

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Optimización de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación por secuenciación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen *follicle stimulating hormone receptor (fshr)* en una población adulta de la comunidad de la Universidad del Valle de Guatemala.

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por

Jaime Adolfo López Herrera

para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2020

Optimización de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación por secuenciación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen *follicle stimulating hormone receptor (fshr)* en una población adulta de la comunidad de la Universidad del Valle de Guatemala.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Optimización de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación por secuenciación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen *follicle stimulating hormone receptor (fshr)* en una población adulta de la comunidad de la Universidad del Valle de Guatemala.

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por

Jaime Adolfo López Herrera

para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2020

HOJA DE APROBACIÓN

HOJA DE APROBACIÓN

Vo. Bo.

(f)



Dalia Lau-Bonilla PhD.

Tribunal examinador:

(f)



Dalia Lau-Bonilla PhD

(f)



andrea Gomez

MSc. Andrea Gomez

(f)



Licda. Andrea Ramos

Fecha de aprobación del examen de graduación

Guatemala, 30 de junio del 2020

PREFACIO

Aquí quiero contar mi historia en algunos párrafos, quizá en algún futuro se me olvide esto y me dé una grata sorpresa.

Jaime nació en el seno de una familia disfuncional, pero con una madre dispuesta a dar la vida para que a sus cachorros de humano no les falte nada. Toda su infancia fue de pobreza y precariedad, madrugar para ordeñar ganado y cultivar maíz, eran algunas de las actividades que realizaba para ganarse el dinero que llevaría a la escuela para comer; esto y muchas cosas más le enseñaron el valor de las cosas.

Pronto las cosas cambiaron y la economía de su familia mejoró, logrando graduarse y llegar a la universidad. Un gran paso y difícil decisión que tomó por impulso, él solo quería tener una carrera científica para ser feliz y ser alguien en la vida. Su primer año fue muy difícil, se sentía insuficiente, se frustró tanto que quiso abandonar su sueño. Su madre quien tuvo las palabras indicadas para llenarlo de coraje y valentía, lo convenció de terminarla.

Tuvo mucho miedo, no se creyó capaz, pero lo logró. Es más, mientras escribe estas líneas tiene recuerdos tan emotivos que le están llenando sus ojos de lágrimas. Aún no puede decir que todo sacrificio tiene su recompensa, pero en su corazón sabe que sí.

En el espacio que me queda quiero agradecer a las personas que directa o indirectamente estuvieron involucradas en la elaboración de este trabajo, agradezco especialmente a:

Mi madre, pilar fundamental y amor de mi vida. Mi ejemplo para seguir porque es una mujer esforzada y de corazón sencillo y humilde.

Mis asesores de tesis, especialmente a Dalia Lau-Bonilla quien aparte de apoyarme con su conocimiento también con su amistad, lo que hizo el proceso.

Mi directora de carrera y docentes por regalarnos algo invaluable como lo es el conocimiento. Pero especialmente a Krizstina Ríos-González, por ser un paño de lágrimas y casi mi segunda madre, darme guía y palabras de apoyo cada vez que me veía en los pasillos de la universidad.

Mis compañeros que se convirtieron en mi familia, y una muy bonita. Quisiera agradecer personalmente a cada uno, pero no me alcanzaría este espacio, solo diré que los amo, y tienen su espacio en mi corazón.

Fredy Mejía, Andrea Ramos y Pamela Pennigton por darme las ideas y ayudarme a consolidar mi trabajo de tesis.

Quien esté leyendo esto, solo te pido un favor,

Sé feliz

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	2
3. JUSTIFICACIÓN.....	3
4. OBJETIVOS.....	4
4.1 General.....	4
4.2 Específicos	4
5. HIPÓTESIS.....	5
5.1 Hipótesis.....	5
6. MARCO TEÓRICO.....	6
6.1 Infertilidad.....	6
6.1.1 Causas de la infertilidad	7
6.2 Técnicas de reproducción asistida.....	8
6.2.1 Estimulación ovárica controlada	8
6.2.1.1 Riesgos de la estimulación ovárica controlada.....	8
6.3 Hormona foliculoestimulante	8
6.3.1 Bioquímica de la FSH.....	9
6.3.2 Función de la FSH.....	10
6.3.3. Deficiencias en la función de la FSH.....	10
6.3.4 Proteína receptora de la hormona foliculoestimulante.....	10
6.3.5 Gen receptor de la hormona foliculoestimulante (- <i>fshr</i> -).....	13
6.3.6 Polimorfismos	14
6.4 Métodos de análisis.....	14
6.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa	14
6.4.2 Electroforesis en gel	16
6.4.3 Secuenciación capilar por método de Sanger.....	17
6.4.4 Análisis de homología de secuencia	18
6.5 Análisis estadístico.....	18
6.5.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	18
6.5.2 Análisis de presión selectivo McDonald-Kreitman	19
7. METODOLOGÍA.....	21
7.1 Aprobación del protocolo por el comité de ética	21
7.1.1 Elaboración del protocolo.....	21

7.1.2 Aprobación del protocolo	21
7.2 Sitio de estudio	21
7.3 Sujetos de estudio	21
7.4 Proceso de reclutamiento.....	21
7.5 Aspectos éticos	22
7.5.1 Consentimiento informado	22
7.5.2 Riesgos y beneficios	22
7.5.3 Aspectos de confidencialidad.....	22
7.5.4 Conflicto de intereses	23
7.6 Diseño de la investigación.....	23
7.6.1 Diseño.....	23
7.7 Criterios de inclusión y exclusión	23
7.7.1 Criterios de inclusión.....	23
7.7.2 Criterios de exclusión	23
7.8 Variables	24
7.8.1 Operacionalización de variables.....	24
7.9 Instrumentos de medición.....	24
7.10 Métodos.....	25
7.10.1 Recolección de la muestra.....	25
7.11 Extracción de ADN.....	25
7.11.1 Extracción 1.	25
7.11.2 Extracción 2.	25
7.11.3 Extracción 3.	25
7.12 Cuantificación del extracto	25
7.13 Reacción en cadena de la polimerasa	25
7.14 Revelación por electroforesis en gel	27
7.15 Secuenciación de fragmentos amplificados	27
7.16 Análisis de homología de secuencia.....	28
7.17 Análisis estadístico.....	28
7.17.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	28
7.17.2 Prueba de McDonald-Kreitman.....	28
7.18 Muestras finales	28
7.19 Comunicación de resultados	28
8. RESULTADOS	30
8.1 Obtención de muestras	30
8.2 Extracción de ADN.....	30
8.3 Optimización de la PCR.....	30

8.4 Análisis de secuenciación.....	33
8.4.1 Comparación de los genotipos (polimorfismos) identificados en la alineación de secuencias.....	33
8.5 Análisis estadístico.....	34
8.5.1 Cálculo de frecuencias alélicas.....	34
8.5.2 Determinación de la presión selectiva	34
9. DISCUSIÓN.....	36
10. CONCLUSIONES	42
11. RECOMENDACIONES	43
12. LITERATURA CITADA.....	44
13. ANEXOS	51
Anexo 1. Carta de aprobación de comité de ética	51
Anexo 2. Texto de la nota informativa que se compartirá vía electrónica.....	52
Anexo 3. Infografía informativa.	53
Anexo 4. Texto de la tarjeta de contacto.	54
Anexo 5. Consentimiento informado.	55
Anexo 6. Declaración del consentimiento informado.	59
Anexo 7. Encuesta que se les pasó a los participantes para recopilar sus datos.....	60
Anexo 8. Diagrama de flujo del proceso de extracción del <i>PureLink® Genomic DNA Kit</i>	61
Anexo 9. Diagrama de flujo del proceso de extracción del <i>MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit</i>	62
Anexo 10. Diagrama de flujo del proceso de extracción del <i>High Pure PCR Template Preparation Kit</i> . 63	
Anexo 11. Protocolo de trabajo del <i>Platinum™ II Hot-Start PCR Master Mix (2X)</i> de Invitrogen.	64
Anexo 12. Diagrama de flujo del proceso de cuantificación de ADN de doble hebra por <i>Quantus Fluorometer™</i>	65
Anexo 13. Procedimiento de análisis de secuencias.....	66
Anexo 14. Comunicación de resultados.	67
Anexo 16. Datos utilizados y criterios evaluados para la prueba de McDonald-Kreitman.....	69
14. GLOSARIO.....	70

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Conceptualización, operacionalización y clasificación de las variables.....	24
Cuadro 2. Condiciones finales para reacción en cadena de la polimerasa, para un volumen final de 25 μ l.....	25
Cuadro 3. Cebadores específicos para la región que se desea amplificar el exón 10 del gen <i>fshr</i> . El fragmento esperado es de 520pb.	26
Cuadro 4. Modificaciones a las condiciones de amplificación del fragmento del exón 10 de gen <i>fshr</i>	27
Cuadro 5. Análisis <i>in silico</i> de la fidelidad de los cebadores a la región objetivo.	30
Cuadro 6. Comparación de la prevalencia de los genotipos identificados en el estudio con la prevalencia mundial.	33
Cuadro 7. Frecuencias alélicas encontradas por medio de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg.	34
Cuadro 8. Determinación de las fuerzas disruptivas que involucradas en la selección de genotipos por medio de la prueba de McDonald-Kreitman.	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consecuencias de la infertilidad.	6
Figura 2. Estructura tridimensional de la FSH humana.	9
Figura 3. Secuencia y estructura tridimensional del receptor de la FSH humana.	11
Figura 4. Rutas de transducción de señales que puede utilizar el acoplamiento de la FSH con el FSHR y los posibles resultados de esta.	12
Figura 5. Localización en el genoma y niveles de expresión en diferentes tejidos del gen <i>fshr</i>	13
Figura 6. Esquema del procedimiento de amplificación del fragmento (principio de la reacción en cadena de la polimerasa).	15
Figura 7. Electroforesis en gel al 2.50% teñido con bromuro de etidio y visualizado en transiluminador, escalera TrackIt100 100pb DNA Ladder.	16
Figura 8. Representación del proceso de lectura de las bases y los resultados obtenidos. ..	17
Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología.	29
Figura10. Electroforesis en gel de agarosa al 2.50% de productos de PCR de un fragmento amplificado del <i>fshr</i>	31
Figura11. Gel de agarosa al 2.50% con productos de PCR de un fragmento amplificado del <i>fshr</i> de las muestras que se enviaron a secuenciar.	32
Figura12. Secuencia de ADN específica para cada variante genotípica.	33

RESUMEN

La hormona Foliculoestimulante (FSH por sus siglas en inglés), es la encargada del proceso de maduración de gónadas durante la pubertad, su señalización es recibida por la proteína receptora de la hormona foliculoestimulante, esta proteína se expresa en las células de la Granulosa en los ovarios y Sertoli en los testículos.

Pertenece a los receptores acoplados a las proteínas G, que son señalizadores moleculares que activan las rutas de transducción de señales de IP3, MAPK y ERK, siendo estas las responsables de la cascada de maduración folicular. Este proceso se ve interrumpido por varios factores, pero el interés en este trabajo son los polimorfismos de un solo nucleótido en el codón 680 del exón 10 del gen *fshr*, específicamente el que determina la expresión de la variante ser/ser en esta posición. Este estudio es de importancia debido a las implicaciones fisiológicas que puede provocar la expresión esta variante del gen en la salud reproductiva de los pacientes.

Estudios realizados por Simoni y Gromoll 2000-2014, en poblaciones a nivel mundial se observó una relación entre ovario poliquístico y baja reserva ovárica con la expresión de serina en la FSHR. Asimismo, en hombres, se asoció con deformaciones de los espermatozoides y cáncer testicular. Otra implicación que tiene la expresión de serina en la salud reproductiva es que en técnicas de reproducción asistida (TRA), donde se usan tratamientos de estimulación ovárica controlada (EOC), se ha visto que las mujeres que expresan la variante ser/ser son resistentes a la estimulación, lo que tarda y encarece el proceso.

Al tener un método de diagnóstico para la detección de las variantes genéticas asociadas al *fshr*, se podría personalizar el tratamiento EOC, obteniendo mejores resultados e incrementando las probabilidades de embarazo. Por lo tanto, en este estudio se propuso optimizar un protocolo de PCR y su posterior secuenciación con el objetivo de determinar la existencia de la variante ser/ser a partir de técnicas de toma de muestra no invasivas.

1. INTRODUCCIÓN

En la última década, la infertilidad ha incrementado hasta convertirse en un problema de salud pública en países como Estados Unidos y Europa. Hay muchas causas que pueden llevar a la infertilidad, estas se dividen en cuatro: factor masculino, femenino, mixto y de causa desconocida. Las personas asisten a clínicas de fertilidad que se dedican a realizar las técnicas de reproducción asistida (TRA), para lograr concebir. Estas técnicas involucran tratamientos de estimulación ovárica controlada (EOC), para incrementar la producción de óvulos y, por lo tanto, aumentar la probabilidad de lograr un embarazo y llevarlo a término.

Este tratamiento puede fracasar por varios motivos como inyección de bajas concentraciones de hormonas, baja reserva ovárica, entre otros. El principal es el fallo en el metabolismo de la Hormona Foliculoestimulante (FSH), que es una de las hormonas utilizadas en la estimulación ovárica controlada. Generalmente la falla consiste en la recepción de la hormona por parte de las células que expresan receptores para FSH, las cuales son las células de la Granulosa y las de Sertoli, ambas involucradas en el desarrollo y maduración folicular durante los ciclos fértiles. Impidiendo el crecimiento de los folículos, llevando al fracaso los tratamientos con EOC, que además son costosos y prolongados.

Determinar la variante genética expresada en la paciente facilitaría el proceso de EOC. Las investigaciones de Castro *et. al.* 2003, muestran que las mujeres que expresan serina en el codón 680 de la FSHR (ser680ser), tienden a ser resistentes a los tratamientos hormonales, pero si se incrementa la concentración de 100UI (Unidades Internacionales) diarias a 10,000 de FSH tiene los mismos resultados que una mujer que expresa asparagina en la misma posición. Por lo tanto, se podría personalizar el tratamiento, incrementando las probabilidades de embarazo y reduciendo tiempo y costos por tratamientos fallidos.

A través de este trabajo, se propone la optimización del método de PCR y análisis de homología de secuencias como método diagnóstico para identificación de polimorfismos en el codón 680 del gen fshr.

2. ANTECEDENTES

A nivel mundial la incidencia de la infertilidad ha aumentado en la última década, de un aproximado de 7-8% en el 2010 a un 15% al 2015. Las causas son muchas y variadas, y alrededor de 20% son desconocidas. Las causas se atribuyen a cuatro factores: masculino, femenino, mixto y desconocido. Entre las últimas, la causa es generalmente genética y en los últimos años su investigación ha crecido.

La principal causa adscrita al factor femenino es el ovario poliquístico, condición en la que se relacionan los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés).

Kuijper *et. al.* 2010, realizó una revisión de varios estudios donde correlacionaban los tres alelos con diferentes factores como baja reserva ovárica, ciclos menstruales irregulares, síndrome de ovario poliquístico (SOP) y endometriosis. La relación más evidente fue con SOP, por lo tanto, puede existir la probabilidad que el polimorfismo en el gen *fshr* del exón 10 codón 680, puede expresar una variante recesiva y así provocar infertilidad. En ese mismo estudio se observó la prevalencia de las tres variantes del codón.

Adicionalmente se observó que en etnias nativas de África y América la variante ser/ser no es prevalente como en las poblaciones caucásicas, siendo esta 21.5% en caucásicos y 10.4% en asiáticos.

En América solo se tiene información sobre la variante serina en poblaciones de Estados Unidos, México, Colombia, Brasil y Argentina (Marino *et. al.*, 2014; M Simoni, Nieschlag, & Gromoll, 2002). No hay estudios en la región mesoamericana sobre la existencia del polimorfismo ser680ser (el cual está relacionado con los síntomas y condiciones mencionados anteriormente) y menos de la prevalencia de este en la región. Por lo tanto, este sería el primer estudio genético que existiría. El cual sentaría las bases para futuras investigaciones en el campo.

Los mismos cebadores empleados por Gromoll *et. al.* 1996 para el estudio de las variantes genéticas del codón 680 del *fshr*, se han venido utilizando en los estudios sobre genética poblacional y sus implicaciones en la salud reproductiva, anteriormente mencionados.

3. JUSTIFICACIÓN

La infertilidad es la incapacidad para lograr un embarazo después de un año manteniendo relaciones sexuales sin usar métodos anticonceptivos (OMS, 2016). Esta condición tiene consecuencias psicológicas y sociales en las personas que la padecen. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), hasta el 2015, aproximadamente 10 a 15% de las parejas en edad reproductiva padecían infertilidad, y Guatemala no es la excepción. En nuestro país existen centros que ofrecen técnicas de reproducción asistida a las parejas que sufren de infertilidad. Estas técnicas involucran tratamientos de estimulación ovárica controlada (EOC) con gonadotropinas como la hormona folículo estimulante (FSH) que pueden ser recombinante y/o urinaria. Debido a variaciones en la expresión del receptor de FSH (FSHR), las estimulaciones ováricas controladas no siempre son eficaces y resultan en una respuesta mínima o nula al tratamiento. Además, en hombres, el gen *fshr* se ha vinculado con funcionamiento anormal de las células de Sertoli y espermatogénesis incompleta (Desai, Roy, & Mahale, 2013).

En Guatemala se desconoce la existencia y prevalencia de los polimorfismos del *fshr*. Por lo tanto, en este estudio tiene como objetivo optimizar un método de detección de polimorfismos por medio de secuenciación, asociados al receptor de la hormona folículo estimulante (FSH) y su posible potencial como método de diagnóstico. Además, determinar las frecuencias alélicas en la población de la comunidad de la Universidad del Valle de Guatemala. Este estudio beneficiaría a las mujeres que en algún futuro deseen someterse a tratamientos de reproducción asistida con la personalización de su tratamiento, disminuyendo el fallo y el costo de este, además incrementando la probabilidad de embarazo.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Optimizar un protocolo de PCR para determinar la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el codón 680 del gen *fshr* en una población adulta de la comunidad de la Universidad del Valle de Guatemala

4.2 Específicos

1. Optimizar factores de reacción para el protocolo de PCR propuesto.
2. Establecer la técnica de secuenciación como método de análisis diagnóstico de polimorfismos de un solo nucleótido en el codón 680 del gen *fshr*.

