



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

11262
18
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Maestría en Ciencias Médicas
(Sede Centro)

ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN DEL RECEPTOR
DE LA HORMONA LUTEINIZANTE EN UNA FAMILIA
CON PSEUDOHERMAFRODITISMO MASCULINO SECUNDARIO
A HIPOPLASIA DE LAS CELULAS DE LEYDIG

ALUMNO : JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ

TUTOR : DR. JUAN PABLO MENDEZ BLANCO

Unidad de Investigación Médica
en Biología del Desarrollo
Hospital de Pediatría
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

COTUTORES: DRA. SUSANA KOFMAN EPSTEIN
Servicio de Genética
Hospital General de México
Secretaría de Salud-Facultad de Medicina, UNAM

DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA
Unidad de Investigación Médica
en Biología del Desarrollo
Hospital de Pediatría
Centro Médico Nacional
Siglo XXI, IMSS

274249.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F.

1999



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y
DE LA SALUD

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
U.N.A.M.

Presente

At'n: Lic. Antonio Díaz García

Informo a usted que el (la) C. Juan Carlos Zenteno Ruiz
candidato al grado de Maestro en Ciencias Médicas
con la tesis titulada "Estudio molecular del gen del receptor de LH en una
familia con pseudohermafroditismo masculino secundario a hipoplasia de
células de Leydig"

será examinado (a) por el jurado que le ha sido designado por el Comité Académico del Programa y
el cual quedó integrado de la siguiente forma:

PRESIDENTE: Dr. Fabio Salamanca Gómez
SECRETARIO: Dr. Moisés Mercado Atri
PRIMER VOCAL: Dr. Juan Pablo Méndez Blanco
SUPLENTE: Dra. Susana Kofman Epstein
SUPLENTE: Dr. Sergio Cuevas-Covarrubias

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, D. F., a 30 de marzo de 1999.

DR. LUIS FELIPE ABREU H.
COORDINADOR DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

A todo el personal de la Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo,
Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

A todo el personal del Servicio de Genética del Hospital General de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través
de la beca 115900.

INDICE

RESUMEN	2
SUMMARY	3
ANTECEDENTES	4
Diferenciación sexual normal.....	4
Eje hipotálamo-hipófisis-testículo.....	10
Gen del receptor de LH	14
Pseudohermafroditismo masculino	17
hipoplasia de las células de Leydig	18
OBJETIVOS	22
SUJETOS Y METODOS	23
RESULTADOS	35
DISCUSION	41
REFERENCIAS	46

RESUMEN

Las anomalías en la diferenciación de la célula de Leydig (agenesia o hipoplasia) constituyen una causa de pseudohermafroditismo masculino (PHM). Se ha demostrado que mutaciones en el gen que codifica al receptor de LH/hCG (R-LH) son responsables de esta enfermedad y se han identificado diversas mutaciones en este gen en sujetos con la enfermedad. El objetivo de nuestro estudio fue caracterizar el defecto molecular del gen del R-LH en tres hermanas con PHM por hipoplasia de las células de Leydig. Se estudió además al padre, a una hermana sana y a 10 controles sanos. Los métodos incluyeron extracción de DNA genómico, amplificación de los 11 exones del gen del R-LH por la técnica de PCR y secuenciación completa del gen. En el nucleótido 1065 se detectó una transición homocigota de citosina (C) a timina (T) (GAC→GAT, codón 355) en las pacientes #1 y #3, correspondiendo este cambio a una mutación silenciosa. En la paciente #2 se identificó homocigosidad para GAC en esta posición, mientras que el padre y la hermana sana resultaron heterocigotos GAC/GAT. El resto de la secuencia fue normal en todos los sujetos. El cambio identificado en el nucleótido 1065 resultó un polimorfismo informativo, ya que al presentar 2 pacientes homocigosidad para GAT y la tercera paciente homocigosidad para GAC, excluimos con certeza que la enfermedad en esta familia estuviera ligada al gen del receptor de LH. Nuestros datos demuestran por primera vez la heterogeneidad genética del padecimiento.

SUMMARY

Leydig cell aplasia or hypoplasia (LCH) is a rare form of male pseudohermaphroditism resulting from inadequate fetal testicular Leydig cell differentiation. Affected individuals presented a wide phenotypic spectrum ranging from complete female external genitalia to males with micropenis. Recessive mutations in the LH receptor gene have been identified as responsible of the condition. In this study, we describe the molecular characterization of the LH receptor gene in three sibs with LCH. The father and an unaffected sister were also studied. Methods included genomic DNA extraction, PCR amplification of the 11 exons of the gene and direct automated sequencing of all the PCR products. After sequencing the 11 exons of the gene, no deleterious mutations were detected in any patient. However, we identified a silent polymorphism in exon 11: patients 1 and 3 presented a C to T substitution at nucleotide 1065, being both patients homozygous GAT/GAT at codon 355. In contrast, patient 2 was homozygous GAC/GAC, while the father and the unaffected sister were heterozygous GAC/GAT. These results exclude that LCH in this family is due to a mutation in the LH receptor gene and provide evidence that defects in other loci, may also result in failure of Leydig cell differentiation demonstrating, for the first time, that Leydig cell hypoplasia is a genetically heterogeneous condition.

ANTECEDENTES

DIFERENCIACION SEXUAL NORMAL

La diferenciación sexual constituye 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 consecuencia 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. Recientemente, se ha demostrado que el fenotipo sexual depende de una serie de interacciones complejas entre señales genéticas, hormonales y celulares que participan en una cascada de eventos que culmina con el desarrollo del fenotipo masculino o femenino. En el humano, el proceso de diferenciación sexual se realiza en tres etapas sucesivas: cromosómica, gonadal y fenotípica(1).

La diferenciación cromosómica se produce 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 o ausencia de los factores determinantes de masculinización (2). Sin embargo, la presencia del cromosoma Y es siempre necesaria para la diferenciación

testicular de la gónada primitiva, independientemente del número de cromosomas X presentes en el genoma de un individuo (3,4).

El dimorfismo sexual gonadal se hace presente hasta la sexta semana de la vida intrauterina (5,6). Al menos cuatro tipos de células participan en la diferenciación de la gónada primitiva: 1.- las células de soporte (células de Sertoli en el varón o células de la granulosa en la mujer) que derivan del epitelio celómico de la cresta gonadal; 2.- las células esteroideogénicas (células de Leydig en el varón y de la teca en la mujer) que derivan de células mesenquimatosas; 3.- células del tejido conectivo (que incluyen células mioides peritubulares y endoteliales formadoras de vasos sanguíneos) y 4.- las células germinales primordiales (CGP), que originarán los gametos (7). La gónada primitiva se transformará en testículo por la presencia y acción del Factor Determinante Testicular (FDT) conocido como SRY y localizado en el cromosoma Y; de no existir éste, de manera pasiva, la gónada primitiva evolucionará hacia ovario (8,9).

Desde hace más de 30 años se inició la búsqueda del FDT en los mamíferos; desde entonces se describieron diversos genes y secuencias que supuestamente correspondían al FDT. Entre ellos podemos citar al antígeno H-Y (10,11), a las secuencias Bkm (12) y al gen ZFY (13). En 1990, Sinclair y cols. (8), identificaron al gen específico, SRY (*Sex determining region on Y chromosome*), el cual induce la transformación de la gónada primitiva en testículo. Este gen presenta una estructura muy sencilla, ya que contiene un sólo exón y no tiene intrones. Los

transcritos originados por el gen son de 1.1 kb; presenta un marco abierto de lectura de 614 pares de bases, el cual codifica una proteína de 204 aa con un peso molecular de 23.9 kilodaltons (14,15). La parte media de la proteína SRY corresponde a un dominio con propiedad de unión al DNA, similar al encontrado en las proteínas nucleares de alta movilidad (16). Existen diversas evidencias en la literatura que han confirmado que el gen SRY es el FDT; algunas de éstas son las siguientes: el gen SRY está localizado en la región más pequeña del cromosoma Y capaz de inducir la diferenciación testicular en el ratón (8) y, como ha sido confirmado por nuestro grupo de trabajo, su presencia es suficiente para el desarrollo testicular en el hombre (9); 15% de las pacientes con disgenesia gonadal pura XY presentan mutaciones en el gen SRY (17-23); en el ratón, la expresión del gen Sry (homólogo murino del SRY) se correlaciona con el inicio de la determinación testicular (24); un fragmento de ADN de 14 kb, que incluye el gen Sry del cromosoma Y del ratón puede inducir el desarrollo masculino en ratones transgénicos XX (25) y finalmente, éste es un gen evolutivamente conservado en el cromosoma Y de mamíferos metaterios y euterios (8,26). La observación de que en algunas alteraciones de la diferenciación sexual se presenta desarrollo testicular aún en ausencia de SRY (27,28), ha llevado a proponer la participación de numerosos genes (autosómicos o ligados al X) en el proceso de desarrollo gonadal, como componentes de una cascada génica responsable de conducir la morfogénesis y la

diferenciación testicular. Entre estos podemos mencionar a los genes WT1, DAX-1, SOX9 y SF1(29-37).

La formación de los fenotipos masculino o femenino es consecuencia de la acción ejercida por las hormonas sintetizadas en el testículo fetal, o por la ausencia de síntesis de éstas por parte del ovario. El mecanismo que lleva a cabo este dimorfismo en los mamíferos fue descrito originalmente por Jost (38,39), quien demostró que al diferenciarse la gónada primitiva a testículo, su producción hormonal induce el desarrollo del fenotipo masculino; en cambio, si la diferenciación gonadal es hacia ovario, el fenotipo será femenino. La extirpación temprana de las gónadas fetales en ambos sexos también induce un fenotipo femenino, lo cual apoya el concepto de inactividad endócrina del ovario fetal (40).

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 Mülllerianos (paramesonéfricos). Los genitales externos se desarrollan a partir de un primordio común (tubérculo genital, pliegues genitales y engrosamientos labioescrotales) (41).

El desarrollo del fenotipo masculino es secundario a la acción de tres hormonas fetales. En un inicio se presenta la involución de los conductos Mülllerianos, proceso que se observa entre la sexta y la octava semana de la gestación y concluye en la décimo primera. Dicha involución está mediada por la hormona inhibidora de estructuras

Müllerianas (HIM) que es una glicoproteína secretada por las células de Sertoli del testículo fetal (42). La acción de la HIM se realiza a través de un receptor transmembranal, localizado en las células mesenquimatosas adyacentes a los conductos Müllerianos (43).

Inmediatamente después de iniciada la síntesis de la HIM, las células intersticiales del testículo fetal se citodiferencian en células de Leydig. Estas servirán como substrato anatómico para la síntesis y secreción de 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. La biosíntesis de T en el testículo fetal se lleva a cabo a partir de acetato (44), y es similar a la observada en el testículo del individuo adulto (45). La síntesis de T a partir de colesterol requiere de la presencia de diversos sistemas enzimáticos diferentes codificados cada uno de éstos, por loci autosómicos independientes (46). La actividad endócrina de la célula de Leydig en etapas tan tempranas de la gestación, representa una excepción en la economía fetal, ya que en general el feto posee medidas de protección las cuales no permiten la síntesis de hormonas esteroides activas que podrían poner en peligro su homeostasis (47).

La T es el precursor (o prohormona) de la tercera hormona fetal virilizante, la dihidrotestosterona (DHT) (48-50). Esta se forma en las células blanco por la acción de la 5α -reductasa extragonadal; y es el mediador intracelular de la gran mayoría de las acciones de los

andrógenos. Esta hormona es la única responsable del desarrollo de los genitales externos masculinos y de la próstata (50,51).

