización de AZFa se encuentra en el intervalo 5, y la localización de AZFb y AZFc se encuentra en el intervalo 6 del cromosoma Y.

Numerosos estudios moleculares han tratado de definir regiones deletadas recurrentemente de Yq. Esto, para determinar la incidencia de microdeleciones entre hombres con azoospermia u oligozoospermia, y para correlacionar el tamaño y posición de la deleción que causa la infertilidad. El

reporte de incidencia de microdeleciones en hombres infértiles varía enormemente entre los estudios realizados, en un rango del 1% al 55% (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16).

3.1.3 CORRELACION ENTRE EL FENOTIPO Y GENOTIPO

Vogt et al.(1996) propuso originalmente que deleciones en AZFa resultan en SCOS del tipo I en donde no hay desarrollo de espermatogonias, mientras que deleciones en AZFb causa SGA usualmente en el estado de espermatocito, y deleciones en AZFc están asociadas con una gran variedad de fenotipos, variando desde el SCOS tipo II (ausencia de células germinales en la mayor parte de los túbulos testiculares) a hipospermatogénesis (presencia de células germinales normales aunque en número reducido). En general, subsecuentes estudios han reafirmado estos descubrimientos, pero algunos de ellos han tenido sus excepciones; deleciones en AZFa y AZFb han sido reportadas en varones oligozoospermicos.

3.1.4 PATRONES EN LA FRECUENCIA DE MICRODELECIONES EN VARONES INFÉRTILES

En respuesta a todos los estudios realizados se podría definir ciertos patrones. Las microdeleciones son encontradas casi exclusivamente en

varones afectados por azoospermia u oligozoospermia severa u, ocasionalmente, en pacientes con alguna otra anomalía andrológica encontrada. Una alta frecuencia de microdeleciones en Yq11 son encontradas en hombres azoospermicos, comparada con hombres oligozoospermicos, y en hombres con infertilidad idiopática bien definida comparada con hombres a quienes la etiología de su infertilidad es conocida. Entre más grande sea la deleción, ésta se relaciona con defectos espermatogénicos más severos. Finalmente, deleciones en AZFa, las cuales no son tan comunes (frecuencia de 1%-5%), generalmente están asociadas con SCOS tipo I, mientras que deleciones en AZFc y AZFc+AZFb (la más frecuente forma de estas lesiones) están asociadas a un variado número de defectos en la espermatogénesis, incluyendo oligozoospermia (17). Debido a estos antecedentes es de gran importancia el poder identificar la presencia de microdeleciones en AZFb y AZFc las cuales se localizan dentro del intervalo 6 del cromosoma Y.

3.1.5 MECANISMOS DE LAS MICRODELECCIONES

La relativa alta frecuencia de deleciones *de novo* en el cromosoma Y indica que es susceptible a pérdida espontánea del material genético. La inestabilidad del cromosoma Y tal vez está relacionada a la alta frecuencia de elementos repetidos agrupados a lo largo del cromosoma, y las deleciones ocurren a

través de eventos aberrantes de recombinación (entre áreas de homología o secuencias repetidas similares, entre el cromosoma X y Y, o por un desbalance en el intercambio de material genético entre cromátidas hermanas del cromosoma Y) o por desprendimiento durante la replicación del DNA (18).

3.2 GENES EN EL CROMOSOMA Y

Varios genes y familias de genes han sido identificados a lo largo del brazo largo del cromosoma Y (19). Estos genes pueden ser divididos dentro de los que se cree intervienen en la actividad celular considerados caseros (housekeeping) y aquellos que solo se expresan en testículo.

Del primer grupo se incluyen los genes *Drosophila* fats facets related Y (*DFFRY*), dead box Y (*DBY*), ubiquitous tetratricopeptide repeat (*TPR*), motif Y (*UTY*), el eukaryotic translation-initiation-factor 1A Y isoform (*eIF-1AY*), selected mouse cDNA on the Y (*SMCY*), y thymosin β 4 Y isoform (*T- β 4Y*). Estos genes son de expresión ubiquita y solo existe una copia en el cromosoma Y, presentando un gen homólogo en el cromosoma X. Del grupo de genes que solo se expresan en testículo incluyen el RNA-binding-motif (*RBM*), deleted in azoospermia (*DAZ*), chromodomain Y (*CDY*), XK-related Y (*XKRY*), protein-tyrosine phosphatase BAS-like (*PTP-BL*)-related Y (*PRY*), y genes de proteínas básicas Y1 y Y2 (*BPY1* y *BPY2*). Estos genes presentan

múltiples copias en el cromosoma Y y no presentan homólogos en el cromosoma X.

En el intervalo 6 existen dos genes en particular que han sido estudiados y que la frecuencia de deleciones en ellos es muy alta en varones infértiles; uno de los genes es el Motivo de Reconocimiento del RNA en el Cromosoma Y (*YRRM/RBM*) identificado por Ma *et al.* (1993), y el otro gen es el Deletado en Azoospermia (*DAZ*) identificado por Reijo *et al.* (1995).