5. HIPÓTESIS

5.1 Hipótesis

Es factible detectar mutaciones puntuales de tipo polimorfismo de un solo nucleótido en el exón 680 del gen *fshr* que codifica para el receptor de la Hormona Foliculoestimulante detectables por medio de homología de secuencia.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 Infertilidad

La infertilidad se define como la incapacidad de una pareja sexualmente activa y no anticonceptiva de lograr un embarazo durante un año (Brugo-Olmedo, Chillik, & Kopelman, 2003). Es difícil hacer un aproximado de la cantidad de parejas infértiles a nivel mundial, pero la Organización Mundial de la Salud al 2008 estimó que cerca de 8 a 12% de las parejas se pueden ver afectadas. Aunque en regiones como en Europa Oriental y Asia Central, estos datos alcanzan el 30% (Nachtigall, 2006).

Cada día se reportan más casos de parejas infértiles a nivel mundial, y ya está reconocida como un problema de salud pública por la Organización Mundial de la Salud (Boivin, Bunting, Collins, & Nygren, 2007). La infertilidad en las parejas suele involucrar problemas psicológicos y sociales (Gurunath, Pandian, Anderson, & Bhattacharya, 2011).

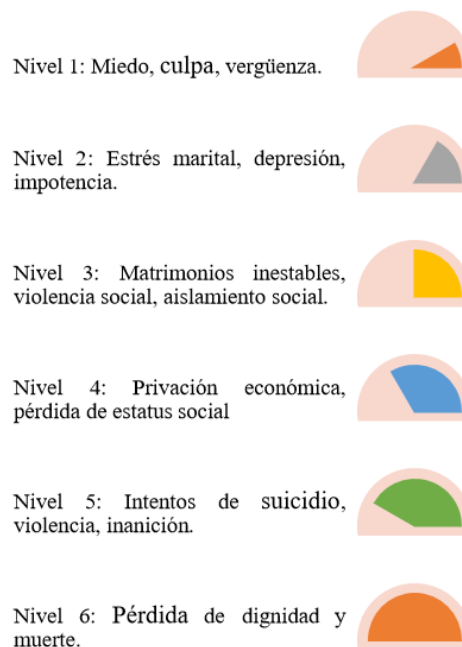


Figura 1. Consecuencias de la infertilidad.

En la Figura 1, propuesta por Datta *et. al.* 2016 en varias ciudades se ha visto este patrón, comúnmente en la mayoría de los casos a nivel mundial se alcanza el nivel 2

(especialmente en Asia y África) y en otros casos nivel 3, pero menos frecuente (Datta *et. al.*, 2016; Ombelet, 2011; Ombelet W., 2008; Pennings, 2008).

6.1.1 Causas de la infertilidad

Muchas de las causas de la infertilidad se desconocen debido a que no hay mucha investigación en el campo (Inhorn & Patrizio, 2015); algunas de las que se han reportado a nivel mundial de factor femenino son: desórdenes menstruales, problemas en las trompas de Falopio, problemas uterinos, desórdenes sexuales, deficiencia ovárica (Roupa Z *et. al.*, 2009). En hombres las causas suelen ser: desórdenes en la producción del semen, fallo testicular, obstrucción de los uréteres, varicocele, criptorquidismo e idiopáticos (Sakthivel & Thangaraj, 2009), estos como factores intrínsecos del cuerpo humano, entre los extrínsecos lo lideran las infecciones de transmisión sexual (ITS), además existe el riesgo de transmisión vertical de madre a hijo, complicando el parto y en muchos casos induciendo el aborto (Olooto, Amballi, & Banjo, 2012).

La incidencia de la infertilidad está asociada a las diferencias geográficas y étnicas, debido a las condiciones de vida y factores genéticos que predisponen a las poblaciones a ser infértiles (Roupa Z *et. al.* 2009). Estudios como los de Datta *et. al.*, 2016; Inhorn & Patrizio, 2015; Mascarenhas, Flaxman, Boerma, Vanderpoel, & Stevens, 2012 experimentaron con las variables antropométricas y establecieron relaciones indirectas con factores genéticos que pueden afectar la salud reproductiva de los seres humanos.

La mayoría de estos casos suele tratarse por técnicas de reproducción asistida (TRA), a las cuales solo personas con un nivel socioeconómico estable/pudiente pueden acceder, por lo costoso del método, y cuando no es así, algunas personas se endeudan o pierden mucho dinero en el proceso (Inhorn & Patrizio, 2015).

6.2 Técnicas de reproducción asistida

La técnica más conocida es la Inseminación Artificial, que suele ser el primer intento para tratar los problemas de fertilidad, antes de las técnicas más especializadas y con mayores porcentajes de efectividad como la Fecundación *in vitro* (IVF por sus siglas en inglés) y/o la Inyección Intracitoplásmica Espermática (ICSI por sus siglas en inglés) que son procedimientos más invasivos y con mayor precio.

6.2.1 Estimulación ovárica controlada

Una de las alternativas para tratar la infertilidad en mujeres es la estimulación ovárica controlada (EOC), esta es una hiperestimulación de las gónadas para que se produzca la maduración de más de un folículo y así poder elevar la tasa de fecundación e implantación en mujeres infértiles (Cakmak, Zamah, Katz, Cedars, & Rosen, 2012). Principalmente se inyectan gonadotropinas (moléculas estimuladoras de las gónadas, principalmente hormonas peptídicas), pero también se utilizan fármacos que estimulan la producción de la FSH a nivel hipofisiario, como resultado se produce una sobreproducción de la hormona, la cual tiene el mismo efecto que si se inyecta la hormona recombinante (Beall & Decherney, 2012).

6.2.1.1 Riesgos de la estimulación ovárica controlada

La EOC es un método efectivo para la producción de folículos maduros en mujeres incapaces de producir FSH o bien que la producen, pero no son sensibles a esta; el principal problema o riesgo es la respuesta que tienen las pacientes a la estimulación con la hormona foliculoestimulante recombinante (rFSH), ya que pueden padecer el síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO por sus siglas en inglés), donde se produce una cantidad anormal de folículos maduros, y en algunas ocasiones de baja calidad (Szló *et. al.*, 2003).

6.3 Hormona foliculoestimulante

La hormona foliculoestimulante (FSH) es secretada por la glándula pituitaria o hipófisis en el cerebro, se considera una gonadotropina porque actúa en las glándulas sexuales de los hombres como de las mujeres, es un ente regulador importante y crítico en la fisiología reproductiva humana y de muchas especies de mamíferos (Das & Kumar, 2018).

Consta de dos subunidades monoméricas, la subunidad α compuesta por 92 aminoácidos y la β por 111; enlazadas a moléculas de azúcar que pueden ser fucosa, galactosa, ácido-N-acetilgalacturónico, ácido-N-acetilglucorónico, manosa y ácido siálico (Ulloa-Aguirre, Timossi, Barrios-De-Tomasi, Maldonado, & Nayudu, 2003); estos carbohidratos son de suma importancia, ya que de ellos depende la vida media de la hormona, función, especificidad, etc (Rafiq *et. al.*, 2016; Swanson, Dickey, & Campbell, 2003).

6.3.1 Bioquímica de la FSH

La FSH es codificada por los genes *cga* (Chronic gonadotropin subunit Alpha) y *fshb* (Follicle-stimulating hormone subunit beta) (NCBI, 2008). Consta de 203 aminoácidos y la subunidad más importante es la β , es la que se encarga de darle la identidad a la hormona y su actividad biológica (Jiang *et. al.*, 2012). La regulación transcripcional del gen se ve afectada positivamente por la acción cAMP; esto incrementa la producción del factor liberador de las gonadotropinas (GnRH por sus siglas en inglés) producidas por el hipotálamo, que estimula la producción de FSH en la glándula pituitaria (Das & Kumar, 2018).



Figura 2. Estructura tridimensional de la FSH humana.

En la Figura 2 se observan las dos subunidades de las que se compone la hormona peptídica, solo se muestra es esqueleto proteico, debido que las unidades de carbohidratos varían entre individuos y ciclos hormonales.

6.3.2 Función de la FSH

En mujeres, su acción es necesaria para el desarrollo folicular y la producción de estradiol, engrosamiento del endometrio y las glándulas cervicales que producen la mucosa vaginal (Ng, Yeung, & Fong, Daniel Tak, 2003). En hombres, es esencial para la regulación de las células de Sertoli y la espermatogénesis. Su principal función es prevenir la apoptosis de los precursores espermáticos y espermatozoides (Desai *et. al.*, 2013; Papanikolaou *et. al.*, 2019).

6.3.3. Deficiencias en la función de la FSH

La hormona está involucrada con la maduración de las gónadas, función que no puede ejecutar cuando existen mutaciones puntuales en el exón 10 codón 680, esto implica un cambio estructural, lo que impide la activación de la cascada de maduración gonadal (Papanikolaou *et. al.*, 2019). Estudios como los de Marino en el 2014 y Desai en el 2013, vinculan la deficiencia de FSH con cáncer testicular, ovario poliquístico, infertilidad no hereditaria, desbalance en los niveles de LHR y TSHR, síndrome de hiperestimulación ovárica, entre otros síntomas. Hay que tomar en cuenta que estos síntomas no son combinados, cada individuo puede padecer de alguno o ninguno (Desai *et. al.*, 2013; Marino *et. al.*, 2014). Esto puede tener distintas causas, comúnmente se estudia la estructura tridimensional de la FSH para saber si es por algún mal plegamiento de esta, pero se ha observado que la mayoría de personas que padecen los síntomas tienen niveles basales adecuados la hormona y su estructura está intacta; lo que indica que no es la hormona per se, sino la recepción de la misma; por lo que en los últimos años se ha estudiado que rol cumplen los receptores, en el metabolismo y los mecanismos de transducción de señales en la maduración de la gónadas (Ulloa-Aguirre, Reiter, & Crepieux, 2018).

6.3.4 Proteína receptora de la hormona foliculoestimulante

Estos receptores están presentes en la membrana de las células gonadales, en los testículos están localizados en las células de Sertoli, y en los ovarios en las células de la Granulosa. Su expresión es exclusiva para este tejido, tanto en animales como humanos; la

transducción de señales de estos receptores se lleva a cabo por receptores acoplados a proteínas G, que activan las cascadas de MAPK y ERK entre otras, en la Figura 4 se observan algunas de las vías de transducción de señales, aún no se conoce qué mecanismo activan, pero se ha comprobado su intervención en dichas funciones de la FSHR (Das & Kumar, 2018; Fock-Chow-Tho *et al.*, 2014; Kumar, Burgess, & Gulbis, 2014).

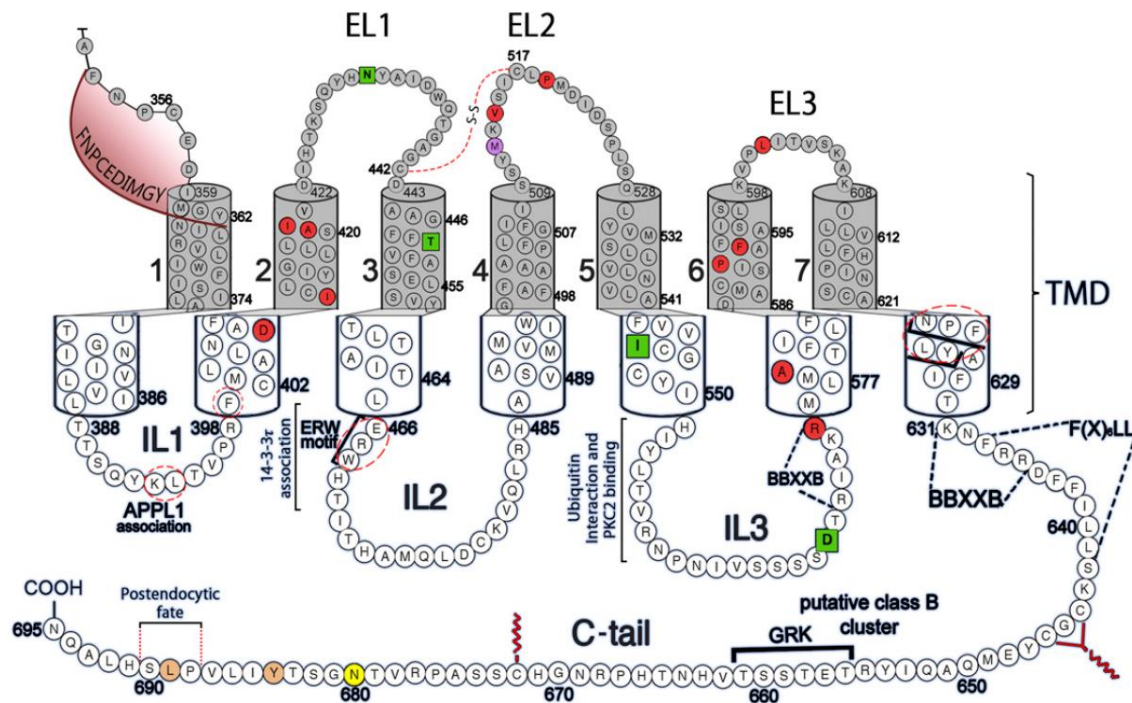


Figura 3. Secuencia y estructura tridimensional del receptor de la FSH humana.

La proteína está compuesta por 695 aminoácidos, y siete dominios transmembrana (TMD); la parte gris representa la región extracelular y la blanca la intracelular. En la Figura 3 se muestra la secuencia específica de la proteína y la organización (posición) dentro y fuera de la membrana celular; la mutación específica de interés está de color amarillo, exón 680 en este caso se muestra con asparagina (N) en la secuencia que es el alelo dominante. Modificaciones en los aminoácidos de color rojo involucran una inactivación de la proteína y los color verde, inducen una activación (Ulloa-Aguirre *et al.*, 2018; Ulloa-Aguirre & Timossi, 1998).

En la Figura 4 se muestra el sistema de transducción de señales más utilizado por las proteínas G como segundos mensajeros, en el mapa se muestran IP3 y cAMP. La interacción de las FSH con el FSHR tiene importancia bioquímica, debido que puede inducir la maduración que involucra la expresión de nuevos genes y activación de rutas de metabólicas diferentes para adaptarse a la nueva etapa, por ejemplo, las células de la granulosa alimentan de piruvato a las vesículas germinales, hasta que madura a ovocito en metafase II, en este estadio puede empezar a utilizar glucosa como fuente de energía en el cual se muestra un evidente cambio del metabolismo. (Loreti *et. al.*, 2013)

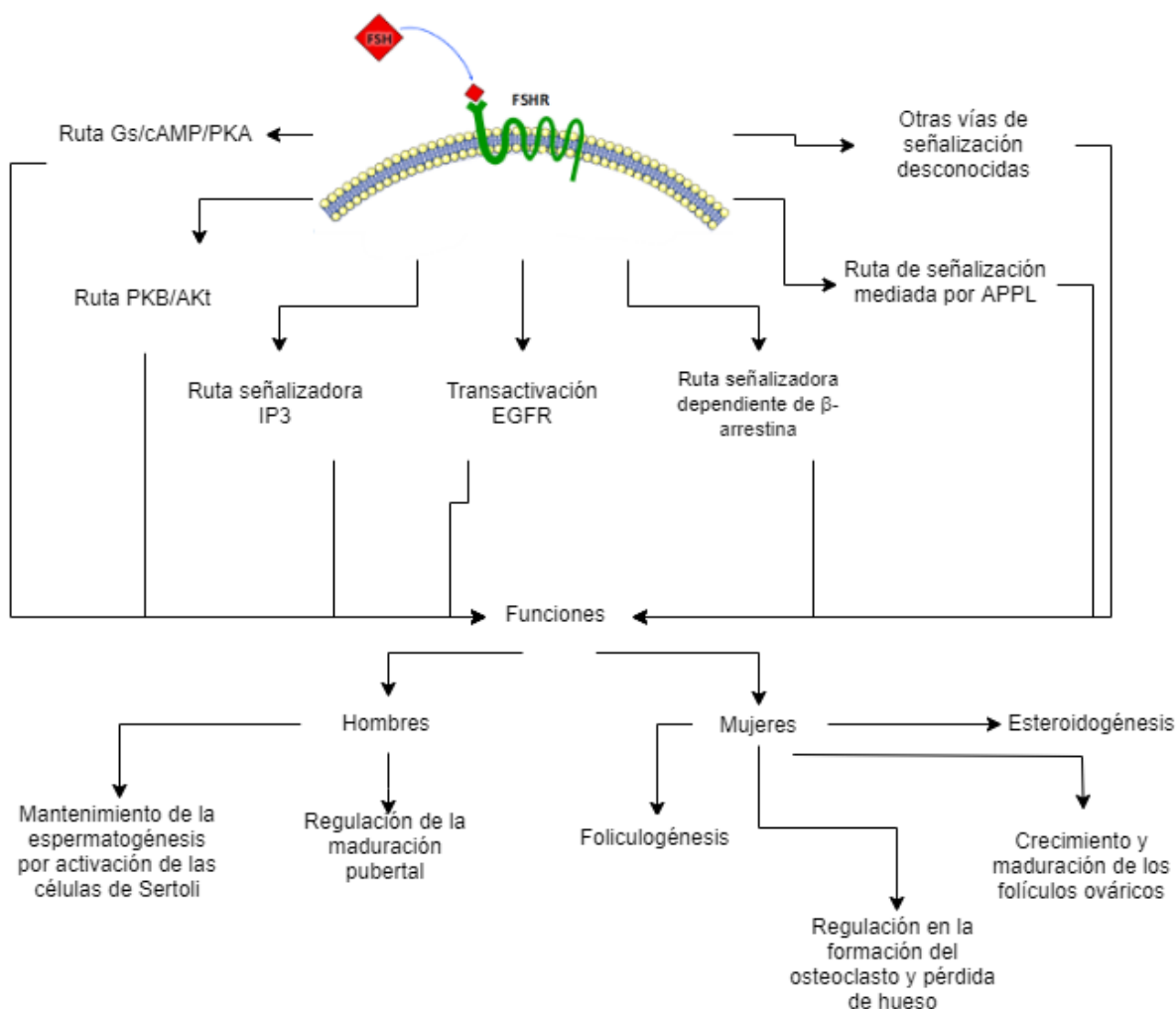


Figura 4. Rutas de transducción de señales que puede utilizar el acoplamiento de la FSH con el FSHR y los posibles resultados de esta.