En la circulación, la T se une a dos proteínas: a la globulina transportadora de testosterona y a la albúmina (52). El paso de la T libre hacia las células no es dependiente de energía y probablemente está dado por un fenómeno de difusión pasiva (53). Tanto la T como la DHT se unen a una proteína receptora localizada en el citoplasma de las células blanco. Al unirse con el andrógeno, el complejo hormona-receptor es translocado al núcleo donde se une a regiones específicas del DNA denominadas elementos de respuesta a hormonas (54-56). El receptor de andrógenos es una proteína de 919 aminoácidos codificada por un gen localizado en Xq11-12 (57-60).

En ausencia de los genes testículo determinantes el primordio gonadal posee una tendencia inherente a desarrollarse como ovario siempre y cuando existan células germinales, ya que en caso contrario se forman estrías fibrosas incapaces de producir hormonas sexuales femeninas durante la pubertad (61,62). Entre la semana décima primera y la décima segunda, las ovogonias entran en la primera profase meiótica (ovocitos primarios) pero se detienen en la etapa de dictiotene hasta la pubertad cuando la acción de la hormona folículo estimulante (FSH) induce la continuación de la meiosis (63). Durante la embriogénesis, el ovario no secreta HIM ni T, lo que origina persistencia de los conductos Mülllerianos y regresión de los conductos Wolffianos, respectivamente (40).

EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-TESTICULO

La síntesis y secreción de T por las células de Leydig está inducida, en un inicio de la etapa fetal, por la acción de la gonadotropina coriónica (hCG) sobre dichas células; sin embargo, a partir de la semana 11-12, el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (H-H-T) inicia su actividad y es entonces cuando la hormona luteinizante (LH) se encarga de estimular la síntesis y secreción de andrógenos (64).

Han transcurrido casi 50 años desde que por primera vez se propuso que la regulación de la síntesis y secreción tanto de LH como de FSH se encontraba mediada por la acción que el sistema nervioso central ejercía sobre la hipófisis anterior (65). Dentro de la complejidad de los eventos que conducen a la síntesis y secreción de gonadotropinas, ha sido demostrado desde hace varios años que la acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) producida en el hipotálamo es un factor determinante para este fin. En 1960, McCann y colaboradores (66) demostraron que la inyección de extractos hipotalámicos a ratas inducía la secreción de LH por la hipófisis anterior. En 1971, los trabajos tanto de Matsuo (67) como de Schally (68), indicaron que un decapeptido era el directamente responsable de la estimulación del gonadotropo, denominándosele desde entonces como GnRH.

El sistema nervioso central se comunica con la hipófisis anterior a través de una vía vascular. La síntesis de GnRH se efectúa en las neuronas especializadas del hipotálamo preóptico. 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 estimula la síntesis y secreción tanto de LH como de FSH (69). 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.

La LH, así como la FSH y la hCG son glicoproteínas estructuralmente similares formadas por 2 cadenas peptídicas, unidas por puentes de hidrógeno, denominadas subunidad alfa y subunidad beta. La beta, es única para cada gonadotropina y le confiere su actividad biológica específica (70). La estructura de la subunidad beta de LH es similar a la de la hCG, excepto por que la de hCG tiene 32 aminoácidos adicionales y varios residuos extras de carbohidratos en su extremo carboxilo (-COOH). La estimulación de la LH sobre las células de Leydig induce la producción de testosterona.

El proceso de esteroidogénesis testicular está mediado por la interacción de la LH/hCG a un receptor localizado en la membrana externa de las células de Leydig (71,72). El receptor de LH es una glicoproteína asimétrica e hidrofóbica constituida de una sola cadena polipeptídica y en el testículo se encuentra confinado exclusivamente a las células de Leydig, como ha sido demostrado mediante estudios con ^{125}I -hCG (73-75); en cada célula de Leydig existe un total aproximado de 6000 receptores (76). Los receptores para LH, unen a su

ligando en una forma sumamente selectiva y con una gran afinidad. La reacción de unión es más bien lenta, llevándose a cabo en una hora aproximadamente, bajo condiciones fisiológicas (76,77). El receptor de LH pertenece a una familia de receptores de superficie implicados en la transducción de señal dependiente de hormonas mediante el sistema de proteínas G/adenilato ciclasa y a la cual pertenecen también los receptores de FSH y TSH (familia de receptores de hormonas glicoproteicas) (78). A diferencia de otros receptores acoplados a proteínas G, esta familia de receptores tiene como característica el presentar un gran dominio extracelular que es el responsable de la unión de ligandos de 28-38 kDa (79). El dominio intracelular es la región responsable de la transducción de señal. La estructura de este grupo de receptores está caracterizada además por la presencia de 7 dominios transmembranales unidos por 3 asas extracelulares y 3 asas intracelulares. El dominio intracelular, así como las asas citoplasmáticas presentan diversos residuos de serina, treonina y tirosina que son sitios potenciales de fosforilación (75). El receptor de LH es regulado por su propio ligando y por FSH a través de la forma cíclica de monofosfato de adenosina (AMPC). Otros factores como la GnRH, el estradiol y algunos factores de crecimiento pueden afectar el nivel de expresión del receptor (80). Recientemente se ha informado de la expresión del receptor de LH en tejidos extragonadales como útero, trompas de Falopio, placenta, arterias testiculares y membranas fetales entre otros (80).

Existen dos requerimientos básicos para la interacción ligando-receptor que son sumamente importantes para la respuesta subsecuente: alta afinidad y rigurosa especificidad. La primera propiedad 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. Al interaccionar la LH con su receptor, se estimula la enzima adenilato ciclasa incorporada a la membrana, la cual cataliza la conversión de ATP en AMPc; el AMPc fungirá como segundo mensajero. El sistema de adenilato ciclasa se encuentra compuesto por 3 unidades diferentes unidas a la membrana: el receptor a la hormona que contiene el sitio específico para el reconocimiento de LH; la unidad catalítica de adenilato ciclasa, la cual convierte trifosfato de adenosina (ATP) a AMPc; y por último la subunidad reguladora del guanidil nucleótido que acopla GTP uniendo la adenilato ciclasa al receptor hormonal (81). Una vez que el AMPc es liberado al citoplasma de la célula de Leydig, se activa la enzima protein cinasa dependiente de AMPc (Cinasa-A) (82), la cual fosforila residuos de serina y treonina localizados en proteínas específicas de la célula e induce una cascada de eventos que culminan con la conversión de colesterol a pregnenolona y la síntesis subsecuente de andrógenos. La fosforilación se presenta en un gran número de sitios intracelulares que incluyen al núcleo celular, modificándose de esta forma las funciones fisiológicas (83). Después del estímulo de LH, se genera una producción máxima de esteroides (principalmente T), que

ocurre después de un pequeño incremento de AMPc. Se ha demostrado que la producción de T en células de Leydig dispersas, alcanza su máximo con la ocupación de solamente 1% de los receptores; debido a esto, no se ha podido observar un aumento significativo en las concentraciones de AMPc (75).

En el humano, la estimulación de la biosíntesis de T se inicia aproximadamente entre la 6a. y la 8a. semana de la gestación (84), lo que indica que los receptores funcionales para LH/hCG se encuentran presentes desde etapas tempranas de la vida fetal (85).

Si bien no existe un conocimiento exacto de cómo finaliza la acción de la LH sobre el testículo y cual es el mecanismo íntimo por el cual la hormona unida es removida, se ha demostrado que los complejos hormona-receptor son internalizados y subsecuentemente degradados (86).

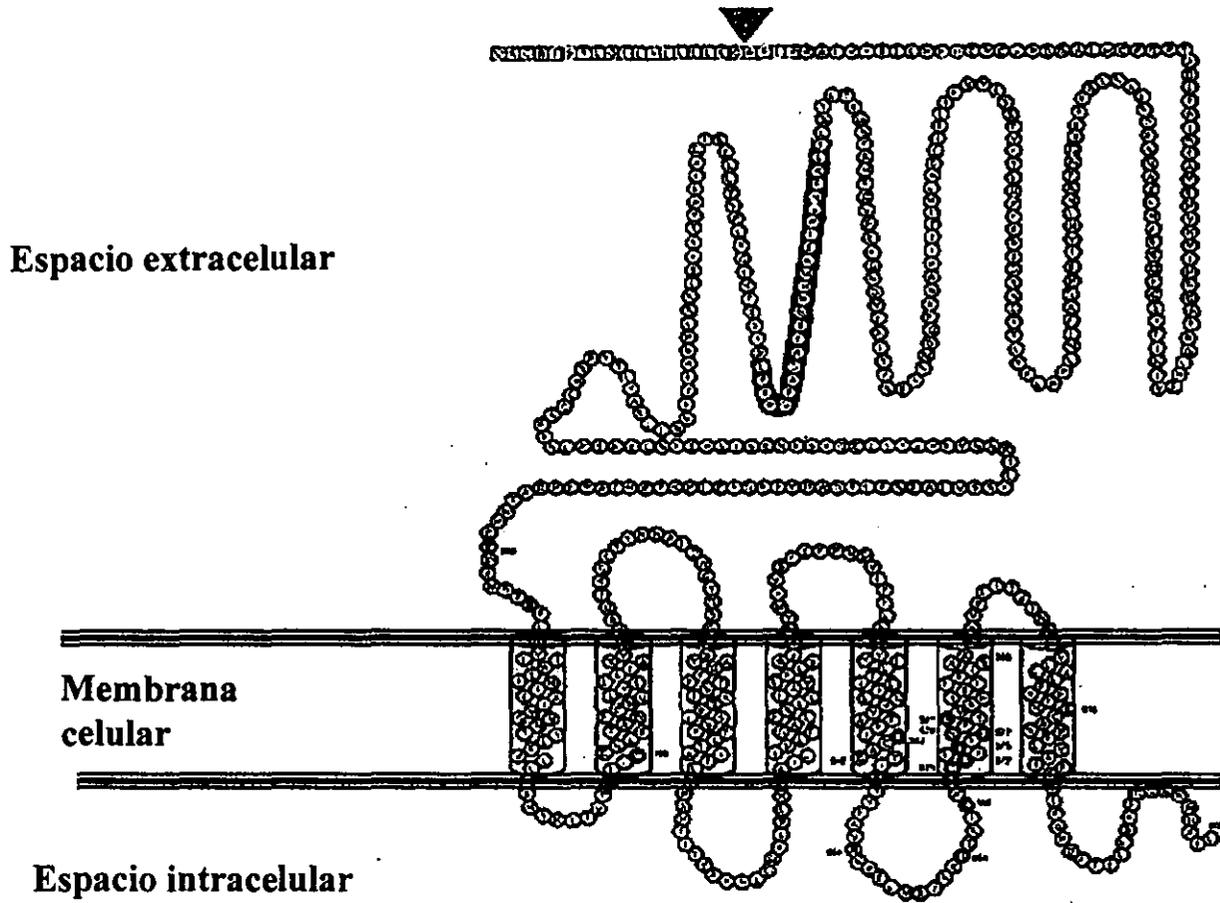
GEN DEL RECEPTOR DE LH

El gen que codifica al receptor de LH/hCG en el humano se encuentra localizado en los brazos cortos del cromosoma 2, específicamente en la banda p21 (87). Este gen tiene una región codificante de más de 60 Kb, constituida por 11 exones y 10 intrones y produce una proteína de 699 aminoácidos. Los exones 2-8 y 10 son muy similares en tamaño, constituidos por alrededor de 70 a 80 pares de bases (pb), los exones 1 y 9 son de aproximadamente 200 pb, mientras que el exón 11 está formado por más de 1000 pb. En la región flanqueante 5' se encuentran secuencias que regulan la respuesta

transcripcional del gen a algunas hormonas, factores de crecimiento y análogos de segundos mensajeros. Los primeros 10 exones del gen codifican la mitad amino terminal de la proteína que corresponde al gran dominio extracelular del receptor constituido por 335 aminoácidos, mientras que el exón 11 es el encargado de codificar la mitad carboxilo terminal de la proteína. Esta última región incluye un segmento extracelular de 42 aminoácidos, siete dominios transmembranales (unidos entre sí por 3 asas extracelulares y 3 asas intracelulares) constituidos por 267 residuos de aminoácidos y el dominio intracitoplasmático completo (C-terminal) que está conformado por 72 aminoácidos (88). Esta organización estructural del receptor de LH/hCG es similar a la observada en otros receptores acoplados a proteínas G en los que también se han identificado 7 dominios transmembranales (89). En la figura 1 se muestra un esquema de la organización estructural del receptor de LH.

