



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“POLIMORFISMOS Y MUTACIONES EN EL
GEN DE LA HORMONA LUTEINIZANTE Y
SU ASOCIACIÓN CON LA INFERTILIDAD
PRIMARIA EN POBLACIÓN MEXICANA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
LUZ DEL CARMEN CAMACHO CASTILLO

Tutor: DRA. MARTA MENJÍVAR IRAHETA



MÉXICO, D. F.

2006



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.

“POLIMORFISMOS Y MUTACIONES EN EL GEN DE LA HORMONA LUTEINIZANTE Y SU ASOCIACIÓN CON LA INFERTILIDAD PRIMARIA EN POBLACIÓN MEXICANA”

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta en el laboratorio de Endocrinología Molecular del Hospital Juárez de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Marta Menjívar Iraheta	Facultad de Química, UNAM
Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM
Dr. Fernando López Casillas	Instituto de Fisiología, UNAM

Se reconoce la colaboración de la M en C Ma. Guadalupe Ortiz López, laboratorio de endocrinología Molecular del Hospital Juárez de México en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología, UNAM
Vocal	Dr. José Pedraza Chaverrí	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Marco A. Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Ma. Teresa Tusié Luna	INNSZ

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.2 Eje hipotálamo-hipófisis-gónada	2
1.3 Acción de las gonadotropinas en el testículo	4
1.4 Ciclo ovárico	5
1.5 Síntesis de hormonas esteroides	9
1.6 Infertilidad	11
1.7 Variabilidad genética	11
1.8 Mutaciones y polimorfismos de los principales componentes del eje hipotálamo-hipófisis-gónada	12
1.8.1 GnRH	12
1.8.2 Gonadotropinas	13
a) Subunidad α	14
b) Subunidad β de la FSH	14
c) Subunidad β de la LH	15
d) Receptores de LH y FSH	16
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	18
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1 Diseño experimental	19
6.2 Determinaciones bioquímicas	20
6.3 Determinaciones hormonales	21
6.4 Extracción de ADN	22
6.5 Diseño de oligonucleótidos para el gen de LH β	22
6.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
6.7 Polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP)	23
6.8 Purificación del ADN	23

6.9 Secuenciación manual método de Sanger	23
6.10 Ensayo de actividad biológica	24
6.11 Análisis estadístico	25
7. RESULTADOS	26
7.1 Mediciones antropométricas	26
7.2 Determinaciones bioquímicas	26
7.2.1 Mujeres	26
7.2.2 Hombres	27
7.3 Cuantificaciones hormonales	28
7.3.1 Mujeres	28
7.3.2 Hombres	30
7.4 Pruebas Moleculares	32
7.4.1 Amplificación del exón 2 por PCR, controles	32
7.4.2 Amplificación del exón 2 por PCR, pacientes	32
7.4.3 Análisis por SSCP controles	33
7.4.4 Análisis por SSCP pacientes	33
7.4.5 Purificación de DNA	36
7.4.6 Secuenciación del exón 2	37
7.5 Bioensayo de actividad biológica	44
7.5.1 Relación bioactividad/inmunorreactividad	45
7.5.2 Frecuencias alélicas	48
7.6 PCR Exón 3	48
7.6.1 Análisis por SSCP exón 3	49
8. DISCUSIÓN	51
9. CONCLUSIONES	55
10. REFERENCIAS	56
ANEXO	65

RESUMEN

La hormona luteinizante (LH) es un componente fundamental del eje reproductivo. Existen cinco variantes de secuencia en el gen de la LH relacionadas con alteraciones en el ciclo menstrual, retraso de la pubertad o infertilidad. En México no existen estudios que evalúen los cambios de secuencia en el gen de la LH, ni la frecuencia con la que están relacionados con la infertilidad, por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar mutaciones y/o polimorfismos en el gen de la LH causantes de infertilidad primaria. Se incluyeron en el estudio 25 hombres y 25 mujeres sanos con fertilidad probada, así como 25 personas con diagnóstico de infertilidad primaria idiopática. Para evaluar el estado de salud se realizó un examen médico, determinaciones bioquímicas y hormonales. Las gonadotropinas y esteroides sexuales se cuantificaron por ensayo inmunoradiométrico o radioinmunoensayo, respectivamente. El estudio molecular consistió en la evaluación de cada uno de los exones de la LH por PCR-SSCP y secuenciación. Las pruebas bioquímicas y las determinaciones hormonales se encontraron dentro de los rangos normales y son congruentes con la selección de los pacientes y controles. En el análisis molecular se encontraron cinco cambios de secuencia ya informados en la literatura, el primero en la zona intrónica (C₈₈₉-T) y los otros cuatro en el exón 2, dos de los cuales fueron los cambios sinónimos G₁₀₁₈-C (Pro), C₁₀₃₄-A (Val), mientras los otros dos fueron los cambios asociados Trp⁸Arg e Ile¹⁵Thr. Adicionalmente, se evaluó la actividad biológica *in vitro* de las variantes encontradas por medio de un bioensayo utilizando células HEK-293 que expresaban el receptor recombinante de LH, se determinó la cantidad de AMPc producido en respuesta al estímulo con la LH presente en el suero de los pacientes y controles. La potencia biológica *in vitro* se expresó como el cociente bioactividad/inmunoreactividad (B/I), no hubo diferencia significativa en la relación B/I entre las muestras de los portadores de las diversas variantes de LH. No se detectaron mutaciones o variantes en la LH que pudieran ser la causa directa de infertilidad en los pacientes analizados. En conjunto los resultados moleculares y las pruebas de potencia biológica muestran que los cambios encontrados son polimorfismos que no afectan la actividad de la hormona. Es importante resaltar que este estudio nos permitió conocer las variantes de secuencia del gen de la LH presentes en la población mexicana.

1. INTRODUCCIÓN

Las células requieren mecanismos de comunicación inter e intracelular para asegurar una respuesta coordinada que se ajuste a los cambios constantes en el ambiente interno y externo, dos sistemas que se encuentran estrechamente involucrados en la realización de estas funciones son: el sistema nervioso y el sistema endocrino, estos sistemas trabajan de manera coordinada por medio de cascadas o ejes hormonales para regular la síntesis y secreción hormonal (1). En cada nivel de jerarquía dentro de los ejes hormonales existe la posibilidad de retroalimentación negativa, esto significa que una elevada concentración de las hormonas secretadas puede inhibir su propia liberación (2).

1.2 Eje hipotálamo-hipófisis-gónada

La función reproductiva se encuentra controlada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG). El hipotálamo es un componente del sistema nervioso central que regula, entre otras funciones, la secreción de las hormonas hipofisarias (3). La glándula hipófisis se divide en adenohipófisis (hipófisis anterior) y neurohipófisis (hipófisis posterior), la secreción de las hormonas adenohipofisarias está controlada por medio de factores liberadores e inhibidores hipotalámicos. En la adenohipófisis son secretadas la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), también llamadas gonadotropinas, estas hormonas regulan la función gonadal y reproductiva. La síntesis y secreción de LH y FSH se lleva a cabo en las células llamadas gonadótropos, bajo control de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (4). La GnRH es un decapeptido secretado por las neuronas productoras de GnRH en el hipotálamo, esta hormona se libera en pulsos, la frecuencia de los mismos difiere a lo largo de las diversas etapas de desarrollo, por ejemplo en niñas prepúberes la frecuencia de los pulsos es de uno cada 3-4 horas, mientras que en la mujer adulta dicha frecuencia es de un pulso cada 90-100 minutos en la fase temprana folicular y de uno cada 60 minutos en la fase folicular tardía. La naturaleza pulsátil de la secreción de la GnRH resulta en la liberación en fases de la LH y FSH. La vida media de la GnRH en el humano, es menor de 10 minutos (5,6). Una vez liberada, la GnRH es transportada por los vasos sanguíneos hipotálamo-hipofisarios hacia la adenohipófisis, en

donde se encuentran los gonadótropos, las células encargadas de la síntesis y secreción de LH y FSH, en estas células existen receptores específicos para GnRH (GnRHr). El receptor para GnRH es una proteína que posee 7 dominios transmembranales, acoplada a proteínas G y cuya señalización se ejerce vía fosfolipasa C, provocando la movilización del Ca^{2+} intracelular, estimulando la síntesis y liberación de las gonadotropinas (7,8). La LH y FSH son miembros de la familia de hormonas glucoproteicas por lo que comparten características estructurales y bioquímicas, estas hormonas están compuestas por dos subunidades asociadas de manera no covalente denominadas α y β . La subunidad α es común para todas las hormonas glucoproteicas, mientras que la subunidad β es específica para cada hormona y les confiere la actividad biológica. Es importante resaltar que únicamente el dímero posee actividad biológica (9). Una característica de estas hormonas es la presencia de fracciones de carbohidratos en ambas subunidades, en la subunidad α se encuentran dos grupos de carbohidratos en los residuos Asn 52 y Asn 78, en la subunidad β se encuentra un grupo para la LH Asn 13 y dos para la FSH Asn 13 y Asn 30 (10). Los residuos de azúcares presentes en estas hormonas son importantes para el plegamiento y ensamblaje de las subunidades, así como para regular su vida media en circulación (11). La LH y la FSH actúan en los ovarios y testículos regulando la síntesis de hormonas esteroideas y la gametogénesis, los mecanismos serán discutidos más adelante. Los esteroideos y péptidos gonadales secretados bajo influencia de las gonadotropinas actúan a nivel hipotalámico e hipofisiario regulando positiva o negativamente la secreción de LH y FSH (12).

1.3 Acción de las gonadotropinas en el testículo

Los testículos se alojan en la cavidad escrotal, están formados por los túbulos seminíferos, los cuales se integran por tres tipos celulares: las células de Leydig, epiteliales y de Sertoli, en donde se lleva a cabo la esteroidogénesis y espermatogénesis, ambas funciones están reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (H-H-T) figura 1.

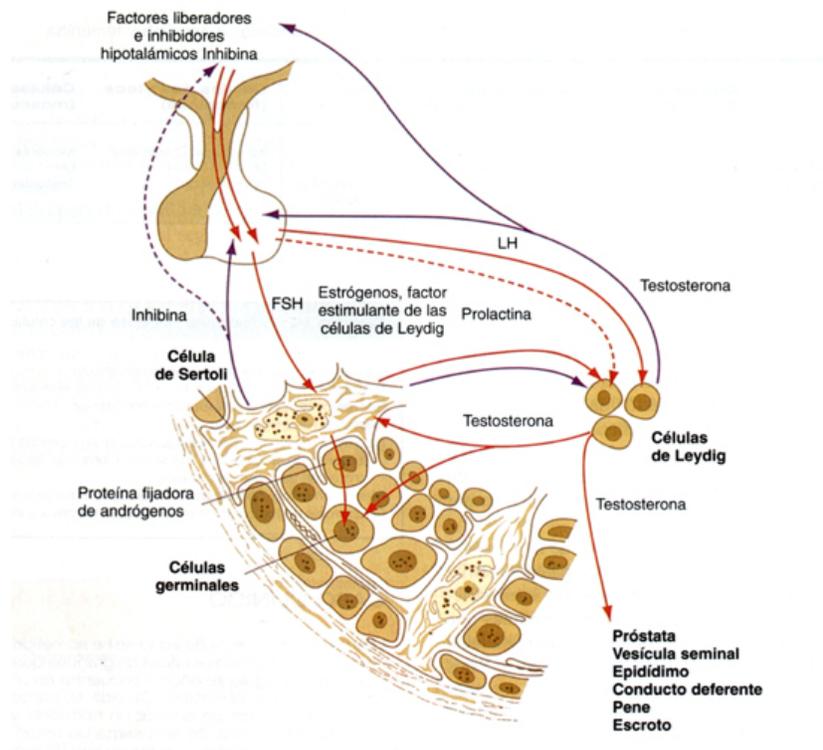


Figura 1. Representación esquemática del eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo

Como se mencionó la síntesis y secreción de LH y de FSH dependen de la liberación de GnRH en el hipotálamo, esto se ha demostrado mediante la medición directa de GnRH y LH en ratas, en donde se observa un alto grado de concordancia entre los pulsos de secreción de GnRH y LH. La FSH también es secretada bajo el estímulo de GnRH, sin embargo, no es tan clara la manera en la cual el patrón de secreción de FSH depende de la pulsatilidad de GnRH (13). La LH estimula la producción de andrógenos en las células de Leydig y de los factores regulatorios no esteroideos (inhibina y activina), mientras que la

FSH se une a su receptor específico en las células de Sertoli y estimula los eventos tempranos en la espermatogénesis, incluyendo la proliferación de las espermatogonias y la meiosis, aunque la maduración completa de las espermátides requiere de la testosterona (14). Los receptores de FSH y LH utilizan una vía de señalización semejante, ambos son proteínas de 7 asas transmembranales acopladas a proteínas G las cuales al ser activadas promueven un incremento en la producción de AMPc, este segundo mensajero libera la subunidad catalítica de la proteína cinasa A (PKA), permitiendo la fosforilación de numerosas proteínas intracelulares que actúan como activadores transcripcionales, esta cascada de eventos impulsa la maduración espermática y la síntesis de hormonas esteroides sexuales (15). La secreción de LH y FSH es inhibida por retroalimentación negativa, la elevación de los esteroides sexuales suprime la liberación de GnRH en el hipotálamo y de gonadotropinas en la hipófisis (16). Existen otras proteínas que participan en la regulación del eje H-H-T, la inhibina, un inhibidor no esteroide de la liberación de FSH y la activina que estimula la secreción de FSH. Se han identificado dos formas de inhibina la A y la B, ambas son heterodímeros que constan de una subunidad α y una de las dos subunidades β , βA o βB . Los heterodímeros y homodímeros de las dos subunidades β son llamados activinas y se designan como activina AB (heterodímeros) y activina A o B (homodímero de βA o B) (17,18).

1.4 Ciclo ovárico

Los ovarios pueden ser divididos en dos compartimentos, la región periférica llamada corteza y la región central o médula. La corteza contiene estructuras foliculares en diferentes estadios de desarrollo y la médula está compuesta principalmente por vasos sanguíneos, nervios y fibras musculares (19). Estos órganos poseen dos funciones fundamentales: la producción de gametos (ovogénesis) y la síntesis de hormonas esteroides (esteroidogénesis).

Al comienzo de la pubertad se tienen aproximadamente 300,000 folículos, de esta gran cantidad solo 400 o 500 madurarán durante la vida reproductiva de una mujer. Entre la

pubertad y menopausia de una mujer se libera un ovocito maduro cada 28 días, este evento depende de la actividad cíclica del ovario, la cual es controlada por los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (H-H-O) figura 2. Para su estudio el ciclo ovárico puede dividirse en tres fases: folicular, ovulatoria y lútea (20).

