

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN QUE CODIFICA  
PARA EL RECEPTOR DE LA HORMONA FOLICULO  
ESTIMULANTE EN PACIENTES CON DISGENESIA  
GONADAL PURA 46,XX

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
**(BIOLOGIA CELULAR)**  
P R E S E N T A :  
**ELSA VERONICA DE LA CHESNAYE CARAVEO**

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA

01/15/10



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## PREFACIO

Agradezco en primer lugar a mis padres y a toda mi familia, por su paciencia, amor, y por su apoyo en todo momento, independientemente de las circunstancias, ya que sin su ayuda no podría haberse realizado esta tesis.

A la Dra. Patricia Canto, directora de tesis, por su apoyo en todo momento y especialmente por su amistad.

Al Dr. Juan Pablo Méndez, jefe de la Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo, por su apoyo y aportaciones.

A mis compañeras del laboratorio por su amistad, consejos y apoyo en todo momento.

## ABREVIATURAS

aa:	Aminoácido
AMPc:	Monofosfato de Adenosina en su forma cíclica
ATP:	Trifosfato de Adenosina
ddH <sub>2</sub> O:	Agua bidestilada
DGP:	Disgenesia Gonadal Pura
DHT:	Dihidrotestosterona
DNA:	Acido Desoxirribonucléico
DNTP's:	Desoxinucleótidos trifosfatados
EDTA:	Acido etilen-diamino-tetra-acético monosódico
FSH:	Hormona Folículo Estimulante
FSHR:	Receptor de la Hormona Folículo Estimulante
GTP:	Trifosfato de Guanidina
HIM:	Hormona Inhibidora de las Estructuras Mülllerianas
Kb:	Kilobases
KCl:	Cloruro de Potasio
LH:	Hormona Luteinizante
Mg <sub>2</sub> Cl:	Cloruro de Magnesio
Na <sub>2</sub> EDTA:	Acido etilen-diamino-tetra-acético disódico
NaCl:	Cloruro de Sodio
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> :	Persulfato de amonio
pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
RIA:	Radioinmunoanálisis
SDS:	Sulfato dodecil-sódico
T:	Testosterona
TBE:	Amortiguador de Tris-base, Acido bórico y EDTA
Tris-HCl:	Tris-Acido clorhídrico
TSH:	Hormona Estimulante de la Tiroides
U:	Unidades

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

- Figura 1: Estructura del gen que codifica para el receptor de FSH
- Figura 2: Estructura del receptor de FSH y localización de mutaciones y variantes alélicas
- Tabla 1: Características clínicas de las 12 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XX
- Tabla 2: Concentraciones hormonales plasmáticas de gonadotropinas y estradiol de las 12 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XX
- Figura 3: Método para la extracción de DNA de sangre periférica
- Figura 4: Método para la extracción de DNA de gónadas fijadas en parafina
- Tabla 3: Secuencia de los oligonucleótidos en dirección 5'→3' que se utilizaron en el estudio del gen que codifica para el FSHR
- Figura 5: Reacción en cadena de la polimerasa
- Figura 6: Secuenciación automática
- Figura 7: Secuenciación manual
- Figura 8: Reacción en cadena de la polimerasa de los exones 1 y 2 del gen del FSHR de las pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XX
- Figura 9: Reacción en cadena de la polimerasa de los exones 3 y 4 del gen del FSHR de las pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XX
- Figura 10: Reacción en cadena de la polimerasa de los exones 5 y 6 del gen del FSHR de las pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XX
- Figura 11: Reacción en cadena de la polimerasa de los exones 7 y 8 del gen del FSHR de las pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XX
- Figura 12: Reacción en cadena de la polimerasa de los exones 9 y 10 (fragmento A) del gen del FSHR de las pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XX

- Figura 13: Reacción en cadena de la polimerasa del exón 10 (fragmentos B y C) del gen del FSHR de las pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XX
- Figura 14: Reacción en cadena de la polimerasa del exón 10 (fragmento D) del gen del FSHR de las pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XX
- Figura 15: Secuenciación parcial en dirección 5' de los exones 1 y 2 del gen del FSHR
- Figura 16: Secuenciación parcial en dirección 5' de los exones 3 y 4 del gen del FSHR
- Figura 17: Secuenciación parcial de los exones 5 y 6 del gen del FSHR
- Figura 18: Secuenciación parcial en dirección 3' del exón 7 del gen del FSHR
- Figura 19: Secuenciación parcial en dirección 5' de los exones 8 y 9 del gen del FSHR
- Figura 20: Secuenciación parcial en dirección 5' del exón 10 (fragmentos A y B) del gen del FSHR
- Figura 21: Secuenciación parcial en dirección 5' del exón 10 (fragmentos C y D) del gen del FSHR

## INDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
Diferenciación sexual normal .....	3
Eje Hipotálamo-hipófisis-gónada .....	9
Receptor de la hormona folículo estimulante .....	11
Estructura del gen del receptor de la FSH .....	12
Alteraciones de la diferenciación sexual .....	13
Disgenesia gonadal pura 46,XX .....	14
JUSTIFICACION .....	18
OBJETIVO .....	19
HIPOTESIS.....	19
SUJETOS Y METODOS.....	20
Sujetos .....	20
Extracción de DNA genómico .....	21
Extracción de DNA a partir de bloques de parafina...	23
Oligonucleótidos .....	24
Reacción en cadena de la polimerasa .....	25
Purificación de los productos de PCR .....	26
Secuenciación .....	27
RESULTADOS.....	31
DISCUSION .....	33
CONCLUSION .....	40
REFERENCIAS .....	41

## RESUMEN

La disgenesia gonadal pura (DGP), es una alteración en la traducción del sexo cromosómico al sexo gonadal, la cual se caracteriza por presentar un complemento cromosómico 46,XX y falla ovárica prematura que se traduce en amenorrea primaria (en su forma completa) o amenorrea secundaria (en su forma incompleta) y en un desarrollo puberal anormal. La DGP 46,XX se puede presentar en forma esporádica o en casos familiares con un patrón de transmisión autosómico recesivo. También se presenta hipogonadismo hipergonadotrópico secundario a la presencia de estrías gonadales bilaterales u ovarios marcadamente hipoplásicos con algunos folículos. Se ha demostrado en casos esporádicos y familiares, que mutaciones en sentido erróneo en el gen (FSHR) que codifica para el receptor de la hormona folículo estimulante (FSH), son la causa de una forma de DGP 46,XX al ocasionar una reducción en la capacidad de unión de la hormona a su receptor y una consecuente disminución de la producción de adenosin monofosfato en su forma cíclica (AMPC).

El gen abarca 54 kilobases y está formado por 10 exones y 9 intrones. La región traducida comprende una proteína de 678 aminoácidos, con un peso molecular de 76.46 kilodaltones.

En este trabajo se realizó el estudio molecular de los 10 exones que comprenden al gen del FSHR de 12 mujeres con

diagnóstico de DGP 46,XX. Se extrajo el DNA genómico de sangre periférica de las 12 pacientes con DGP 46,XX. Por medio de la técnica de PCR, se amplificaron los 10 exones del gen del FSHR para investigar la presencia de deleciones, utilizándose 12 pares de oligonucleótidos sintéticos, derivados de la secuencia de dicho gen. Para identificar la presencia de mutaciones puntuales, los fragmentos amplificados por PCR se purificaron y fueron secuenciados en ambas direcciones.

En todos los casos se observó que el tamaño y la secuencia de los productos de PCR de los 10 exones del gen del FSHR en las 12 pacientes estudiadas fueron iguales a los normales; por lo que se sugiere, que la presencia de DGP 46,XX en las 12 mujeres estudiadas, puede ser secundaria a mutaciones localizadas en la región promotora del gen del FSHR, en sus regiones intrónicas o bien debido a la existencia de alteraciones en algunos de los genes que participan en la cascada de la diferenciación sexual.

## INTRODUCCION

### DIFERENCIACION SEXUAL NORMAL

La diferenciación sexual es uno de los fenómenos biológicos de mayor trascendencia y complejidad, el cual permite la perpetuación de las especies con reproducción sexual. El dimorfismo sexual es el resultado de una serie de eventos que se presentan en las etapas más tempranas de la vida, requiriéndose un alto grado de precisión en sus mecanismos de regulación. Este se realiza en tres etapas sucesivas: cromosómica, gonadal y fenotípica. La diferenciación cromosómica se inicia al momento de la fertilización cuando un espermatozoide que posee un cromosoma X o un cromosoma Y fertiliza a un óvulo que aporta un cromosoma X. De esta forma, se establece el dimorfismo sexual que caracteriza a los mamíferos, en los cuales la hembra presenta un complemento cromosómico sexual XX y el macho XY. Los eventos posteriores en la diferenciación sexual dependerán de la presencia de factores determinantes de masculinización (1,2). La presencia del cromosoma Y es necesaria para la diferenciación testicular de la gónada primitiva, independientemente del número de cromosomas X presentes en el genoma del individuo (3,4). El cromosoma Y es uno de los cromosomas humanos más pequeños, formado por una región heterocromática y una región eucromática. La región eucromática abarca el brazo corto, el centrómero y el segmento proximal del brazo largo (5); esta región está formada

por bloques de secuencias homólogas al cromosoma X, familias de secuencias repetidas específicas y todos los genes identificados del cromosoma Y (6). La región heterocromática se encuentra localizada en la parte distal del brazo largo y está constituida de secuencias altamente repetidas (7).

El cromosoma X es un cromosoma grande que constituye el 5.3% del genoma haploide. Se han clonado numerosos genes que en su mayoría codifican para funciones somáticas; asimismo, se han reportado un gran número de enfermedades ligadas a este cromosoma (3).

En 1949, Barr y Bertram (8) identificaron en las neuronas de gatos hembras un cuerpo adherido a la membrana nuclear que se teñía intensamente y que se encontraba ausente en las neuronas de gatos machos. Ohno y cols. (1) demostraron que esta estructura denominada cuerpo de Barr o cromatina sexual estaba formada por un cromosoma X condensado; en estudios posteriores se determinó que dicho cromosoma X presentaba una configuración no lineal con los telómeros muy próximos (9).

La equivalencia en la dosis génica entre machos y hembras se logra mediante la inactivación transcripcional de uno de los cromosomas X en el núcleo de cada célula somática femenina (10). La mayoría de los genes de uno de los cromosomas X se inactivan en forma temprana durante la embriogénesis (días 12 y 18 de la gestación humana) y en cada célula esta inactivación es al azar, es un proceso heredable ya que el cromosoma X permanece silencioso en las futuras generaciones celulares (11).

En mujeres heterocigotas para variantes electroforéticas de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa se observó que los ovocitos formaban un heterodímero de las dos formas de la enzima, con lo que se demostró que en la línea germinal femenina se reactiva el cromosoma X inactivo antes de la meiosis (12). La presencia de ambos cromosomas X activos es necesaria para la formación del folículo y el subsecuente desarrollo del ovario (11). Por otro lado, en la línea germinal masculina el único cromosoma X, aparentemente no se transcribe durante la espermatogénesis, y permanece condensado dentro de la vesícula sexual (7).

Esta diferencia en la actividad de los cromosomas X en las células germinales femeninas y masculinas refleja el estado activo que permite el apareamiento normal de ambos cromosomas homólogos en la meiosis femenina, a diferencia de lo que ocurre en la espermatogénesis, en la cual la inactivación del cromosoma X protege de una recombinación entre regiones no homólogas, que tendría un efecto deletéreo en la célula germinal (13).

El dimorfismo sexual gonadal se hace presente hasta la sexta semana de vida intrauterina (14,15). La gónada primitiva se transformará en testículo si es que existe la presencia y la acción del factor determinante testicular el cual se localiza en el cromosoma Y. De no existir éste, la gónada primitiva evolucionará hacia ovario (16,17). En el humano, el primordio gonadal es bipotencial e indistinguible morfológicamente en ambos sexos hasta la etapa de 12mm (alrededor del día 42 de la

gestación humana). Las crestas gonadales se forman durante la tercera y cuarta semanas de la embriogénesis por la proliferación del epitelio celómico y la condensación del mesénquima en ambos lados de la línea media entre el mesonefros y el mesenterio dorsal (18).

En un principio, las células germinales primordiales se localizan en el endodermo posterior del saco vitelino e inician su migración hacia el primordio gonadal a través del mesénquima del mesenterio durante la quinta semana de gestación. Se ha reportado que en el embrión humano el número de células germinales en migración es aproximadamente de 700 a 1300, y que para la octava semana de gestación están presentes cerca de 600,000 células germinales. Posteriormente, estas células se convierten en ovogonias o espermatogonias (18).

Las gónadas embrionarias masculinas o femeninas están formadas por células germinales y tres tipos de células somáticas: las células de soporte (células de Sertoli en el hombre y células foliculares en la mujer), las células esteroideogénicas (células de Leydig en el hombre y células de la teca en la mujer) y células del tejido conectivo (19).

En ausencia del gen determinante del testículo, el primordio gonadal posee una tendencia inherente a desarrollarse como ovario siempre y cuando existan células germinales, ya que en caso contrario se formarían estrías fibrosas incapaces de producir hormonas sexuales femeninas durante la pubertad (20,21). En la mujer continúa la proliferación del epitelio celómico y las

células germinales crecen y se diferencian en ovogonias. Entre la semana décima primera y la décima segunda de edad gestacional (etapa de 80 mm), las ovogonias entran en la primera fase meiótica (ovocitos primarios) y posteriormente se detienen en la etapa de dictioteno hasta la pubertad, momento en el cual la hormona folículo estimulante (FSH) continúa la meiosis (22).

La diferenciación fenotípica masculina y femenina se lleva a cabo por la acción de las hormonas sintetizadas en cada una de las gónadas específicas. El mecanismo que da lugar a este dimorfismo en los mamíferos fue descrito originalmente por Jost (23,24) quien demostró que al diferenciarse la gónada primitiva hacia testículo, se induce el desarrollo del fenotipo masculino; en cambio, si la diferenciación gonadal se da hacia ovario, el fenotipo, aparentemente de manera pasiva, será femenino. La ausencia temprana de gónadas fetales también induce un fenotipo femenino, lo cual apoya el concepto de inactividad endócrina del ovario fetal (18).

Las estructuras primordiales del tracto genital que dan origen a los genitales internos, incluyen dos sistemas de conductos que se encuentran presentes en los embriones de ambos sexos: los conductos Wolffianos (mesonéfricos) y los conductos Müllerianos (paramesonéfricos). Los genitales externos se desarrollan a partir de un primordio común (tubérculo genital, pliegues genitales y engrosamientos labioescrotales) (25).

El desarrollo del fenotipo masculino está dado por el efecto de tres hormonas fetales virilizantes sobre los primordios

genitales. La primera de ellas, secretada por las células de Sertoli del testículo, es la hormona inhibidora de estructuras Mullerianas (HIM) que se encarga de inducir la involución de los conductos Mülllerianos, proceso que se observa entre la sexta y octava semana de la gestación y concluye en la décima primera con la desaparición de estas estructuras. Inmediatamente después de iniciada la síntesis de la HIM, las células de Leydig sintetizan y secretan testosterona (T). El efecto virilizante de la T se ejerce sobre los conductos Wolffianos que se diferencian a epidídimo, vas deferens, vesículas seminales y conducto eyaculador (18).

La T es el andrógeno principal secretado por el testículo y es el precursor de la dihidrotestosterona (DHT). Esta se forma en la célula blanco por la acción de la  $5\alpha$ -reductasa extragonadal. Esta hormona durante la embriogénesis, es la única responsable del desarrollo de los genitales externos masculinos y de la próstata (26).

Durante la embriogénesis, el ovario no secreta HIM, ni T (la ausencia de esta última hormona da lugar a la regresión de los conductos Wolffianos), al no secretarse HIM, los conductos Mülllerianos se diferencian en trompas de Falopio, útero y tercio superior de la vagina; el tercio inferior de esta última proviene del seno urogenital. En ausencia de DHT el primordio genital se transformará en clítoris, labios mayores y labios menores (15,18).

## EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-GONADA

En 1949, Everet y cols., (27) propusieron que la regulación de la síntesis y secreción de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante, se encontraba mediada por la acción que el sistema nervioso central ejercía sobre la hipófisis anterior. Se ha demostrado que la acción de la hormona liberadora de gonadotropinas producida en el hipotálamo es un factor determinante para la síntesis y secreción de LH y FSH. Posteriormente, en 1960, Mc Cann y cols. (28), demostraron que la inyección de extractos hipotalámicos a ratas inducía la secreción de LH por la hipófisis anterior. Los trabajos tanto de Matsuo (29) como de Shally (30), demostraron que un decapeptido era el responsable de la estimulación del gonadotropo, denominándosele, desde entonces, como hormona liberadora de gonadotropinas.