3.2.1 LA FAMILIA DE GENES RBM

El primer gen *RBM* fue asociado tentativamente con AZF (20) y es un miembro de la familia de genes que codifican proteínas de unión al RNA (RNA-binding protein), el cual está representado en múltiples copias en diferentes regiones del cromosoma Y, y al menos una copia está localizada en la región AZFb (21). El gen *RBM* codifica una proteína que contiene un motivo de reconocimiento del RNA altamente conservado. La proteína *RBM* consiste en cuatro repeticiones en tandem de unos 37 residuos de péptidos nombrado la “caja SRGY” porque tiene un alto contenido de aminoácidos Ser-Arg-Gly-Tyr.

La expresión del gen *RBM* y la proteína *rbm* se halla exclusivamente en células germinales de testículo. Estudios mas recientes indican que *RBM* es

una proteína nuclear que tal vez esté involucrada en el procesamiento del RNA durante la espermatogénesis. Es posible que el gen *RBM* juegue un papel importante durante la edición (splicing) de las moléculas de pre-mRNA, ya que se ha observado que la proteína *RBM* se encuentra localizada junto con cierto número de factores de edición conocidos.

3.2.2 LA FAMILIA DE GENES DAZ

El segundo gen, *DAZ*, es la delección más frecuentemente reportada en Yq11 y está localizada en la región AZFc. Originalmente se reconocía una simple copia del gen, en la actualidad se sabe que es una familia de genes con múltiples copias localizados en la parte distal del intervalo 6(22).

La familia de los genes *DAZ* comparten ciertas características con la familia de genes *RBM*, también codifican para una proteína de unión al RNA que se expresa únicamente en células germinales.

Para algunos investigadores el gen *DAZ* ligado a Y es el mejor candidato de AZF, esto porque las deleciones en un gran número de varones con azoospermia y oligozoospermia se encuentran en este gen.

Un gen homólogo autosomal a *DAZ* llamado *Dazl1*, ha sido caracterizado y localizado en el cromosoma 17 en ratón. Además, en humanos en el cromosoma 3p24 se localizó un gen homólogo nombrado *DAZL1*. Se ha

observado que en ratones “knockout” para *Dazl1* denominado *Dazl1^{-/-}*, presenta un número reducido de células germinales y ausencia de gametos tanto en ratones machos como en hembras (23). En un estudio con ratones transgénicos hecho por Slee *et al* (24), un YAC humano de 225 kb conteniendo un gen *DAZ* ligado a Y fue introducido en un ratón “knockout” (*Dazl1^{-/-}*). Estos ratones denominados *Dazl1^{-/-}:TgS12* presentan un fenotipo un parcial y variable con un incremento en la supervivencia de células germinales en una etapa previa a la del paquiteno de la meiosis.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) múltiple para el diagnóstico molecular de microdeleciones en el intervalo 6 del Cromosoma Y en varones infértiles.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estandarizar la técnica de PCR para cada uno de los marcadores moleculares STS's a utilizar del intervalo 6 del cromosoma Y en varones normales.
2. Estandarizar la técnica de PCR Múltiple para los marcadores moleculares STS's del intervalo 6 del cromosoma Y en varones normales.
3. Detectar microdeleciones, mediante PCR múltiple, en varones infértiles que asisten a programas de reproducción asistida.

5. HIPÓTESIS

Mediante la amplificación de diferentes regiones del cromosoma Y utilizando la técnica de PCR múltiple, es posible el detectar regiones que se han perdido (microdeleciones) de este cromosoma.

6. MATERIAL Y EQUIPO

6.1 EQUIPO

Cámara de Electroforesis

Centrífuga

Equipo de Fotodocumentación

Transiluminador de Luz Ultravioleta

Micropipetas

Termociclador

Vortex

6.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizó sangre periférica anticoagulada con EDTA de varones con cierto grado de infertilidad que acudieron a programas de reproducción asistida.

Estas muestras de sangre fueron proporcionadas por el “Instituto de Estudios de la Concepción Humana”.

6.3 MATERIALES

Para la realización de este proyecto se contó con todos los materiales necesarios para la realización de las reacciones de PCR, como son: microtubos

de 0.6 ml y puntillas para micropipetas; para el aislamiento del DNA: tubos para microcentrífuga de 1.5 ml, tubos vacutainer con EDTA (para las muestras de sangre), y guantes de látex. Además, de los reactivos necesarios para realizar las pruebas.

7. METODOLOGÍA

7.1 AISLAMIENTO DE DNA

Para el aislamiento de DNA se utilizaron dos técnicas diferentes dependiendo del tiempo de almacenamiento de la muestra de sangre. Para muestras recientes se utilizó la técnica de “TSNT”(Tritón X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl a 100 mM, Tris-HCl a 10 mM, pH 8) y para muestras con mayor tiempo de almacenamiento se utilizó la técnica de “de Salado”.