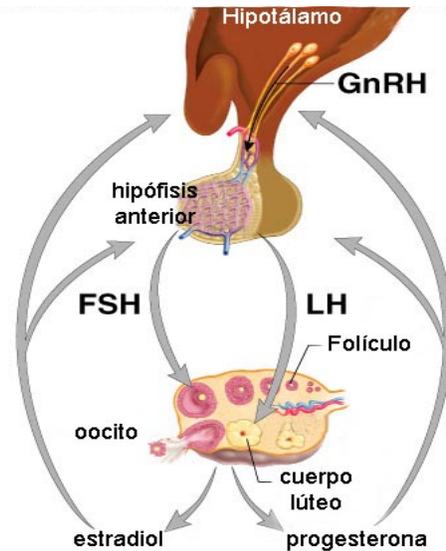


Figura 2. Representación esquemática del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario

Fase folicular. La fase folicular comienza con la diferenciación de la membrana basal que rodea al folículo, la llamada membrana granulosa que forma una barrera entre las células foliculares y el estroma. Se incorporan alrededor del folículo dos capas celulares que se derivan del estroma: las células de la teca interna y externa. Esta fase se caracteriza por el crecimiento terminal de un folículo y la proliferación de las células epiteliales del endometrio debido al aumento en la secreción de estradiol. El crecimiento folicular es iniciado por varios folículos pero sólo uno termina el proceso de desarrollo, mientras en los otros se llevan a cabo procesos degenerativos o de atresia, existe poca información acerca de los factores responsables de los cambios y la organización folicular, así como de los mecanismos que determinan cuántos y cuáles folículos iniciarán su desarrollo en un ciclo (21).

Para que se lleve a cabo la ovulación es necesario que el folículo atraviese varias fases de maduración, dichas etapas son: folículo primordial, preantral, antral y dominante o preovulatorio (22).

Folículo primordial. En esta etapa de maduración el ovocito primario se encuentra rodeado de una capa de células de la granulosa. Los mecanismos de iniciación del crecimiento de los folículos primordiales aún no se conocen, pero se sabe que crecen de manera independiente de las hormonas gonadotropinas hasta un tamaño de 0.2 mm y se ha descrito la participación de diversos factores de crecimiento como: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa ($TGF\alpha$), el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF) I y II, el factor transformante del crecimiento β ($TGF\beta$), el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF 9). Todos estos factores y sus receptores son sintetizados en los folículos que se encuentran en crecimiento, pero no en los que permanecen quiescentes (23,24).

Folículo preantral. Durante este periodo el ovocito va aumentando de tamaño y proliferan las células de la granulosa, las cuales se van organizando en varias capas y comienzan la secreción de mucopolisacáridos que forman la zona pelúcida, una membrana translúcida que rodea al ovocito. Las células de la teca comienzan a organizarse y a formar parte del folículo. Esta etapa del desarrollo folicular se caracteriza por una gran producción de estrógenos en las células de la granulosa, debido al proceso de aromatización, la producción de estrógenos está limitada por el número de receptores de FSH en el folículo. Los receptores de FSH aparecen en el folículo hasta la etapa de folículo preantral (25).

Folículo antral. En esta etapa el folículo aumenta hasta 15 veces su tamaño por ensanchamiento del antro folicular y por un aumento acelerado en la proliferación de las células de la granulosa, las cuales incrementan hasta 600 veces su número, el folículo adquiere un sistema arterial y de vasos linfáticos. Esta fase del crecimiento depende de gonadotropinas, bajo la acción sinérgica de los estrógenos y de FSH se incrementa la producción de las secreciones foliculares que se van acumulando dentro de los espacios intracelulares de las células de la granulosa y posteriormente confluyen hasta formar una

cavidad o antro (26). El líquido folicular es rico en hormonas esteroides, proteínas, proteoglicanos y electrólitos. Dentro del folículo la síntesis de hormonas esteroides se encuentra compartimentalizada formando un sistema de dos células dos gonadotropinas. Los receptores de FSH están presentes solo en las células de la granulosa y los receptores de LH predominan en las células de la teca. Las células de la teca en respuesta a la LH producen andrógenos que pueden ser convertidos a estrógenos a través de la aromatización inducida por FSH en células de la granulosa, ya que la enzima P450 aromatasas solamente se expresa en estas células. La enzima 17^a-hidroxilasa/17-20 desmolasa se expresa únicamente en las células de la teca y es necesaria para convertir sustratos de C-21 como pregnenolona y P a andrógenos C-19 como androstenodiona (27).

El folículo dominante madurará completamente, al parecer el incremento en este folículo de la síntesis de estrógenos produce la disminución de FSH y como consecuencia los folículos no dominantes no son capaces de continuar su desarrollo, ya que no son capaces de continuar la síntesis de estrógenos. Estas alteraciones en los folículos no dominantes inducen cambios atrésicos y experimentan apoptosis (muerte celular programada)(28).

Ovulación. Es el proceso por el cual se expulsa a la cavidad peritoneal el ovocito maduro. El incremento en la cantidad de estradiol que es secretado por el folículo dominante induce un pico preovulatorio de LH, el aumento de esta gonadotropina es el desencadenante de la ovulación, ya que provoca un aumento en el flujo sanguíneo, edema local, liberación de prostaglandinas y producción de ácido hialurónico en las células del estrato granuloso, isquemia de la pared ovárica y rompimiento de las paredes del folículo (29,30).

Fase lútea. Una vez ocurrida la ovulación, las células de la granulosa junto con las células de la teca que las rodean y la rica vasculatura que se formó previamente dan lugar a la formación del cuerpo lúteo o amarillo. Entre los cambios que experimentan estos componentes del folículo se encuentra la luteinización de las células de la granulosa, la cual se caracteriza por un aumento en el tamaño de las células y la presencia de inclusiones lipídicas en el citoplasma. El cuerpo lúteo es el mayor productor de progesterona, al final de la fase lútea si no ocurre el embarazo el cuerpo lúteo se retrae y

disminuye la producción de progesterona, estradiol e inhibina. El endometrio se desprende resultando en la menstruación y finalmente los niveles de FSH se incrementan permitiendo el inicio de un nuevo ciclo. Si ocurre un embarazo el cuerpo lúteo se mantiene y no degenera (31).

1.5 Síntesis de hormonas esteroides

Existen en general 5 grupos de hormonas esteroides: a) mineralocorticoides, los cuales regulan la retención renal de sodio, b) glucocorticoides, implicados en el metabolismo de carbohidratos, c) estrógenos, responsables de las características sexuales secundarias femeninas, d) progestágenos, esenciales para la reproducción y d) andrógenos, que inducen las características sexuales secundarias masculinas (32).

Los tejidos esteroideogénicos pueden sintetizar colesterol *de novo* desde acetato, pero generalmente las células de estos órganos toman la mayor parte del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (33).

Los principales esteroides sexuales son: progesterona, testosterona y estradiol, la fuente más importante de estas hormonas son las gónadas. El paso inicial de la esteroideogénesis es la ruptura de la cadena lateral del colesterol para dar como resultado pregnenolona, esta reacción es catalizada por la enzima P450_{scc} (figura 3). Esta enzima se encuentra en la membrana interna mitocondrial de todas las células esteroideogénicas y es producto del gen CYP11A1. Su función es la conversión de colesterol a pregnenolona e involucra tres reacciones químicas distintas, la 20 α -hidroxilación, 22-hidroxilación y el corte de la cadena lateral del colesterol en la unión entre los carbonos 20 y 22 dando pregnenolona y ácido isocaproico (34).

Una vez producida la pregnenolona sale de la mitocondria y puede seguir una de dos vías denominadas $\Delta 5$ y $\Delta 4$. La pregnenolona y otros esteroides se denominan $\Delta 5$ porque poseen un doble enlace entre los carbonos 5 y 6, mientras que la progesterona, los glucocorticoides, los mineralocorticoides y los andrógenos se denominan $\Delta 4$ porque tienen

un doble enlace entre los carbonos 4 y 5. De esta manera la pregnenolona puede sufrir una 17 α -hidroxilación catalizada por la enzima P450c17 dando como resultado la 17 α -OH-pregnenolona o ser transformada en progesterona, por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) que se encarga de convertir la pregnenolona en progesterona catalizando la isomerización del doble enlace del anillo B al anillo A y la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenación (32,33).

La progesterona es transformada a androstendiona por acción de la 17 α -hidroxilasa (P450c17). La androstendiona pasa a testosterona por acción de la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa mediante una reacción reversible. La testosterona puede ser convertida a estradiol por medio de la enzima P450 aromatasa (34).

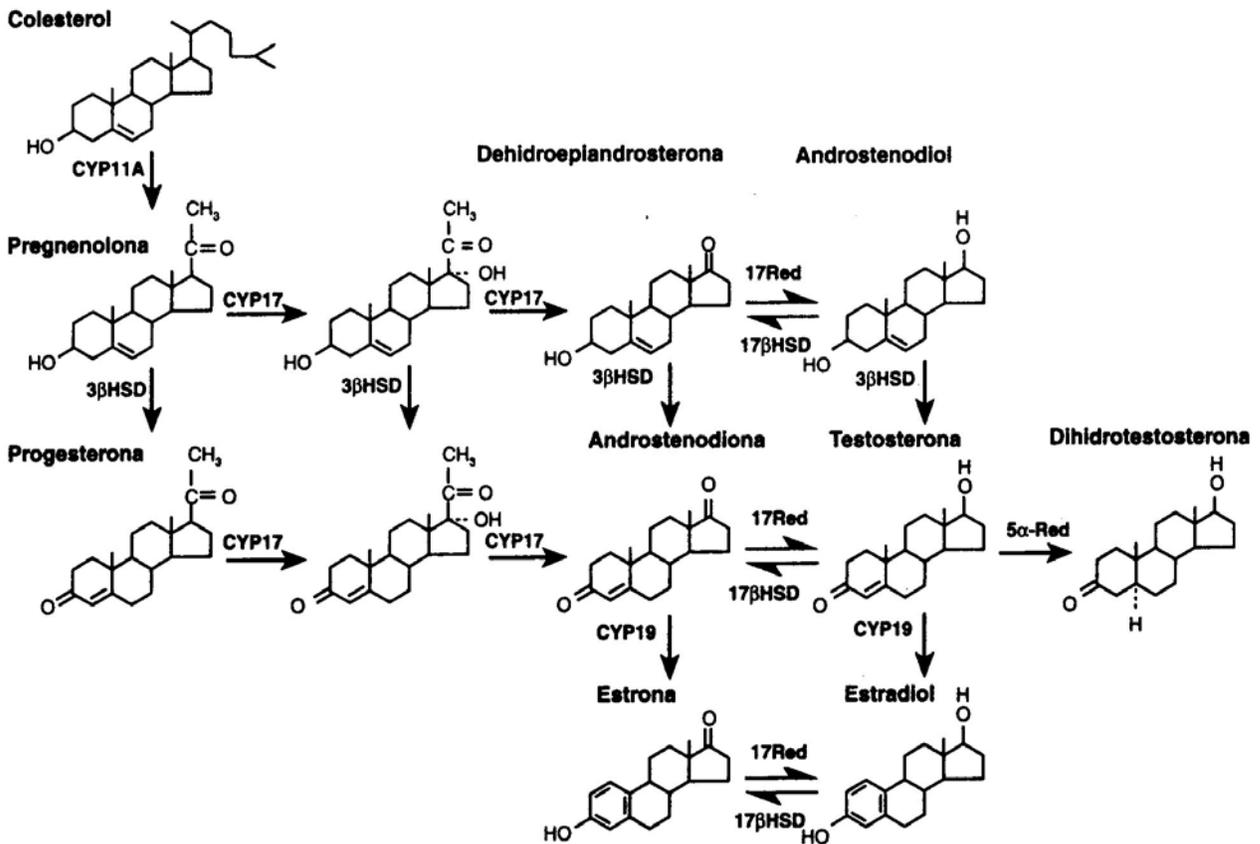


Figura. 3 Síntesis de esteroides sexuales.

1.6 Infertilidad

La infertilidad se define como la incapacidad de una pareja para lograr un embarazo después de 12 meses de relaciones sexuales sin protección y afecta a una de cada diez parejas que desean formar una familia. En México se estima que 3 millones de personas tienen este padecimiento (35).

Se conocen al menos dos clasificaciones de infertilidad, en la primera clasificación se define infertilidad primaria, como aquella en la cual no han ocurrido embarazos previos e infertilidad secundaria, cuando han ocurrido embarazos previos aunque no necesariamente nace un producto vivo, en la segunda clasificación se utiliza el término infertilidad primaria cuando únicamente existen alteraciones en el sistema reproductivo e infertilidad secundaria cuando esta es consecuencia de una enfermedad ajena al sistema reproductivo (36).

Dentro de las causas de infertilidad se encuentran los factores hormonales, inmunológicos, psicológicos, la edad avanzada, obesidad, enfermedades infecciosas, cirugías obstructivas o puede estar relacionada con diversas alteraciones cromosómicas (Síndrome de Turner, Down, Klinefelter, etc.), defectos en la síntesis de hormonas esteroides y trastornos metabólicos (37). A pesar de los grandes avances de la medicina, el 20% de los casos de infertilidad es clasificado de origen idiopático, como resultado el tratamiento que reciben los pacientes es prolongado y poco exitoso (38).

1.7 Variabilidad genética

Cada ser humano posee una copia del genoma única, a pesar de que se comparte un 99.9% de la secuencia, estas pequeñas variaciones resultan en características particulares para cada individuo tales como apariencia física, susceptibilidad a enfermedades o respuesta a tratamientos farmacológicos (39).

Existen diversos tipos de cambios en el DNA, entre los que se encuentran las mutaciones definidas como un cambio en la secuencia del DNA que se puede heredar a la descendencia y tiene un efecto sobre la función de la proteína.

Otro de los cambios comunes son los polimorfismos, que son cambios en la secuencia del DNA presentes con una frecuencia > 1%. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's), son los más comunes de estos cambios, son variaciones de un solo nucleótido en la secuencia del DNA (40). Gracias al proyecto del genoma humano se han descubierto 102,719 SNP's (<http://snp.cshl.org>), aunque se calcula que existen aproximadamente 300,000 con diferente distribución y frecuencia entre las poblaciones del mundo. A pesar de que estos cambios son comunes han sido asociados con el aumento significativo del riesgo genético de padecer enfermedades comunes, como en el caso del alelo APOE*E4 en la enfermedad de Alzheimer, el cual con una frecuencia del 10-20%, explica el riesgo de padecer esta enfermedad en la mitad de la población susceptible (41).