Las gonadotropinas (LH y FSH) ejercen su acción sobre las gónadas (testículos u ovarios), al estimular la secreción de esteroides y la maduración de los gametos (31); ésto se lleva a cabo al interaccionar ambas gonadotropinas con sus receptores específicos localizados en las gónadas (células de la granulosa y células de Sertoli). Para que se lleve a cabo la interacción ligando-receptor, son necesarias dos condiciones indispensables para las respuestas subsecuentes, dichas condiciones son la afinidad y la especificidad. La primera hace posible que a bajas

concentraciones fisiológicas, la hormona sea capaz de reconocer a su receptor respectivo, mientras que la segunda determina que bajo condiciones fisiológicas las funciones tanto del receptor como de la hormona sean evocadas (32).

La unión de las gonadotropinas a sus respectivos receptores inducen un cambio conformacional en los mismos y estimulan a la adenilato ciclasa incorporada a la membrana, la cual a su vez, cataliza la síntesis de monofosfato de adenosina en su forma cíclica (AMPC) que actuará como segundo mensajero. El sistema de adenilato ciclasa se encuentra compuesto por tres unidades diferentes unidas a la membrana: el receptor para la hormona que contiene el sitio específico para el reconocimiento de las gonadotropinas; la subunidad catalítica de adenilato ciclasa, la cual convierte trifosfato de adenosina (ATP) a AMPC; y por último la subunidad reguladora de guanidil nucleótido que acopla trifosfato de guanidina (GTP) uniendo al receptor hormonal a la adenilato ciclasa (32). El compartimiento intracelular del receptor se encuentra directamente involucrado en la señal de traducción.

Los modelos experimentales sugieren que el dominio extracelular de los receptores adoptan una configuración en forma de "U" o de semi-barril, lo que permite su interacción con el dominio transmembranal (33,34). El estado inactivo del receptor se mantiene debido a las constricciones estructurales formadas por los aminoácidos específicos localizados principalmente en el

dominio transmembranal; la interacción con el ligando, libera las constricciones estructurales y permite la activación de la proteína G (35). Se ha postulado que existe un equilibrio entre la forma inactiva y la forma activa de los receptores que acoplan<sup>3</sup> proteínas G. La unión del ligando a su receptor probablemente induce la isomerización del mismo y consecuentemente su activación (32).

### RECEPTOR DE LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE (FSHR)

En los ovarios, la FSH actúa sobre los folículos para dar inicio a la ovogénesis. Esta hormona estimula el crecimiento y diferenciación de las células de la granulosa al interactuar en el ovario con un receptor glicoproteico específico de superficie, de alta afinidad, localizado exclusivamente en la membrana de las células de la granulosa, dicha interacción activa la producción de estrógenos al promover la estimulación de la enzima  $P_{450}$  la cual, lleva a cabo la aromatización de androstenediona a estrógenos (36-38).

El FSHR pertenece a una superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, el cual está constituido por un dominio extracelular amino-terminal, siete dominios transmembranales hidrofóbicos y un dominio intracelular carboxilo-terminal (39). En el dominio extracelular de la proteína se identifican cuatro sitios potenciales para glicosilación; asimismo, en la región amino-terminal, al igual que en la unión entre el dominio extracelular y el dominio transmembranal, se localizan grupos de

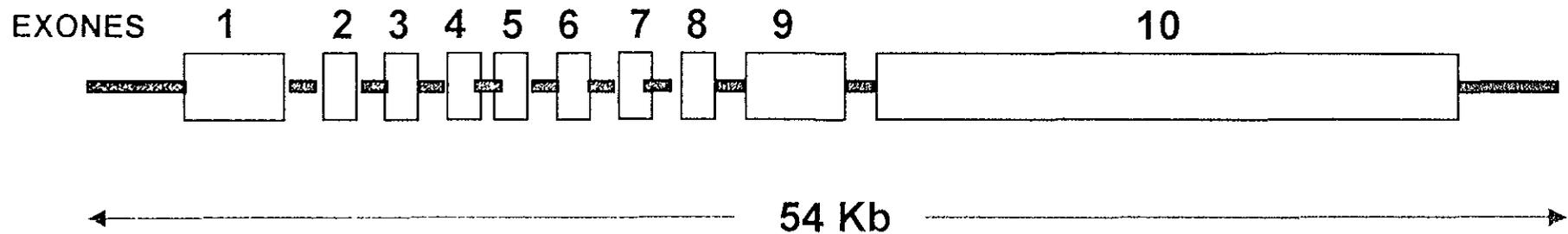
cisteínas que se encuentran altamente conservadas en los receptores de LH, FSH y TSH (40-44). Se ha postulado que la formación de puentes disulfuro es crucial para mantener la integridad conformacional del dominio extracelular en los receptores de las hormonas glicoprotéicas (39).

## **ESTRUCTURA DEL GEN DEL RECEPTOR DE LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE**

El gen que codifica para el receptor de la FSH en el humano se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 2, específicamente en la banda p16-21 (45,46). Este gen abarca 54 kilobases (Kb) del genoma y está formado por 10 exones y 9 intrones (46) (Figura 1). La región traducida está constituida por una proteína de 678 aminoácidos (aa), con un peso molecular de 76.46 kilodaltones. En la región 5' no traducida se han identificado diversos sitios de inicio de transcripción; sin embargo, no se han identificado "corriente arriba" del sitio de inicio de la transcripción, secuencias consenso convencionales TATA o CCAAT. Los estudios de transfección transitoria en células CHO, demostraron que una secuencia de 1.5 Kb de la región 5' no traducida del gen del FSHR es capaz de iniciar la transcripción del gen CAT y los estudios de deleciones en esta zona demostraron actividad de promotor en una región localizada dentro de los 225 pares de bases (pb) próximos al sitio de inicio de traducción

**Figura 1.**

**ESTRUCTURA DEL GEN QUE CODIFICA PARA EL FSHR**



**LOCALIZACION DEL GEN: 2p 16 - 21**

(47). Con base en lo anterior, se ha postulado que en esta región del gen del FSHR se localizan secuencias promotoras. Estas secuencias promotoras proximales en la región 5' no traducida del gen que codifica para el FSHR se encuentran altamente conservadas, tanto en el humano, como en el ratón y la rata. Asimismo, los estudios de deleciones en esta región demostraron que existen elementos represores en la región proximal del promotor (48).

Los primeros 9 exones del gen del FSHR constituídos por 359 aminoácidos, codifican para la región amino-terminal de la proteína que corresponde al gran dominio extracelular del receptor. Los primeros 254 aa del exón 10 codifican para los 7 dominios transmembranales (los cuales se encuentran unidos entre sí por tres asas extracelulares y 3 asas intracelulares), y los 65 aa restantes de este exón conforman la región carboxilo terminal del dominio intracelular (48).

#### **ALTERACIONES EN LA DIFERENCIACION SEXUAL**

Las alteraciones en cualquier estadio de la diferenciación sexual, durante la embriogénesis, conducen a la presencia de malformaciones en el desarrollo sexual. Estas pueden ser clasificadas de acuerdo con la etapa de desarrollo en la que se presenten; ésto es, en errores del sexo cromosómico, errores del sexo gonadal y errores del sexo fenotípico (18,49,50).

Dentro de las alteraciones en la traducción del sexo cromosómico al sexo gonadal se encuentran las disgenesias gonadales. En estas alteraciones, hasta la fecha, no ha podido ser dilucidado con precisión el factor específico que las determina (18,50).

Las disgenesias gonadales abarcan a un grupo heterogéneo de padecimientos con diversas anormalidades cromosómicas, gonadales y fenotípicas. Dentro de las disgenesias gonadales se encuentran las disgenesias gonadales puras (DGP) que a su vez se subdividen en 46,XX y 46,XY (18,51,52).

#### **DISGENESIA GONADAL PURA 46,XX**

La DGP 46,XX es una entidad patológica heterogénea y de etiología variable (50-54); la cual se caracteriza por presentar un complemento cromosómico 46,XX y falla ovárica prematura que se traduce en amenorrea primaria (en su forma completa) o amenorrea secundaria (en su forma incompleta) y en un desarrollo puberal anormal. La DGP 46,XX se puede presentar tanto en forma esporádica como en casos familiares con un patrón de transmisión autosómico recesivo (53-56). Las mujeres afectadas no presentan estigmas somáticos de Turner y los genitales externos e internos son femeninos. Desde el punto de vista endocrinológico presentan hipogonadismo hipergonadotrópico secundario a presencia de estrías gonadales bilaterales (forma completa del síndrome); sin embargo, en las formas incompletas de DGP 46,XX los ovarios

pueden encontrarse marcadamente hipoplásicos con algunos folículos, lo que conlleva a diversos grados de función ovárica (18,56).

El diagnóstico clínico se confirma con el estudio de laparoscopia, el cual revela la presencia de estrias bilaterales o de ovarios hipoplásicos. El tratamiento es sustitutivo a base de estrógenos y progestinas (18).

A diferencia de las DGP 46,XY, en las DGP 46,XX no son frecuentes las neoplasias en las estrias gonadales (18).

Se ha demostrado tanto en casos esporádicos como familiares, que mutaciones en sentido erróneo en el gen que codifica para el FSHR, son la causa de una forma de DGP 46,XX (57-59).

En 1995, Aittömaki y cols. (57,58), llevaron a cabo el estudio molecular del gen FSHR en 75 mujeres finlandesas con diagnóstico de DGP 46,XX, las cuales pertenecían a 13 familias diferentes. Dicho estudio demostró un patrón hereditario autosómico recesivo (57), y de las 75 mujeres estudiadas, 22 fueron homocigotas para la mutación reportada (60) (Figura 2). Dicha mutación se localiza en el exón 7 y da lugar a una transición de citosina a timina en el nucleótido 566, que conduce al cambio del aminoácido alanina por valina en la posición 189 de la proteína (57,58). Los estudios de expresión por transfección de este receptor mutado, demostraron una reducción importante de la capacidad de unión de la hormona a su receptor y consecuentemente una reducción en la producción de AMPc (58).



Asímismo, Beau y cols. (1998) (59), realizaron el estudio molecular del gen del FSHR en una mujer con diagnóstico de DGP 46,XX en su forma incompleta (caracterizada por amenorrea secundaria y ovarios con un desarrollo folicular normal hasta la etapa antral, y una disfunción de las etapas subsecuentes). Dicho estudio, reveló una mutación heterocigota compuesta (Figura 2). La primera se localiza en el exón 6 y da lugar a una transversión de timina a citosina en el nucleótido 479, que conduce al cambio del aminoácido isoleucina por treonina en la posición 160 de la proteína; la segunda mutación, se localiza en el exón 10 y da lugar a una transversión de citosina a timina en el nucleótido 1717, que conduce al cambio del aminoácido arginina por cisteína en la posición 573 de la proteína. Los estudios de expresión por transfección de este receptor mutado, demostraron una reducción importante de la capacidad de unión de la hormona a su receptor y consecuentemente una reducción en la producción de AMPc (59).

Posteriormente, este mismo grupo de investigación (61), realizó el estudio molecular del gen del FSHR en una mujer con diagnóstico de DGP 46,XX en su forma incompleta, demostrándose una mutación heterocigota (Figura 2). La primera se localiza en el exón 9 y sustituye al aminoácido asparagina por valina en la posición 224 de la proteína; la segunda, se localiza en el exón 10 y conduce al cambio del aminoácido leucina por valina en la posición 601 de la proteína. Los estudios de expresión por transfección de este receptor mutado, demostraron para la primera mutación, una reducción importante de la capacidad de unión de la

hormona a su receptor y consecuentemente una reducción en la producción de AMPc; por el contrario, el receptor con la mutación en el exón 10, demostró una capacidad de unión similar a la del receptor silvestre (61).

## JUSTIFICACION

Como se encuentra referido en los antecedentes, las pacientes con disgenesia gonadal pura 46, XX, presentan estrías gonadales bilaterales (en su forma completa) o bien ovarios marcadamente hipoplásicos con escasos folículos (en su forma incompleta), lo que ocasiona un desarrollo puberal anormal. Esta entidad patológica es heterogénea y de etiología variable; sin embargo, se ha demostrado que mutaciones en sentido erróneo en el gen del receptor para la hormona folículo estimulante, dan origen a un tipo de DGP 46,XX.

Con base en los hallazgos descritos, y debido a que estos estudios se han realizado en escasas poblaciones y que no en todos ellos se han estudiado todos los exones del gen del FSHR, consideramos relevante llevar a cabo el estudio molecular del mismo en mujeres con DGP 46,XX; con la finalidad de ampliar los conocimientos acerca del rol que juega el gen del FSHR en la etiopatogenia de esta entidad patológica.

## **OBJETIVO**

Determinar el tipo de mutación existente en el gen del receptor de FSH en mujeres con diagnóstico de hipogonadismo hipergonadotrópico secundario a disgenesia gonadal pura 46,XX.

## **HIPOTESIS**

Las mujeres con diagnóstico de hipogonadismo hipergonadotrópico secundario a disgenesia gonadal pura 46, XX, presentan mutaciones en el gen que codifica para el receptor de FSH.

## SUJETOS Y METODOS

### SUJETOS

Se incluyeron 12 mujeres con diagnóstico comprobado de hipogonadismo hipergonadotrópico secundario a disgenesia gonadal pura 46,XX.

Las pacientes que se incluyeron en este estudio (n=12) son de origen étnico mestizo mexicano y pertenecían a familias diferentes, excepto las pacientes 7 y 8, las cuales son hermanas. Todas las pacientes estudiadas presentaron un complemento cromosómico 46,XX y un fenotipo femenino. Las características clínicas individuales de las pacientes se pueden observar en la Tabla 1. La edad al momento de ingreso fue entre los 16 y 34 años. Se documentó en 9 pacientes amenorrea primaria (pacientes 1,2,5,6,7,8,10,11 y 12) y en 3 amenorrea secundaria (pacientes 3,4 y 9).

El estudio histopatológico llevado a cabo en las pacientes, demostró la presencia de estrias gonadales bilaterales en 8 de ellas (pacientes 1,2,6,7,8,10,11 y 12) y en las 4 pacientes restantes, la presencia de ovarios hipoplásicos. En la Tabla 2, se pueden observar las concentraciones hormonales plasmáticas de gonadotropinas y de estradiol cuantificados por

Tabla 1

Características clínicas de las 12 pacientes con diagnóstico de disgenesia gonadal pura 46,XX.

Paciente	Edad al ingreso (años)	Amenorrea	Gónadas y genitales internos
1	19	PRIMARIA	UTERO HIPOPLASICO Y ESTRIAS BILATERALES
2	19	PRIMARIA	UTERO HIPOPLASICO Y ESTRIAS BILATERALES
3	20	SECUNDARIA	UTERO Y OVARIOS HIPOPLASICOS
4	16	SECUNDARIA	UTERO Y OVARIOS HIPOPLASICOS
5	25	PRIMARIA	UTERO HIPOPLASICO Y ESTRIAS BILATERALES
6	24	PRIMARIA	UTERO HIPOPLASICO Y ESTRIAS BILATERALES
7a	34	PRIMARIA	UTERO HIPOPLASICO Y ESTRIAS BILATERALES
8a	29	PRIMARIA	UTERO HIPOPLASICO Y ESTRIAS BILATERALES
9	22	SECUNDARIA	UTERO Y OVARIOS HIPOPLASICOS
10	21	PRIMARIA	UTERO HIPOPLASICO Y ESTRIAS BILATERALES
11	20	PRIMARIA	UTERO HIPOPLASICO Y ESTRIAS BILATERALES
12	19	PRIMARIA	UTERO HIPOPLASICO Y ESTRIAS BILATERALES

a= HERMANAS

Tabla 2

Concentraciones hormonales basales de las 12 pacientes con diagnóstico de disgenesia gonadal pura 46,XX

Paciente	LH* (UI/l)	FSH* (UI/l)	E2 (pg/ml)
1	27.1	26.7	14.8
2	22.8	23.6	< 13.0
3	36.3	8.0	N.D.
4	16.0	37.7	< 17.0
5	26.4	68.0	30.0
6	44.0	52.0	< 13.0
7a	20.1	33.4	< 13.5
8a	31.9	49.7	< 13.5
9	34.4	27.9	17.8
10	37.1	38.0	< 13.0
11	34.0	47.0	< 13.0
12	29.0	67.5	< 13.0
S.C.	3.0-12.0	0.5-5.0	> 30.0-100.0

\* MEDIA DE DOS VALORES BASALES  
 S.C.= SUJETOS CONTROL (n=30)  
 N.D.= NO DETECTABLE  
 a= HERMANAS

radioinmunoanálisis (RIA) siguiendo la metodología utilizada en nuestro laboratorio en los últimos 5 años (62). En todos los casos se documentó la presencia de hipogonadismo hipergonadotrópico.