7.1.1 TECNICA DE “TSNT”

Se colocan 300µl de sangre total anticoagulada con EDTA 5mM en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se añaden 200µl de buffer de lisis (Tritón X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl a 100 mM, Tris-HCl a 10 mM, pH 8) y 500µl de fenol saturado. Se mezcla completamente por inversión durante un minuto. Posteriormente, se agregan 100µl de SEVAG y se agita en Vortex durante cinco minutos. Una vez concluida la agitación, se añade a la mezcla 200µl de buffer TE 1X y se procede inmediatamente a centrifugar por 15 minutos a 14,000 g.

Una vez concluida la centrifugación, se transfiere la fase acuosa a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se precipita el DNA agregando 2 volúmenes de

etanol al 100%. Por último, se centrifuga por 2 minutos a 14,000 g para decantar el sobrenadante y obtener la pastilla de DNA, se lava la pastilla con un ml de etanol al 70%, se vuelve a centrifugar por 2 minutos, se decanta el sobrenadante y se pone a secar la pastilla. La pastilla se resuspende en 50µl de TE 1X a 4° C por 24 horas.

7.1.2 TÉCNICA DE “DE SALADO” (Salting-out)

Se colocan 200µl de la muestra de sangre con 1000µl de buffer de lisis para eritrocitos (NH₄Cl 155mM, NaHCO₃ 10mM, EDTA 0.1mM pH 7.4). Después, se incuba por 10 min a 4° C mezclando ocasionalmente; posteriormente se centrifuga a 14,000 rpm por 10 min. Se descarta el sobrenadante y se lava la pastilla con 800µl de buffer de lisis para eritrocitos incubar y centrifugar como se hizo anteriormente. Se repite con 500µl y 200µl de buffer de lisis para eritrocitos.

Se resuspende el botón con 150µl de buffer de lisis para leucocitos (Tris-HCl 10mM NaCl 400mM, EDTA 2mM, pH 8.2) agregando 3.5µl de proteinasa K (10mg/ml) y 10µl de SDS 10%. Se incuba toda la noche a 55° C. Posteriormente, se añade 50µl de NaCl 6M, se agita vigorosamente por un minuto y se centrifuga a 14,000rpm por 15 min. El sobrenadante se transfiere en un vial para eliminar las proteínas con 500µl de fenol y 100µl de SEVAG,

se centrifuga por 20 min a 14,000rpm. Se recupera el sobrenadante y se precipita el DNA con 2 volúmenes de etanol.

Por último, se centrifuga por 2 minutos a 14,000 g para decantar el sobrenadante y obtener la pastilla de DNA, se lava la pastilla con un ml de etanol al 70%, se vuelve a centrifugar por 2 minutos, se decanta el sobrenadante y se pone a secar la pastilla. La pastilla se resuspende en 50µl de TE 1X a 4° C por 24 horas.

7.2 PCR DE LOS MARCADORES STS's.

Para el análisis de detección de microdeleciones en el intervalo 6 del cromosoma Y se probaron un total de 16 marcadores moleculares STS's (sequence-tagget site), que incluyen regiones que ya se han determinado que se deletan en Yq11 en el intervalo 6, donde se encuentran las regiones AZFb y AZFc de dicho cromosoma. (Figura 1). Se probaron todos los diferentes marcadores por separado, utilizando DNA de individuos sin problemas aparentes de infertilidad. En la Tabla 1 se muestran los 16 marcadores moleculares utilizados, su locus, la secuencia de los oligos (derecho e izquierdo) y el tamaño de los productos de PCR esperados. Se llevaron a cabo reacciones de PCR bajo condiciones controladas de temperatura de desnaturalización, hibridación y polimerización.

7.2.1 PREPARACIÓN DE LAS REACCIONES DE PCR

Para la preparación de la mezcla de reacción de PCR se colocan en un vial de 0.5 ml 1 μ l de cada oligonucleótido, a una concentración de 100 ng/ μ l, 2.5 μ l de dNTP's (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) a 2.5 mM, 1 μ l de Taq polimerasa (1 U/ μ l), 2.5 μ l de buffer para la enzima, así como 17 μ l de agua bidestilada esterilizada y libre de nucleasas. Para poder estandarizar cada uno de los veintinueve marcadores STS's se utilizó 1 μ l del DNA de un varón control (varon que haya tenido hijos).

7.2.2 CONDICIONES PARA LA REACCION DE PCR

Las reacciones de PCR se realizaron con el equipo necesario que se encuentra en el laboratorio (Termociclador M.J. Research Mod. PTC-100). Las condiciones de tiempo y temperatura del programa que se utilizó se muestran en la Tabla 2.

