

11216

1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO



SUBDIVISION DE ESPECIALIZACION
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
ESTUDIO DE POLIMORFISMO DEL GEN DEL RECEPTOR
DE LH EN PUBERTAD RETARDADA CONSTITUCIONAL.
M.

SECRETARIA DE SALUD
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
ORGANISMO DESCENTRALIZADO



TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

M E D I C O G E N E T I S T A

P R E S E N T A :

JAVIER TADEO GRANADOS RIVERON

TUTOR: DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ

DIRECCION DE ENSEÑANZA





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Página
RESUMEN _____	2
ANTECEDENTES _____	3
JUSTIFICACION _____	34
OBJETIVOS _____	34
SUJETOS Y MATERIAL _____	35
ANALISIS ESTADISTICO _____	40
ASPECTOS ETICÒS Y DE BIOSEGURIDAD _____	40
RESULTADOS _____	41
DISCUSION _____	45
REFERENCIAS _____	49
ANEXO _____	62

RESUMEN:

La pubertad retardada constitucional se diagnostica en pacientes que entran espontáneamente en la pubertad a una edad cronológica mayor al límite establecido como normal. Estos pacientes usualmente presentan una estatura menor a la de individuos de su edad, pero su estatura y velocidad de crecimiento suelen ser apropiados respecto a su edad ósea. Frecuentemente existen antecedentes familiares de parientes en primer grado de pubertad retardada.

En el presente estudio se intentó correlacionar la presencia de cuatro polimorfismos previamente identificados en el gen del receptor de hormona luteinizante (54 ins CTGCAG, A872G, G935A y C1065T) con la ocurrencia de pubertad retardada constitucional en varones.

El análisis de la distribución de los alelos polimórficos en cuatro pacientes con pubertad retardada constitucional y en cuatro controles con pubertad normal mostró que los portadores de los polimorfismos de los exones 1 y 11 tienen alrededor de tres veces más probabilidades de presentar retraso puberal que los no portadores. Sin embargo, dada la reducida muestra de individuos considerados en el estudio, no es posible descartar la posibilidad de que estos resultados sean producto del azar.

Antecedentes

Pubertad

Se considera a la pubertad como una fase del desarrollo de la función hipotálamo-hipofisaria-gonadal, la cual inicia desde el periodo fetal y continúa durante la adolescencia y está dirigida a alcanzar una plena maduración sexual y la fertilidad (Van Vliet, 1991). La adolescencia (del latín *adolescere*, padecer o crecer) comprende el lapso entre la presentación de las primeras características sexuales secundarias y el pleno establecimiento de la madurez física (Wheeler, 1991).

Estos cambios ocurren gracias a la estimulación de las gónadas por parte de las gonadotropinas hipofisarias y al incremento en la producción de esteroides sexuales por estas glándulas. (Retter et al, 1982).

Aparentemente el aumento en la producción de las gonadotropinas se debe a un decremento en la sensibilidad del gonadostato en el hipotálamo a los esteroides sexuales, que ejercerían sobre él una retroacción negativa. Esta reducción de su inhibición por el SNC, además del aumento de la secreción pulsátil de GnRH, desencadenarían el conjunto de sucesos que llamamos pubertad. (Grumbach, 1975) (Rosenfield, 1991) (Bardin et al, 1981).

Los diferentes estadios del desarrollo puberal han sido clasificados por Marshall y Tanner (Marshall y Tanner, 1986). Esta clasificación ha sido aceptada mundialmente (Styne et al, 1979) y se basa en el varón en las siguientes características: volumen testicular, rugosidad, color y elongación del escroto, longitud y grosor del pene y cantidad, distribución y características del vello pubiano. Para la mujer esta clasificación considera el desarrollo mamario

(glándula y pezón) y del vello púbico. De acuerdo a las características presentes en un sujeto determinado, este podrá ser clasificado desde un estadio 1 de desarrollo genital (prepuber) hasta el estadio 5 (adulto normal) (Marshall y Tanner, 1986).

Durante la pubertad, las gónadas se desarrollan tanto en tamaño como en sus funciones endocrina y reproductiva especializadas; por un lado, la producción total de esteroides sexuales aumenta progresivamente y por el otro se adquiere la capacidad reproductiva. Como consecuencia de esta producción aumentada de esteroides sexuales, se desarrollan las características sexuales secundarias, se incrementa el crecimiento y se hacen aparentes los cambios definitivos en la composición y proporciones del cuerpo (Van Vliet, 1991).

En los varones la pubertad se inicia al presentarse aumento del volumen testicular. (Burr et al, 1970). El testículo prepuberal tiene un volumen de 1 a 3 ml y una longitud menor de 2.5 cm. El crecimiento puberal de los testículos ocurre en un periodo promedio de alrededor de 4 años y pasa de su volumen inicial hasta alcanzar uno mayor a 15 ml. Morfológicamente este crecimiento se debe al desarrollo de los túbulos seminíferos, estimulado por la acción de la FSH (Marshall y Tanner, 1986).

Durante la pubertad el volumen medio del ovario aumenta de 1 a 4 ml y los ovarios adquieren un aspecto "megalocístico", como reflejo de sus cambios histológicos (Stanhope et al, 1985). El desarrollo sexual secundario de las niñas implica el crecimiento de los genitales internos así como el desarrollo mamario. (Tanner JM, 1962). Estos cambio son ocasionados por la producción de estrógenos por parte del ovario y frecuentemente inician alrededor de los 8 años

de edad (Salardi et al, 1985). El tránsito del inicio del estadio 2 hasta el inicio de la fase 5 toma como promedio 4 años. Los primeros signos clínicos son el aumento de volumen del monte pubiano, labio mayores y clitoris. La vagina aumenta su longitud y el útero aumenta su tamaño a expensas del miometrio, el endometrio se desarrolla rápidamente tras ocurrir la menarca, la cual en la mayoría de los casos se presenta de 12 a 24 meses después del inicio del desarrollo mamario y posterior al pico de crecimiento estatural (Marshall y Tanner, 1986).

El desarrollo sexual secundario en niños comprende el desarrollo gonadal, peneano así como el crecimiento del vello púbico. Estos eventos son causados por la producción de andrógenos testiculares cuya primer evidencia clínica en un 98% de los casos es el aumento de volumen testicular, que se presenta generalmente alrededor de los 9 años de edad. El promedio de la duración de estos eventos, desde el estadio 2 al 5 es de 3.5 años. Igualmente se observa el desarrollo del pene, de las vesículas seminales, de la próstata y de las glándulas bulbouretrales. El crecimiento peneano se presenta de 16 a 18 meses después del inicio del crecimiento testicular. El vello púbico aparece poco después de que se ha dado el inicio del desarrollo genital. El vello axilar aparece aproximadamente 2 años después de la pubarca, mientras que el vello facial se manifiesta a una edad media de 14.9 años. El cambio de voz en el varón durante la pubertad se presenta generalmente durante el pico de crecimiento estatural.

Durante la pubertad, la velocidad del crecimiento aumenta de manera importante y el índice de maduración esquelética está acelerado, lo que lleva a la fusión de los cartílagos epifisarios, por lo que la pubertad puede ser considerada como un evento de promoción del crecimiento, además de un proceso limitante de

la talla final. La combinación del aumento de los esteroides sexuales y de la hormona de crecimiento parece ser responsable del pico de crecimiento estatural (Wheeler MD, 1991).

La diferencia en la talla del adulto entre hombres y mujeres es debida en parte al pico de crecimiento puberal que ocurre 2 años después en los varones en quienes es típicamente un evento tardío, ya que empieza durante el estadio 3 de desarrollo y alcanza un máximo durante el estadio 4 (Tanner y Marshall, 1986).

En un estudio realizado en población mexicana (Guízar-Vázquez, 1985) se describió el desarrollo de caracteres sexuales secundarios por edad y talla en 669 niños, de edades comprendidas entre 9 y 16 años, valorados de acuerdo a los criterios establecidos por Tanner. La edad promedio para el estadio 2 de desarrollo genital (G2) fue de 12.07 ± 0.87 años y para el estadio 2 de desarrollo de vello púbico (P2) de 12.72 ± 0.84 años. La talla promedio para G2 fue de 1434 ± 66.53 mm y para P2 de 1494 ± 71.19 mm.

Pubertad retardada:

El término pubertad retardada define la ausencia de manifestaciones físicas de maduración sexual a una edad cronológica 2.5 desviaciones estándar por encima de la edad promedio de inicio de la pubertad en una población específica (Williams). Tomando como base este criterio y de acuerdo a los estudios realizados en niños mexicanos, la edad crítica es de 13.8 años (Guízar-Vázquez, 1985).

Retardo constitucional del desarrollo y la pubertad:

Esta entidad se diagnostica en pacientes que entran espontáneamente en la pubertad a una edad cronológica mayor al límite establecido como normal. Estos pacientes usualmente presentan una estatura menor a la de individuos de su edad, pero su estatura y velocidad de crecimiento suelen ser apropiados respecto a su edad ósea. Frecuentemente existen antecedentes en familiares de primer grado de pubertad retardada. En esta entidad, la adrenarca y gonadarca presentan retardo, mientras que en pacientes con deficiencia aislada de gonadotrofinas la adrenarca se presenta a la edad esperada (Sklar et al, 1980) (Counts et al, 1987).

En pacientes con retardo constitucional de la pubertad, la edad ósea se correlaciona mejor que la edad cronológica con la edad de inicio de los cambios puberales. Estos pacientes tienen una edad ósea retrasada al momento del diagnóstico, pero al alcanzarse una edad ósea equivalente a 12 a 14 años para niños y de 11 a 13 para niñas, los estadios iniciales de maduración sexual se vuelven evidentes. Los niveles plasmáticos de hormonas gonadales suelen ser bajos al momento del diagnóstico, pero a medida en que la edad ósea avanza, los niveles de gonadotrofinas y la secreción pulsátil de LH se incrementan (Williams).

En su forma "pura", la pubertad retardada constitucional es una variante fisiológica extrema de la velocidad normal de desarrollo, en contraparte con la pubertad precoz constitucional verdadera. Los individuos afectados alcanzan una completa maduración sexual, pero el proceso es más prolongado. Los pacientes con talla baja familiar no presentan retardo en la pubertad. Así, la talla baja familiar

es una variante fisiológica en la cual la velocidad del desarrollo y la edad ósea son normales, mientras que la pubertad retardada constitucional es un desorden que secundariamente afecta al crecimiento (Link et al, 1986).

Ocasionalmente, los individuos con pubertad retardada constitucional presentan una talla normal. En estas circunstancias la tendencia genética para estatura alta es considerablemente mayor respecto a aquellos con talla baja. En estos casos, las decisiones diagnósticas y terapéuticas deben enfocarse al status puberal.

Los pacientes con pubertad retardada constitucional frecuentemente no alcanzan la estatura predicha (Crowne et al, 1990) (LaFranchi, 1991). Esto ha sido atribuido a un crecimiento deficiente de la columna vertebral en relación a la longitud de las extremidades pélvicas, lo que resulta en proporciones eunocoides cuando el sujeto alcanza la edad adulta. Mientras más grande sea la desproporción de segmentos, más cerca está el paciente de la talla final predicha (Albanese et al, 1993) (Albanese et al, 1995).

Las niñas con pubertad retardada constitucional acuden con menos frecuencia que los varones a una evaluación médica, pero suelen presentar también tallas subóptimas. Dado que en ellas el diagnóstico puede ser más tardío y sus tallas predichas calculadas a una mayor edad, es más frecuente que alcancen su altura predicha pero no la óptima (Crowne et al, 1990).

Los pacientes masculinos con antecedente de pubertad retardada constitucional presentan una densidad mineral en el cuello del fémur alrededor de una desviación estándar debajo de los valores normales, lo cual incrementa el riesgo de sufrir fracturas osteoporóticas. (Finkelstein et al, 1992).

Hipogonadismo Hipogonadotrópico: Infantilismo Sexual Relacionado a Deficiencia de Gonadotropinas:

Cualquier deficiencia en la secreción pulsátil de LHRH y la resultante deficiencia de LH y FSH, provoca infantilismo sexual.

La deficiencia de LHRH puede ser secundaria a un defecto no detectado hasta la edad en que se esperaría el inicio de la pubertad puede ser, por ejemplo, debida a un tumor, proceso inflamatorio, lesión vascular o trauma. La deficiencia de LHRH puede ser cuantitativa (absoluta o relativa) o cualitativa y especialmente en mujeres, puede involucrar anomalías en la amplitud o frecuencia de los pulsos de LHRH o en ambos. La deficiencia de gonadotropinas puede resultar de lesiones que afecten directamente a la glándula pituitaria. Cuando también se encuentra una disminución de GH, la velocidad de crecimiento disminuye y la estatura es corta. En contraste con los sujetos con retardo constitucional del crecimiento y la pubertad, los pacientes con deficiencia de gonadotropinas no tienen una respuesta normal a la estimulación con LHRH ni un perfil pulsátil de LH incongruente con la edad ósea. Además, los niveles de LH y FSH plasmáticos y urinarios son frecuentemente bajos. (Crowley et al, 1985) (Spratt et al, 1987).