En el dominio extracelular de la proteína se identifican seis sitios potenciales para glicosilación. En la porción amino terminal en la unión entre el dominio extracelular y el dominio transmembranal se encuentran varios grupos de cisteínas. Debido a que estas cisteínas están conservadas en los receptores de LH, FSH y TSH, se cree que la formación de puentes disulfuro es crucial para mantener la integridad conformacional del dominio extracelular en los receptores de las hormonas glicoproteicas (88).

Figura 1



Organización estructural del receptor de LH

La región 5' del gen del receptor de LH tiene una longitud de 1085 pb y se han identificado 2 cajas TATA localizadas a -34 y -47 así como una secuencia que corresponde a un elemento de respuesta a AMPc (80).

Recientemente fue identificada una variante alélica del gen del receptor de LH denominada LQ, la cual se caracteriza por presentar 2 aminoácidos adicionales en el extremo amino de la proteína (residuos 19 y 20). La variante LQ es común en población caucásica pero no se logró identificar en una muestra de población japonesa (90). La expresión de ambas formas del receptor en células COS-7 no reveló diferencias en la capacidad de producción de AMPc ni en la expresión de la proteína en la superficie celular (90).

PSEUDOHERMAFRODITISMO MASCULINO

Las alteraciones del proceso de diferenciación sexual durante cualquier etapa de la vida intrauterina, conducen a la presencia de anomalías en el desarrollo sexual. Estos trastornos pueden ser clasificados de acuerdo con el momento del desarrollo en el que se originaron; ésto es, en errores del sexo cromosómico, errores del sexo gonadal y errores del sexo fenotípico (91).

Dentro de las alteraciones del sexo fenotípico se encuentra el pseudohermafroditismo masculino (PHM), que está constituido por un grupo de padecimientos en los cuales el individuo afectado presenta cariotipo 46,XY, testículos y fenotipo femenino o ambiguo. El PHM se ha dividido para su estudio en 3 categorías principales: 1.- defectos

en la síntesis, secreción o acción de la HIM, que originan un grupo de padecimientos en los que los individuos afectados presentan virilización masculina normal con persistencia de estructuras Mülllerianas; 2.- anomalías secundarias a deficiencias en la producción de T, originadas por defectos en cualquiera de las 5 enzimas necesarias para la síntesis de T a partir de colesterol o a anomalías del receptor de LH/hCG; y 3.- síndromes de resistencia a la acción de los andrógenos, que son considerados la causa mas común de PHM (91-93).

HIPOPLASIA DE LAS CELULAS DE LEYDIG

Las anomalías en la diferenciación de la célula de Leydig (agenesia o hipoplasia) constituyen una causa poco frecuente de PHM (94-114). Las características principales de esta alteración son las siguientes: 1) complemento cromosómico 46,XY; 2) testículos pequeños, criptorquídicos, con presencia de túbulos seminíferos, escasas espermatogonias e hipoplasia o agenesia de las células de Leydig en el intersticio; 3) presencia variable de derivados Wolffianos y ausencia de derivados Mülllerianos; 4) genitales externos predominantemente femeninos, aunque en los casos de hipoplasia puede encontrarse ambigüedad genital o micropene. El desarrollo de las características sexuales secundarias en la pubertad es variable; 5) T sérica baja y disminución de la respuesta androgénica al estímulo con hCG; 6) valores normales de los precursores en la biosíntesis de T y 7) patrón hereditario autosómico recesivo (101). Los estudios

histológicos testiculares en estos pacientes muestran túbulos seminíferos inmaduros con células de Sertoli de apariencia normal, adelgazamiento de la membrana basal y células semejantes a fibroblastos en el intersticio; si bien con frecuencia pueden identificarse espermatogonias, no se han podido observar espermatoцитos (93,94,96,97,101). Por otra parte, en la mayoría de los pacientes se ha podido identificar epidídimo y vasos deferentes, hecho que podría indicar que algunas células de Leydig son funcionales durante el desarrollo fetal (98).

Clinicamente, la agenesia o hipoplasia de células de Leydig se ha clasificado en 2 tipos: el tipo I que es la forma severa en la que los sujetos afectados presentan fenotipo femenino y el tipo II que son los casos menos severos en los que se observa ambigüedad genital o micropene (103).

Recientemente se ha demostrado que mutaciones en el gen que codifica al receptor de LH/hCG son responsables del PHM secundario a agenesia o hipoplasia de células de Leydig (105-114). El tipo y la localización de tales mutaciones se resume en la Tabla 1. Los estudios de expresión por transfección de estos receptores mutantes en células 293 de riñón, las cuales no expresan receptor de LH, demostraron la incapacidad de los mismos para activar la producción del AMPc en presencia de la hormona agonista (LH/hCG), impidiéndose de manera secundaria, la síntesis de T (105-114).

Tabla 1

Mutaciones inactivantes descritas en el gen del receptor de LH.

Exón	Nucleótido mutado	Cambio de aminoácido	Referencia
11	C1660T	Arg554término	107
11	C1847A	Ser616Tir	107,108
11	C1635A	Cis545término	106
11	G1787C	Ala593pro	105,109
11	G1060A	Glu354Lys	112
11	T1874A	Iso625Lys	113
11	Del. 1822-1827	Del. Leu608-Val609	114
8	Delección completa del exón		108
10	A872G	Asn291Ser	108
5	C393T	Cys131Arg	110
1	Inserción de 33 pb	Inserción de 11 aa	111

Debido al escaso número de pacientes estudiados, ha sido difícil establecer una correlación definitiva entre el fenotipo de los pacientes y la alteración específica a nivel molecular; sin embargo, recientemente se ha identificado que la severidad del cuadro clínico tiene una relación inversa con la actividad residual del receptor (113).

Hay que señalar que ciertas mutaciones descritas en el exón 11 de este gen han sido correlacionadas con la presencia de una enfermedad conocida como pubertad precoz familiar limitada a varones o "testotoxicosis" (115-119). En esta entidad autosómica dominante, los individuos afectados presentan signos de desarrollo puberal entre los 1 y los 4 años de edad, como son virilización acelerada, crecimiento rápido y cierre prematuro de las epífisis, lo que conlleva a talla baja en la edad adulta. Estos pacientes presentan niveles disminuidos de LH, ausencia del patrón pulsátil de secreción puberal de LH, T sérica elevada y respuesta de tipo prepuberal a la administración de GnRH, hallazgos que sugieren una estimulación independiente de gonadotropinas en la síntesis de T (120). La expresión *in vitro* de receptores de LH/hCG mutantes provenientes de individuos con testotoxicosis, ha demostrado que tales mutaciones inducen una activación constitutiva en la producción de AMPc en ausencia de la hormona agonista (LH/hCG), lo que finalmente induce un aumento en los niveles séricos de T y el desarrollo de pubertad precoz (116-119).

OBJETIVOS

Caracterizar la mutación del gen del receptor de LH/hCG en tres hermanas con diagnóstico comprobado de pseudohermafroditismo masculino por hipoplasia de las células de Leydig.

Identificar, mediante el estudio molecular, el patrón de segregación familiar del gen mutado y detectar a los individuos portadores (heterocigotos).

Correlacionar el defecto molecular existente con el fenotipo de los sujetos afectados.

SUJETOS Y METODOS

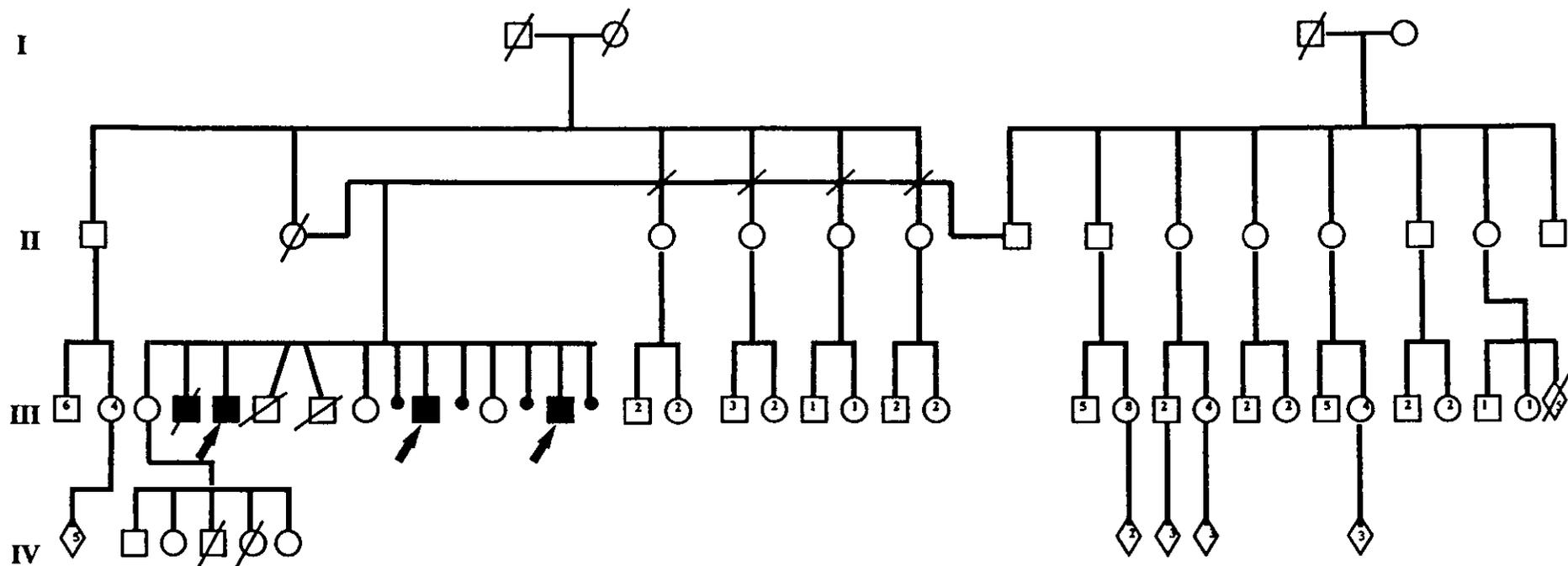
Sujetos:

Se estudió a una familia originaria del Estado de México con pseudohermafroditismo masculino en la que en 1981 se demostró mediante estudios histológicos, endócrinológicos y bioquímicos el diagnóstico de hipoplasia de las células de Leydig (96). En esta familia, en la cual no se documentó consanguinidad, se estudiaron tres pacientes afectadas con el síndrome, una hermana sana y el padre (heterocigoto obligado) (Figura 2).

