

11216

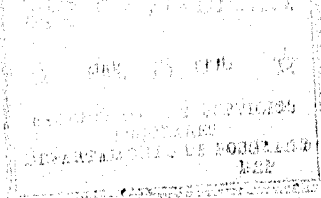
20  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

"SINDROME DE KALLMANN; ESTUDIO CLINICO,  
GENETICO Y MOLECULAR EN 22 PACIENTES"



**T E S I S**

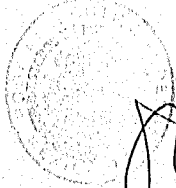
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**MEDICO ESPECIALISTA EN  
GENETICA MEDICA**

**P R E S E N T A :**

**JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ**

SECRETARIA DE SALUD  
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO  
ORGANISMO DE INVESTIGACION



DIRECCION DE ENSEÑANZA

MEXICO, D. F.

FEBRERO DE 1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**"SINDROME DE KALLMANN : ESTUDIO CLINICO, GENETICO  
Y MOLECULAR EN 22 PACIENTES"**

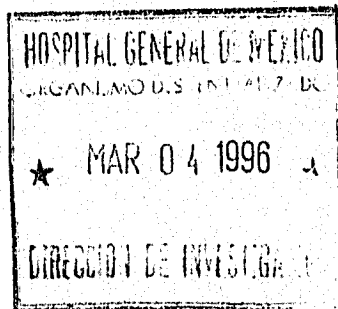


**DRA. SUSANA KOFMAN-ALFARO**

**JEFE DE SERVICIO**

**PROFESOR TITULAR DEL CURSO**

**TUTOR DE TESIS**



**ESTA TESIS FUE REGISTRADA Y REVISADA  
POR LA UNIDAD DE EPIDEMIOLOGIA  
DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO, SSa.  
CON CLAVE DIC/95/PC/95/310/03/147.**

## INDICE

INTRODUCCION	1
EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-GONADA	3
PUBERTAD	11
PUBERTAD RETARDADA E HIPOGONADISMO HIPOGONADOTROPICO	18
SINDROME DE KALLMANN	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
OBJETIVOS	31
MATERIAL Y METODOS	32
RESULTADOS	41
DISCUSION Y CONCLUSIONES	50
REFERENCIAS	58

## INTRODUCCION

La integridad del desarrollo sexual en el humano depende de dos mecanismos que se llevan a cabo en diferentes etapas de la vida:

- 1) la diferenciación sexual
- 2) la maduración sexual

La diferenciación sexual inicia con la fertilización del óvulo por el espermatozoide, momento en el que se establece el sexo cromosómico o genético del individuo. La determinación sexual en el humano está basada en el complemento cromosómico del cigoto: los varones tienen un cromosoma X y un cromosoma Y, mientras que las mujeres tienen 2 cromosomas X. Los individuos con un solo cromosoma X son fenotípicamente femeninos (1) en cambio en presencia de un cromosoma Y normal los individuos se desarrollan como varones (2), independientemente de la presencia de cromosomas X supernumerarios (3). El cromosoma Y codifica un factor dominante llamado factor de determinación testicular (FDT) indispensable para dirigir el desarrollo de la gónada

indiferenciada hacia testículo durante la sexta a séptima semana de vida embrionaria. Una vez diferenciado, el testículo fetal produce 2 hormonas encargadas de determinar el fenotipo masculino del individuo: la hormona antimülleriana (AMH) o factor inhibidor de Müllerianos (FIM) sintetizada por las células de Sertoli, y la testosterona que es sintetizada por las células de Leydig. La hormona antimülleriana tiene como función promover la regresión de los conductos müllerianos (paramesonéfricos) que en el embrión femenino darán origen al útero a las trompas y al tercio superior de la vagina. La testosterona, por su parte, se encarga de inducir la virilización de los genitales internos masculinos, promoviendo la diferenciación de los conductos de Wolff (mesonéfricos) en vesículas seminales, vasos deferentes y epidídimo. A su vez, la testosterona es reducida a 5 alfa dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5 alfa reductasa. La DHT es indispensable para virilizar los genitales externos del feto (uretra, pene, escroto) y para promover el desarrollo de la próstata (4).

En ausencia de un cromosoma Y funcional, la gonada bipotencial se desarrollará como ovario por lo que la diferenciación sexual en la mujer se considera un evento pasivo(4).



El proceso de maduración sexual incluye una serie compleja de eventos interrelacionados que resultan en un individuo sexualmente maduro y capaz de reproducirse. Estos eventos se conocen en conjunto con el nombre de pubertad. La causa directa de los cambios en la apariencia física y en la conducta durante la pubertad es la elevación en las concentraciones de esteroides sexuales, principalmente testosterona en el hombre y estradiol en la mujer. El desarrollo de las características sexuales secundarias y el inicio de la gametogénesis dependen de la actividad integrada del eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal (5).

#### **EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-GONADA**

Han transcurrido más de 40 años desde que por primera vez se propuso que la regulación de la síntesis y secreción de las hormonas gonadotrópicas, luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), se encontraba mediada por la acción que el sistema nervioso central (SNC) ejercía sobre la hipófisis anterior (6).

En 1960, Mc Cann y colaboradores (7) observaron que la inyección de extractos hipotalámicos a ratas provocaba la

secreción de LH por la hipófisis anterior. En 1971, los trabajos de Matsuo (8) y de Schally (9) demostraron que un decapeptido cuya secuencia de aminoácidos era Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly, era el responsable de la estimulación del gonadotropo, denominándosele desde entonces como hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La GnRH es sintetizada a partir de una prohormona mayor. Esta ha sido identificada en varias especies, observándose que es diferente en distintos tipos de vertebrados, pero semejante en los diversos mamíferos (10). La administración de GnRH exógena ha confirmado que este péptido es el responsable del estímulo para la síntesis y secreción de las gonadotropinas (11,12). Existe aún controversia sobre la existencia de una hormona hipotalámica específica liberadora de FSH, y aún cuando desde hace tiempo se han publicado diversos estudios e hipótesis que apoyan ambas posibilidades, no existe un consenso generalizado al respecto (13,14).

El sistema nervioso central se comunica con la hipófisis anterior a través de una vía vascular. La síntesis de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) se efectúa en las neuronas especializadas del hipotálamo preóptico, localizadas en la porción ventral del diencefalo por arriba del quiasma óptico, así como en aquellas situadas en la porción medial y basal del mismo

(15,16). Este péptido es secretado, siempre en forma pulsátil por las terminales neuronales hacia una red capilar especializada que rodea a la eminencia media. Una vez que alcanza la circulación porta-hipofisiaria, es transportado hacia la hipófisis anterior donde interactúa con los gonadotropos hipofisarios estimulando la síntesis y secreción tanto de LH como de FSH (17).

La acción ejercida por la GnRH sobre la hipófisis anterior se inicia con la unión, por parte de la hormona, a receptores específicos localizados en la membrana citoplasmática del gonadotropo. Esta unión altera la permeabilidad de la membrana a algunos iones, permitiendo así la movilización del calcio intra y extracelular con lo que se activa la liberación de las gonadotropinas (18). Al producirse la unión con el receptor, aumenta la concentración de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) al activarse el sistema adenilato ciclasa; este fenómeno, al parecer no es indispensable para la acción hormonal. El número de receptores hipofisarios a GnRH puede ser incrementado farmacológicamente mediante la exposición de la glándula a GnRH o a estrógenos, lo cual permite que en determinadas condiciones, exista una mejor respuesta de la glándula a la acción de la GnRH (19).

Ambas gonadotropinas (LH y FSH) son glicoproteínas estructuralmente similares, con pesos moleculares de aproximadamente 30, 000 daltones.

Cada hormona está formada por dos cadenas glicopeptídicas, denominadas subunidad alfa y subunidad beta. La secuencia de aminoácidos de la subunidad alfa es idéntica en ambas hormonas. La beta, constituida por 115 aminoácidos, es única para cada gonadotropina y le confiere su actividad biológica específica (20). Ambas gonadotropinas ejercen su acción sobre las gónadas (testículos u ovarios), estimulando la síntesis y secreción de esteroides así como la maduración de los gametos (21). En los testículos, la FSH actúa sobre las células de Sertoli estimulando la espermatogénesis; en el ovario, la FSH actúa sobre los folículos primordiales y estimula la gametogénesis. La LH promueve en las células de Leydig la síntesis y secreción de andrógenos, siendo el principal de éstos la testosterona, mientras que en la mujer estimula a las células de la granulosa para promover la esteroidogénesis (22,23).

La GnRH es liberada en forma pulsátil y condiciona dos tipos de patrones de secreción de gonadotropinas: tónico y cíclico; el tónico es el patrón de secreción observado en los varones y uno de los mecanismos de control en la mujer. La

secreción cíclica, exclusiva de la mujer en edad reproductiva, está influenciada por un mecanismo de retroalimentación positivo o estimulador, en el cual un incremento en la circulación de estrógenos hasta un nivel crítico o de una duración suficiente, propicia la liberación sincrónica de LH y FSH (liberación preovulatoria). Por otro lado, es importante señalar que la secreción de gonadotropinas probablemente siempre es pulsátil o episódica aún cuando el patrón sea tónico o cíclico, sin importar la edad (del feto al adulto). Sin embargo, existe dificultad para detectar los pulsos pequeños cuando la concentración de gonadotropinas es baja (tal como en los individuos prepúberales) por limitaciones metodológicas (24).

La hipófisis responde solamente al estímulo de tipo pulsátil de la GnRH (24), ya que cuando se expone a la glándula a la acción continua de esta hormona se observa una falta de respuesta al estímulo, presentándose el fenómeno de regulación decreciente o de desensibilización por parte de los receptores de la hormona (25). Este fenómeno fue demostrado originalmente por Roth y colaboradores (26) para el receptor de la insulina en el hígado. La desensibilización significa que una exposición prolongada de la célula blanco a una concentración hormonal elevada conduce a una respuesta hormonal disminuida. Este

fenómeno es secundario a ciertos cambios en la concentración y/o afinidad del receptor y tiene como función fisiológica el prevenir la sobreestimulación de las células (27,28).

Asimismo, ha sido observado que tanto la frecuencia como la amplitud de los pulsos de GnRH varían de acuerdo con el ambiente endócrino existente. Esta frecuencia presenta variaciones a lo largo del ciclo ovulatorio (29) y es incrementada por la castración (30). Por lo tanto, el SNC modificará la descarga de las neuronas productoras de GnRH en el hipotálamo dependiendo del ambiente endócrino existente(31).

Al igual que la GnRH, la LH presenta pulsatilidad en las diferentes fases del ciclo menstrual normal, durante la maduración del eje en la pubertad, así como en diversos estados de hipogonadotropismo secundario, como en la supresión del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, la hiperprolactinemia, la anorexia nervosa y la amenorrea posejercicio (32-35).

