

# GENÉTICA APLICADA A LA REPRODUCCIÓN HUMANA

M<sup>a</sup> Carmen Martínez Romero

Laboratorio de Genética Molecular. CBGC. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.

E-mail: mcarmen.martinez16@carm.es

## Introducción

La ciencia de la genética aplicada a la reproducción humana nos permite descubrir su impacto de la patología reproductiva a nivel general y llegar a un diagnóstico individual en cualquiera de los sexos que permite en muchos casos resolver la disfunción reproductiva de la pareja.

Sabemos que la infertilidad o esterilidad afecta aproximadamente al 15 % de las parejas que intentan concebir <sup>1 2</sup>. Entre los agentes etiológicos que se han descrito se encuentran: factores hormonales, inmunológicos, psicológicos, edad, obesidad, secundarios a cirugías o alteraciones de la gametogénesis. Sin embargo, aún se considera que en una elevada proporción de pacientes, la esterilidad e infertilidad es de origen desconocido o idiopático, representando al 20 % de los casos. Aunque es difícil establecer la contribución genética a la infertilidad humana, se estima que esta afecta a más del 30 % de los casos, ya que incluso las causas anteriormente mencionadas pueden tener un componente genético que afecte a la reproducción de sus portadores <sup>3</sup>.

## Recomendaciones previas al análisis genético

Cuando se solicita una prueba genética es conveniente investigar la historia clínica personal y familiar mediante la realización de un árbol genealógico que comprenda tres generaciones.

Se debe reflejar si existe consanguinidad en la pareja, los antecedentes familiares de esterilidad, retraso mental, enfermedades musculares progresivas, cataratas tempranas, alteraciones en la coagulación, minusvalías, malformaciones o parálisis al nacimiento...etc.

Debe existir un compromiso de suministrar asesoramiento genético, una vez obtenidos y evaluados los resultados <sup>4</sup>. Es decir, el resultado debe ir acompañado de la información relativa a la trascendencia del diagnóstico realizado, así como de las opciones reproductivas que tiene la pareja en cada caso.

## Alteraciones cromosómicas

Las anomalías cromosómicas se detectan mediante el estudio del cariotipo en diferentes tejidos. Entre pacientes con infertilidad se ha descrito una incidencia global del 2,1 % y 6,1 % en mujeres y varones respectivamente, la mayor incidencia se observa en varones con azoospermia entre los que se alcanza hasta

un 16 %. <sup>5</sup>

Las anomalías cromosómicas numéricas se originan por errores de la división celular, fenómeno conocido como no-disyunción. Consiste en un fallo de la separación de los cromosomas homólogos cuando se encuentran apareados en la placa metafásica, desplazándose ambos hacia un mismo polo. La no-disyunción cromosómica también puede ocurrir durante las primeras divisiones mitóticas de un cigoto normal, formándose dos líneas celulares con distinto número de cromosomas, dando lugar a lo que llamamos mosaicismos. Las alteraciones en el número de los cromosomas o aneuploidías suelen ir asociadas a retraso mental y/o malformaciones congénitas. Cuando afectan al número de los cromosomas autosómicos, que incluyen los pares cromosómicos desde 1 hasta el 22, son muy graves y su gravedad depende del cromosoma implicado. Con respecto a la fertilidad, los portadores presentan en sus gametos a partes iguales óvulos o espermatozoides con 23 ó 24 cromosomas, que tras la fecundación con gametos cromosómicamente normales podrán engendrar embriones cromosómicamente normales o embriones trisómicos, que heredarán el síndrome con una probabilidad del 50 %.

Las aneuploidías de los cromosomas sexuales son menos severas y son las que se observan con mayor frecuencia entre los pacientes que acuden a las clínicas de reproducción. Éstas incluyen los síndromes que se describen a continuación:

- Síndrome de Klinefelter (SK) (47,XXY)
- Varones 47,XXY
- Varón XX / Mujer XY
- Síndrome de Turner (45,X)
- Mujeres 47,XXX.