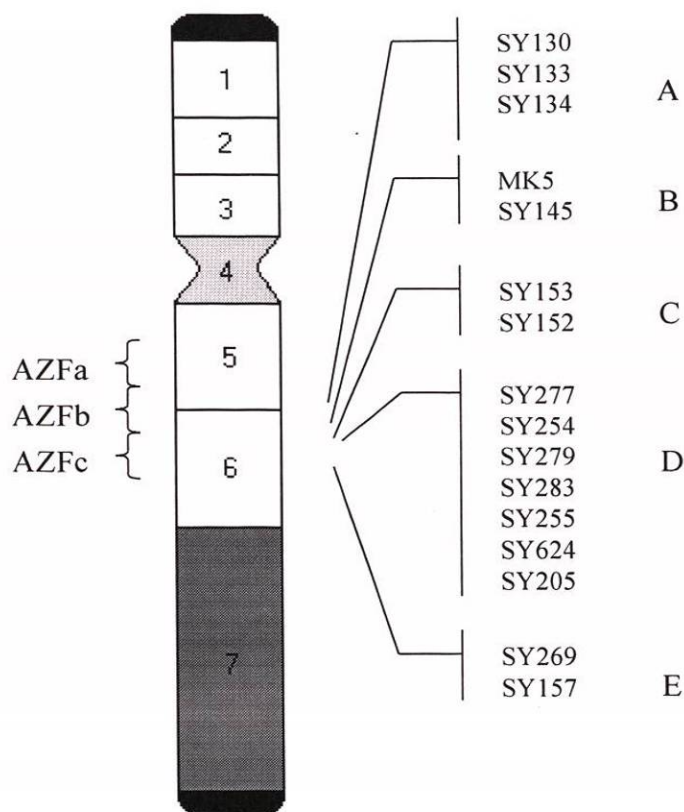


Figura 1. Esquema del cromosoma Y. Localización de las regiones AZFa, AZFb y AZFc (Factor de Azoospermia) en el brazo largo del cromosoma Y, así como los marcadores moleculares utilizados dentro del intervalo 6 para la detección de microdeleciones

Tabla 1. Marcadores moleculares STS del cromosoma Y (Yq11).

STS	Locus	Oligo izquierdo	Oligo derecho	*pb
SY130	DYS221	CAGAGAGTTTTCTAACAGGGCG	TATGGGAATCACTTTTGCAACT	173
SY133	DYS223	TNATTTCTCTGCCCTTCACCAG	TATGATGATTGCCTAAAGGGAA	177
SY134	DYS224	CTGTCTGCCTCACCATAAAACG	CAACCACTGCCAAAACCTTCAA	301
SY145	DYF51S1	CAACACAAAAACACTCATATACTCG	TTGAGAATAATTGTATGTTACGGG	142
SY152	DYS236	AAAGACAGTCTGCCATGTTTCA	TNACAGGAGGGTACTTAGCAGT	125
SY153	DYS237	AAGCATCCTCATTTTATGTCCA	CCCAACCCAAAAGCACTGAGTA	139
SY277	DAZ	GGGTTTTGCCTGCATACGTAATTA	GCCTAAAAGCAATTCTAAACCTCCA	312
SY254	DAZ	CTGGGTGTTACCAGAAGGCAA	GAACCGTATCTACCAAAGCAGC	370
SY279	DAZ	CCACCTCATGGTAGTAAAATTGTA	CGTTGTAGCAATAAGATAAATAAGA	835
SY283	DAZ	CAGTGATACTCGGACTTGTGTA	GTTATTTGAAAAGCTACACGGG	497
SY255	DAZ	GGTGCTCGTCATGTGCAGCCAC	GAGTACAGGATTCGGCGTGAT	123
SY624	DAZ	TTTAAATCTGTTGGATCCTCTCA	TTCTTTCAGTCTCGATTATTTGTTA	256
SY205	DAZ	TCTCACTGTTGTTGTGTAGGTTAC	TGGATCTGAGAATGCTTCACCTTA	99
SY269	DYS247	CTGAACTCCAATCATCCCTGA	ATTTGGCTCTACTTTTCCCCTT	115
SY157	DYS240	AGCTTAGGAAAAAGTGAAGCCG	CTCCTGCTGTCAGCAAGATACA	289
MK5	RBM	TATGGCAGAAGTTGGGAGAGTT	GATGCCACATAACTTGAGCTACC	154

STS= Sequence-taget site

*pb= Tamaño del producto de PCR en pb (pares de bases).

Tabla 2. Programa del Termociclador.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Evento
1	94	4	<i>Desnaturalización inicial</i>
2	94	1	<i>Desnaturalización</i>
3	57	1	<i>Apareamiento</i>
4	72	3	<i>Extensión</i>
5		35 ciclos al paso 2	
6	72	7	<i>Extensión prolongada</i>

7.3 PCR MÚLTIPLE.

Las pruebas de PCR múltiple (múltiplex-PCR) consisten en usar varios marcadores moleculares STS's en una misma reacción lo cual hará que se amplifiquen varias regiones del cromosoma Y en un mismo tiempo. Se probaron diferentes combinaciones de oligonucleótidos para determinar cuales de ellos funcionan mejor en una misma reacción de PCR. Se tomó en cuenta los tamaños de los oligos, la homología que había entre ellos y la proximidad dentro del cromosoma Y.

Se probaron cuatro mezclas para las reacción de PCR con ocho oligos cada mezcla, de esta manera se lograron amplificar cuatro regiones diferentes del intervalo 6 de Yq11 en cada reacción.