El estudio de las variantes genéticas comunes y su relación con la susceptibilidad a enfermedades requiere la caracterización de la variación genética en cada una de las poblaciones humanas y la realización de estudios de asociación en los genes candidato (42).

1.8 Mutaciones y polimorfismos de los principales componentes del eje hipotálamo-hipófisis-gónada

Existe un componente genético en gran parte de las diversas formas de infertilidad y subfertilidad, sin embargo, aproximadamente el 30% de los casos de infertilidad son clasificados como de origen idiopático, muchos de estos casos pueden ser explicados por mutaciones en genes que regulan la función reproductiva, como los genes de las gonadotropinas y sus receptores (43,44).

El conocimiento profundo de las alteraciones del DNA y los patrones de expresión en los genes relacionados con estos padecimientos proporcionará estrategias terapéuticas más directas (45).

1.8.1 GnRH

El gen de GnRH se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 8 y contiene cuatro exones. El GnRH es un decapeptido derivado del procesamiento postraduccional de

una molécula precursora llamada preproGnRH, la cual consiste de 92 aminoácidos. La preproGnRH se estructura de la siguiente manera: el decapeptido es precedido por un péptido señal de 23 aminoácidos, el último residuo de 56 aminoácidos se conoce como péptido asociado a GnRH (GAP) (46). En la tabla 1 se presentan las mutaciones y polimorfismos conocidos de GnRH y su receptor.

Tabla1. Mutaciones y polimorfismos de GnRH

Hormona	Mutación	Cambio	Fenotipo hombres	Fenotipo mujeres	Ratón KO	Ref.
GnRH	Delección de 8p No se han identificado mutaciones en humanos hasta la fecha	—	—	—	Ratones con delección de 8p presentan hipogonadismo	(47)
GnRHR	10 mutaciones	Interfieren en la unión de GnRH y/o las vías de activación por IP3 o fosfolipasa C	Hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático. Poco desarrollo de los genitales (microfalo, criptorquidia, etc.), alteración del desarrollo de la pubertad y resistencia al tratamiento con pulsos de GnRH. Azoospermia u oligospermia	Hipogonadismo hipogonadotrópico o idiopático Ausencia de desarrollo sexual y resistencia a la estimulación con GnRH	—	(48)

1.8.2 Gonadotropinas

Estas hormonas, poseen una subunidad α común y una subunidad β que les confiere especificidad biológica (49). Ambas cadenas son sometidas a modificaciones post-traduccionales mediante la adición de oligosacáridos, ligados en posición N- a residuos de asparagina (Asn) para las cuatro hormonas y adicionalmente en posición O- a residuos de serina (Ser) para la hCG, con diferentes grados de sulfatación y sialidación (50).

a) Subunidad α

La subunidad α es idéntica en las cuatro gonadotropinas y está codificada por un solo gen compuesto por cuatro exones y localizado en el cromosoma 6p21.1-23. El RNAm maduro posee entre 800 y 900 nucleótidos, los mensajeros son traducidos a un precursor que contiene un péptido señal de 24 aminoácidos y la secuencia de 92 aminoácidos correspondiente a la apoproteína. En la tabla 2 se muestran las mutaciones y polimorfismos encontrados en el gen de la subunidad α (51).

Tabla2. Mutaciones y polimorfismos en el gen de la subunidad α .

Hormona	Mutación	Cambio en la función	Ratón KO	Referencias
α	No se han encontrado	—	+/- crecen normalmente y son fértiles -/- deficiencia severa en el crecimiento e infertilidad	(52)

b) Subunidad β de la FSH

La subunidad β de FSH está codificada en un gen localizado en el cromosoma 11p13, contiene tres exones. El RNAm codifica para un precursor que incluye un péptido señal de 20 aminoácidos y un residuo apoproteico de 110 aminoácidos (53). En la tabla 3 se muestran las mutaciones y polimorfismos de la FSH β

Tabla 3. Mutaciones y polimorfismos el gen de FSH β

Subunidad	Mutación	Cambio	Fenotipo hombres	Fenotipo mujeres	Referencia
FSH β	5 mutaciones (2 hombres y 3 mujeres)	No es capaz de formar el dímero con α	Virilizan normalmente, testículos pequeños, azoospermicos, FSH sin actividad biológica	Homozigotas, presentan retraso de la pubertad, ausencia de desarrollo mamario, amenorrea primaria. FSH \downarrow , LH \uparrow	(54,55)

c) Subunidad β de la LH

Está codificada por un solo gen de 1.1 kb, localizado en el cromosoma 19q13.3. Contiene tres exones, el RNAm posee 700 nucleótidos y codifica para una proteína con un péptido señal de 24 aminoácidos y una apoproteína de 121 aminoácidos (56). La subunidad beta de la LH, posee un alto grado de complejidad estructural debida a la formación de diversos puentes disulfuro, la proteína posee 12 residuos de cisteína y en su conformación tridimensional no existen grupos sulfhidrilo libres. Algunas de las uniones disulfuro producidas en esta proteína se encuentran entre los residuos 26-110, 93-100 y 23-72. Al comparar las subunidades β de las hormonas glicoproteicas se han encontrado dos regiones constantes, 16-38 y 56-100, las cuales son posibles dominios de unión al receptor (51). En la tabla 4 se muestran los cambios conocidos en el gen de LH β .

Tabla 4. Mutaciones y polimorfismos en el gen de la subunidad β de la LH

Exón	Tipo	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Hombres	Mujeres	Bioactividad	Inmuno-reactividad	Referencia
3	Sentido equivocado	CA ²²¹ G CGG	Gln ⁵⁴ Arg	Ausencia de pubertad espontánea	No se ha detectado	Ausente	Normal	(57)
2	Dos mutaciones sentido equivocado en el mismo alelo	T ⁸² GC CGG AT ¹⁰⁴ C ACC	Trp ⁸ Arg Ile ¹⁵ Thr	Retraso de la pubertad	Fertilidad disminuida	Aumenta	No detectada por anticuerpos α/β específicos	(58,59)
3	Sentido equivocado	A364GT GGT	Gly ¹⁰² Ser	Infertilidad	Alteraciones del ciclo menstrual, infertilidad	Disminuida in vitro	Normal	(60,61, 64)
3	Sentido equivocado	G ⁵² CA ACA	Ala-3 Thr	Activa la vía transducción de señales por IP ₃ in vitro		Normal	Normal	(62,
2	—	—	Gly36Asp	Retraso de la pubertad e infertilidad, hipogonadismo.		No se ha estudiado	No se ha estudiado	(65,66)
—	Seis polimorfismos	—	—	No se han reportado alteraciones		Normal	Normal	(60)

d) Receptores de LH y FSH

En cuanto a los receptores existen mutaciones activantes e inactivantes, las primeras causan la activación constitutiva de la vía de señalización, mientras que el segundo tipo produce la respuesta contraria. En la tabla 5 se muestran las mutaciones conocidas de los receptores de las gonadotropinas.

Tabla 5. Mutaciones y polimorfismos en los genes de los receptores de LH y FSH

Mutaciones activantes	Fenotipo femenino	Fenotipo masculino	Referencia
FSHR	No se presentan alteraciones	Pubertad precoz	(67).
LHR	No se ha detectado	Pubertad precoz hipersecreción de testosterona independiente de LH	(68)
Mutaciones inactivantes	Fenotipo femenino	Fenotipo masculino	Referencia
FSHR	Ausencia de maduración folicular, falla ovárica hipergonadotrópica, hipoenstrogenismo	Masculinizados normalmente, poseen testículos pequeños a normales, grados variables de supresión de la espermatogénesis, pero no presentan infertilidad absoluta.	(69,70)
LHR	Amenorrea primaria, la mayor parte solo presenta menstruaciones irregulares, altos niveles de LH, FSH normal, muy bajos niveles de testosterona	Pseudohermafroditismo, hipoplasia de las células de Leydig, producción de testosterona disminuida	(71,72)

Los datos de las tablas anteriores muestran claramente el papel de las variantes de secuencia de los genes de GnRH, las gonadotropinas y sus receptores en las patogénesis de la infertilidad primaria y el retraso en el desarrollo de la pubertad. Los estudios publicados se han realizado principalmente en población caucásica y la mayoría se dedicaron a la búsqueda de mutaciones reportadas por medio de RFLP. Hasta el momento no existen estudios en población Mexicana.

2. JUSTIFICACIÓN

Las técnicas modernas de biología molecular han permitido incrementar la comprensión de la función reproductiva y las enfermedades relacionadas. La identificación de mutaciones en el gen de la LH en individuos con alteraciones en la función reproductiva permitirá aumentar el conocimiento de la manera en la cual dicha hormona ejerce su función y determinar un mejor manejo terapéutico en casos de infertilidad primaria en población Mexicana.

3. HIPÓTESIS

Se encontrarán polimorfismos del gen de la LH específicos para la población Mexicana. En los pacientes con infertilidad primaria es probable que se encuentren mutaciones en el gen de la LH que expliquen la alteración.

OBJETIVOS

Identificar mutaciones y/o polimorfismos de la LH y su posible relación con la infertilidad primaria en pacientes mexicanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las variantes polimórficas del gen de la LH presentes en población mexicana
- Conocer si existen variantes o mutaciones del gen de la LH relacionadas con la infertilidad primaria

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

Se reclutó un total de 50 controles fértiles y 25 pacientes, a ambos grupos se les tomó una muestra de 20 mL de sangre, la cual se dividió en dos alícuotas, la primera para la extracción del DNA y la segunda para pruebas bioquímicas y cuantificaciones hormonales. Se registraron las medidas de cintura cadera estatura y peso, para calcular el Índice Cintura Cadera (ICC) y el índice de masa corporal (IMC). Una vez extraído el DNA se realizó el análisis de PCR-SSCP y secuenciación, posteriormente

CRITERIOS DE SELECCIÓN

SUJETOS CONTROL

Mujeres

- 25 a 40 años
- ciclos menstruales regulares

Hombres

- 25 a 55 años
- Seminograma normal

Para ambos sexos:

- Padres y abuelos mexicanos
- Tener por lo menos un hijo
- Perfil hormonal normal

PACIENTES CON INFERTILIDAD PRIMARIA IDIOPÁTICA

- Pacientes del Hospital Juárez de México
- Diagnóstico de infertilidad primaria idiopática.

El protocolo fue aprobado por el comité de Ética de Investigación en Humanos del Hospital Juárez de México. Todos los controles llenaron una carta de aceptación, en la que dieron su consentimiento de participación voluntaria en el proyecto (anexo).

6.2 Determinaciones bioquímicas

Se realizaron pruebas de glucosa, triglicéridos y colesterol, para las cuales se utilizaron estuches comerciales de Stanbio Laboratory.

Glucosa

El método empleado para la cuantificación de glucosa se basa en la oxidación de la glucosa en presencia de glucosa oxidasa (GOD) a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno formado, reacciona bajo la influencia de peroxidasa (POD) y 4-aminoantipirina para formar un complejo rojo violeta de quinona. La intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa.

Colesterol total

El método utilizado se basa la capacidad de la colesterol esterasa (CE) para hidrolizar los ésteres de colesterol produciendo colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre así producido, más el colesterol preformado se oxidan en presencia de colesterol oxidasa (Cox) resultando en colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno. Un cromógeno quinonaimina, con absorción máxima de 500 nm, se produce cuando el fenol se acopla oxidativamente con 4-aminofenazona, en presencia de peroxidasa (POD) con peróxido de hidrógeno. La intensidad del color rojo final es proporcional a la concentración total de colesterol.

Triglicéridos

Esta prueba se basa en la acción de la lipasa sobre los triglicéridos produciendo glicerol y los ácidos grasos. En una segunda etapa el glicerol se fosforila por el adenosin-5'-trifosfato (ATP) para producir glicerol-3 fosfato (G3P) y adenosin-5'-difosfato (ADP) en una reacción catalizada por la glicerol-cinasa (GK), de tal manera que el G₃P es oxidado por la glicerolfosfato oxidasa (GPO) produciendo dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno. Los peróxidos reaccionan con 4-aminoantipirina y 4-clorofenol bajo la influencia catalítica de la peroxidasa (POD) para formar una quinoneimina de color rojo. La intensidad del color rojo final es proporcional a la concentración total de colesterol.

6.3 Determinaciones hormonales

IRMA de LH y FSH

Se utilizaron los siguientes Kits comerciales: DSL-4600 ACTIVE ® LH Coated-Tube IRMA, DSL-4700 ACTIVE ® FSH Coated-Tube IRMA (Diagnostic Systems Laboratories). El ensayo inmunoradiométrico (IRMA) es un método no competitivo, en el cual, cuando el analito (LH o FSH) está presente se une a dos anticuerpos formando un complejo que queda unido a la fase sólida. El excedente de anticuerpo marcado se elimina por decantación y lavado (Miles LEM). Se añadieron 100 µL de los estándares, controles o muestras problema en el fondo de los tubos correspondientes, se adicionaron 100 µL de anticuerpos marcados con ^{125}I a cada tubo. Se incubaron todos los tubos durante dos horas a temperatura ambiente. Se decantaron todos los tubos, excepto los tubos de cuentas totales, Se realizaron un tres lavados, excepto a los tubos para cuentas totales. La radioactividad se determinó en un contador gamma (1282 COMPUGAMMA CS, LKB Wallac) durante un minuto.

RIA de estradiol, progesterona y testosterona

Se cuantificaron por los siguientes kits DPC Coat-A-Count Estradiol, Active® PROGESTERONE RIA DSL-3900 y Active® TESTOSTERONE RIA DSL-4000.

En la técnica de RIA se tiene una cantidad fija de anticuerpo inmovilizado en un soporte sólido. La hormona marcada radiactivamente (^{125}I), compete con la hormona presente en la muestra a analizar. Después de la incubación, el antígeno unido se separa del antígeno libre por decantación. La cantidad de cuentas es inversamente proporcional a la cantidad de la hormona presente en la muestra (Abbas Ak). Se añadieron 100 µL de los estándares, controles o muestras problema en el fondo de los tubos correspondientes, se adicionó una cantidad constante de hormona marcada con ^{125}I a cada tubo. Se incubaron todos los tubos durante dos horas a temperatura ambiente. Se decantaron todos los tubos, excepto los tubos de cuentas totales. La radioactividad se determinó en un contador gamma (1282 COMPUGAMMA CS, LKB Wallac) durante un minuto.