Para la realización del estudio, se obtuvo aprobación tanto del comité de estudios en humanos como de los sujetos participantes mediante carta de consentimiento informado.

Paciente 1: Esta paciente fue evaluada a los 18 años de edad y a la exploración física presentó talla y segmentos corporales normales, fenotipo femenino, ausencia de desarrollo mamario, ausencia de vello púbico y axilar y genitales externos de aspecto infantil. El cariotipo en sangre periférica fue 46,XY y los niveles séricos de gonadotropinas se encontraron elevados. La laparotomía reveló la presencia de gónadas intraabdominales y ausencia de derivados Mülllerianos y Wolffianos con excepción de una porción rudimentaria de la trompa uterina izquierda. El estudio histológico de la biopsia gonadal demostró tejido testicular con túbulos seminíferos de tipo infantil con células de Sertoli. En el espacio intersticial se

Figura 2



Arbol genealógico de la familia con pseudohermafroditismo masculino secundario a hipoplasia de las células de Leydig

observaron fibroblastos y células mesenquimatosas que se interpretaron como precursores de células de Leydig. Las determinaciones hormonales realizadas en esta paciente se muestran en la tabla 2.

Paciente 2: Sujeto de 25 años de edad con fenotipo femenino y ausencia de desarrollo sexual secundario. Esta paciente había recibido terapia con estrógenos por un tiempo por lo que presentaba cierto grado de crecimiento mamario. El cariotipo en sangre periférica fue 46,XY. Los hallazgos histológicos en la biopsia de gónadas de esta paciente fueron semejantes a los observados en la paciente 1. No se identificaron cambios en la morfología de las células intersticiales después de una prueba de estimulación con 5000 unidades IM de hCG diarias por 5 días. Las concentraciones hormonales de esta paciente se muestran en la tabla 2.

Paciente 3: Paciente fenotípicamente femenina, evaluada a los 8 años de edad, presentó una masa inguinal izquierda y cariotipo 46,XY en sangre periférica.

Tabla 2

NIVELES SERICOS* DE TESTOSTERONA (T), 17-OH PROGESTERONA (17-OHP4) Y ANDROSTENEDIONA (A) BASALES Y DURANTE UNA PRUEBA DE ESTIMULACION CON 5000 UI DIARIAS DE hCG POR 5 DIAS

Paciente		Basal	día 1	día 2	día 3	día 4	día 5
1	T	0.08	0.14	0.11	0.11	0.14	0.14
	17-OHP4	0.25	0.25	0.18	0.25	0.30	0.27
	A	0.22	0.22	0.31	0.25	0.28	0.23
2	T	0.04	-	0.03	0.03	0.09	0.07
	17-OHP4	0.21	0.21	0.20	0.24	0.27	0.31
	A	0.32	0.28	0.30	0.30	0.27	0.32

*Resultados expresados en ng/ml.

MÉTODOS

Extracción de DNA Genómico

El DNA genómico de los 5 sujetos de la familia, así como el de 10 controles sanos no relacionados se obtuvo mediante una técnica previamente descrita (121,122) con algunas modificaciones (123).

Se extrajeron 3 ml de sangre a cada sujeto, colocándose en tubos Vacutainer que contenían 0.05 ml de Na₂EDTA como anticoagulante. Posteriormente y con el fin de lisar los eritrocitos, la sangre se colocó en un tubo cónico y se mezcló con un volumen igual de un amortiguador que contenía tris-HCl/tritón X-100/sacarosa (TTS). La mezcla anterior fue transferida a microtubos de 1.5 ml centrifugándose a 9,221 g durante 1.5 min, a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y el botón de leucocitos fue resuspendido en 1 ml de TTS, volviéndose a centrifugar a 9,221 g durante 1.5 min a temperatura ambiente. Este último paso fue repetido varias veces hasta obtenerse un botón de leucocitos libre de eritrocitos. El paquete de leucocitos se resuspendió en 570 µl de NaCl 50 mM, agregándose 50 µl de SDS al 10% para lisar las membranas de los leucocitos. La mezcla se agitó durante varios minutos. Con el fin de precipitar las proteínas, se adicionaron 200 µl de NaCl 5M, se agitó y se dejó en reposo durante 5 minutos. Posteriormente, el botón de leucocitos fue centrifugado a 9,221 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo estéril y se adicionaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto (-20°C) para precipitar el DNA. El DNA

precipitado se recolectó con una pipeta Pasteur estéril de punta curva y se lavó con etanol frío al 70%. Por último, la muestra se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en un volumen entre 200 y 400 μl de agua bidestilada estéril. El DNA se conservó a -20°C para su análisis posterior.

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

$[\text{DNA}], (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{260}) (\text{dilución}^{-1}) (0.05\mu\text{g}/\mu\text{l})$, en donde $0.05\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de DNA = 1 D.O₂₆₀

La relación 260/280 indicó la pureza del DNA obtenido. Se consideraron como óptimas las relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.0 unidades de D.O₂₆₀. 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% (4).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Por medio de la técnica de PCR se amplificaron los 11 exones del gen del receptor de LH. Los pares de oligonucleótidos utilizados, así como las condiciones de la reacción se muestran en las tablas 3A y 3B. El nombre, dirección y posición relativa de estos oligonucleótidos se esquematiza en la figura 3. Todos los oligonucleótidos fueron adquiridos en una casa comercial (Accesolab, México) y llevados a una concentración final de 100 μM .

TABLA 3A

Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR y secuenciación directa del gen del receptor de LH.

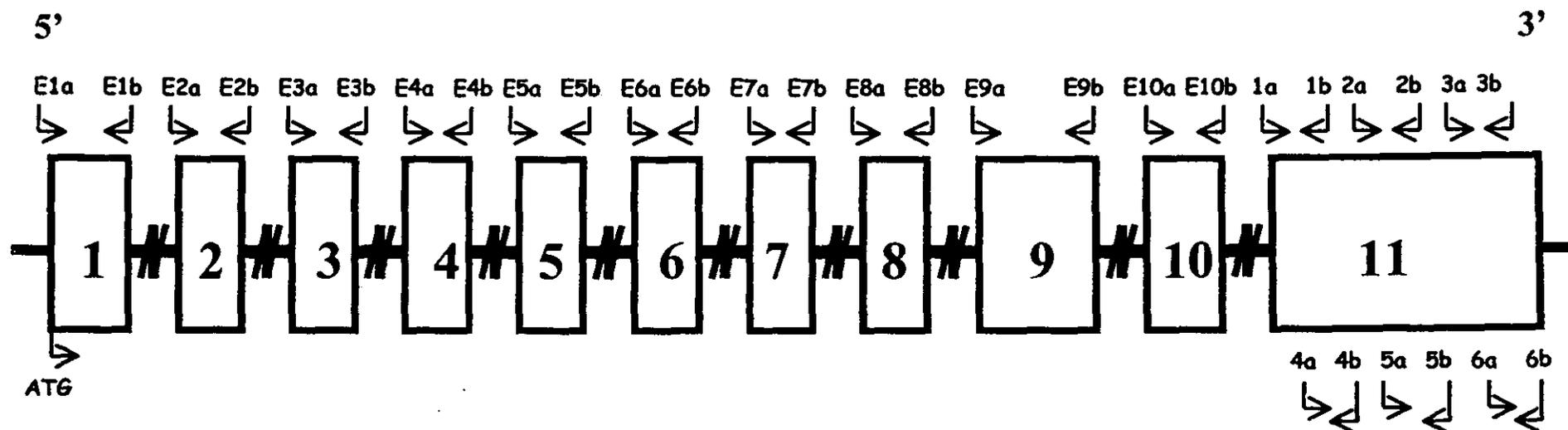
Exón	Oligonucleótidos 5' - 3'	producto amplificado	Temperatura y tiempo de alineamiento
11	1a CGATTTACCTGCATGGC 1b CCCGACGTTTACAGCAGCC	211 pb	58°C (2 min)
	2a TATCCCATCAATTCTTGTGCC 2b GGATTGAGAAGGCTTATTTGATCC	194 pb	58 °C (2 min)
	3a CACTGCTGGCTTTTTCTACTGTATT 3b TGAAGGCAGCTGAGATGGCAAAAA	463 pb	55 °C (2 min)
	4A CCCTTACCTCAAGCCAATAA 4b CATGTTTCCCATGATGGCTA	218 pb	54 °C (1 min)
	5a TATGAATATGGTTTCTGCTTACC 5b GTGTAGACAGAAAGTTCCTTG	376 pb	50 °C (1 min)
	6a CCAACTCTAAAGTTTTACTGGT 6b GTTAAAATTACTGGTACAGGTA	371 pb	54 °C (1 min)
10	E10a ACAGTCAGGTTTAGCCTGAA E10b CTTCTGAGTTTCCCTGATG	174 pb	50 °C (30 seg)
9	E9a CCTGGGCGGCGGAGCAA E9b TCTGCCACAGCTTGGGTAGG	316 pb	58 °C (30 seg)
8	E8a AACTCCACTAAGGGCAATAT E8b ACACCCTAAGCAGTCCTGT	164 pb	56 °C (30 seg)

Tabla 3B

7	E7a ATGTGTTTCCAAACTGTTTCT E7b TTCATTTTTATTCCCTGAGCTG	174 pb	50 °C (30 seg)
6	E6a GCATAACAGTTTCCTATTTGC E6b TGTATGGCAGAACACAAATCT	178 pb	55 °C (30 seg)
5	E5a ATGCCTTTGTA CTCTCTTTT E5b TAGGAAACTGTTATGCATAG	206 pb	56 °C (30 seg)
4	E4a CACACATTTCAAACAATACAC E4b TTTGATTTTCATCAGATGCC	200 pb	48 °C (1 min)
3	E3a ATTATCATGCAGACACGGTCA E3b TACCAAGTGGGCTCCAGCCA	211 pb	57 °C (30 seg)
2	E2a TTGGATTTCTTTTTTCTTTTTTCT E2b GTCTTTTGATATGCAGTAACT	126 pb	50 °C (1 min)
1	E1a CACTCAGAGGCCGTCCAAG E1b GGAGGGAAGGTGGCATAGAG	291 pb	60 °C (30 seg)

Atger y Cols. (80).

Figura 3



Organización exón/intrón del gen del receptor de LH. Los exones están representados por cuadros del 1 al 11. Los intrones están representados por líneas delgadas interrumpidas. Se señala la posición del codón de inicio (ATG). La posición, dirección y nombre de los oligonucleótidos usados para la amplificación del gen están indicados en cada exón.

En todos los casos se preparó una reacción estándar de 50 μ l de acuerdo a la técnica descrita por Sambrook y cols. (124). Esta reacción contenía entre 0.5 y 1.0 μ g de DNA, amortiguador de amplificación 10 X (Tris-HCl/KCl/Mg₂Cl) a una concentración final de 1X, mezcla de los 4 desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) a una concentración final de 20 μ M, los iniciadores a concentraciones finales específicas, 2 U de Taq polimerasa (Perkin-Elmer Corp, Branchburg New Jersey, USA) y ddH₂O estéril. La mezcla de reacción se cubrió con 100 μ l de aceite mineral. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en un equipo Gene Amp PCR System 9700 de Perkin Elmer. Para la amplificación del exón 1 se agregó a la mezcla de reacción DMSO al 5%, debido a la alta proporción de G y C presente en este exón.