## **METODOS**

### **Extracción de DNA genómico**

Se extrajeron 5 ml de sangre periférica en 7 pacientes con DGP 46,XX, para la obtención de DNA genómico siguiendo la técnica previamente descrita (63,64), con algunas modificaciones

La sangre se depositó en tubos de 5 ml que contenían como anticoagulante, 0.05 ml de Na<sub>2</sub>EDTA 0.5 M, pH 8.0. Posteriormente, con el fin de lisar los eritrocitos, la sangre se colocó en tubos de 15 ml y se mezcló con un volumen igual de un amortiguador que contenía tris-HCl 10 mM, pH 7.4/1% tritón X-100/ sacarosa 300 mM. La mezcla anterior se transfirió a microtubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 9,221 g durante 1.5 min a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y el botón de leucocitos obtenido se resuspendió en 1 ml del mismo amortiguador, se centrifugó nuevamente a 9,221 g durante 1.5 min a temperatura ambiente, éste paso se repitió cuantas veces fué necesario hasta obtener un botón de glóbulos blancos limpio. Para llevar a cabo la lisis de las membranas de los leucocitos, se agregaron 570 µl de NaCl 50 mM y 30 µl de SDS al 10% y se agitaron los microtubos durante 5

minutos; para la precipitación de las proteínas se adicionaron 200  $\mu$ l de NaCl saturado, los microtubos se agitaron nuevamente y se dejaron en reposo durante 5 minutos, posteriormente se centrifugaron a 9,221 g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril. Para la precipitación del DNA se adicionaron dos y medio volúmenes de etanol absoluto frío; el DNA se recolectó con una pipeta Pasteur estéril de punta curva y se lavó en etanol frío al 70%. Por último, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en un volumen entre 200 y 400  $\mu$ l de agua bidestilada (ddH<sub>2</sub>O) estéril y se almacenó a -20° C para su análisis posterior (Figura 3).

En todas las muestras obtenidas se realizó un análisis espectrofotométrico mediante lecturas a 260 y 280 nm. La concentración de DNA se calculó mediante la siguiente fórmula:

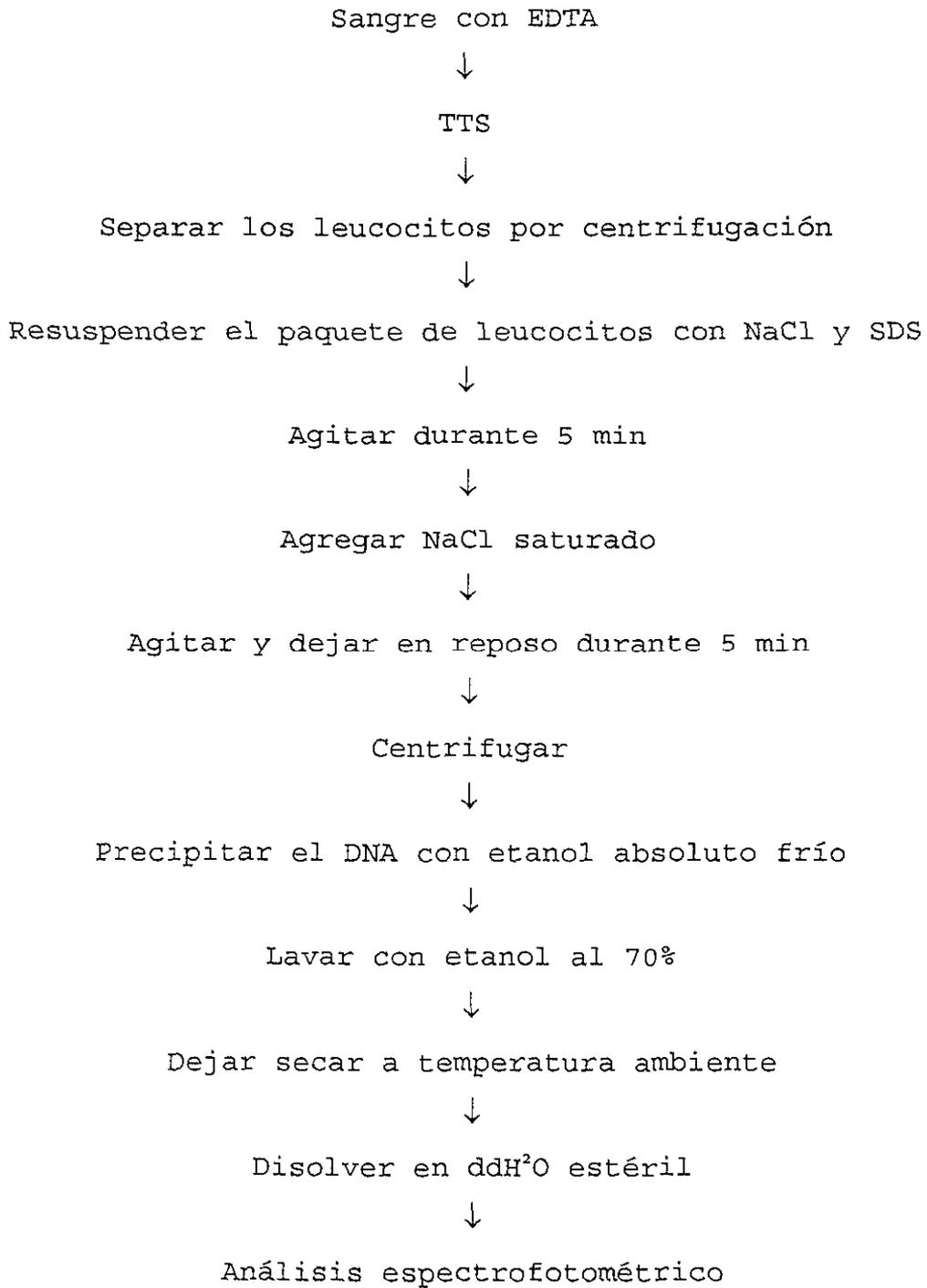
$[DNA] (\mu g/\mu l) = (A_{260}) (dilución) (50.0 \mu g \text{ de DNA})$ , en donde 50.0  $\mu$ g de DNA=1 D.O. (260)

La relación 260/280 nos indica la pureza del DNA obtenido. Se consideraron óptimas las relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.0 unidades de D.O<sub>260</sub> (65).

Para determinar la calidad de las muestras se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio al 0.0002%

### FIGURA 3

#### EXTRACCION DE DNA DE SANGRE PERIFERICA



## Extracción de DNA a partir de bloques de gónada previamente incluidos en parafina

En aquellos pacientes en las cuales no se pudo obtener el DNA de sangre periférica, se extrajo el DNA de gónada incluida en parafina (n=5) siguiendo la técnica de Cooper y cols., con algunas modificaciones (66). Se depositaron 3 cortes de tejido de 10  $\mu\text{m}$  cada uno, en tubos de 1.5 ml y se desparafinizaron con 1.0 ml de xileno ultrapuro. Los tubos se centrifugaron a 9,221g/15 min a temperatura ambiente. Se decantó el xileno y se repitió el paso anterior. Para eliminar el xileno, se agregó 1.0 ml de etanol absoluto frío; se centrifugaron los tubos a 9,221g/15 min a temperatura ambiente, se decantó el etanol y se repitió el paso anterior. Para la ruptura de la membrana de los tejidos y la deproteínización, se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de amortiguador de digestión (NaCl 1M, Tris-HCl 0.01M, ph 8.0, EDTA 0.02M, ph 8.0 y SDS al 0.5%), 20  $\mu\text{l}$  de SDS al 10% y 7.5  $\mu\text{l}$  de Proteinasa K [20 mg/ml] y esta mezcla se incubó durante 24 hrs a 48°C. Posteriormente, con el fin de inactivar la proteinasa K, la mezcla se incubó a 97°C durante 10 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se extrajo el DNA con 140  $\mu\text{l}$  de fenol y 140  $\mu\text{l}$  de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Los microtubos se centrifugaron a 9,221g/15 min a 0°C, se transfirió el sobrenadante a tubos de 1.5 ml y se añadió 280  $\mu\text{l}$  de

cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1); los microtubos se centrifugaron nuevamente a 9,221g/15 min a 0°C y se transfirió el sobrenadante a microtubos de 1.5 ml. Para alcanzar una fuerza iónica suficiente, se agregaron 25 µl de acetato de sodio 3M. El DNA se obtuvo precipitándolo con 460 µl de isopropanol y se almacenó a 4°C por 18 hrs. Posteriormente, con el fin de sedimentar el DNA, se centrifugaron los microtubos a 9,221g/35 min a temperatura ambiente, se decantó el isopropanol y el DNA se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µl de ddH<sub>2</sub>O. El DNA obtenido se almacenó a -20 °C para su análisis posterior (Figura 4).

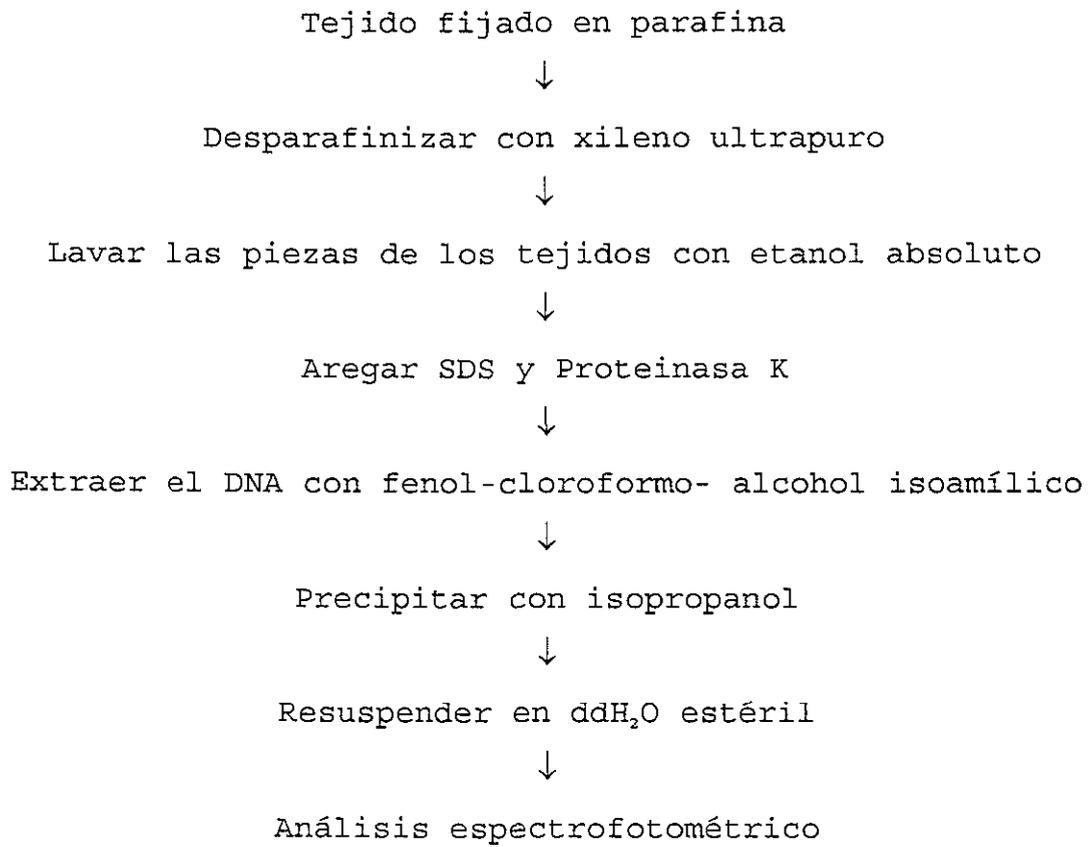
Se determinó la concentración de DNA por espectrofotometría; para conocer la calidad de la muestra, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

### Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos específicos derivados de la secuencia de los 10 exones del gen que codifica para el FSHR fueron adquiridos de una casa comercial (Accesorios para laboratorios S.A. de C.V.). Cada uno de los oligonucleótidos se resuspendieron en ddH<sub>2</sub>O estéril para una concentración de 100 µM. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para descartar la presencia de oligonucleótidos adicionales.

## FIGURA 4

### EXTRACCION DE DNA DE GONADAS FIJADAS EN PARAFINA



## Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Con la técnica de PCR, se llevó a cabo la amplificación de cada uno de los exones que constituyen el gen del FSHR, tanto del DNA extraído de sangre periférica como del DNA de gónada embebido en bloques de parafina. Para ello, se utilizaron 12 pares de oligonucleótidos sintéticos correspondientes a la secuencia de los 10 exones que constituyen al gen del FSHR (57) (Tabla 3). En todos los casos se preparó una reacción estándar de 50  $\mu$ l siguiendo la técnica descrita por Sambrook y cols. (65) que contenía: 500 ng de DNA genómico, amortiguador de amplificación 10 X (10 mM Tris-HCl, pH 8.3/50 mM KCl/Mg<sub>2</sub>Cl) a una concentración final de 1X, mezcla de los 4 desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) a una concentración final de 80  $\mu$ M, iniciadores (5' y 3') a una concentración final de 0.24  $\mu$ M, 2 U de Taq. polimerasa (Perkin Elmer, New Jersey, USA) y ddH<sub>2</sub>O estéril, a cada microtubo se añadió 100  $\mu$ l de aceite mineral (Figura 5). Todas las reacciones se llevaron a cabo en un equipo DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer New Jersey, USA). Las condiciones adecuadas para la amplificación de los 10 exones del gen del FSHR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización a 94°C/5 min, 30 ciclos de 94°C/1 min, las correspondientes temperaturas de alineamiento para cada exón/1 min y 72°C/1 min y un ciclo de extensión a 72°C/7 min (Tabla 3). En cada

Tabla 3

Secuencia de los oligonucleótidos en dirección 5' → 3' que se utilizaron en el estudio del gen que codifica para el FSHR.

No.	Oligonucleótido	Exón	Tamaño del producto	Temperatura de alineamiento	Localización del Oligonucleótido
1	Sentido:5' AATTATGGCCTGCTCCTG 3' antisentido:5' ATAGTACGCAATGCACAAATGC 3'	1	215 bp	56 °C	-4-INTRÓNICA
2	Sentido:5' TCTTGCAGGAGGTTTGTC 3' antisentido:5' TTGAGGCATTCACACTCACAGC 3'	2	118 bp	56 °C	INTRONICA
3	Sentido:5' TCAAGGAGGTAACGAACTGGC 3' antisentido:5' ATCCCCCAATCTTCTTGCTT 3'	3	146 bp	58 °C	INTRÓNICA
4	Sentido:5' GCATTCTTACCATCAAGATGA 3' antisentido:5' GTGGGGGTACCAAACACTACATG 3'	4	153 bp	58 °C	INTRONICA
5	Sentido:5' TATCCAACACAGGTATTAAGCACCT 3' antisentido:5' AATCACACTTTCAAAGCTCAGCC 3'	5-6	1.9 kb	63 °C	116-192
6	Sentido:5' GTTATTTTCAGATGGCTGAATAAG 3' antisentido:5' GCTCATCTAGTTGGGTTTC 3'	7	78 bp	53 °C	INTRONICA-592
7	Sentido:5' CCCAGGATCTAAGCGATAATA 3' antisentido:5' CTCACAGAATGACTGGTCCAGA	8	85 bp	57 °C	198-216
8	Sentido:5' GAGATATTTCAAGAACAAGGAT 3' antisentido:5' TCACATTTGCCGTCTCCAGTTT 3'	9	196 bp	59 °C	217-840
9	sentido:5'-GACTTATGCAATGAAGTGGTTG 3' antisentido:5'GTGAAAAAGCCAGCAGCATC 3'	10A	341 bp	56 °C	1006-1346
10	sentido:5'-ATTGACTGGCAAACCTGGGG 3' antisentido:5' AGAGGAGGACACGATGTTGG 3'	10B	396 bp	56 °C	1300-1695
11	sentido:5'-GGCTGCTATATCCACATCTACC 3' antisentido:5' CAGAACCAGCAGAATCTTTGC 3'	10C	201 bp	60 °C	1639-1839
12	sentido:5' CTTTCTTTGCCATTTCTGCC 3' antisentido:5' CAAAGGCAAGGACTGAATTATC 3'	10D	378 bp	56 °C	1766-2143

## FIGURA 5

### REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)



reacción de PCR se utilizaron un control femenino positivo y un blanco como control negativo.