La función hipofisiaria-gonadal es regulada por efectos de retroalimentación de las hormonas gonadales y por ciertos factores que influyen sobre el hipotálamo. Las tres clases de esteroides secretados por las gónadas (estrógenos, progestágenos y andrógenos) se unen a receptores específicos en la hipófisis e influyen directamente en la secreción de gonadotropinas. Los

receptores esteroideos han sido ampliamente localizados en las células cerebrales, donde se han relacionado con la regulación de la conducta sexual, la regulación de la secreción de GnRH y la diferenciación del cerebro. En presencia de un hipotálamo funcionalmente normal, la secreción de gonadotropinas en ambos sexos es modulada por la acción de estrógenos y andrógenos. El tratamiento con testosterona o estrógenos en el varón causa una caída dependiente de dosis en la secreción basal de gonadotropinas, existiendo además un cambio en la respuesta hipofisiaria a GnRH (36).

Otras hormonas diferentes a los esteroides gonadales y a las gonadotropinas también han sido relacionadas con la regulación de la función reproductiva. Estas incluyen a las inhibinas y activinas las cuales son hormonas peptídicas secretadas por las gónadas (37,38), y la prolactina (PRL), que inhibe la secreción de GnRH (39). La dopamina puede inhibir directamente la secreción de LH bajo ciertas circunstancias (40).

Las gonadotropinas pueden actuar directamente en el hipotálamo para modular la secreción de GnRH (asa corta de retroalimentación) y la GnRH puede influir directamente en su propia secreción (asa ultra corta de retroalimentación) (41).

Las neuronas que regulan la secreción de GnRH reciben inervación de otras neuronas capaces también de estimular o inhibir, a través de estos impulsos, la función gonadal (41). Ciertos neurotransmisores como la acetilcolina y la noradrenalina modifican el control central de las gonadotropinas (42). Por ejemplo, la inyección de adrenalina en el hipotálamo medio basal en la rata desencadena la liberación de LH; los bloqueadores alfa adrenérgicos inhiben la respuesta ovulatoria tanto en ratas como en conejos y los medicamentos que controlan el bloqueo alfa adrenérgico pueden inhibir la ovulación en la mujer. Los efectos de retroalimentación de los estrógenos son mediados en parte por un efecto central sobre las fibras catecolaminérgicas proyectadas hacia el hipotálamo (43).

Las endórfinas y otros opioides endógenos pueden influir en la secreción de GnRH y consecuentemente de LH (44). La morfina y sus análogos inhiben la ovulación, así como el antagonista de los opioides, la naloxona, induce la ovulación en algunas pacientes con hiperprolactinemia (45).



## PUBERTAD

Se denomina pubertad al periodo que comprende la transición de la niñez a la edad adulta e implica cambios en casi todos los órganos y estructuras del cuerpo (46). El término adolescencia (del latín, *adolescere*, crecer) comprende el lapso entre el inicio de las características sexuales secundarias y la consumación de la madurez física (47).

La transición de la inmadurez sexual al desarrollo sexual adulto representa un evento dinámico y complejo, sobre el cual aún no han sido dilucidados los factores que dan inicio a la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada después de un largo período de relativa inactividad (48). Al iniciarse la pubertad, las concentraciones de gonadotropinas se incrementan paulatinamente y la gónada en maduración inicia la producción de esteroides sexuales (49). El aumento puberal en la producción de gonadotropinas ha sido atribuido a la disminución de la sensibilidad del gonadostato del SNC a la retroalimentación negativa por parte de los esteroides sexuales. Aparentemente,

esto es debido a un aumento de los pulsos de GnRH, así como a que la inhibición tónica del SNC disminuye gradualmente. La edad de aparición de la pubertad es variable puesto que depende de factores genéticos, constitucionales y del medio ambiente. En el hombre la pubertad aparece generalmente antes de los 15 años de edad, mientras que en la mujer se presenta antes de los 13. Cuando a los 18 años de edad en el varón o a los 16 en la mujer no se ha iniciado la pubertad se establece el diagnóstico de retraso puberal. En estos casos se deduce que el eje hipotálamo-hipófisis-gónada presenta una alteración patológica anatómico-funcional (50,51).

Los diferentes estadios del desarrollo puberal han sido clasificados por Marshall y Tanner (52). Esta clasificación ha sido aceptada mundialmente (53) y se basa, en el varón en las siguientes características: volumen de las gónadas, rugosidad, coloración y elongación del escroto, longitud y grosor del pene y cantidad, distribución y características del vello pubiano. De acuerdo a las características presentadas por determinado sujeto, éste podrá ser clasificado desde un estadio 1 de desarrollo genital (prepuber) hasta el estadio 5 (adulto normal). En la mujer la clasificación de Tanner se basa en el desarrollo mamario (glándula mamaria y pezón) y del vello púbico, clasificándose

también desde el estadio 1 (prepuber) hasta el estadio 5 (adulto completamente desarrollada) (52).

Las gónadas se desarrollan tanto en tamaño como en sus funciones endócrina y reproductiva especializadas; por un lado, la producción total de esteroides sexuales aumenta progresivamente y por el otro, se adquiere la capacidad reproductiva. Como consecuencia de la producción aumentada de esteroides sexuales por las gónadas, se desarrollan las características sexuales secundarias, ocurre incremento en el crecimiento y se hacen aparentes los cambios definitivos en la composición y proporciones del cuerpo (46).

Recientemente se ha obtenido un mayor conocimiento acerca del crecimiento y la maduración del ovario durante la pubertad por medio de la ecografía; el volumen medio del ovario aumenta de 1 a 4 ml. entre los 8 y los 13 años de edad (54) y los ovarios adquieren frecuentemente un aspecto "megalocístico" como reflejo de los complejos cambios histológicos existentes (55).

En los varones, la pubertad se inicia al presentarse aumento en el volumen testicular (56). El testículo prepuberal tiene un volumen de 1-3 ml o una longitud menor de 2.5 cm. El crecimiento puberal de los testículos ocurre en un período promedio de alrededor de 4 años y pasa de su volumen inicial a un

volumen mayor de 15 ml. Histologicamente, el crecimiento testicular se debe principalmente a la maduración de los túbulos seminíferos, estimulados por la acción de la FSH (57).

El desarrollo sexual secundario en las niñas implica el crecimiento de los genitales internos y externos así como el desarrollo mamario y la aparición del vello púbico y axilar (52). El primer signo de pubertad en la mayoría de la niñas lo constituye el inicio del desarrollo mamario (58). Este se encuentra controlado por la secreción estrogénica del ovario y se inicia a partir de los 8 años de edad. La edad precisa dependerá de factores constitucionales, genéticos y ambientales. El proceso completo de desarrollo mamario, desde la aparición del estadio 2 hasta la consecución del estadio 5, toma como promedio 4 años (59). Con la cercanía de la pubertad, el monte pubiano aumenta en tamaño por la acumulación gradual de grasa, al igual que los labios mayores y el clitoris. Poco después de la telarca, la vagina presenta cambios histológicos secundarios a la estimulación estrogénica que resultan en un aumento de la longitud vaginal (58). En el período prepuberal, el cuerpo del útero aumenta sólo ligeramente de tamaño. El crecimiento uterino durante la pubertad temprana es causado primariamente por el crecimiento del miometrio. El endometrio no comienza a

desarrollarse sino hasta después del inicio de las características sexuales secundarias y se observa un rápido incremento en el espesor miometrial poco después de la menarca (47). Aunque en general la pubarca se presenta de 6 a 18 meses después de la telarca, aproximadamente 15% de las niñas normales desarrollan vello púbico antes del inicio del crecimiento mamario. La duración media para progresar del estadio 2 al estadio 5 de vello púbico es de 2.5 años. El vello axilar en las mujeres aparece a una edad media entre los 12.5 y los 13.1 años y depende de la población estudiada (60,61). El pico de crecimiento puberal(estatural) en las niñas, es un evento puberal temprano, típicamente coincidente con el desarrollo mamario. La velocidad de crecimiento alcanza un índice máximo durante el estadio 3 (47).

La menarca, en la mayoría de los casos se presenta de 12 a 24 meses después del inicio del desarrollo mamario y posterior al pico de crecimiento estatural. La edad promedio de la menarca presenta variaciones geográficas, encontrándose en algunas poblaciones entre los 12.8 y los 13.5 años de edad (62,63). En un estudio realizado en población mexicana, se encontró que la menarca se presentó a una edad promedio de 12.5 años (64).

El desarrollo sexual secundario en niños comprende el desarrollo gonadal, peneano, así como el crecimiento del vello púbico (47). La secuencia de desarrollo puberal en aproximadamente 98% de los niños se inicia con el crecimiento testicular (58). Los cambios virilizantes en la pubertad son consecuencia de la secreción de andrógenos por los testículos. El inicio de estos cambios, en condiciones normales, se presenta después de los 9 años de edad y está modulado por factores genéticos y ambientales (47). El período medio de tiempo para completar el proceso de desarrollo genital, desde la aparición del estadio 2 hasta alcanzar el estadio 5, es de aproximadamente 3.5 años (52,60,65). Concomitantemente con el crecimiento del pene, crecen y se desarrollan las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales. La primera eyaculación se presenta durante la pubertad temprana o durante la pubertad media, usualmente precediendo al pico de crecimiento estatural puberal, lo que corresponde a una edad cronológica de 14.3 años en promedio (66). El crecimiento peneano generalmente se presenta de 12 a 18 meses después del inicio del crecimiento testicular (67). El vello púbico aparece poco después de que ha dado inicio el desarrollo genital (58). El vello axilar aparece aproximadamente 2 años después de la pubarca, mientras que el

vello facial se manifiesta a una media de 14.9 años (60,61). El cambio de voz en el varón durante la pubertad es consecuencia de un incremento en el tamaño de la laringe inducido por andrógenos, y se presenta generalmente durante el pico de crecimiento estatural puberal (58,60).

Durante la pubertad, la velocidad de crecimiento aumenta de manera importante y el índice de maduración esquelético está acelerado, lo que lleva a la fusión de los cartílagos epifisarios, por lo que la pubertad puede ser considerada como un evento de promoción del crecimiento, además de un proceso limitante de la talla final. La combinación del aumento de los esteroides sexuales y de la hormona de crecimiento, parece ser responsable del pico de crecimiento puberal (47). La diferencia en la talla del adulto entre hombres y mujeres es debida en parte al pico de crecimiento estatural puberal que ocurre 2 años después en los varones (68) en quienes éste es típicamente un evento tardío, que empieza durante el estadio 3 de desarrollo y alcanza un máximo durante el estadio 4 (52).