6.4 Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó a partir de 10 mL de sangre con 200µl de EDTA (0.5 M) pH 8.0. Se realizó un lavado con solución sacarosa-tritón 2X fría, el botón se lavó con 5 mL de solución sacarosa tritón 1X. Se adicionaron 3 mL de amortiguador de lisis nuclear y se resuspendió el precipitado, se añadieron 108 µl de SDS al 20% más 100 µl de proteinasa K (5 mg/mL) se incubó la mezcla a 37°C toda la noche se transfirió a tubos cónicos estériles de 15 mL y se agregó 1 mL de NaCl saturado, se centrifugó a 2,168 g durante 15 min. Se adicionaron 2 volúmenes de ETOH al 100% al sobrenadante, se obtuvo el DNA precipitado, se lavó con ETOH al 70% moviendo suave la pipeta. Se dejó secar completamente el DNA, se resuspendió en 200 µl de buffer T/E. Para la cuantificación de DNA se utilizó una dilución 1:200, midiendo su pureza espectrofotométricamente (260/280 nm), teniendo una relación de entre 1.7-2.0.

6.5 Diseño de oligonucleótidos para el gen de LHβ

Los oligonucleótidos fueron diseñados en base a la secuencia reportada en el GeneBank No. de Acceso X00264.

Exón	Secuencia	Tamaño	Temperatura de alineamiento
2	F2 GGTCTGAATAGGAGATGCCA R2 CCATTCCCCAACCGCAGG	400 pb	60°C
3	F3 GAGCGCGAACCACCTGGCCAGCCTC R3 GTGGAGCCGAGAGTCAACTCGATC	350 pb	65°C

6.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Por cada tubo se agregó 1 µL de DNA, 2.5 µL de Buffer 10X, 20 µM de cada oligo y de cada dNTP's, 1 µL de DMSO y 5 U/ml de Taq polimerasa. La amplificación de la reacción

se realizó en el termociclador (Mastercycler *gradient* eppendorff), en 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 95°C durante 30 seg, una temperatura alineamiento de 65°C durante 30 seg, y una temperatura de extensión de 72°C durante 30 seg. Se verificó que la reacción se llevara a cabo correctamente, corriendo un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y amortiguador TBE1X durante 45 min a 80 Volts.

6.7 Polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP)

La sustitución de una sola base es suficiente para alterar la movilidad de la cadena de DNA que es sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizados con o sin glicerol, el método fue modificado con base en el reportado por Orita y cols. (Orita M). Se mezclaron 2 µl del producto de PCR y 28 µl amortiguador de carga para SSCP, se desnaturalizó a 95°C durante 5 min e inmediatamente después se colocó en hielo durante 5 minutos. Se depositaron 3 µl de las muestras en el gel de acrilamida. Se corrieron a 190 V durante 22 horas. Al terminar el gel se transfirió a un papel de 3 mm de espesor, y se secó en el desecador (Gel Dryer Labnet), durante una hora a 75°C. El gel, ya seco se colocó en un cassette y se expuso a una placa radiográfica, durante 24 h, para después revelarlo.

6.8 Purificación del ADN

El amplificado se purificó para realizar la secuenciación utilizando columnas CENTRICON YM-30, se añadió el producto de PCR en el frasco con la membrana, se agregaron 2 mL de agua bidestilada estéril. Se centrifugó a 8,000 g durante 30 min. Se invirtió la columna colocando un cono y centrifugándolo a 4400 g por 2min. El producto se cuantificó espectrofotométricamente en una dilución 1:200, y se corrió un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para verificar la talla, concentración y la pureza.

6.9 Secuenciación manual método de Sanger

La técnica de Sanger utiliza la síntesis de ADN para generar fragmentos terminales en puntos específicos a lo largo de una secuencia blanco (Sanger F). El rompimiento de la

secuencia de ADN va seguido de la introducción de dideoxinucleósidos trifosfatos (ddNTPs), análogos de nucleósidos, los cuales pueden ser sustituidos por deoxinucleósidos en una posición al azar durante la etapa de copiado de una de las hebras del ADN, así como también terminar la síntesis del ADN de manera específica. Utilizando los ddNTPs correspondientes a las bases nucleotídicas por separado en reacciones de síntesis, se pueden generar cuatro poblaciones de oligonucleótidos, que determinan cada posición en la hebra del ADN. Las bandas de ADN, por tanto pueden ser corridas en un gel por medio de una electroforesis, y la secuencia ser deducida a partir del orden de corrimiento de las bandas. Se efectuaron las reacciones de amplificación con un KIT Secuencia de Amersham (OH USA) número de catálogo 79760KT. Estas reacciones contenían desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), marcados radiactivamente [α - ^{33}P] número de catálogo AH9539 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). En cada tubo se agregó 0.5 μl de cada uno de los desoxinucleótidos marcados, mastermix dGTP (7.5 μM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2.0 μl , buffer de reacción (concentrado) 2.0 μl , termosecuencia DNA polimerasa (4 U/ml), oligonucleótido 1.0 μl , ADN a una concentración entre 25-250 fmol y ddH₂O hasta alcanzar un volumen total de 20.0 μl . La amplificación se realizó en el termociclador (mastercycler gradient eppendorf), en 35 ciclos de 95°C durante 30 seg, 65°C durante 30 seg y 72°C durante 1 minuto. Al terminar se adicionaron 4 μl de la solución STOP. Se preparó el gel de acrilamida-urea, las muestras se desnaturalizaron a 70°C durante 5 min, y 5 min en hielo, se depositaron 4 μl de muestra en cada pozo dejándolo correr 2 horas la primera corrida y una hora y media la segunda corrida a 1800 V a 55°C. El gel se transfirió a papel 3 mm y se secó durante 60 min a 75°C con vacío. Posteriormente se expuso una placa de rayos X, en un casete, se dejó a temperatura ambiente durante 5 días y posteriormente se revelaron las placas. Se leyeron las secuencias de los exones estudiados y se compararon con las secuencias ya reportadas en el banco de genes.

6.10 Ensayo de actividad biológica

Se utilizó la línea celular HEK 293, transfectada con el receptor recombinante de LH, donada por el Dr. Aarón J. W. Hsueh, Stanford University, CA, EUA. Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), bajo en glucosa, que

contenía 5% de suero fetal bovino (Gibco, BRL), 100 mg/mL de geneticina (Sigma Chemicals Co.) y 100 mU/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina (Gibco BRL) a un pH de 7.2 - 7.3, las células se incubaron en condiciones estándar 37°C y 5% de CO₂. Para la cuantificación de AMPc producido por las células en respuesta al estímulo con LH, se cultivaron en placas de 6 pozos, a cada pozo se le agregaron 300 µL de medio de cultivo conteniendo 0.125 mM de MIX, 200,000 células, 100 µL de la dosis estándar o la muestra desconocida de LH. El ensayo se incubó por 24 h a 37°C, transcurrido este tiempo las células y el medio fueron aspirados y el producto obtenido fue calentado a ebullición por tres minutos y posteriormente almacenado a -20 °C hasta el momento de la cuantificación por RIA. El AMPc total fue cuantificado utilizando el kit de IMMUNOTECH.

6.11 Análisis Estadístico

Los resultados de las determinaciones bioquímicas y hormonales se compararon utilizando ANOVA y la prueba "t" de Student no pareada, empleando el programa estadístico Graph Pad Prism versión 3.0, Graph Pad Software Inc. San Diego, CA. El cálculo de las frecuencias alélicas y su análisis con la prueba χ^2 se realizaron con el programa POPGENE versión 1.31. Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar de la media (EEM). Los valores de p menores a 0.05 fueron considerados significativos.

7. RESULTADOS

Se reclutaron como sujetos control 25 mujeres y 25 hombres, además de 25 pacientes. Los resultados de las pruebas realizadas se muestran a continuación.

7.1 Mediciones antropométricas

Se midió la estatura, peso, cintura y cadera en los sujetos control y pacientes, con estos datos se calculó el índice de masa corporal (IMC) y el índice cintura cadera (ICC) los resultados se muestran en la tabla 5. Todas las medidas antropométricas en los sujetos control se encontraron dentro de los límites de referencia. La medida de IMC fue significativamente diferente en los hombres con infertilidad comparada con los hombres control. Los valores de referencia del IMC son <25 normal, 25-30 sobrepeso y >30 obesidad, el valor normal de ICC es < 1.

	Peso	Estatura	Cintura	Cadera	IMC	ICC
Mujeres controles	57.8 ± 6.3	1.6 ± 12	78.3 ± 10.1	97.5 ± 8.1	23.2 ± 0.8	0.80 ± 0.01
Hombres controles	76.6 ± 7.1	1.71 ± 9.2	96.5 ± 11	104.5 ± 5.4	23.1 ± 0.7	0.87 ± 0.01
Mujeres Pacientes	79 ± 7	1.5 ± 0.2	96.4 ± 12.9	98.8 ± 7.3	26.5 ± 3.5	0.96 ± 0.07
Hombres pacientes	81.5 ± 13.5	1.6 ± 0.05	97 ± 13.2	99.2 ± 7.5	27.8 ± 4.9 ^a	0.97 ± 0.06

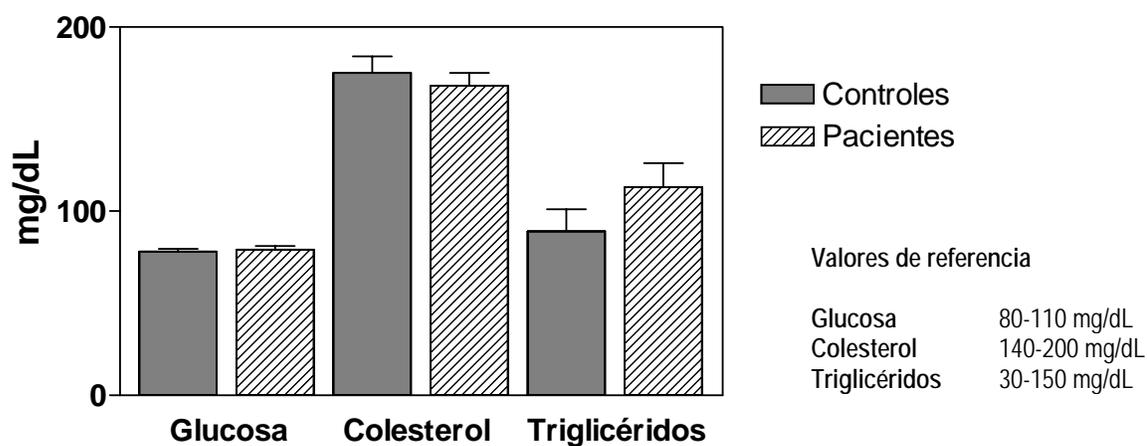
Tabla 5. Mediciones antropométricas de los sujetos control. Valores expresados como promedio ± EEM, ^aP<0.05 vs controles.

7.2 Determinaciones bioquímicas

Se realizó la cuantificación en suero de glucosa, colesterol y triglicéridos en controles y pacientes.

7.2.1 Mujeres

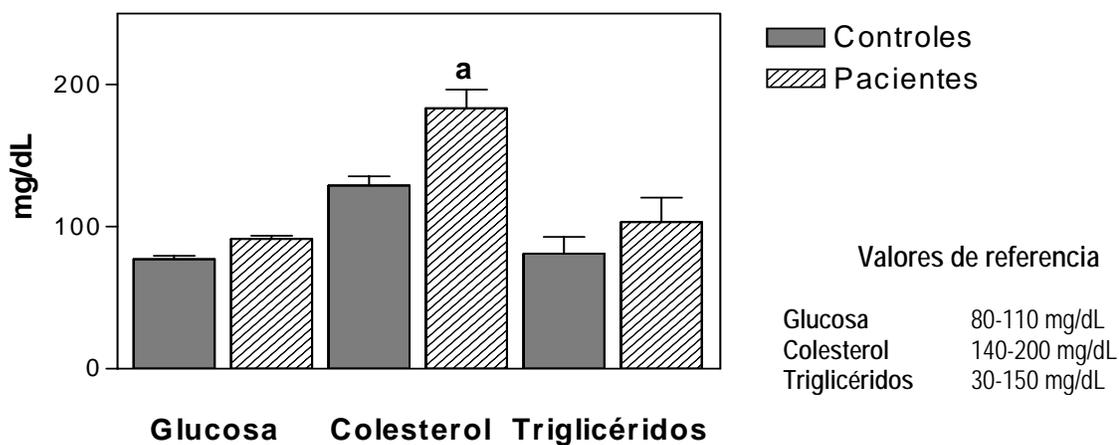
Los resultados de las determinaciones bioquímicas en las mujeres control y pacientes (gráfica 1) se encuentran dentro de los límites de referencia. No se encontró diferencia significativa entre controles y pacientes.



Gráfica 1. Determinaciones bioquímicas en mujeres control y pacientes. Valores expresados como promedio \pm EEM.

7.2.2 Hombres

Los resultados de la cuantificación de glucosa, colesterol y triglicéridos en los hombres control y pacientes (gráfica 2) se observaron dentro de los valores normales.

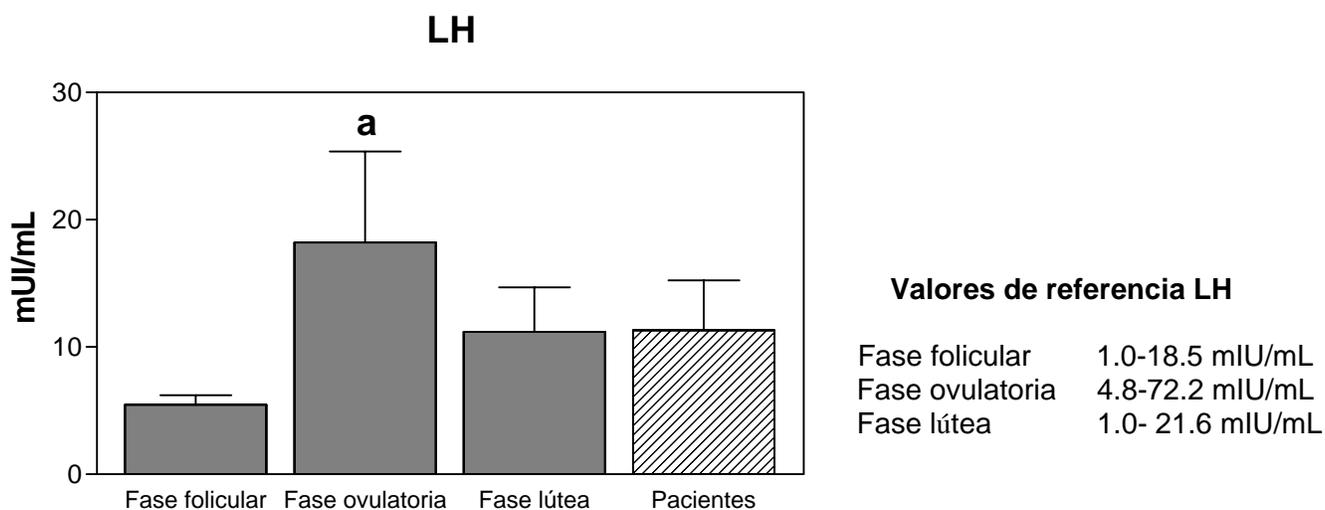


Gráfica 2. Determinaciones bioquímicas en los hombres control y pacientes. Valores expresados como promedio \pm EEM. ^a $P < 0.05$ vs controles.