El análisis de los productos de PCR obtenidos de sangre periférica y de gónadas fijadas en parafina se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1.2% utilizando una escalera de 100 pb como marcador de peso molecular (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA). El tamaño de los fragmentos correspondientes se encuentra detallado en la Tabla 3.

Una vez obtenidos los productos de PCR, se llevó a cabo la purificación de los mismos.

#### **Purificación de los productos de PCR**

La purificación de los productos de PCR mayores de 200 pb, se llevó a cabo con un estuche de GENECLEAN II (BIO 101, Inc., Vista., Ca). Para ello, se cortó la banda del gel de agarosa que se deseaba purificar, ésta se disolvió con una solución de TBE modificador y yoduro de sodio a una temperatura de 55°C; posteriormente, se adicionó Glassmilk (en este paso se utiliza la propiedad de unión del DNA al vidrio), se lavó con una solución de New Wash (Tris con un pH entre 7.0-8.5, y etanol al 51%) y finalmente el producto de PCR purificado se resuspendió en 20 µl de ddH<sub>2</sub>O estéril.

La purificación de los productos de PCR menores de 200 pb, se llevó a cabo utilizando columnas de separación Centricon-30 (Amicon, Foster City, USA). Se procedió a remover a cada muestra el

aceite mineral y se adicionó 950  $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O estéril; posteriormente se transfirió esta mezcla a columnas y se centrifugaron a 945g/30 min. Cada columna se invirtió dentro de la centrifuga y nuevamente se centrifugaron a 945g/5 min. Posteriormente, se transfirió la muestra del tubo cónico de la columna a microtubos de 0.5 ml.

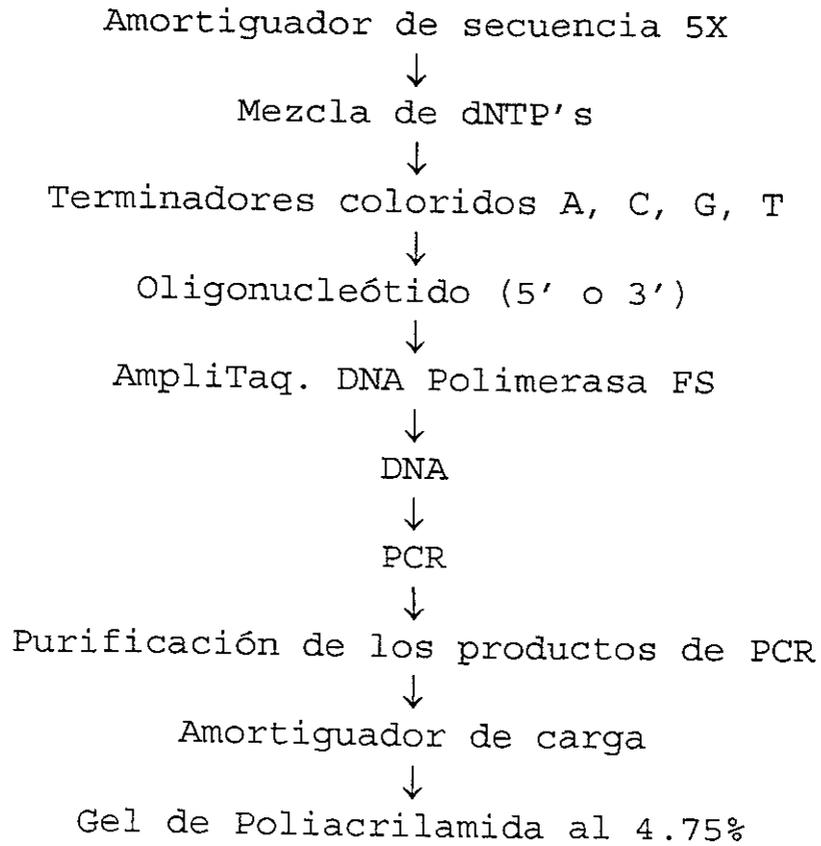
Se determinó la concentración de cada uno de los productos amplificados por análisis espectrofotométrico a 260 nm.

### **Secuenciación**

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo de forma automática y manual; ambas se basan en el método descrito por Sanger y cols. (67), con algunas modificaciones. La razón para emplear ambos métodos es debido a que el intervalo de lectura en el secuenciador automático incluye fragmentos entre 100 y 800 pb de longitud; y el gen del FSHR incluye exones menores a 100 pb y mayores a 800 pb. Se utilizó la secuenciación automática (Figura 6), para los exones 1 al 4 así como para los exones 8 al 10 (incluyendo los cuatro fragmentos de éste último). Para la secuenciación de los exones antes mencionados, se empleó el estuche Dye Terminator Cycle Sequencing Core Kit (Perkin Elmer, New Jersey, USA). Se llevó a cabo la mezcla de reacción en tubos de microcentrifuga de 0.5 ml con: amortiguador de secuencia 5X, mezcla de dNTP's, oligonucleótido (5' o 3') a una concentración final de 0.25  $\mu$ M, terminador colorido A, terminador colorido C, terminador

## FIGURA 6

### SECUENCIACION AUTOMATICA

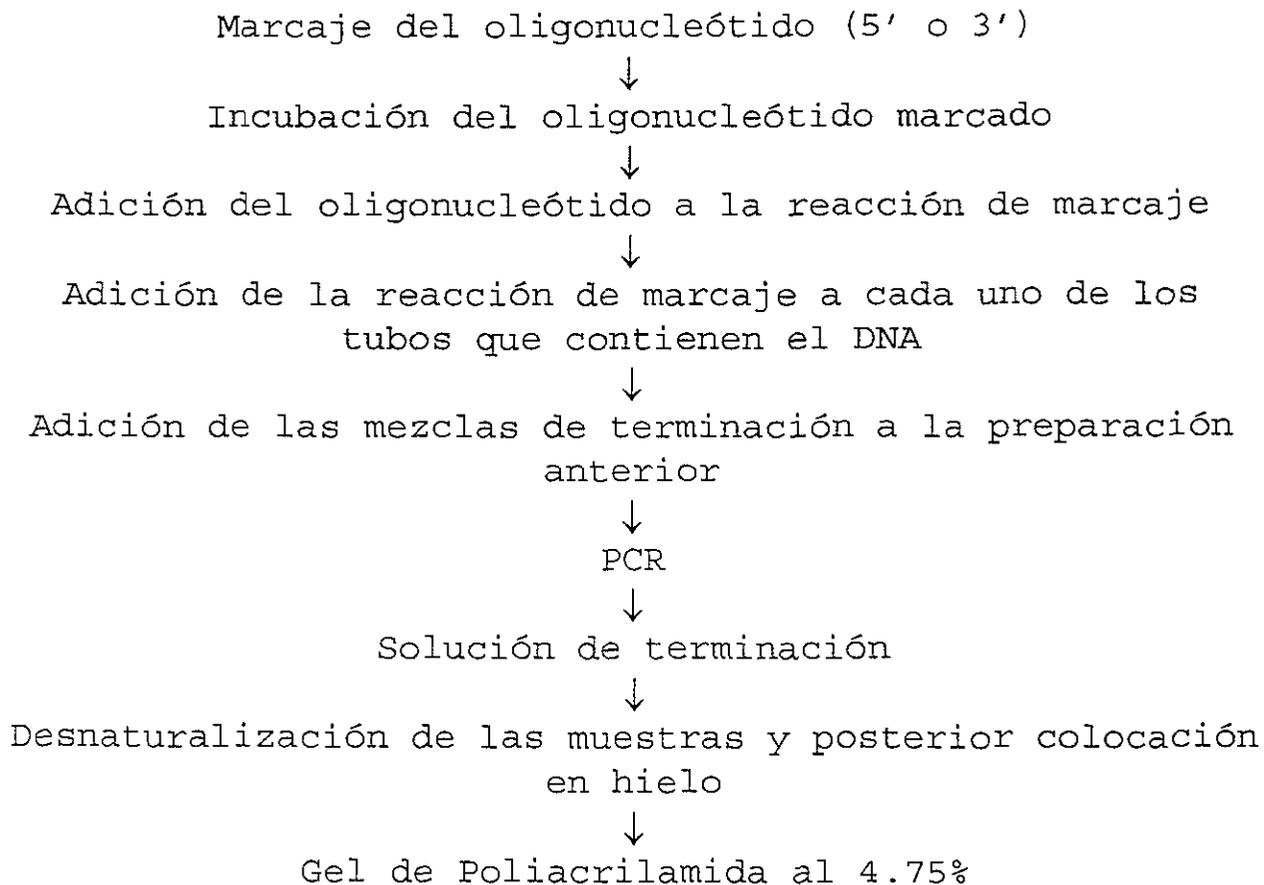


colorido G, terminador colorido, T y AmpliTaq DNA Polimerasa, FS. Se añadió a esta mezcla de reacción 350 ng de DNA genómico y ddH<sub>2</sub>O para un volumen final de 20 µl. Se llevó a cabo la PCR de cada una de las reacciones de secuenciación, con las temperaturas de desnaturalización, reasociación y extensión previamente estandarizadas (Tabla 3). Al finalizar la PCR, se procedió a la purificación de los productos mediante la precipitación con etanol y acetato de sodio. Las muestras se resuspendieron en amortiguador de carga (formamida desionizada y EDTA 25 mM, pH 8.0, que contiene 50 mg/ml de azul dextrán en una proporción de 5:1 de formamida a EDTA/azul dextrán). Las muestras se desnaturalizaron a temperatura de ebullición y se colocaron en hielo. El DNA se secuenció en un gel de poliacrilamida al 4.75% (50 ml) que contenía acrilamida al 40%, 25 g de urea, bisacrilamida:acrilamida (18:2), 5 ml de TBE 10X, 16.87 ml ddH<sub>2</sub>O, 250 µl de NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> al 10% y 28.2 µl de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina. Se analizaron las muestras en un secuenciador automático Applied Biosystems 373 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Foster City, USA.).

Para el estudio de los exones 5, 6 y 7, se empleó la técnica de secuenciación manual (Figura 7). Esta técnica se realizó con un estuche Amplicycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, New Jersey, USA). La reacción del marcaje final de los oligonucleótidos se llevó a cabo con 50 µCi de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P (Amersham International plc, UK), 2 µl de amortiguador cinasa 10X (Tris-HCl, 700 mM, pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, ditiotritol 50 mM) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 0.8 µl del

## FIGURA 7

### SECUENCIACION MANUAL



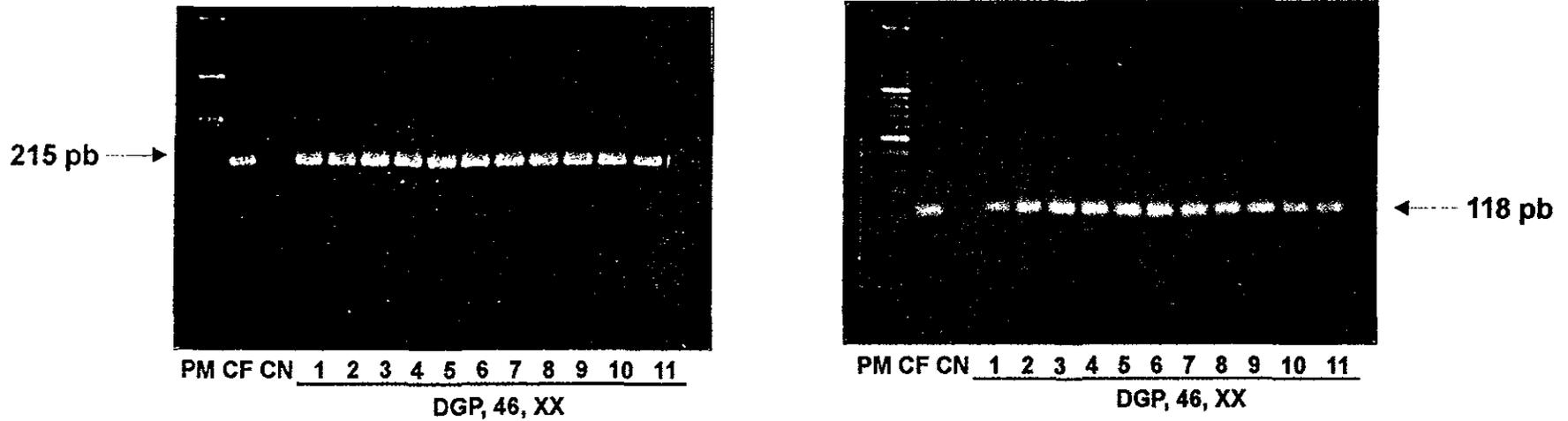
iniciador 20  $\mu\text{M}$  (5' o 3'), 3  $\mu\text{l}$  de T4 polinucleótido cinasa (10U/ $\mu\text{l}$ ) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) y ddH<sub>2</sub>O para un volumen final de 10.8  $\mu\text{l}$ . Se incubó la reacción a 37 °C por 10 min y a 90 °C durante 5 min. Posteriormente, se añadió 1  $\mu\text{l}$  de la mezcla anterior a la reacción de marcaje que contenía: 4  $\mu\text{l}$  de amortiguador 10X (100 U de Amplitaq Polimerasa, Tris-HCl 500 mM, pH 8.9, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM y Tween al 0.25%), 350 ng de DNA genómico y ddH<sub>2</sub>O para un volumen final de 30  $\mu\text{l}$ . En tubos de microcentrífuga de 0.5 ml se agregaron 2  $\mu\text{l}$  de cada una de las mezclas de terminación: guanina (c<sup>7</sup> dGTP 22.5  $\mu\text{M}$ , dATP, dCTP y dTTP 10  $\mu\text{M}$  y ddGTP 80  $\mu\text{M}$ ); adenina (c<sup>7</sup> dGTP 22.5  $\mu\text{M}$ , dATP, dCTP y dTTP 10  $\mu\text{M}$  y ddATP 600  $\mu\text{M}$ ); timina (c<sup>7</sup> dGTP 22.5  $\mu\text{M}$ , dATP, dCTP y dTTP 10  $\mu\text{M}$  y ddTTP 900  $\mu\text{M}$ ) y citocina (c<sup>7</sup> dGTP 22.5  $\mu\text{M}$ , dATP, dCTP y dTTP 10  $\mu\text{M}$  y ddCTP 300  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente, se añadieron 6  $\mu\text{l}$  de la reacción de marcaje a cada uno de los tubos de microcentrífuga que contenían las mezclas de terminación para dar un volumen final de 8  $\mu\text{l}$ . Se llevó a cabo la PCR de cada una de las reacciones de secuenciación con las temperaturas de desnaturalización, reasociación y extensión previamente estandarizadas (Tabla 3). Al finalizar la PCR, se añadieron a cada una de las reacciones de secuenciación 4  $\mu\text{l}$  de la solución de terminación (0.8 ml formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 10.05% y xilencianol al 0.02%). Las muestras se

desnaturalizaron a temperatura de ebullición y se colocaron en hielo. El DNA marcado se secuenció en un gel de poliacrilamida al 5% (100 ml) que contenía acrilamida 30%, 45 g de urea, bisacrilamida:acrilamida (18:2), 20 ml de TBE 5X, 30 ml ddH<sub>2</sub>O, 670 µl de NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> al 10%, y 25 µl de N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina. Se precalentó el gel a 1900 V, 70 W y 49 mA a 50 °C durante 1 hora, se colocaron las muestras (3 µl/carril) y se corrió la electroforesis con el voltaje y las temperaturas anteriores durante 2-3 hrs. Posteriormente, se secó el gel durante una hora a 80 °C, y se expuso por diferentes periodos de tiempo en placas Kodak X-OMAT con pantallas intensificadoras.

## RESULTADOS

El análisis por PCR del DNA genómico extraído de sangre periférica y de gónadas incluídas en parafina de los 10 exones del gen del receptor para FSH no demostró deleciones en ninguna de las 12 mujeres afectadas. En todos los casos se observó que el tamaño de los productos del DNA fue el esperado de acuerdo a su peso molecular y que hubo amplificación de los 10 exones del gen en cada una de las pacientes. En las figuras 8 a 14, se observa para cada exón, la amplificación del mismo en el control positivo y en 11 de las 12 pacientes estudiadas (por razones prácticas, con excepción de la figura 10, se omitió en el resto de las figuras a una de las hermanas afectadas), así mismo, en cada reacción se incluyó un control negativo, el cual no amplificó para ninguno de los 10 exones del gen del FSHR.