7.3.1 PREPARACIÓN DE LAS REACCIONES DE PCR MÚLTIPLE

Para la preparación de la mezcla de reacción de PCR Múltiple se colocó en un vial de 0.5 ml primeramente 1 μ l de cada oligonucleótido, a una concentración de 100 ng/ μ l, 2.5 μ l de dNTP's (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) a 2.5 mM, 0.25 μ l de Taq polimerasa (5 U/ μ l), 2.5 μ l de buffer para la enzima, así como 17 μ L de agua bidestilada estéril y libre de nucleasas. Para poder estandarizar cada uno de los veintinueve marcadores STS's se utilizó 1 μ l del DNA de un varón control.

7.4 PCR MÚLTIPLE EN VARONES INFÉRTILES.

Ya que se estandarizó las reacciones de PCR, primeramente todos los marcadores por separado, y después en mezclas (PCR múltiple), se analizaron las muestras de 52 pacientes a los cuales se les había diagnosticado cierto grado de infertilidad por medio de pruebas de espermogramas. Las muestras de estos pacientes fueron reclutadas en el "Instituto de Estudios de la Concepción Humana" de varones que se les ha diagnosticado cierto grado de infertilidad y que se han sometido a técnicas de reproducción asistida.

8. RESULTADOS

8.1 AISLAMIENTO DE DNA

Después de seguir todo el procedimiento de las técnicas de aislamiento se pudo obtener muestras de DNA por ambos métodos.

8.1.1 AISLAMIENTO DE DNA POR LA TECNICA DE “TSNT”

Por medio de esta técnica se obtuvo DNA de muy buena calidad y a una concentración considerable. El único inconveniente de esta técnica es que a partir del tercer día de almacenamiento de la muestra de sangre se va obteniendo menos cantidad de DNA hasta ya no poder obtenerlo. En la figura 2 se observa un gel de agarosa con muestras de DNA aislado con la técnica de “TSNT” (pacientes No. 27, 28, 29 y 30).

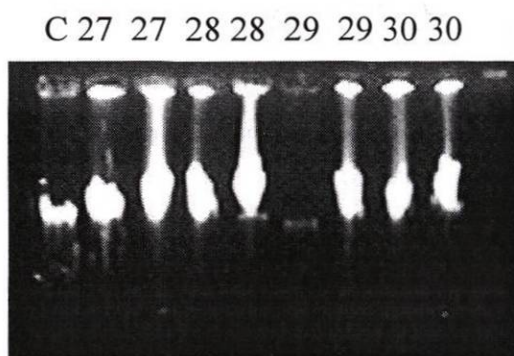


Figura 2. Aislamiento de DNA por la técnica de “TSNT”. El DNA se aisló mediante la técnica de “TSNT” a partir de sangre periférica. Pacientes 27, 28, 29 y 30; C es un control positivo. Gel de agarosa al 0.8 %.

8.1.2 AISLAMIENTO DE DNA POR LA TÉCNICA DE “DE SALADO”

(Salting-out)

Esta técnica se utilizó solo cuando las muestras de sangre no eran recientes y que por la técnica de “TSNT” no se pudo obtener el DNA. Con esta técnica se puede obtener DNA en muestras de sangre que tienen un tiempo considerable de almacenamiento, en este caso hasta un año. En la figura 3 se observan diferentes muestras de DNA obtenidas con esta técnica (pacientes No. 50, 51 y 52). Aunque se obtiene menos cantidad, la calidad del DNA es muy buena.

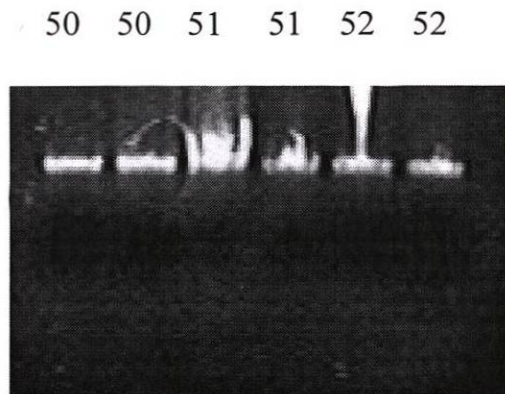


Figura 3. Aislamiento de DNA por la técnica de Salting-out. El DNA se aisló mediante la técnica de “de salado” a partir de sangre periférica. Pacientes 50, 51 y 52. Gel de agarosa al 0.8 %.

8.2 ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA DE PCR PARA MARCADORES STS's.

Se logró la estandarización de las reacciones de PCR para la amplificación de los 16 marcadores STS's. Se probaron todos los diferentes marcadores por separado, utilizando DNA de individuos sin problemas aparentes de infertilidad.