Los productos de cada reacción de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, teñidos con bromuro de etidio al 0.0002%. En todos los casos, se incluyó un marcador de peso molecular, una muestra de un sujeto sano como control positivo y una reacción a la cual no se le agregó DNA, como control negativo.

Purificación de los Productos de PCR

La purificación de los productos de PCR a partir del gel de agarosa se realizó mediante el kit GENECLEAN II (BIO-101, Vista CA, USA). Se cortó la banda del gel con el producto de amplificación, se pesó y se disolvió en una solución de TBE modificado y yoduro de

sodio a 55°C. Posteriormente, se adicionaron perlas de vidrio (5 µl de Glassmilk), se lavó en 3 ocasiones con 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 agua bidestilada estéril.

Secuenciación

La secuenciación de los 11 exones del gen del receptor de LH se realizó con un estuche para secuencia de DNA [Dye Terminator Cycle Sequencing Core Kit (Perkin-Elmer Perkin Elmer Corp, Branchburg New Jersey, USA)]. El procedimiento seguido se basó en el método descrito por Sanger y cols. (125) con algunas modificaciones. En tubos de microcentrífuga de 0.5 ml se llevó a cabo la mezcla de la reacción con: amortiguador de secuencia 5X, mezcla de dNTP's, oligonucleótido a una concentración definida (5' o 3'), terminadores coloridos A, C, G, T y AmpliTaq DNA Polimerasa FS (Perkin Elmer Corp, Branchburg New Jersey, USA). A esta reacción se le añadió el DNA genómico (300 nanogramos del templado/reacción) y agua bidestilada para un volumen final de 20 µl. La PCR de cada una de las reacciones de secuencia fue realizada con las temperaturas de desnaturalización, reasociación y extensión previamente estandarizadas para cada fragmento. Al finalizar la PCR, se procedió a la purificación de los productos mediante la precipitación con 50 µl de etanol al 95% y 2 µl de acetato de sodio 3 M. Las muestras fueron resuspendidas en 4 µl de amortiguador de carga (formamida desionizada y EDTA, que contiene 50 mg/ml de azul dextrán en una proporción 5:1 de formamida y EDTA/azul

dextrán). Las muestras fueron calentadas a temperatura de ebullición y colocadas en hielo. El DNA fue secuenciado en un gel de poliacrilamida al 4.75% (50 ml) que contenía acrilamida al 40%, urea 25 g, bisacrilamida:acrilamida (18:2), 5 ml de TBE 10X, 16.87 ml ddH₂O, 250 μ l NH₄SO₄ al 10% y 28.2 μ l de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina. Las muestras (4 μ l/carril) fueron analizadas en un secuenciador automático Applied Biosystem 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City CA, USA).

RESULTADOS

El análisis del árbol genealógico de la familia investigada no reveló consanguinidad en por lo menos 2 generaciones anteriores a la de las enfermas. En todos los sujetos estudiados la concentración y la calidad del DNA obtenido fueron satisfactorias, como puede observarse en los resultados del análisis espectrofotométrico y electroforético mostrados en la Tabla 4.

En los 5 sujetos de la familia en estudio se observó amplificación de los 11 exones del gen del receptor de LH. En todos los casos, el tamaño de los productos obtenidos coincidió con lo esperado al compararlos con los marcadores de peso molecular. Estos hallazgos descartaron la presencia de deleciones parciales o totales en la secuencia codificante del gen. En los 10 sujetos controles, la amplificación de los 11 exones también fue normal. Los productos de amplificación se muestran en las figuras 4A-H y 5A-H. La purificación de cada uno de estos productos de PCR fue adecuada obteniéndose en todos los casos templados con concentraciones de entre 75 y 100 nanogramos de DNA por μl .

Tabla 4

Sujeto	260 nm	280 nm	260/280 nm	DNA $\mu\text{g/ml}$	Electroforésis
Paciente 1	0.4573	0.1993	1.8830	1.188	No degradado
Paciente 2	0.8758	0.7269	1.8001	2.189	No degradado
Paciente 3	0.7686	0.4015	1.9144	1.921	No degradado
Hermana sana	0.4001	0.1083	2.000	1.100	No degradado
Padre	0.9689	0.8304	1.9118	2.422	No degradado
Controles (n=10)	0.3904-0.9877	0.1004-0.9504	1.8-2.0	1.00-2.55	No degradado

Análisis espectrofotométrico y electroforético del DNA genómico de los pacientes y de los controles sanos