Figura 8



PM= Peso molecular (100 pb)

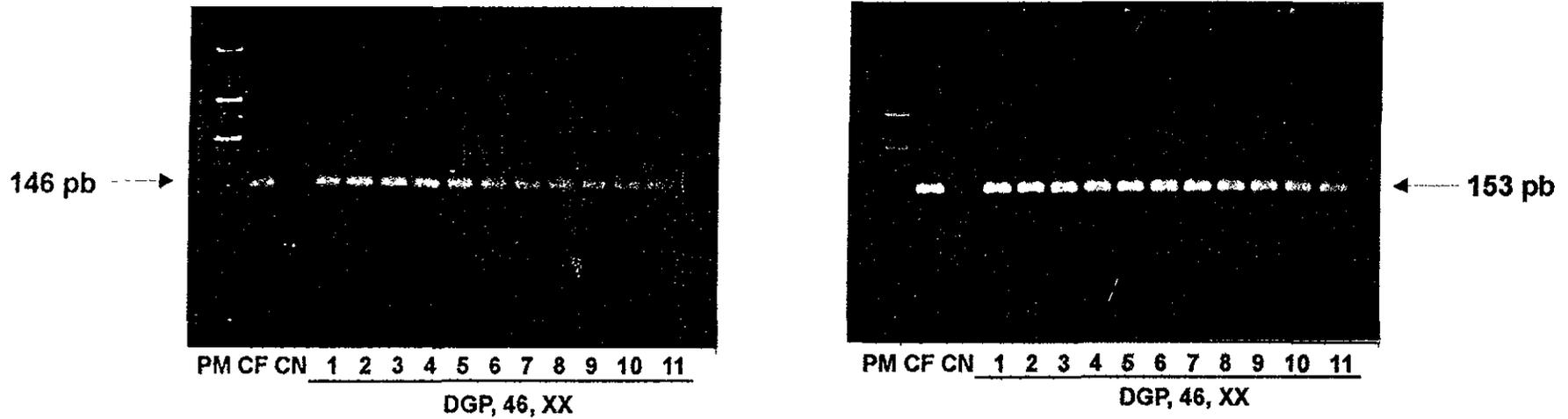
CF= Control Femenino

CN= Control Negativo

DGP, 46, XX= Disgenesia gonadal pura 46, XX

Reacción en Cadena de la Polimerasa de los exones 1 y 2 del gen del FSHR. En todos los pacientes con DGP 46, XX, así como en el CF, se observa amplificación de dichos exones, los cuales corresponden a 215 y 118 pb, respectivamente

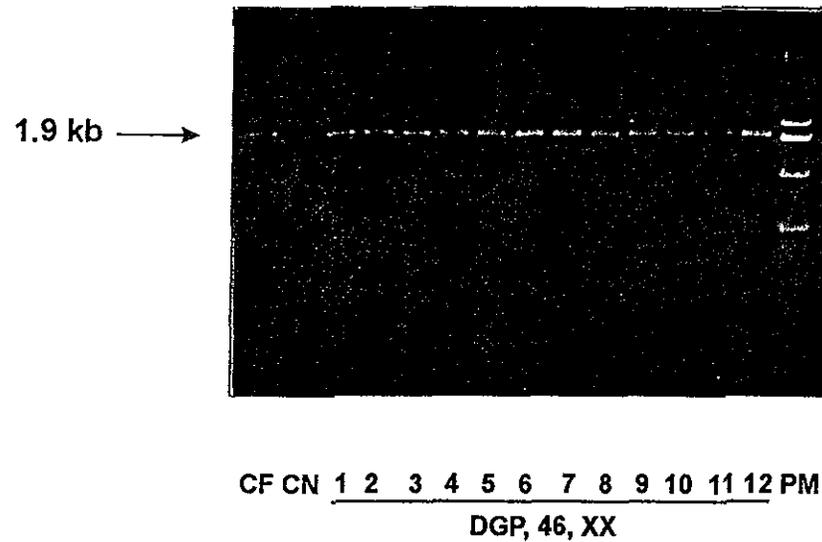
**Figura 9**



PM= Peso molecular (100 pb)  
CF= Control Femenino  
CN= Control Negativo  
DGP, 46, XX= Disgenesia gonadal pura 46, XX

Reacción en Cadena de la Polimerasa de los exones 3 y 4 del gen del FSHR. En todos los pacientes con DGP 46, XX, así como en el CF, se observa amplificación de dichos exones, los cuales corresponden a 146 y 153 pb, respectivamente

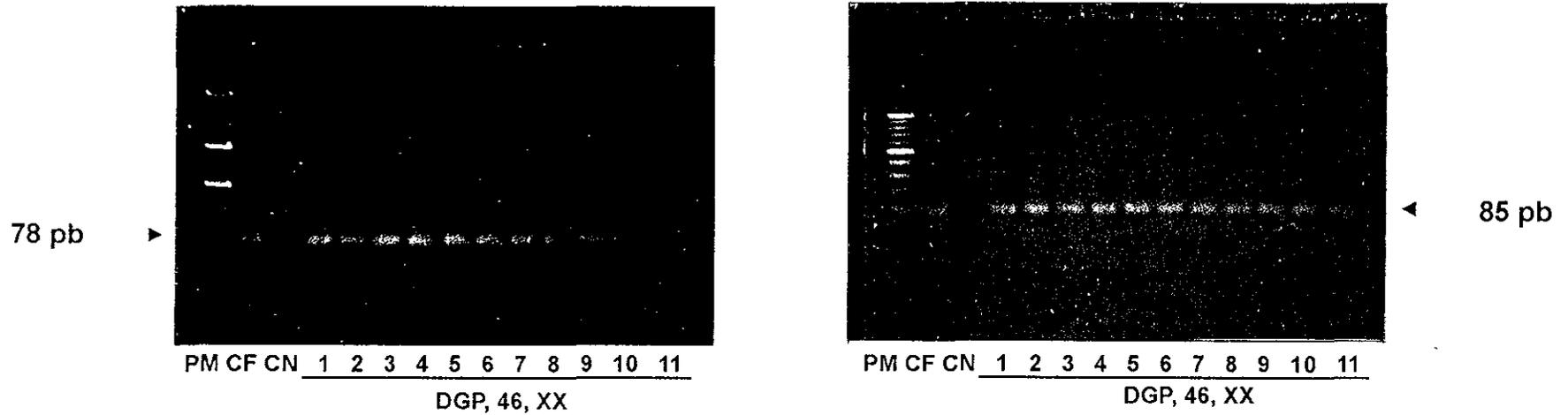
**Figura 10**



PM= Peso molecular (1 Kb)  
CF= Control Femenino  
CN= Control Negativo  
DGP, 46, XX= Disgenesia gonadal pura 46, XX

**Reacción en Cadena de la Polimerasa de los exones 5 y 6 del gen del FSHR. En todos los pacientes con DGP 46, XX, así como en el CF, se observa amplificación de dichos exones, los cuales corresponden a un fragmento de 1.9 kb**

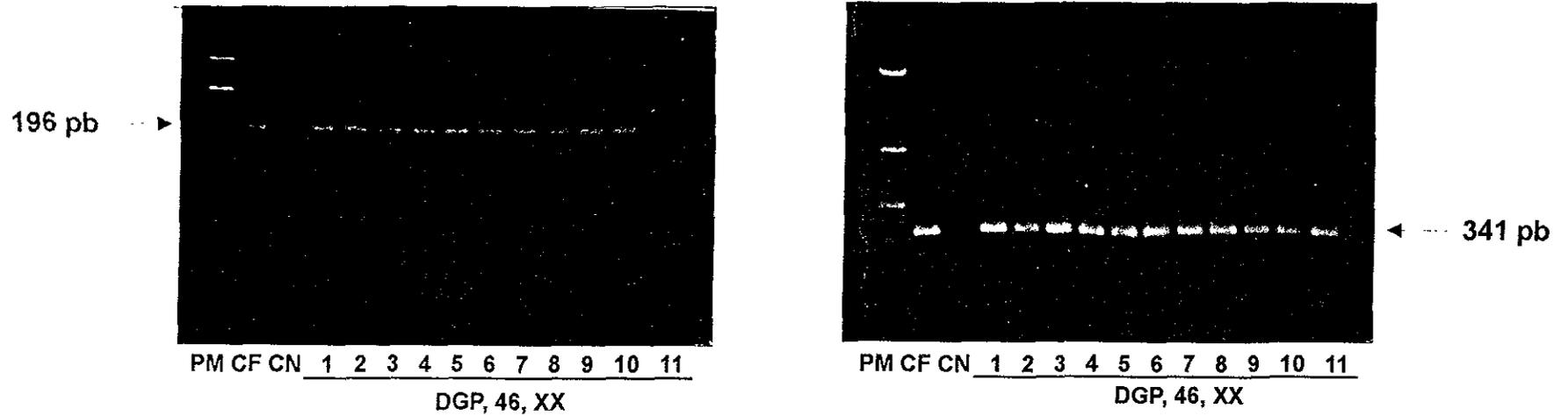
Figura 11



PM= Peso molecular (100 pb)  
CF= Control Femenino  
CN= Control Negativo  
DGP, 46, XX= Disgenesia gonadal pura 46, XX

Reacción en Cadena de la Polimerasa de los exones 7 y 8 del gen del FSHR. En todos los pacientes con DGP 46, XX, así como en el CF, se observa amplificación de dichos exones, los cuales corresponden a 78 y 85 pb, respectivamente

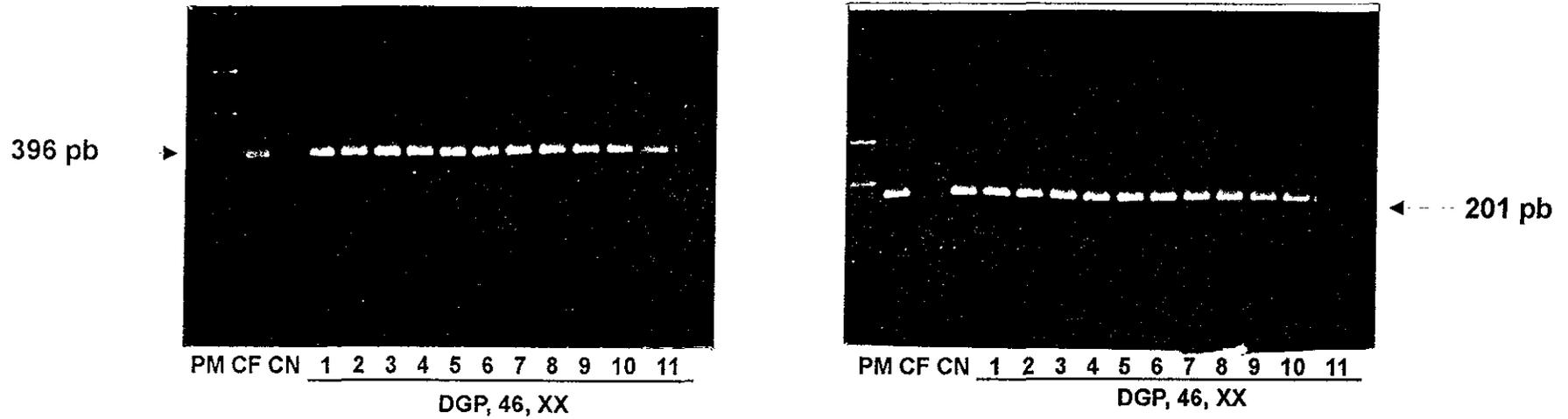
Figura 12



PM= Peso molecular (100 pb)  
CF= Control Femenino  
CN= Control Negativo  
DGP, 46, XX= Disgenesia gonadal pura 46, XX

Reacción en Cadena de la Polimerasa de los exones 9 y 10 (Fragmento A) del gen del FSHR. En todos los pacientes con DGP 46, XX, así como en el CF, se observa amplificación de dichos exones, los cuales corresponden a 196 y 341 pb, respectivamente

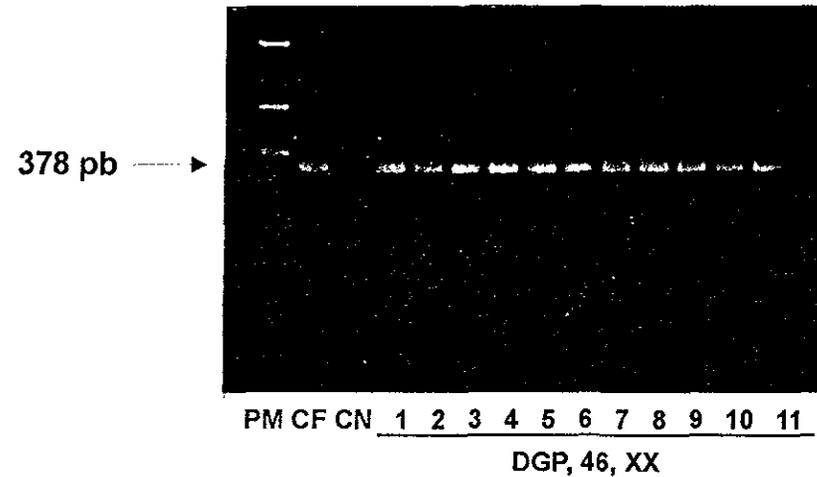
Figura 13



PM= Peso molecular (100 pb)  
CF= Control Femenino  
CN= Control Negativo  
DGP, 46, XX= Disgenesia gonadal pura 46, XX

Reacción en Cadena de la Polimerasa del exon 10 (Fragmentos B y C) del gen del FSHR. En todos los pacientes con DGP 46, XX, así como en el CF, se observa amplificación de dichos fragmentos, los cuales corresponden a 396 y 201 pb, respectivamente

Figura 14



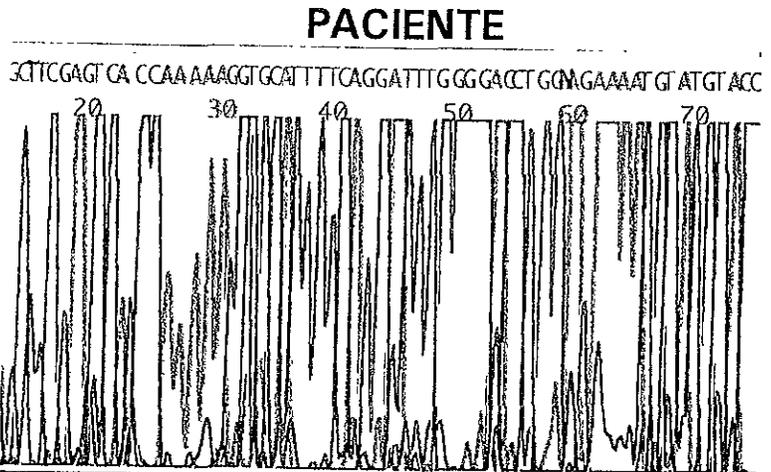
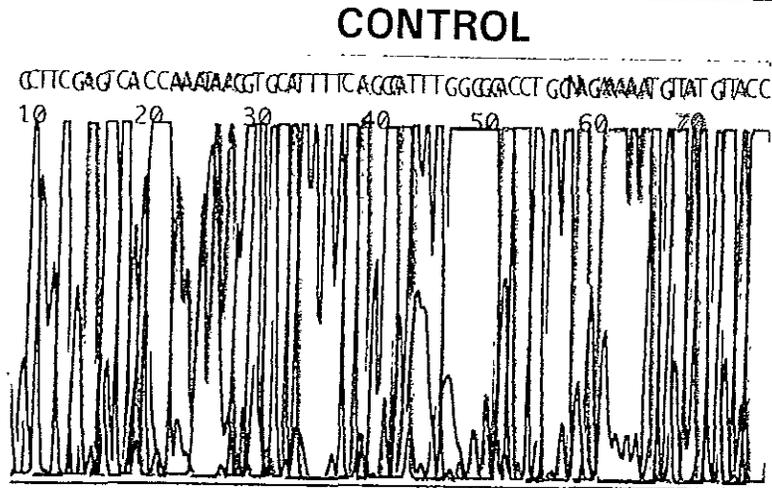
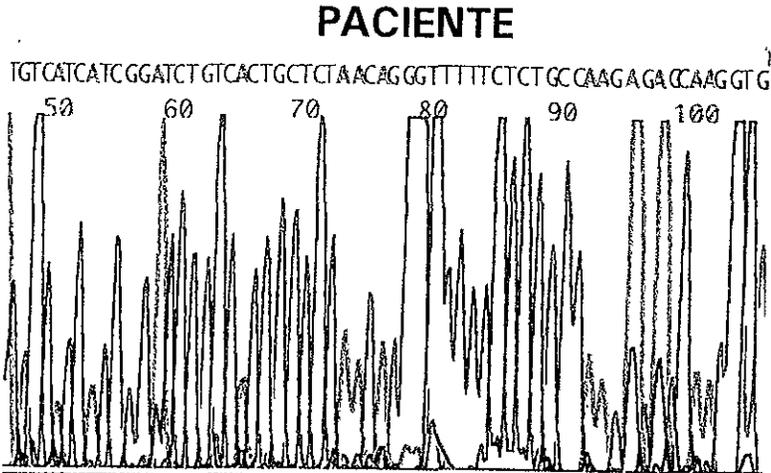
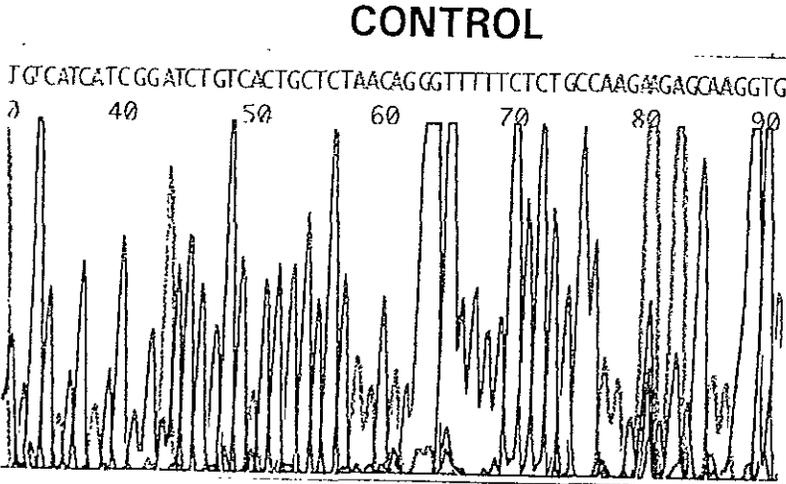
PM= Peso molecular (100 pb)  
CF= Control Femenino  
CN= Control Negativo  
DGP, 46, XX= Disgenesia gonadal pura 46, XX

Reacción en Cadena de la Polimerasa del exón 10 (Fragmento D) del gen del FSHR. En todos los pacientes con DGP 46, XX, así como en el CF, se observa amplificación de dicho fragmento, el cual corresponde a 378 pb

Se procedió a realizar la secuenciación en dirección 5' y 3' (método manual y automático), tanto del DNA extraído de sangre periférica como del obtenido de gónada incluida en parafina de los 10 exones del gen del FSHR.