Se probaron diferentes condiciones de PCR y concentraciones de los oligonucleótidos con lo cual se logró una muy buena amplificación de todos los marcadores STS's como se muestra en las figuras 4 y 5

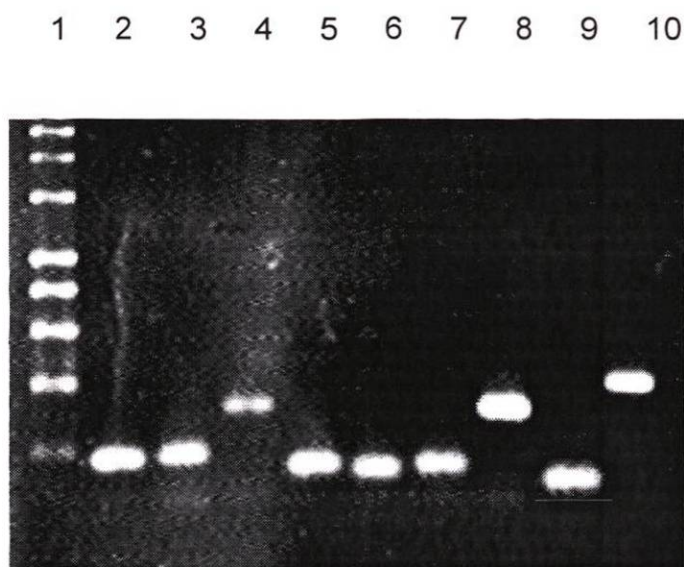


Figura 4. Amplificación individual de los marcadores STS's (a). Productos de reacción de PCR. En el carril 1 se corrió el marcador de peso molecular de 200pb. En los carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 se corrieron los productos de PCR de los marcadores SY130, SY133, SY134, SY145, SY152, SY153, SY157, SY205 y SY254 respectivamente. Gel de agarosa al 1.5 %.

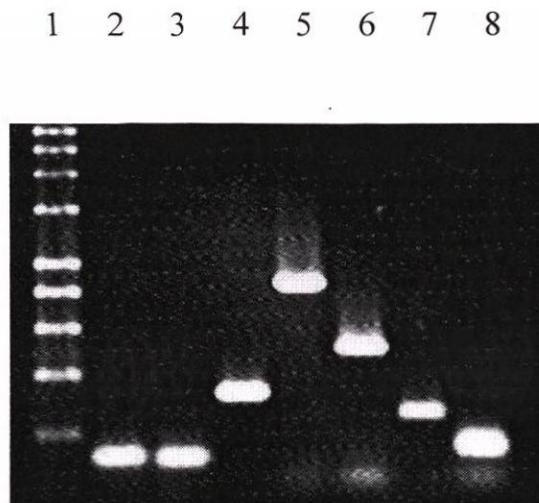


Figura 5. Amplificación individual de los marcadores STS's (b). Productos de la reacción de PCR. En el carril 1 se corrió el marcador de peso molecular de 200pb. En los carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se corrieron los productos de PCR de los marcadores SY255, SY269, SY277, SY279, SY283, SY624 y MK5, respectivamente. Gel de agarosa al 1.5 %.

8.3 ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA DE PCR MÚLTIPLE.

Puesto que realizar 16 reacciones de PCR por cada individuo consume mucho tiempo y reactivos, una vez que se demostró la amplificación individual de cada marcador procedimos a amplificar varios marcadores en una misma reacción, a lo cual se le conoce como prueba de PCR Múltiple. Se probaron diferentes combinaciones de oligonucleótidos para determinar cuales de ellos funcionan mejor en una misma reacción de PCR. Se tomó en cuenta los tamaños de los oligos, la homología que puede haber entre ellos y la proximidad dentro del cromosoma Y.

Se estandarizaron cuatro mezclas (A, B, C y D) diferentes donde se incluyen ocho oligonucleótidos en cada mezcla de reacción de PCR. De esta manera se lograron amplificar cuatro regiones diferentes del intervalo 6 de Yq11 en cada reacción. La distribución de los 16 marcadores STS's en las reacciones de PCR se muestran en la tabla 3 y en la figuras 6 y 7 se muestran estas cuatro reacciones de PCR.

Tabla 3. Distribución de los marcadores STS's en cuatro grupos de reacción de PCR.

Mezcla	STS	Tamaño pb	Locus
A	SY205	99	DAZ
	SY145	142	DYF51S1
	SY157	286	DYS240
	SY254	374	DAZ
B	SY269	118	DYS247
	SY153	143	DYS237
	SY624	256	DAZ
	SY283	497	DAZ
C	SY152	129	DYS236
	SY130	177	DYS221
	SY134	305	DYS224
	SY279	835	DAZ
D	SY255	127	DAZ
	MKS	154	RBM
	SY133	187	DYS223
	SY277	312	DAZ

STS= Sequence-taget site

*pb= Tamaño del producto de PCR en pb (pares de bases).

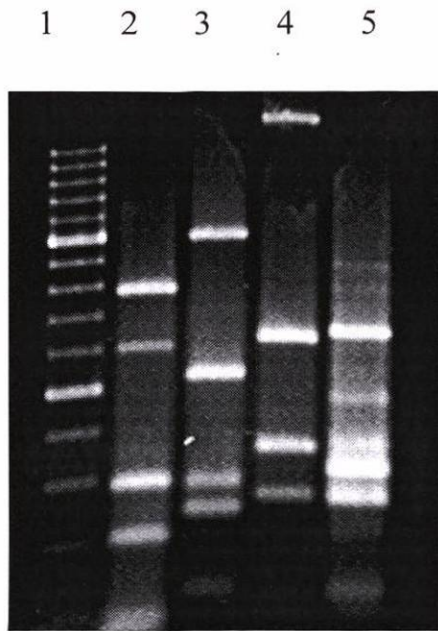


Figura 6. PCR múltiple del paciente número 19. Productos de PCR de los 16 marcadores STS's en cuatro reacciones de PCR Múltiple (carriles 2, 3, 4 y 5). Cada reacción incluye 4 marcadores moleculares STS's. Carril 1 marcador de peso molecular de 50 pb. Gel de agarosa al 2.5%.