7.3 Cuantificaciones hormonales

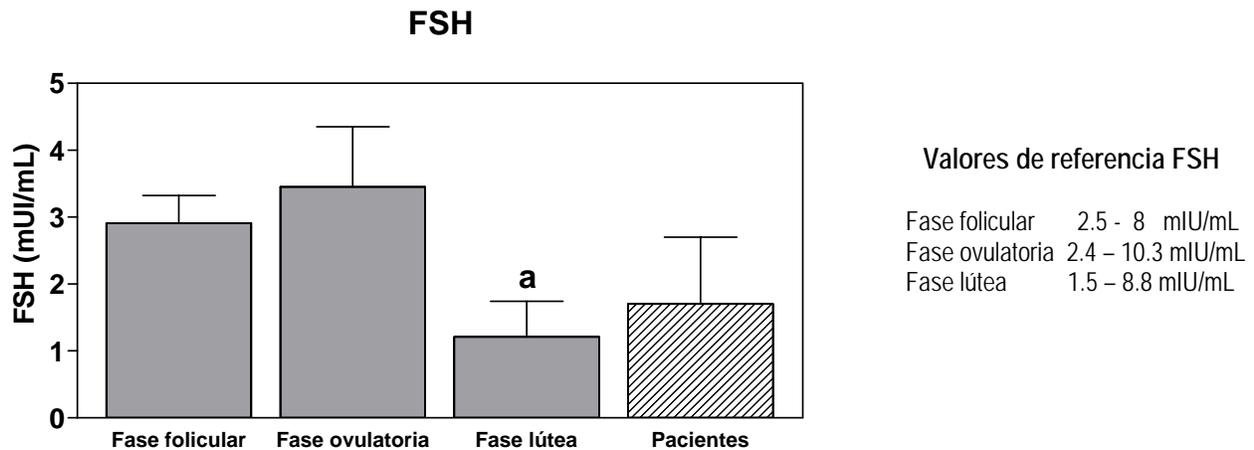
7.3.1 Mujeres

Los resultados de la cuantificación de la hormona luteinizante en mujeres control durante las tres fases del ciclo ovárico se muestran en la gráfica 3. Se observó un incremento significativo de la LH durante la fase ovulatoria. En el grupo de pacientes los niveles de LH fueron similares a los detectados en la fase lútea de las mujeres control.



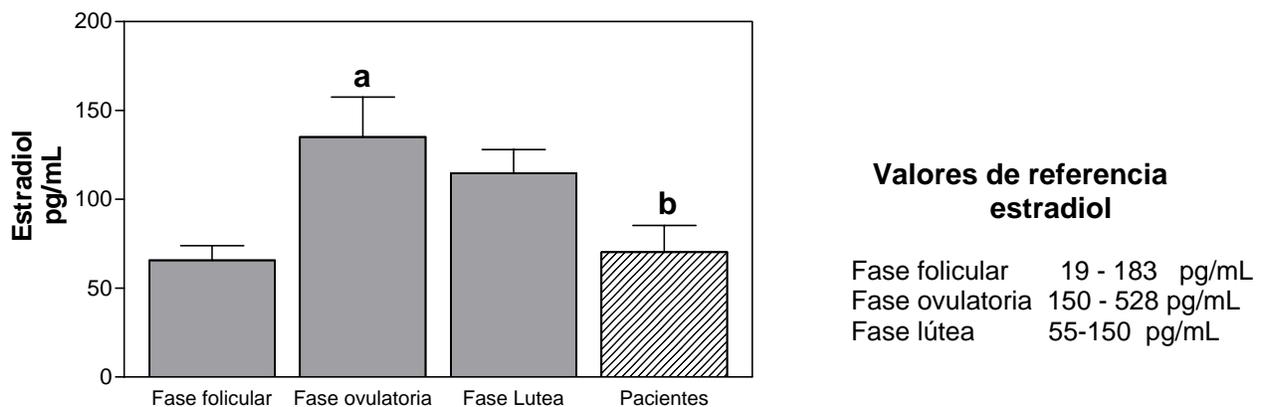
Gráfica 3. Cuantificación de LH en mujeres control en la fase folicular, ovulatoria y lútea y pacientes. Valores expresados como promedio \pm EEM, (n=25). ^aP < 0.05 vs Fase folicular.

Las concentraciones de la hormona FSH en los controles mostraron un patrón de secreción dentro de los valores de referencia para mujeres con ciclos normales (gráfica 4). En las pacientes los niveles fueron normales..



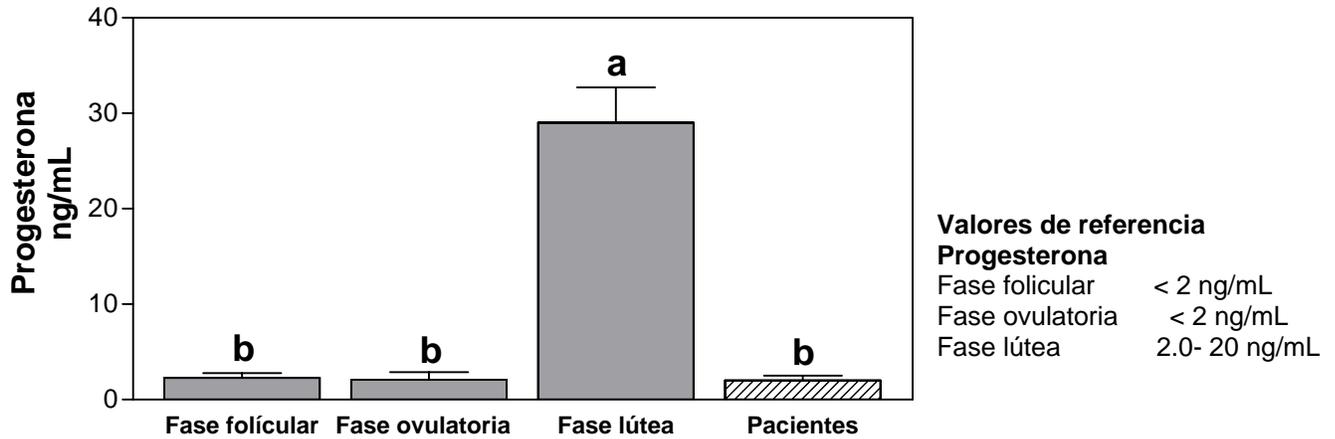
Gráfica 4. Cuantificación de FSH en mujeres control en la fase folicular, ovulatoria y lútea y pacientes. Valores expresados como promedio \pm EEM, (n=25). ^aP < 0.05 vs Fase ovulatoria.

En la grafica 5 se muestran los resultados de la cuantificación de estradiol en mujeres control. Se observó un aumento significativo de la concentración de estradiol durante la fase ovulatoria. En las pacientes los valores de estradiol fueron semejantes a los de la fase folicular de los controles.



Gráfica 5. valores de estradiol en mujeres control y pacientes. Valores expresados como promedio \pm EEM, (n=25). ^aP < 0.05 vs Fase folicular, ^bP < 0.05 vs Fase ovulatoria.

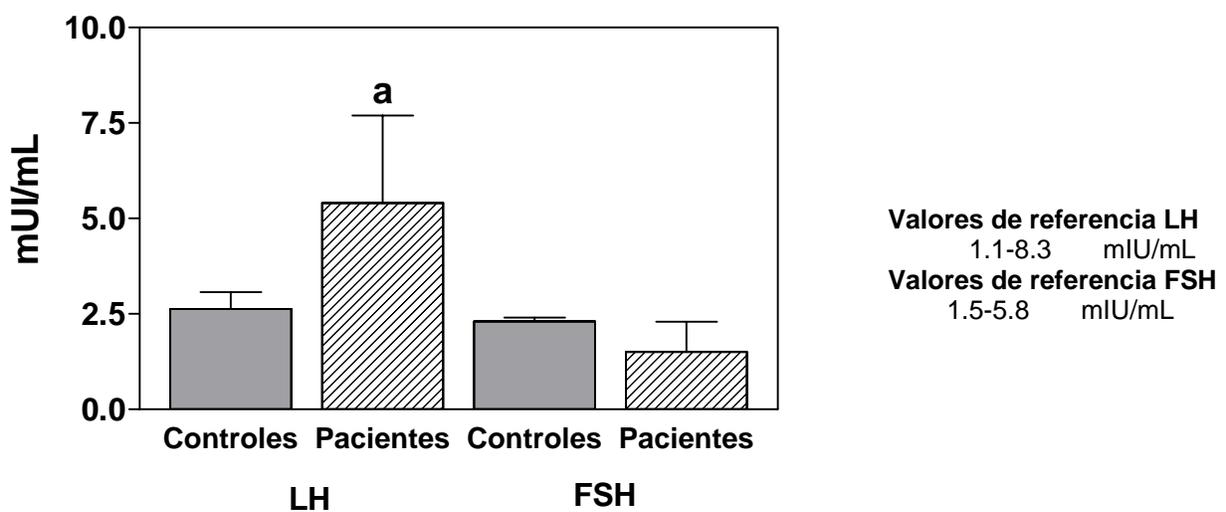
Los valores de progesterona durante la fase lútea aumentaron significativamente en las mujeres control (gráfica 6). En las pacientes no se observó incremento.



Gráfica 6. Cuantificación de progesterona en mujeres control (fase folicular, ovulatoria y lútea) y pacientes. Valores expresados como promedio \pm EEM, (n=25). ^aP < 0.05 vs Fase folicular, ^bP < 0.05 vs Fase lútea .

7.3.2 Hombres

Las determinaciones de hormona luteinizante y folículo estimulante en hombres control, se muestran en la gráfica 7, estas hormonas se encontraron dentro de los valores de referencia. En los pacientes se observa un aumento significativo de la LH con respecto a los controles, sin embargo, se encuentra dentro de los valores normales.



Gráfica 7 . Cuantificación de LH y FSH en hombres control. Valores expresados como promedio \pm EEM (n=25). ^aP < 0.05 vs controles

La cuantificación de estradiol y testosterona en hombres control y pacientes se muestra en la tabla 6. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

Hormona	Valor	Valores de referencia
Estradiol (pg/mL)	Controles (25) 30.1 ± 4.1	50
	Pacientes (13) 45.3 ± 17.1	
Testosterona (ng/mL)	Controles (25) 5.8 ± 0.7	3 – 10
	Pacientes (13) 8.6 ± 3.2	

Tabla 6. Cuantificación de estradiol y testosterona en hombres control. Valores expresados como promedio \pm EEM. () = n de individuos.

7.4 Pruebas moleculares

7.4.1 Amplificación del exón 2 por PCR en muestras de sujetos control

Se realizó la amplificación por PCR del exón 2 de la subunidad β de la LH, en la figura 4 se observa el corrimiento electroforético de los productos de la reacción de las muestras de los sujetos control. La temperatura de alineamiento fue de 60°C. Se utilizó un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se corrió durante 45 minutos a 85 v.

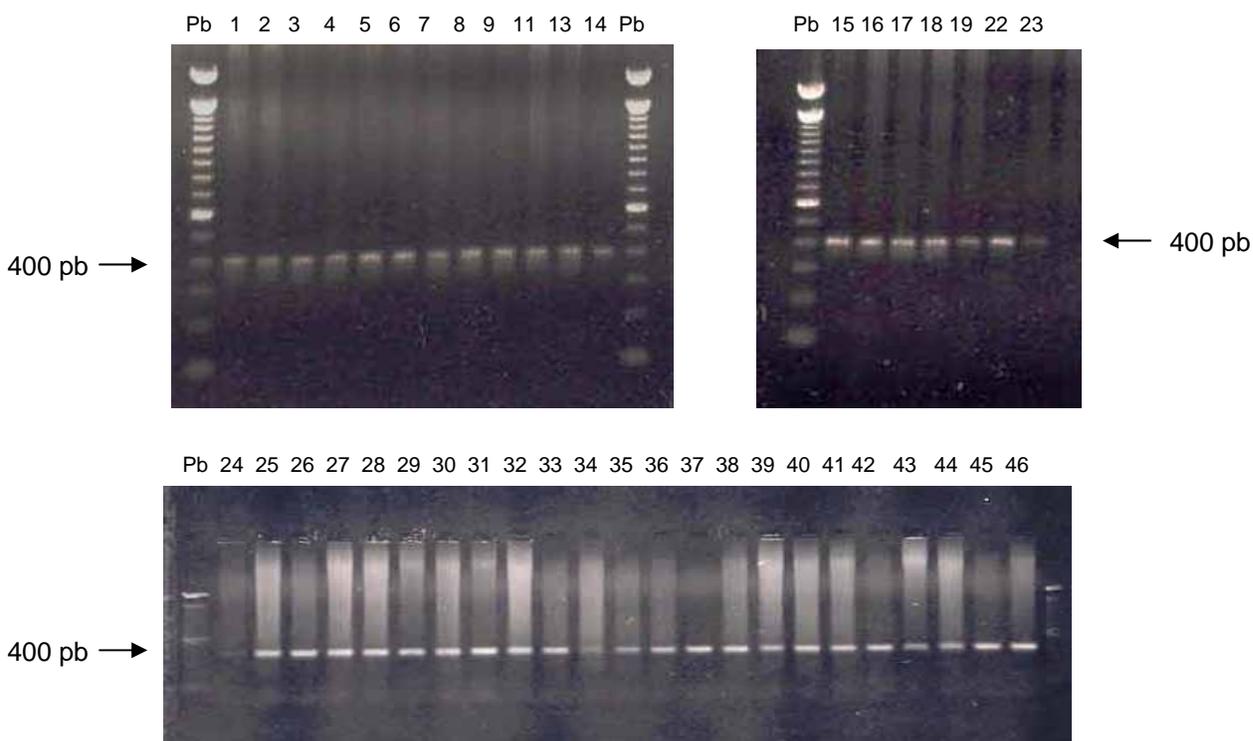


Figura 4. Amplificación del exón 2. Sujetos control.

7.4.2 Amplificación del exón 2 por PCR en muestras de pacientes

En la figura 5 se observa el corrimiento electroforético de los productos de la amplificación por PCR del exón 2 de las muestras de los pacientes. La temperatura de alineamiento fue de 60°C. Se utilizó un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se corrió durante 45 minutos a 85 V.