## PUBERTAD RETARDADA E HIPOGONADISMO HIPOGONADOTROPICO

En algunos individuos la pubertad puede presentarse tardiamente (pubertad retardada) o nunca iniciarse (hipogonadismo). La pubertad retardada puede ser definida como la ausencia de desarrollo sexual secundario a una edad de 15 años en los varones y de 13 años en las mujeres. En muchos casos la causa de la pubertad retardada es fácilmente atribuible a un proceso patológico preexistente, como enfermedad sistémica crónica severa o anorexia nervosa. En contraste, en otros casos, la etiología del retardo puberal es menos evidente y la causa debe de ser determinada mediante procedimientos diagnósticos específicos (64).

Aunque en la práctica médica se reconocen menos niñas que niños con pubertad retardada, presumiblemente por razones psicosociales, la incidencia de esta condición no difiere marcadamente entre ambos sexos. Por definición, la población general puede contener 2.5 % de individuos quienes maduran en un tiempo 2 desviaciones estandar más allá de la media. La mayoría



de estos niños tienen retardo fisiológico, también llamado constitucional, en cuanto al crecimiento y el desarrollo puberal. Estos pacientes deben ser diferenciados de aquellos con patologías subyacentes o alteraciones hormonales que condicionen retraso puberal (70).

Dentro de las pubertades retardadas patológicas, conocidas también como hipogonadismos, la determinación de gonadotropinas (LH y FSH) en sangre permite dividir a estos padecimientos en 2 categorías generales: hipogonadismo hipergonadotrópico, definido como una alteración gonadal primaria con un aumento secundario de gonadotropinas e hipogonadismo hipogonadotrópico, que es definido como una alteración primaria del eje hipotálamo-hipófisis con una consecuente disminución en la secreción de gonadotropinas y secundariamente de esteroides gonadales. La presencia de niveles bajos de gonadotropinas en un paciente con pubertad retardada puede deberse a diversas causas. La etiología más común de pubertad retardada es la fisiológica y puede ser diagnosticada con certeza solo después de haber excluido otras alteraciones específicas. En la actualidad no existe ningún método para diferenciar con certeza, antes de los 18 años de edad, que un individuo presenta pubertad retardada fisiológica o hipogonadismo

hipogonadotrópico. Si no es posible excluir otros diagnósticos, como el hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático, se tendrá que esperar hasta los límites de edad establecidos (18 años en el varón y 16 años en la mujer) con el fin de poder determinar el diagnóstico de certeza (70,71).

Existen varias entidades patológicas que condicionan hipogonadismo hipogonadotrópico y por lo tanto pubertad retardada. Los pacientes con deficiencia múltiple de hormonas trópicas generalmente presentan alteraciones en varios de los ejes hipotálamo-hipofisarios, lo que condiciona retardo en el crecimiento e infantilismo sexual. El hipopituitarismo, en la mayoría de los casos, es un defecto hipotalámico de origen desconocido, aunque siempre debe excluirse la posibilidad de que sea secundario a la presencia de un tumor. Los tumores hipofisarios primarios en niños raramente son causa de hipopituitarismo, sin embargo, los craneofaringiomas pueden crecer dentro de la silla turca así como hacia arriba, dentro del hipotálamo. Las lesiones por histiocitosis X, tuberculosis o sarcoidosis, pueden interferir con la función de la hipófisis anterior y/o posterior, por infiltración hipotalámica. Las anomalías en el desarrollo de la línea media del SNC pueden estar asociadas a una variedad de defectos hipotalámicos y

condicionar hipogonadismo (70,72). La radiación de la cabeza o el cuello en el tratamiento de tumores pueden producir disminución de las funciones hipotálamo-hipofisarias (73). Ciertos padecimientos como el síndrome de Prader-Willi se encuentran asociadas con deficiencia de gonadotropinas (74). Este síndrome está caracterizado por hipotonía, obesidad, retardo mental, talla baja y diabetes mellitus tipo 2. El grado de hipogonadismo en ésta alteración varía de parcial a severo. En una proporción importante de estos casos se ha descrito una alteración del cromosoma 15 caracterizada por delección en la parte proximal del brazo largo, en la región q11-q13 (75). El síndrome de Bardet-Biedl es una forma rara de hipogonadismo hipogonadotrópico y está caracterizado por retinitis pigmentosa, obesidad, retardo mental y polidactilia. La herencia es autosómica recesiva y el grado de deficiencia de gonadotropinas es variable (76). El síndrome de lentiginosis múltiple ha sido asociado con hipogonadismo y presenta además defectos cardíacos, anormalidades urológicas, talla baja y sordera. Otros síndromes complejos asociados con hipogonadismo incluyen al síndrome de Noonan, al síndrome de Moebius, a la ictiosis congénita y a la ataxia cerebelar (70,77). Cualquier alteración sistémica que afecte el crecimiento puede causar un desarrollo puberal tardío. Tales afecciones incluyen

una gran variedad de trastornos nutricionales y del tracto gastrointestinal, así como enfermedades cardíacas y renales severas. La falla renal con uremia asociada, produce invariablemente retardo del crecimiento a cualquier edad (78). La enfermedad inflamatoria intestinal y la enfermedad celiaca son ejemplos bien definidos de alteraciones gastrointestinales que pueden causar un retardo severo en el crecimiento. Este último padecimiento puede presentarse solo con talla baja y retraso en la pubertad en ausencia de sintomatología intestinal (79).

#### **SINDROME DE KALLMANN**

El síndrome de Kallmann representa la causa más común de hipogonadotropismo y está caracterizado por la asociación de hipogonadismo hipogonadotrópico y alteraciones en la olfacción. La primera descripción de la enfermedad es atribuida a Maestre de San Juan en 1856 (80), aunque los primeros casos familiares fueron reportados hasta 1944 por Francis J. Kallmann y colaboradores (81). Posteriormente, en 1954, De Morsier realizó autopsias en individuos afectados y demostró la ausencia total o parcial de los bulbos y tractos olfatorios por lo que denominó a

la enfermedad displasia olfato-genital (82). Desde entonces se han descrito múltiples familias y diversos casos esporádicos con el síndrome, demostrándose que el hipogonadotropismo es debido a la ausencia de secreción hipotalámica de GnRH y conociéndose en la actualidad como síndrome de Kallmann. Los estudios genealógicos en casos familiares de síndrome de Kallmann han mostrado que la enfermedad tiene un mecanismo hereditario heterogéneo ya que se han identificado patrones de segregación autosómicos recesivos, autosómicos dominantes y recesivos ligados al cromosoma X (83-85). La herencia recesiva ligada al X es considerada como la forma más frecuente de transmisión en base al hecho de que por cada mujer afectada existen 7 varones con la enfermedad. El padecimiento se presenta con frecuencia de manera esporádica.

Los estudios orientados a identificar el gen o los genes reponsables del síndrome de Kallmann se iniciaron en 1986 con la observación clínica de una familia en la cual algunos varones afectados presentaban la asociación de síndrome de Kallmann y de ictiosis ligada al X ( por deficiencia de la enzima sulfatasa de esteroides (STS), cuyo gen está localizado en Xp22.3). Se postuló entonces que un síndrome de genes contiguos, debido a la codelección del gen STS y del gen del síndrome de Kallmann era el

responsable del fenotipo de estos pacientes. Esta hipótesis llevó a la asignación cromosómica tentativa del gen del síndrome de Kallmann ligado al X a Xp22.3. A partir de entonces se estudiaron diversos pacientes con rearrreglos cromosómicos que comprometían a Xp22.3 lo que permitió la construcción de un mapa de delección de esta región asignándose un intervalo específico al gen de síndrome de Kallmann (86,87). A partir de este intervalo crítico y trabajando de manera independiente, dos grupos de investigadores, aislaron un mismo gen candidato para el síndrome de Kallmann ligado al X, el gen KAL (88,89). La identificación posterior de delecciones y mutaciones puntuales en el gen KAL en pacientes con diagnóstico clínico de síndrome de Kallmann ligado al X, confirmó al gen candidato como responsable de la enfermedad (90-93). En la literatura se ha informado el estudio molecular de 83 pacientes con diagnóstico de síndrome de Kallmann y árbol genealógico sugestivo de herencia ligada al X, identificándose en 7 casos delecciones completas, en 2 delecciones parciales y en 9 casos una mutación puntual del gen KAL (90-95).

El gen KAL consta de 14 exones y su producto proteico es de 680 aminoácidos, es un gen que escapa a la inactivación del cromosoma X y tiene un pseudogen homólogo en Yq11.2. El análisis de la secuencia de la proteína codificada por KAL reveló

homología con algunas moléculas de adhesión celular neural, las cuales intervienen en procesos de migración neuronal durante la embriogénesis (88,89). Estos datos complementados con los estudios de Schwanzel-Fukuda y Pfaff (96), quienes demostraron que las neuronas productoras de GnRH comparten un origen y vía de migración común con las neuronas del sistema olfatorio accesorio, indican que el síndrome de Kallmann ligado al X es originado por un defecto genético en la migración de las neuronas productoras de GnRH y de las neuronas olfatorias. Recientemente y en base a estudios de expresión del gen KAL en el pollo, se ha sugerido que la alteración precisa podría implicar una sinápsis defectuosa entre los axones de las neuronas olfatorias y las dendritas de las células mitrales en el bulbo olfatorio; esta sinápsis estaría mediada normalmente por la proteína KAL(97).

En resumen, el síndrome de Kallmann ligado al X es causado por la ausencia de una proteína encargada de mantener la integridad en la vía de migración de las neuronas productoras de GnRH, las cuales se originan en la placa olfatoria y se dirigen hacia el hipotálamo durante el desarrollo embrionario.

La incidencia del síndrome de Kallmann se ha estimado en 1 de cada 10 000 varones, tiene una prevalencia de 1 en cada 25 pacientes anósmicos ó hipósmicos y de 1 en 30 en varones con hipogonadismo. Existe un número 5 a 7 veces mayor de varones afectados en relación a mujeres afectadas, lo que sugiere que la forma ligada al X es la más frecuente.

El cuadro clínico está caracterizado por hipogonadismo hipogonadotrópico (niveles de LH y FSH menores de 5 mIU/ml) lo que condiciona secundariamente niveles bajos de testosterona. además existen alteraciones de la olfacción (anosmia o hiposmia no selectivas) y alteraciones fenotípicas resultantes del estado de deficiencia de andrógenos como son ausencia de desarrollo de caracteres sexuales secundarios, hábito eunucoide, criptorquidia, infertilidad y ginecomastia entre otros.