Histiocitosis de Langerhans (Enfermedad de Hand-Schüller-Christian o Histiocitosis x). Actualmente se considera a este padecimiento una proliferación clonal de los histiocitos de Langerhans o sus precursores, caracterizado por infiltración de estas células en piel, vísceras y huesos. Diabetes insípida, deficiencia de GH o pubertad retardada pueden resultar de la infiltración del

hipotálamo y/o hipófisis. Pueden existir lesiones óseas quísticas en cráneo, costillas, pelvis y escápula, en huesos largos de las extremidades y en la espina dorsolumbar (Lavin et al, 1993) (Egeler et al, 1995).

Lesiones Inflamatorias Postinfecciosas del SNC, Anormalidades Vasculares y Trauma Craneoencefálico. Son causas inusuales de hipogonadismo hipogonadotrófico que ocasionalmente se han asociado a granulomas tuberculosos o sarcoidóticos. La hidrocefalia también puede causar pubertad retrasada, la cual revierte tras la descompresión (Asherson et al, 1965) (Fiedler et al, 1975).

Radiación de la Cabeza. La radiación como tratamiento para tumores del SNC o leucemia puede condicionar una falla hipotálamo-hipofisiaria. La deficiencia de gonatropinas después de la de GH, es el defecto mas común por lesiones de este tipo (Hokken-Koelega et al, 1993) (Sttuberfield et al, 1995).

Defectos del Desarrollo. Los defectos de línea media de la cabeza y el SNC se encuentran asociados a múltiples deficiencias endocrinas, como sucede en la displasia septo-óptica, caracterizada por afección del nervio óptico, nistagmo pendular o incluso ceguera. Este defecto, además de otros como la holoprosencefalia pueden causar deficiencias de todas las hormonas hipofisarias (Perrone et al, 1994) (Elias et al, 1994).

Deficiencia Aislada de Gonadotropinas:

Puede presentarse en forma familiar o aislada. Los pacientes alcanzan una estatura apropiada para su edad, dado que sus niveles de esteroides gonadales son bajos para provocar la fusión de las epífisis y así desarrollan una mayor longitud de sus extremidades superiores en comparación con las inferiores. Sin tratamiento llegan a ser adultos altos. Se ha descrito en el ratón *hpg/hpg* una forma autosómica recesiva debida con delección del gen LHRH (Richards et al, 1994).

Síndrome de Kallman: Es una condición genéticamente heterogénea y se caracteriza por hipogonadismo hipogonadotrópico debido a deficiencia de LHRH además de alteraciones de la olfacción secundarias a displasia o agenesia de los bulbos y/o tractos olfatorios. Los afectados presentan generalmente un hábito eunucoide y defectos de la línea media. Menos frecuentemente se observan trastornos convulsivos, acortamiento de metacarpianos, pie cavo, hipoacusia neurosensorial, ataxia cerebelar, movimientos oculares anormales aplasia o displasia renal unilateral y menos frecuentemente bilateral y sinquinesia de extremidades superiores. La forma ligada a X se ha mapeado en Xp22.3, en el locus del gen KAL1, que escapa a la inactivación del X y codifica una proteína con función de adhesión neural extracelular, posiblemente involucrada en la migración de las neuronas LHRH al hipotálamo. Se han descrito una gran variedad de mutaciones y delecciones del gen y ocasionalmente la enfermedad se ha asociado a ictiosis ligada a X, condrodisplasia punctata y retraso mental en un síndrome de genes contiguos. (Kallman et al, 1994) (Ballabio et al, 1989).

Deficiencia aislada de LH: También llamada síndrome del eunuco fértil, está caracterizada por producción deficiente de testosterona asociada a grados variables de espermatogénesis. En la mayoría de los casos, la deficiencia hormonal es incompleta. Esta condición puede ser idiopática (se han descrito casos raros con mutación de la subunidad de la LH) u ocasionada por neoplasias hipotalámicas. El tratamiento con GCH, mejora la espermatogénesis (Weiss et al, 1992).

Deficiencia Aislada de FSH: Puede estar causada por una producción deficiente de la subunidad beta de la FSH. Se han descrito casos en los que existe feminización normal o con infantilismo sexual, ya que aún niveles bajos del FSH o de actividad del receptor de FSH pueden ser suficientes para mantener la secreción de estradiol e inducir la pubertad. (Aittomaki et al, 1995).

Enanismo hipopituitario idiopático.

Es causado generalmente por deficiencia de factores de liberación hipotalámicos. Algunos pacientes con deficiencia aislada de GH desarrollan pubertad espontánea cuando su edad ósea alcanza un estadio puberal de 11 a 13 años, lo que no sucede en pacientes con deficiencia aislada de gonadotropina. La estatura al inicio de la pubertad y la estatura en relación con la edad ósea determinan la estatura final. Se han demostrado malformaciones del tallo de la hipófisis por RM, así como asociación con distrés perinatal. Las formas familiares de deficiencias múltiples de

hormonas hipofisarias con herencia autosómica recesiva o ligada a X son las menos comunes (Goodman et al, 1968).

Condiciones variadas:

Síndrome de Prader-Willi: Se caracteriza por hiperfagia, obesidad e intolerancia a los carbohidratos, desde la infancia se nota hipotonía, letargo, actividad disminuida *in utero*, retraso mental de leve a moderado, manos y pies pequeños, facies característica con ojos almendrados, boca triangular, frontal estrecho. La estatura es baja a los 15 años de edad con pubertad retardada e hipogonadismo causados por disfunción hipotalámica a pesar de la adrenarca temprana. Raras veces se presenta en forma familiar. 70% de los pacientes presentan una deleción paterna en 15q11-13, mientras que 20-25% presentan disomía uniparental materna. En 2-5% de los casos se ha detectado un defecto en el centro de impronta, y se ha propuesto un gen candidato para esta región, denominado snRPN (polipéptido SmN asociado a ribonucleoproteína pequeño nuclear). SnRPN está implicado en el *splicing* de RNAm expresados en encéfalo incluyendo el hipotálamo y se piensa que es un gen crítico para esta enfermedad (Ozçelik et al, 1992).

Síndromes de Laurence-Moon y Bardet-Biedl: Ambos síndromes son autosómicos recesivos y presentan retinosis pigmentosa e hipogonadismo. El síndrome de Laurence-Moon presenta además paraplejia espástica, mientras que

el Bardet-Biedl se asocia a polidactilia y obesidad. El síndrome Biemond II es una variedad que presenta además coloboma de iris (Laurence y Moon, 1866).

Deficiencias Funcionales de Gonadotropinas: Otras causas de pubertad retardada son la malnutrición y las enfermedades sistémicas crónicas como la enfermedad pulmonar crónica, fibrosis quística, enteritis regional, hemofilia, talasemia, enfermedad de Cronh, insuficiencia renal crónica, neoplasias, leucemias, hipotiroidismo, diabetes mellitus y enfermedad de Cushing. En general la pérdida de peso de cualquier causa de menos del 80% del peso ideal respecto a la estatura pueden llevar a deficiencia de gonatropinas y niveles bajos de leptina. Se ha establecido una relación entre actividad física y anomalías de la pubertad. El entrenamiento por si mismo parece inhibir el pulso generador de LHRH, efecto que puede estar mediado por vías opioidérgicas endógenas que involucran endorfinas. Las atletas que inician con entrenamiento previo a la pubertad presentan retraso en la menarca y pueden desarrollar osteopenia por hipoestrogenismo crónico. En los hombres se presentan niveles de testosterona bajos y respuesta disminuida a LHRH así como decremento en amplitud y frecuencia del pulso espontáneo de LHRH (Maki et al, 1988) (Landon et al, 1984) (Chaussain et al, 1987).

Hipogonadismo Hipergonadotrópico: Infantilismo Sexual con Trastornos Gonadales Primarios:

Síndrome de Klinefelter o Disgenesia Tubular Seminifera y sus variantes: Las características invariables son: testículos son pequeños, alteración de la

espermatogénesis y un fenotipo masculino con ginecomastia y proporciones eunucoideas. Los niveles de gonadotropinas están elevadas postpuberalmente, pero con niveles puberales normales. Los niveles de testosterona son normales hasta los 14 años. (Klinefelter, 1942). Después de la pubertad se desarrolla hialinización y fibrosis de los túbulos seminíferos. El inicio de la pubertad usualmente no está retrasado, pero la disminución de las reservas de las células de Leydig y los niveles bajos de testosterona podrían retrasar los cambios puberales. En estos pacientes, el cariotipo más común es 47, XXY seguido de mosaicos 46, XY/ 47, XXY. El riesgo de cáncer de mama es 20 veces mayor que en varones normales (Salbhenblat et al, 1985) (Plymate et al, 1983).

Otras causas de Falla Testicular Primaria:

Agentes quimioterapéuticos:

Estos agentes pueden causar daño a las células de Sertoli y a las células germinales en pacientes prepuberales. El daño puede ser reversible, pero la concentración de FSH y LH elevadas indican persistencia de daño gonadal. La radiación de las gónadas puede causar daño testicular primario manifestado por azoospermia aunque los niveles de testosterona pueden ser normales en asociación con niveles de LH y FHS elevados (falla de células de Leydig compensada) (Penso et al, 1974).

Defectos Biosintéticos testiculares: El pseudohermafroditismo masculino causado por deficiencia de 17 hidroxilasa o de 17,20 liasa está asociado con infantilismo sexual y fenotipo femenino. El defecto bloquea la síntesis de

testosterona y andrógenos adrenales y afecta la masculinización en todos los estadios del desarrollo. La deficiencia de la proteína esteroidogénica aguda (STAR) resulta en un defecto en el transporte del colesterol dentro de la mitocondria, con lo cual existe deficiencia parcial o total para la esteoidogénesis, que se manifiesta por pseudohermafroditismo masculino y ausencia de desarrollo sexual secundario en mujeres (Bose et al, 1997) (Fujeda et al, 1997).

Resistencia a la LH: Está causada por una anomalía en el receptor de LH en la célula de Leydig. Es un trastorno autosómico recesivo debido a mutaciones en el gen que codifica al receptor transmembranal LH/hCG acoplado a proteínas G en individuos 46, XY que origina una forma de pseudohermafroditismo masculino. (Wrinkler et al, 1993).

Anorquia y Criptorquidia: En los varones 46, XY sin testículos palpables es importante determinar si hay tejido testicular presente. La condición puede deberse a testículos intraabdominales que tiene un alto riesgo de degeneración maligna o a anorquia, en la que no se encuentran las gónadas por laparotomía o bien a testículos retráctiles. La pubertad se verá retrasada en proporción inversa a la función testicular residual, cuya potencialidad depende del tratamiento quirúrgico o médico empleado. La orquidopexia postpuberal se asocia con una alta prevalencia mayor al 85% de azoospermia u oligospermia (Lee, 1993).

Síndrome de Disgenesia Gonadal y sus variantes (Síndrome de Turner):

Es la causa de hipogonadismo hipergonadotrópico en mujeres. Esta entidad se caracteriza por talla baja, infantilismo sexual, asociados varias anomalías somáticas. El cariotipo mas frecuente es 45, X. Sin embargo el cuadro clínico puede estar modificado por mosaicismo o anomalías estructurales de un cromosoma X o Y (Rosenfeld, 1991).

El síndrome puede ser reconocido al nacimiento por higromas del cuello, linfedemas de las extremidades, micrognatia, uñas displásicas, paladar alto, pliegues epicánticos, ptosis, orejas de implantación baja o displásicas, cabello de implantación baja, tórax ancho, teletelia, acortamiento de cuartos metacarpianos, cubitus valgus, nevos pigmentados abundantes.

La inteligencia es normal, aunque puede haber afección de la coordinación visomotora, espaciotemporal y habilidad matemática, así como problemas de ajuste social. Se ha postulado que un gen materno improntado juega un papel importante en las diferencias de comportamiento social entre hombres y mujeres y trastornos del desarrollo (Skuse et al, 1997). El patrón de crecimiento es anormal y está determinado por la pérdida de un gen (SHOX o PHOG) en la región pseudoautosómica de los brazos cortos de X e Y (Carr y Gedeon, 1997).

El patrón bifásico de la secreción de gonadotropinas en la niñez está por arriba de lo normal del nacimiento a los 4 años y después de los 10 años. La aparición de caracteres sexuales secundarios está retrasada. Las gónadas atróficas son la causa de infantilismo sexual; en cerca del 10% de los casos, puede ocurrir pubertad, menarca, y raramente embarazo.

El mosaicismo y las anomalías estructurales están asociadas con un fenotipo menos severo. La pérdida de todo o parte del brazo corto del X lleva a los hallazgos físicos de disgenesia gonadal (Warburton et al, 1980).