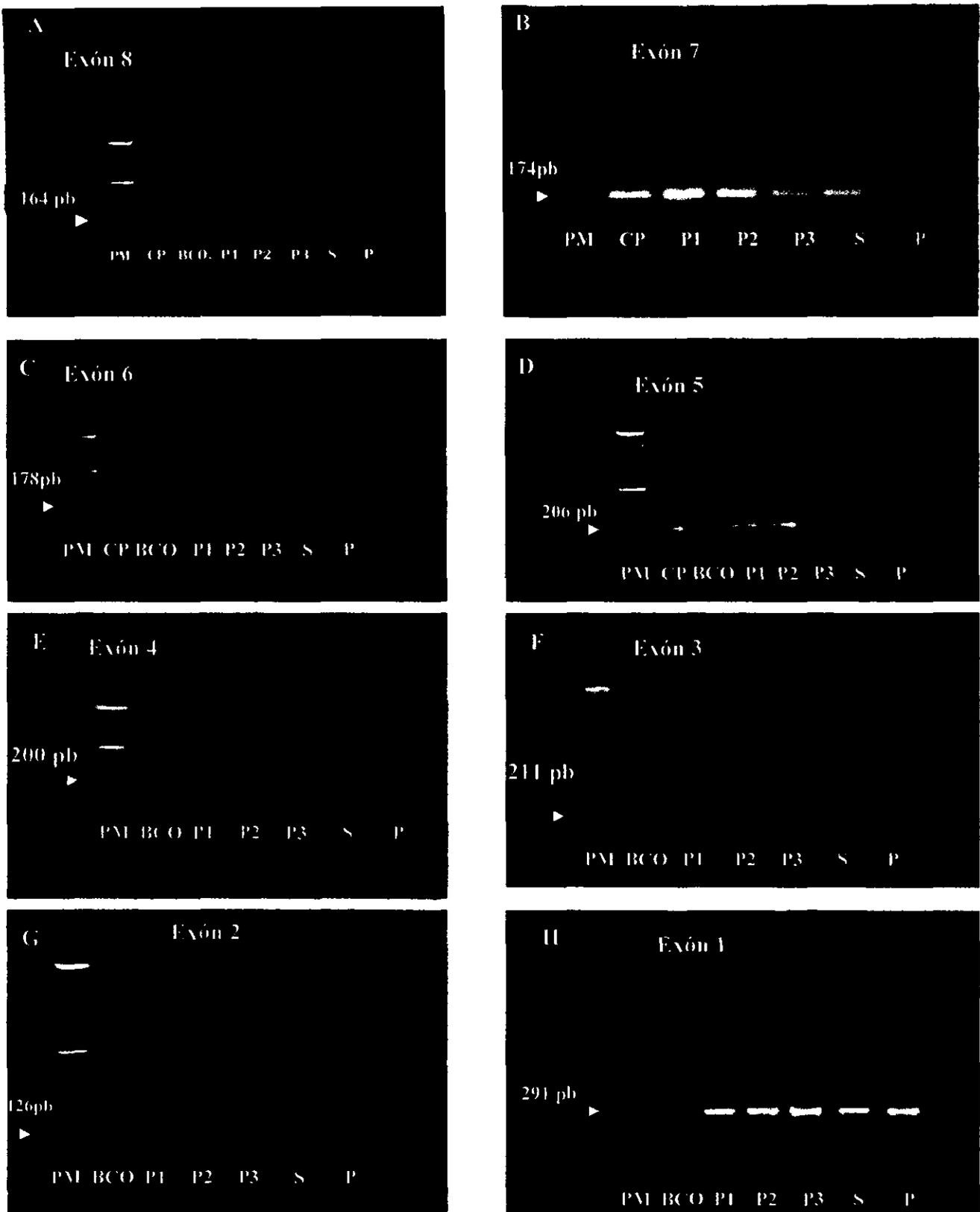


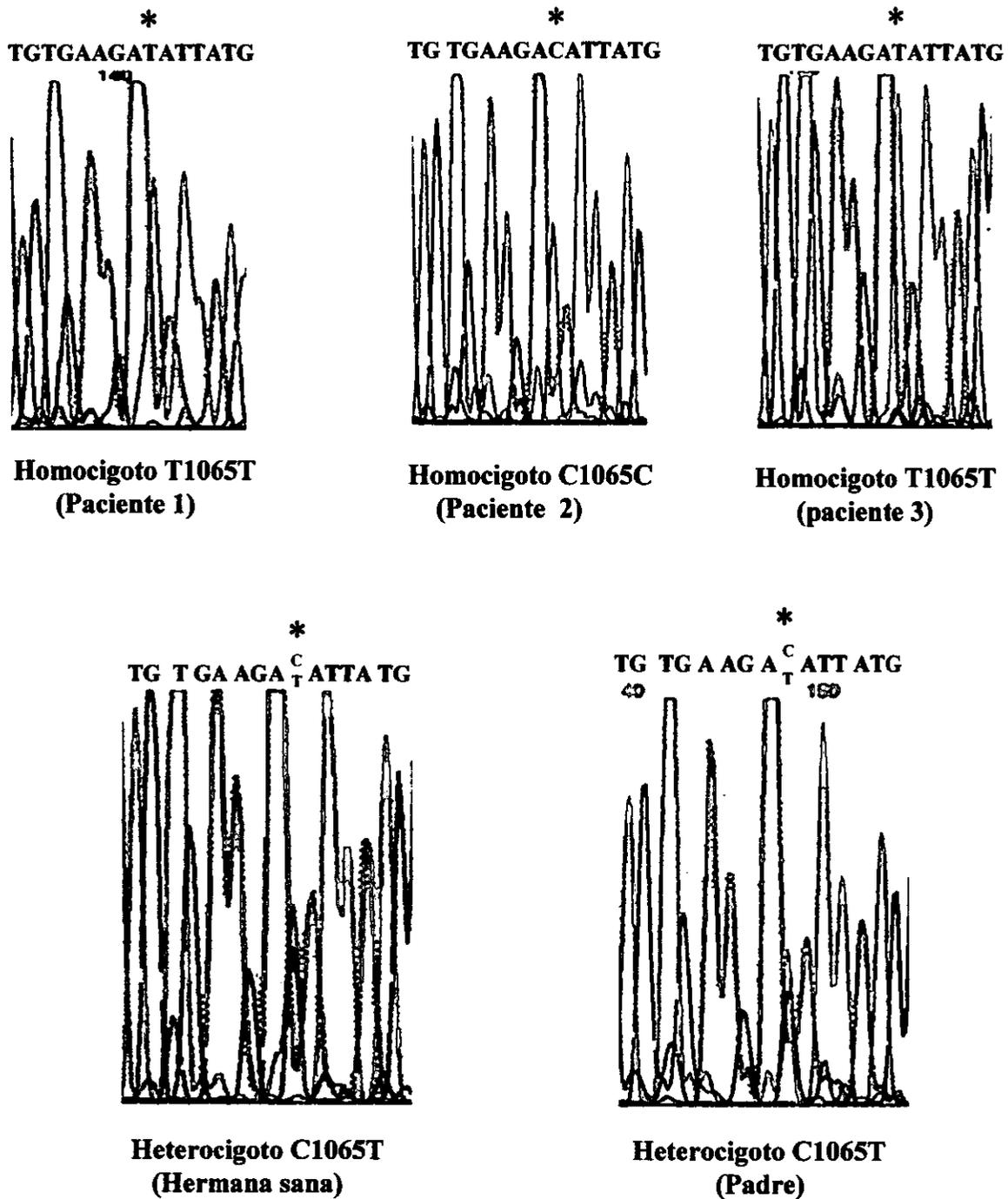
Figura 5A-H

En el fragmento del exón 11 amplificado con los oligonucleótidos 4a y 4b se detectó una transición homocigota de citosina a timina (C→T) en las pacientes afectadas #1 y #3. Este cambio, localizado en el nucleótido 1065, modifica el codón GAC a GAT; sin embargo, el aminoácido codificado en posición 355 es mismo (ácido aspártico), correspondiendo este cambio a una mutación silenciosa o polimorfismo. En la paciente #2 se identificó homocigosidad para GAC en esta posición, mientras que el padre y la hermana sana resultaron heterocigotos GAC/GAT para tal cambio (Figura 6). Cuatro de los individuos controles resultaron heterocigotos GAC/GAT y 6 fueron homocigotos GAC/GAC. Este cambio puntual fue confirmado al secuenciar en 3 ocasiones (en ambos sentidos) cada muestra.

La secuenciación del exón 1 reveló que los 5 miembros de la familia presentaban la variante α LQ del receptor de LH. Los 10 sujetos controles analizados también presentaron la variante α LQ del gen.

El análisis de secuencia del resto de los exones del gen del receptor de LH no demostró alteración alguna al ser comparada con la secuencia normal.

Figura 6



Secuencia parcial del exón 11 del gen del receptor de LH. Las pacientes 1 y 3 son homocigotas T/T en el nucleótido 1065 (*), mientras que la paciente 2 es homocigota C/C en esa posición. La hermana sana y el padre son heterocigotos C/T.

DISCUSION

En el presente trabajo se realizó el estudio molecular del gen del receptor de LH en 3 hermanas en quienes se había diagnosticado pseudohermafroditismo masculino secundario a hipoplasia de las células de Leydig (96). El estudio incluyó además una hermana sana y a su padre.

La hipoplasia de las células de Leydig es un padecimiento con patrón hereditario autosómico recesivo; en algunos casos familiares descritos previamente se ha documentado consanguinidad. En esta familia no se logró identificar consanguinidad en por lo menos 3 generaciones anteriores a la de los pacientes.

La amplificación normal de los 11 exones en los sujetos afectados descartó la posibilidad de una delección total o parcial del gen como causa de la enfermedad en esta familia. Las delecciones totales o parciales del gen del receptor de LH son extremadamente raras en pacientes con hipoplasia de células de Leydig ya que solo se ha descrito una delección total del exón 8 (108) y una microdelección de 6 pares de bases en el exón 11 (114). Asimismo, la amplificación de los productos con los pesos moleculares esperados, descartó en esta familia la presencia de inserciones significativas como la descrita por Wu en un paciente con la enfermedad (111).

La secuenciación de los 11 exones del gen del receptor de LH permitió reconocer la presencia de un cambio de base en el exón 11 en 2 de las 3 pacientes estudiadas (afectadas #1 y #3). Este cambio consistió en la transición homocigota de citosina a timina en la

posición 1065, lo cual lleva a una substitución de un codón GAC a uno GAT (GAT/GAT). Sin embargo, ambos codones codifican para el mismo aminoácido, ácido aspártico en el residuo 355, por lo que este cambio corresponde a una mutación silenciosa o polimorfismo génico. En la tercera paciente (paciente #2) se identificó homocigosidad para el codón normal (GAC/GAC) mientras que el padre y la hermana sana resultaron heterocigotos GAC/GAT. Este cambio resultó en un polimorfismo informativo, ya que al presentar 2 pacientes homocigosidad para GAT (GAT/GAT) en el codón 355 y la tercera paciente homocigosidad para GAC (GAC/GAC), se excluye que la enfermedad en esta familia se encuentre ligada al gen del receptor de LH. El hecho de que una de las pacientes presente un genotipo diferente (GAC/GAC) al de las otras dos hermanas afectadas (GAT/GAT), implica que los dos alelos del gen que recibió de sus padres son diferentes a aquellos que recibieron sus otras dos hermanas afectadas. Con base en estos hallazgos, se puede excluir de manera definitiva una mutación del gen del receptor de LH como causante de la enfermedad en estas pacientes.

Recientemente se han identificado diversos polimorfismos en la secuencia codificante del gen del receptor de LH (126). Aunque tales polimorfismos no poseen relevancia en la función del receptor, son importantes para la identificación de la segregación familiar de los alelos del gen. El polimorfismo C1065T identificado en esta familia mexicana, ya había sido descrito previamente en poblaciones caucásicas y asiáticas (126). Por otra parte, el polimorfismo G935A

observado en una familia con hipoplasia de células de Leydig fue informativo para identificar la segregación de alelos en un caso de heterocigosidad compuesta (111). De esta manera, los polimorfismos informativos pueden utilizarse como una herramienta importante para identificar la segregación familiar del gen del receptor de LH y como ocurrió en nuestro estudio, excluir el ligamiento del gen a la enfermedad. Esta es la primera ocasión en que la presencia de un polimorfismo informativo excluye una mutación del gen del receptor de LH como responsable de la presencia de la hipoplasia de células de Leydig. Hasta la fecha se han descrito diversos casos de pseudohermafroditismo masculino secundario a alteraciones en la diferenciación de las células de Leydig (agenesia o hipoplasia), en los cuales se ha identificado mutaciones inactivantes en el gen del receptor de LH (105-114). Se ha comprobado que tales mutaciones provocan una alteración en la transducción de la señal de la LH en la célula de Leydig, lo que da como resultado una disminución de los niveles intracelulares de AMPc y consecuentemente inhibición en la síntesis de testosterona. De manera alterna, la mutación puede ocasionar una expresión disminuida del receptor en la superficie celular con disminución en la síntesis andrónica (111,114). La ausencia de mutación en el gen del receptor de LH en 3 hermanas con hipoplasia de las células de Leydig estudiadas en el presente trabajo, indica que este padecimiento es genéticamente heterogéneo. Recientemente se ha reportado que en algunas familias con esta enfermedad estudiadas por Chan y cols. (127) no se ha logrado

identificar anomalías en el gen del receptor de LH, lo que sugiere que las mutaciones responsables podrían estar localizadas en regiones no codificantes del gen (promotores o intrones) o que mutaciones en otros genes pueden ocasionar un fenotipo semejante. En nuestro estudio sin embargo, dada la combinación de alelos del gen del receptor de LH observadas en las 3 pacientes, podemos excluir la presencia de alteraciones moleculares en regiones no codificantes de este gen. La hipoplasia de las células de Leydig ha sido observada también en varios sujetos con cariotipo 47,XXY (síndrome de Klinefelter) (128,129) y en un caso de anomalía estructural de cromosoma Y (130), lo que apoya el concepto de heterogeneidad genética en la enfermedad.

Por otra parte, en los 5 sujetos de la familia y en los 10 controles se identificó la variante α LQ del receptor de LH. Con anterioridad esta variedad alélica, la cual carece de la inserción de 2 aminoácidos en el extremo amino de la proteína, fue identificada en 100% de los sujetos de una muestra de población japonesa (n=110) (90). Aunque nuestra muestra es pequeña, la similitud observada en la variante del receptor entre la población japonesa y la población mexicana puede ser debida a fenómenos migratorios.

El análisis de secuencia del resto de los exones del gen en los 5 miembros de la familia estudiada en este trabajo, no demostró ninguna anomalía lo que apoya, en esta familia en particular, la responsabilidad de otro gen en la etiología del padecimiento.

Recientemente, se identificó que la proteína β de unión al reforzador CCAAT (C/EBP β), la cual pertenece a la familia de factores de transcripción de regiones básicas/cierres de leucina, es indispensable para la diferenciación y función de la célula de Leydig. Se ha demostrado que las ratonas transgénicas deficientes para C/EBP β presentan infertilidad secundaria a alteraciones de la función ovárica; este fenotipo ha sido atribuido a un defecto en la señal de LH en las células de la granulosa ovárica, lo que conduce a una regulación anormal del gen de la aromatasa P450 (131). Estas observaciones indican la existencia de otros componentes importantes en la vía de señalización dependiente de LH, la cual conduce a la diferenciación y maduración normal de las células de Leydig. Las mutaciones en algunos de estos componentes podrían ocasionar también un fenotipo semejante al observado en los casos de mutación del receptor de LH.

En conclusión, nuestros datos aportan evidencia suficiente para excluir un defecto del gen del receptor de LH en esta familia con hipoplasia de células de Leydig y demuestran por primera vez la heterogeneidad genética del padecimiento. Asimismo, podemos postular que la identificación de otros genes necesarios para la diferenciación y maduración de esta estirpe celular permitirá demostrar el defecto genético preciso que originó la enfermedad en esta familia y probablemente en otras en las cuales no se ha podido demostrar mutaciones en el gen del receptor de LH.

BIBLIOGRAFIA

1. Sinclair AH. Human sex determination. J Exp Zool. 1998; 281:501-505.
2. Wachtel SS, Tiersch TR. The search for the male-determining gene. En: Molecular Genetics of Sex Determination. Stephen S Wachtel (Ed). Academic Press, 1994:1-22.
3. Jacobs P, Ross A. Structural abnormalities of the Y chromosome in man. Nature (London). 1966;210:352-355.
4. Muller U. The human Y chromosome. En: Molecular Genetics of Sex Determination. Stephen S Wachtel (Ed). Academic Press, 1994:205-224.
5. Bogan JS, Page DC. Ovary? Testis?- A mammalian dilemma. Cell. 1994;76:603-607.
6. Kofman-Alfaro S, Merchant-Larios H, Pérez-Palacios G. Diferenciación sexual. I. Bases biológicas del dimorfismo sexual. Rev Invest Clin (Mex). 1982;34:349-359.

7. Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell-Badge R, Capel B. Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol*. 1997;7:958-968.
8. Sinclair A, Berta P, Palmer M, Hawkins J, Griffiths B, Smith M, Foster J, Frischauf A, Lovell-Badge R, Goodfellow P. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 1990;346:240-244.
9. López M, Torres L, Méndez JP, Cervantes A, Alfaro G, Pérez-Palacios G, Erickson R, Kofman-Alfaro S. SRY alone can induce normal male sexual differentiation. *Am J Med Genet*. 1995;55:356-358.
10. Wachtell S, Ohno S, Koo G, Boyse E. Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature*. 1975;257:235-236.
11. Zenzes M, Müller U, Aschmoneit I, Wolf U. Studies on H-Y antigen in different cell fractions of the testis during pubescence. Immature germ cells are antigen H-Y negative. *Hum Genet*. 1978;45:297-303.