Aún cuando para diagnosticar el síndrome de Kallmann se requieren de niveles disminuidos de LH, FSH y testosterona plasmáticos (hipogonadotropismo) y alteraciones olfatorias, se han descrito una variedad de anomalías asociadas a la enfermedad tales como labio y paladar hendido, paladar ojival alto, sinquinesia (movimientos en espejo de las extremidades), anomalías motoras oculares (nistagmus), sordera neurosensorial, ceguera al color, ataxia cerebelar, epilepsia,



aplasia renal uni o bilateral, riñón en herradura, pie cavo, manchas café con leche, diabetes mellitus tipo 2, inteligencia limitrofe y anormalidades psiquiátricas tal como esquizofrenia. El tratamiento del síndrome de Kallmann se basa en la terapia de reemplazo hormonal para estimular el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales secundarias y de la función sexual. El enantato de testosterona aplicado por vía intramuscular cada 15 días útil en la promoción y el mantenimiento de los caracteres sexuales secundarias. La administración pulsátil de GnRH puede permitir la fertilidad en algunos pacientes, aunque la hCG en inyecciones repetidas puede también ser usada para estimular la gametogénesis en ambos sexos. La criptorquidia de larga evolución puede predisponer a la aparición de tumores testiculares, por lo que la orquidectomía está indicada en aquellos individuos con tal riesgo (98).

En contraste con la secreción pulsátil de LH que se observa en varones normales, más del 90% de los pacientes con síndrome de Kallmann muestran ausencia de la pulsación de LH debido a la ausencia de GnRH, lo que se traduce finalmente en hipogonadismo. Algunos de estos pacientes exhiben pulsos de amplitud baja, secreción de LH biológicamente inactiva y un

patrón de secreción de GnRH similar al encontrado en la pubertad temprana (99). El tratamiento exitoso con GnRH ha demostrado que la secreción hipofisiaria de LH y FSH puede ser normalizada al administrar la dosis adecuada de GnRH a los intervalos fisiológicos (95).

Cerca de 50% a 70% de los pacientes con deficiencia aislada de GnRH tienen olfacción normal. No está claro si esto representa un proceso diferente de la enfermedad o una parte del espectro de defectos en las neuronas de GnRH. Los pacientes con y sin alteraciones olfatorias responden igualmente bien al estímulo con GnRH, confirmando así un defecto en la secreción endógena en ambos subgrupos (100).

Es importante estar concientes de que pueden producirse efectos psicológicos severos debido a un retardo en el desarrollo sexual del adolescente (101). Estos incluyen las siguientes manifestaciones: síntomas de tensión emocional, enfermedades psicosomáticas, síntomas de sobrecompensación, bajo rendimiento escolar, disminución de las actividades deportivas y metas vocacionales o educacionales inadecuadas para la edad (70). Sin embargo, en el adolescente existe un grave problema ya que no podemos concluir por ninguna prueba si se trata de un hipogonadismo hipogonadotrópico fisiológico o patológico. El

iniciarle el tratamiento a un niño con pubertad retardada fisiológica, además de ser molesto y costoso, puede ocasionar la formación de anticuerpos anti HCG (si es que este fue el fármaco elegido). En contraste, a un paciente que presenta hipogonadismo hipogonadotrópico conviene iniciarle el tratamiento a partir de los 13 a 14 años de edad. El retraso en el manejo terapéutico en estos sujetos condiciona la aparición de las alteraciones psicosociales antes descritas, además de que el desarrollo genital final puede no ser el óptimo.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.- Cuales son las anomalías clínicas que se asocian con mayor frecuencia al síndrome de Kallmann?

2.- Cual es el patrón hereditario que se encuentra con mayor frecuencia en los casos familiares de síndrome de Kallmann?

3.- Que tipo de alteraciones moleculares se encuentran en el gen responsable del síndrome de Kallmann ligado al X en población mexicana?

## OBJETIVOS

Conocer la frecuencia de las alteraciones clínicas asociadas al síndrome de Kallmann

Identificar el patrón hereditario observado en los casos familiares de síndrome de Kallmann

Detectar alteraciones moleculares en el gen del síndrome de Kallmann ligado al X (deleciones parciales o totales del gen).

## MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio transversal, observacional y descriptivo en 22 pacientes masculinos con diagnóstico de síndrome de Kallmann, quienes fueron captados en los servicios de Genética del Hospital General de México y de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

Al ingreso de cada paciente se practicó evaluación clínica detallada con el fin de determinar el grado de desarrollo sexual secundario y estadificación del mismo de acuerdo a la clasificación de Marshall y Tanner. La función olfatoria fue evaluada de acuerdo a la metodología descrita por Rosen (104). Esta prueba consiste en evaluar la olfacción mediante la identificación de diversos aromas, que ya han sido previamente estandarizados en 100 controles sanos. Estos aromas se presentan al paciente con los ojos vendados y en recipientes opacos, iniciándose con el aroma menos penetrante para finalizar con el

más penetrante. Se utilizan los siguientes aromas: dentífrico, jabón de tocador, vainilla, café y colonia. Se clasifica al paciente como anósmico cuando no percibe ninguno de los 5 aromas presentados; se considerará que el paciente es hipósmico cuando no perciba alguno (s) de los aromas presentados. La prueba fue diferida cuando se presentó alguna anomalía que alteraba circunstancialmente la olfacción, por ejemplo gripe, rinitis alérgica, etc. Las alteraciones clínicas asociadas a la enfermedad fueron recopiladas en una hoja-formato diseñada especialmente para ese fin.

Se consideró que el padecimiento presentaba probable transmisión ligada al cromosoma X cuando existía por lo menos un hombre afectado en la familia de la madre del propósito o se encontraban 2 hermanos varones afectados, ausencia de mujeres afectadas en la familia y ausencia de consanguinidad.

Se excluyó la posibilidad de una lesión tumoral que condicionara el hipogonadismo hipogonadotrópico mediante placas de cráneo AP y lateral. Asimismo, mediante la historia clínica detallada se excluyeron otras causas de hipogonadismo hipotalámico. realizar

Para la realización de los estudios endocrinológicos se obtuvieron determinaciones basales en plasma de LH, FSH,

testosterona y estradiol. En todos los pacientes se realizó prueba de estimulación con GnRH previa impregnación con la misma hormona. Para ello, se estimuló al individuo durante 4 días con 100 microgramos de GnRH disueltos en solución salina a pasar en 2 horas y cada 30 minutos se cuantificaron las concentraciones de gonadotropinas ( se extrajeron 1.5 ml de sangre venosa en cada tiempo). El quinto día se repitió la infusión pero la cuantificación de gonadotropinas se hizo cada 15 minutos e incluso media hora después de haber concluido el estímulo. Se consideró que un paciente respondía, y por lo tanto presentaba un hipogonadismo hipotalámico, cuando la respuesta de LH estaba por arriba de 6 mUI/ml y la de FSH por arriba de 3 mUI/ml (44).

Para el análisis hormonal, cada muestra sanguínea permaneció durante 30 minutos a temperatura ambiente para lograr su coagulación. Posteriormente, se centrifugó a 1000 Xg. El suero resultante se congeló a -20 grados centígrados hasta el día en que se llevó a cabo el radioinmunoanálisis (RIA) de LH, FSH y testosterona. Todos los reactivos para este estudio fueron donados por el Matched Reagent Program de la OMS (Ginebra, Suiza).



La LH y FSH séricas se cuantificaron mediante RIAs de doble anticuerpo, de acuerdo con la metodología descrita por Sufi y colaboradores (103). Los resultados de estas hormonas se expresaron en miliunidades internacionales por mililitro de acuerdo a la primera preparación de referencia internacional. Con el fin de evitar variaciones interensayo, todas las muestras de un sujeto fueron analizadas en el mismo ensayo.

A todos los pacientes se les realizó evaluación oftalmológica especializada, así como urografía excretora, previa determinación de urea y creatinina. En los casos en que la urografía excretora reportó alteraciones anatómicas renales, se realizó TAC de abdomen para corroborar el diagnóstico

Los estudios moleculares se llevaron a cabo mediante las técnicas que se señalan a continuación:

A) Obtención de DNA genómico: los 20 ml de sangre extraídos al paciente se aplicaron en tubos con EDTA como anticoagulante. Los leucocitos se separaron por centrifugación y se lavaron con amortiguador de lisis de eritrocitos hasta obtener un botón blanco libre de eritrocitos, se agregó amortiguador de lisis de leucocitos y proteinasa K a una concentración final de

200 microgramos/ml y se dejó en incubación entre 18 y 20 h a 42°C.

Posteriormente, se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo 1:1 y una extracción con cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, se precipitó el DNA con alcohol absoluto a -20°C y NaCl a una concentración final de 50 a 100 mM. El DNA se lavó en etanol al 70% y se disolvió en amortiguados de Tris-EDTA. Todas las muestras se almacenaron a 4°C.

Las muestras de DNA diluidas 1:1000 se analizaron por espectrofotometría, mediante la lectura de la absorbancia a 260 y 280 nanómetros, calculando la relación 260/280 y la concentración de la muestra, mediante la siguiente fórmula:

concentración DNA (microgramo/microlitro) =  $(A_{260}) (dilución^{-1})$   
(0.05 microgramos/microlitro) 0.05 microgramos/microlitro de DNA =  
1 D.O.<sub>260</sub>.

Para verificar la existencia de una adecuada calidad de la muestra se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (110). Cuando la relación 260/280 no se encontró dentro de los límites de referencia, se realizó una re-extracción con el fin de purificar el DNA. Asimismo, en los casos donde se encontró degradación del DNA en la electroforesis, se recortará la banda

de alto peso molecular del gel de agarosa, para así reobtener el DNA por el método de congelación en nitrógeno líquido (111).

B) Síntesis de oligonucleótidos: la síntesis de oligonucleótidos específicos para cada exón del gen KAL se realizó en un sistema automático. Debido a la reactividad de las bases nitrogenadas y a la presencia del azúcar del DNA, todos los centros reactivos fueron protegidos por grupos específicos. Las funciones nucleofílicas del amino de las bases se protegieron con un grupo isobutilo el cual fue removido cuando se completo la síntesis por lisis con amonio. El 5'-OH de la desoxirribosa es protegido con dimetoxitril (DMT), el cual se eliminó por un ácido prótico débil al inicio de cada ciclo de acoplamiento. El 3'-OH del azúcar se deriva mediante un grupo altamente reactivo de fosforamidita que es activado por acoplamiento con un ácido débil. El oxígeno del fosfato que se encuentra cargado es protegido por un grupo B-cianoetilo. Así, se obtiene la formación secuencial y específica de los enlaces fosfato internucleótidos (111).