Otras Causas de Falla Ovárica Primaria:

La Radioterapia y los Agentes Citotóxicos: El daño ocasionado por estos agentes puede ser una causa de falla ovárica primaria. Es aconsejable ubicar quirúrgicamente a los ovarios para colocarlos fuera del campo de radiación, pues la dosis estándar de radiación provocan esterilidad en 30% de mujeres jóvenes y en 100% de mujeres mayores. El uso de procarbazona, carmustina y lomustina para el tratamiento de tumores cerebrales está asociado a falla gonadal primaria (Thibaud et al, 1992).

Ooforitis Autoinmune: 36% de las mujeres con síndrome poliglandular autoinmune presentan falla ovárica antes de los 20 años, mientras que 4% de los varones afectados por esta entidad presentan falla testicular a esa edad. Se han detectado anticuerpos en contra de enzimas esteriodogénicas, algunos en contra de tejidos específicos, mientras que otros reaccionan aparentemente contra cualquier célula (Hoek et al, 1997).

Disgenesia gonadal XX por mutaciones del gen de receptor de FSH: Es una entidad autosómica recesiva debida a una mutación en el dominio extracelular del receptor de FSH en mujeres con retardo de la pubertad, amenorrea primaria,

niveles elevados de gonadotropinas y una detención de los folículos ováricos en la etapa de folículo primario (Aittomaki et al, 1995).

Síndrome de Noonan: Esta caracterizado por cuello alado, ptosis, fisuras palpebrales dirigidas hacia abajo, orejas de implantación baja, estatura corta, cubitus valgus y linfedema. Las mujeres tienen función ovárica normal, los hombres pueden tener criptorquidia, aplasia o hipoplasia germinal y función disminuida de las células de Leydig. Se hereda en forma autosómica dominante. La incidencia es estimada de 1/1000 a 1/5000. Alrededor de la mitad de los pacientes presentan mutaciones nuevas (Elsawi et al, 1994).

Receptor de LH

La reproducción en los mamíferos es dependiente de la liberación pulsátil de las gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH), hormonas que actúan juntas regulando la función gonadal. Los efectos biológicos de estas hormonas incluyen la estimulación de la maduración y función testicular y ovárica además de la regulación de la gametogénesis y esteroidogénesis (Catt y Dufau, 1991). En el testículo, la LH actúa a través de receptores membranales en las células de Leydig, manteniendo los procesos metabólicos generales y las enzimas esteroidogénicas y regulando la producción y secreción de andrógenos (Dufau, 1990). Los receptores testiculares de LH son expresados durante la vida fetal, posnatal, durante la pubertad y a través de la vida adulta.

En el ovario, la LH promueve la maduración de las células foliculares. Después de los efectos inductores iniciales de la FSH y LH en los folículos

pequeños y medianos, la LH promueve los estadios subsecuentes del desarrollo folicular y la esteroidogénesis en las células de la granulosa y luteínica (Richards y Hedin, 1988). La LH dispara la ovulación, promoviendo la ruptura del folículo preovulatorio y la liberación del ovocito. El receptor de LH no es detectable en el ovario fetal, pero es expresado en la vida neonatal temprana. La gonadotropina coriónica humana es sintetizada y secretada por las células del sinciciotrofoblasto desde la etapa de la implantación, mantiene la secreción de estrógeno y progesterona por el cuerpo lúteo durante el embarazo (Catt y Dufau, 1991).

La gonadotropina coriónica humana es estructuralmente similar a la LH y se une con gran afinidad al receptor de LH en la superficie de las células en los tejidos blanco.

Las hormonas glicoproteicas hipofisarias y placentarias (LH, GCH,FSH Y TSH) son heterodímeros que contienen una subunidad α común y una subunidad β distintiva que les confiere especificidad biológica a cada una de las hormonas individuales. Ambas subunidades están unidas por interacciones no covalentes estabilizadas por un motivo llamado giro β cisteína, que forma un "cinturón" que circunda al segundo giro de la subunidad α (Lapthorn et al, 1994) (Wu et al, 1997).

Estructuralmente, las hormonas glicoproteicas son miembros del superfamilia de factores de crecimiento de tipo de knot de cisteína, que incluye al factor de crecimiento nervioso y al factor de crecimiento transformante β . En contraste con otros miembros de esta familia, las hormonas glicoproteicas, se asocian con sus receptores solo como heterodímeros. Los receptores para

gonadotropinas unen al heterodímero, en tanto que las subunidades individuales no muestran afinidad significativa (Catt y Dufau, 1980).

El receptor de LH pertenece a una subclase de los receptores de hormonas glicoproteicas que incluye a los receptores de LH, FSH y TSH. La expresión del receptor de LH es inducida por FSH y por la misma LH (Catt y Dufau, 1991) (Dufau, 1990) (Saez, 1994). Sin embargo, la hormona de crecimiento, por si misma o con la prolactina contribuye con la expresión del receptor y previene su pérdida tras la hipofisectomía. (Catt et al, 1980).

Cuadro 1 : Secuencia del cDNA del receptor de LH y su traducción en los tres marcos de lectura.

1	ATG AAG CAG CGG TTC TCG GCG CTG CAG CTG CTG AAG CTG CTG CTG CTG CAG CCG CCG	60
1	M K Q R F S A L Q L L K L L L L L Q P P	20
	* S S G S R R C S C * S C C C C C S R R	
	E A A V L G A A A A E A A A A A A A A	
61	CTG CCA CGA GCG CTG CGC GAG GCG CTC TGC CCT GAG CCC TGC AAC TGC GTG CCC GAC GGC	120
21	L P R A L R E A L C P E P C N C V P D G	40
	C H E R C A R R S A L S P A T A C P T A	
	A T S A A R G A L P * A L Q L R A R R R	
121	GCC CTG CGC TGC CCC GGC CCC ACG GCC GGT CTC ACT CGA CTA TCA CTT GCC TAC CTC CCT	180
41	A L R C P G P T A G L T R L S L A Y L P	60
	P C A A P A P R P V S L D Y H L P T S L	
	P A L P R P H G R S H S T I T C L P P C	
181	GTC AAA GTG ATC CCA TCT CAA GCT TTC AGA GGA CTT AAT GAG GTC ATA AAA ATT GAA ATC	240
61	V K V I P S Q A F R G L N E V I K I E I	80
	S K * S H L K L S E D L M R S * K L K S	
	Q S D P I S S F Q R T * * G H K N * N L	
241	TCT CAG ATT GAT TCC CTG GAA AGG ATA GAA GCT AAT GCC TTT GAC AAC CTC CTC AAT TTG	300
81	S Q I D S L E R I E A N A F D N L L N L	100
	L R L I P W K G * K L M P L T T S S I C	
	S D * F P G K D R S * C L * Q P P Q F V	
301	TCT GAA ATA CTG ATC CAG AAC ACC AAA AAT CTG AGA TAC ATT GAG CCC GGA GCA TTT ATA	360
101	S E I L I Q N T K N L R Y I E P G A F I	120
	L K Y * S R T P K I * D T L S P E H L *	
	* N T D P E H Q K S E I H * A R S I Y K	
361	AAT CTT CCC CGA TTA AAA TAC TTG AGC ATC TGT AAC ACA GGC ATC AGA AAG TTT CCA GAT	420
121	N L P R L K Y L S I C N T G I R K F P D	140
	I F P D * N T * A S V T Q A S E S F Q M	
	S S P I K I L E H L * H R H Q K V S R C	
421	GTT ACG AAG GTC TTC TCC TCT GAA TCA AAT TTC ATT CTG GAA ATT TGT GAT AAC TTA CAC	480
141	V T K V F S S E S N F I L E I C D N L H	160
	L R R S S P L N Q I S F W K F V I T Y T	
	Y E G L L L * I K F H S G N L * * L T H	

481 ATA ACC ACC ATA CCA GGA AAT GCT TTT CAA GGG ATG AAT AAT GAA TCT GTA ACA CTC AAA 540
 161 I T T I P G N A F Q G M N N E S V T L K 180
 * P P Y O E M L F K G * I M N L * H S N
 N H H T R K C F S R D E * * I C N T Q T

 541 CTA TAT GGA AAT GGA TTT GAA GAA GTA CAA AGT CAT GCA TTC AAT GGG ACG ACA CTG ACT 600
 181 L Y G N G F E V Q S H A F N E S T T L T 200
 Y M E M D L K K Y R V M H S M G R H * L
 I W K W I * R S T K S C I Q W D D T D F

 601 TCA CTG GAG CTA AAG GAA AAC GTA CAT CTG GAG AAG ATG CAC AAT GGA GCC TTC CGT GGG 660
 201 S L E L K E N V H L E K M H N G A F R G 220
 H W S * R K T Y I W R R C T M E P S V G
 T G A K G K R T S G E D A Q W S L P W G

 661 GCC ACA GGG CCG AAA ACC TTG GAT ATT TCT TCC ACC AAA TTG CAG GCC CTG CCG AGC TAT 720
 221 A T G P K P W I F L P P N C R P C R A M 240
 P Q G R K P W I F L P P N C R P C R A M
 H R A E N L G Y F F H Q I A G P A E L W

 721 GGC CTA GAG TCC ATT CAG AGG CTA ATT GCC ACG TCA TCC TAT TCT CTA AAA AAA TTG CCA 780
 241 G L E S I K E N V H L E K M H N G A F R G 260
 A * S P F R G * L P R H P I L * K N C H
 P R V H S E A N C H V I L F S K K I A I

 781 TCA AGA GAA ACA TTT GTC AAT CTC CTG GAG GCC ACG TTG ACT TAC CCC AGC CAC TGC TGT 840
 261 S R E T F V L L E A T L T Y P S H C C 280
 Q E K H L S I S W R P R * L T P A T A V
 K R N I C Q S P G G H V D L P O P L W C

 841 GCT TTT AGA AAC TTG CCA ACA AAA GAA CAG AAT TTT TCA CAT TCC ATT TCT GAA AAC TTT 900
 281 A F R N L P T K E Q N R I F H I P F L K T F 300
 L L E T C Q Q K N R I F H I P F L K T F
 F * K L A N K R T E F F T F H F * K L F

 901 TCC AAA CAA TGT GAA AGC ACA GTA AGG AAA GTG AAT AAC AAA ACA CTT TAT TCT TCC ATG 960
 301 S K Q C E S T V R K V N N K T L Y S S M 320
 P N N V K A Q * G K * I T K H F I L P C
 Q T M * K H S K E S E * Q N T L F F H A

 961 CTT GCT GAG AGT GAA CTG AGT GGC TGG GAC TAT GAA TAT GGT TTC TGC TTA CCC AAG ACA 1020
 321 L A E S E L I W L I N I L A I M G N M T V 340
 L L R V N * V A G T M N M V S A Y P R H
 C * E * T E W L G L * I W F L L T Q D T

 1021 CCC CGA TGT GCT CCT GAA CCA GAT GCT TTT AAT CCC TGT GAA GAT ATT ATG GGC TAT GAC 1080
 341 P R C A P E P D A F N P C E D I M G Y D 360
 P D V L L N Q M L L I P V K I L W A M T
 P H C S * T R C F * S L * R Y Y G L * L

 1081 TTC CTT AGG GTC CTG ATT TGG CTG ATT AAT ATT CTA GCC ATC ATG GGA AAC ATG ACT GTT 1140
 361 F L R V L I W L I N I L A I M G N M T V 380
 S L G S * F G * L I F * P S W E T * L F
 P * G P D L A D * Y S S H H G K H D C S

 1141 CTT TTT GTT CTC CTG ACA AGT CGT TAC AAA CTT ACA GTG CCT CGT TTT CTC ATG TGC AAT 1200
 381 L F V L L T S R Y K L T V P R F L M C N 400
 F L F S * Q V V T N L Q C L V F S C A I
 F C S P D K S L Q T Y S A S F S H V Q S

 1201 CTC TCC TTT GCA GAC TTT TGC ATG GGG CTC TAT CTG CTG CTC ATA GCC TCA GTT GAT TCC 1260
 401 S F A E S E F C M G L Y L L L I A S V D S 420
 S P L Q T F A W G S I C C S * P Q L I P
 L L C R L L H G A L S A A H S L S * F P

 1261 CAA ACC AAG GGC CAG TAC TAT AAC CAT GCC ATA GAC TGG CAG ACA GGG AGT GGG TGC AGC 1320
 421 Q T K G Q Y Y N H A I D W Q T G S G C S 440
 K P R A S T I T M P * T G R Q G V G A A
 N Q G P V L * P C H R L A D R E W V Q H

 1321 ACT GCT GGC TTT TTC ACT GTA TTC GCA AGT GAA CTT TCT GTC TAC ACC CTC ACC GTC ATC 1380

441 T A G F F T V F A S E L S V Y T L T V I 460
L L A F S L Y S Q V N F L S T P S P S S
C W L F H C I R K * T F C L H P H R H H