La FSH no solo es necesaria para la maduración de las gónadas sino en funciones vitales como mantener el equilibrio de la formación y destrucción del sistema óseo, dada su estrecha relación con la vitamina D (Das & Kumar, 2018).

6.3.5 Gen receptor de la hormona foliculoestimulante (-*fshr*-)

El gen que codifica a la proteína receptora de la hormona foliculoestimulante es el *fshr*, se encuentra en el cromosoma 2, en la posición específica 2p16.3; el tamaño de la secuencia es de 192kb; posee 10 exones y 9 intrones que abarcan 54kb de ADN genómico, y el exón más largo es el décimo que mide 1,234pb (Achrekar *et. al.*, 2009).

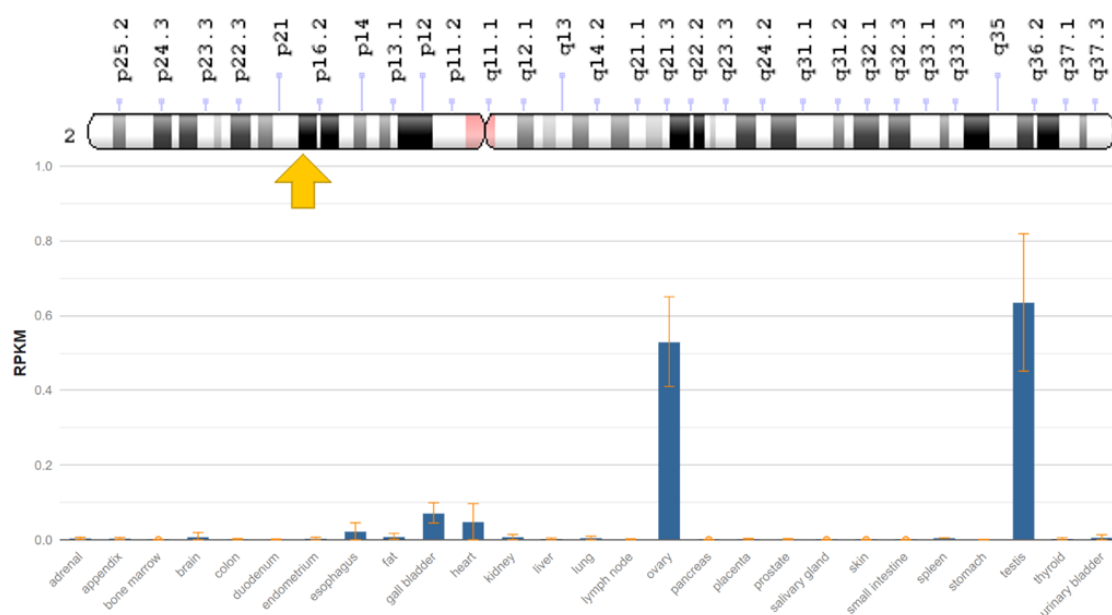


Figura 5. Localización en el genoma y niveles de expresión en diferentes tejidos del gen *fshr*.

La posición específica del gen es en el brazo pequeño del cromosoma 2 banda 1, región 6, subregión 3; los niveles de expresión son mayores en testículos y ovarios en comparación de los demás tejidos, aunque se observa una expresión menor en corazón y vesícula biliar (NCBI 2019).

6.3.6 Polimorfismos

Cerca del 99.9% del genoma humano es parecido entre individuos presentándose un 0.1% de varianza en la secuencia, lo que se conoce como polimorfismos genéticos, estos son la base la evolución de las especies, debido a que ciertas mutaciones específicas otorgan características únicas y ventajosas a los individuos. Estos se pueden producir de diferentes formas, por ejemplo, errores en el mecanismo de replicación y reparación del ADN, también por factores ambientales como exposición a luz UV y/o sustancias mutagénicas. Existen diferentes tipos de mutaciones los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), polimorfismos de secuencias repetidas (mini satélites, microsatélites, STR y LTR). En este caso, el interés está en los SNP; que son mutaciones puntuales donde cambia solo una base de la secuencia. Los seres humanos son diploides, por lo tanto puede poseer tres genotipos cuando se produce un SNP, homocigoto para el genotipo dominante, heterocigoto u homocigoto para el genotipo recesivo (Caratachea, 2007; Sakthivel *et. al.*, 2011).

6.4 Métodos de análisis

6.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa

6.4.1.1 Principio y limitaciones

Es una técnica utilizada en la biología molecular para amplificar segmentos específicos de ADN en grandes ordenes de magnitud (Joshi & Deshpande, 2011). Permite tener copias de fragmentos de ADN con alta fidelidad, es muy útil para diagnóstico clínico, investigación, medicina forense y salud pública (Lynch & Brown, 1990). El ensayo requiere principalmente del ADN, cebadores, nucleótidos, ADN-polimerasa y Cloruro de Magnesio, todo esto se mezcla y se incuba en un termociclador, este equipo proporciona rampas de temperatura esenciales para que se amplifique la secuencia (Giasuddin, 1995).

La principal ventaja es la facilidad del método, también la fidelidad de las copias y la especificidad; pero una desventaja es que es un método tardado, se necesita conocer la secuencia de ADN que se analiza y los productos de amplificación deben ser cortos máximo 2Mb (Garibyan & Avashia, 2014).

La reacción consta de tres pasos específicos los cuales son desnaturalización, alineamiento y extensión; en la primera etapa la doble hebra de ADN se separa para que la ADN-polimerasa pueda acceder a la secuencia. En la segunda etapa del proceso los cebadores se unen a la secuencia blanco, y en la tercera la polimerasa se activa y empieza el proceso de extensión que consisten el realizar una hebra complementaria a la plantilla (Garibyan & Avashia, 2014).

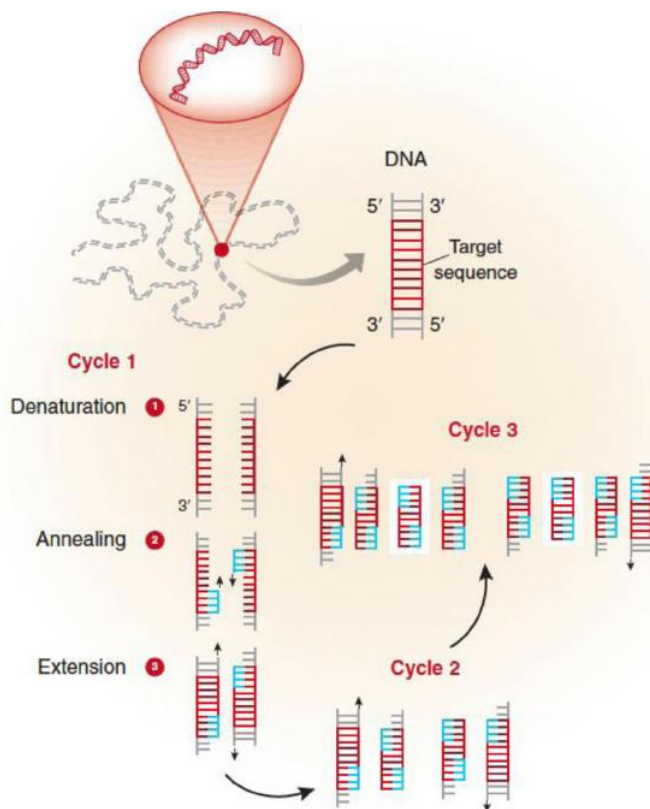


Figura 6. Esquema del procedimiento de amplificación del fragmento (principio de la reacción en cadena de la polimerasa).

La secuencia en rojo denota el fragmento objetivo que se desea amplificar; las secuencias en azul se refieren a los cebadores específicos para el fragmento objetivo.

Para corroborar que el fragmento de ADN se amplificó correctamente se necesita realizar una revelación como prueba confirmatoria, cada PCR comúnmente viene acompañado de una electroforesis en gel que permite visualizar el producto de ampliación.

6.4.2 Electroforesis en gel

Es una técnica de separación por un campo eléctrico que fluye de las cargas positivas hacia las cargas negativas, estas mismas están asociadas con biomoléculas, por eso se utiliza para separarlas, a este fenómeno se le conoce como atracción electrostática (Rabindra & Raju, 2012). La separación se debe realizar en una matriz porosa y viscosa que sea capaz de soportar el campo eléctrico al que se expone; los más utilizados son agarosa para separar ADN y poliacrilamida para proteínas. Dicha

separación tiene factores importantes como voltaje, carga neta, razón masa/carga, forma y temperatura de la molécula, porosidad y viscosidad de la matriz de separación. Para poder visualizar las biomoléculas separadas se deben utilizar tintes específicos; en este caso para el ADN se utiliza bromuro de etidio, SYBR green I y GelRed, todos necesitan ser excitados para poder visualizarse, para eso se utiliza un transiluminador (Ylmaz, Ozic, & Gok, 2012).

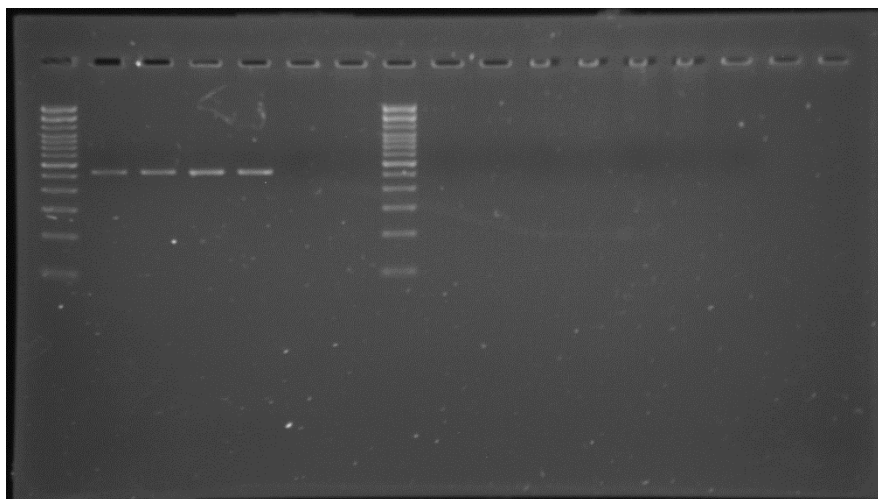


Figura 7. Electroforesis en gel al 2.50% teñido con bromuro de etidio y visualizado en transiluminador, escalera TrackIt100 100pb DNA Ladder.

La electroforesis en gel de agarosa es de las técnicas más utilizadas para la visualización de los productos de la PCR, debido a que da una idea básica del éxito de la amplificación del fragmento.

6.4.3 Secuenciación capilar por método de Sanger

La secuenciación, como su nombre lo indica, es determinar la posición de las bases nitrogenadas en los segmentos de ADN de interés. El principal método de secuenciación es propuesto por Sanger & Coulson en 1977, que se basa en la utilización de dideoxynucleótidos (ddNTP's) fluorescentes en mezcla con nucleótidos sin modificaciones.

La secuenciación capilar es una modificación al método de Sanger para automatizar el proceso y obtener resultado en la menor cantidad de tiempo y con mejor calidad. Entre las modificaciones agregadas al método es la utilización distintos fluoróforos (uno para cada base nitrogenada reducida -ddNTP-), cada una de estas emite luz a cierta longitud de onda, de modo que se puede realizar como *one-pot-reaction*. La siguiente modificación es que se cambia la enzima ADN-polimerasa por Taq-polimerasa. De esta manera se puede automatizar como si se tratara de una PCR, en el proceso de amplificación se integran los ddNTPs con fluoróforos que seguidamente se analizarán por electroforesis capilar. Este proceso consiste en separar los fragmentos de amplificados por tamaño, cada segmento amplificado posee una base nitrogenada que estaba identificada con un marcador fluorescente específico, esta es leída por el detector y por la longitud de onda que emite, se sabe la identidad de la base en esa posición, el proceso se repite hasta leer toda la secuencia, todos los fragmentos se leen repetidas veces para confirmar la posición de las bases; los resultados se presentan en formato fasta o en un gráfico conocido como electroferograma (Janitz, 2008).

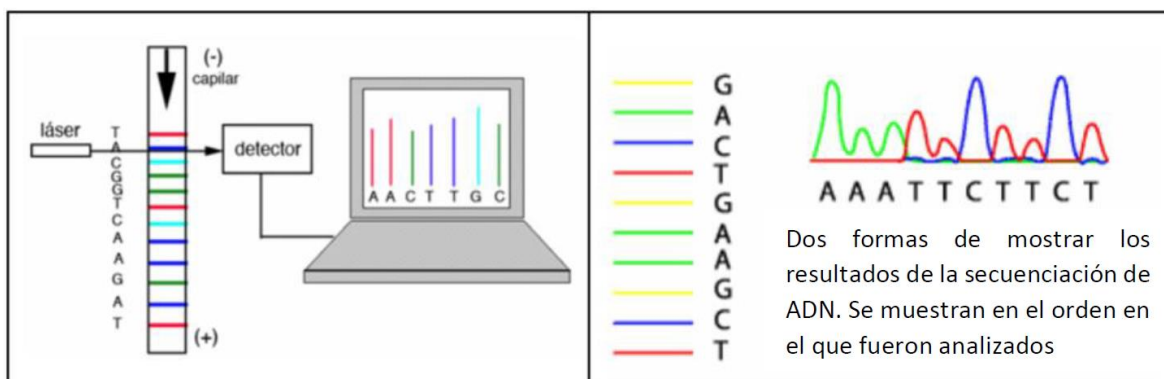


Figura 8. Representación del proceso de lectura de las bases y los resultados obtenidos.

Fuente: (Carrilho, Kist, & Franc, 2019).

6.4.4 Análisis de homología de secuencia

Consiste en un análisis *in silico*, que se realiza con la secuencia de nucleótidos obtenida para el fragmento de interés. La secuencia se ingresa en la base de datos donde se desee analizar, esta se compara contra el genoma humano, el algoritmo compara base por base la secuencia consenso contra la nuestra, y proporciona información de la similitud y diferencias que encontró.

Este análisis se realiza para corroborar orígenes evolutivos, construir mapas filogenéticos, etc. Los algoritmos realizan una comparación de secuencias para buscar similitudes, lo que se conoce como secuencias homólogas, las secuencias que se consideran se han separado por eventos de especiación y se conocen como secuencias ortólogas; y las secuencias homólogas que sufren duplicación y tienen diferente posición en el genoma se conocen como secuencias parálogas (Sonnhammer & Durbin, 1994).

6.5 Análisis estadístico

6.5.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Generalmente se le conoce como población al conjunto de individuos que pertenecen a una especie dotada de reproducción sexual, es decir, que se reproducen por el entrecruzamiento de sus miembros. También debe cumplir con el principio de Panmixia, lo que indica que los cruces deben ser aleatorios y que todos los individuos pueden aparearse sin restricción alguna. El estudio de las poblaciones se puede hacer de tres enfoques, investigando el acervo alélico, es decir, el conjunto que alelos presentes para un loci y sus respectivas frecuencias alélicas. Acervo gamético, el conjunto de alelos de grupo de alelos o bien el conjunto de loci, se estudia la razón de alelos por loci y sus frecuencias en la población y por último el acervo cigótico que es el grupo de parejas de alelos por locus (Wigginton, Cutler, & Abecasis, 2005).

El modelo de Hardy-Weinberg (HWT) hace referencia a la descripción dinámica de las poblaciones, esta prueba estadística nos da como resultado una predicción de la composición de los acervos genéticos de definen a la población estudiada en la dimensión temporal en un futuro de su situación al inicio.

Ecuación 1. Modelo de Hardy Weinberg.

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Donde:

p : frecuencia del genotipo homocigoto dominante.

pq : frecuencia del genotipo heterocigoto.

q : frecuencia del genotipo homocigoto recesivo.

Prueba de hipótesis:

H_0 : No hay diferencia entre los datos observados y los esperados.

H_A : Existe diferencia estadísticamente significativa entre los datos esperados y observados.

Si el valor de X^2 es cero o cercano a cero, no hay suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula.

Este modelo no se cumple cuando existe alguna perturbación en la población, tales como: mutaciones, selección natural, apareamiento no aleatorio, deriva genética y flujo de genes. Dado que estas fuerzas genéticas afectan las frecuencias alélicas de la población. Debido a este tipo de fuerzas disruptivas es poco común que el modelo del equilibrio de HW ocurre en la naturaleza, por esto se considera un caso idealizado, pero es de gran utilidad para conocer las frecuencias alélicas de una población en un momento específico (Namipashaki, Razaghi-Moghadam, & Ansari-Pour, 2015).

6.5.2 Análisis de presión selectivo McDonald-Kreitman

Uno de los resultados de dichas fuerzas disruptivas es la presión selectiva; esta se define como el nivel que los organismos se ven beneficiados o desfavorecidos por mutaciones genéticas. Existen las sustituciones sinónimas que, el cambio en el codón no produce un aminoácido diferente y las sustituciones no sinónimas en las cuales un cambio en el codón codifica un aminoácido diferente (Barbadilla & Egea, 2008). Por otro lado, este tipo de presión puede provocar selección positiva o negativa; en el caso de la presión selectiva positiva o direccional, esta tiene un carácter cuantitativo, es decir, muchos individuos lo

poseen. No necesariamente es el mejor, pero potencia su fitness reproductivo, un ejemplo es la resistencia a los antibióticos en las bacterias, dado que solo sobreviven aquellas que poseen genes de resistencia; aumentan en cantidad porque pueden sobrevivir en tales condiciones (Soler, 2004). La selección negativa o estabilizadora tiene carácter cualitativo, dado que se selecciona el alelo que potencia de mejor manera el fitness reproductivo de la especie, un claro ejemplo son las proteínas del sistema inmune y su alta especificidad.