Entre los varones infértiles cuyo cariotipo es normal y el recuento espermático es bajo, se ha descrito un incremento de espermatozoides con aneuploidías/diploidías. Este efecto puede estudiarse fácilmente mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) de espermatozoides, consiste en marcar con sondas de ADN fluorescentes cromosomas específicos en el núcleo de los espermatozoides en estadio de interfase y nos permite determinar si presentan o no una dotación cromosómica correcta (Fig. 1). En un estudio previo al tratamiento de reproducción asistida podemos evaluar la presencia de anomalías cromosómicas en los espermatozoides de muestras procedentes de eyaculado, epidídimo o testículo, y establecer así el riesgo de transmisión de anomalías

cromosómicas de origen paterno a la descendencia. Las disomías para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y se han correlacionado con un descenso de la concentración y movilidad espermática.

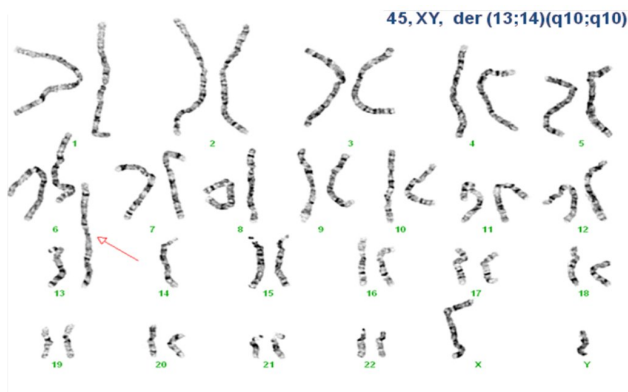


Figura 1. Cariotipo de alta resolución en un varón portador de translocación robertsoniana entre los cromosomas 13 y 14. Fórmula: 45,XY (13;14)(q10;q10).

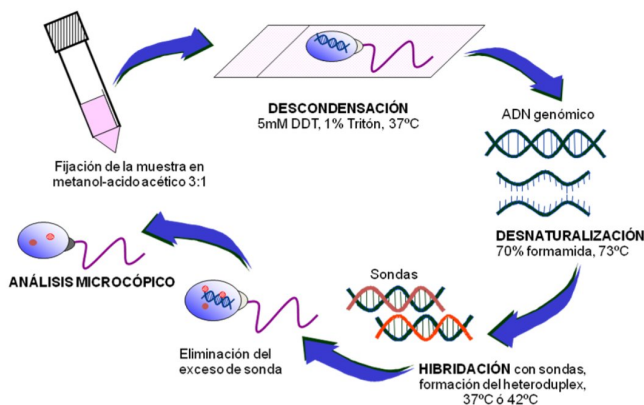


Figura 2. Esquema de la Hibridación in situ fluorescente (FISH) en espermatozoides.

Las alteraciones estructurales pueden originarse por el efecto mutagénico de factores ambientales que producen roturas cromosómicas que conllevan al reordenamiento de estos fragmentos. Las alteraciones estructurales se clasifican en equilibradas si no afectan a la cantidad normal de información genética y desequilibradas si existe información adicional (duplicación de un segmento cromosómico) o pérdida de material genético (delección cromosómica).

Cuando estas anomalías son equilibradas (como las inversiones y algunas translocaciones o inserciones), el material genético queda íntegro, por lo que no tiene efectos adversos sobre el portador, aunque tienen un alto riesgo de producir descendientes con la

alteración en desequilibrio.