1381 ACT CTA GAA AGA TGG CAC ACC ATC ACC TAT GCT ATT CAC CTG GAC CAA AAG CTG CGA TTA 1440
461 T L E R W H T I T Y A I H L D Q K L R L 480
L * K D G T P S P M L F T W T K S C D *
S R K M A H H H L C Y S P G P K A A I K

1441 AGA CAT GCC ATT CTG ATT ATG CTT GGA GGA TGG CTC TTT TCT TCT CTA ATT GCT ATG TTG 1500
481 R H A I L I M L G G W L F S S L I A M L 500
D M P F * L C L E D G S F L L * L L C C
T C H S D Y A W R M A L F F S N C Y V A

1501 CCC CTT GTC GGT GTC AGC AAT TAC ATG AAG GTC ACT ATT TGC TTC CCC ATG GAT GTG GAA 1560
501 P L V G V S N Y M K V S I C F P M D V E 520
P L S V S A I T * R S V F A S P W M W K
P C R C Q Q L H E G Q Y L L P H G C G N

1561 ACC ACT CTC TCA CAA GTC TAT ATA TTA ACC ATC CTG ATT CTC AAT GTG GTG GCC TTC TTC 1620
521 T T L S Q V Y I L T I L I L N V V A F F 540
P L S H K S I Y * P S * F S L W W P S S
H S L T S L Y I N H P D S Q C G G L L H

1621 ATA ATT TGT GCT TGC TAC ATT AAA ATT TAT TTT GCA GTT CGA AAC CCA GAA TTA ATG GCT 1680
541 I I C A C Y I K I Y F A V R N P E L M A 560
* F V L A T L K F I L Q F A S T Q W M W L
N L C L L H * N L F C S S K P R I N G Y

1681 ACC AAT AAA GAT ACA AAG ATT GCT AAG AAA ATG GCA ATC CTC ATC TTC ACC GAT TTC ACC 1740
561 T N K D T K I A K K M A I L I F T D F T 580
P I K I Q R L L R K K W Q S S S P I S P
Q * R Y K D C * E N G N P H L H R F H L

1741 TGC ATG GCA CCT ATC TCT TTT TTT GCC ATC TCA GCT GCC TTC AAA GTA CCT CTT ATC ACA 1800
581 C M A P I S F F A I S A A F K V P L I T 600
A W H L S L F L P S Q L P S K Y L L S Q
H G T Y L F F C H L S C L Q S T S Y H S

1801 GTA ACC AAC TCT AAA GTT TTA CTG GTT CTT TTT TAT CCC ATC AAT TCT TGT GCC AAT CCA 1860
601 V T N S K V L L V L F F Y P I N S C A N P 620
* P T L K F Y W F F I P S I L V P I H
N Q L * S F T G S F L S H Q F L C Q S I

1861 TTT CTG TAT GCA ATA TTC ACT AAG ACA TTC CAA AGA GAT TTC TTT CTT TTG CTG AGC AAA 1920
621 F L Y A I F T K T F Q R D F F L L S K 640
F C M Q Y S L R H S K E I S F F C * A N
S V C N I H * D I P K R F L S F A E Q I

1921 TTT GGC TGC TGT AAA CGT CGG GCT GAA CTT TAT AGA AGG AAA GAT TTT TCA GCT TAC ACC 1980
641 F G C C K R R A E L Y R R K D F S A Y T 660
L A A V N V G L N F I E G K I F Q L T P
W L L * T S G * T L * K E R F F S L H L

1981 TCC AAC TGC AAA AAT GGC TTC ACT GGA TCA AAT AAG CCT TCT CAA TCC ACC TTG AAG TTG 2040
661 S N C K N G F T G S N K P S Q S T L K L 680
P T A K M A S L L D Q I S L L N P P * S C
Q L Q K W L H W I K * A F S I H L E V V

2041 TCC ACA TTG CAC TGT CAA GGT ACA GCT CTC CTA GAC AAG ACT CGC TAC ACA GAG TGT TAA 2100
681 S T L H C Q G T A L L D K T R Y T E C * 700
P H C T V K V Q L S * T R L A Y T Q S V X
H I A L S R Y S S P R Q D S L H R V L

El receptor de LH es una glicoproteína, constituida por una sola cadena polipeptídica de 674 aminoácidos tiene un peso molecular de 75kDa. Consta de tres dominios principales: 1) El dominio extracelular que posee seis sitios potenciales de glicosilación y catorce copias de una secuencia imperfectamente repetida de alrededor de 25 aminoácidos similar a un motivo llamado "repetido rico en leucina", el cual aparentemente está involucrado con interacciones con superficies hidrofóbicas e hidrofílicas, una función que puede ser importante para su activación; 2) el dominio transmembranal está constituido principalmente por residuos aminoacídicos hidrófobos cruza al membrana siete veces y posee secuencias similares a los receptores de proteínas G; 3) el dominio intracelular y las asas que conectan las hélices transmembranales contienen numerosos residuos de serina, treonina y tirosina, los cuales son sitios potenciales de fosforilación (Figura 1).

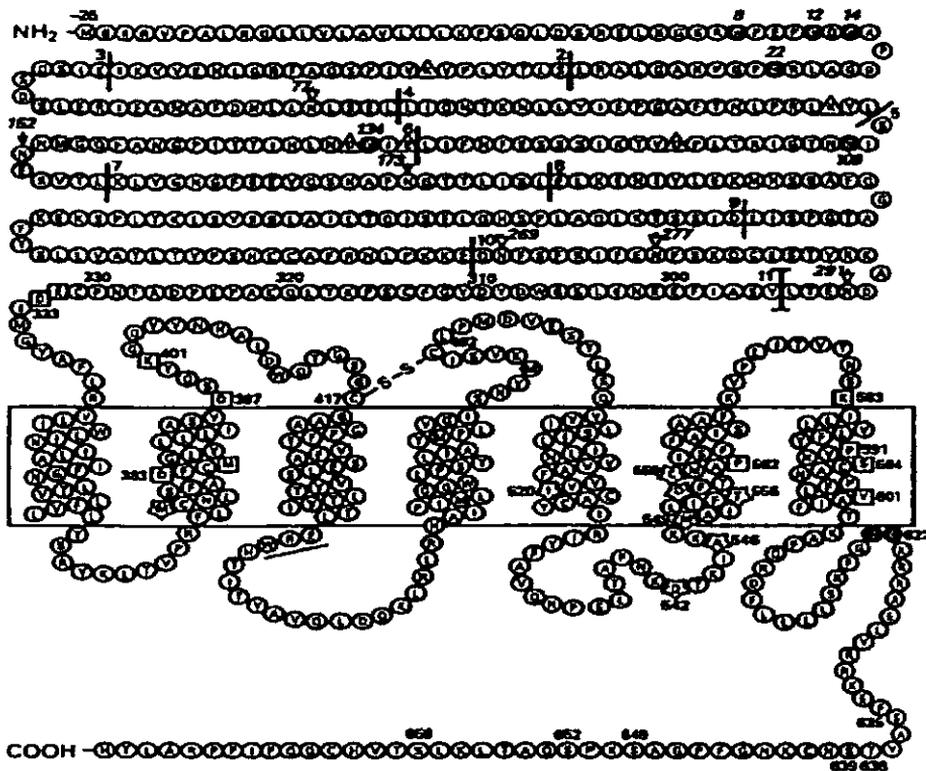


Figura 1: Se muestra la secuencia de aminoácidos del receptor de LH. Las divisiones entre los exones (numerados del 1 al 11) están indicadas por líneas verticales. Los aminoácidos del péptido señal se encuentran señalados por hexágonos y los del péptido maduro en círculos. Los aminoácidos que participan en la unión con el ligando están señalados por triángulos y aquellos relevantes para la transducción de señal se señalan mediante cuadrados. Los residuos de cisteína necesarios para la unión se indican mediante círculos sombreados en los exones 1, 5 y 6. Las flecha oscuras señalan sitios funcionales de glicosilación en los aminoácidos 152 y 173. Las flechas claras indican otros sitios consenso de glicosilación (Dufau, 1990).



Figura 2: Diagrama mostrando la interacción del receptor con su ligando (Protein Database 2001).

Se han encontrado múltiples especies de RNAm del receptor LH/CG. En los ovarios de rata se detectaron las especies 6.7, 4.3, 2.6 y 1.2 kb, siendo éste último el menos abundante y el 6.7 el más detectable. En los testículos se detectan además transcritos de 1.6 y 2.8 kb. A pesar de la heterogeneidad de los transcritos de RNAm, todas las células gonadales expresan una proteína de 85-93 kDa como el único (o al menos el más abundante) receptor LH/CG de superficie.

A pesar de que la mayoría de los investigadores están de acuerdo en que el cAMP es el medidor principal de las acciones del receptor de LH/CG en células gonadales, existen reportes respecto a la posibilidad de que otros segundos

mensajeros tales como inositol fosfatos, diacilglicerol y Ca^{++} se encuentren involucrados (Dufau, 1990).

Cuadro 2: Mutaciones por sustitución de nucleótidos reportadas en el receptor de LH.

Codón	Nucleótido	Aminoácido	Fenotipo
354	TGAA-AAA	Glu-Lys	Hipoplasia de células de Leydig
373	GCC-GTC	Ala-Val	Pubertad precoz masculina
398	ATG-ACG	Met-Thr	Pubertad precoz masculina
457	CTC-CGC	Leu-Arg	Pubertad precoz masculina
542	aATT-CTT	Ile-Leu	Pubertad precoz masculina
545	TGCT-TGA	Cys-Term	Hipoplasia de células de Leydig
554	TCGA-TGA	Arg-Term	Hipoplasia de células de Leydig
564	GAT-GGT	Asp-Gly	Pubertad precoz masculina
568	GCT-GTT	Ala-Val	Pubertad precoz masculina
571	ATGg-ATA	Met-Ile	Pubertad precoz masculina
572	GCA-GTA	Ala-Val	Pubertad precoz masculina
575	CATC-CTC	Ile-Leu	Pubertad precoz masculina
577	ACC-ATC	Thr-Ile	Pubertad precoz masculina
578	GATt-GAA	Asp-Glu	Pubertad precoz masculina
578	GAT-GGT	Asp-Gly	Pubertad precoz masculina
578	CGAT-TAT	Asp-Tyr	Pubertad precoz masculina
581	CTGC-CGC	Cys-Arg	Pubertad precoz masculina
593	TGCC-CCC	Ala-Pro	Hipoplasia de células de Leydig
616	TCT-TAT	Ser-Tyr	Hipoplasia de células de Leydig
625	ATA-AAA	Ile-Lys	Hipoplasia de células de Leydig

MUTACIONES DEL RECEPTOR DE LH

Las mutaciones activadoras del receptor de LH/CG afectan principalmente a los varones. Una activación constitutiva de este receptor provoca estimulación de las células de Leydig en las etapas fetal y prepuberal en ausencia de LH, lo cual resulta en niveles altos de testosterona y desarrollo puberal a edades muy tempranas. Esta condición autosómica dominante es llamada "pubertad precoz familiar limitada a varones" (PPFLV) o "testotoxicosis". Los casos esporádicos causados por mutaciones nuevas son catalogados como "pubertad precoz esporádica limitada a varones" (PPELV) (Shenker et al, 1993).

Hasta la fecha se han reportado 11 sustituciones de una sola base en el exón 11 del gen del receptor de LH/CG en 72 familias con pubertad precoz limitada a varones. Estas sustituciones causan mutaciones de sentido equivocado en las hélices transmembranales II, V y VI o en la tercer asa citoplásmica. La mayoría de las mutaciones (7/11) se encuentran en la hélice VI. Con la excepción de la sustitución de isoleucina por leucina en la posición 542, el resto de las mutaciones resultan en sustituciones de aminoácidos conservados en los receptores para LH, FSH y TSH, lo cual sugiere que estos aminoácidos pueden jugar un importante papel en la actividad biológica de estos receptores. La mutación más común es Asp578Gly, que afecta a la hélice transmembranal VI y representa el 67% de las mutaciones encontradas. Esta mutación es responsable del 76% de los casos de PPFLV y de 40% de los casos de PPELV. Las mutaciones Met398Thr, Ile542Leu, Ala572Val, Ile575Leu y Asp578Gly se encuentran tanto en PPFLV como en PPELV. Se ha determinado que pacientes con orígenes étnicos no caucásicos parecen tener un riesgo relativo mayor de

presentar mutaciones raras. Existen 3 familias con PPFLV en las cuales no se identificaron mutaciones en el receptor de LH/hCG. Con la excepción de un par de pacientes (2/22), las mutaciones se encontraron en el exón 11 (Kremer et al, 1993).

Las mutaciones inactivadoras del receptor de LH/CG se manifiestan clínicamente tanto en hombres como en mujeres. En el varón, la inactivación del receptor causa hipoplasia de células de Leydig (HCL), una forma autosómica recesiva de pseudohermafroditismo masculino resultante de la falla en la diferenciación de las células de Leydig. En la mujer, la inactivación del receptor causa hipogonadismo hipogonadotrófico y amenorrea primaria. Estas mutaciones incluyen sustituciones de una sola base, delección de un exón y una inserción en fase (Kremer et al, 1995).