La prueba de McDonald y Kreitman (MKT) es una de las más confiables y potentes para estudiar la selección huella de la selección natural. Se compara la variación dentro de la especie con la divergencia entre especies en dos sitios o dos tiempos; tomando en cuenta los cambios sinónimos y no sinónimos, en la prueba se espera que la razón entre los cambios antes mencionados sea igual, de no ser así la dinámica poblacional está sujeta a procesos de selección negativa o positiva (Charlesworth & Eyre-walker, 2008).

7. METODOLOGÍA

7.1 Aprobación del protocolo por el comité de ética

7.1.1 Elaboración del protocolo

Durante el mes enero se escribió el protocolo con las especificaciones requeridas por el comité de ética de la Universidad del Valle de Guatemala.

7.1.2 Aprobación del protocolo

El protocolo fue aprobado por el comité el 2 de octubre de 2019, se muestra la carta de aprobación en el anexo 1.

7.2 Sitio de estudio

Los participantes se reclutaron en el mes de octubre de 2019 en el campus central de la Universidad del Valle de Guatemala ubicada en 18 avenida 11-95, Zona 15, Vista Hermosa III, Guatemala C.A.

7.3 Sujetos de estudio

Miembros de la comunidad de la Universidad del Valle de Guatemala los cuales incluyen a los estudiantes, catedráticos, investigadores y personal administrativo.

7.4 Proceso de reclutamiento

La primera nota informativa sobre el estudio se envió vía electrónica. En esta se incluyó la información sobre el estudio. Se detalló el día, sitio y la hora en la que las personas anuentes a colaborar pudieron avocarse con los investigadores, se les dió todo el material e información necesaria para que conocieran todos los pormenores del estudio (el texto que se utilizó se muestra en el anexo 2).

En el día citado se montó un stand de información en la Plaza Paiz-Riera, en el cual se mostró una infografía (Anexo 3) que contenía la información ampliada sobre el estudio y puntos clave a explicar.

A los asistentes que desearon participar en el estudio se les otorgó una tarjeta con la información de contacto del coinvestigador con los días, horario y lugar donde se realizó el muestreo (el texto de la tarjeta se incluye en el anexo 4).

7.5 Aspectos éticos

7.5.1 Consentimiento informado

A todas aquellas personas que estuvieron anuentes a participar en el estudio se les proporcionó el consentimiento informado para darles toda la información sobre el estudio y ellos tomaron la decisión de participar en el estudio. Dicho consentimiento informado se encuentra adjunto en la sección de anexos, anexo 5, del presente documento. En el anexo 6, se encuentra la declaración del consentimiento informado.

7.5.2 Riesgos y beneficios

7.5.2.1 Riesgos

Debido a que la muestra se tomó por hisopado de mucosa oral, no se consideró que haya riesgos para la salud del participante, dado que es una técnica no invasiva.

Existen riesgos plausibles porque no se han establecido asociaciones de los polimorfismos del gen *fshr* que perjudiquen al participante.

7.5.2.2 Beneficios

No se conoce beneficio directo para los participantes. Solamente para la comunidad científica, quienes pueden utilizar los datos como las frecuencias alélicas para futuras investigaciones que deseen establecer asociaciones de polimorfismos del gen *fshr* con otros parámetros antropométricos y/o posibles condiciones de salud.

7.5.3 Aspectos de confidencialidad

La información que se obtuvo se manejó únicamente por los responsables del estudio, los datos serán recolectados en papel, y están bajo la custodia de Jaime López, responsable

principal. Con estos datos se generó una hoja de cálculo en MS Excel con código, sexo y edad del participante, este archivo estuvo en una computadora protegida con contraseña, para que nadie pueda acceder a la información. Los datos previamente descritos fueron pedidos mediante una encuesta vía *Survey monkey* que se presenta en el anexo 7, de la sección de anexos.

7.5.4 Conflicto de intereses

Los autores declararon no tener conflicto de intereses en el estudio. El departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala financió la mayor parte del proyecto y el resto corrió por cuenta del investigador Jaime López.

7.6 Diseño de la investigación

7.6.1 Diseño

El estudio es no experimental, cuantitativo, de corte transversal.

7.6.2 Tipo de muestreo

El tipo de muestreo es no probabilístico basada en sujetos disponibles.

7.6.3 Tamaño de muestra

10 individuos.

7.7 Criterios de inclusión y exclusión

7.7.1 Criterios de inclusión

Personas de 18 años o más. Miembros de la comunidad UVG (estudiantes, catedráticos y personal administrativo), capaces de firmar el consentimiento informado.

7.7.2 Criterios de exclusión

Personas con infección en la garganta, que hayan fumado, masticado chicle o comido una hora antes del muestreo.

7.8 Variables

7.8.1 Operacionalización de variables

Cuadro 1. Conceptualización, operacionalización y clasificación de las variables.

Nombre	Definición	Clasificación		
		Naturaleza	Escala de medición	Codificación
Concentración de ADN	Cantidad de ADN que se obtiene de ADN en el método de extracción.	Cuantitativa	Razón	ng/μl
Pureza de ADN	Cualidades del ADN como integridad, presencia de contaminación en el extracto.	Cuantitativa	Razón	Valor A260/280 Aproximado a 1.80 Valor A260/230 Entre 2.0 y 2.2
Polimorfismos de un solo nucleótido en el gen <i>fshr</i> exón 680	Variante genética presente en el gen <i>fshr</i>	Cualitativa	Nominal	1 Ser/Asn 2 Asn/Asn 3 Ser/Ser

7.9 Instrumentos de medición

Se solicitó a los participantes completar un cuestionario para recolectar su información como nombre, sexo, edad y contacto, cuestionario virtual, que respondieron después de firmar el consentimiento informado, se realizó por medio de SurveyMonkey, que se encuentra en el anexo 7.

7.10 Métodos

7.10.1 Recolección de la muestra

Con hisopos de alginato de UTM™ se realizó un estriado de la mejilla interna del participante por 30 segundos y se suspendieron las células en un tubo de 1.5ml con y 1 ml de agua ultrapura y se agitó para liberar el contenido del hisopo en el agua, se centrifugó por 1 minuto a 8,000 g para concentrar las células y recuperarlas con mayor facilidad.

7.11 Extracción de ADN

7.11.1 Extracción 1.

El kit que utilizó es el *PureLink® Genomic DNA Kits* número de catálogo K1820-01. La metodología específica de trabajo se encuentra en el Anexo 8.

7.11.2 Extracción 2.

El kit que utilizó es el *MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit* número de catálogo AM1840. La metodología específica de trabajo se encuentra en el Anexo 9.

7.11.3 Extracción 3.

El kit que utilizó es el *High Pure PCR Template Preparation Kit* número de catálogo 11796828001. La metodología específica de trabajo se encuentra en el Anexo 10.

7.12 Cuantificación del extracto

Se utilizó el *Quantus Fluorometer™* código de producto E6150, el manual de operación del equipo se adjunta en el Anexo 11. También realizó la cuantificación por *NanoDrop One C* de ThermoFisher.

7.13 Reacción en cadena de la polimerasa

Se utilizó el kit *Platinum™ II Hot-Start PCR Master Mix 2X* número de catálogo 14000013. El procedimiento se encuentra en la sección de anexos, Anexo 12.

Cuadro 2. Condiciones finales para reacción en cadena de la polimerasa, para un volumen final de 25µl.

Parámetros	Concentración inicial	Concentración final	Volumen inicial (µL)	Volumen final (µL)
MasterMix**	2x	2x	12.5	12.5
Enhancer	2x	2x	5	5
FSH10EF	2.5 mM	0.2	1	0.5
FSH10ER	2.5 mM	0.2	1	0.5
Agua	--	--	4.5	5.5
Plantilla de ADN	--	--	1	1
Total	--	--		25

*Concentración inicial se refiere al primer intento que se realizó, y la concentración que se muestra es la final en los 25 µl, lo mismo para concentración final y los volúmenes iniciales y finales.

** El MasterMix contiene 1.5mM MgCl₂ y 0.2mM de cada uno de los dNTPs, el fabricante no reporta la concentración de la DNA polimerasa.

Los cebadores utilizados fueron los FSHR10ER y FSHR10EF; su secuencia se muestra en el siguiente Cuadro (Loutradis *et. al.*, 2006).

Cuadro 3. Cebadores específicos para la región que se desea amplificar el exón 10 del gen *fshr*. El fragmento esperado es de 520pb.

Cebador	Secuencia
FSHR10EF	5'-TTTGTGGTCATCTGTGGCTGC-3'
FSHR10ER	5'-CAAAGGCAAGGACTGAATTATCATT-3'

El programa de amplificación que se propone en la metodología de Loutradis en el 2006, así mismo múltiples autores se basan en esta metodología, quienes básicamente modifican la temperatura de anidamiento y el número de ciclos. En el presente estudio se realizaron algunas adaptaciones al método, las cuales se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 4. Modificaciones a las condiciones de amplificación del fragmento del exón 10 de gen *fshr*.

		Geles						
		1 2 3 4 5						
Fases	Ciclos	Etapas	Tiempo (min)	Temperatura (°C)				
1	1	Iniciación	4			95		
2	35	Desnaturalización	1			95		
		Hibridación/anidamiento	1	52	52	55	55	57
		Elongación	2			72		
3	1	Conservación	10			72		
			∞			4		

Las primeras y últimas etapas de la amplificación de mantuvieron, la única que cambió fue el anidamiento. En la Figura 10 se muestra la fotografía del primer y último gel que representan la optimización de la reacción. Los geles intermedios se encuentran en la sección de anexos, Anexo 10. Los números de 1 al 5 detallan cada uno de los intentos de amplificación y cada intento se realizó por duplicado, y la cantidad de ciclos no se modificó. Siendo el último intento con las condiciones con las que se trabajó el experimento.

7.14 Revelación por electroforesis en gel

Se preparó un gel de agarosa al 2.5% en TBE 1X y se corrió por 20 minutos a 100 voltios, como tinte se utilizó bromuro de etidio 0.5 µg/mL.

7.15 Secuenciación de fragmentos amplificados

Los productos de amplificación se validaron enviándolos los productos del PCR para secuenciación de fragmentos a Psomagen Corp (<https://www.macrogenusa.com>).

7.16 Análisis de homología de secuencia

El alineamiento y comparación de las secuencias se realizó en Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y el procedimiento de análisis se describe en el anexo 13.

7.17 Análisis estadístico

7.17.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Para conocer la frecuencia alélica de la población se realizó una prueba de equilibrio de poblaciones con ayuda de la herramienta online disponible en: <https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/>.

7.17.2 Prueba de McDonald-Kreitman

Para analizar la divergencia y el nivel de selección que los procesos evolutivos han tenido sobre la especie humana se utilizó la herramienta <http://mkt.uab.es> desarrollada por la Universitat Autònoma de Barcelona.

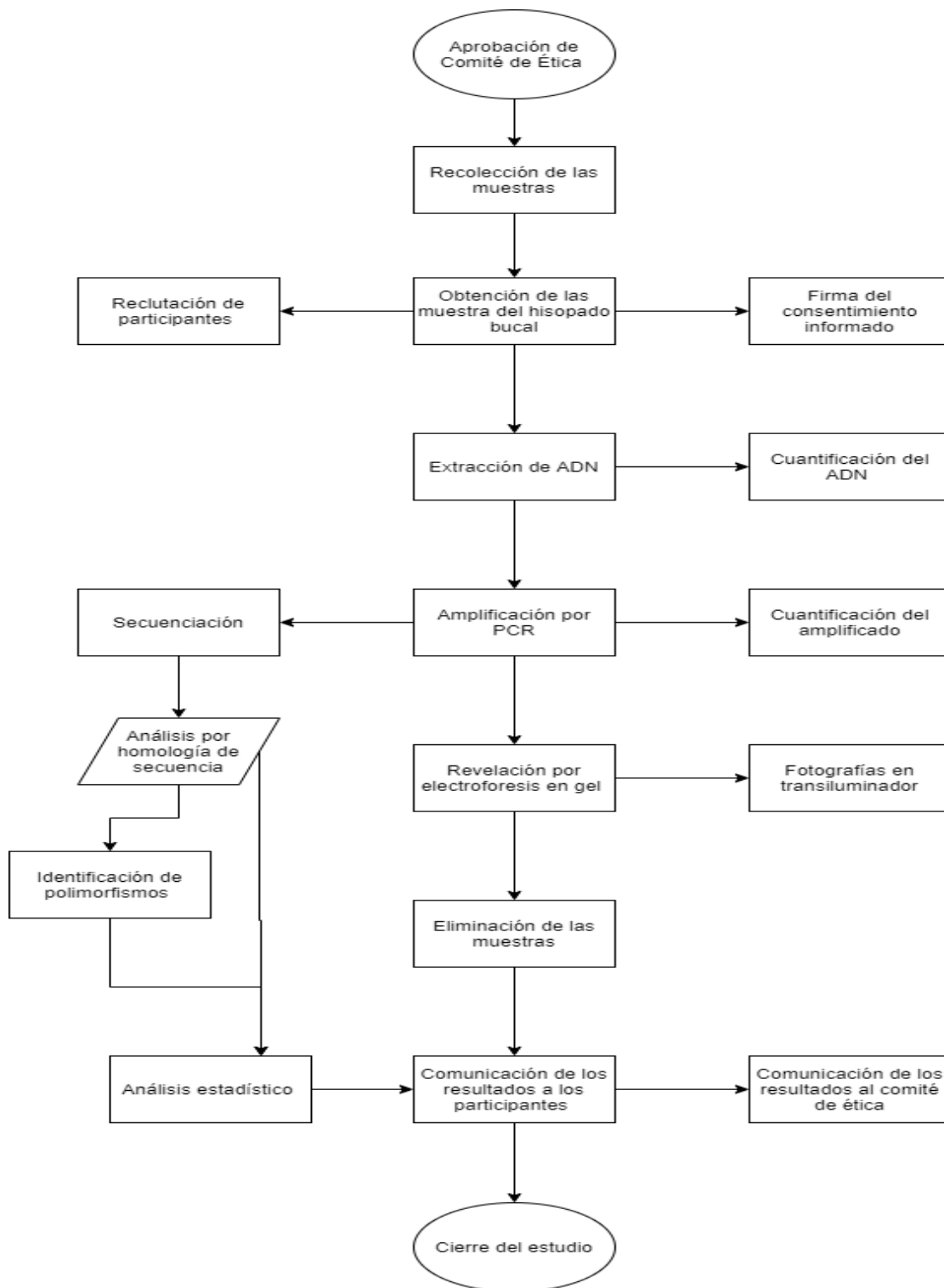
7.18 Muestras finales

Al terminar el análisis se descartaron las muestras proporcionadas por los participantes y el remanente de ADN en bolsas de desecho de material biológico, para su incineración por la empresa ECOTERMO; asimismo se destruyó la información confidencial recopilada durante el estudio.

7.19 Comunicación de resultados

Tanto el resultado personal como los resultados globales del estudio fueron trasladados a los participantes de forma personal, para evitar la mala interpretación de los resultados y se aclararon las dudas de los participantes. La nota de comunicación se encuentra adjunta en el anexo 14.

Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología.



8. RESULTADOS

8.1 Obtención de muestras

Se realizaron pruebas para saber si se podría obtener ADN genómico de calidad en muestras de saliva, pero con ninguno de los tres kits de extracción mencionados en la sección de métodos página 34 se logró obtener una cantidad cuantificable de ácidos nucleicos, por lo tanto, se decidió utilizar hisopos de alginato, dado que se lograba recuperar mayor número de células epiteliales al cepillar las mejillas, con esto, mayor concentración de material genético.

8.2 Extracción de ADN

De los tres kits empleados en la extracción del material nucleico, descritos en la sección de métodos y segundo apartado, solamente con *High Pure PCR Template Preparation* se logró obtener ADN de calidad para realizar la amplificación. En la extracción de *PureLink® Genomic DNA Kit* y *MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit*, no se logró determinar la concentración de ADN, tanto en *Quantus Fluorometer™* y *NanoDrop One C* las lecturas fueron cero.

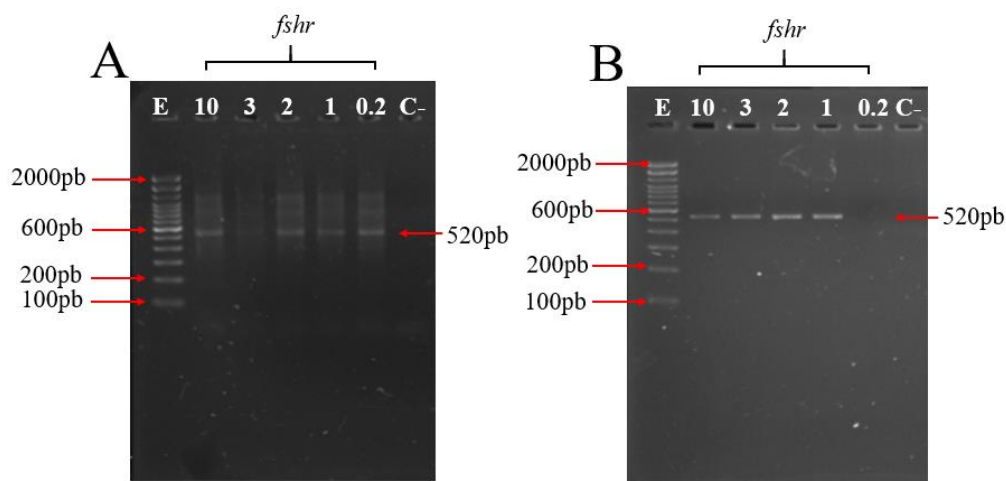
Inicialmente el método de cuantificación era *NanoDrop*, pero ninguna de las cuantificaciones realizadas en este equipo fueron mayores o cero, debido a este motivo se decidió usar *Quantus Fluorometer™*, en este equipo se logró determinar la concentración de las muestras.

8.3 Optimización de la PCR

Cuadro 5. Análisis *in silico* de la fidelidad de los cebadores a la región objetivo.