8.4 PRUEBAS DE PCR MÚLTIPLE EN VARONES INFÉRTILES.

Una vez estandarizada la metodología del PCR Múltiple se analizaron por esta técnica un total de 52 pacientes varones con cierto grado de infertilidad. Todos estos pacientes amplificaron los 16 marcadores, es decir que no presentaron una microdelección en estos loci analizados (Figuras 6 y 7).

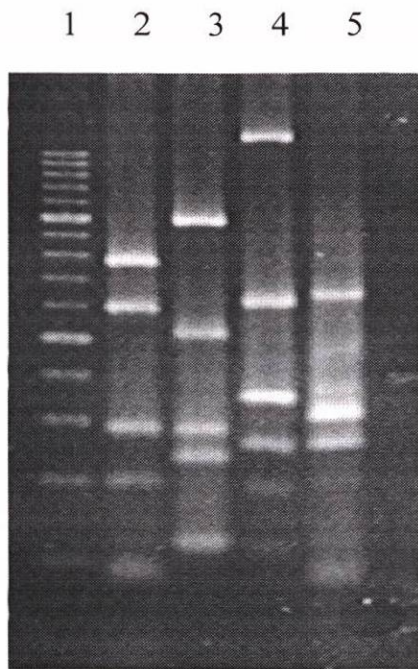


Figura 7. PCR múltiple del paciente número 16. Productos de PCR de los 16 marcadores STS's en cuatro reacciones de PCR Múltiple (carriles 2, 3, 4 y 5). Cada reacción incluye 4 marcadores moleculares STS's. Carril 1 marcador de peso molecular de 50 pb. Gel de agarosa al 2.5%.

9. DISCUSION

Numerosos estudios moleculares han tratado de definir regiones deletadas recurrentemente de Yq. Esto, para determinar la incidencia de microdeleciones entre hombres con azoospermia u oligozoospermia, y para correlacionar el tamaño y posición de la deleción que causa la infertilidad. El reporte de incidencia de microdeleciones en hombres infértiles varía enormemente entre los estudios realizados, que van de un rango del 1% al 55% (Riejo et al. 1995, Quereshi et al. 1996; Stuppia et al. 1996,1997; Foresta et al. 1997, 1998; Prior et al. 1997; Simoni et al. 1997; van der Vent et al. 1997).

Las poblaciones de estudio para microdeleciones han incluido pacientes azoospérmicos, pacientes azoospérmicos y oligospérmicos, o pacientes azoospermic/oligozoospérmicos y pacientes normospérmicos infértiles. La mayoría de los estudios clínicos seleccionan individuos con azoospermia u oligozoospermia idiopáticos, aunque otros incluyen hombres infértiles no seleccionados con causas conocidas y no conocidas de su infertilidad como en este caso. Desafortunadamente, sin embargo, no existe un acuerdo general en que consiste una infertilidad idiopática. Varones con antecedentes de varicocele y criptorchidismo son considerados idiopáticos en algunos estudios y no idiopáticos en otros. Variaciones en la frecuencia de deleciones tambien

pueden ser afectadas por el número de pacientes en el estudio; en general, estudios con pocos pacientes reportan alta frecuencia de deleciones, que podría deberse a que en estos estudios seleccionan más estrictamente a los pacientes. Otra variable que tal vez afecte la frecuencia de deleciones en Yq es la cantidad y la posición de los marcadores. Esta desigualdad en las diferentes frecuencias y localización de deleciones entre los estudios, quizás refleja una diferencia étnica o geográfica, relacionada ya sea con un haplogrupo del cromosoma Y, fondo genético o a la influencia ambiental.

Uno de los beneficios del diagnóstico de microdeleciones en el cromosoma Y, son el poder diferenciar entre una esterilidad masculina idiopática y genética. Por otra parte, las personas con este padecimiento de tipo genético dispondrán de la información que les permitirá medir el riesgo de transmitir su problema de infertilidad a su descendencia, como consecuencia de las técnicas de reproducción asistida.

Debido al aumento de parejas con problemas de infertilidad que acuden a programas de reproducción asistida, es de gran importancia la implementación de técnicas de diagnóstico molecular para la detección de problemas genéticos. El no implementar este tipo de pruebas, conllevaría en este caso, al aumento en las alteraciones genéticas en nuestra población.