Por otra parte se han identificado cuatro polimorfismos en el gen del receptor de LH/CG (Wu et al, 1998). Una inserción de seis pares de bases (CTGCAG) fue encontrada a partir del nucleótido 54 del cDNA en 8 de 34 cromosomas independientes en población japonesa, mientras que 66% de los cromosomas no presentaban la inserción. La frecuencia de heterocigocidad fue de 0.353. Esta inserción fue identificada por Atger (Atger et al, 1995) y se sugirió que representaba la secuencia real de hLHR en relación a otra publicada previamente sin la inserción. Esta inserción introduce un dipéptido Leu-Gln dentro del primer repetido de leucina del dominio extracelular de la proteína (Minegishi et al, 1990).

El exón 10 contiene dos polimorfismos que cambian la secuencia de aminoácidos del receptor. El primer polimorfismo ocurre en el nucleótido 872, y cambia A por G. Las frecuencias alélicas para este polimorfismo, estimadas a

partir de 54 cromosomas fueron de 0.648 (alelo A), 0.352 (alelo G) y 0.115 (heterocigotos A/G). El alelo A crea un codón para asparagina y un sitio potencial para N-glicosilación. La substitución de A por G lleva al reemplazo de este residuo de asparagina por serina y por lo tanto a la pérdida del sitio de glicosilación, indicando que este sitio probablemente no se encuentre glicosilado o bien que la glicosilación de este sitio no tiene efecto funcional en el receptor. El otro polimorfismo en el exón 10 ocurre en el nucleótido 935 (A/G). Las frecuencias alélicas estimadas en 54 cromosomas fueron de 0.593 (alelo A) y 0.407 (alelo G). La frecuencia de heterocigosidad fue de 0.192. El alelo A codifica para asparagina, en tanto que el alelo G lleva a un codón de serina. La presencia del alelo G puede ser descubierta usando la enzima de restricción Mae III que no corta el alelo A (Shao-Ming 1997). Ambos polimorfismos presentes en el exón 10 demostraron prevalencia étnica. La población en estudio comprendió un 53.8% de caucásicos, 34.6% de puertorriqueños, 5.8% de afroamericanos y 5.8% de asiáticos. Para el polimorfismo en el nucleótido 872, mientras que todos los caucásicos fueron homocigotos para el alelo A, todos los asiáticos fueron homocigotos y los puertorriqueños fueron homocigotos para el alelo G o heterocigotos A/G. Respecto al polimorfismo del nucleótido 935, todos los asiáticos y puertorriqueños fueron homocigotos para el alelo A. (Laue et al, 1996).

Otro polimorfismo ha sido detectado en el exón 11, en donde el nucleótido 1065 es polimórfico, pudiendo ser C o T. Ambos codones resultantes (GAC y GAT) codifican para Triptofano, por lo que este es un polimorfismo que no altera la secuencia de aminoácidos del producto proteico. Las frecuencias alélicas estimadas en 50 cromosomas fueron de 0.60 (alelo C), 0.40 (alelo T) y 0.40

(heterocigotos C/T). Este polimorfismo no altera la secuencia de aminoácidos. No existe una obvia prevalencia étnica o correlación con enfermedad de este polimorfismo (Wu et al, 1998).

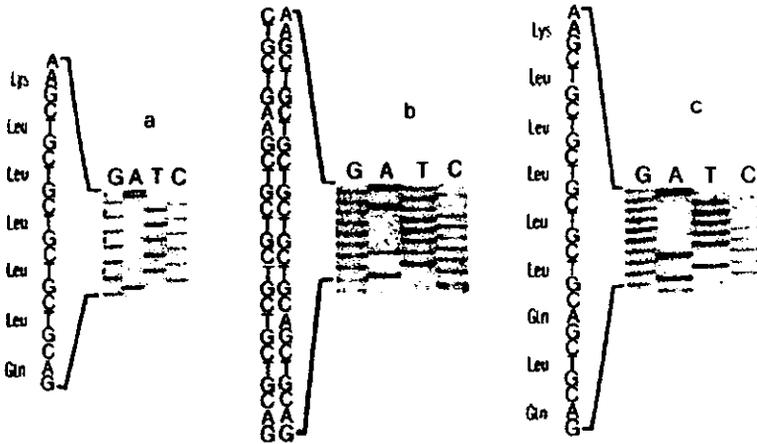


Figura 3: Secuencia directa de productos de PCR a partir de DNA genómico mostrando el polimorfismo del exón 1 (54 ins CTGCAG) y la secuencia de sus productos proteicos, A) homocigoto para el alelo sin la inserción, B) heterocigoto y C) homocigoto para el alelo con la inserción (Wu et al, 1998).

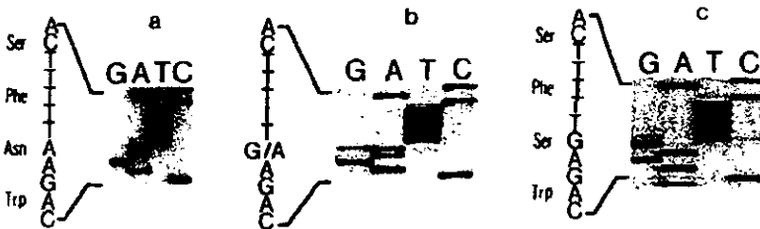


Figura 4: Secuencia directa de productos de PCR a partir de DNA genómico mostrando uno de los polimorfismos del exón10 (A872G) y la secuencia de sus productos proteicos, A) homocigoto A/A, B) heterocigoto A/G y C) homocigoto G/G (Wu et al, 1998).

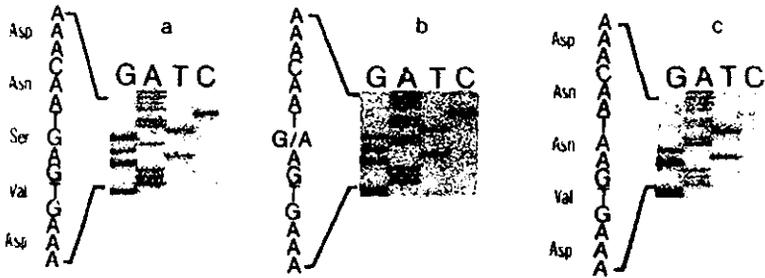


Figura 5: Secuencia directa de productos de PCR a partir de DNA genómico mostrando uno de los polimorfismos del exón10 (G935A) y la secuencia de sus productos proteicos, A) homocigoto G/G, B) heterocigoto G/A y C) homocigoto A/A (Wu et al, 1998).

JUSTIFICACION

En el varón los cambios puberales se deben al efecto virilizante de los andrógenos.

Al unirse a su receptor en la membrana externa de la célula de Leydig, la LH induce la producción de testosterona.

Las alteraciones genéticas en el gen del receptor de LH podrían explicar estados anormales del desarrollo sexual en el varón, como la pubertad retardada constitucional.

OBJETIVOS

Correlacionar la presencia de polimorfismos específicos del gen del R-LH con la ocurrencia de pubertad retardada constitucional en varones.

JUSTIFICACION

En el varón los cambios puberales se deben al efecto virilizante de los andrógenos.

Al unirse a su receptor en la membrana externa de la célula de Leydig, la LH induce la producción de testosterona.

Las alteraciones genéticas en el gen del receptor de LH podrían explicar estados anormales del desarrollo sexual en el varón, como la pubertad retardada constitucional.

OBJETIVOS

Correlacionar la presencia de polimorfismos específicos del gen del R-LH con la ocurrencia de pubertad retardada constitucional en varones.

SUJETOS Y METODOS

Sujetos

Se incluyeron en el estudio 4 pacientes varones con diagnóstico comprobado de pubertad retrasada constitucional y 4 sujetos control con antecedentes de desarrollo puberal normal.

Criterios de inclusión:

- 1.- Varones con un volumen testicular igual o menor a 4 ml a una edad cronológica de 13.8 años o más, medidos con Orquidómetro de Pradder, evaluados por dos expertos.
- 2.- Ausencia de enfermedad subyacente o desnutrición que pueda causar el retardo puberal.
- 3.- Ausencia del pico de crecimiento estatural

METODOS

Examen clínico

La evolución de las cifras de peso y talla se registraron tomando como base las tablas de somatometría pediátrica de Ramos-Galván (Ramos-Galván, 1975), a partir de su valor absoluto y su ubicación percentilar.

La determinación del volumen testicular se realizó utilizando el orquidómetro de Prader, que se basa en la comparación visual y táctil del testículo con elipsoides

de madera de volúmenes conocidos, evaluada por dos expertos durante mediciones independientes.

Extracción de DNA Genómico

El DNA genómico de los pacientes, así como el de sujetos controles, se obtuvo mediante una técnica previamente descrita (Buffone, 1985) (Kempter, 1992) con algunas modificaciones (Cuevas-Covarrubias, 1998).

Previa firma de carta de consentimiento informado por los padres, se extrajeron 3 ml de sangre a cada sujeto, colocándose en tubos Vacutainer que contienen 0.05 ml de Na₂EDTA como anticoagulante. Posteriormente, 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 contiene 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 fue decantado y el botón de leucocitos resuspendido en 1 ml de TTS, volviéndose a centrifugar a 9,221 g durante 1.5 min a temperatura ambiente. Este último paso se repitió hasta obtener un botón de leucocitos libre de eritrocitos. El paquete de leucocitos se resuspendió en 570 µl de NaCl 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 agitándose y dejándose en reposo durante 5 minutos. Posteriormente, el botón de leucocitos se centrifugo a 9,221 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se adicionaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto (-20°C). El DNA precipitado 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 μl de agua bidestilada (ddH_2O) estéril. El DNA se conservó para su análisis posterior a -20°C .

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

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

La relación 260/280 nos indica la pureza del DNA obtenido. Consideraremos que las relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.0 unidades de D.O_{260} son las óptimas. 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%.

Oligonucleótidos

La secuencia de los oligonucleótidos específicos para amplificar los exones 1, 10 y 11 del gen del R-LH fue tomada de por Atger et al. Los oligonucleótidos fueron adquiridos en Accesolab, México. Cada oligonucleótido fue llevado a una concentración final de $100 \mu\text{M}$.

Los oligonucleótidos que se usaron fuerin:

	Secuencia	Producto	Temp./tiempo de alineamiento
Exón 11:	4a CCCTTACCTCAAGCCAATAA 4b CATGTTTCCCATGATGGCTA	218 pb	54°C (1 min)
Exón 10:	E10a ACAGTCAGGTTTAGCCTGAA E10b CTTCTGAGTTTCCTTGCATG	174 pb	50°C (30 seg)

Exón 1:

E1a CACTCAGAGGCCGTCCAAG
E1b GGAGGGAAGGTGGCATAGAG

291 pb

60°C
(30 seg)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En todos los casos se preparó una reacción estándar de 50 µl de acuerdo a la técnica descrita por Sambrook y cols. (Sambrook, 1989). Esta reacción contenía entre 0.5 y 1.0 µg 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 µM, los oligonucleótidos a concentraciones finales específicas, 2 U de Taq polimerasa (Perkin-Elmer Corp, Branchburg New Jersey, USA) y ddH₂O estéril. Todas las reacciones se realizaron 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.

El producto de cada reacción de amplificación se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, teñido 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 agregará 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 lavaron 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 productos de PCR de los exones 1,10 y 11 del gen del R-LH se realizó con un estuche para secuencia de DNA [Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer Perkin Elmer Corp, Branchburg New Jersey, USA)]. El procedimiento seguido se basa en el método descrito por Sanger y cols. (Sanger, 1977) con algunas modificaciones. En tubos de microcentrífuga de 0.5 ml se lleva 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 añade 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 se realizó con las temperaturas de desnaturalización, reasociación y extensión usadas en el PCR inicial de cada fragmento. Al finalizar la PCR, se procedió a la purificación de los productos usando el método de columnas (Centrisep) y el producto purificado fue desecado en un concentrador al vacío.

Posteriormente se resuspendió cada muestra en 25µ de TSR (*template supression reagent*) (Perkin-Elmer), se sometieron a un ciclo de desnaturalización

por 5 minutos y se colocaron en el secuenciador automatizado de DNA que utiliza electroforesis en capilar (ABI PRISM 310). Las secuencias de DNA obtenidas se compararon con las secuencias publicadas del gen del receptor de LH para identificar los cambios polimórficos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos consistió en: 1) la estimación puntual de la razón de posibilidades u *odds ratio* (OR) de presentar pubertad retardada constitucional de los portadores frente a los no portadores de cada polimorfismo individual mediante el método de Mantel y Haenzel y su intervalo de confianza de 95% (95% CI) correspondiente (Mantel y Haenzel, 1959) y 2) la estimación de la razón de posibilidades global para los cuatro polimorfismos mediante el modelo de exposición binaria con covariables categóricas del método global de Mantel y Haenzel (Mantel y Haenzel, 1959) y el intervalo de confianza de 95% correspondiente mediante el método de Robins (Robins et al. 1986).