Cebador	Porcentaje de fidelidad (%)
FSHR10EF	100
FSHR10ER	72

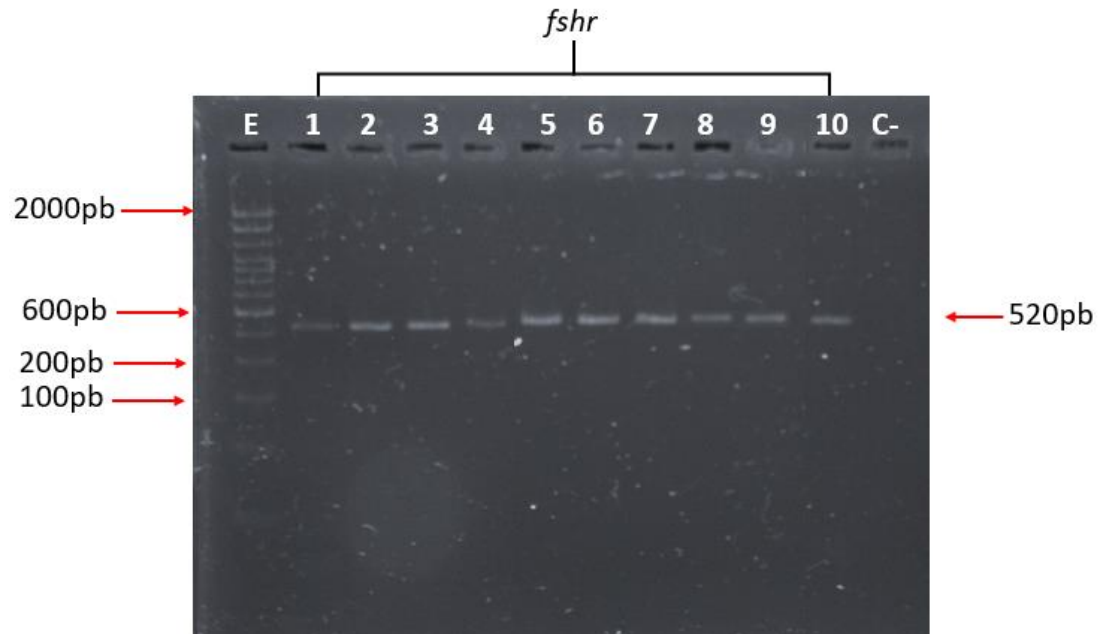
Figura10. Electroforesis en gel de agarosa al 2.50% de productos de PCR de un fragmento amplificado del *fshr*.



Geles de agarosa al 2.50% con 5 μ l cargados para cada una de las muestras y 5 μ l de escalera *TrackIt 100pb* (Invitrogen). En donde: 10, 3, 2, 1 y 0.2 son la concentración de ADN en ng/ μ l agregados para la amplificación por PCR; C- control negativo. La flecha roja a la derecha indica la banda esperada con su peso molecular en pares de bases. Las condiciones de esta reacción son: *Mastermix Platinum 2X* 12.5 μ l, *enhancer Platinum 2X* 5 μ l (estos dos parámetros no cambiaron a lo largo de las siguientes réplicas); cebador FSHR10EF 2.5 μ l (1mM), cebador FSHR10ER 2.5 μ l (1mM), 1.5 μ l de agua DEPC y 1 μ l de ADN. Programa de incubación para la amplificación de muestra en el Cuadro 4. (A) Se muestra el primer gel de agarosa donde se muestra la separación de los fragmentos amplificados por PCR con las condiciones iniciales propuestas por Loutradis *et. al.* 2006. (B) Se muestra el gel de agarosa con la separación de los productos de PCR, habiendo optimizado los factores de reacción.

Se consideraron optimizados los parámetros de amplificación tomando en cuenta indicadores de logro como la ausencia de bandas inespecíficas y barrido (fragmentos de ADN mal amplificado) en el carril.

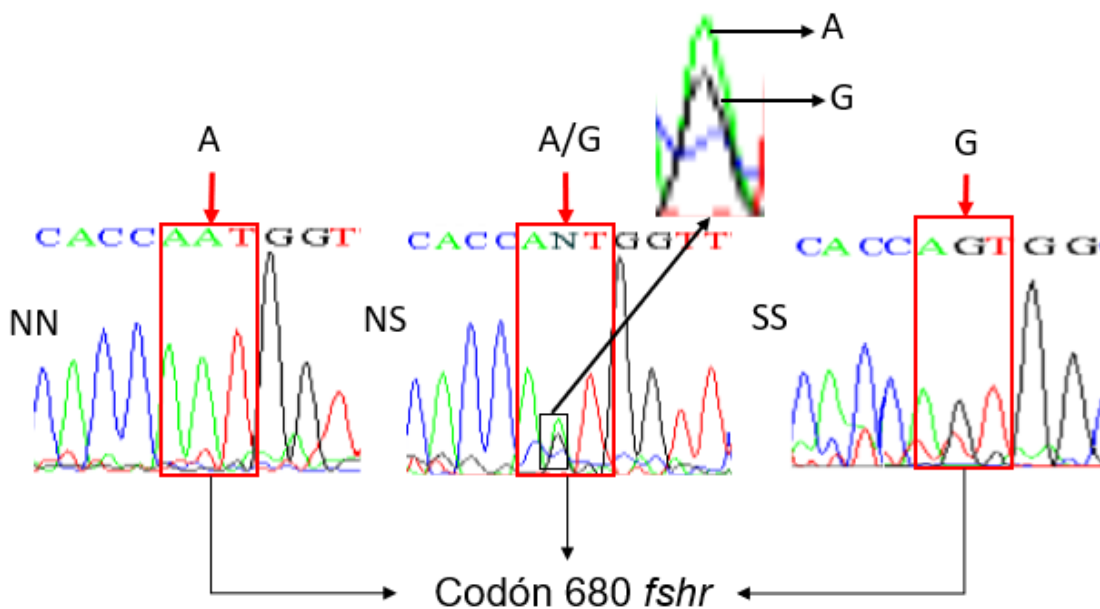
Figura11. Gel de agarosa al 2.50% con productos de PCR de un fragmento amplificado del *fshr* de las muestras que se enviaron a secuenciar.



En donde: 1-10 es el número que se le asignó a cada participante. C- control negativo, E es la escalera. La flecha roja a la derecha indica la banda esperada con su peso molecular en pares de bases.

8.4 Análisis de secuenciación

Figura12. Secuencia de ADN específica para cada variante genotípica.



El lugar de la sustitución del nucleótido está señalado con las flechas rojas. En el recuadro rojo se muestra el codón 680. La determinación de las variantes genotípicas se llevó a cabo mediante la alineación de las secuencias de estos fragmentos específicos con la secuencia proporcionada por (Sudo, 2002).

8.4.1 Comparación de los genotipos (polimorfismos) identificados en la alineación de secuencias.

Cuadro 6. Comparación de la prevalencia de los genotipos identificados en el estudio con la prevalencia mundial.

	Genotipo		
	NN	NS	SS
Porcentaje observado (%)	50	30	20
Porcentaje esperado (%) *	48.8	30.2	21

*Fuente: (Kuijper *et. al.*, 2011).

8.5 Análisis estadístico

8.5.1 Cálculo de frecuencias alélicas

Cuadro 7. Frecuencias alélicas encontradas por medio de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg.

	Homocigotos comunes	Heterocigotos	Homocigotos recesivos	X^2
Frecuencia esperada	0.42	0.45	0.12	0.116
Frecuencia observada	0.50	0.30	0.20	

El valor marcado con negrillas es el valor de chi-cuadrado, el cual indica que, por ser cercano a cero, no es posible rechazar la hipótesis nula, por lo tanto, muestra que no hay diferencia significativa entre las frecuencias alélicas observadas de las esperadas.

Dado que la distribución alélica no cumple con los supuestos considerados del modelo de HW, se evaluó si el genotipo homocigoto dominante tuvo algún efecto de presión selectiva o fuerzas disruptivas para establecerse.

8.5.2 Determinación de la presión selectiva

Cuadro 8. Determinación de las fuerzas disruptivas que involucradas en la selección de genotipos por medio de la prueba de McDonald-Kreitman.

Tipo de mutación	Fijada	Puntual	
Sinónimas	0	4	
No sinónimas	0	2	
NS:S	0	2	0

En esta prueba se asume que la proporción de sitios polimórficos sinónimos son iguales a los no sinónimos. Entonces, si $NS:S = 1$ se comprueba la hipótesis, $NS:S > 1$ los cambios se fijaron positivamente, $NS:S < 1$ los cambios se fijaron de forma negativa.

Para esta prueba es necesario compararla con una especie cercana filogenéticamente, por lo que la especie de comparación fue *Pan troglodytes* (chimpancé) por ser los parientes más cercanos que conocemos.

9. DISCUSIÓN

La FSH es esencial el funcionamiento normal de la reproducción humana y de algunos animales, en conjunto con su proteína receptora que es codificada por el gen *fshr*. Previamente se ha descrito existen variantes alélicas presentes en el exón 10 codón 680 (Manuela Simoni, Gromoll, & Nieschlag, 1997). Estas tienen amplia distribución en poblaciones específicas como la nórdica, india mesoamericana, etc. (Manuela Simoni & Casarini, 2014), la identificación de estas variantes genéticas puede dirigir a investigaciones de su potencial indicador predictivo para la respuesta ovárica por estimulación hormonal endógena (Beall & Decherney, 2012).

Para poder obtener resultados confiables en los diferentes estudios se debe contar con métodos, equipos y reactivos que cumplan con estándares de calidad, por esta razón se optimizan los métodos, para asegurar la reproducibilidad de los resultados; se evita el gasto innecesario de reactivos de alto valor, entre otros.

Principalmente se realizó la extracción de ADN por tres diferentes kits de diferentes casas comerciales, de los cuales solo con uno se logró obtener material genético de calidad (*High Pure PCR Template Preparation Kit*), con lo otros kits no se logró obtener una cantidad cuantificable de ADN, aunque es muy probable que no haya habido extracción, dado que estaban vencidos y la concentración de células en saliva es baja. Además, otra razón para este fallo es porque los kits utilizados optimizados para extracción de ácidos nucleicos de tejidos sólidos y tejido con alta concentración celular, y en el caso de los hisopados no posee numerosa cantidad de células, por lo que se recomienda que el medio de transporte del hisopo tenga un volumen menor a 1ml. Aunque el *High Pure PCR Template Preparation Kit* sí especificaba que era efectivo para tejido con baja carga celular. Aun cuando la extracción y cuantificación del material genético fueron exitosas no se obtuvieron concentraciones mayores a 20 ng/μl.

El método original para el estudio de dichos genotipos/polimorfismos fue propuesto por (Gromoll, Simoni, & Nieschlag, 1996), su equipo sustentó las bases para que muchos más lo acoplaran a sus necesidades. Dicho procedimiento consiste en la amplificación de una región de 520pb del exón 10 del gen *fshr* por medio de una PCR, este segmento de ADN

contiene el fragmento de interés, seguido de un análisis por *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) con la endonucleasa *BsrI*, dado se contaba con la disponibilidad de la enzima, se optó por secuenciación, este método proporciona más información sobre las secuencias y no solamente el genotipo expresado.

Al momento de replicar la amplificación descrita en el método original, no se obtuvo ningún resultado relevante, dado que las revelaciones por electroforesis en gel denotaban que no hubo amplificación del segmento. Pero se contaba con el kit comercial *Platinum Hot-Start Master mix 2X* que cumplía con los parámetros utilizados en el método de Loutradis *et. al.* 2006. Al realizar la amplificación utilizando el kit (mostradas en el Cuadro 2 y 3), se obtuvo como resultado la fotografía que se muestra en la Figura 10A, pero las condiciones no eran las ideales dado que la revelación por electroforesis en gel mostraba barrido (por segmentos amplificados deficientemente) y bandas inespecíficas, por lo que se ajustó la concentración de cebadores de 2.5mM a 0.2mM y temperatura de anidamiento de 52°C a 57°C, la cual es 5°C mayor que el método base (ver Cuadro 2), que son las únicas variables que podrían estar afectado. Al definir los parámetros finales mostrados en los mismos cuadros, y el resultado plausible se muestra en la Figura 10B, donde no se observa barrido ni bandas inespecíficas. Cabe recalcar que primero se modificó la concentración de los cebadores reduciendo a la mitad dicho parámetro en cada réplica, con esto se logró eliminar el barrido, pero no las bandas inespecíficas, por lo que se decidió ajustar la temperatura de anidamiento, incrementando 1°C por cada réplica hasta obtener una banda limpia, como se observa en la Figura 10B (ver anexo 15).

Cuando se utiliza la PCR, se debe tomar en cuenta la fidelidad de la polimerasa y la especificidad de los cebadores, dado que ha observado que son posibles fuente de error. En el análisis *in silico* de los cebadores (Cuadro 8), el que amplifica la hebra líder (dirección 5´- 3´) tenía el 100% de fidelidad al ser alineado, pero el cebador que amplifica la hebra rezagada (dirección 3´- 5´) solamente el 72%, esto es notorio al revisar las secuencias que se amplificaron del cebador FSHR10ER, contienen múltiples N, esto indica que el algoritmo no logró determinar la base que se encontraba en esa posición. Cabe mencionar que se realizaron pruebas de amplificación con diferentes concentraciones de ADN, el rango de 0.5 a 10 ng/μl

se obtenían bandas claras e intensas, menor a este rango no se observaba amplificación y mayores había presencia de bandas inespecíficas, esto se puede ver en la Figura10.

Habiendo optimizado los factores para la amplificación del fragmento del exón 10 del gen *fshr* se amplificaron las 10 muestras de los participantes obteniendo los resultados mostrados en la Figura11, en la revelación por electroforesis en gel no se observan bandas inespecíficas ni barrido, indicando el éxito de la amplificación y que dicho producto está listo para ser enviado a su respectiva secuenciación. Para asegurar la calidad de las secuencias cada una de las muestras pasaron por un proceso de purificación para eliminar cualquier contaminación, dicho proceso fue realizado por *Psomagen Inc.* quienes ofrecen este servicio, además de secuenciación.

La calidad de las secuencias *forward* (5´-3´) es buena, dado que la cantidad de N (cualquier nucleótido que el algoritmo no logró identificar) es mínima. Caso contrario con las secuencias amplificadas con el cebador *reverse* (3´-5´), por lo discutido anteriormente, hay que recalcar que el codón de interés se encontraba aproximadamente en el centro y en ambas secuencias, se logró determinar el genotipo expresado en cada copia del gen.

Aunque no se cuenta con suficientes muestras para realizar un análisis estadístico robusto, las proporciones reportadas por Kiujper *et. al.* 2011 se mantuvieron. Describió que a nivel mundial el genotipo dominante del codón 680 del exón 10 del *fshr* es la variante que codifica para el aminoácido asparagina en las dos copias del gen; en el Cuadro 9 se muestra dicha comparación entre el estudio antes mencionado con 1771 participantes y el actual con 10; si se hubiese realizado con una mayor cantidad de voluntarios los resultados hubiesen tenido mayor significancia para hacer una estadística robusta y con mayor validez científica, esto no fue posible dado a las limitaciones del estudio, siendo la más importante la disponibilidad de materiales, reactivos y equipo encontrados en el laboratorio del departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala.

Cabe mencionar que el muestreo no fue completamente aleatorio, este factor provocó que se tuviese sesgo de edad y sexo, el 90% de los participantes eran de sexo femenino, esto puede alterar los resultados obtenidos, dado que los estudios multifactoriales como los de Papanikolaou y colaboradores, han demostrado que en la población griega, las mujeres tienen mayor frecuencia alélica del genotipo ser680ser que los hombres. Por lo tanto, se sugiere

realizar estudios con alta heterogeneidad en la muestra y mayor cantidad de participantes, y así poder eliminar cualquier tipo de sesgo en los resultados.

Basado en las frecuencias encontradas en el presente estudio se necesitan 58 individuos de la población seleccionada para comprobar la hipótesis, es decir, para poder concluir que la población guatemalteca estudiada cumple con la misma distribución del polimorfismo reportada a nivel mundial.

Sin embargo, en el mismo estudio de Kuijper en el 2011, demostró que existían diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de dichos genotipos en etnias de diferentes regiones del mundo, específicamente en Asia, principalmente en las que no han mezclado mucho su acervo genético, dado que en Guatemala coexisten diferentes etnias, sería interesante estudiar dichas frecuencias alélicas en estas poblaciones y compararlas con las reportadas.

Entre las pruebas estadísticas que se realizaron se encuentra Hardy-Weinberg, la cual se evaluó la frecuencia alélica del genotipo polimórfico. Dado que el valor de chi cuadrado era cercano a cero, no es posible rechazar la hipótesis nula, la cual indica que dicha frecuencia sigue patrones de herencia mendeliana; pero este genotipo no cumple el supuesto: “No hay diferencia en la eficacia biológica o selectiva entre los distintos genotipos” (Rodríguez, Gaunt, & Day, 2009), dado que el genotipo SS disminuye el fitness reproductivo, por lo que hay alguna fuerza disruptiva que intervino en la selección de estos alelos.

Cabe mencionar que, aunque no se cumplan todos los supuestos mencionados en la descripción del modelo (páginas 27 y 28), la prueba de HW es una herramienta poderosa para el cálculo de frecuencias alélicas, por lo tanto, entre los resultados más destacados de este experimento es el cálculo aproximado de las frecuencias alélicas en la población guatemalteca estudiada.

Para determinar dicha fuerza evolutiva (como la selección natural), se realizó el prueba de McDonald-Kreitman; la cual evalúa que las frecuencias alélicas sinónimas y no sinónimas varían con la misma proporción intra e interespecie; el resultado mostró que la proporción de sitios fijados sinónimos y no sinónimos es cero (Cuadro 11), es decir, no hay diferencia entre especies, dado que no se encontró variabilidad entre el chimpancé y los

humanos, pero al evaluar los polimorfismos (diferencias intraspecie) la proporción era 4:2, siendo esta mayor que 1, lo que indicaba que existe una selección positiva. Con dicha confirmación ya se pudo concluir que, en la fijación del genotipo homocigoto dominante (NN) intervinieron fuerzas que favorecen a la selección positiva o direccional.