El mecanismo por el cual los desequilibrios cromosómicos producen síntomas clínicos es la activación extra o deficiente de genes únicos que se encuentran en trisomía o monosomía y por fallo de la regulación de genes que actúan durante el desarrollo embrionario. Sus efectos sobre la fertilidad son muy variados dependiendo de que se produzca o no un desequilibrio de material genético, así como del cromosoma implicado y la longitud del mismo que esté afectado. Dependiendo del comportamiento de los cromosomas durante la meiosis, se pueden originar desde embriones incompatibles con la vida (abortos espontáneos o mortinatos) o niños con graves malformaciones hasta esterilidad. Las alteraciones estructurales se clasifican en:

- **Translocaciones.** Destacan por su mayor frecuencia y pueden ser translocaciones recíprocas cuando hay intercambio de material entre dos cromosomas no homólogos que tienen una incidencia de alrededor del 0,2 recién nacidos o translocaciones robertsonianas que suceden por la fusión de la región centromérica de los cromosomas llamados acrocéntricos (que son los pertenecientes a los pares 13, 14, 15, 21 y 22) (Fig. 2).
- **Inversiones.** Las inversiones se dividen en dos grupos: pericéntricas, que se producen por rotura en dos puntos de brazos opuestos invirtiéndose el segmento central que contiene el centrómero; y paracéntricas, en las que los dos puntos de rotura se presentan en un mismo brazo, de manera que el segmento que se invierte no contiene centrómero. Los efectos de las inversiones sobre la fertilidad dependen de la longitud del segmento invertido, las inversiones grandes suelen estar asociadas a mayor número de gametos aberrantes (y como consecuencia infertilidad) que las inversiones pequeñas.
- **Cromosomas marcadores.** Son pequeños cromosomas extra en los que con frecuencia es difícil determinar su origen. Su efecto sobre el portador dependerá fundamentalmente del cromosoma del cual se derive y de la región del mismo que contenga. En su mayoría derivan de regiones pericentroméricas y brazos cortos de cromosomas acrocéntricos. Durante la meiosis pueden producir problemas de no disyunción al asociarse a otros cromosomas acrocéntricos.

Actualmente, los arrays de CGH (aCGH) se han incorporado a los servicios de genética como la última herramienta de diagnóstico desarrollada en el ámbito de la citogenética molecular para cubrir las limitaciones de la citogenética convencional. Los aCGH contiene una serie de clones o fragmentos de DNA de todo el genoma, recogidos en secuencias de oligos o

BAC (Bacterial Artificial Chromosome) que están adheridos a un porta y que mediante hibridación comparativa nos permite el análisis simultáneo de dichos fragmentos. Los aCGH nos aportan una alta resolución en la detección de ganancias y pérdidas globales de ADN genómico (Fig.3).



Figura 3. Imagen de PCR multiplex que incluye el análisis de 20 secuencias STS en un control y dos pacientes (P1: Normal, P2: Secuencias delecionadas en Yq).

### Enfermedades monogénicas

#### Microdeleciones del cromosoma Y

Es la segunda causa de esterilidad en el varón después del Síndrome de Klinefelter. El papel del cromosoma Y en la espermatogénesis fue sugerido por Tiepolo y Zuffardi hace más de tres décadas, que encontraron en varones azoospermicos deleciones (pérdida de material genético) visibles al microscopio en el brazo largo del cromosoma Y<sup>6</sup>. En base a estas deleciones se propuso la existencia de un gen de la espermatogénesis en esta región al que llamaron AZF (Azoospermic Factor)<sup>7 8</sup>. Vogt et al. 1996 y Affara et al. 1999 subdividieron esta región en AZFa, AZFb y AZFc (Fig. 4). Las deleciones en estas subregiones ocurren en un rango del 9-18% de varones con azoospermia u oligozoospermia severa de causa idiopática<sup>9</sup>. Actualmente este diagnóstico se aborda mediante un análisis de PCR multiplex, analizando varias secuencias STSs (sequence tagged sites) correspondientes a las distintas regiones AZF (Fig.4).