ASPECTOS ETICOS Y DE BIOSEGURIDAD

En cada caso se solicitó a los padres del paciente su consentimiento por escrito para participar en el protocolo. Se informó con anticipación de las características del proyecto y de los beneficios que podrían resultar del mismo. Se le aseguró a los padres y al paciente que el DNA que se obtuviera se usaría exclusivamente para tratar de identificar alteraciones genéticas asociadas a su padecimiento.

Se anexa carta de consentimiento.

por 5 minutos y se colocaron en el secuenciador automatizado de DNA que utiliza electroforesis en capilar (ABI PRISM 310). Las secuencias de DNA obtenidas se compararon con las secuencias publicadas del gen del receptor de LH para identificar los cambio polimórficos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos consistió en: 1) la estimación puntual de la razón de posibilidades u *odds ratio* (OR) de presentar pubertad retardada constitucional de los portadores frente a los no portadores de cada polimorfismo individual mediante el método de Mantel y Haenzel y su intervalo de confianza de 95% (95% CI) correspondiente (Mantel y Haenzel, 1959) y 2) la estimación de la razón de posibilidades global para los cuatro polimorfismos mediante el modelo de exposición binaria con covariables categóricas del método global de Mantel y Haenzel (Mantel y Haenzel, 1959) y el intervalo de confianza de 95% correspondiente mediante el método de Robins (Robins et al. 1986).

ASPECTOS ETICOS Y DE BIOSEGURIDAD

En cada caso se solicitó a los padres del paciente su consentimiento por escrito para participar en el protocolo. Se informó con anticipación de las características del proyecto y de los beneficios que podrían resultar del mismo. Se le aseguró a los padres y al paciente que el DNA que se obtuviera se usaría exclusivamente para tratar de identificar alteraciones genéticas asociadas a su padecimiento.

Se anexa carta de consentimiento.

por 5 minutos y se colocaron en el secuenciador automatizado de DNA que utiliza electroforesis en capilar (ABI PRISM 310). Las secuencias de DNA obtenidas se compararon con las secuencias publicadas del gen del receptor de LH para identificar los cambio polimórficos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos consistió en: 1) la estimación puntual de la razón de posibilidades u *odds ratio* (OR) de presentar pubertad retardada constitucional de los portadores frente a los no portadores de cada polimorfismo individual mediante el método de Mantel y Haenzel y su intervalo de confianza de 95% (95% CI) correspondiente (Mantel y Haenzel, 1959) y 2) la estimación de la razón de posibilidades global para los cuatro polimorfismos mediante el modelo de exposición binaria con covariables categóricas del método global de Mantel y Haenzel (Mantel y Haenzel, 1959) y el intervalo de confianza de 95% correspondiente mediante el método de Robins (Robins et al. 1986).

ASPECTOS ETICOS Y DE BIOSEGURIDAD

En cada caso se solicitó a los padres del paciente su consentimiento por escrito para participar en el protocolo. Se informó con anticipación de las características del proyecto y de los beneficios que podrían resultar del mismo. Se le aseguró a los padres y al paciente que el DNA que se obtuviera se usaría exclusivamente para tratar de identificar alteraciones genéticas asociadas a su padecimiento.

Se anexa carta de consentimiento.

RESULTADOS

El análisis del historial y del examen clínico de los casos y los controles permitió establecer que no existían antecedentes recientes de consanguinidad en sus familias o evidencias de enfermedad subyacente potencialmente responsable del retardo puberal.

En el cuadro 3 se detalla la distribución de los 4 alelos polimórficos en los sujetos de estudio. En cuanto al polimorfismo en el exón 1, tres pacientes y los cuatro controles fueron homocigotos para el alelo con la inserción CTGCAG, en tanto que un paciente fue heterocigoto, presentando un alelo con la inserción y el otro sin ella (OR = 3.85; 95% CI = 0.12, 196.55).

Todos los pacientes y los controles fueron homocigotos para el alelo A del polimorfismo del exón 10, A872G (OR = 1; 95% CI = 0.02, 62.31).

Un paciente y un control fueron heterocigotos para el polimorfismo G935A del exón 10, presentando cada uno un alelo G y otro A, siendo el resto de los sujetos homocigotos para el alelo G (OR = 1; 95% CI = 0.004, 24.55).

Finalmente, dos de los pacientes y uno de los controles presentaron cada uno un alelo C y otro T del polimorfismo C1065T, mientras que el resto de los sujetos fueron homocigotos para el alelo C (OR = 3; 95% CI = 0.15, 59.85).

Considerando los cuatro polimorfismos en conjunto, la distribución de los alelos polimórficos en casos y controles, observó una razón de posibilidades global de 2.6, con un intervalo de confianza de 95% de 0.14 a 7.35.

Cuadro 3: Distribución encontrada de los alelos polimórficos en los sujetos de estudio.

	Polimorfismo Exón 1 54 ins CTGCAG	Polimorfismo Exón 10 872 A→G	Polimorfismo Exón 10 935 G→A	Polimorfismo o Exón 11 1065 C→T
Paciente 1	CTGCTGCAGCCG	A	G	C
Paciente 2	CTGCTGCAGCCG	A	G	C
Paciente 3	CTGCTGCAGCCG	A	G/A	C/T
Paciente 4	CTGCTGCAGCCG / CTGCCG	A	G	C/T
Control 1	CTGCTGCAGCCG	A	G	C/T
Control 2	CTGCTGCAGCCG	A	G	C
Control 3	CTGCTGCAGCCG	A	G	C
Control 4	CTGCTGCAGCCG	A	G/A	C

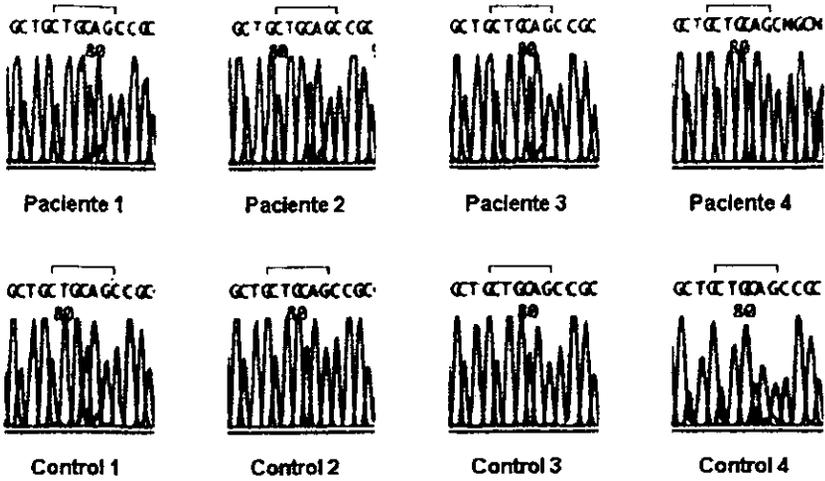


Figura 6: Segmentos de los electroferogramas obtenidos tras la secuencia de el exón 1 a partir de DNA genómico de los pacientes y los controles. La localización del las seis pares de bases que constituyen la inserción se señalan mediante la barra.

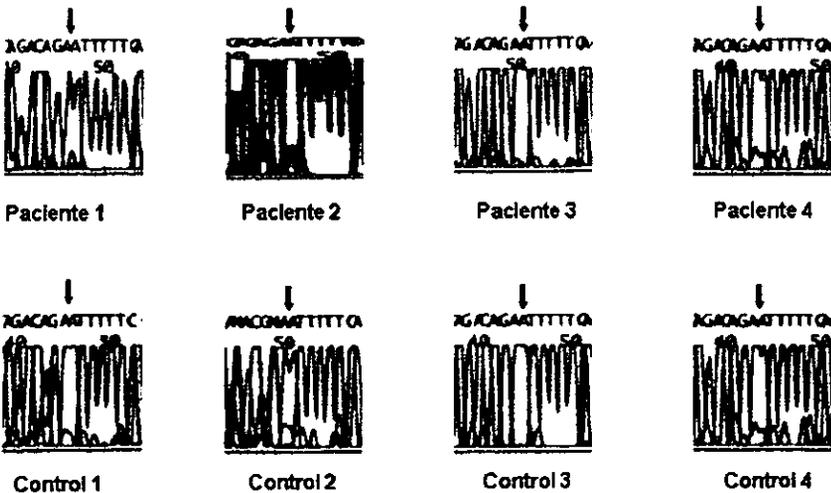


Figura 7: Segmentos de los electroferogramas obtenidos tras la secuencia de el exón 10 a partir de DNA genómico de los pacientes y los controles. La localización de la base donde ocurre la sustitución (A872G), se señala mediante la flecha negra vertical.

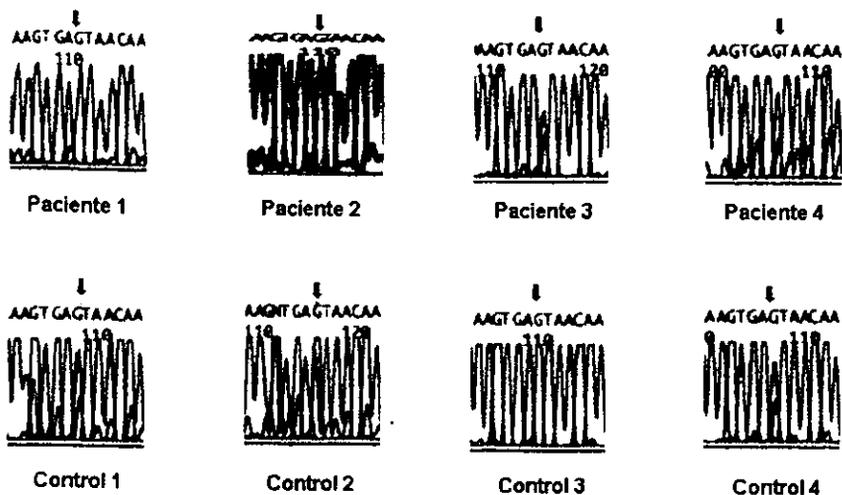


Figura 8: Segmentos de los electroferogramas obtenidos tras la secuenciación de la secuencia de la región del exón 10 a partir de DNA genómico de los pacientes y los controles. La localización de la base donde ocurre la sustitución (G935A), se señala mediante la flecha negra vertical.

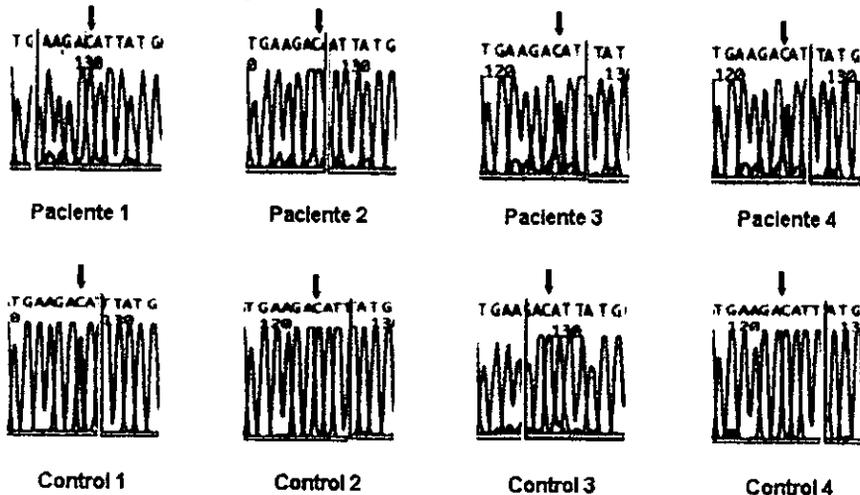


Figura 9: Segmentos de los electroferogramas obtenidos tras la secuenciación de una parte del exón 11 a partir de DNA genómico de los pacientes y los controles. La localización de la base donde ocurre la sustitución (C1065T), se señala mediante la flecha negra vertical.

DISCUSIÓN

La pubertad retardada constitucional es un padecimiento que se caracteriza por la aparición de caracteres sexuales secundarios de forma espontánea a una edad mayor al límite considerado normal en una población determinada, en ausencia de patología subyacente que pueda por sí misma explicar el retardo puberal. De este modo, el diagnóstico se hace generalmente por exclusión. El adjetivo de "constitucional" o "idiopática" hace alusión al hecho de que hasta la fecha se desconoce la existencia de un agente etiológico directo con una relación causal estrecha con la enfermedad. Se ha determinado que los varones presentan con mayor frecuencia pubertad retardada constitucional aunque se desconoce hasta la actualidad los factores responsables de esta tendencia.