12. Singh L, Purdom IF, Jones KW. Conserved sex-chromosome-associated nucleotide sequences in eukaryotes. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. 1981;45:805-814.
13. Page D, Mosher E, Simpson E, Fisher E, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, de la Chapelle A, Brown L. The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. Cell. 1987;51:1091-1104.
14. Su H, Lau Y. Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. Am J Hum Genet. 1993;52:24-38.
15. Dubin R, Ostrer H. Sry is a transcriptional activator. Mol Endocrinol. 1994;8:1182-1193.
16. Jantzen HM, Admon A, Bell SP, Tjian R. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. Nature. 1990;344:830-836.
17. Berta P, Hawkins J, Sinclair A, Taylor A, Griffiths B, Goodfellow P, Fellous M. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. Nature. 1990;348:448-450.

18. Jager R, Anvret M, Hall K, Scherer G. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature*. 1990;348:452-454.
19. Hawkins J, Taylor A, Goodfellow P, Migeon C, Smith K, Berkovitz G. Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *Am J Hum Genet*. 1992;51:979-984.
20. Affara N, Chalmers I, Ferguson-Smith M. Analysis of the SRY gene in 22 sex-reversed XY females identifies four new point mutations in the conserved DNA binding domain. *Hum Mol Genet*. 1993;2:785-789.
21. Peters R, King ChY, Ukiyama E, Falsafi S, Donahoe P, Weiss M. An SRY mutation causing human sex reversal resolves a general mechanism of structure-specific DNA recognition: application to the four-way DNA junction. *Biochemistry*. 1995;34:4569-4576.
22. Schmitt-Ney M, Thiele H, Kaltwaber P, Bardoni B, Cisternino M, Scherer G. Two novel SRY missense mutations reducing DNA binding identified in XY females and their mosaic fathers. *Am J Hum Genet*. 1995;56:862-869.

23. Werner M, Huth J, Gronenborn A, Clore M. Molecular basis of human 46,XY sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex. *Cell*. 1995;81:705-714.
24. Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*. 1990;348:450-452.
25. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature*. 1991;351:117-121.
26. Foster J, Brennan F, Hampikian G, Goodfellow P, Sinclair A, Lovell-Badge R, Selwood L, Renfrec M, Cooper D, Graves JAM. Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY related sequences in marsupials. *Nature*. 1992;359:531-533.
27. López M, Torres L, Méndez JP, Cervantes A, Pérez-Palacios G, Erickson R, Alfaro G, Kofman-Alfaro S. Clinical traits and molecular findings in 46,XX males. *Clin Genet*. 1995;48:29-34.

28. Torres L, López M, Méndez JP, Canto P, Cervantes A, Alfaro G, Pérez-Palacios G, Erickson R, Kofman-Alfaro S. Molecular analysis in true hermaphrodites with different karyotypes and similar phenotypes. *Am J Med Genet.* 1996;63:348-355.
29. Jiménez R, Sánchez A, Burgos M, Díaz de la Guardia R. Puzzling out the genetics of mammalian sex determination. *Trends Genet.* 1996;12:164-166.
30. Pelletier J, Bruening W, Kashtan C, Mauer S, Manivel J, Strieger J, Houghton D, Junien C, Habib R, Fouser L, Fine R, Silverman B, Haber D, Housman D. Germline mutations in the Wilm's tumour suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell.* 1991;67:437-447.
31. Bennett CP, Docherty Z, Robb SA, Ramani P, Hawkins J, Grant D. Deletion 9p and sex reversal. *J Med Genet.* 1993;30:518-520.
32. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley K, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McGabe ERB, Fraccaro M, Zuffardi O, Camerino G. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature.* 1994;7:497-501.

33. Foster J, Dominguez-Steglich M, Guioli S, Kwok Ch, Weller P, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young I, Goodfellow P, Brook J, Schafer A. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*. 1994;372:525-530.
34. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY related gene SOX9. *Cell*. 1994;49:1111-1120.
35. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*. 1994;77:481-490
36. Lim HN, Freestone SH, Romero D, Kwok C, Hughes IA, JR Hawkins. Candidate genes in complete and partial XY sex reversal: Mutation analysis of SRY, SRY-related genes and FTZ-F1. *Mol Cell Endocrinol*. 1998;140:51-58.
37. Swain A, Narváez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R. Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature*. 1998;391:761-767.

38. Jost A. Problems of fetal endocrinology. The gonadal and hypophyseal hormones. *Rec Progr Horm Res.* 1953;8:379-418.
39. Jost A, Vigier B, Prepin J, Perchellet J. Studies on sex differentiation in mammals. *Rec Progr Horm Res.* 1973;29:1-41.
40. Grumbach M, Conte F. Disorders of sex differentiation. En: Wilson J, Foster D. eds. *Williams Textbook of Endocrinology*, 8^a. ed. Philadelphia. Saunders. 1992:853-951.
41. Jirásek J. The relationship between the structure of the testis and differentiation of the external genitalia and phenotype in man. En: Wolstenholme G, O'Connor M. eds. *Endocrinology of the Testis.* Boston. Little Brown & Co. 1967:3-30.
42. Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Müllerian-inhibiting substance function during sexual development. *Cell.* 1994;79:415-425.

43. Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, van der Schoot PJ, Hoogerbrugge JW, et al. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct. *Development* 1994;120:189-197.
44. Serra G, Pérez-Palacios G, Jaffe R. De novo testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1979;10:128-132.
45. Savard K. Biosynthesis of androgen from progesterone by human testicular tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 1956;16:1629-1634.
46. Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr rev.* 1988;9:295-318.
47. Pérez-Palacios G, Pérez A. Integración endócrina de la unidad fetoplacentaria y patología del testículo fetal. En: Malacara J y cols. eds. 4^a. ed. *Fundamentos de Endocrinología Clínica.* México. La prensa Médica Mexicana. 1990:455-470.

48. Wilson J. Metabolism of testicular androgens. En: Greep R, Astwood E. eds. Handbook of Physiology. Endocrinology of the Male Reproductive System. vol V. Washington. American Physiological Society. 1975;Sec 7:491-508.
49. Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Diaz-Sánchez V, Altamirano A, Pérez-Palacios G. Self-priming effect of luteinizing hormone human chorionic gonadotropin in upon the biphasic testicular response to exogenous hCG. I. Serum testosterone profile. J Clin Endocrinol Metab. 1985;61:926-932.
50. Imperato-McGinley J, Gautier T. Male pseudohermaphroditism due to inherited 5 α -reductase deficiency in man. En: Martinez-Mora. ed. Intersexual States: disorders of sex differentiation. Barcelona. Doyma. 1994:231-240.
51. Méndez JP, Ulloa-Aguirre A, Imperato McGinley J, Brugmann A, Delfín M, Chávez B, Shackleton C, Kofman-Alfaro S, Pérez-Palacios G. Male pseudohermaphroditism due to primary 5 α -reductase deficiency: variation in gender identity reversal in seven mexican patients from five different pedigrees. J Endocrinol Invest. 1995;18:205-213.
52. Pardridge W. Serum bioavailability of sex steroid hormones. J Clin Endocrinol Metab. 1986;15:259-265.

53. Lasznitzki I, Franklin H, Wilson J. The mechanism of androgen uptake and concentration by rat ventral prostate in organ culture. *J Endocrinol.* 1974;60:81-90.
54. O'Malley B. The steroid receptor superfamily: more excitement predicted in the future. *Mol Endocrinol.* 1990;4:363-369.
55. Tsai M-J, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:451-486.
56. Wilbert D, Griffin J, Wilson J. Characterization of the cytosol androgen receptor of the human prostate. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983;56:113-120.
57. Lubahn D, Joseph D, Sullivan P, Willard H, French F, Wilson D. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science.* 1988;240:327-330.
58. Kupier GG, Faber PW, van Rooij HC, van der Korput JA, Ris-Stalpers C, Klaassen P, Trapman J, Brinkmann AO. Structural organization of the human androgen receptor gene. *J Mol Endocrinol.* 1989;2:1-4.

59. Zhou Z-X, Wong C-I, Sar M, Wilson EM. The androgen receptor: an overview. *Recent Prog Horm Res.* 1994;49:249-274.
60. Tylley WD, Marcelli M, Wilson JD. Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:327-331.
61. George F, Wilson J. Embriology of the genital tract. En: Walsh P, y cols. eds. *Campbell's Urology.* 6^a. ed. Philadelphia. Saunders. 1992:1496-1506.
62. Merchant-Larios H. Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. En: Van Blerkom J, Motta P. eds. *Ultrastructure of Reproduction.* Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers. 1984:19-30.
63. George F. Sexual differentiation. En: Griffin D, Ojeda S. eds. *Textbook of Endocrine Physiology.* 2^a. ed. USA. Oxford University Press. 1992:117-132.
64. Huhtaniemi I. Fetal testis-a very special endocrine organ. *Eur J Endocrinol.* 1994;130:25-31.

65. Everet JW, Sawyer CH, Markee JE. A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology*. 1949;44:234-238.
66. McCann SM, Taleisnik S, Friedman HM. LH releasing activity in hypothalamic extracts. *Soc Exp Biol Med Proc*. 1960;104:432-434.
67. Matsuo H, Baba Y, Mair RMV. Structure of the porcine LH and FSH releasing hormone. 1. The proposed aminoacid sequence. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971;43:1334-1339.
68. Schally A, Arimura A, Baba Y, et al. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971;43:393-399.
69. Marshall LA, Monroe SE, Jaffe RB. Physiologic and therapeutic aspects of GnRH and its analogs. En: Martin L, Ganong WF, (Eds). *Frontiers in Neuroendocrinology*. Raven Press. 1988:239-278.
70. Ulloa-Aguirre A, Midgley AR, Beitins EZ, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev*. 1995;16:765-787.

71. Weinstein RL, Kelch RP, Jenner AM. Secretion of unconjugated androgens and estrogens by the normal and abnormal human testis before and after hCG. J Clin Invest. 1974;53:1-5.
72. Huhtaniemi IT, Korenbrot CC, Jaffe RB. HCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. J Clin Endocrinol Metab. 1977;44:963-967.
73. Lago DA, Rolandi MT, Bortolussi M, Galli S. Direct binding of radioiodinated human chorionic gonadotropin to frozen sections of rat testis. J Reprod Fert. 1975;43:123-126.
74. Rebois, RF, Omedeo-Sale F, Brady, RO, Fishman PH. Covalent crosslinking of the human chorionic gonadotropin to its receptor in rat testes. Proc Natl Acad Sci USA. 1981;78:2086-2089.
75. Segaloff DL, Ascoli M. The lutropin/choriogonadotropin receptor....4 years later. Endocr Rev. 1993;14:324-347.
76. Mendelson C, Dufau ML, Catt KJ. Gonadotropin binding and stimulation of cyclic adenosine 3:5-monophosphate and testosterone production in isolated Leydig Cells. J Biol Chem. 1975;250:8818-8825.