Cada oligonucleótido se resuspendió en 200 microlitros de agua bidestilada estéril y diluido 1:500. Se realizó la lectura espectrofotométrica a 260 nm cuantificándose la cantidad de

oligonucleótido. La concentración de cada oligonucleótido se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$A_{260} \times 500 \times 0.03 = (\text{oligo}) \text{ microgramo/microlitro}$$

C) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Aproximadamente de 500 nanogramos a 1 microgramo de DNA se amplificó mediante PCR, durante 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 min; alineamiento a 55°C durante 1 min (excepto para el exón 1 el cual se alineó a 63°C) con 1 min de extensión a 72°C. Se utilizaron pares de oligonucleótidos que flanquean las secuencias intrónicas de los exones de KAL. El análisis de las muestras se realizó en un gel de agarosa al 1.5% (91).

D) Southern Blot: para la técnica de hibridación DNA-DNA tipo Southern, se digirieron de 10 a 20 microgramos de DNA con la enzima de restricción EcoRI, para obtener fragmentos de DNA de tamaño específico. Estos fragmentos fueron separados en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. El DNA se desnaturalizó in situ, se colocó el gel en solución desnaturalizante en agitación moderada por una hora y por una hora en solución neutralizante. Posteriormente, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa reforzada con nylon (Duralose UV,

Stratagene o Hybon C-extra, Amersham) de acuerdo al procedimiento descrito por Southern (110). Con el fin de preparar la membrana y evitar uniones inespecíficas se realizó un paso de prehibridación de acuerdo a las técnicas estándar. La hibridación del DNA transferido a la membrana se realizó con la sonda (pFB23A) que corresponde al DNA complementario del gen KAL. El marcaje de la sonda se llevó a cabo con dATP-<sup>32</sup>p o con algún marcaje no radiactivo. La hibridación tuvo una duración de 18 h a 45°C; posteriormente, se hicieron múltiples lavados con una solución de SDS y SSC (111).

E) Análisis conformacional del polimorfismo de cadena sencilla de DNA (SSCP): con el fin de realizar un tamizaje para determinar en que exón pudiesen encontrarse mutaciones puntuales causantes de la enfermedad, los fragmentos obtenidos por PCR se analizaron por el método de SSCP, mediante la utilización de técnicas no radiactivas en el equipo phast system (112). A 1 microlitro de producto de PCR de cada exón a estudiar, se le adicionó 1 microlitro de solución desnaturalizante (98% formamida, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% xilencianol y 2% glicerol). Dicho producto se hirvió por 5 min con el fin de desnaturalizar los productos de PCR, los cuales se enfriaron inmediatamente, para así evitar la renaturalización de los mismos. Las muestras se

separaron en un minigel de poliacrilamida al 12.5% con un precorrimiento a 400 V, 10 mA, 2.5 W, 15°C y 60 vh. El corrimiento se realizó a 400 V, 10 mA, 2.5 W, 15°C y 60 vh. Los geles se tiñieron con nitrato de plata. Finalmente, se comparó el patrón de bandas con el de los controles para así reconocer la existencia, en caso dado, de alguna alteración.

## RESULTADOS

Se estudiaron un total de 22 pacientes masculinos en quienes se concluyó el diagnóstico clínico y endocrinológico de síndrome de Kallmann y cumplieron con los criterios de inclusión en el protocolo.

### HALLAZGOS CLINICOS

En la tablas 1 y 2 se resumen los datos clínicos encontrados en los 22 pacientes estudiados.

El rango de edad se encontró entre 9 y 51 años de edad con un promedio de 26.18 años. El motivo de consulta en la mayoría de los casos fue la ausencia de desarrollo sexual secundario o hipogonadismo en 18 casos; 3 casos consultaron por infertilidad y en 1 caso el motivo de consulta fue microgonadismo. En todos los pacientes se presentaron alteraciones de la olfacción: anosmia

en 14 pacientes (63.6 %) e hiposmia en 8 (36.4 %); la prueba de olfacción se realizó de la misma manera en las madres de 15 de los propósitos sin encontrarse en ningún caso alteraciones olfatorias que sugirieran el estado de portadoras. Todos los pacientes presentaron hipogenitalismo de grados variables (valorado por la escala de Tanner). 18 pacientes presentaron hábito eunucoide, 8 criptorquidia (5 unilateral y 3 bilateral) corregida quirúrgicamente en 7 de ellos. En 11 casos se encontró ginecomastia bilateral; 2 pacientes habían sido sometidos a mamoplastias de reducción debido al crecimiento mamario. Las anomalías asociadas a la enfermedad encontradas con mayor frecuencia fueron: paladar alto (n = 12), sinquinesia de extremidades superiores (n = 11), acortamiento de cuartos metacarpianos (n = 10), alteraciones renales (n = 7), padecimientos dermatológicos (n = 6), alteraciones oftalmológicas (n = 6) y asimetría facial (n = 5). Las alteraciones renales encontradas fueron agenesia renal unilateral en 3 casos, malrotación renal unilateral en 2 casos, malrotación renal bilateral en 1 caso y ectasia pielocaliceal bilateral también en 1 caso. En los 3 pacientes con agenesia renal unilateral, se realizó además TAC abdominal la cual corroboró el diagnóstico. Los padecimientos dermatológicos asociados consistieron en 2



casos a ictiosis ligada al X, en 2 casos a dermatitis atópica, un caso de urticaria y 1 caso de vitiligo. Dentro de las alteraciones oftalmológicas encontradas, 3 casos correspondieron a parálisis de músculos oculares, 1 caso de microcornea bilateral, 1 caso de estrabismo y 1 caso de miopía.

#### **ESTUDIO CITOGENETICO**

En los 22 pacientes se realizó cariotipo con bandas GTG, sin encontrarse alteraciones numéricas y/o estructurales en 15 metafases analizadas en cada caso (tabla 2 ).

#### **ANALISIS GENEALOGICO**

En 10 casos familiares el árbol genealógico fue sugestivo de un patrón hereditario recesivo ligado al cromosoma X y en los 12 casos restantes el propósito fue el único afectado en la familia. En ninguna de las familias estudiadas se encontró algún caso de la enfermedad en mujeres.

## **ESTUDIOS ENDOCRINOLÓGICOS**

Todos los pacientes presentaron niveles plasmáticos de LH, FSH y testosterona por debajo de los límites de referencia lo que corroboró el hipogonadismo hipogonadotrópico. Los 22 pacientes respondieron a la prueba de estimulación con GnRH exógena confirmándose así el origen hipotalámico de la deficiencia hormonal (GnRH). En la figura 1 se muestra la gráfica resultante de la prueba de estimulación en los pacientes 1 y 2. Por otra parte, las determinaciones de estradiol plasmático se encontraron dentro de límites normales en todos los casos.

## **ESTUDIOS MOLECULARES**

Se realizó el análisis por PCR del DNA genómico en 22 pacientes, encontrándose amplificación normal de los 14 exones del gen KAL en 20 de los sujetos. En dos pacientes, hermanos (pac. 17 y pac. 18) se observó amplificación normal de los exones 1, 2 y del 6 al 14, pero no se reconoció amplificación de los

exones 3, 4 y 5. Esto sugiere la existencia de una delección intragénica que comprende dichos exones en ambos pacientes.

Se realizó el estudio por SSCP no radiactivo en 11 de los pacientes que presentaron amplificación por PCR de los 14 exones del gen KAL. En 8 individuos estudiados por dicha metodología, no se demostró alteración en el patrón de movilidad electroforética de ninguno de los 14 exones del gen KAL. Los 3 pacientes restantes presentaron un patrón alterado de movilidad electroforética del exón 11; tales alteraciones pueden corresponder a mutaciones puntuales en dicho exón.

**TABLA 1**  
**CARACTERISTICAS CLINICAS , CITOGENETICAS Y GENEALOGICAS**

PACIENTE	EDAD (años)	MOTIVO DE CONSULTA	CARIOTIPO	ALTERACION EN LA OLFACION	ARBOL SUGESTIVO DE HERENCIA LIGADA AL CROMOSOMA X
1	38	ADS	46, XY	ANOSMIA	NO
2	27	ADS	46, XY	ANOSMIA	NO
3	29	ADS	46, XY	HIPOSMIA	NO
4	15	ADS	46, XY	HIPOSMIA	SI
5	30	I	46, XY	HIPOSMIA	SI
6	29	I	46, XY	HIPOSMIA	SI
7	19	ADS	46, XY	HIPOSMIA	NO
8	23	ADS	46, XY	ANOSMIA	NO
9	18	ADS	46, XY	ANOSMIA	SI
10	9	MG	46, XY	ANOSMIA	SI
11	25	ADS	46, XY	HIPOSMIA	NO
12	22	ADS	46, XY	ANOSMIA	SI
13	23	ADS	46, XY	HIPOSMIA	NO
14	29	ADS	46, XY	ANOSMIA	NO
15	20	ADS	46, XY	ANOSMIA	NO
16	34	ADS	46, XY	ANOSMIA	SI
17	25	ADS	46, XY	ANOSMIA	SI
18	23	ADS	46, XY	ANOSMIA	NO
19	51	ADS	46, XY	ANOSMIA	SI
20	30	I	46, XY	ANOSMIA	NO
21	34	ADS	46, XY	HIPOSMIA	NO
22	23	ADS	46, XY	ANOSMIA	SI

ADS = AUSENCIA DE DESARROLLO SEXUAL SECUNDARIO

46

I = INFERTILIDAD

MG= MICROGENITALISMO

**TABLA 2**  
**ALTERACIONES CLINICAS ASOCIADAS AL SINDROME DE KALLMANN**

PACIENTE	HABITO EUNUCOIDE	PALADAR ALTO	SINQUINESIA	ACORTAMIENTO DEL CUARTO METACARPIANO	CRIPTORQUIDIA	PADECIMIENTOS DERMATOLOGICOS	ALTERACIONES RENALES	ALTERACIONES OFTALMOLOGICAS
1	+	+	-	-	-	A	MRU	-
2	+	-	+	+	+	-	MRB	-
3	+	+	-	-	-	-	-	-
4	-	+	-	-	-	I	-	-
5	-	-	+	-	-	I	-	-
6	+	-	+	-	+	-	-	-
7	+	-	-	+	-	-	-	-
8	+	-	+	-	-	A	EPB	PMO
9	+	+	+	+	+	-	ARU	-
10	+	+	+	+	-	-	ARU	-
11	+	+	-	+	+	-	-	-
12	+	+	-	-	+	A	-	-
13	+	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	-	+	V	MRU	MCB
15	+	+	+	-	-	-	-	EST
16	+	+	+	-	-	-	ARU	PMO
17	+	-	+	+	+	-	-	PMO
18	+	-	-	+	-	-	-	-
19	+	-	-	+	-	-	-	-
20	-	-	-	+	-	-	-	MP
21	+	+	-	-	-	-	-	-
22	+	+	+	+	+	-	-	-

A = ATOPIA  
I = ICTIOSIS  
V = VITILIGO

MRU = MALROTACION RENAL UNILATERAL  
MRB = MALROTACION RENAL UNILATERAL  
EPB = ECTASIA PIELOCALICEAL BILATERAL  
EST = ESTRABISMO