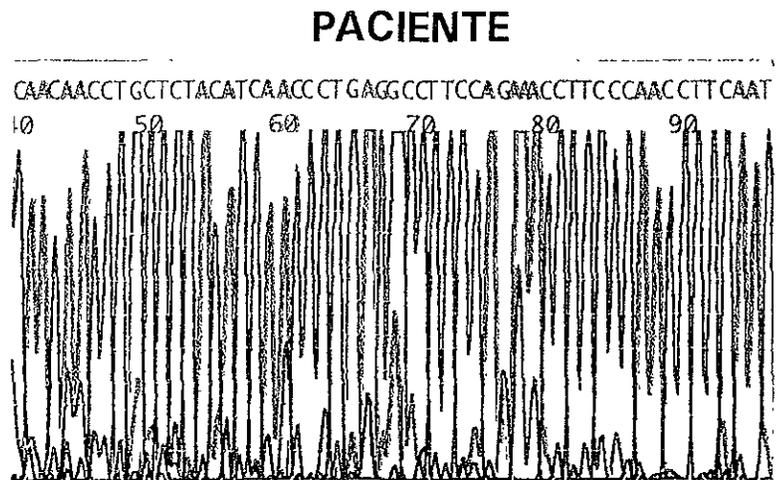
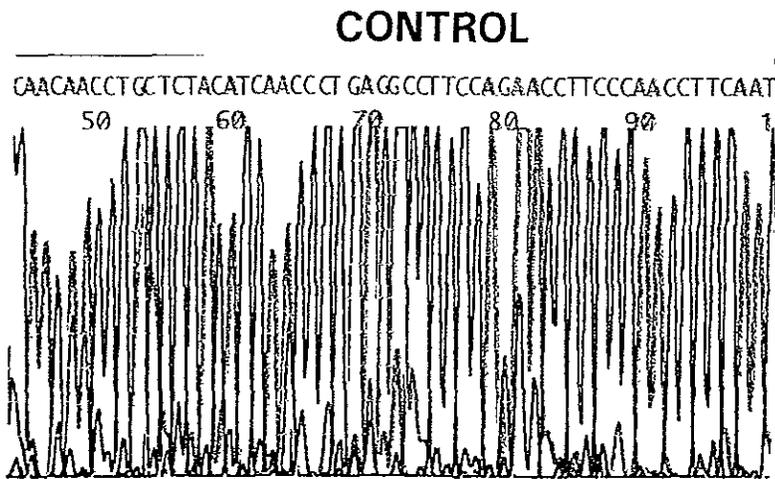
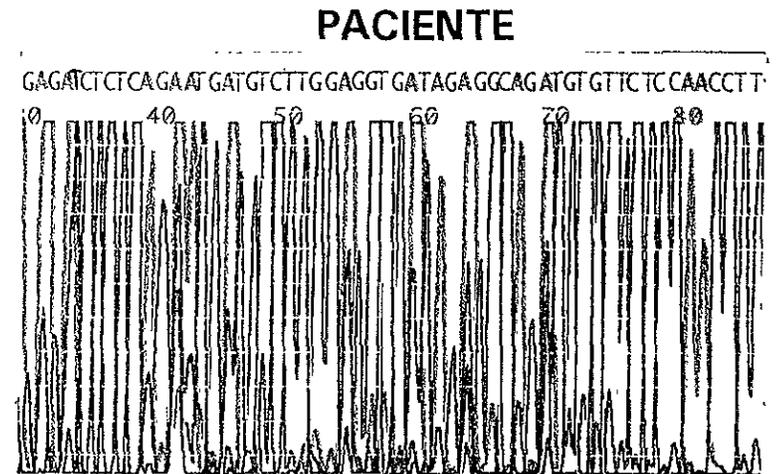
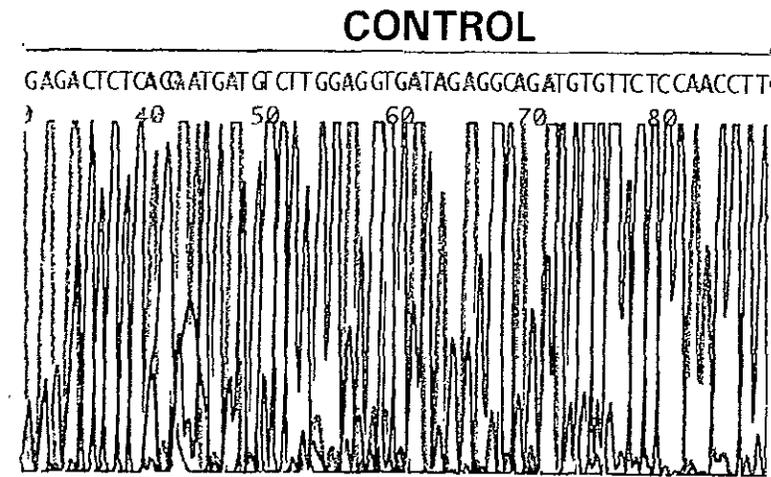
La secuencia de los 10 exones de las 12 pacientes con DGP 46,XX, en sangre y en gónadas fue normal. En las figuras 15 a 21, se observan fragmentos de las secuencias correspondientes a los 10 exones del gen del FSHR.

FIGURA 15



Secuenciación parcial en dirección 5' de los exones 1 y 2 del gen del FSHR. Se observa que las pacientes con DGP 46,XX presentan la misma secuencia que los controles

FIGURA 16



Secuenciación parcial en dirección 5' de los exones 3 y 4 del gen del FSHR. Se observa que las pacientes con DGP 46,XX presentan la misma secuencia que los controles

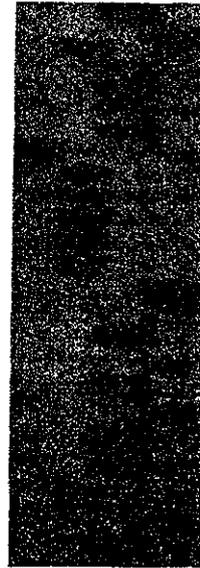
FIGURA 17

EXON 5

CONTROL

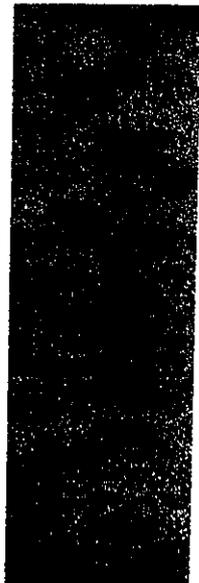


PACIENTE

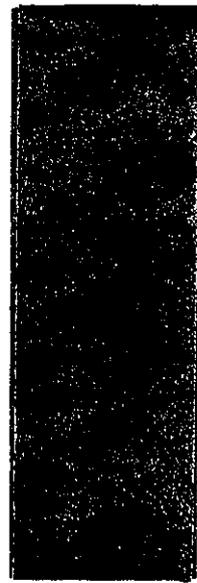


EXON 6

CONTROL

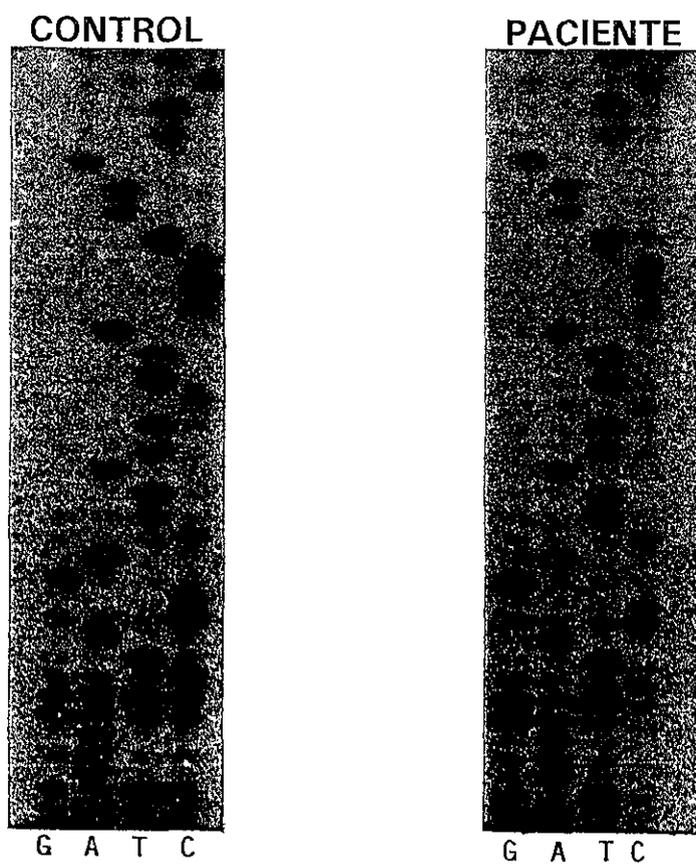


PACIENTE



Secuenciación parcial de los exones 5 y 6 del gen del FSHR. Se observa que la paciente con DGP 46,XX presenta la misma secuencia que el control.

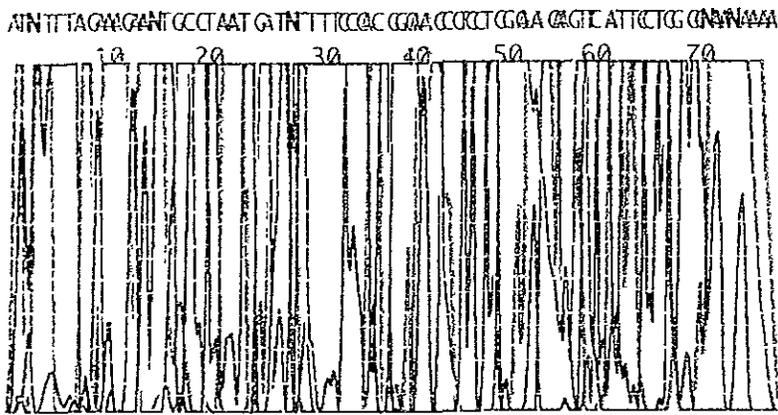
F I G U R A 10



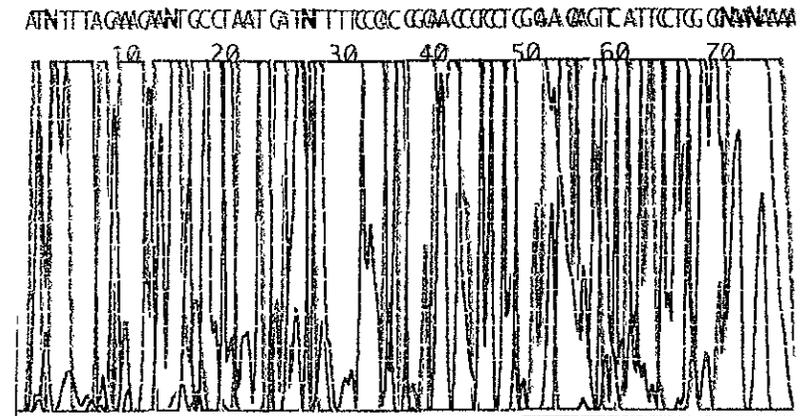
Secuenciación parcial en dirección 3' del exón 7 del gen del FSHR. Se observa que la paciente con DGP 46,XX presenta la misma secuencia que el control.