Detalle del cromosoma 6: 46,XX,del(6)(q13q14.1)

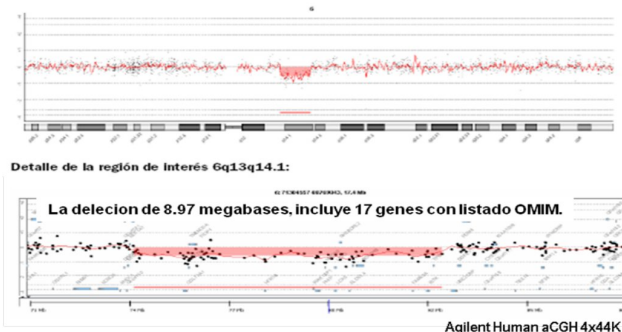


Figura 4. Resultado de array CGH de oligonucleótidos en una paciente con microdelección intersticial en el cromosoma 6.

### Fibrosis Quística (FQ)

La FQ es la alteración autosómica recesiva más frecuente en la raza caucásica, con una incidencia de 1/2400 y una frecuencia de portadores de 1/25.

Está originada por una mutación en el gen CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) localizado en 7q31.2. Se ha demostrado la importancia de realizar un screening de mutaciones de este gen en varones con Agenesia Bilateral Congénita de Vasos Deferentes (ABCVD) en los que este defecto conduce a una azoospermia obstructiva. El gen codifica una proteína de membrana que funciona como transportador iónico y que está implicado en la formación del conducto eyaculador, vesícula seminal, vasos deferentes y los 2/3 distales del epidídimo. La proteína CFTR también está implicada en el transporte de agua y electrolitos a través del epitelio del epidídimo y ayuda a mantener un ambiente óptimo para la maduración y transporte del espermatozoide. Estudios genéticos revelan que entre el 50-83% de los pacientes con ABCVD tienen al menos una mutación conocida en CFTR y que aproximadamente el 10% tienen dos mutaciones conocidas<sup>10 11</sup>. Aunque la ABCVD es genéticamente similar a la FQ, se trata de una entidad clínica distinta. Se encuentra en el 2% de varones con infertilidad pero está con mayor frecuencia asociado a azoospermia obstructiva, bajo volumen seminal y pH ácido.

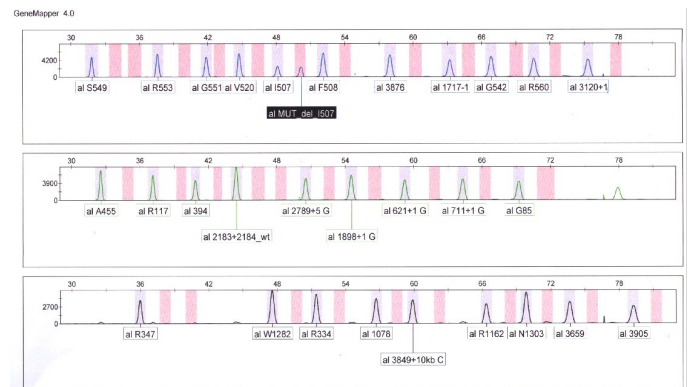


Fig. 5. Análisis de mutaciones del gen CFTR incluidas en el Kit PCR-OLA V.3 de Abbott. Applied Biosistem (AB3130).

Actualmente, se han descrito más de 1.500 mutaciones distintas para la FQ, entre las que la F508 representa el 70% de ellas y junto con el análisis de otras 36 mutaciones de menor frecuencia constituyen más del 87% de las mutaciones descritas para la población europea (Fig.5). Se considera altamente recomendable la realización del estudio molecular en la mujer cuando la pareja es portadora de una mutación FQ o presenta antecedentes familiares<sup>12 13</sup>. Ante la sospecha clínica de esta enfermedad y un resultado de screening negativo, la secuenciación del gen puede permitir el hallazgo de mutaciones no conocidas. La probabilidad de que nazca

un hijo con FQ o ABCVD dependerá de la combinación exacta de dichas mutaciones<sup>14</sup>. El consorcio para el análisis genético de la FQ recoge la información sobre las mutaciones a través de internet (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>).