10. CONCLUSIONES

1. Los marcadores moleculares STS's funcionaron adecuadamente en diferentes combinaciones para poder establecer reacciones múltiples de PCR para el diagnóstico molecular de microdeleciones dentro del brazo largo del cromosoma Y.
2. El PCR múltiple permite poder hacer un diagnóstico de microdeleciones del cromosoma Y más rápido y económico.
3. Ninguno de los 52 pacientes con problemas de infertilidad, ya sea con azoospermia u oligozoospermia severa, presentó una microdelección en el intervalo 6 del cromosoma Y.

11. LITERATURA CITADA

- 1.- Mosher A (1985) Reproductive impairments in the United States, 1965-1982. *Demography*, 22: 415-430.
- 2.- Reijo R, Alagappan R K, Patrizio P Page D (1996) Severe oligospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 347: 1290-1293.
- 3.- Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C., Gelbart W.M., 1998, *Genética*, Quinta Edición, Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, México, pp 550-556.
- 4.- Tiepolo L, Zuffardi O (1976) Localization of factor controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 34: 119-124.
- 5.- Vogt P H, Edelman A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiewewetter F, Kohn F M, et al (1996) Human Y chromosome azoospermia factor (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Gen* 5: 933-943.
- 6.- Reijo R, Lee T Y, Salo P, Alagappan R, Brown L G, Rosenberg M, Rozen S, et al (1995) Diverse spermatogenic defects in human caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 10: 373-393.

- 7.- Quereshi S J, Ross A R, Ma K, Cooke H J, Intyre M, Chandley A C, Hargreave T B (1996) PCR screening for Y chromosome microdeletions. A first step toward the diagnosis of genetically determined spermatogenic failure in men. *Mol Hum Reprod* 2: 775-779.
- 8.- Stuppia L, Mastroprimiano G, Calabrese G, Peila r, Tenaglia R, Palka G (1996) Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome detected by STS-PCR in 6 of 33 patients with idiopathic oligo- and azoospermia. *Cytogenet Cell Genet* 72: 155-158.
- 9.- Stuppia L, Gatta V Mastroprimiano G, Pompetti F, Calabrese G, guanciali P Morizio E, et al (1997) Clustering of Y chromosome deletions in subinterval E of interval 6 supports the existence of an oligozoospermia critical region outside the DAZ gene. *J Med Genet* 34: 881-883.
- 10.- Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Rossato M, Barboux s, Bortoli A (1997) Y-chromosome deletions in idiopathic severe testiculopathies. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1075-1080.
- 11.- Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Moro E, Pistorello M, Barboux S, Rossato M (1998) High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reprod* 13: 302-307.

- 12.-** Pryor J L, Kent-First M Muallem A, Van Bergen A H, Norten W E, Meisner L, Roberts K P (1997) Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Eng J Med* 336: 534-539.
- 13.-** Simoni M, Gromoll J, Dworniczak B, Rolf C, Abshagen K, Kamischke A, Carani C, et al (1997) screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (deleted in azoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil Steril* 67: 542-547.
- 14.-** Van der Vent K, Montag M, Peshka B, Leygraaf J, Schwanitz G, Haidl G, Krebs D, et al (1997) Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Mol Hum Reprod* 3: 699-704.
- 15.-** Kobayashi K., Mizumo K., Hida A. *Et al.* (1995) PCR análisis of the Y chromosome long arm in azoospermic patients. Evidence for a second locus required for spermatogenesis. *Hum. Mol. Genet.*,3, 1965-1967.
- 16.-** Najmabadi H., Huang V., Yen P. *et al.* (1996) Substantial prevalence of microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence-tagged site – based mapping strategy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81, 1347-1352.
- 17.-** McElreavey K., Krausz C. (1999) Male Infertility and the Y Chromosome. *Am J. Hum. Genet.* 64: 928-933.

- 18.- Jobling M.A., Williams G., Schiebel K., Pandya A., McElreavey K., Salas L., Rappold G.A. (1998) A selective difference between human Y-chromosomal DNA haplotypes. *Curr Biol* 8: 1391-1394.
- 19.- Lahn B T, Page D (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278: 675-680.
- 20.- Ma K., Inglis J.D., Sharkey A., Bickmore W.A., Hill R.E., Prosser E.J., Speed R.M., et al (1993) A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling spermatogenesis. *Cell* 75: 1287-1295.
- 21.- Elliott D.J., Oghene K., Makarov G., Makarova O. Hargreave T.B., Chandley A.C., Eperon I.C., et al (1998) Dynamic changes in the subnuclearorganisation of pre-mRNA splicing proteins and RBM during germ cell development. *J Cell Sci* 111: 1255-1265.
- 22.- Sexana R., Brown L.G., Hawkins T., Alagappan R.K., Skalestky H., Reeve M.P.(1996) The DAZ gene cluster on the Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat. Gen.* 14: 292-299.
- 23.- Ruggiu M., Speed R., Taggart M., McKay S.J., Kilanowski F., Saunders P. (1997) The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmatic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389: 73-77.

24.- Slee R., Grimes B., Speed R.M., Taggart M., Maguire S.M., Ross A. *et al*
(1999) A human DAZ transgene confers partial rescue of the mouse Dazl
null phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8040-8045.