Desde el punto de vista genético, la pubertad retardada constitucional es una entidad poco estudiada, sin embargo el hecho de que una gran proporción de sujetos con retardo puberal de tipo idiopático presenten antecedentes familiares de la condición, sugiere fuertemente que existen factores genéticos involucrados en la génesis de la enfermedad. En 1996, Ranvio (Ranvio et al, 1996) intentó establecer la relación entre polimorfismos de la subunidad β de la hormona luteinizante y el inicio y progresión de la pubertad, descubriendo que los portadores de las variantes Trp⁸Arg y Ile¹⁵Thr de la hormona presentaban menor volumen testicular, talla mas baja, y una tasa de crecimiento significativamente menor que los portadores del alelo silvestre. Sin embargo, en sus pacientes con pubertad retardada constitucional, la frecuencia de las variantes de la subunidad β de la LH no fue significativamente distinta a la de la población control. No existen

otros estudios que específicamente hayan intentado correlacionar variantes genéticas con el riesgo de desarrollar pubertad retardada en uno u otro sexo.

Se ha establecido que la unión de la LH a su receptor en la membrana externa de la célula de Leydig, induce la producción de testosterona y que los cambios puberales en el varón se deben al efecto virilizante de los andrógenos. De acuerdo a esto, es probable que alteraciones genéticas o variantes polimórficas en el gen del receptor de LH puedan explicar estados anormales del desarrollo sexual en el varón, como la pubertad retardada constitucional.

Al menos 4 polimorfismos han sido descritos en el gen del receptor de LH. Estos se encuentran en los exones 1, 10 y 11 y aunque no se ha demostrado que estas variantes modifiquen la actividad biológica del receptor, no puede descartarse que existan diferencias funcionales entre las distintas variantes alélicas. El cambio polimórfico más importante ha sido localizado en el exón 1 y consiste en la inserción de 6 pares de bases (CTG CAG), inserción que origina la adición de leucina y glicina en el dominio extracelular de la proteína, región que interviene en la unión al ligando. Este polimorfismo es muy frecuente en población japonesa y en un estudio en nuestra población también se detectó una alta frecuencia de esta inserción (Zenteno, 1999). Las semejanzas en las frecuencias del polimorfismo del exón 1 entre estas dos poblaciones fueron atribuidas a fenómenos migratorios ancestrales. Sin embargo, estudios recientes usando sistemas de expresión con receptores que contenían o no la inserción, demostraron que la presencia o ausencia de estos dos aminoácidos no influye sustancialmente en la actividad biológica de la molécula del receptor de LH. (Rodien et al, 1990).

Con el fin de determinar si la presencia de algún polimorfismo individual o el efecto aditivo de dos o más polimorfismos en el gen del receptor de LH se asocian con la presencia de pubertad retardada constitucional en varones, en el presente estudio investigamos las frecuencias alélicas de estas variantes en un grupo de cuatro sujetos con pubertad retardada idiopática y cuatro controles varones con historia de pubertad normal. Se realizó amplificación por PCR de los exones 1, 10 y 11 y se sometieron a secuenciación automatizada para determinar la presencia de las variantes polimórficas.

El análisis estadístico se realizó mediante el método de Mantel y Haenzel para la estimación de la razón de posibilidades u *odds ratio* (OR), la cual se expresa como el cociente entre las probabilidades de los portadores del polimorfismo de presentar la enfermedad y las probabilidades de los no portadores de estar afectados, por lo que el valor nulo, (que indica el mismo “riesgo” para los expuestos que para los no expuestos) es 1.

Es interesante señalar que el valor de la razón de posibilidades correspondiente al polimorfismo del exón 1 fue de 3.85, lo que indica que la probabilidad de padecer pubertad retardada constitucional es 3.85 veces superior para los portadores del polimorfismo que para quienes no lo presentan. Sin embargo, el intervalo de confianza de 95% calculado para este polimorfismo, (0.11-126.5) incluye al valor nulo de la razón de posibilidades, por lo que no puede descartarse que esta aparente diferencia puede ser debida al azar.

El cálculo de la razón de posibilidades para ambos polimorfismos del exón 10 (OR= 1, valor nulo) no mostró tendencia alguna en cuanto a una mayor

posibilidad de presentar el padecimiento para portadores y no portadores de estos polimorfismos.

Para el polimorfismo del exón 11, la estimación de la razón de posibilidades fue de 3.0, pero al igual que el polimorfismo del exón 1, el intervalo de confianza de 95% correspondiente indica que este puede ser un valor fortuito.

Por otra parte, la razón de posibilidades global, considerando a los 4 polimorfismos como covariables categóricas, fue calculada con el método global de Mantel y Haenzel, con el fin de evaluar cualquier posible efecto aditivo en los casos en que un determinado sujeto presentara más de un polimorfismo. La estimación del valor de esta razón de posibilidades global fue de 2.6, en tanto que el intervalo de confianza de 95% correspondiente (calculado mediante el método de Robins) fue de 0.13-7.35, evidenciando una tendencia aparentemente significativa pero probablemente casual.

A pesar de que las aparentes correlaciones entre la pubertad retardada constitucional en varones y los polimorfismos del gen del receptor de LH identificadas en nuestro estudio, pueden ser, según el análisis estadístico de los datos, producto del azar, no es posible afirmar que no exista de hecho una verdadera relación causal. Futuros estudios con muestras más grandes de casos y controles podrán confirmar o descartar estas tendencias preliminares y contribuirán a identificar los factores genéticos responsables de la pubertad retardada idiopática.

REFERENCIAS

1. Aittomaki K, Dieguez Lucena JL, Pakarinen P, et al. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotrophic ovarian failure. *Cell* 1995;82:959-968.
2. Albanese A, Stanhope R. Does constitutional delayed puberty cause segmental disproportion and short stature?. *Eur J Pediatr* 1993; 152:293-296.
3. Albanese A, Stanhope R. Predictive factors in the determination of final height in boys with constitutional delay in growth and puberty. *J Pediatr* 1995;126:545-550.
4. Asherson RA, Jackson WPU, Lewis B. Abnormalities of development associated with hypothalamic calcification after tuberculous meningitis. *Br Med J* 1965; 2:839-43.
5. Atger M, Misrahi M, Sar S, et al. Structure of the luteinizing hormone-choriogonadotropin receptor gene: unusual promoter and 5' non-coding regions. *Mol Cell Endocrinol.* 1995; 111:113-123.
6. Ballabio A, Bardoni B, Carozzo R, et al. Contiguous gene syndromes due to deletions in the distal short arm of the human X chromosome. *Proc Acad Sci USA* 1989;86:10001-10005.
7. Bardin CW, Paulsen CA. The testes. En: Williams A (Ed.). *Textbook of Endocrinology.* WB Saunders and CO. Philadelphia 293, 1981.
8. Bogin, B. Adolescence in evolutionary perspective. *Acta Pediatr Suppl* 1994;406:29-35.
9. Bose HS, Pescovitz OH, Miller WL. Spontaneous feminization in a 46, XX female patient with congenital lipoid adrenal hyperplasia due to a homozygous

- frameshift mutation in the steroidogenic acute regulatory protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1511-1515.
10. Buffone GJ, Darlington GJ. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem* 1985; 31:164-5.
 11. Burr IM, Sizonenko PC, Kaplan SL. Hormonal changes in puberty. *Pediatr Res* 1970;4:25.
 12. Carr DH, Gedeon M. Population cytogenetics in human abortuses. En: Hook EB, Porter IH, eds. *Population cytogenetics*. New York: Academic Press 1977; 1-9.
 13. Catt K, Dufau ML. Gonadotropic hormones: biosynthesis, secretion, receptor and actions. En: Yen SSC, Jaffe RB. *Reproductive Endocrinology* Philadelphia, Saunders pp. 105-55. 1991.
 14. Catt K, Harwood JP, Clayton RN, Davies TF, Chan V, Dufau ML. Regulation of peptide hormone receptors and gonadal steroidogenesis. *Recent Prog Horm Res* 1980;36:557-622.
 15. Counts DR, Pescovitz OH, Barnes KM, et al. Dissociation of adrenarche and gonadarche in precocious puberty and in isolated hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 1174-1178.
 16. Crowley WF, Filicori M, Spratt DI. The physiology of gonadotropin release hormone secretion in men and women. *Rec Prog Horm Res* 1985; 41:473-526.
 17. Crowne EC, Shalet SM, Wallace WH, et al. Final height in boys with untreated constitutional delay in growth and puberty. *Arch Dis Child* 1990; 65:1109-1112.
 18. Cuevas-Covarrubias SA, Maya-Nuñez G, Kofman-Alfaro S. A modified quick method for DNA extraction from leucocytes 1998; comunicación personal.

19. Chan, WY. Molecular genetic, biochemical, and clinical implications of gonadotropin receptor mutations. *Mol Genet Metab* 1998;63: 75-84.
20. Chaussain JL, Roger M, Couprie C, et al. Treatment of precocious puberty with a long acting preparation of D-Trp6-LHRH. *Horm Res* 1987; 28:155-63.
21. Dufau ML. The luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor of testis and ovary. En: *Receptor Purification*. Litwack G (Ed.) Clifton, Humana Press 1990.
22. Egeler RM, D'Angio GJ. Langerhans cell histiocytosis. *J Pediatr* 1995; 127:1-11.
23. Elias R, Sadeghi-Nejad A. Precocious puberty in girls with myelodysplasia. *Pediatrics* 1994; 93:521-2.
24. Elsawi MM, Pryor JP, Klufio G, et al. Genital tract function in men with Noonan syndrome. *J Med Genet*, 1994;31:468-470.
25. Fiedler R, Krieger DT. Endocrine disturbances in patients with congenital aqueductal stenosis. *Acta Endocrinol* 1975; 80:1-13.
26. Finkelstein JS, Neer RM, Biller BM, et al. Osteopenia in men with a history of delayed puberty. *N Eng J Med* 1992; 326:600-4.
27. Fujeda K, Tajima T, Nakae J, et al. Spontaneous puberty in 46, XX subjects with congenital lipoid adrenal hyperplasia-ovarian steroidogenesis is spared to some extent despite inactivating mutations in the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *J Clin Invest* 1997;99:1265-1271.
28. Goodman HG, Grumbach MM, Kaplan SL. Growth and growth hormone. II. A comparison of isolated growth hormone deficiency and multiple pituitary

- hormone deficiencies in 35 patients with idiopathic hypopituitary dwarfism. *N Engl J Med* 1968;278:57-68.
29. Gromoll J, Partsch CJ, Simoni M, Nordhoff V, Sippell WG, Nieschlag E, Saxena BB. A mutation in the first transmembrane domain of the lutropin receptor causes male precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 Feb; 83:476-80.
30. Grumbach MM, Styne DM. Puberty: ontogeny, neuroendocrinology, physiology, and disorders. En: *William Textbook of endocrinology*. New York: W B Saunders 19th edition 1998. pp1509.
31. Grumbach MM. Onset of puberty. En: Berenberg SR, ed. *Puberty: Biologic and Social components*. Leiden: HE Stenfert Kroese, 1975:1-21.
32. Guízar-Vázquez JJ, Rosales-Lopez A, Ortiz-Jalomo R, Nava-Delgado SE, Salamanca-Gomez F. Secondary sex characteristics among Mexican boys 9 to 16 years of age. Horizontal study. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1985;42:409-414.
33. Harlan WR, Grillo GP, Coroni-Huntley J., et al. Secondary sex characteristics of boys 12 to 17 years of age: the U.S. Health Examination Survey. *J Pediatr* 1979; 95: 293-297.
34. Harlan WR, Harlan EA, Grillo GP. Secondary sex characteristics of girls 12 to 17 years of age: The U.S. Health Examination Survey. *J Pediatr* 1980; 96:1074-1078.
35. Hoek A, Shoemaker J, Draxhage HA. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev* 1997;18:107-134.
36. Hokken-Koelega AC, Van Doorn JW, Hahlen K, et al. Long-term effects of treatment for acute lymphoblastic leukemia with and without irradiation on growth and puberty: a comparative study. *Pediatr Res* 1993; 33:577-82.

37. Huhtaniemi IT, Eskola V, Pakarinen P, et al. The murine luteinizing hormone and follicle stimulating hormone receptor genes: transcription initiation sites, putative promoter sequences and promoter activity. *Mol Cell Endocrinol.* 1992; 88: 55-66.
38. Jiang, X. L., Dreano, M., Buckler, D. R., Cheng, S., Ythier, A., Wu, H., Hendrickson, W. A., EITayar, N.: Structural predictions for the ligand-binding region of glycoprotein hormone receptors and the nature of hormone-receptor interactions. *Structure* 1995;3:1341.
39. Kallmann F, Schonfeld WA, Barrera SW. Genetic aspects of primary eunuchoidism. *Am J Ment Defic* 1994;48:203-236.
40. Kempter B, Grossbadern K. A quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *TIG* 1992; 8:226-30.
41. Klinefelter HF, Reifenstein EC, Albright F. Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without a-leydigism, and increased excretion of follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol* 1942; 2:615-27.
42. Kosugi S, Van Dop C, Geffner ME, Rabl W, Carel JC, Chaussain JL, Mori T, Merendino JJ Jr, Shenker A. Characterization of heterogeneous mutations causing constitutive activation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Hum Mol Genet* 1995; 4:183-8.
43. Kraaij R, Post M, Kremer H, Milgrom E, Epping W, Brunner HG, Grootegoed JA, Themmen AP. A missense mutation in the second transmembrane segment of the luteinizing hormone receptor causes familial male-limited precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1995 Nov; 80:3168-72.