### Trombofilias

Son alteraciones del sistema de coagulación que generan fenómenos trombóticos, debido a un exceso de producción de factores de coagulación o bien cantidades demasiado bajas de proteínas anticoagulantes que limitan la formación de coágulos.

La mayoría de las mujeres con una trombofilia tiene un embarazo sano, aunque contribuyen a una serie de complicaciones, incluyendo la pérdida fetal durante el segundo o tercer trimestre, desprendimiento de la placenta y crecimiento insuficiente del feto.

Las trombofilias también pueden causar una forma severa de preeclampsia, un trastorno que puede presentar riesgos graves para la madre y el feto que se caracteriza por alta presión arterial y presencia de proteínas en la orina. La combinación de trombofilias puede incrementar el riesgo de pérdida fetal recurrente<sup>15 16</sup>, algunas de las trombofilias descritas son:

- Factor V de Leiden.
- Polimorfismo G20210A del gen de la protrombina.
- Deficiencia de antitrombina III.
- Deficiencia de proteína C.
- Deficiencia de proteína S.
- Mutación del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).

### Fallo ovárico precoz (FOP)

El fallo ovárico precoz o menopausia prematura afecta aproximadamente a una de cada 1000 mujeres. Se caracteriza por amenorrea, hipoestrogenismo y niveles elevados de gonadotropinas en mujeres de menos de 40 años. Se trata de una alteración heterogénea causada por mutaciones en diversos genes, aunque globalmente, se ha identificado alguno de ellos en un pequeño número de pacientes (¡10 %). Las alteraciones cromosómicas se observan con mayor frecuencia en aquellas mujeres más jóvenes e implican mayoritariamente al cromosoma X. Se han descrito dos regiones críticas en Xq13-q22 y Xq22-q27 que deben contener varios genes que determinan la función ovárica, se trata de deleciones o disrupciones que se detectan a nivel submicroscópico.

Aproximadamente el 20-30 % de las mujeres con FOP tienen otra mujer afectada en su familia, lo que sugiere que esta condición tiene predisposición

genética. Las mujeres portadoras de premutación para el síndrome del X-frágil (FMR1) tienen un riesgo incrementado de FOP<sup>17</sup>. El síndrome X-frágil lo produce una mutación dinámica que consiste en un incremento en el número de repeticiones CGG en el gen FMR1. El número de repeticiones que determina el fenotipo de normalidad está entre 6-54 copias sucesivas. Aquellos con un número en el rango de 55-230 repeticiones CGG presentan un estado de premutación sin riesgo para los varones. Las mujeres con premutación pueden incrementar en su descendencia el número de repeticiones dando lugar a una mutación completa con más de 230 repeticiones CGG. Esto produce la hipermetilación de la citosina y como consecuencia de esta hipermetilación se inactiva el gen FMR1 responsable del fenotipo del síndrome X-frágil.

Otra mutación identificada en el receptor de la hormona FSH (FHSR) ha sido la 566C-T que lleva a una pérdida de función de dicho receptor y a fallo ovárico precoz con amenorrea. Por otro lado, la transición 769G¿A en el gen de la inhibina se observa en el 7 % de las pacientes FOP<sup>18</sup>.

### Distrofia Miotónica (DM)

Debe considerarse en pacientes con aborto recurrente (AR) y con historia personal y/o familiar de miotonía (disminución de la capacidad para relajar los músculos contraídos), deterioro cognitivo, debilidad muscular progresiva y comienzo temprano de cataratas. La distrofia miotónica o enfermedad de Steiner es la distrofia muscular más frecuente en el adulto (1/8000). Se transmite con un patrón de herencia autosómico dominante y se caracteriza por una expresividad variable en cuanto a la edad de manifestación de la enfermedad.