77. Wang H, Segaloff DL, Ascoli M. Lutropin/choriogonadotropin down-regulates its receptor by both receptor-mediated endocytosis and cAMP-dependent reduction in receptor mRNA. *J Biol Chem.* 1991;266:780-785.
78. Koo YB, Ji I, Slaughter RG, Ji TH. Structure of the luteinizing hormone receptor gene and multiple exons of the coding sequence. *Endocrinology.* 1991;128:2297-2308.
79. Tsai-Morris CH, Buczko E, Wang W, Xie X-Z, Dufau ML. Structural organization of the rat luteinizing hormone (LH) receptor gene. *J Biol Chem.* 1991;266:11355-11359.
80. Atger M, Misrahi M, Sar S, Le Flem L, Dessen P, Milgrom E. Structure of the human luteinizing hormone-choriogonadotropin receptor gene: unusual promoter and 5' non-coding regions. *Mol Cell Endocrinol.* 1995;111:113-123.
81. Abramowitz J, Iyengar R, Birnbaumer L. Guanyl nucleotide regulation of hormonally-responsive adenylyl cyclases. *Mol Cell Endocrinol.* 1979;16:129-132.

82. Podesta EJ, Dufau ML, Solano AR. Hormonal activation of protein kinase in isolated Leydig cells: electrophoretic analysis of cyclic AMP receptors. *J Biol Chem.* 1978;253:8994-8997.
83. Catt KJ, Dufau ML. Basic concepts of mechanism of action of peptide hormones. *Biol Reprod.* 1976;14:1.
84. Harrison RW, Lippman SS. How steroid hormones work. *Hosp Pract.* 1989;9:63-76.
85. Molsberry RL, Cau BR, Mendelson CR. Human chorionic gonadotropins binding to human fetal testis. *J Clin Endoc Metab.* 1982;55:791-794.
86. Ascoli M. Internalization and degradation of receptor-bound human choriogonadotropin in Leydig tumor cells. Fate of the hormone subunits. *J Biol Chem.* 1982;257:13306-13311.
87. Rousseau MF, Misrahi M, Atger M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. Localization of the human luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) to chromosome 2p21. *Cytogenet Cell Genet.* 1990;54:77-79.

88. Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, Miyamoto K, Hasegawa Y, Ibuki Y, Igarashi M. Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;172:1049-1054.
89. Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC. Sequence alignment of the G-protein coupled receptors superfamily. *DNA Cell Biol.* 1992;11:1-20.
90. Rodien P, Cetani F, Contaghiola S, Tonacchera M, Duprez L, Minegishi T, Govaerts C, Vassart. Evidences for an allelic variant of the human LH/CG receptor rather than a gene duplication: functional comparison of wild-type and variant receptors. *J Clin Endocrinol. Metab.* 1998;83:4431-4434.
91. Grumbach MM, Conte FA. Disorders of sex differentiation. En: *Williams Textbook of Endocrinology.* JD Wilson, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, Eds. 9ª edición, 1998, pp:1303-1425.
92. MacLean HE, Warne GL, Zajac JD. Intersex disorders: shedding light on male sexual differentiation beyond SRY. *Clin Endocrinol.* 1997;46:101-108 .

93. Warne GL, Zajac JD. Disorders of sexual differentiation. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998;27:945-967.
94. Berthezene F, Forest MG, Grimaud JA, Claustraut B, Mornex R. Leydig-cell agenesis. A cause of male pseudohermaphroditism. *N Engl J Med.* 1976;295:969-972.
95. Brown DM, Markland C, Dehner LP. Leydig cell hypoplasia : A cause of male pseudohermaphroditism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1978;46:1-7.
96. Pérez-Palacios G, Scaglia HE, Kofman- Alfaro S, Saavedra D, Ochoa S, Larraza O, Pérez AE. Inherited male pseudohermaphroditism due to gonadotropin unresponsiveness. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1981;98:148-155.
97. Schwartz M, Imperato-McGinley J, Peterson RE, Cooper G, Morris PL, MacGillivray M, Hensle T. Male pseudohermaphroditism secondary to an abnormality in Leydig Cell differentiation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981;53:123-127.
98. Lee PA, Rock JA, Brown TR, Fichman KM, Migeon CJ, Jones Jr HW. Leydig cell hypofunction resulting in male pseudohermaphroditism. *Fertil Steril.* 1982;37:675-679.

99. Rogers RM, Garcia L, Van den Berg L, Petrik PKF, Snihurowych WM, Crockford PM. Leydig cell hypogenesis: a rare cause of male pseudohermaphroditism and a pathological model for the understanding of normal sexual differentiation. *J Urol*. 1982;128:1325-1329.
100. Eil C, Austin M, Sesterhenn I, Dunn JF, Cutler Jr GB, Johnsonbaugh RE. Leydig cell hypoplasia causing male pseudohermaphroditism: diagnosis 13 years after prepubertal castration. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984;58:441-448.
101. David R, Yoo DJ, Landin L, Lew L, Sklar C, Schinella R, Golimbu M. A syndrome of gonadotropin resistance possibly due to a luteinizing hormone receptor defect. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984;59:156-160.
102. Arnhold IJ, Mendonca BB, Bloise W. Male pseudohermaphroditism resulting from Leydig cell hypoplasia. *J Pediatr*. 1985;106:1057.
103. El-Awady MK, Temtamy SA, Salam MA, Gad YZ. Familial Leydig cell hypoplasia as a cause of male pseudohermaphroditism. *Hum Hered*. 1987;37:36-40.

104. Toledo SPA. Leydig cell hypoplasia leading to two different phenotypes: male pseudohermaphroditism and primary hypogonadism not associated with this. Clin Endocrinol. (Oxf) 1992;36:521-522.
105. Kremer H, Kraaij R, Toledo SPA, Post M, Fridman JB, Hayashida CY, Van Reen M, Milgrom E, Ropers HH, Mariman E, Themmen APN, Brunner HG. Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene. Nat Genet. 1995;9:160-164.
106. Laue L, Wu SM, Kudo M, Hsueh AJW, Cutler GB, Griffin JB, Wilson JD, Brain C, Berry AC, Grant DB, Chan WY. A nonsense mutation of the human luteinizing hormone receptor gene in Leydig cell hypoplasia. Hum Mol Genet. 1995;4:1429-1433.
107. Latronico AC, Anasti J, Arnhold IJP, Rapaport R, Mendonca BB, Bloise W, Castro M, Tsigos C, Chrousos GP. Testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. N Engl J Med. 1996;334:507-512.

108. Laue LL, Wu S-M, Kudo M, Bourdony CJ, Cutler GB, Hsueh JW, Chan W-Y. Compound heterozygous mutations of the luteinizing hormone receptor gene in Leydig cell hypoplasia. *Mol Endocrinol.* 1996;10:987-997.
109. Toledo SPA, Brunner HG, Kraaij R, Post M, Dahia PLM, Hayashida CY, Kremer H, Themmen APN. An inactivating mutation of the luteinizing hormone receptor causes amenorrhea in a 46,XX female. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:3850-3854.
110. Misrahi M, Meduri G, Pissard S, Bouvattier C, Beau I, Lossfelt H, Jolivet A, rappaport R, Milgrom E, Bougneres P. Comparison of immunocytochemical and molecular features with the phenotype in a case of incomplete male pseudohermaphroditism associated with a mutation of the luteinizing hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:2159-2165.
111. Wu S-M, Hallermeier KM, Laue L, Brain C, Berry AC, Grant DB, Griffin JE, Wilson JD, Cutler GB, Chan W-Y. Inactivation of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor by an insertional mutation in Leydig cell hypoplasia. *Mol Endocrinol.* 1998;12:1651-1660.

112. Stavrou SS, Zhu Y-S, Cai L-Q, Katz MD, Herrera C, Defillo-Ricart M, Imperato-McGinley J. A novel mutation of the human luteinizing hormone receptor in 46XY and 46XX sisters. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:2091-2098.
113. Martens JWM, Verhoef-Post M, Abelin Neusa, Ezabella M, Toledo SPA, Brunner HG, Themmen APN. A homozygous mutation in the luteinizing hormone receptor causes partial Leydig cell hypoplasia: correlation between receptor activity and phenotype. *Mol Endocrinol.* 1998;12:775-784.
114. Latronico AC, Chai Y, Arnhold IJP, Liu X, Mendonca BB, Segaloff DL. A homozygous microdeletion in helix 7 of the luteinizing hormone receptor associated with familial testicular and ovarian resistance is due to both decreased cell surface expression and impaired effector activation by the cell surface receptor. *Mol Endocrinol.* 1998;12:442-450.
115. Kremer H, Mariman E, Otten BJ, Moll GW, Stoelinga BA, Wit JM, Jansen M, Drop S, Faas B, Ropers HH, Brunner HG. Cossegregation of missense mutations of the luteinizing hormone receptor gene with familial male-limited precocious puberty. *Hum Mol Genet.* 1993;2:1779-1783.

116. Shenker A, Laue L, Kosugi S, Merendino JJ, Minegishi T, Cutler GB. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature*. 1993;365:652-654.
117. Yano K, Hidaka A, Saji M, Polymeropoulos MH, Okuno A, Kohn LD, Cutler GB. A sporadic case of male-limited precocious puberty has the same constitutively activating point mutation in luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene as familial cases. *J Clin Endoc Metab*. 1994;79:1818-1823.
118. Latronico AC, Anasti J, Arnhold IJP, Mendonca BB, Domenice S, Albano MC, Zachman K, Wajchenberg BL, Tsigos C. A novel mutation of the luteinizing hormone receptor gene causing male gonadotropin-independent precocious puberty. *J Clin Endoc Metab*. 1995;80:2490-2494.
119. Kraaij R, Post M, Kremer H, Milgrom E, Epping W, Brunner HG, Grootegoed A, Themmen APN. A missense mutation in the second transmembrane segment of the luteinizing hormone receptor causes familial male-limited precocious puberty. *J Clin Endoc Metab*. 1995;80:3168-3172.

120. Egli CA, Rosenthal SM, Grumbach MM, Montalvo JM. Gonadotropin-independent sex-limited autosomal dominant sexual precocity in 4 generations: "familial testotoxicosis". *Pediatr Res.* 1983;17(Part 2):16A.
121. Buffone GJ, Darlington GJ. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem.* 1985;31:164-165.
122. Kempter B, Grossbadern K. A quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *TIG.* 1992;8:226-230.
123. Cuevas-Covarrubias SA, Maya-Núñez G, Kofman-Alfaro S. A modified quick method for DNA extraction from leukocytes. 1998; Enviado a publicación.
124. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2ª Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989;E5.
125. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74:5463-5467.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

126. Wu SM, Jose M, Hallermeir K, Rennert OM, Chan WY. Polymorphisms in the coding exons of the human luteinizing hormone receptor gene. *Hum Mutat.* 1997;11:333-334.
127. Chan W-Y. Molecular genetic, biochemical, and clinical implications of gonadotropin receptor mutations. *Mol Genet Metab.* 1998;63:75-84.
128. Nistal M, Paniagua R, Abaurrea MA, Pallardo LF. 47,XXY Klinefelter's syndrome with low FSH and LH levels and absence of Leydig cells. *Andrologia.* 1980;12:426-433.
129. Rodriguez de Ledesma JM, Cozar JM, Nistal-Martin N, Cisneros J. Klinefelter syndrome with hypogonadotropic hypogonadism and absence of Leydig cells. *Arch Esp Urol.* 1994;47:618-620.
130. Genuardi M, Bardoni B, Floridia G, Chiurazzi P, Scarano G, Zollino M. 1995 Dicentric chromosome Y associated with Leydig cell agenesis and sex reversal. *Clin Genet.* 47:38-41.

131. Nalbant D, Williams SC, Stocco DM, Khan SA. Luteinizing hormone-dependent gene regulation in Leydig cells may be mediated by CCAAT/enhancer-binding protein- β . *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;139:272-279.