Dicha selección es común en proteínas del sistema inmune, tales como citoquinas y TLR's (*Toll Like Receptors*); porque su funcionamiento depende de un reconocimiento de alta precisión, si esto no es así, la cascada de inflamación puede verse alterada y esto representa una desventaja evolutiva, dado que las células del sistema inmune no podrían defendernos de patógenos externos (Shields, Harmon, & Whitehead, 1996). En el caso de la selección de las gonadotropinas también sufrieron este mismo proceso evolutivo, se seleccionaron genes y aminoácidos que favorecían el fitness reproductivo, es decir, mejoraron su supervivencia ante los demás miembros de la especie (Casarini, Santi, & Marino, 2015). Este mismo equipo liderado por Casarini en el 2015, realizó un metaanálisis de sus estudios sobre *fshr* y *fshb*, y determinó que posiblemente se seleccionó la asparagina en el codón 680 porque generaba un enlace más fuerte a la FSH, provocando que la acción de esta hormona sea más efectiva, modulando mejor la respuesta y de forma selectiva. Por otro lado, la fijación de genotipos poco ventajosos como es la expresión de serina en dicho codón es reducida en la población, dado que se establecieron de forma recesiva, aunque no sea útil y traiga consecuencias negativas en el fitness reproductivo es muy difícil eliminar dicho genotipo, además se necesita mucho tiempo e intervención de fuerzas disruptivas (Soler, 2004).

En el anexo 16, se muestran los fragmentos analizados por MKT del fragmento amplificado de la hebra líder (5'-3'), donde se observa que 3 de los 10 participantes expresan el polimorfismo en dicha hebra, estos resultados son consistentes dado que dos participantes que expresaban el genotipo homocigoto recesivo y 3 eran heterocigotos, pero solo uno de ellos presenta el recesivo en la hebra líder.

Fue posible realizar la optimización del kit comercial para la identificación del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) mediante secuenciación en el codón 680 y exón 10 del gen *fshr*. Estableciendo un método diagnóstico, previo a someterse a una estimulación ovárica controlada, y así poder personalizar dicho tratamiento e incrementando la

probabilidad de lograr un embarazo. Por otro lado, en el ámbito científico, la implementación de este método podría servir para estudios de salud reproductiva y establecer asociaciones entre la expresión de serina en el codón 680 del *fshr* con variables de interés como ovario poliquístico y criptozoospermia en la población guatemalteca. Además, con la información obtenida de las secuencias se determinó que este genotipo sufrió fuerzas disruptivas que favorecen selección positiva, se infiere que fue para mejorar el fitness reproductivo de la especie.

En Guatemala, en una clínica de fertilidad, una EOC tiene un costo entre 1,600 2,000 dólares, tomando en cuenta: los medicamentos que preparan a la mujer para el ciclo hormonal, las hormonas y honorarios médicos. No se toma en cuenta los análisis de diagnóstico previo a la estimulación. Esto incluye una prueba de AMH, que es recuerdo o determinación de la concentración circundante de la hormona Antimülleriana, la cual se encarga de producción de óvulos en los ovarios. Niveles altos de la AMH significa que las probabilidades de concebir un embarazo son altas y viceversa, se ha utilizado como marcador indirecto para conocer si una mujer es buena o pobre respondedora a la EOC (Lingner *et. al.*, 2011).

El fallo del tratamiento significa la pérdida de la inversión, una paciente pobre respondedora en promedio se somete a dos o tres ciclos de estimulación ovárica. Lo que el costo de la inversión es cada vez mayor, por lo que si se acuñara el presente análisis diagnóstico a las pruebas de rutina previas a la estimulación, la cual tendría un valor aproximado de \$200.00 que representa aproximadamente el 10% de la inversión inicial, podría asegurarse, de alguna manera, el éxito de la EOC y con eso el monto invertido en el tratamiento.

10. CONCLUSIONES

Se optimizó un protocolo para la determinación de la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido en el codón 680 del gen *fshr* en una población adulta de la comunidad de la Universidad del Valle de Guatemala ajustando la temperatura de anidamiento a 57°C y la concentración de cebadores a 0.2mM, hasta que se logró una amplificación limpia, libre de bandas inespecíficas y barrido. Con suficiente calidad para su secuenciación.

Se identificaron los tres genotipos mediante el análisis de secuencia del fragmento del exón 10 del gen *fshr* como método diagnóstico de polimorfismos de un solo nucleótidos en muestras no invasivas de 10 humanos.

Por otro lado, se estableció una aproximación de las frecuencias alélicas ($NN=0.5$, $NS=0.3$, $SS=0.2$) para el genotipo polimórfico 680 en una población adulta guatemalteca para futuros experimentos que deseen estudiar las implicaciones de este polimorfismo en la salud reproductiva.

El análisis estadístico arrojó que la fijación del genotipo en el codón 680 del exón 10 del gen *fshr* se deben a fuerzas disruptivas, en específico de selección positiva o direccional.

11. RECOMENDACIONES

Dado que la gran mayoría de laboratorios que ofrecen análisis diagnósticos utilizan kits para realizar las PCR, se recomienda optimizar los parámetros de reacción de los kits comerciales que utilizan para realizar las pruebas diagnósticas que ofrecen.

Tomando en cuenta toda la información que se puede obtener a partir de las secuencias, se recomienda utilizar este protocolo de identificación de genotipos polimórficos dado que se puede crear una base de datos que soporte estudio de genética poblacional o bien salud reproductiva.

Se sugiere realizar estudios con alta heterogeneidad en la muestra y mayor cantidad de participantes, y así poder eliminar cualquier tipo de sesgo en los resultados.

12. LITERATURA CITADA

- Achrekar, S. K., Modi, D. N., Desai, S. K., Mangoli, V. S., Mangoli, R. V., & Mahale, S. D. (2009). Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism (Thr307Ala) is associated with variable ovarian response and ovarian hyperstimulation syndrome in Indian women. *Fertility and Sterility*, *91*(2), 432–439. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.11.093>
- Barbadilla, A., & Egea, R. (2008). Standard and generalized McDonald – Kreitman test : a website to detect selection by comparing different classes of DNA sites, *36*(May), 157–162. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn337>
- Beall, S. A., & Decherney, A. (2012). History and challenges surrounding ovarian stimulation in the treatment of infertility. *Fertility and Sterility*, *97*, 795–801. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.02.030>
- Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*, *22*(6), 1506–1512. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem046>
- Brugo-Olmedo, S., Chillik, C., & Kopelman, S. (2003). Definición y causas de la infertilidad. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, *54*(4), 227–248. <https://doi.org/10.1038/nm.f.1895>.The
- Cakmak, H., Zamah, A., Katz, A., Cedars, M., & Rosen, M. (2012). *Effective method for emergency fertility preservation: random-start controlled ovarian hyperstimulation. Fertility and Sterility* (Vol. 98). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.629>
- Caratachea, M. A. C. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, *20*(3), 213–221.
- Carrilho, E., Kist, T. B. L., & Franc, L. T. C. (2019). A review of DNA sequencing techniques, *2*(2002), 169–200.

- Casarini, L., Santi, D., & Marino, M. (2015). Impact of gene polymorphisms of gonadotropins and their receptors on human reproductive success. *Reproduction*, *150*(6), R175–R184. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0251>
- Charlesworth, J., & Eyre-walker, A. (2008). The McDonald – Kreitman Test and Slightly Deleterious Mutations. *Society for Molecular Biology and Evolution*, *25*(6), 1007–1016. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn005>
- Das, N., & Kumar, T. R. (2018). Molecular regulation of follicle-stimulating hormone synthesis, secretion and action. *Journal of Molecular Endocrinology*, *60*(3), R131–R155. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0308>
- Datta, J., Palmer, M. J., Tanton, C., Gibson, L. J., Jones, K. G., Macdowall, W., ... Wellings, K. (2016). Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men. *Human Reproduction*, *31*(9), 2108–2118. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew123>
- Desai, S. S., Roy, B. S., & Mahale, S. D. (2013). Mutations and polymorphisms in FSH receptor: Functional implications in human reproduction. *Reproduction*, *146*(6). <https://doi.org/10.1530/REP-13-0351>
- Fock-Chow-Tho, D., Topp, E., Ibeagha-Awemu, E. A., Bissonnette, N., Desai, S. S., Roy, B. S., ... Deshpande, J. D. (2014). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, *44*(1), 213–221. <https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>
- Gariyban, L., & Avashia, N. (2014). NIH Public Access. *J Invest Dermatol.*, *133*(3), 1–8. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1.Research>
- Giasuddin, A. S. M. (1995). Polymerase chain reaction technique: Fundamental aspects and applications in clinical diagnosis. *Journal of Islamic Academy of Science*, *8*(1), 29–32.
- Gromoll, J., Simoni, M., & Nieschlag, E. (1996). An activating mutation of the follicle-stimulating hormone receptor autonomously sustains spermatogenesis in a hypophysectomized man. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *81*(4), 1367–1370.
- Gurunath, S., Pandian, Z., Anderson, R. A., & Bhattacharya, S. (2011). Defining infertility—

- a systematic review of prevalence studies. *Human Reproduction Update*, 17(5), 575–588. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr015>
- Inhorn, M. C., & Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century Downloaded from. *Human Reproduction Update*, 21(4), 411–426. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>
- Janitz, M. (2008). *Edited by Analysis of Microarray Data Principles of Computational Cell Biology Cancer Diagnostics with DNA Microarrays Handbook of Genome Research*. Alemania.
- Jiang, X., Liu, H., Chen, X., Chen, P.-H., Fischer, D., Sriraman, V., ... He, X. (2012). Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor. *Proceedings of the National Academy of the United States*, 109(31), 12491–12496. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206643109>
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2011). Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1). <https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>
- Kuijper, E. A. M., Blankenstein, M. A., Lutikhof, L. J., Roek, S. J. M., Overbeek, A., Hompes, P. G., ... Lambalk, C. B. (2011). Frequency distribution of polymorphisms in the FSH receptor gene in infertility patients of different ethnicity. *Reproductive BioMedicine Online*, 22(S1), S60–S65. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(11\)60010-2](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(11)60010-2)
- Kumar, K. K., Burgess, A. W., & Gulbis, J. M. (2014). Structure and function of LGR5: An enigmatic G-protein coupled receptor marking stem cells. *Protein Science*, 23(5), 551–565. <https://doi.org/10.1002/pro.2446>
- Lingner, T., Meinicke, P., Nei, M., Gojoborit, T., Wigginton, J. E., Cutler, D. J., ... Janitz, M. (2011). The polymerase chain reaction: Current and future clinical applications. *Fertility and Sterility*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.5772/38479>
- Loreti, N., Fresno, C., Barrera, D., Andreone, L., Albarran, S. L., Fernandez, E. A., ...

- Campo, S. (2013). The glycan structure in recombinant human FSH affects endocrine activity and global gene expression in human granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 366(1), 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.11.021>
- Loutradis, D., Patsoula, E., Minas, V., Koussidis, G. A., Antsaklis, A., Michalas, S., & Makrigiannakis, A. (2006). FSH receptor gene polymorphisms have a role for different ovarian response to stimulation in patients entering IVF/ICSI-ET programs. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 23(4), 177–184. <https://doi.org/10.1007/s10815-005-9015-z>
- Lynch, J. R., & Brown, J. M. (1990). The polymerase chain reaction: Current and future clinical applications. *Journal of Medical Genetics*, 27(1), 2–7.
- Marino, M., Adversi, F., Simoni, M., La Marca, A., Casarini, L., Capodanno, F., ... Moriondo, V. (2014). FSHR polymorphism p.N680S mediates different responses to FSH in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 393(1–2), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.06.013>
- Nachtigall, R. D. (2006). International disparities in access to infertility services. *Fertility and Sterility*, 85(4), 871–875. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.08.066>
- Namipashaki, A., Razaghi-Moghadam, Z., & Ansari-Pour, N. (2015). The Essentiality of Reporting Hardy-Weinberg Equilibrium Calculations in Population-Based Genetic Association Studies Citation: Namipashaki A, Razaghi-Moghadam Z, Ansari-Pour N. The essentiality of reporting hardy-Weinberg equilibrium calculations in popu. *CELL JOURNAL(Yakhteh) Cell Journal(Yakhteh) Cell J*, 17(172), 187–192. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4503832/pdf/Cell-J-17-187.pdf>
- NCBI. (2008). *CGA glycoprotein hormones, alpha polypeptide [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1081>
- Ng, E., Yeung, W., & Fong, Daniel Tak, P. C. (2003). Effects of age on hormonal and ultrasound markers of ovarian reserve in Chinese women with proven fertility. *Human Reproduction*, 18(10), 2169–2174. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg404>
- Olooto, W. E., Amballi, A. A., & Banjo, T. A. (2012). A review of Female Infertility;

- Important Etiological Factors and Management. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research Scholars Research Library J. Microbiol. Biotech. Res*, 2(3), 379–385. Retrieved from <http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>
- Ombelet, W. (2011). Global access to infertility care in developing countries: a case of human rights, equity and social justice. *Facts, Views & Vision in ObGyn*, 3(4), 257–266. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24753875>
- Ombelet W., C. I. (2008). Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. Hum Reprod Update. *Human Reproduction Update*, 14(6), 605–621.
- Papanikolaou, I. G., Giannelou, P., Anagnostou, E., Mavrogianni, D., Drakakis, P., & Loutradis, D. (2019). Combined study on the single nucleotide polymorphisms in the follicle-stimulating hormone receptor (Ser680Asn) and anti-Müllerian hormone receptor type II (-482A>G) as genetic markers in assisted reproduction. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 38(1), 1–9. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2018-0077>
- Pennings, G. (2008). *Ethical issues of infertility treatment in developing countries*. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/den142>
- Rabindra, P., & Raju, N. (2012). Gel-Electrophoresis and Its Applications. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, (May). <https://doi.org/10.5772/38479>
- Rafiq, R., van Schoor, N. M., Sohl, E., Zillikens, M. C., Oosterwerff, M. M., Schaap, L., ... de Jongh, R. T. (2016, November 1). Associations of vitamin D status and vitamin D-related polymorphisms with sex hormones in older men. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.11.013>
- Rodriguez, S., Gaunt, T. R., & Day, I. (2009). Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *American Journal of Epidemiology Practice of Epidemiology*, 169(4), 505–514. <https://doi.org/10.1093/aje/kwn359>

- Roupa Z, Polikandrioti M, Sotiropoulou P, Faros E, Koulouri A, Wozniak G, & Gourni M. (2009). *Tel 210 2931022, mob. 6974780723 Email: zoeroupa@yahoo.gr HSJ-HEALTH SCIENCE JOURNAL ® VOLUME. A Dr Z. Roupa Aigosthenon* (Vol. 3). Retrieved from www.hsj.gr
- Sakthivel, J. P., & Thangaraj, G. (2009). Genetics of human male infertility. - PubMed - NCBI. *Singapore Medical Journal*, 50(4), 336. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19421675>
- Sakthivel, J. P., Thangaraj, G., Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., ... Zakin, V. (2011). For specific country limitation on “Field of use” contact info@isohelix.com For Swab or DNA Kit information visit www.isohelix.com Isohelix 2015 DNA Swabs and Sample Handling. *Fertility and Sterility*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1.Research>
- Shields, D. C., Harmon, D. L., & Whitehead, A. S. (1996). Evolution of hemopoietic ligands and their receptors: Influence of positive selection on correlated replacements throughout ligand and receptor proteins. *Journal of Immunology*, 156(3), 1062–1070.
- Simoni, M, Nieschlag, E., & Gromoll, J. (2002). Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Human Reproduction Update*, 8(5), 413–421. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/0fa2/45c25ff9860fc87f5288ccd857e24123b009.pdf>
- Simoni, Manuela, & Casarini, L. (2014). Genetics of FSH action: a 2014-and-beyond view. *European Journal of Endocrinology*, 170(3), R91–R107. <https://doi.org/10.1530/EJE-13-0624>
- Simoni, Manuela, Gromoll, J., & Nieschlag, E. (1997). The Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology ¹. *Endocrine Reviews*, 18(6), 739–773. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.6.0320>
- Soler, J. J. (2004). Capítulo 7: SELECCIÓN NATURAL Y ADAPTACIÓN. *Estación Experimental de Zonas Áridas*, 1(7), 128–152.
- Sonnhammer, E. L. L., & Durbin, R. (1994). A Workbench for large-scale sequence

- homology analysis. *Bioinformatics*, 10(3), 301–307.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/10.3.301>
- Sudo, S. (2002). Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. *Molecular Human Reproduction*, 8(10), 893–899.
<https://doi.org/10.1093/molehr/8.10.893>
- Swanson, P., Dickey, J. T., & Campbell, B. (2003). Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1–4), 53–59.
<https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030476.73360.07>
- Szló, L., Bancsi, F. J. M. M., Broekmans, F. J. M., Mol, B. W. J., Dik, J., Habbema, F., & Te Velde, E. R. (2003). Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and failure to become pregnant after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 79(5), 1091–1100. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(03\)](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(03)0282(03))
- Ulloa-Aguirre, A., Reiter, E., & Crepieux, P. (2018). FSH receptor signaling: Complexity of interactions and signal diversity. *Endocrinology*, 159(8), 3020–3035.
<https://doi.org/10.1210/en.2018-00452>
- Ulloa-Aguirre, A., & Timossi, C. (1998). Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Human Reproduction Update*, 4(3), 260–283.
- Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C., Barrios-De-Tomasi, J., Maldonado, A., & Nayudu, P. (2003). M i n i rev i ew Impact of Carbohydrate Heterogeneity in Function of Follicle-Stimulating Hormone: Studies Derived from in Vitro and in Vivo Models 1. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 69, 379–389. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.016915>
- Wigginton, J. E., Cutler, D. J., & Abecasis, G. R. (2005). A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *American Journal of Human Genetics*, 76(5), 887–893.
<https://doi.org/10.1086/429864>
- Ylmaz, M., Ozic, C., & Gok, Ihami. (2012). Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*.
<https://doi.org/10.5772/38654>

13. ANEXOS

Anexo 1. Carta de aprobación de comité de ética.