El gen de la DM está localizado en el cromosoma 19q13.3 y codifica una proteinkinasa que tiene su función en el músculo esquelético. La mutación que causa la enfermedad es la expansión del triplete repetitivo CTG, localizado en la región 3' no codificante del gen. Se trata de una mutación dinámica sujeta a un fenómeno de anticipación<sup>19</sup>, éste se caracteriza porque los síntomas se manifiestan a edad más temprana en la siguiente generación y además lo hacen de forma más severa (debido a una mayor expansión del triplete).

Las mujeres con DM también presentan hiperandrogenismo que afecta a las hormonas que controlan la fertilidad, las mujeres más jóvenes están menos afectadas. Los varones DM tienen afectada la capacitación y la reacción acrosómica. Si los portadores pueden pasar desapercibidos durante las primeras décadas de su vida, la forma congénita es muy grave<sup>20</sup>.

**Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP)**

El síndrome del ovario poliquístico se ha asociado con una resistencia a la insulina, defectos en la secreción de insulina y un riesgo mayor de desarrollar diabetes tipo II. Los estudios realizados sobre familias con probandos SOP indican que el 24 % tienen hermanas también afectadas <sup>21</sup>.

**Bibliografía:**

- 1. Greenhall E, Vessey M. The prevalence of subfertility: A review of the current confusion and a report of two new studies. *Fertil Steril*. 1990; 54:978-83.
- 2. De Kretser DM. Male infertility. *Lancet*. 1997; 349:787-90.
- 3. Layman, LC. Human gene mutations causing infertility. *J Med Genet*. 2002; 39(3):153-61.
- 4. Ley de Investigación Biomédica, L. 14/2007 de 3 de Julio. Boletín Oficial del Estado. N° 159, (Jul. 4, 2007).
- 5. Gekas J, Thepot F, Turleau C et al. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod*. 2001; 16(1):82-90.
- 6. Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y –chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl* 2004; 27: 240-9.
- 7. Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, et al. Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15; 94:3848-53.
- 8. Kent-First MG, Kol S, Muallem A et al. The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmatic sperm injection and their infertile fathers. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 943-950.
- 9. Kleiman SE, Yogev L, Gamzu R et al. Three-Generation Evaluation of Y- Chromosome Microdeletion. *Journal of Andrology* 1999; 20: 394-398.
- 10. Donat R, McNeill AS, Fitzpatrick DR et al. The incidence of cystic fibrosis gene mutations in patients with congenital bilateral absence of the vas deferens in Scotland. *Br J Urol*. 1997; 79: 74-7.
- 11. Van de ven K, Messer L, Van de ven H et al. Cystic fibrosis mutation screening in healthy men with reduced sperm quality. *Hum Rep* 1996; 11: 513-517.
- 12. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*. 2008; 7:179-96.
- 13. Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Clausures M, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders updated European recommendations. *Eur J Hum Genet*. 2009; 17:51-65.
- 14. Lissens W, Mercier B, Tournaye H et al. Cystic fibrosis and infertility caused by congenital bilateral absence of the vas deferens and related clinical entities. *Hum Reprod* 1998; 11: 55-78.
- 15. Kovalevsky G, Gracia, C R, Berlin, J A, Samuel, MD and Barnhart, K T. Evaluation of the association between hereditary thrombophilias and recurrent pregnancy loss: A meta-analysis. *Arch Intern Med*, 2003: 164 (5): 558-563.
- 16. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: A meta-analysis. *Lancet*, 361(9361), I 901-908.
- 17. Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, et al. Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study-preliminary data. *Am J Med Genet* 1999; 83: 322-5.
- 18. Woad KJ, Watkins WJ, Prendergast D et al. Shelling AN. The genetic basis of premature ovarian failure. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006; 46: 242-4. Review.
- 19. Brunner HG, Bruggenwirth HT, Nillesen W, Jansen et al. Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele size on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM). *Am J Hum Genet* 1993; 53:1016-23.
- 20. Harper, P. (2004). *Practical genetic counseling* (5th ed.). New York: Oxford University Press Inc.
- 21. Legro RS and Strauss JF. Molecular progress in infertility: polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2002; 78: 569-76. Review.