FIGURA 19

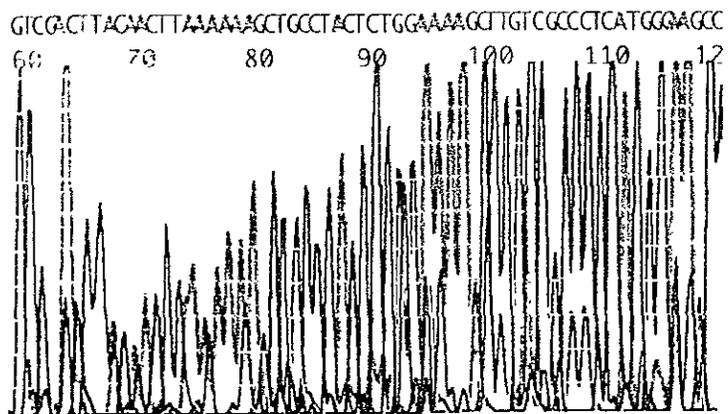
CONTROL



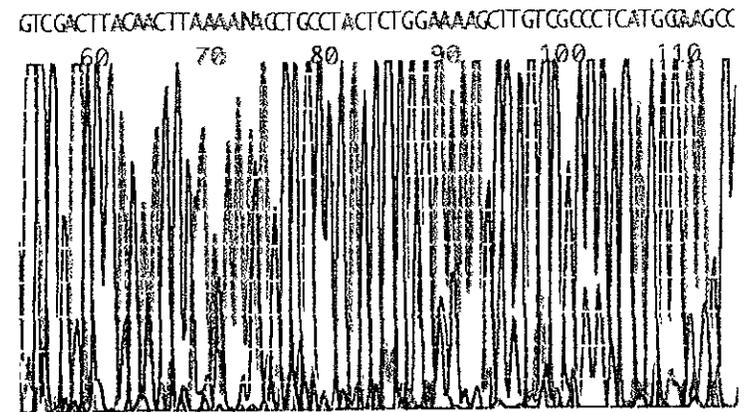
PACIENTE



CONTROL

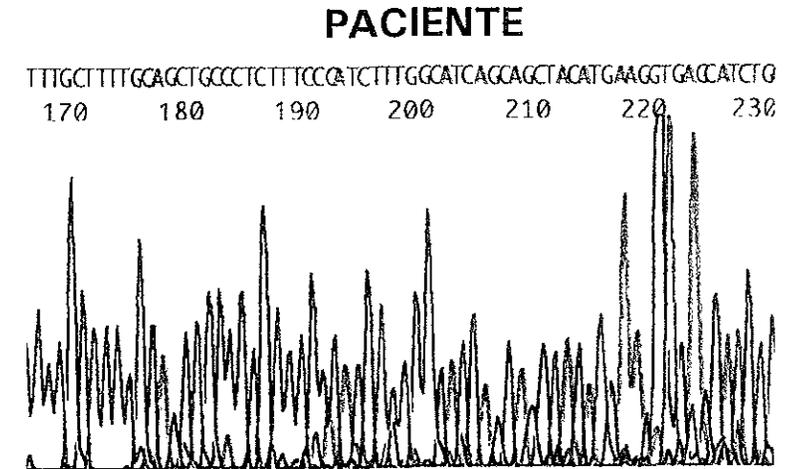
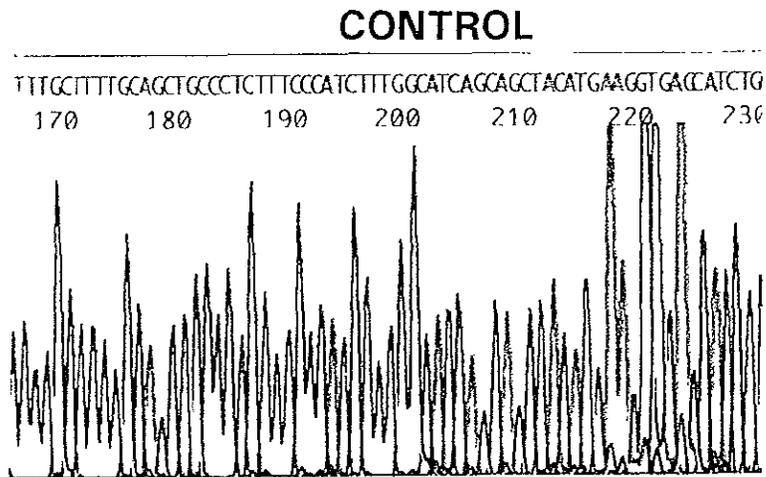
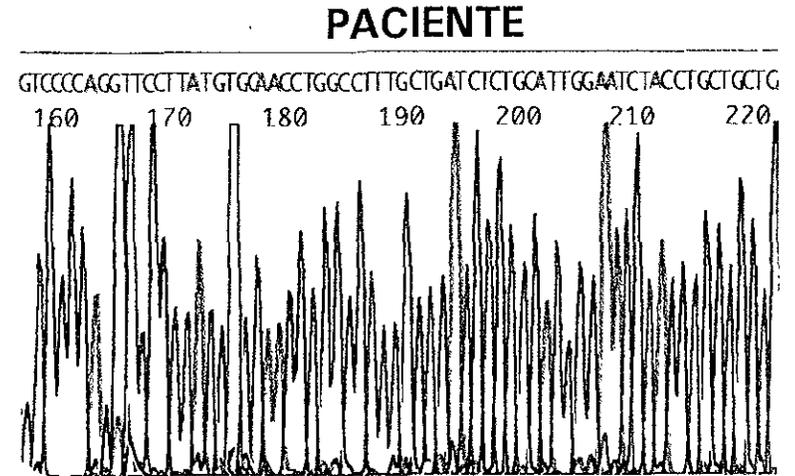
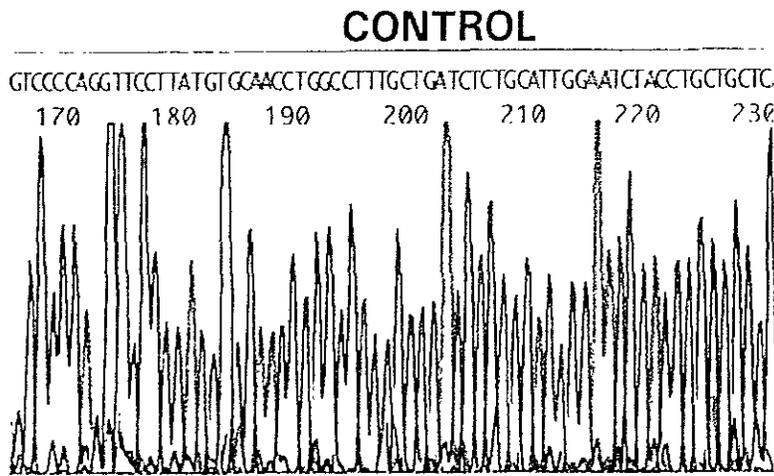


PACIENTE



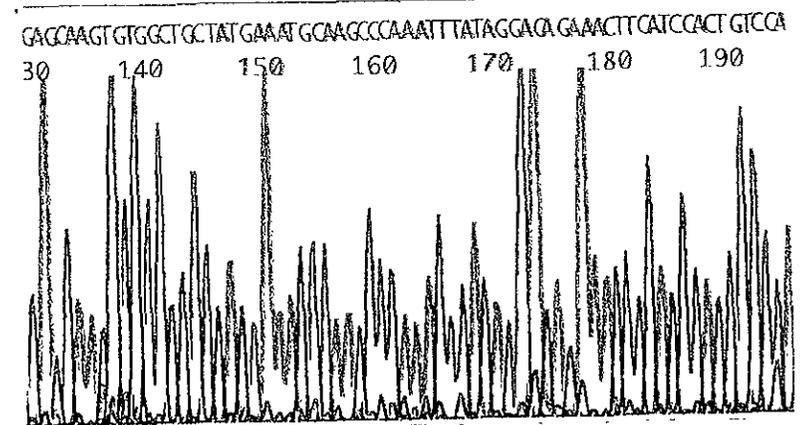
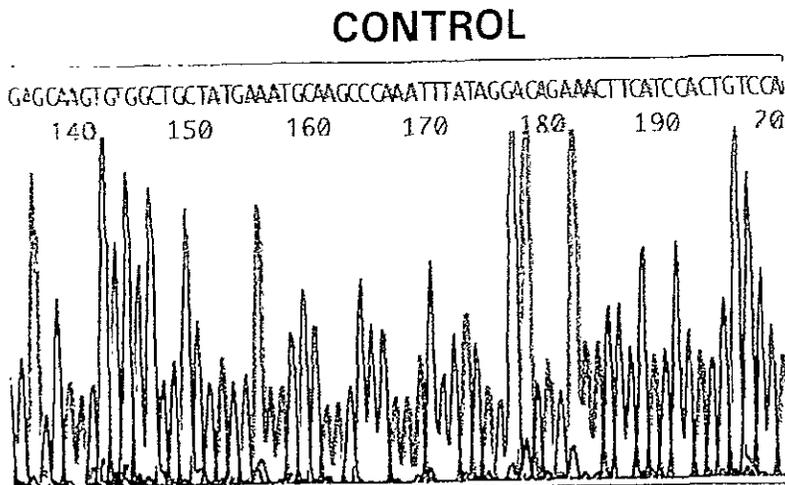
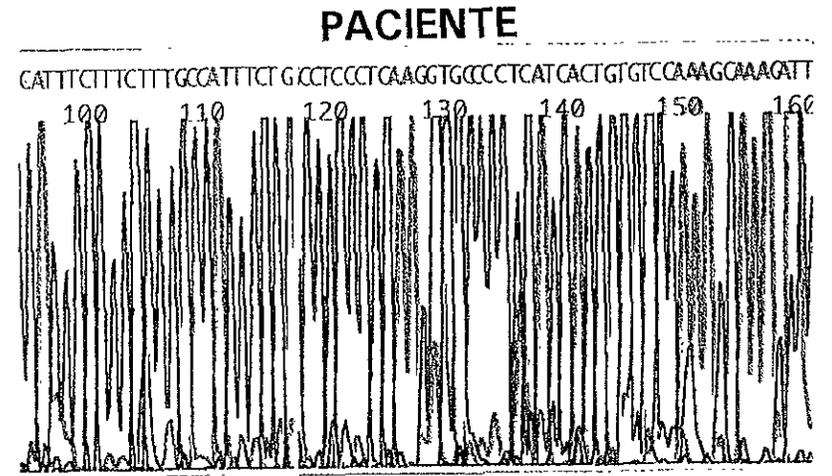
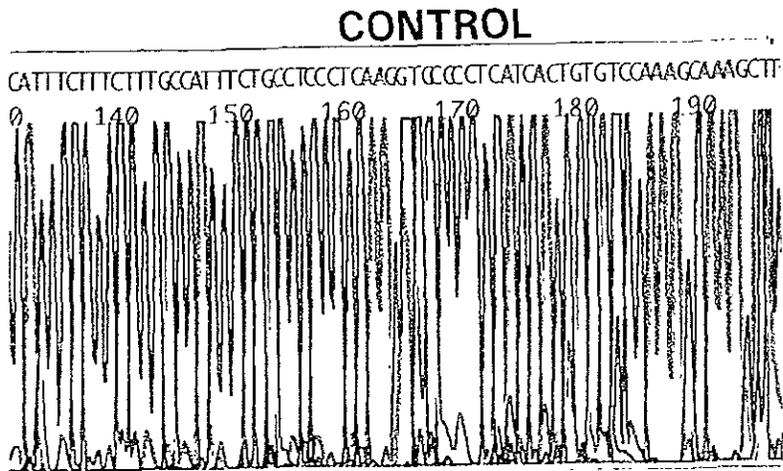
Secuenciación parcial en dirección 5' de los exones 8 y 9 del gen del FSHR. Se observa que las pacientes con DGP 46,XX presentan la misma secuencia que los controles

FIGURA 20



Secuenciación parcial en dirección 5' del exón 10, fragmentos A y B del gen del FSHR. Se observa que las pacientes con DGP 46,XX presentan la misma secuencia que los controles

FIGURA 21



Secuenciación parcial en dirección 5' del exón 10, fragmentos C y D del gen del FSHR. Se observa que las pacientes con DGP 46,XX presentan la misma secuencia que los controles

## DISCUSION

En este trabajo se llevó a cabo el estudio molecular de 12 pacientes con diagnóstico de disgenesia gonadal pura 46,XX.

Esta entidad se caracteriza por presentar un complemento cromosómico 46,XX y falla ovárica prematura, la cual se traduce en amenorrea primaria o secundaria y un desarrollo puberal anormal. Desde el punto de vista endocrinológico presentan hipogonadismo hipergonadotrópico secundario a presencia de estrias gonadales bilaterales (forma completa del síndrome); sin embargo, en las formas incompletas de DGP 46,XX los ovarios pueden encontrarse marcadamente hipoplásicos con algunos folículos, lo que conlleva a diversos grados de función ovárica (18,56).

En 1995, Aittömaki y cols. (57,58), estudiaron a 75 mujeres finlandesas con diagnóstico de DGP 46,XX, tanto en su forma completa como incompleta, demostrando en 22 de estas mujeres (las cuales pertenecían a 13 familias diferentes), una mutación en sentido erróneo en el exón 7 del gen que codifica para el FSHR. Dicha mutación dio lugar a una disminución en la capacidad de unión de la FSH a su receptor y consecuentemente una reducción en la producción de AMPc (57,58).

Al estudiar si existía homología de la secuencia del gen del FSHR en diferentes especies, incluyendo la del humano, se observó que la mutación se localiza en una región altamente conservada

del receptor protéico; asimismo, esta secuencia de cinco aminoácidos es idéntica a la encontrada en los receptores de FSH, LH y TSH y contiene sitios de N-glicosilación, los cuales son importantes para la función del dominio extracelular. Lo anterior sugiere que este sitio participa en la transferencia del receptor hacia la región transmembranal, o en el cambio conformacional del mismo (68). En 1995, Davis y cols. (69) llevaron a cabo un estudio en ratas, en el cual demostraron que los sitios de glicosilación localizados en la secuencia donde se presentó la mutación son importantes para el plegamiento de la proteína; por lo tanto, una mutación en esta región afectaría la integridad conformacional del receptor (46). Lo anterior fue demostrado por Ranniko y cols. (datos no publicados), los cuales observaron que la mutación en el exón 7 altera el movimiento del receptor hacia la membrana celular, así como su adecuado plegamiento. Con base en estos hallazgos postularon que esta mutación dio lugar en estas pacientes finlandesas a la DGP 46,XX.

Posteriormente, diversos grupos de investigadores (70-75), realizaron estudios en el gen del receptor de FSH en mujeres con DGP 46,XX en diversas poblaciones: alemana, inglesa, norteamericana, (en la que incluyeron mujeres de origen caucásico, africo-americano, indio e hispano) y brasileña, incluyéndose aquí también mujeres con orígenes étnicos diversos. El número de pacientes que se incluyeron en estos estudios fue diferente para cada grupo (72,75). Asimismo, se incluyeron tanto mujeres con DGP 46,XX completa como incompleta, así como mujeres

que pertenecían a la misma familia; sin embargo, en ninguno de los estudios se demostraron mutaciones en el gen de FSHR en estas pacientes.

A diferencia de nuestro estudio, en el cual sí se secuenciaron los 10 exones que codifican para FSHR, estos grupos no llevaron a cabo la secuencia de los 10 exones que comprenden al gen del FSHR, únicamente estudiaron al exón 7 (en el cual se reportó la mutación finlandesa) (57), los exones 1, 5-6 (ya que comprenden la región inicial y media del dominio extracelular) (74), y el exón 10 que codifica para la región transmembranal e intracelular (71-75).

Se ha demostrado que la presencia de mutaciones en los genes que codifican para los receptores que acoplan proteínas G, como son los receptores de LH, TSH y GnRH dan lugar a diversas patologías (76). Estas mutaciones por lo general se presentan en el exón que codifica para los dominios transmembranal e intracelular; motivo por el cual, era de esperarse que pudiesen presentarse mutaciones en el exón 10 que codifica para estos dominios del receptor de FSH y dieran lugar a DGP 46,XX. Sin embargo, solamente se demostraron, en algunas de estas poblaciones la presencia de dos polimorfismos en este exón.

En 1998 Beau y cols. (59), demostraron en una mujer de ascendencia armenia con diagnóstico de DGP 46,XX en su forma incompleta, una mutación heterocigota; localizada en el exón 6, que dió lugar al cambio del aminoácido I160T y en el exón 10 que sustituye el aminoácido R573C. Los estudios de expresión por

transfección de este receptor mutado, demostraron una reducción de la capacidad de unión de la hormona a su receptor y consecuentemente una reducción en la producción de AMPc (59).

Posteriormente, este mismo grupo de investigación (61), realizó el estudio molecular del gen del FSHR en una mujer con diagnóstico de DGP 46,XX en su forma incompleta; demostrándose una mutación heterocigota en el exón 9 y exón 10, la cual sustituye al aminoácido N224V y al aminoácido L601V respectivamente. Los estudios de expresión por transfección de este receptor mutado demostraron que únicamente la mutación N224V da lugar a una reducción importante de la capacidad de unión de la hormona a su receptor y consecuentemente una reducción en la producción de AMPc (61).

En este estudio se incluyeron mujeres con DGP 46,XX en su forma completa (n=9) e incompleta (n=3), así como a dos mujeres que pertenecían a la misma familia. No se demostraron en ninguna de las 12 pacientes, mutaciones en ninguno de los 10 exones del gen que codifica para FSHR, así como tampoco detectamos la presencia de polimorfismos. La diferencia de las pacientes incluídas en este estudio con respecto a las finlandesas y a las mujeres estudiadas por Beau y cols. fué su origen étnico mestizo mexicano, e inclusive en nuestro estudio se incluyó a dos mujeres que pertenecían a la misma familia y dado que se ha propuesto una herencia autosómica recesiva, se esperaba al menos que las hermanas presentaran una mutación en este gen.

La mutación reportada en este gen en la población finlandesa como causa de DGP 46,XX, pudiese explicarse por un efecto fundador ocasionado por un alto índice endogámico y las mutaciones heterocigotas presentes en las mujeres estudiadas por Beau y cols., pudiesen ser mutaciones únicas.

En 1999, Conway y cols. (77), realizaron el estudio molecular del gen del FSHR en 49 mujeres inglesas con falla ovárica prematura, así como en 5 con síndrome de ovario resistente y 93 mujeres con síndrome de ovario poliquístico. Al igual que en los estudios previos, no se demostraron mutaciones en el gen del FSHR en ninguna de las pacientes estudiadas; sin embargo, si encontraron los polimorfismos descritos en el exón 10 (71-75).

El hecho de que no se hayan demostrado en las 12 pacientes, mutaciones en ninguno de los 10 exones del gen que codifica para FSHR, no descarta la posibilidad de que existan alteraciones en otras regiones de este gen, o bien que esta patología sea secundaria a otras causas. Se ha reportado en diversos genes que la presencia de mutaciones en el promotor o en las regiones intrónicas, conducen a alteraciones fenotípicas (78,79). De igual forma, se han reportado mutaciones silenciosas a nivel postranscripcional que ocasionan alteraciones en la regulación de la proteína mutada (80). En este estudio, únicamente se realizó la búsqueda de mutaciones en los 10 exones que comprenden al gen; sin embargo, no se secuenciaron las regiones intrónicas ni el promotor del mismo, así como tampoco se realizaron estudios en el

receptor protéico, por lo tanto, no podemos descartar la posibilidad de que la DGP 46,XX en estas pacientes se deba a la presencia de mutaciones en estas regiones, o bien la causa sean alteraciones en la proteína. En los últimos cinco años se han identificado diferentes cromosomas en los que se localizan diversos genes que se consideran candidatos potenciales para el desarrollo de falla ovárica prematura. Entre los genes que cosegregan con la presencia de falla ovárica prematura, se ha identificado, un gen localizado en Xq22 homólogo al gen diáfano de Drosophila melanogaster, el cual se expresa tanto en tejidos de fetos como de adultos humanos, el gen de regulación autoinmune (AIRE), localizado en el cromosoma 21 y el gen para la subunidad  $\beta$  de la hormona FSH mapeado en el cromosoma 11. Es posible que en cualquiera de las 12 mujeres que incluimos en este estudio, existiesen mutaciones en cualquiera de estos genes mencionados anteriormente, o bien que la alteración pudiese encontrarse a nivel de segundos mensajeros y aún cuando existiera un aumento de AMPc como consecuencia de la unión de la FSH con su receptor, las moléculas que funcionan como segundos mensajeros no recibieran la señal que da inicio a su expresión y funcionamiento (76).