44. Kremer H, Kraaij R, Toledo SP, Post M, Fridman JB, Hayashida CY, van Reen M, Milgrom E, Ropers HH, Mariman E. Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene. *Nat Genet* 1995; 9:160-4.
45. Kremer H, Mariman E, Otten BJ, Moll GW Jr, Stoelinga GB, Wit JM, Jansen M, Drop SL, Faas B, Ropers HH. Cosegregation of missense mutations of the luteinizing hormone receptor gene with familial male-limited precocious puberty. *Hum Mol Genet* 1993; 2:1779-83.
46. LaFranchi S, Hanna CE, Mandel SH. Constitutional delay of growth: expected versus final adult height. *Pediatrics* 1991; 87:82-87.
47. Landon C, Rosenfeld RG. Short stature and pubertal delay in male adolescents with cystic fibrosis: androgen treatment. *Am J Dis Child* 1984; 138:388-91.
48. Laphom AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE. Crystal structure of human chorionic gonadotrophin. *Nature* 1994;369:455-61.
49. Latronico AC, Abell AN, Amhold IJ, Liu X, Lins TS, Brito VN, Billerbeck AE, Segaloff DL, Mendonca BB. A unique constitutively activating mutation in third transmembrane helix of luteinizing hormone receptor causes sporadic male gonadotropin-independent precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 Jul; 83:2435-40.
50. Latronico AC, Anasti J, Amhold IJ, 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 Endocrinol Metab* 1995; 80:2490-4.

51. Latronico AC, Anasti J, Arnhold IJ, Rapaport R, Mendonca BB, Bloise W, Castro M, Tsigos C, Chrousos GP. Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *N Engl J Med* 1996; 334:507-12.
52. Laue L, Chan WY, Hsueh AJ, Kudo M, Hsu SY, Wu SM, Blomberg L, Cutler GB Jr. Genetic heterogeneity of constitutively activating mutations of the human luteinizing hormone receptor in familial male-limited precocious puberty. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Mar 14;92(6):1906-10.
53. Laue L, Wu SM, Kudo M, Hsueh AJ, Cutler GB Jr, Griffin JE, Wilson JD, Brain C, Berry AC, Grant DB. A nonsense mutation of the human luteinizing hormone receptor gene in Leydig cell hypoplasia. *Hum Mol Genet* 1995; 4:1429-33.
54. Laue L, Wu SM, Kudo M, Hsueh AJ, Cutler GB Jr, Jelly DH, Diamond FB, Chan WY. Heterogeneity of activating mutations of the human luteinizing hormone receptor in male-limited precocious puberty. *Biochem Mol Med* 1996; 58:192-8.
55. Lavin PT, Osband ME. Evaluating the role of therapy in Histiocytosis X: clinical studies, staging, and scoring. *Hematol Oncol Clin North Am* 1987; 1:35-47.
56. Lee P. Fertility in cryptorchidism: does treatment make a difference?. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1993;22:479-490.
57. Link K, Blizzard RM, Evans WS, et al. The effect of androgen on the pulsatile release and the twenty-four-hour mean concentration of growth hormone in peripubertal males. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:159-164.
58. Loosfelt H, Misrahi M, Atger M, et al. Cloning and sequencing of porcine LH-HCG receptor c-DNA; variants labeling the transmembrane domain. *Science* 1989 245: 525-528.

59. Maki M, Kallonen K, Lahdeaho ML, et al. Changing pattern of childhood coeliac disease in Finland. *Acta Paediatr Scand* 1988; 77:408-12.
60. Mantel N, Haenzel W, Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst* 1959;22:719-748.
61. Marshall WA, Tanner JM. Puberty. In: Falkner F, Tanner JM, eds. *Human Growth. Vol.2. Postnatal Growth: Neurobiology.* 2nd. Ed. New York: Plenum, 1986:171-209.
62. Martens JW, Verhoef-Post M, Abelin N, Ezabella M, Toledo SP, Brunner HG, Themmen AP. A homozygous mutation in the luteinizing hormone receptor causes partial Leydig cell hypoplasia: correlation between receptor activity and phenotype. *Mol Endocrinol* 1998; 12:775-84.
63. Matthews JNS, Altman DG, Campbell MJ, et al. Analysis of serial measurements in medical research. *Br Med J.* 1990; 300: 230-235
64. McFarland KC, Sprengel R, Philips HS, Kilher M, et al. Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G-coupled receptor family. *Science* 1989; 245: 494-499.
65. 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; 172:1049-54.
66. Ozçelik R, Leff S, Robinson W. Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN), an expressed gene in the Prader-Willi syndrome critical region. *Nature Genet* 1992;2:359-269

67. Penso J, Lippe B, Ehrlich R, et al. Testicular function in prepubertal and pubertal male patients treated with cyclophosphamide for nephritic syndrome. *J Pediatr* 1974; 84:831-6.
68. Perrone L, Del Gaizo D, D'Angelo E, et al. Endocrine studies in children with myelomeningocele. *J Pediatr Endocrinol* 1994; 7:219-23.
69. Plymate SR, Leonard JM, Paulsen CA. Sex hormone-binding globulin changes with androgen replacement. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57:645-8.
70. Prader A. Delayed adolescence. *Clin Endocrinol Metab* 1975;4:143-55.
71. Raivio T, Huhtaniemi I, Anttila R, et al. The role of luteinizing hormone- β gene polymorphism in the onset and progression of puberty in healthy boys. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3278-82.
72. Ramos-Galvan R. Somatometría pediátrica: estudio semilongitudinal en niños de la ciudad de México. *Arch Inv Med* 1975;(supl 6)83-396.
73. Ramos-Rodriguez RM. Crecimiento y proporcionalidad corporal en adolescentes mexicanas. U.N.A.M. P 119, 1986.
74. Retter EO, Grumbach MM. Neuroendocrine control mechanism and the onset of puberty. *Annu Rev Physiol* 1982; 595-611
75. Richards JS, Hedin L. Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation and luteinization. *Annu Rev Physiol* 1988;50:441-63.
76. Rillema JA. Development of the mammary gland and lactation. *Trends Endocrinol Metab* 1994;5: 149-154.

77. Robins J, Breslow NE, Greenland. Estimators of the Mante-Haenzel variance consistent in both sparse data and large-strata limiting models. *Biometrics* 1986;42:311-323.
78. Rodien P, Cetani F, Contaghiola S, Tonaccera M, Duprez L, Mineguishi T, Gobaests C, Vassart T. Evidences for an allelic variant of the human LH/GC receptor rather than tahn a gene duplication: functional comparision of wild-type and variant receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4431-4434.
79. Rosenfield RL. Puberty and its disorders in girls. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 1991;20:15-28.
80. Saez JM. Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocr Rev* 15:574-626.
81. Salardi S, Orsini F, Cacciari E. Pelvic ultrasonography in premenarcheal girls: Relation to puberty and sex hormone concentrations. *Arch Dis Child* 1985;60:120-129.
82. Salbenblatt JA, Bender BG, Puck MH, et al. Pituitary-gonadal function in Klinefelter syndrome before and during puberty. *Pediatr Res* 1985;19:82-6.
83. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
84. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Sci USA* 1977; 74: 5463-7.
85. Shenker A, Laue L, Kosugi S, Merendino JJ Jr, Minegishi T, Cutler GB Jr. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* 1993; 365:652-4 .

86. Sklar CA, Kaplan SL, Grumbach MM. Evidence of dissociation between adrenarche and gonadarche: studies in patients with idiopathic precocious puberty, gonadal dysgenesis, isolated gonadotropin deficiency, and constitutionally delayed growth and adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:548-56.
87. Skuse DH, James RS, Bishop DVM, et al. Evidence from Turner syndrome of an imprinted X-linked locus affecting cognitive function. *Nature* 1997;387:705-708.
88. Spratt DI, Carr DH, Merriam GR et al. The spectrum of abnormal patterns of gonadotropin-releasing hormone secretion in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: clinical and laboratory correlations. *J Clin Endocrinol* 1987; 64:283-91.
89. Stanhope R, Adams J, Jacobs HS. Ovarian ultrasound assessment in normal children, idiopathic precocious puberty and during low dose pulsatile gonadotrophin releasing hormone treatment of hypogonadotropic hypogonadism. *Arch Dis Child* 1985;60:116-121.
90. Stavrou SS, Zhu YS, Cai LQ, 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 Jun; 83:2091-8.
91. Stubberfield TG, Byrne GC, Jones TW. Growth and growth hormone secretion after treatment for acute lymphoblastic leukemia in childhood: 18-Gy versus 24-Gy cranial irradiation. *J Pediatr Hematol Oncol* 1995; 17:167-71.
92. Styne D, Grumbach ML. Puberty in the male and female, its physiology and disorders. En: Yen SS, Jaffe RB (Eds.). *Reproductive Endocrinology*,

- Physiology, Pathophysiology and Clinical Management. WB Saunders, Philadelphia, 1979.
93. Tanner JM. The development of the reproductive system. En: Tanner JM (Ed.) Growth at adolescence. 1962. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
94. Thibaud E, Ramirez M, Brauner R, et al. Preservation of ovarian function by ovarian transposition performed before pelvic irradiation during childhood. *J Pediatr* 1992;121:880-884.
95. Tsai-Morris CH, Bookzko E, Wang W, Dufau ML. Intronic nature of the rat luteinizing hormone receptor gene defines a soluble receptor subspecies with hormone binding activity. *J Biol Chem* 1990; 265: 19385-19388.
96. Turner HH. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus. *Endocrinology* 1938;23:566-574.
97. Van Vliet G. Clinical aspects of normal pubertal development. *Horm Res* 1991; 36:93-100.
98. Warburton D, Kline J, Stein I. Monosomy X: a chromosomal anomaly associated with young maternal age. *Lancet* 1980;1:167-169.
99. Weiss J, Axelrod L, Withcomb RW et al. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the β -subunit of luteinizing hormone. *N Eng J Med* 1992;326:179-183.
100. Wheeler MD. Physical changes of puberty. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 1991;20:1-14.
101. Wrinkler L, Offner G, Krull F, et al. Growth and pubertal development in nephropathic cystinosis. *Eur J Pediatr* 1993;152:244-249.

102. Wu SM, Hallermeier KM, Laue L, Brain C, et al. Inactivation of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor by an insertional mutation in Leydig cell hypoplasia. *Mol Endocrinol.* 1998;12: 1651-1660.
103. Wu SM, Jose M, Hallermeier K, Rennert OM, et al. Polymorphisms in the coding exons of the human luteinizing hormone receptor gene. *Hum Mutation.* 1997; 11: 333-334.
104. Wu SM, Leschek EW, Brain C, Chan WY. A novel luteinizing hormone receptor mutation in a patient with familial male-limited precocious puberty: effect of the size of a critical amino acid on receptor activity. *Mol Genet Metab* 1999; 66:68-73.
105. Xie YB, Wang H, Segaloff DL. Extracellular domain of lutropin choriogonadotropin receptor expressed in transfected cells binds choriogonadotropin with high affinity. *J Biol Chem.* 1990; 265: 21411-21414.
106. Yano K, Saji M, Hidaka A, Moriya N, Okuno A, Kohn LD, Cutler GB Jr. A new constitutively activating point mutation in the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene in cases of male-limited precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1162-8.
107. Zenteno JC. Estudio molecular del gen del receptor de la hormona luteinizante en una familia con pseudohermafroditismo masculino secundario a hipoplasia de la células de Leydig. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México 1999.

ANEXO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____ como padre del paciente _____, acepto en forma voluntaria participar en la investigación "Estudio de polimorfismos del gen del receptor de LH en varones con pubertad retardada constitucional" y que le sean practicados a mi hijo los estudios de DNA necesarios para tratar de identificar alteraciones genéticas que pudieran estar asociadas a su enfermedad. Se me ha informado adecuadamente de las características del estudio que requerirá de la toma de 3 ml de sangre mediante punción venosa, la cual podría ocasionar molestias mínimas como la formación de un pequeño hematoma. Se me ha asegurado que el DNA que se obtenga será usado exclusivamente para investigar las variantes genéticas mencionadas.

Se me ha asegurado que de rehusarnos al estudio, esto no modificaría la calidad de atención que recibimos por parte de la institución

ATENTAMENTE

Nombre _____ Firma _____

Dirección _____

Médico Responsable _____ Firma _____

Testigo 1 _____ Firma _____

Testigo 2 _____ Firma _____

México, D.F., a _____ de _____ de _____.