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

11 calle 15-79 zona 15 V.H. III,
PBX: 2369 0791 al 95
Tels: 2364-0336 al 40
2364-0492 al 97
2507-1500

COMITÉ DE ÉTICA
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
RESULTADOS EVALUACION DE PROYECTO

BIOQ-005-Febrero 2019-15530

A: Licda. Andrea Ramos, Investigador Principal
Jaime Adolfo López Herrera, Co-Investigador Principal

DE: Dr. Élfego Rolando López
Presidente, Comité de Ética
Facultad de Ciencias y Humanidades
Universidad del Valle de Guatemala

FECHA: 02 de octubre de 2019.

ASUNTO: **Proyecto de Investigación:** OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA IDENTIFICACIÓN POR SECUENCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNP) EN EL GEN FOLLICLE STIMULATING HORMONE RECEPTOR (FSHR) EN UNA POBLACIÓN ADULTA DE LA COMUNIDAD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

VEREDICTO: Aprobado. Dado que fueron realizadas las modificaciones que se requirieron.

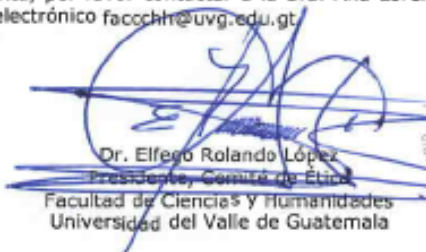
El Comité de Ética de la Facultad de Ciencias y Humanidades de la UVG ha revisado y aprobado el protocolo arriba indicado. Se le recuerda que el comité debe revisar y aprobar todos protocolos de investigación que utilicen la experimentación biomédica en seres humanos, en intervalos apropiados y de acuerdo al nivel de riesgo, por lo menos una vez al año. Si el proyecto dura más de un año, es responsabilidad del investigador, enviar al comité el protocolo de investigación para revisión y solicitud de aprobación de continuación del estudio.


Archive esta notificación como prueba de la aprobación. Para evitar atrasos en la aprobación de su investigación y la posible suspensión del estudio, por favor envíe su solicitud de continuación, por lo menos seis semanas antes de cumplirse seis meses después de haber sido autorizado por este comité.

Cualquier problema o evento serio relacionado con el estudio, deberá ser notificado inmediatamente al Comité.

Cualquier modificación al protocolo debe ser enviada al Comité para su aprobación antes de ser implementada.

Si tiene alguna duda o pregunta, por favor contactar a la Sra. Ana Lorena Ortiz, al teléfono 25071500, extensión 21448 o al correo electrónico faccch@uvg.edu.gt


Dr. Élfego Rolando López
Presidente, Comité de Ética
Facultad de Ciencias y Humanidades
Universidad del Valle de Guatemala



ERLQ/alo
c.c. Dirección de Departamento
expediente estudiante
archivo

Anexo 2. Texto de la nota informativa que se compartirá vía electrónica.

Estimados estudiantes, catedráticos y personal administrativo de la Comunidad UVG.

Por este medio les invitamos a conocer sobre un estudio de análisis de polimorfismos (variaciones genéticas) asociados a los receptores de la hormona foliculoestimulante (FSH), que estamos realizando como tema de tesis de grado de la Licenciatura en Bioquímica y Microbiología. En Guatemala no se conoce sobre la prevalencia de dichos polimorfismos, los cuales tienen importancia clínica ya que la presencia de algunas de estas variantes puede estar relacionadas con la función de los ovarios y testículos.

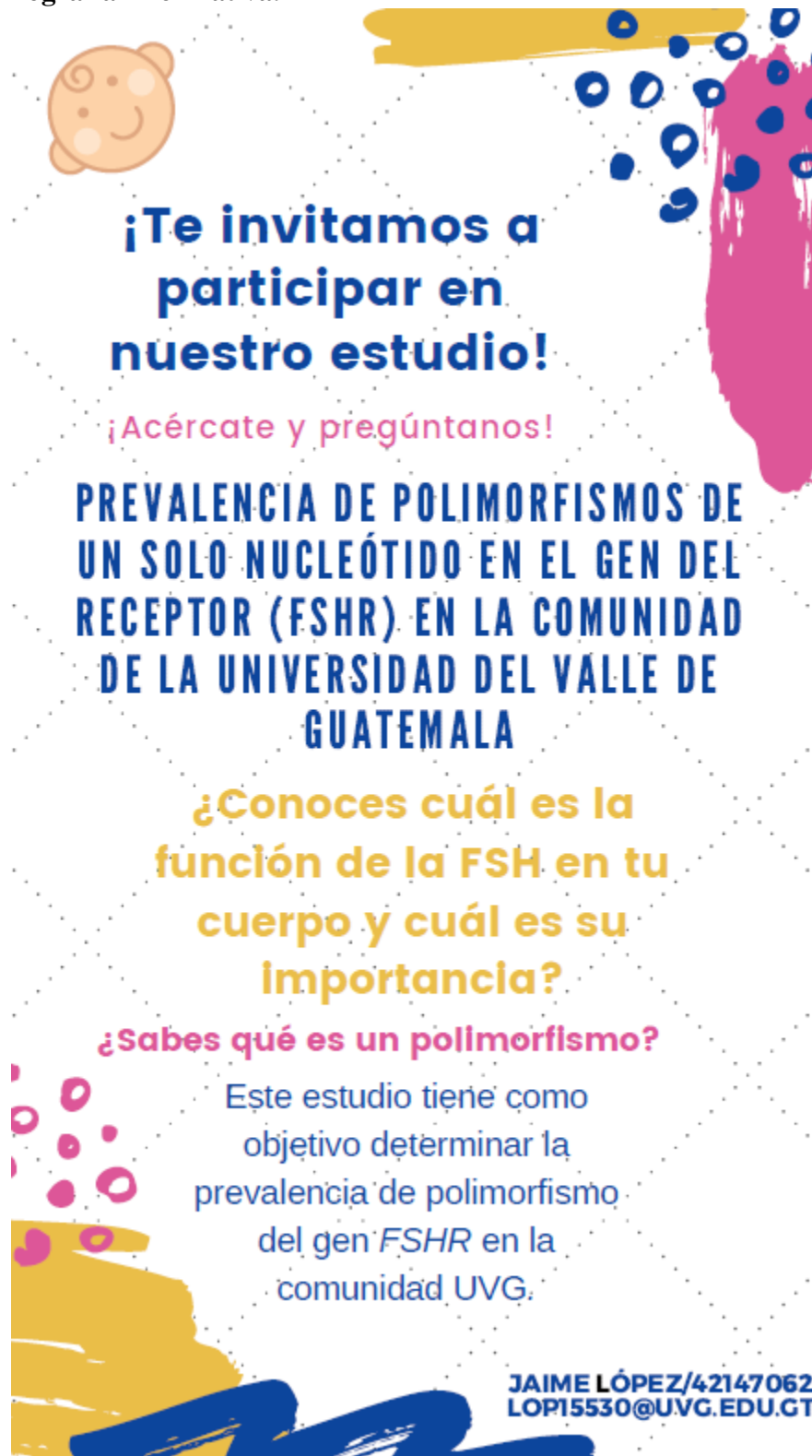
Les hago la invitación para que participen en el estudio, el cual no solo aportará conocimiento a la comunidad científica, sino que, si usted lo desea, permitirá que conozca sobre las variantes de este gen que usted tiene. Esto no le traerá beneficio directo a usted, pero contribuirá a generar conocimiento sobre este tema.

Para ampliarle la información sobre los alcances y lo que implicaría su participación en el estudio, le invitamos a acompañarnos en la Plaza Paiz-Riera el día x del mes de julio.

Jaime López

Estudiante de Bioquímica y Microbiología

Anexo 3. Infografía informativa.



¡Te invitamos a participar en nuestro estudio!

¡Acércate y pregúntanos!

PREVALENCIA DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO EN EL GEN DEL RECEPTOR (FSHR) EN LA COMUNIDAD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

¿Conoces cuál es la función de la FSH en tu cuerpo y cuál es su importancia?

¿Sabes qué es un polimorfismo?

Este estudio tiene como objetivo determinar la prevalencia de polimorfismo del gen *FSHR* en la comunidad UVG.

**JAIME LÓPEZ/42147062
LOP15530@UVG.EDU.GT**

Anexo 4. Texto de la tarjeta de contacto.

Horario de muestreo
Lunes a viernes de 9:00 am a 12:00pm
Laboratorio C1-101
Jaime López
[lop15530@uvg.edu.gt]
[+ (502) 54855865]

Anexo 5. Consentimiento informado.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Consentimiento informado

Optimización de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación por secuenciación de Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNP) en el gen *Follicle Stimulating Hormone Receptor (fshr)* en una población adulta de la comunidad de la Universidad del Valle de Guatemala

Introducción:

Yo soy Jaime Adolfo López Herrera, estudiante de la Licenciatura en Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala. Estoy investigando la optimización de una técnica para la detección molecular de variantes genéticas que pueden afectar la función de la hormona folículo estimulante (FSH), y consecuentemente tener un efecto sobre la infertilidad de la persona. Se decidió realizar el estudio en la Universidad del Valle de Guatemala por conveniencia en la toma de muestras a participantes en diferentes rangos de edad.

Le voy a dar información e invitarle a participar en esta investigación. No tiene que tomar una decisión hoy si desea participar o no en la investigación. Antes de decidir, puede hablar sobre la investigación con alguien quien se sienta cómodo y tenga confianza.

Puede que no entienda algunos términos o conceptos de este documento. Por favor, está en libertad de preguntarme sin importar que sea, lo importante es que no tenga dudas sobre la investigación.

Propósito de la prueba

El propósito del estudio es optimizar el método de detección de las variantes genéticas de un solo nucleótido del gen *fshr*, así generar una herramienta de análisis genéticos para estudio posteriores.

La infertilidad es la incapacidad de lograr un embarazo tras mantener relaciones sexuales sin protección durante un año. Afecta a aproximadamente al 15% de la población

en general, y algunas de sus causas son de origen genético. Para poder estudiar esto, el primer paso es optimizar una técnica de detección molecular de las variantes genéticas, para posteriormente determinar si en la población de Guatemala existen variantes genéticas del receptor de esta hormona.

Selección de participantes:

Estoy invitando a 10 personas a participar en el estudio, de a todas aquellas personas mayores de edad que sean colaboradores o estudiantes activos de la Universidad del Valle de Guatemala, que no tengan problemas o enfermedades bucales y que no hayan fumado, comido o masticado chicle una hora antes.

Criterios de inclusión y exclusión:

Invito a participar en nuestro estudio a todas las personas mayores de 18 años pertenecientes a la Comunidad UVG, que no tengan ninguna enfermedad bucal o bien hayan fumado o comido una hora antes de la toma de muestra, ya que esto puede comprometer los resultados de la prueba, y no deseamos general falsas especulaciones.

Participación y retiro de voluntarios

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no en el estudio. Si usted no quiere participar o acepta participar y más adelante ya no se siente cómodo en el estudio o decide retirarse, debe comunicármelo para que le entregue los resultados obtenidos hasta el momento a partir de su muestra. Además, para que destruya cualquier sobrante de su muestra. Si no quiere participar o decide retirarse, no tendrá consecuencias en su trabajo o con sus profesores.

Procedimiento y protocolo

Si decide participar en el estudio, le pediré una muestra hisopado oral, que consiste en frotar la mejilla interna con un hisopo de alginato por 30 segundos. Esto lo haremos en un lugar privado del laboratorio C1-101. Al terminar el estudio todas las muestras serán destruidas incluido cualquier remanente de ADN.

Riesgos:

No hay riesgo para usted para la toma de la muestra. El único riesgo es que se perdiera la confidencialidad de su información y resultados. Sin embargo, para que eso no suceda, utilizaré un código en la base de datos y en su muestra, y no usaré su nombre ni otra información suya.

Molestias:

Al participar la única molestia que podría sentir es resequedad en los labios y boca, sin embargo, esto pasará rápidamente bebiendo agua.

Beneficios:

No hay ningún beneficio directo para usted por participar en el estudio. Si bien podrá conocer qué variantes genéticas posee para el receptor de la hormona, esta información no puede relacionarse directamente a problemas relacionados con la fertilidad.

Confidencialidad:

Su nombre y otros datos personales estarán bajo el cuidado del investigador y no se compartirán con nadie. Sus datos, muestras y el resultado de las pruebas no tendrán su nombre, sino que un código que solo el responsable del estudio conocerá. Este documento se encontrará bajo llave en dominio del investigador, quién las tendrá bajo llave en la oficina de su casa.

Notificación de resultados:

Aproximadamente dos meses después de la toma de muestra le enviaré un correo electrónico con el resultado de la prueba. Este consistirá en la variante genética que usted tiene para el gen del receptor de la hormona folículo estimulante (FSHR)

Compensación económica

No se dará ninguna compensación económica por su participación en el estudio. Únicamente le otorgaremos un pin y un caramelo por la participación.

Conflicto de intereses

El investigador declara que no tiene conflicto de interés para realizar el estudio.

Notas aclaratorias:

Si no comprende alguna de la información proporcionada o tiene dudas sobre su participación en este estudio no firme el consentimiento. Haga las preguntas hasta que le queden resueltas, puede hacer las preguntas al momento de leer el documento o bien, si más tarde surgen nuevas dudas, puede contactar al responsable del estudio Jaime López al teléfono 54855865. Si tiene dudas sobre sus derechos como participante en el estudio puede contactar al presidente del comité de ética que revisó y aprobó este protocolo, Prof. Dr. Elfego Rolando López Tel: 2364-0336 al 40 ext: 21346.

Si usted firma el consentimiento, aceptando su participación en el estudio, recibirá una copia con su firma y la del investigador, con la fecha respectiva a la toma de muestra. Su firma no implica pérdida de sus derechos de acuerdo con las leyes del país.

Anexo 6. Declaración del consentimiento informado.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Consentimiento informado

Optimización de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación por secuenciación de Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNP) en el gen *Follicle Stimulating Hormone Receptor (fshr)* en una población adulta de la comunidad de la Universidad del Valle de Guatemala

DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

He sido invitado a participar en la investigación sobre la determinación de las variantes genéticas de la hormona folículo estimulante. Entiendo que proporcionaré una muestra de hisopado oral. He sido informado sobre los riesgos del estudio. Participaré porque soy miembro de la comunidad de la Universidad del Valle de Guatemala y me limité a no comer, fumar y masticar chicle antes y durante la toma de mi muestra, debido que esto puede comprometerla. Estoy consciente que hay no beneficios directos ni remuneración por mi participación. Se me ha proporcionado el nombre del investigador y sus contactos de teléfono y correo electrónico. He tenido la oportunidad de preguntar dudas acerca del estudio y me han contestado satisfactoriamente. Consiento voluntariamente participar en este estudio y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte de ninguna manera.

Nombre del participante: _____

Fecha: _____

Firma del participante: _____

Código: _____

Nombre de la persona responsable del consentimiento: _____

Fecha: _____

Firma del responsable del consentimiento: _____

Anexo 7. Encuesta que se les pasó a los participantes para recopilar sus datos.

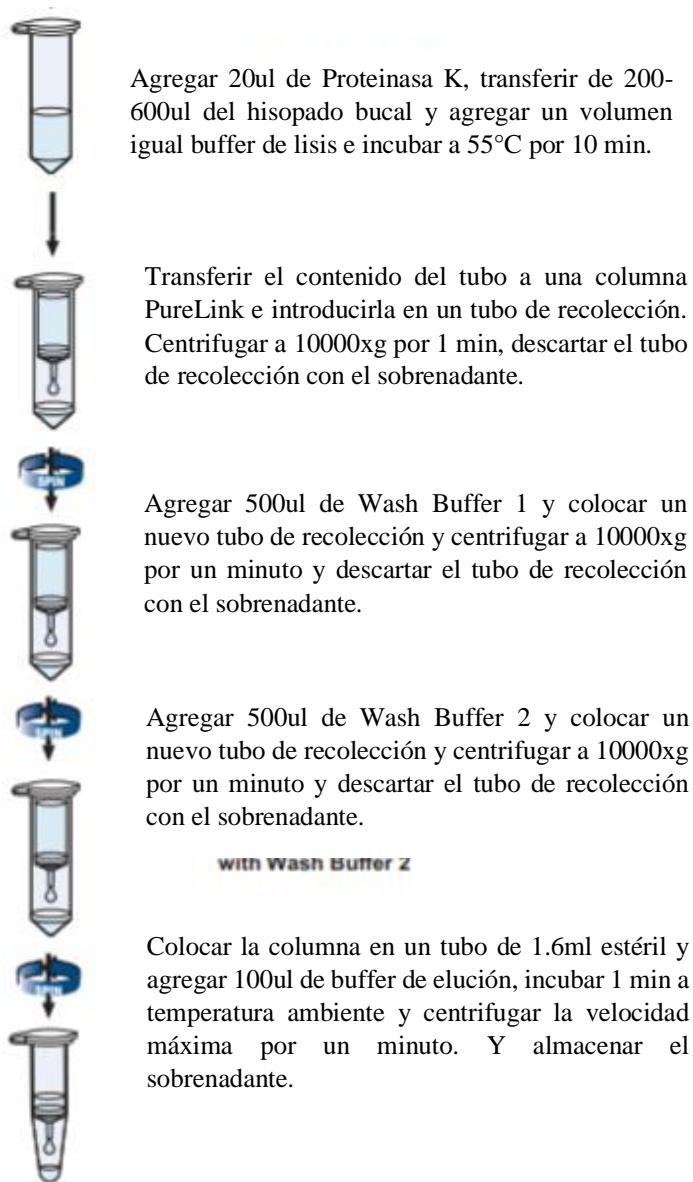
<https://es.surveymonkey.com/r/YMJW8PR>.

Recopilación de datos para participar en el estudio

PREVALENCIA DE POLIMORFISMOS ASOCIADOS AL GEN (FSHR) EN HOMBRES Y MUJERES DE LA UVG

Si usted está realizando esta encuesta es porque tiene la intención de participar en nuestro estudio. La información que proporcione solo será del dominio de los responsables del estudio y nadie más. Es totalmente confidencial. Después de haber proporcionado su información y nosotros contactarle, usted pudo cambiar de opinión y es totalmente libre de abandonar el estudio, nosotros eliminaremos su información.