Como mencionamos anteriormente, de las 12 pacientes estudiadas, 9 presentan DGP 46,XX en su forma completa y 3 en su forma incompleta. En lo que respecta a la etiopatogenia de la DGP en su forma completa, pudiese ser consecuencia de una alteración en cualquiera de los genes que intervienen en la cascada de

eventos que conducen a la diferenciación sexual; sin embargo, la presencia de ovarios hipoplásicos en las 3 pacientes con DGP 46,XX en su forma incompleta, sugiere que esta condición patológica pudo haberse originado por causas distintas a alteraciones genéticas.

Es importante señalar, que la diferencia entre las pacientes con la forma completa de DGP 46,XX y las pacientes con la forma incompleta, es que las primeras presentan amenorrea primaria y estrías gonadales bilaterales, por el contrario, las segundas, presentan amenorrea primaria o secundaria y folículos desarrollados hasta la etapa antral. Esta diferencia ha postulado que la forma incompleta de la DGP 46,XX no es una variante de la misma, sino otra entidad patológica. Diversos investigadores (59, 60, 71-74, 77) mencionan que la presencia de amenorrea secundaria en conjunto con el desarrollo de ovarios hipoplásicos en los que se pueden observar algunos folículos, es característica de falla ovárica prematura, entidad patológica que se define como un cese en la producción de estrógenos ováricos y un estado hipergonadotrópico entre la menarca y los 40 años de edad (81).

Asimismo, entre las causas que se considera originan falla ovárica prematura, se encuentran la presencia de ooforitis autoinmune, enfermedades infecciosas y anticuerpos antirreceptor de FSH (81). Por lo anterior no podemos descartar la posibilidad de que las 3 pacientes con amenorrea secundaria y ovarios hipoplásicos incluídas en este estudio, hayan presentado alguna de estas alteraciones que dieron lugar a su patología.

## CONCLUSION

El análisis molecular de los 10 exones que comprenden al gen del FSHR, no reveló mutaciones en ninguna de las 12 mujeres con DGP 46,XX. Por lo tanto, se sugiere que la presencia de DGP 46,XX en las 12 mujeres estudiadas pudiese ser secundaria a mutaciones localizadas en la región promotora del gen del FSHR, o en las regiones intrónicas del mismo; o bien debido a la existencia de alteraciones en algunos de los genes que participan en la cascada de la diferenciación sexual.

## REFERENCIAS

- 1.- Ohno S. Sex chromosomes and sex-linked genes. En: Labhart A., (ed). Monographs on Endocrinology. Springer-Verlag, Berlin. p 5, 1967.
- 2.- Wachtel SS, Tiersch TR. The search for the male-determining gene. En: Wachtel SS., (ed). Molecular Genetics of Sex Determination. Academic Press, New York. p 1, 1994.
- 3.- Therman E, Susman M. "Human chromosomes. Structure, behavior and effects". Springer-Verlag, New York. p 376, 1993.
- 4.- Muller U. The human Y chromosome En: Wachtel SS., (ed). Molecular Genetics of Sex Determination. Academic Press, New York. p 205, 1994.
- 5.- Goodfellow PN, Ramsay M, Weissenbach J. The genetic constitution of the Y chromosome. Genome Priority Rep 1: 641, 1993.
- 6.- Cuevas-Covarrubias SA, Kofman-Alfaro SH. El cromosoma Y humano. Rev Invest Clin. 42: 290, 1990.
- 7.- Cooke HJ, Fantes J, Greene D. Structure and evolution of human Y chromosome DNA. Differentiation. 23: s48, 1993.
- 8.- Barr ML, Bertram EG. A morphological distinction between neurones of the male and the female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. Nature. 163: 676, 1949.
- 9.- Walker CL, Cargile CB, Foy KM, y cols. The Barr body is a looped X chromosome formed by telomere association. Proc Natl Acad Sci USA. 88: 6191, 1991.
- 10.- Rastan S. X chromosome inactivation and the XIST gene. Curr Op Genet Dev. 4: 292, 1994.
- 11.- Lyon MF. Some milestones in the history of X-chromosome inactivation. Annu Rev Genet. 26: 17, 1992.
- 12.- Gartler SM, Liskay RM, Gant N. Two functional X-chromosomes in human oocytes. Exp Cell Res. 82: 464, 1973.
- 13.- Jablonka E, Lamb MJ. Meiotic pairing constraints and the activity of sex chromosomes. J Theor Biol. 133: 23, 1988.

- 14.- Jirásek J. En: Cohen M., (ed). Development of the genital system and male pseudohermaphroditism. John Hopkins University Press, Baltimore. p 52, 1971.
- 15.- Kofman-Alfaro S, Merchant-Larios H, Pérez-Palacios G. Diferenciación sexual I. Bases biológicas del dimorfismo sexual. Rev Invest Clin. 34: 349, 1982.
- 16.- Sinclair A, Berta P, Palmer M, y cols. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature. 346: 240, 1990.
- 17.- López M, Torres L, Méndez JP, y cols. SRY alone can induce normal male sexual differentiation. Am J Med Genet. 55: 356, 1995.
- 18.- Grumbach MM, Conte FA. Disorders of sex differentiation. En: Watson JD, Foster DW. (eds). Williams Textbook of Endocrinology. W. B. Saunders, Philadelphia. p 853, 1992.
- 19.- McLaren A. Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage. Bioessays. 13: 151, 1991.
- 20.- George F, Wilson J. Embriology of the genital tract. En: Walsh P, y cols. (eds). Campbell's Urology. 6a ed. Saunders, Philadelphia. p 1496, 1992.
- 21.- Merchant-Lariós H. Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. En: Van Blerkom J, Motta P. (eds). Ultrastructure of Reproduction. Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands. p 19, 1984.
- 22.- George F. Sexual differentiation. En: Griffin D, Ojeda S. (eds). Textbook of Endocrine Physiology. 2a ed. Oxford University Press, USA. p 117, 1992.
- 23.- Jost A. Problems of fetal endocrinology. The gonadal and hypophyseal hormones. Rec Progr Horm Res. 8: 379, 1953.
- 24.- Jost A. Studies on sex differentiation in mammals. Rec Progr Horm Res. 29: 1, 1973.
- 25.- Jirásek J. The relationship between the structure of the testis and differentiation of the external genitalia and phenotype in man. En: Wolstenhome G, O' Connor M. (eds). Endocrinology of the Testis. Little Brown & Co, Boston. p 3, 1967.

- 26.- Wilson J. Metabolism of testicular androgens. En: Greep R, Astwood E. (eds). Handbook of Physiology. Endocrinology of the Male Reproductive System. vol V. American Physiological Society, Washington. Sec 7 491, 1975.
- 27.- 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: 234, 1949.
- 28.- Mc Cann SM, Taleisnik S, Friedman HM. LH releasing activity in hypothalamic extracts. Soc Exp Biol Med Proc. 104: 432, 1960.
- 29.- Matsuo H, Baba Y, Mair RMV, y cols. Structure of the porcine LH and FSH-releasing hormone. 1. The proposed aminoacid sequence. Biochem Biophys Res Commun 43: 393, 1971.
- 30.- Shally A, Arimura A, Baba Y, et al. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. Biochem Biophys Res Commun 43:1334, 1971.
- 31.- Conn PM. GnRH regulation of gonadotropin release and target cell responsiveness. En: de Groot L J, y cols. eds. Endocrinology. W. B. Saunders, Philadelphia. p 284, 1989.
- 32.- Kahn CR, Smith RJ, Chin W W. Mechanism of action of hormones that act at the cell surface En: Williams Textbook of Endocrinology. Watson JD, Foster DW. (eds). W. B. Sauders, Philadelphia. pp 91-34, 1992.
- 33.- Braun T, Schoefield PR, Sprengel R. Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. EMBO J. 10: 1885, 1991.
- 34.- Moyle WR, Campbell RK, Rao LVSAN, y cols. Model of human chorionic gonadotropin and lutropin receptor interaction that explains signal transduction of the glycoprotein hormones. J Biol Chem. 270: 20020, 1995.
- 35.- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. Molecular pathophysiology and clinical manifestations of gonadotropin receptor defects. Steroids. 63: 288, 1998.
- 36.- Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC, y cols. Hormonal regulation of the differentiation of culture ovarian granulosa cells. Endocr Rev. 5: 76, 1984.

- 37.- Adashi EY, Hsueh AJW. Estrogens augment the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem.* 257: 6077, 1992.
- 38.- Chan WY. Molecular genetic, biochemical and clinical implications of gonadotropin receptor mutations. *Mol Genet Metab.* 63: 75, 1998.
- 39.- Spiegel AM. Genetic basis of endocrine disease. Mutations in G proteins and G protein-coupled receptors in endocrine disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 81: 2434, 1996.
- 40.- McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, y cols. Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science.* 245: 494-499, 1989.
- 41.- Loosfelt H, Misrahi M, Atger M, y cols. Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science.* 245: 525-528, 1989.
- 42.- Parmentier M, Libert F, Maenhaut C, y cols. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science.* 246: 1620-1622, 1989.
- 43.- Misrahi M, Loosfelt H, Atger M, y cols. Cloning, sequencing and expression of human TSH receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 166: 394-403, 1990.
- 44.- Griffin J, Wilson J. Disorders of sexual differentiation. En: Walsh P. ed. *Campbell's Urology.* W. B. Saunders, Philadelphia. p 1819, 1986.
- 45.- Rousseau-Merck MF, Atger M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. The chromosomal localization of the human follicle-stimulating receptor gene (FSHR) on 2p21-2p16 is similar to that of the luteinizing hormone receptor gene. *Genomics.* 15: 222-224, 1993.
- 46.- Gromoll J, Pekel E, Nieschlag E. The structure and organization of the human follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene. *Genomics.* 35: 3068-311, 1996.
- 47.- Gromoll J, Dankbar B, Gudermann T. Characterization of the 5' flanking region of the human follicle-stimulating hormone receptor gene. *Mol Cell Endocrinol.* 102: 93-102, 1994.
- 48.- Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, Ibuki Y, Igarashi M. Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 175: 1125-1130, 1991.

- 49.- Mc Donough PG, Byrd JR, Tho PT, Mahesh VB. Phenotypic and cytogenetic findings in eighty-two patients with ovarian failure-changing trends. *Fertil Steril*. 28: 638, 1977.
- 50.- Rebar RW, Hypergonadotropic amenorrhea and premature ovarian failure. A review. *J Reprod Med*. 27: 179, 1982.
- 51.- Bateman BG, Nunley WC, Kitchin JD. Hypergonadotropic ovarian failure in young women. *Int J Gynecol Obstet*. 21: 305, 1983.
- 52.- Reindollar RH, Mc Donough PG. Pubertal aberrancy. Etiology and Clinical approach. *J Reprod Med*. 29: 391, 1984.
- 53.- Christakos A, Simpson JL, Jounger JB, Christian CD. Gonadal dysgenesis as an autosomal recessive condition. *Am J Obstet Gynecol*. 104: 1028, 1969.
- 54.- Boczkowski K. Pure gonadal dysgenesis and ovarian dysplasia in sisters. *Am J Obstet Gynecol*. 106: 626, 1970.
- 55.- Simpson JL, Christakos AC, Horwith M, Silverman FS. Gonadal dysgenesis in individuals with apparently normal chromosomal complements: tabulation of cases and compilation of genetic data. *Birth Defects*. 7: 215, 1971.
- 56.- Simpson JL. Gonadal dysgenesis and sex chromosome abnormalities: phenotypic/karyotypic correlations. En: Simpson JL. ed. *Genetic Mechanisms of Sexual Development*. New York, Academic Press. p 365, 1979.
- 57.- Aittomäki K, Dieguez Lucena JL, Pakarinen P, y cols. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*. 82: 959, 1995.
- 58.- Aittomäki K, Herva R, Stenman U-H, y cols. Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 81: 3722, 1996.
- 59.- Beau I, Touraine P, Meduri G, y cols. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *J Clin Invest*. 102: 1352, 1998.
- 60.- Huhtaniemi IT, Aittomaki K. Mutations of follicle-stimulating hormone and its receptor: effects on gonadal function. *Eur J Endocrinol*. 138: 473, 1998.

- 61.- Touraine P, Beau I, Gougeon A, y cols. New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: Correlations between receptor function and phenotype. *Mol Endocrinol*. 13: 1844, 1999.
- 62.- Méndez JP, Schiavon R, Diaz-Cueto L, y cols. A reliable endocrine test with human menopausal gonadotropins for diagnosis of true hermaphroditism in early infancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 83: 3523, 1998.
- 63.- Buffone GJ, Darlington GJ. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem*. 31: 164, 1985.
- 64.- Kempter B, Grossbadern K. Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *TIG*. 8: 226, 1992.
- 65.- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2a de. Cold. Spring Harbor Laboratory Press. p E5, 1989
- 66.- Cooper C, Stratton M. Extraction and enzymatic amplification of DNA from paraffin-embedded specimens. En: Mathew Ch. Ed. *Protocols in Human Molecular Genetics*. New Jersey. Human Press. 1991; 133-140.
- 67.- Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 74: 5463, 1977.
- 68.- Tapanainen JS, Vaskivuo T, Aittomäki K y Huhtaniemi IT. Inactivating FSH receptor mutations and gonadal dysfunction. *Mol Cel Endocrinol*. 145: 129, 1998.
- 69.- Davis D, Liu X, Segaloff DL. Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone receptor and assessment of their role in FSH receptor function. *Mol endocrinol*. 9: 159, 1995.
- 70.- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology and pathophysiology. *Endocr Rev*. 18: 739, 1997.
- 71.- Conway E, Höppner W, Gromoll J, y cols. Mutations of the FSH receptor gene are rare in familial and sporadic premature ovarian failure. *J Endocrinol*. 152 (Suppl.): 227, 1997.
- 72.- Layman LC, Amde S, Cohen DP, y cols. The finnish follicle-stimulating hormone receptor gene mutation is rare in North American women with 46,XX ovarian failure. *Fertil Steril*. 69: 300, 1998.

- 73.- da Fonte Kohek MB, Batista MC, Russell Aj, y cols. No evidence of the inactivating mutation (C566T) in the follicle-stimulating hormone receptor gene in Brazilian women with premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 70: 565, 1998.
- 74.- Whitney E, Layman LC, Chan PL, y cols., The follicle-stimulating hormone receptor gene is polymorphic in premature ovarian failure and normal controls. *Fertil. Steril.* 64: 518-524, 1995.
- 75.- Liu JY, Cedars MI, y cols., Mutations in the FSH receptor genes of females with or without hypergonadotropic hypogonadism. Ares Serono Foundation Conference. Paris. 1996. Abstract P18.
- 76.-Christin-Maitre S, Vasseur C, Portnoi MF y Bouchard P. Genes and premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol.* 145: 75, 1998.
- 77.- Conway Gs, Conway E, Walker C, y cols. Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol.* 57: 97, 1999.
- 78.- Shea J, Isasi CR, Couch S, y cols. Relations of plasma fibrinogen level in children to measures obesity, the (G455A) mutation in the beta-fibrinogen promoter gene, and family history of ischemic heart disease: the Columbia University Biomarkers Study. *Am J Epidemiol.* 150: 737, 1999.
- 79.- Wilson J, Griffin J, Russell D. Steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. *Endocr Rev.* 14: 577, 1993.
- 80.- Grad JM, Dai JL, Wu S, Burnstein KL. Multiple androgen response elements and a Myc consensus site in the androgen receptor (AR) coding region are involved in androgen-mediated up-regulation of AR messenger RNA. *Mol Endocrinol.* 13: 1896, 1999.
- 81.- Grumbach MM, Conte FA. Disorders of sex differentiation. 9<sup>a</sup> edición. En: Watson JD, Foster DW., y cols. (eds). *Williams Textbook of Endocrinology.* W. B. Saunders, Philadelphia. p 1352, 1998.