ARU = AGENESIA RENAL UNILATERAL  
PMO = PARALISIS DE LOS MUSCULOS OCULARES  
MCB = MICROCORNEA BILATERAL  
MP = MIOPIA

**TABLA 3**

**CONCENTRACIONES HORMONALES BASALES**

<b>PACIENTES</b>	<b>LH (mUI/ml)</b>	<b>FSH (mUI/ml)</b>	<b>T (ng/ml)</b>	<b>ESTRADIOL</b>
1	1.3	0.2	3.0	14
2	0.4	0.3	0.4	< 13
3	2.8	1.6	2.3	18
4	0.8	0.9	1.4	< 13
5	6.4	2.0	3.6	36
6	1.1	1.7	1.2	< 13
7	1.3	0.1	0.4	13
8	2.4	1.8	0.3	< 13
9	N.D	0.9	0.5	< 13
10	0.3	0.8	0.1	< 13
11	0.4	N.D	0.2	14
12	0.4	0.1	0.3	< 13
13	0.7	1.6	0.3	15
14	1.4	0.3	0.4	< 13
15	0.1	N.D	1.5	15
16	N.D	N.D	0.4	< 13
17	1.0	N.D	0.8	< 13
18	0.8	2.3	1.1	17
19	N.D	N.D	0.3	< 13
20	2.0	0.2	0.2	< 13
21	5.2	0.6	0.4	< 13
22	0.6	N.D	0.4	< 13
<b>VALORES DE REFERENCIA</b>	<b>3 - 12</b>	<b>0.5 - 5.0</b>	<b>&gt; 3.8</b>	<b>&lt; 60</b>

N.D = NO DETECTABLE

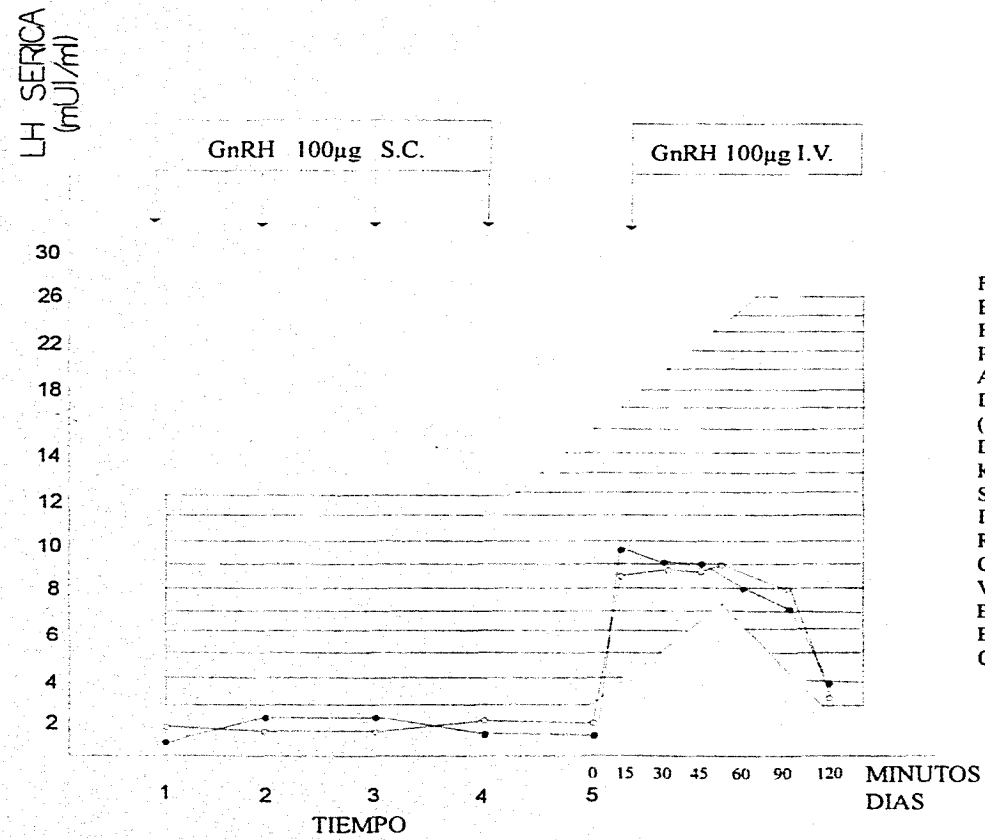


FIG. 1: RESPUESTA HIPOFISIARIA EN TERMINOS DE LH AL ESTIMULO CON GnRH I.V.. POSTERIOR A 4 DIAS DE ADMINISTRACION DEL DECAPEPTIDO, EN DOS SUJETOS (PACIENTES 1 Y 2) CON DIAGNOSTICO DE SINDROME DE KALLMANN. EL AREA SOMBREADA REPRESENTA EL INTERVALO DE LOS VALORES DE REFERENCIA TANTO BASALES COMO POSESTIMULO EN 20 VARONES ADULTOS SANOS, ENTRE LOS 22 Y LOS 35 AÑOS DE EDAD UTILIZADOS COMO CONTROL.

## DISCUSION

El síndrome de Kallmann es la causa más común de hipogonadismo hipogonadotrópico y un motivo frecuente de pubertad retardada en los varones. Se caracteriza por la asociación de hipogonadotropismo y alteraciones en la olfacción, aunque se han descrito una variedad de anomalías clínicas asociadas a la enfermedad que afectan principalmente riñón, ojos, piel y estructuras craneofaciales. Por otra parte, la enfermedad presenta heterogeneidad genética ya que puede transmitirse de manera autosómica recesiva, autosómica dominante o recesiva ligada al cromosoma X. Este último mecanismo es el más frecuente ya que existe una proporción mayor de hombres afectados que de mujeres (7 a 1). El gen responsable del síndrome de Kallmann ligado al X se identificó recientemente y se ha reportado que alteraciones en este gen, tales como mutaciones puntuales y deleciones, son responsables de la enfermedad. En nuestro país no existe a la fecha ningún estudio acerca del síndrome de Kallmann, por lo que se desconocen cuales son las alteraciones clínicas que se asocian con mayor frecuencia a la enfermedad, su mecanismo de transmisión hereditaria en los casos familiares y las



alteraciones moleculares en el gen, todo lo cual es motivo del presente estudio.

En los 22 casos estudiados se comprobó el diagnóstico de la enfermedad en base a niveles disminuidos de gonadotropinas plasmáticas y alteraciones olfatorias. Las anomalías de la olfacción correspondieron a anosmia en 63.6% de los pacientes mientras que el 36.4% de los pacientes resultó hipósmico. En la literatura revisada no existen datos acerca de la proporción de pacientes anósmicos e hipósricos y no se ha podido correlacionar el grado de alteración olfatoria con anomalías específicas a nivel molecular, aunque se considera que las mutaciones que alteran de forma importante la función de la proteína producto de KAL, resultan en individuos anósmicos (91).

Se ha reportado que las portadoras del síndrome de Kallmann ligado al X pueden presentar manifestaciones leves de la enfermedad como alteraciones menstruales y de la olfacción (93) sin embargo, en el presente estudio se evaluó la función olfatoria en 15 madres de casos índice sin encontrarse en ellas ninguna anomalía.

Las alteraciones clínicas asociadas a la enfermedad se encontraron en forma frecuente y fueron: paladar alto (n =

12), sinquinesia de extremidades superiores (n = 11), acortamiento de cuartos metacarpianos (n = 10), padecimientos dermatológicos (n= 6), alteraciones renales (n = 7), alteraciones oftalmológicas (n = 6) y asimetría facial (n = 5). Estas anomalías coinciden con las reportadas en diferentes estudios de la enfermedad y se correlacionan con el sitio de expresión del gen KAL: bulbo olfatorio (alteraciones de la olfacción), núcleo oculomotor (anomalías de la movilidad ocular), mesonefros/metanefros (alteraciones renales) y mesénquima facial (LPH y asimetría facial) (97).

Una observación interesante en este estudio es que no se encontraron algunas anomalías clínicas que se reportan con frecuencia en estudios previos de la enfermedad, particularmente pie cavo, labio y paladar hendido, sordera neurosensorial y retraso mental; esto podría deberse en parte al tamaño de la muestra. Además, se encontraron 4 pacientes con atopia (18.8%) los cuales correspondieron a 2 casos de dermatitis atópica, 1 caso de urticaria y 1 caso de edema angioneurítico. La ocurrencia de enfermedades atópicas en el síndrome de Kallmann no se encuentra reportada en la literatura y puede representar un dato de relevancia en la historia natural de la enfermedad.

**FALTA PAGINA**

**No. 53**

En lo que se refiere al estudio genealógico, en 10 casos se encontró un patrón hereditario sugestivo de herencia recesiva ligada al X, lo que concuerda con la literatura que señala a este tipo de herencia como el más frecuente. Los 12 pacientes restantes son casos únicos del padecimiento en sus respectivas familias y si bien pudieran corresponder a pacientes con los otros dos tipos de herencia de la enfermedad (autosómica recesiva y autosómica dominante), no puede descartarse herencia recesiva ligada al X, ya sea por mutaciones nuevas o que por azar sean los únicos afectados en familias portadoras del gen. Se requerirán estudios moleculares más finos en estas familias para descartar que la enfermedad se encuentre ligada al cromosoma X y así poder realizar diagnóstico temprano del padecimiento y ofrecer un asesoramiento genético confiable. En nuestra población inicial de pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico, no se detectó a ninguna mujer con anosmia o hiposmia y tampoco en la muestra final de 22 pacientes con síndrome de kallmann se encontraron mujeres con la enfermedad aún en los casos familiares. Estos datos podrían sugerir que la forma recesiva ligada al X es más común en nuestra población que en poblaciones estudiadas con anterioridad en las que la proporción de afectados por

sexo que se reporta es de 1 mujer afectada por cada 7 varones con la enfermedad (92).

Los estudios moleculares del gen KAL en los 22 casos reportados en este trabajo, permitieron identificar a 2 pacientes (hermanos) con una deleción intragénica de los exones 3, 4 y 5. De acuerdo a la literatura las deleciones son infrecuentes en el gen KAL (90), en 1991, Bick reportó 2 hermanos con una deleción intragénica de aproximadamente 3 kilobases en el extremo 3' del gen KAL (90). La deleción descrita en nuestros 2 pacientes constituye el segundo reporte de una deleción intragénica, así como la primera alteración molecular identificada en pacientes mexicanos con síndrome de Kallmann.