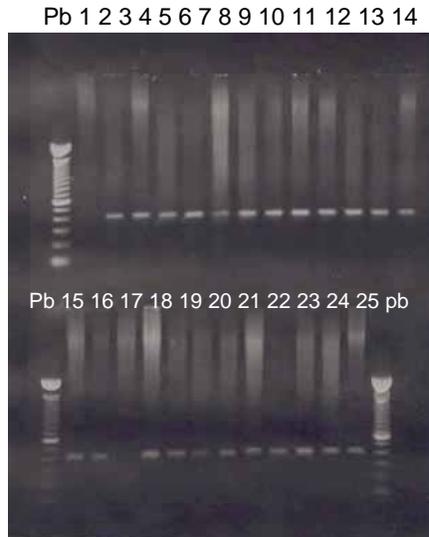


Figura 5. Amplificación del exón 2. Pacientes.

7.4.3 Análisis por SSCP controles.

Para cada exón del gen de la subunidad LH β se realizaron cuatro corrimientos electroforéticos, variando la concentración de acrilamida del gel, de la siguiente manera: 5.4% de acrilamida con y sin glicerol, y 8.0% de acrilamida con y sin glicerol. Los geles que no contenían glicerol corrieron por 18 h a 200V, mientras que los que contenían glicerol corrieron por 22 h a 200V. Un ejemplo de las cuatro condiciones de corrimiento para el análisis SSCP, del exón 2 en muestras de sujetos control se muestran en la figura 6, en estos geles se observaron tres diferentes patrones de migración señalados por las flechas, en el carril 1 en donde se distinguen siete bandas, en la muestra del carril 2 cuatro bandas y en el carril 3 cinco bandas. Se secuenciaron los patrones tipo C-2, C-3 y C-22.

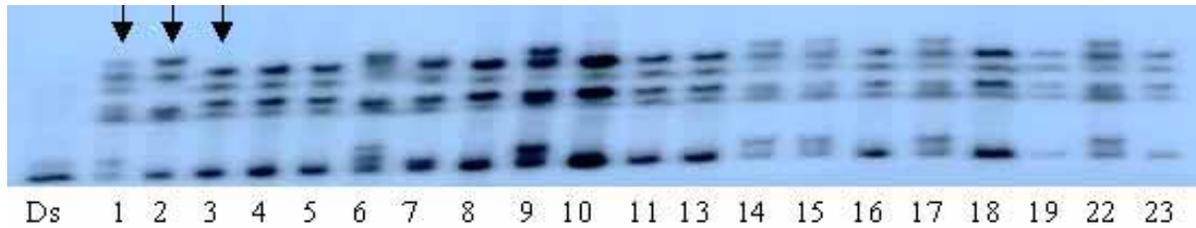
7.4.4 Análisis por SSCP pacientes.

En la figura 7 se muestran las cuatro condiciones de corrimiento para el análisis SSCP del exón 2 de las muestras de los pacientes, se observaron dos diferentes patrones de migración señalados por las flechas. Se secuenciaron patrones tipo I-5 e I-10.

SSCP, Exón 2

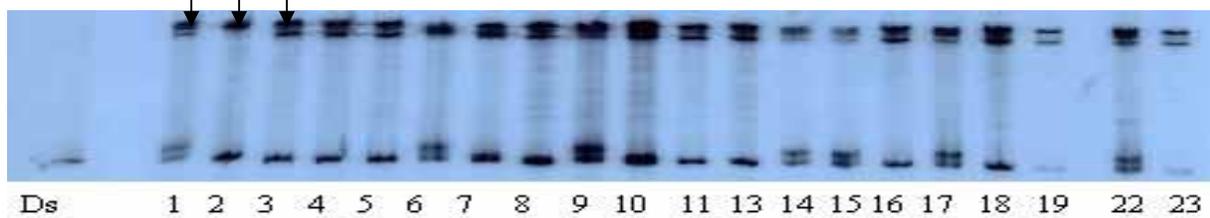
5.4% con glicerol

A



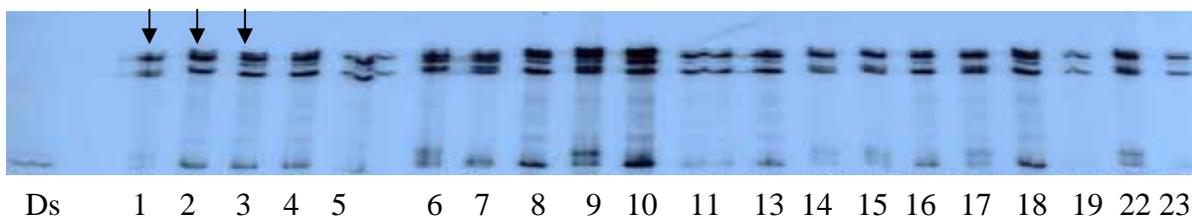
5.4% sin glicerol

B



8.0% con glicerol

C



8.0% sin glicerol

D

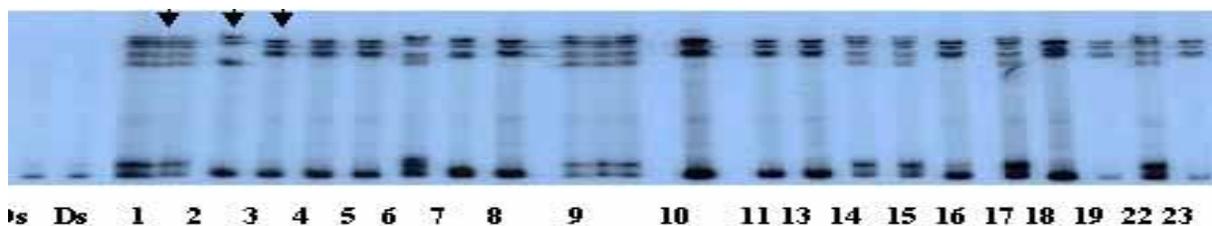
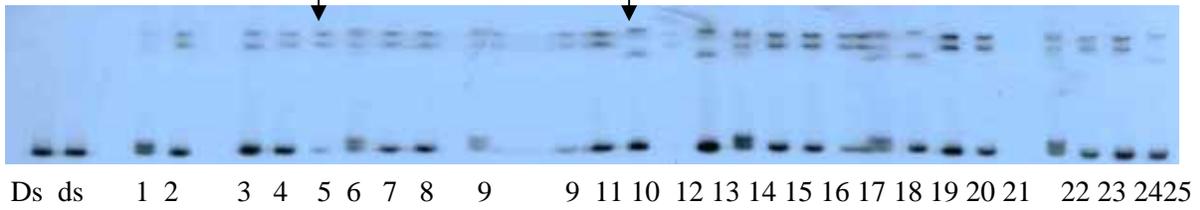


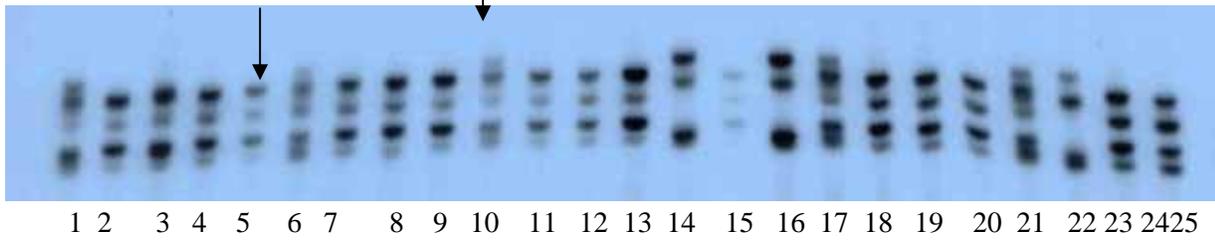
Figura 6. Análisis SSCP del ADN de los controles correspondiente al exón 2 del gen LHB. En la figura se muestran las SSCPs obtenidas: (A) 5.4% con glicerol. (B) 5.4% sin glicerol. (C) 8.0% con glicerol. (D) 8.0% sin glicerol. Las flechas indican los diferentes patrones de migración. DS= doble cadena.

SSCP, Exón 2

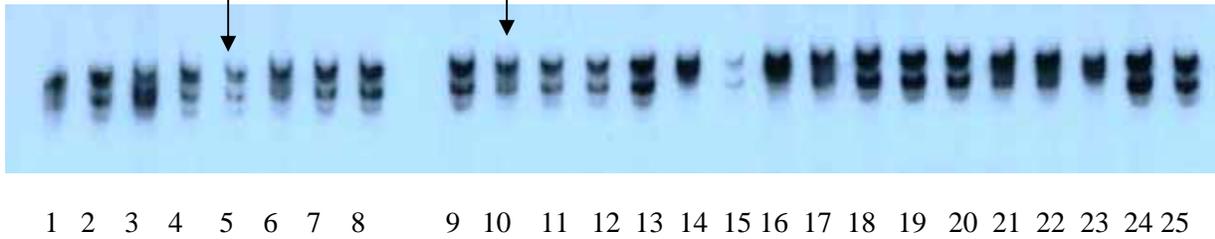
5.4% con glicerol   **A**



5.4% sin glicerol  **B**



8.0% con glicerol   **C**



8.0% sin glicerol   **D**

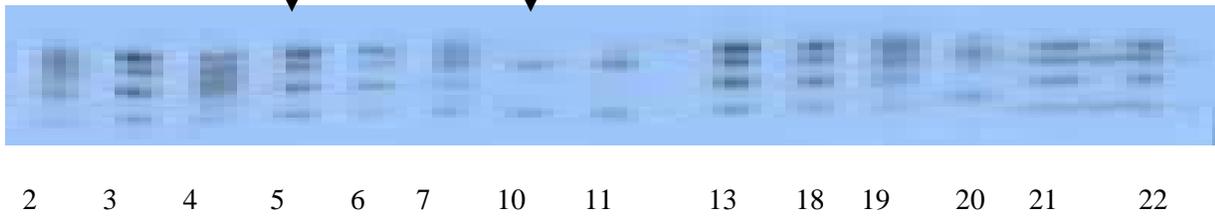


Figura 7. Análisis SSCP del ADN de los pacientes correspondiente al exón 2 del gen LHB. En la figura se muestran las SSCPs obtenidas: (A) 5.4% con glicerol. (B) 5.4% sin glicerol. (C) 8.0% con glicerol. (D) 8.0% sin glicerol. Las flechas indican los diferentes patrones de migración.

7.4.5 Purificación de ADN

En base al corrimiento electroforético de las SSCP's del exón 2 de los controles, se eligieron las muestras para secuenciar: C-2, C-3, C-22 y C-27 las cuales presentaron diferentes patrones de migración.

En la figura 8A se muestra el producto del PCR de la amplificación del exón 2 en las muestras C-2, C-3 y C-22. Posteriormente se realizó la purificación del amplificado que se muestra en la figura 8B en todas las muestras.

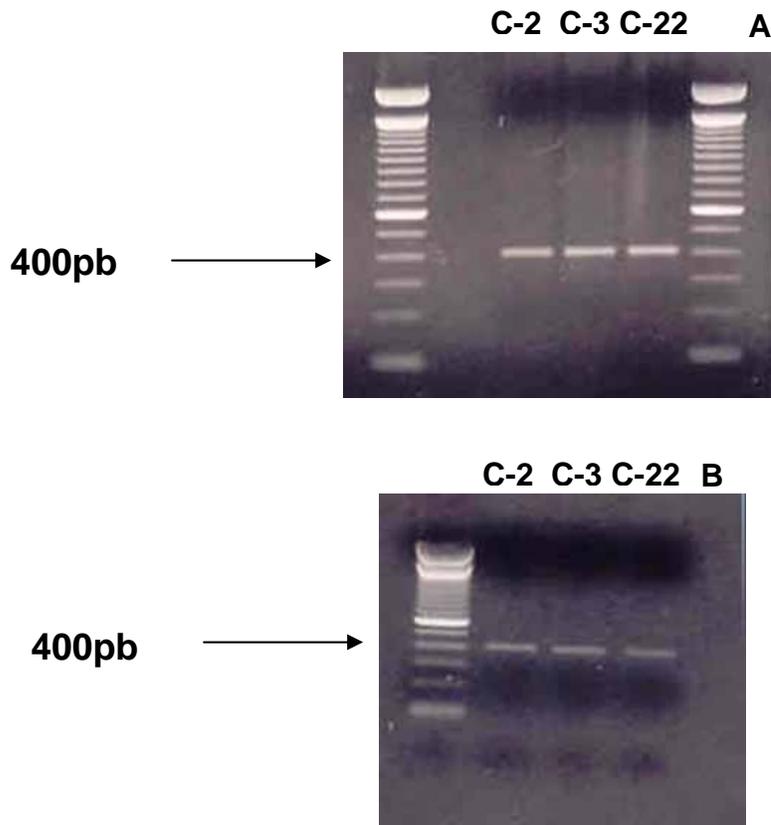


Figura 8 purificación del producto de PCR, amplificación del exón 2 del gen LHB. A) PCR, B) Producto purificado.

7.4.6 Secuenciación del exón 2. Controles y pacientes

En la figura 9 se observa la secuenciación manual del exón 2 del gen de LH β para las muestras de los controles C-2, C-3 y C-22, la secuencia se comparó con la reportada en el GenBank (número de acceso X00264). El alineamiento múltiple de secuencias reveló que las secuencias C- 2 y C-3 (figura 9A y 9C), coinciden con la secuencia silvestre, mientras que la muestra C-22 (figura 9B) presenta un cambio de nucleótido 889 c/t en el intrón 1-2 y posee ambos alelos.