Anexo 8. Diagrama de flujo del proceso de extracción del *PureLink® Genomic DNA Kit*.



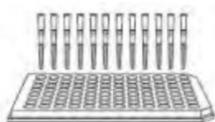
Anexo 9. Diagrama de flujo del proceso de extracción del MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit.



Agregar 235ul de buffer de lisis a un Bead tube

Agregar 175ul de la muestra y agitar por 15 min, idealmente en un agitador magnéticos.

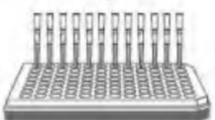
Centrifugar a 8000g por 1 min o bien utilizar un imán para recuperar el botón con las perlas magnéticas



Transferir 115ul de muestra a pozo en la placa de 96 pocillos.

Agregar 65ul de isopropanol al 100% y mezclar por 1 min.

Agregar 20ul la mezcla perlas magnéticas y mezclar por 5 min.



Capturar las perlas magnéticas con un imán y cuidadosamente descartar el sobrenadante.

WASH 2X

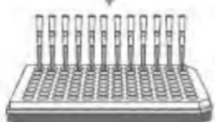
Lavar dos veces con 150ul con Wash solution 1.

WASH 2X

Lavar dos veces con 150ul con Wash solution 2.



Secar las perlas magnéticas, agitando por 2 min.



Agregar 20-50ul de buffer de elución precalentado a 65°C y mezclar por 3 min.

Capturar las perlas magnéticas y transferir el sobrenadante a un tubo de almacenamiento.

Anexo 10. Diagrama de flujo del proceso de extracción del *High Pure PCR Template Preparation Kit*.

Agregar 200ul de Binding Buffer, 40ul de proteinasa K, 200ul de tejido salival e incubar por 10 min a 70°C+



Agregar 100ul de isopropanol y mezclar hasta homogenizar. Seguido trasladar el contenido a un tubo con filtro y centrifugar a 8000g por 1 min.



Agregar 500ul de Inhibitor Removal Buffer y mezclar hasta homogenizar. Seguido trasladar el contenido a un tubo de decantación y centrifugar a 8000g por 1 min. Descartar el sobre nadante.



Agregar 500ul de Wash Buffer y mezclar hasta homogenizar. Seguido trasladar el contenido a un tubo de decantación y centrifugar a 8000g por 1 min. Descartar el sobre nadante.

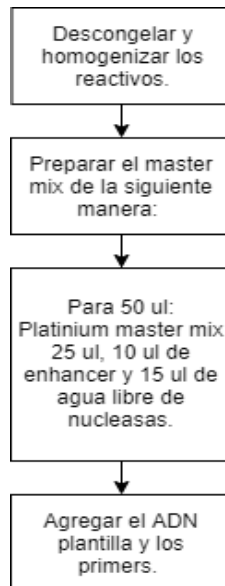


Agregar 500ul de Wash Buffer y mezclar hasta homogenizar. Seguido trasladar el contenido a un tubo de decantación y centrifugar a 8000g por 1 min. Descartar el sobrenadante.

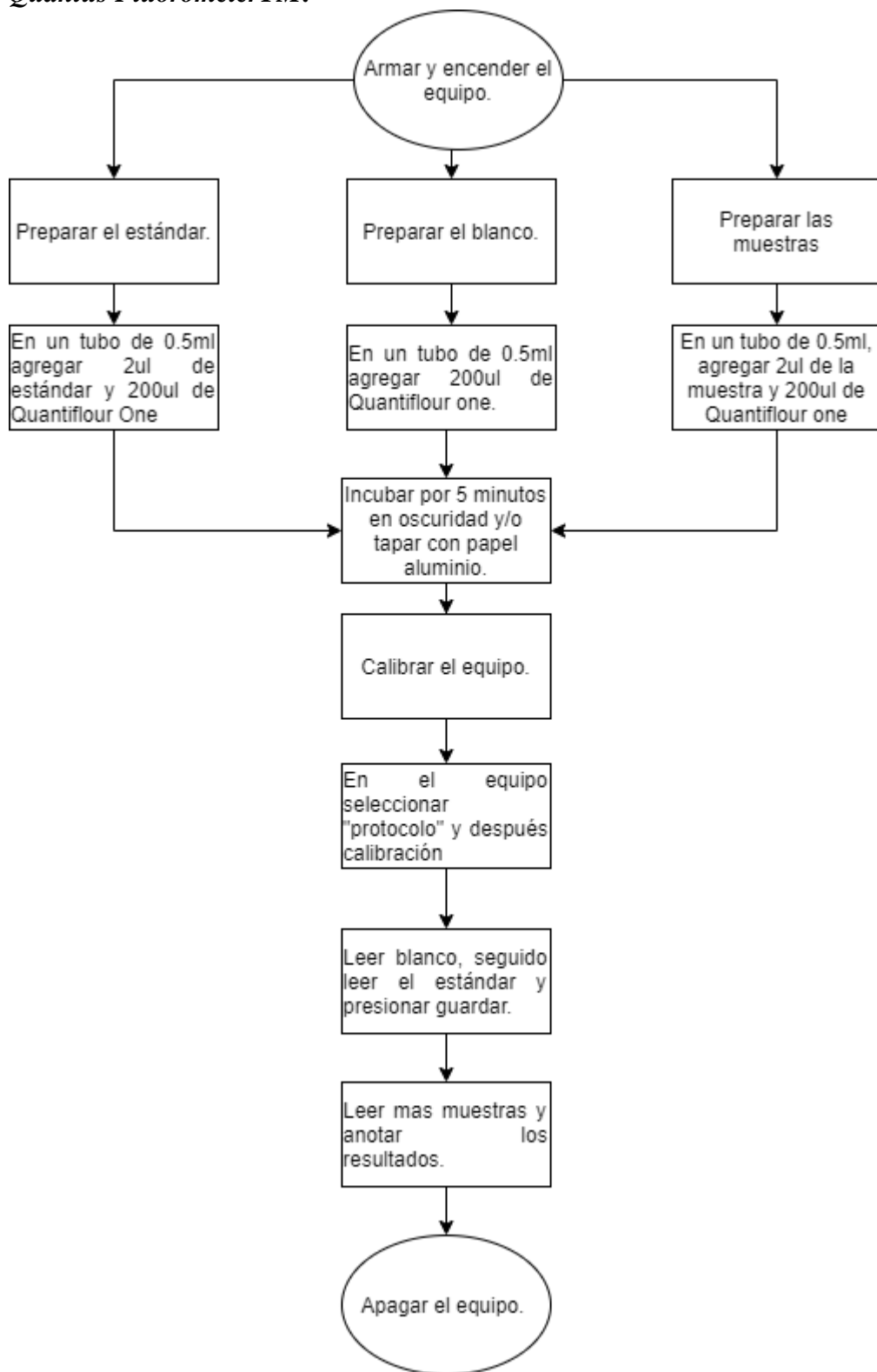


Agregar 50ul de Elution Buffer precalentado a 70°C y mezclar hasta homogenizar. Seguido trasladar el contenido a un tubo de recolección. y centrifugar a 13000g por 1 min.

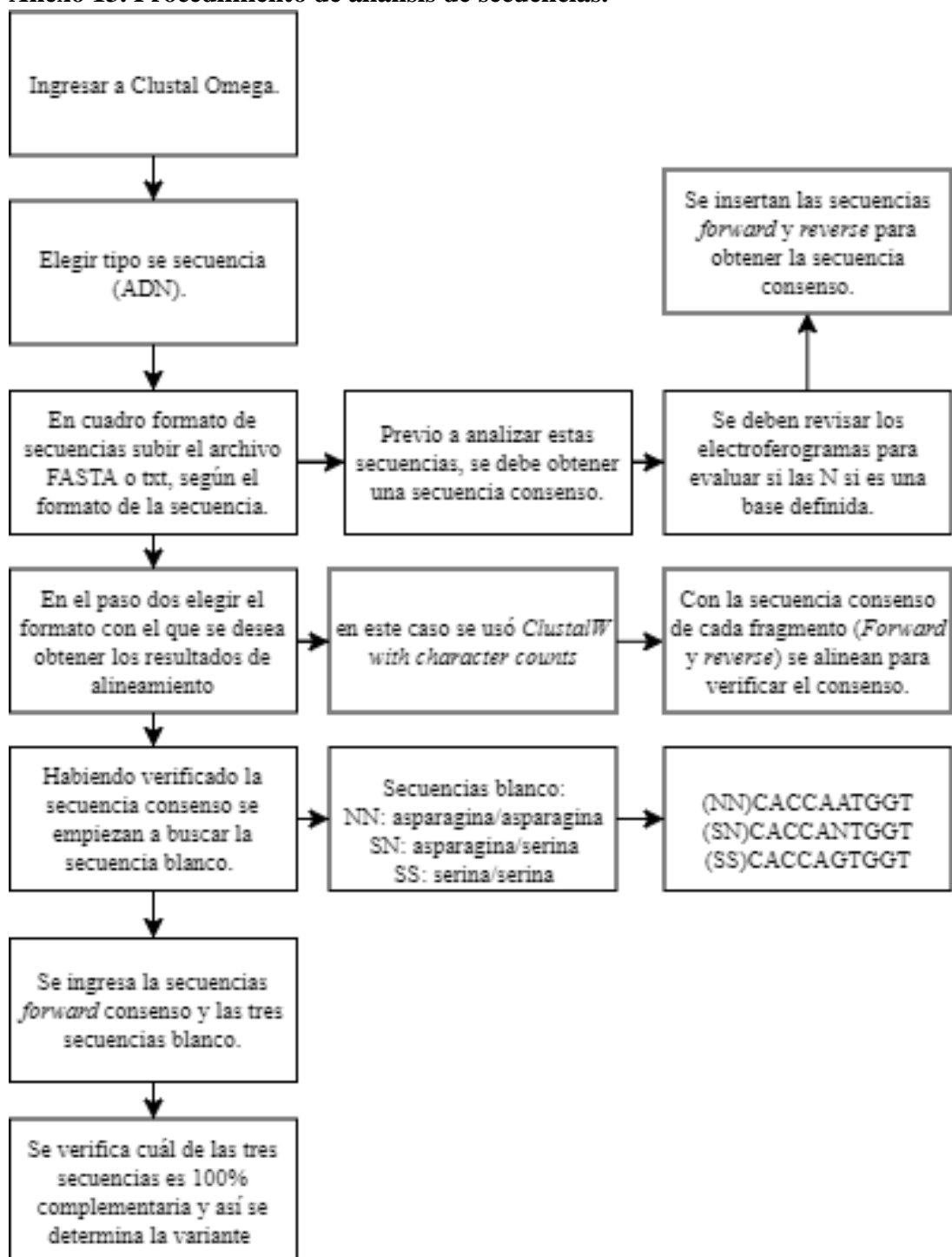
Anexo 11. Protocolo de trabajo del *Platinum™ II Hot-Start PCR Master Mix (2X)* de Invitrogen.



Anexo 12. Diagrama de flujo del proceso de cuantificación de ADN de doble hebra por *Quantus Fluorometer*™.



Anexo 13. Procedimiento de análisis de secuencias.



Anexo 14. Comunicación de resultados.

12 de marzo del 2020

Estimado (a) nombre del (la) participante:

El día 9 de octubre usted voluntariamente nos proporcionó una muestra de hisopado bucal en el laboratorio de Bioquímica C1-101 de la Universidad del Valle de Guatemala. Le notificamos que el resultado obtenido fue el polimorfismo heterocigoto para serina y asparagina en la posición 680 del gen que codifica para el receptor de la hormona foliculoestimulante (FHSR por sus siglas en inglés).

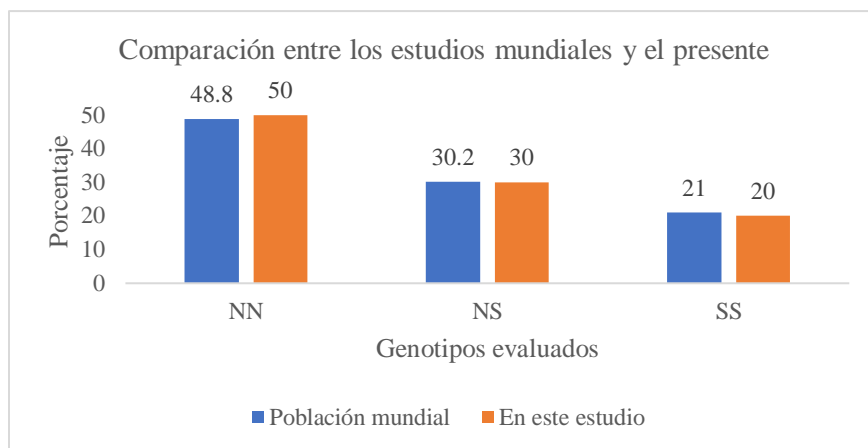
Genotipo

asn/ser

Le recuerdo que hasta la fecha no se han realizado estudios en Guatemala y el resultado puede no tener ninguna implicación médica.

Le agradecemos su participación en el estudio. El 16 de enero la muestra que nos otorgó fue destruida. El consentimiento que vincula su información personal con la muestra será destruido primera semana de junio.

A continuación, se presentan los resultados globales del estudio.



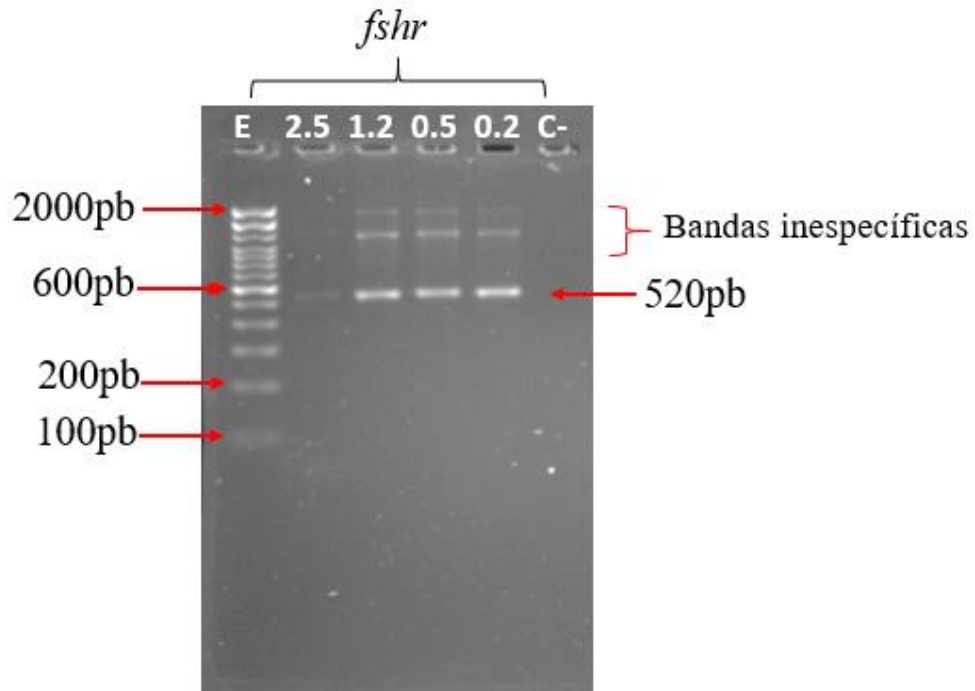
NN: homocigoto dominante para asparagina

NS: heterocigoto asparagina/serina

SS: homocigoto recesivo serina

Cualquier duda o consulta puede responder a: lop5530@uvg.edu.gt o bien al 54855865 vía WhatsApp.

Anexo 15. Electroforesis en gel de agarosa al 2.50% de productos de PCR de un fragmento amplificado del *fshr*.



Gel de agarosa al 2.50% con 5 μ l cargados para cada una de las muestras y 5 μ l de escalera *TrackIt 100pb* (*Invitrogen*). En donde: 2.5, 1.2, 0.5, 0.2 son las concentraciones de cebadores en milimoles (mM), C- control negativo. La flecha roja a la derecha indica la banda esperada con su peso molecular en pares de bases. Las condiciones de esta reacción son: *Mastermix Platinum 2X* 12.5 μ l, *enhancer Platinum 2X* 5 μ l y 1 μ l de ADN.

Anexo 16. Datos utilizados y criterios evaluados para la prueba de McDonald-Kreitman.

Secuencia 1	AAT	GTC	ACC	AGT	GGT	TCC	ACT	TAC
Secuencia 2	CGA	GTC	ACC	AAT	GGT	TCC	ACT	TAC
Secuencia 3	AGA	GTC	ACC	AAT	GGT	TCC	ACT	TAC
Secuencia 4	AGA	GTC	ACC	AAT	GGT	TCC	ACT	TAC
Secuencia 5	AGA	GTC	ACC	AAT	GGT	TCC	ACT	TAC
Secuencia 6	AGA	GTC	ACC	AAT	GGT	TCC	ACT	TAC
Secuencia 7	AGA	GTC	ACC	AAT	GGT	TCC	ACT	TAC
Secuencia 8	AGA	GTC	ACC	AGT	GGT	TCC	ACT	TAC
Secuencia 9	AGA	GTC	ACC	AGT	GGC	ATC	CTT	TAG
Secuencia 10	AGA	GTC	ACC	AAT	GGT	TCC	ACT	TAC
<i>Pan troglodytes</i>	AGA	GTC	ACC	AAT	GGT	TCC	ACT	TAC

En los recuadros rojos se muestra los sitios de variación, y en el reCuadro verde el codón de interés. Donde se observa el cambio de base y es una mutación no sinónima (dos los cambios en la segunda base se consideran no sinónimos).

14. GLOSARIO

FSH: Follicule-stimulating hormone

rFSH: Recombinant follicule-stimulating hormone

fshr: gen Follicule-stimulating hormone receptor

FSHR: Follicule-stimulating hormone receptor

EOC: Estimulación Ovárica Controlada

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

PCR: Polymerase Chain Reaction