En el grupo de 11 sujetos en quienes se realizó la técnica de SSCP, se encontraron 3 pacientes con alteración en el patrón de corrimiento electroforético del exón 11, lo que sugiere la presencia de mutaciones puntuales. En estos 3 pacientes deberá realizarse posteriormente la secuenciación directa de dicho exón para descartar o confirmar tal alteración. En los 8 pacientes restantes en los que se realizó el análisis por SSCP de los 14 exones del gen KAL, no se encontraron alteraciones en el patrón de corrimiento electroforético. Estos datos no descartan que

en alguno (s) de estos pacientes pueda existir una mutación puntual ya que se considera que la técnica de SSCP no detecta 20% de tales anomalías (113). Será necesario realizar la secuenciación directa de los 14 exones del gen para descartar la existencia de mutaciones puntuales que sean responsables de la enfermedad.

Por otra parte, en un trabajo publicado en 1993 por Hardelin, se estudiaron diversos casos familiares de síndrome de Kallmann en quienes se observó un patrón de transmisión compatible con herencia recesiva ligada al X (93). En algunas de estas familias no se logró detectar ninguna alteración en el gen KAL aún después de la secuenciación de todos los exones; estos resultados sugirieron 3 posibilidades para explicar la ocurrencia de la enfermedad en tales pacientes:

- 1.- que la mutación se encuentre en regiones intrónicas del gen ( como ha sido reportado por Hardelin ) (92, 93).

- 2.- que la mutación se encuentre en regiones promotoras del gen

- 3.- que algunas de estas familias representen casos de la enfermedad con las otras formas de herencia (autosómica recesiva o autosómica dominante).

Es importante considerar alguna de estas 3 posibilidades en los pacientes en quienes al finalizar nuestro estudio no se encuentre ninguna alteración molecular.

Se requerirán otros datos moleculares para identificar a los genes responsables de las formas dominante y recesiva del síndrome de Kallmann, y poder establecer el mecanismo por medio del cual las alteraciones en estos genes producen la asociación de hipogonadismo hipogonadotrópico y defectos en el sistema olfatorio.

#### REFERENCIAS

- 1.- Ford CE, Jones KW, Polani P, et. al. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal sex dysgenesis (Turner s syndorme). Lancet. y, p.711,1959.
- 2.- Welshons WJ, Russell LB. The Y chromosome as a bearer of male determining factors in the mouse. Proc. Natl. Acad. Scio. USA. 45, p.560,1959.
- 3.- Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. Nature. 183, p.302,1959.
- 4.- Puscheck E, Behzadian A, McDonough P. Molecular biology of sexual diferentiation. Infertility and reproductive medicine clinics of North America. 5, p.69,1994.
- 5.- Odell WD. Puberty. In: Textbook of endocrinology. De Groot, et. al. eds. WB Saunders Co. London,3, Chap. 111,p. 1860,1989.
- 6.-Everet JW, Sawyer CH, Markee JE. A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. Endocrinology. 44, p.234,1949.
- 7.- Mc Cann SM, Taleisnik S, Friedman HM. LH releasing activity in hypothalamic extracts. Soc. Exp. Biol. Med. Proc. 104, p.432,1960.
- 8.- Matsuo H, Baba Y, Mair RMV, et. al. Structure of the porcine LH and FSH-releasing hormone. 1. The proposed aminoacid sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, p.393,1971.
- 9.- Schally A, Arimura A, Baba Y, et. al. Isolation and properties of the FSH and LH releasing hormone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, p.1334,1971.
- 10.- King JA, Millar RP. Heterogeneity of vertebrate luteinizing hormone- releasing hormone. Science. 206, p.67,1979.
- 11.- Dufau ML, Beitins IZ, Mc Arthur JW, et. al. Effects of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) upon bioactive



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

and immunoreactive serum LH levels in normal subjects. J. Clin. Endocrinol. Metab. 43, p.658,1976.

12.- Beitins IZ, Dufau ML, O'loughlin K, et. al. Analysis of biological and immunological activities in the two pools of LH released during constant infusion of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in men. J. Clin. Endocrinol. Metab. 45, p.605,1977.

13.- Mc Cann SM, Mizunuma H, Samson WK. Differential hypothalamic control of FSH secretion. A review. Psychoneuroendocrinology. 8, p. 299,1983.

14.- Wise PM, Rance N, Barr GD, et. al. Further evidence that luteinizing hormone-releasing hormone also is follicle stimulating hormone releasing hormone. Endocrinology. 104, p.940,1979.

15.- Setalo G, Vigh S, Schally A, et al. LHRH containing neural elements in the rats hypothalamus. Endocrinology.96, p.135,1975.

16.-Kawano H, Daikoku S. Immunohistochemical demonstration of LHRH neurons and their pathways in the rat hypothalamus. Neuroendocrinology. 32, p.179,1981.

17.- Bergland RM, Page RB. Can the pituitary secrete directly to the brain ? (affirmative anatomical evidence). Endocrinology. 102, p. 1325,1978.

18.- Conn PM, Hazum E. Luteinizing hormone release and gonadotropin releasing hormone (LHRH) receptor internalization: independent action of LHRH. Endocrinology. 109, p.2040,1981.

19.- Clayton RN, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors:Characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. Endocr. Rev. 2, p.186,1981.

20.-Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. Endo. Rev. 4, p.179, 1983.

21.- Odell WD. LH and FSH. En: De Groot L, Cahill GF, Odell WD, et. al. Endocrinology, Grine and Stratton, Nueva York, p.149,1979.

22.- Eik-Nes KB. Biosynthesis and secretion of testicular steroids. En: Greep RO, Astwood EB (Eds), Handbook of Physiology, American Physiology Society, Washington, p.95,1975.

- 23.- Ulloa- Aguirre A, Méndez JP, Díaz-Sánchez V, et al. Self- priming effect of LH/hCG upon the biphasic testicular response to exogenous hCG. I. Plasma testosterone profile. J. Clin. Endocrinol. Metab. 61, p.926,1985.
- 24.- Spratt DI, O'dea LSL, Schoenfeld D, et. al. Neuroendocrine-gonadal axis in men: frequent sampling of LH, FSH and testosterone. Am. J. Physiol. 254, p.658,1988.
- 25.- Wildt L, Hausler A, Marshall G, et. al. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the Rhesus monkey. Endocrinology. 109, p.376,1981.
- 26.- Roth AH, Kahn CR, Neville DM , et. al. Insulin receptor deficiency in genetic and acquired obesity. J. Clin. Invest. 56, p. 769,1975.
- 27.- Baxter JD, Funder JW. Hormone receptors. N. Eng. J. Med. 301, p. 1149,1979.
- 28.- Catt KJ, Harwood JP, Aguilera G, et. al. Hormonal regulation of peptide receptor and target cell response. Nature. 280, p.109,1979.
- 29.- Levine JE, Ramirez VD. Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy as stimulated with push-pull cannulae. Endocrinology. 111, p.1438, 1982.
- 30.- Sarkar D, Fink G. Luteinizing hormone releasing factor in pituitary stalk plasma from long-term ovariectomized rats: effects of steroids. J. Endocrinol. 86, p.511,1980.
- 31.- Kow LM, Pfaff D. Suprachiasmatic neurons in tissue slices from ovariectomized rats: electrophysiological and neuropharmacological characterization and the effects of estrogen treatment. Brain Res. 297, p.275,1984.
- 32.- Judd HL. Biorhythms of gonadotropin and testicular hormone secretion. In: Krieger DT. Ed. Endocrine Rhythms. New York: Raven, p. 299,1979.
- 33.- Rebar RW, Yen SSC. Endocrine rhythms in gonadotropins and ovarian steroids with reference to reproductive processes. In: Krieger DT, ed. Endocrine rhythms. New York: Raven, p.259,1979.

- 34.- Crowley WF, Filicori M, Spratt DI, et. al. The physiology of gonadotropin releasing hormone (LHRH) in men and women. *Recent. Prog. Horm. Res.* 41, p.473,1985.
- 35.- Veldhuis JD. Physiological properties of the luteinizing hormone pulse signal: Impact of intensive and extended venous sampling paradigms on its characterization in healthy men and women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62, p.881,1986.
- 36.- Seyler LE Jr, Graze K, Canalis E, et. al. Effect of sex-steroid priming on pituitary response to LHRH. In: Beiling CG, Wentz AC, eds. *The LH Releasing Hormone*. New York: Masson. p.87,1980.
- 37.- Ying SY. Inhibins and activins. In: Martini L, Ganong WF, eds. *Frontiers in Neuroendocrinology*. New York: Raven. 10, p.167,1988.
- 38.- Maison AJ, Berkmeir LM, Schmelzer CH, et al. Activin B: precursor sequence, genomic structure and in vitro activities. *Mol. Endocrinol.* 3, p.1352,1989.
- 39.-Evans WS, Cronin MJ, Thorner MO. Hypogonadism in hyperprolactinemia: proposed mechanisms. In: Ganong WF, Martini L, eds. *Frontiers in Neuroendocrinology*. New York: Raven. 7, p.77, 1982.
- 40.- Quikley ME, Rakoff JS, Yen SS. Increased luteinizing hormone sensitivity in dopamine inhibition of polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52, p. 231,1981.
- 41.- Motta M, Piva F, Martini L. The hypothalamus as the center of endocrine feedback mechanisms. In: Martini L, Motta M, Fraschini F, eds. *The Hypothalamus*. New York: Academic. p. 463,1970.
- 42.-Barracough CA, Wise PM: The role of catecholamines in the regulation of the pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion. *Endocr. Rev.* 3, p.91,1982.
- 43.-Shivers BD, Harlan RD, Morrell JI. Absence of oestradiol in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature.* 304, p.345,1982.
- 44.-Ulloa Aguirre A, Méndez JP, Gonzalez A, et al. Changes in the responsiveness of luteinizing hormone secretion of the opioid antagonist naloxone throughout male sexual maturation. *Clin. Endocrinol.* 29, p.17,1988.
- 45.- Quikley ME, Sheehan KL, Casper RF, et al. Evidence of an increased opioid inhibition of luteinizing hormone secretion

- in hyperprolactinemic patients with pituitary microadenoma. J. Clin. Endocrinol. Metab. 50, p.427,1980.
- 46.- Van Vliet G. Clinical aspects of normal pubertal development. Horm. Res. 36, p.93,1991
- 47.- Wheeler MD. Physical changes of puberty. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 20, p.1,1991.
- 48.- Retter EO, Grumbach MM: Neuroendocrine control mechanism and the onset of puberty. Annu. Rev. Physiol. 44, p.595,1982.
- 49.- Grumbach MM, Roth JC, Kaplan SL, et al. Hypotalamic pituitary regulation of puberty in man; evidence and concepts derived from clinical research. In: Grumbach MM, GRave GD, Mayer FE (Eds) Control of Puberty: John wiley and son Inc, New York, p 115, 1972.
- 50.- Rosenfield RL. Puberty and its disorders. in girls. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 20, 1 p.15, 1991.
- 51.- Bardin CW, Paulsen CA. The testes. In Williams A (Ed.) Texbook of Endocrinology, WB Saunders and Co, Philadelphia, p 293, 1981.
- 52.- Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. Arch. Dis. Child. 45, p 13, 1970.
- 53.- Styne D, Grumbach ML. Puberty in the male and female; its physiology and disorders. In: Yen SSC, Jaffe RB (Eds.) Reproductive Endocrinology, Physiology, Pathophysiology and Clinical Management. WB Saunders, Philadelphia, p.591,1979.
- 54.- Salardi S, Orsini F, Cacciari E, et al. Pelvic ultrasonography in premenarcheal girls: Relation to puberty and sex hormone concentrations. Arch. Dis. Child. 60, p.120,1985.
- 55.- Stanhope R, Adams J, Jacobs HS, et al. Ovarian ultrasound assessment in normal children, idiopathic precocious puberty, and during low dose pulsatile gonadotrophin releasing hormone treatment of hipogonadotropic hipogonadism. Arch. Dis Child. 60, p.116,1985.
- 56.- Burr IM, Sizonenko PC, Kaplan SL, et al. Hormonal changes in puberty. Pediatr. Res. 4, p.25,1970.
- 57.- Marshall WA, Tanner JM. Puberty; in Falkner F, Tanner JM (Eds.): Human Growth. New York Plenum Press, 2, p.171,1986.