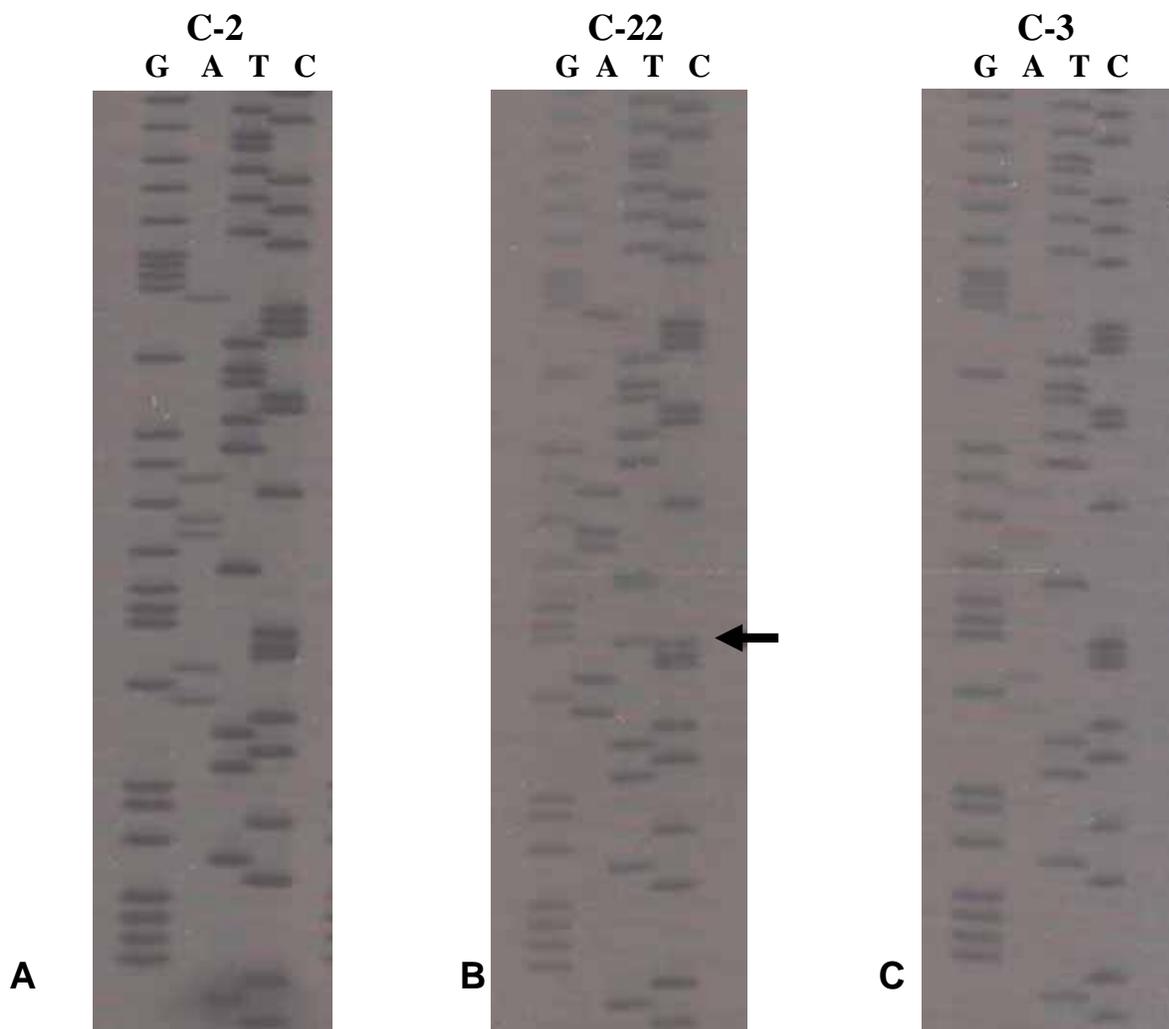


Figura 9. Secuenciación del exón 2 del gen LHB, A) C-2, B) C-22 y C) C-3. La flecha indica el cambio en la secuencia.

Al comparar la secuenciación automática del exón dos de la muestra C-2 (figura 10) con la secuencia reportada en el GenBank (número de acceso X00264) se encontraron 2 cambios, el primero se encontró en la zona intrónica 1-2 en el nucleótido C₈₈₉T, el siguiente es un cambio silencioso en el codón GTG₁₀₃₄GTC que codifica para valina. El sujeto es homocigoto para todos los cambios.

En la secuencia del exón 2 de la LH sujeto C-3 se encontró un cambio (figura 11), una mutación silenciosa en el codón CCA₁₀₁₈CCC que codifica para prolina. El sujeto es portador homocigoto para este cambio.

En la figura 12 se muestra la secuenciación automática para el control C-22 se observaron dos cambios heterocigotos, el primero en el nucleótido C₈₈₉T en la zona intrónica 1-2, el segundo un cambio silencioso en el codón CCA₁₀₁₈CCC que codifica para prolina.

Se amplificó por PCR el exón 2 de la subunidad β de la LH para las muestras I-5 e I-10, posteriormente se purificó el producto de la reacción y se realizó la secuenciación automática.

En la figura 13 observamos la secuenciación automática para la muestra del paciente I-5, la secuencia coincide con la reportada en el GenBank (número de acceso X00264).

En la figura 14 se muestra la secuenciación de la muestra del paciente I-10 se encontraron tres cambios en la secuencia. El primero en la zona intrónica C₈₈₉T, el siguiente se identificó en el codón TGG~~82~~CGG dando por resultado el cambio de triptofano por arginina (Trp~~8~~Arg) y por último en el codón ATC~~104~~ACC la sustitución de isoleucina por treonina (Ile~~15~~Thr). El paciente es heterocigoto para los cambios encontrados en el exón 2.