- 58.- Tanner JM. The development of the reproductive system. In: Growth at adolescence. ed. 2. Oxford, Blackwell Scientific publications. 4, p.53,1962.
- 59.- Marshall WA, Tanner JM: Variations in the pattern of pubertal changes in girls. Arch. Dis. Child. 44, p 291,1969.
- 60.- Lee PA. Normal ages of pubertal events among american males and females. J. Adolesc. Health Care. 1, p.26,1980.
- 61.- Billewicz WZ, Fellowes HM, Thomson AM. Pubertal changes in boys and girls in Newcastle upon Tyne. Ann. Hum. Biol. 8, p.211,1981.
- 62.- Zacharias L, Rand WM, Wurtman RJ. A prospective study of sexual development and growth in american girls: the statistics of menarche. Obstet. Gynecol. Surv. 31, p.325,1976.
- 63.- Largo RH, Prader A. Pubertal development in Swiss girls. Helv. Pediatr. Acta. 38, p.229,1983.
- 64.- Ramos Rodriguez RM. Crecimiento y proporcionalidad corporal en adolescentes mexicanas. UNAM, p.119,1986.
- 65.- Largo RH, Prader A. Pubertal development in Swiss boys. Helv Pediatr. Acta. 38, p.242,1983.
- 66.- Laron Z, Dickerman Z, Arad J, et al. Age at first conscious ejaculation. In: Cacciari E, Prader A (Eds.) Pathophysiology of Puberty. WB Saunders, Philadelphia. p.117,1980.
- 67.- Barnes HV. Physical growth and development during puberty. Med. Clin. North Am. 59, p.1305,1975.
- 68.- Tanner JM. Physical growth at adolescence. In: Growth at Adolescence, Ed. 2 Oxford, Blackwell Scientific Publications, p.1, 1962.
- 69.- Toublanc JE, Roger M, Chaussain JL. Etiologies of late puberty. Horm. Res. 36, p.136,1991.
- 70.- Kulin EH. Disorders of sexual maturation. In: Delayed adolescence and precocious puberty. In. Textbook of endocrinology. De Groot, et al. eds. WB. Saunders Co. London, 3, chap. 112, p.1873, 1989.

- 71.- Knorr D, Bidlingmaier F, Butenandt O, et al. Plasma testosterone in male puberty. Acta. Endocrinol. 75, p.181,1974.
- 72.- Stanhope R. Preece MA, Brook CGD. Hypoplastic optic nerves and pituitary dysfunction. Arch. Dis. Child. 59, p.111,1984.
- 73.- Romshe CA, Zipf WB, Miser A, et. al. Evaluation of growth hormone release and human growth hormone treatment in children with cranial irradiation-associated short stature. J. Pediatr. 104, p.177,1984.
- 74.- Kauli R, Prager-Lewin R, Laron Z. Pubertal development in the Prader-Labhart-Willi syndrome. Acta. Pediatr. Scand. 67, p.763,1978.
- 75.- Ledbetter DH, Riccardi VM, Airhart SD. Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi Syndrome. N. Engl. J. Med. 304, p.325, 1981.
- 76.- Toledo SPA, Medeiros-Neto GA, Knobel M, Mattar E. Evaluation of the hypothalamic-pituitary-gonadal function in the Bardet-Biedl syndrome. Metabolism. 26, p.1277,1977.
- 77.- Volpe R, Metzler WS, Johnson MW. Familial hypogonadotropic eunuchoidism with cerebellar ataxia. J. Clin. Endocrinol. Metab. 23, p.107,1963.
- 78.- Holliday MA, Kulin HE, Lockwood DH. et. al. The endocrine control of growth in children with chronic renal failure. Am. J. Kidney Dis. 7, p.262,1986.
- 79.- Cacciari E, Salardi S, Lazzari R, et. al. Short stature and celiac disease. A relationship to consider even in patients with no gastrointestinal tract symptoms. J. Pediatr. 103, p.708,1983.
- 80.- Maestre de San Juan A. Siglo Médico, 131, 211, 1856.
- 81.- Kallmann FJ, Schonfeld WA, Barron SE. The genetics aspects of primary eunuchoidism. Am. J. Ment. Defic. 48, p.203,1944.
- 82.- De Morsier, G. Schweiz Arch. Neurol. Psychiat.74, p.309,1954.
- 83.- White B, Rogol AD, Brown KS et. al. The syndrome of anosmia with hypogonadism. A genetic study of 18 new families and a review. Am. J. Med. Genet. 15, p.417,1983.

84.- Hermanussen M, Sippell WG. Heterogeneity of Kallmanns syndrome. Clin. Genet. 28, p.106, 1985.

85.- Jones J, Kemman E. Olfacto-genital dysplasia in the female. Obstet. Gynecol. Annu. 5, p.443,1976.

86.- Ballabio A, Parenti G, Tippett p, et. al. X linked ichthyosis due to steroid sulphatase deficiency associated with Kallmann syndrome (hypogonadotropic hypogonadism and anosmia): linkage relationships with Xg and cloned DNA sequences from the distal short arm of the X chromosome. Hum. Genet. 72, p.237,1986

87.- Meitinger T, Heye B. Petit C, et. al. Definitive localization of X-linked Kallmann syndrome (Hypogonadotropic hypogonadism and anosmia) to Xp22.3: close linkage to the hypervariable repeat sequence CRI-5232. Am. J. Hum. Genet. 47, p.664,1990.

88.- Franco B, Guioli S, Pragliola A, et. al. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path finding molecules. Nature. 353, p.529,1991.

89.- Legouis R, Hardelin JP, Levilliers J, et. al. The candidate gene for the X- linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. Cell. 67, p.423,1991.

90.- Bick D, Franco B, Sherins RJ, et. al. Intragenic Deletion of the KALIG-1 Gene In Kallmann's Syndrome. N. Eng. J. Med. 326, p.1752,1992.

91.- Hardelin JP, Levilliers J, Del Castillo I, et al. X chromosome-linked Kallmann syndrome: stop mutations validate the candidate gene. Proc Natl Acad Sci USA 89, p.8190,1992.

92.- Hardelin JP, Levilliers J, Young J, et. al. Xp22.3 Deletions In Isolated Familial Kallmann's Syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 76, p.827,1993.

93.- Hardelin JP, Levilliers J, Blanchard S, et. al. Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome. Hum. Mol. Genet. 2, p.373,1993.

94.- Klink A, Meindl A, Hellebrand H, et. al. A patient with an interstitial deletion in Xp22.3 locates the gene for X-linked recessive chondrodysplasia punctata to within a one megabase interval. Hum. Genet. 93, p.463,1994.

- 95.- Martul P, Pineda J, Levilliers J, et. al. Hypogonadotropic Hypogonadism with hyposmia, X-linked ichthyosis, and renal malformation syndrome. Clin. Endocrinol. 42, p.121,1995.
- 96.- Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origin of luteinizing hormone neurons. Nature. 338, p.161,1989.
- 97.- Rugarli E, Ballabio A. Kallmann Syndrome: From Genetics to Neurobiology. JAMA. 270, p 2713,1993
- 98.- Carson SA. Kallmann Syndrome. En: Birth Defects Encyclopedia. Buyse ML. p.1000,1990.
- 99.- Spratt DI, Carr DB, Merriam GR, et. al. The spectrum of abnormal patterns of gonadotropin-releasing hormone secretion in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: clinical and laboratory correlations. J. Clin. Endocrinol. Metab. 64, p.283,1987.
- 100.- Whitcomb RW, Crowley WF Jr. Male hypogonadotropic hypogonadism. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 22, p.125, 1993.
- 101.- Erhardt AA, Meyer-Bahlburg HFL. Psychological correlates of abnormal pubertal development. J. Clin. Endocrinol. Metab. 4, p.207, 1975.
- 102.- Parenti G, Rizzolo MG, Ghezzi M, et. al. Variable penetrance of hypogonadism in a sibship with Kallmann syndrome due to a deletion of the KAL gene. Am. J. Med. Genet. 57, p. 476,1995.
- 103.- Sufi SB, et. al. Programme for the provision of matched reagents for radioimmunoassay of hormones in reproductive physiology. Method Manual, Tenth edition, WHO, Geneva, Switzerland, 1986.
- 104.- Rosen SW, Gahn P, Rogol AD. Congenital anosmia: Detection thresholds for seven odorant classes in hypogonadal and eugonadal patients. Ann. Otol. 88, p.288,1979.
- 105.- Berkow R, et. al. El Manual Merck. Ediciones Doyma, 8a. edición, 1989.
- 106.- Stevenson RE, et. al. Human malformations and related anomalies. Oxford University Press. First Edition,1993.
- 107.- Thompson MW, et. al. Genetics in medicine. W.B Saunders company. Fifth Edition,1991.



108.- King RC, et. al. A dictionary of genetics. Oxford University Press. Fourth Edition, 1990.

109.- Rooney DE, et. al. Human cytogenetics, a practical approach, vol. I. Oxford University Press. Second Edition, 1992.

110.- Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. Molecular-cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor laboratory press. Nueva York, 1989.

111.- Hanahan D. DNA cloning: a practical approach. In: Glover DM. eds. IRL Oxford, p.109, 1985.

112.- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et. al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, p.2766, 1989.

113.- Orita M, Sekiya T, Hayashi K. DNA sequence polymorphism in Alu repeats. Genomics. 8, p.271, 1990.