Figura 10. Secuenciación del exón 2 de LHB control 2

S/N G:1536 A:793 T:1030 C:1540

KB.bcp

KB 1.1.1 Cap:15

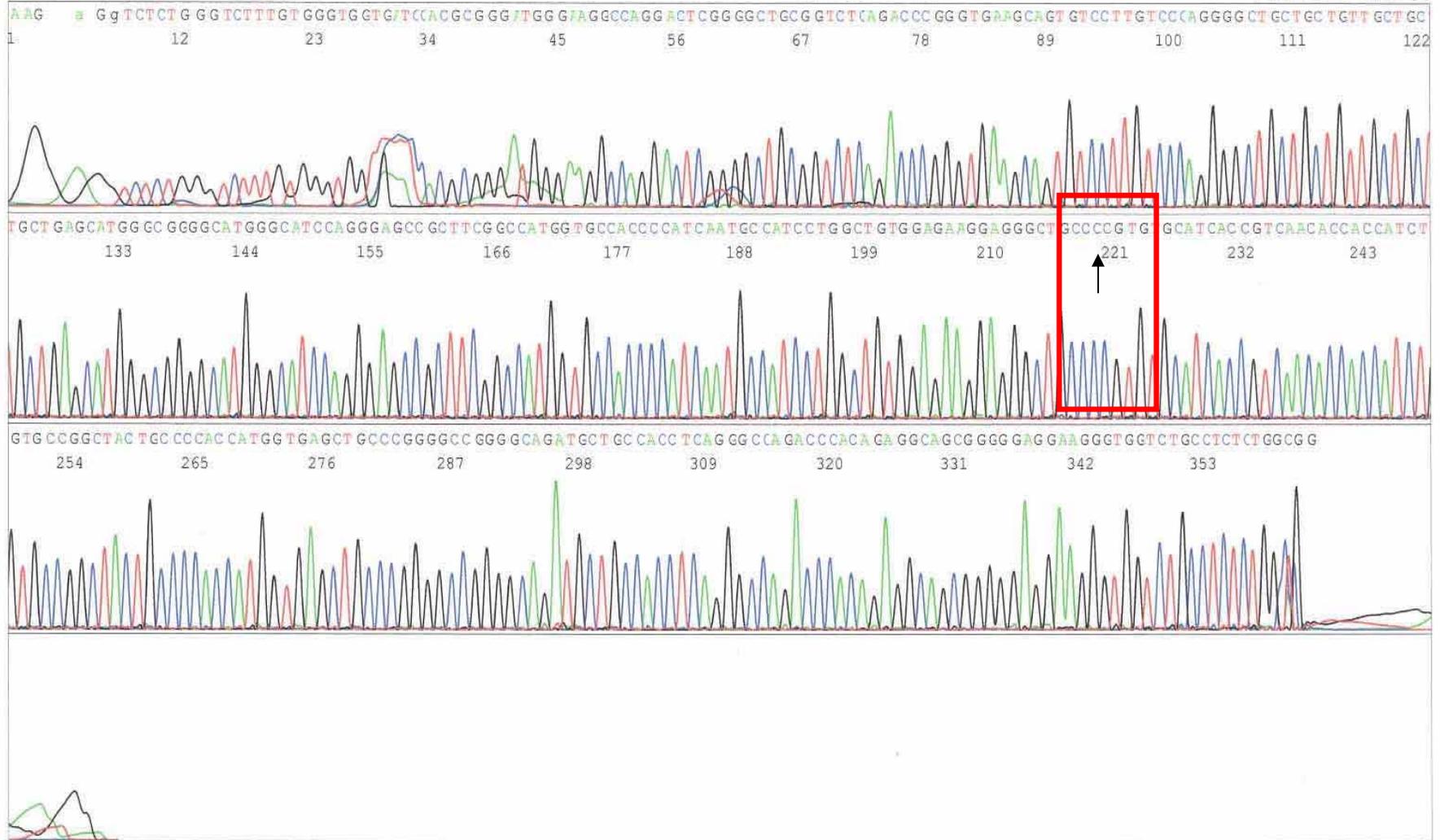


Figura 11. Secuenciación del exón 2 de LHB control 3

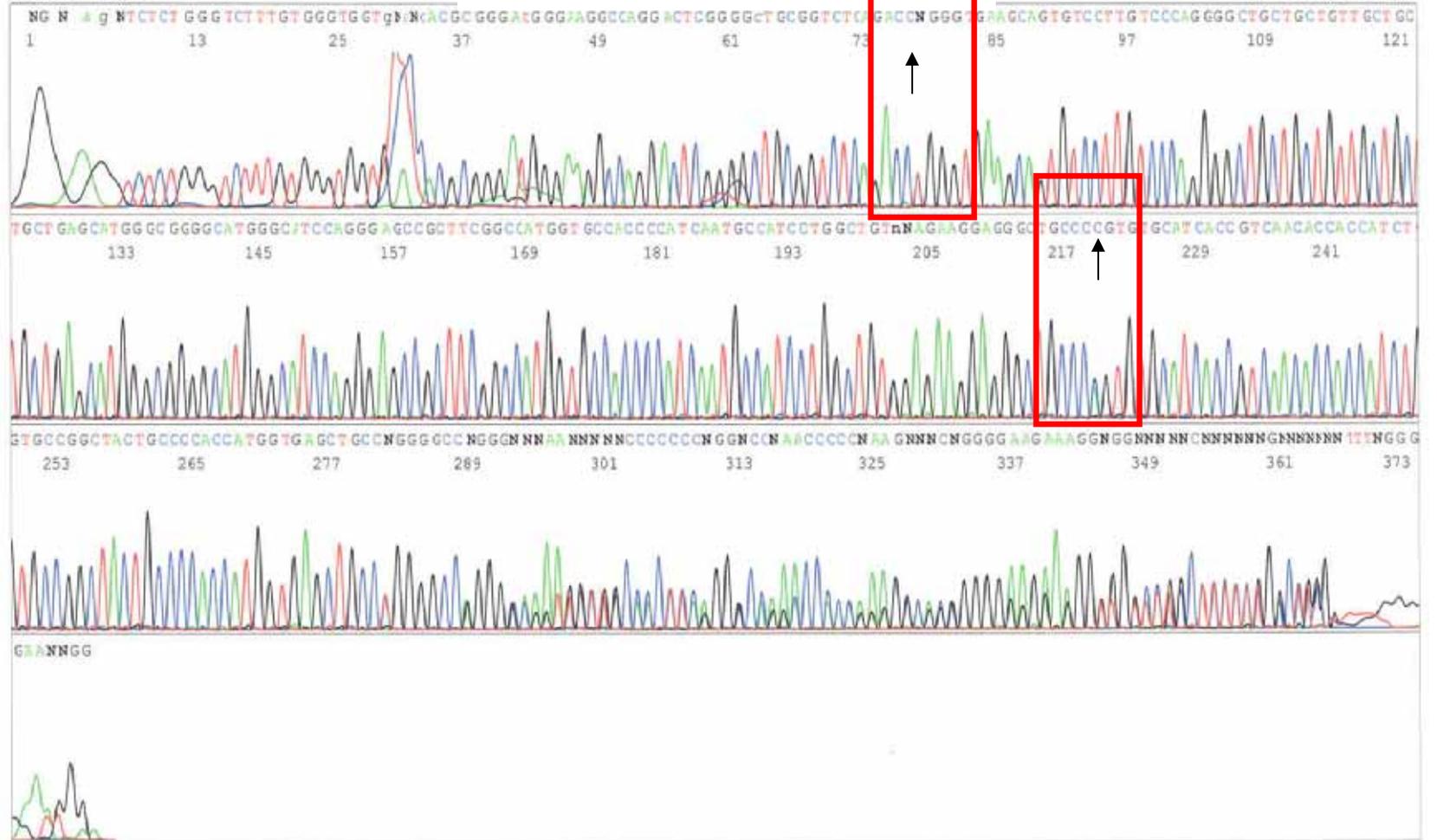


Figura 12. Secuenciación del exón 2 de LHB control 22

S/N G:485 A:169 T:261 C:311

KB.bcp

KB 1.1.1 Cap:5

Vi

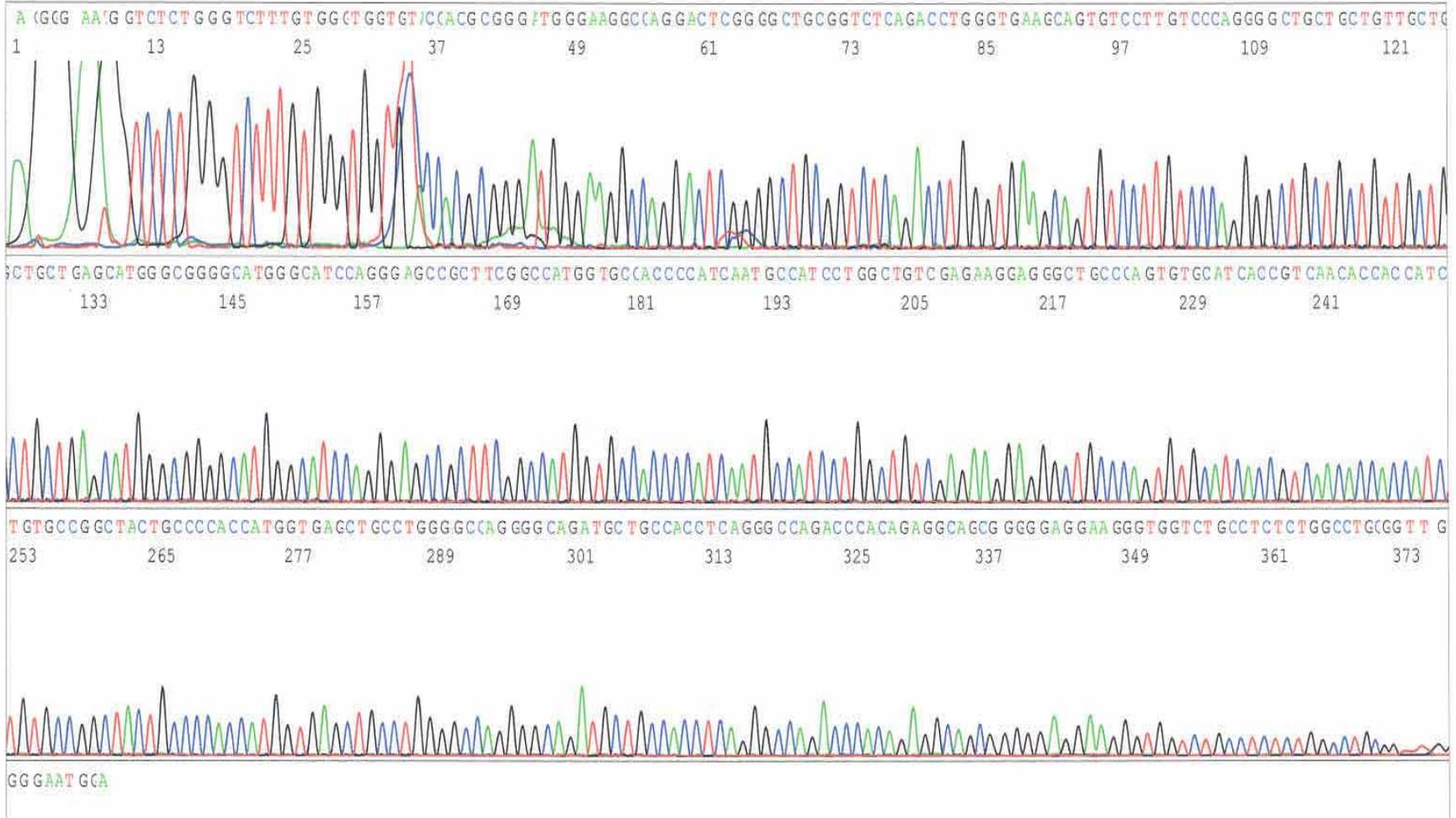


Figura 13. Secuenciación del exón 2 de LHB paciente I-5

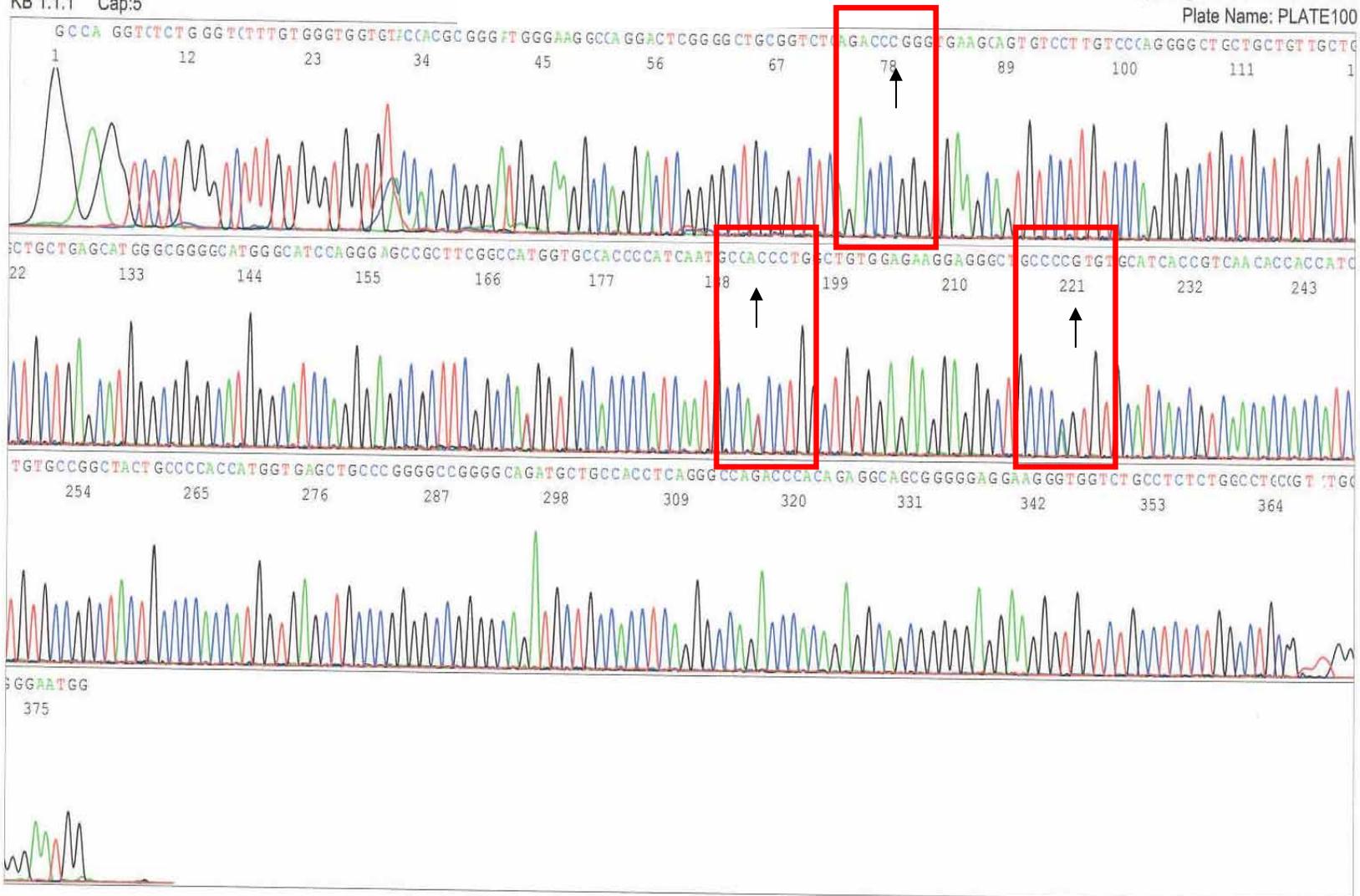
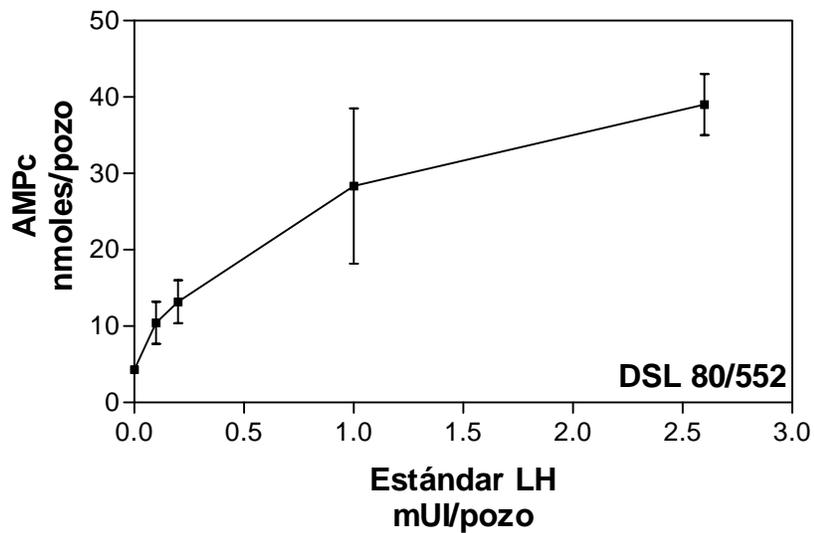


Figura 14. Secuenciación del exón 2 de LHB paciente I-10

7.5 Bioensayo de actividad biológica

En la gráfica 8 se muestra la curva de dosis respuesta al estímulo de las células HEK-293 hLHr con dosis crecientes del estándar de LH (80/552), los resultados se expresan en términos de síntesis de AMPc. El ensayo se realizó por triplicado.



Gráfica 8. Producción de AMPc por las células HEK 293-hLHr, en respuesta al estímulo con el estándar de LH 80/552.

7.5.1 Relación bioactividad/inmunorreactividad

Para el bioensayo de actividad biológica se cuantificó la producción de AMPc en células HEK 293-hLHr, en respuesta al estímulo con el suero de los sujetos control o pacientes. Cada suero fue probado individualmente por duplicado, utilizándose tres diferentes concentraciones del mismo. La relación B/I se calculó con los resultados del bioensayo y de la cuantificación de LH por IRMA. En la tabla 7 se muestran los valores de actividad biológica, inmunológica y la relación B/I correspondientes al tipo de variante de LH encontrada en sujetos control. No hubo diferencia significativa al comparar las tres variantes tanto en hombres como en mujeres control.

Controles Mujeres	Biológica mUI/mL	Inmunológica mUI/mL	B/I
Silvestre n=12	4.8 ± 0.5	1.3 ± 0.7	8.1 ± 3.4
C ⁸⁸⁹ T GTG ¹⁰³⁴ GTC CCA ¹⁰¹⁸ CCC n=2	4.6 ± 0.4	1.1 ± 0.5	10.5 ± 2.4
C/T ⁸⁸⁹ CCA/C ¹⁰¹⁸ CCC n=9	3.9 ± 0.4	0.8 ± 0.5	10.8 ± 2.7
Controles Hombres	Biológica mUI/mL	Inmunológica mUI/mL	B/I
Silvestre n=14	3.4 ± 0.8	0.2 ± 0.08	14.2 ± 2.9
C ⁸⁸⁹ T GTG ¹⁰³⁴ GTC CCA ¹⁰¹⁸ CCC n=4	3.1 ± 0.3	0.4 ± 0.03	8.6 ± 1.4
C/T ⁸⁸⁹ CCA/C ¹⁰¹⁸ CCC n=7	3.2 ± 0.6	0.5 ± 0.2	10.4 ± 0.9

Tabla 7. Resultados de la cuantificación de la actividad biológica, inmunológica y la relación B/I de acuerdo al tipo de variante de LH en controles. Los valores se expresan como promedio ± EEM. ^aP < 0.05 vs mujeres.

En la tabla 8 se muestran los valores de actividad biológica, inmunológica y la relación B/I correspondientes al tipo de padecimiento y variante de LH encontrada en las mujeres con diagnóstico de infertilidad. Únicamente se muestran los datos de las pacientes en las cuales se observó un cambio en el valor de la relación B/I.

Diagnóstico	Variante	B	I	B/I
Controles	Silvestre	4.8 ± 0.5	1.3 ± 0.7	8.1 ± 3.4
Mujeres Pacientes	Silvestre	3.6 ± 0.4	0.15±0.04	24 ± 2.4 ^a
	C/T ⁸⁸⁹ CCA/C ¹⁰¹⁸ CCC	1.8 ± 0.05	0.5±0.02	3.3 ± 0.05 ^a
	Silvestre	3.0 ± 0.15	0.2±0.02	14.7 ± 0.6
	Silvestre	2.6 ± 0.1	1.1±0.3	2.4 ± 0.1 ^a
	Silvestre	3.4 ± 0.45	^{3.8} 0.3±0.03	13.8±1.6

Tabla 8. Resultados de la cuantificación de la actividad biológica, inmunológica y la relación B/I de acuerdo al tipo de variante de LH en mujeres pacientes. Los valores se expresan como promedio ± EEM. ^aP < 0.05 vs variante silvestre mujeres.

En la tabla 9 se muestran los valores de actividad biológica, inmunológica y la relación B/I correspondientes al tipo de padecimiento y variante de LH encontrada en pacientes masculinos que muestran diferencias significativas en los valores de la relación B/I y en el paciente que presentó la variante Trp⁸Arg, Ile¹⁵Thr.

Diagnóstico	Variante	B	I	B/I
Controles	Silvestre	3.4 ± 0.8	0.2 ± 0.08	14.2 ± 2.9
Hombres pacientes	Silvestre	3 ± 0.6	1.9 ± 0.3	1.6 ± 0.5 ^a
	Silvestre	3.5 ± 0.4	0.52 ± 0.06	6.7 ± 0.9
	t82gg→cgg Trp8Arg at104c→acc Ile15Thr	5.2 ± 0.9	0.31 ± 0.04	16.6 ± 1.8

Tabla 9. Resultados de la cuantificación de la actividad biológica, inmunológica y la relación B/I de acuerdo al tipo de variante de LH en hombres con infertilidad. Los valores se expresan como promedio ± EEM. ^aP < 0.05 vs variante silvestre hombres.

7.5.2 Frecuencias alélicas

En la tabla 10 observamos la comparación de las frecuencias alélicas de las diversas variantes de LH encontradas, a pesar de que se observan algunas diferencias entre los grupos no fueron significativas.

CAMBIOS				CONTROLES		PACIENTES	
Posición	Localización	Alelo	Aminoácido	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
889	Intrón 1	C	-----	0.234	0.225	0.142	0.188
		T	-----	0.776	0.775	0.847	0.812
986	Exón 2	T	Trp	1.000	1.000	1.000	0.928
		C	Arg	0.000	0.000	0.000	0.072
1008	Exón 2	T	Ile	1.000	1.000	1.000	0.928
		C	Thr	0.000	0.000	0.000	0.072
1018	Exón 2	G	Val	1.000	0.800	1.00	1.00
		C		0.000	0.200	0.00	0.00
1034	Exón 2	C	Pro	0.467	0.800	1.00	1.00
		A		0.533	0.200	0.00	0.00

Tabla 10. Cálculo de la frecuencia alélica de las diversas variantes de LH encontradas

7.6 PCR Exón 3

En la figura 15 se muestra el corrimiento electroforético de los productos de la amplificación por PCR del exón 3 de la subunidad β de la LH. La temperatura de alineamiento fue de 65°C. Se utilizó un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se corrió durante 45 minutos a 85 v.

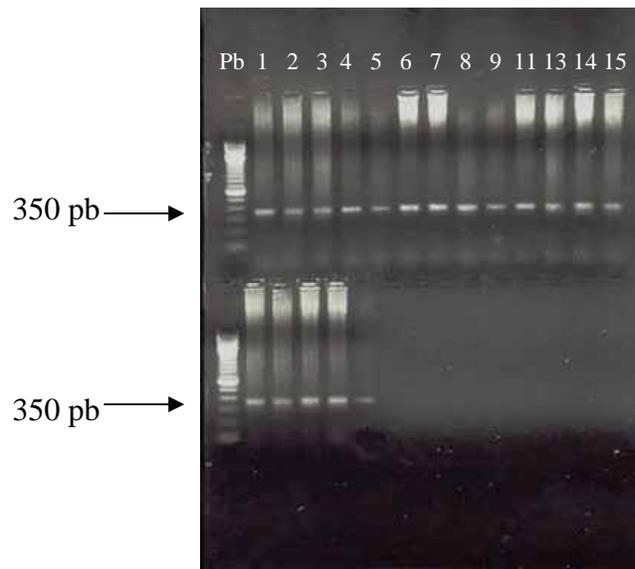


Figura 15. PCR exón 3

7.6.1 Análisis por SSCP exón 3

Se realizaron cuatro corrimientos electroforéticos, variando la concentración de acrilamida del gel: 5.4% de acrilamida con y sin glicerol, y 8.0% de acrilamida con y sin glicerol. Los geles que no contenían glicerol corrieron por 18 h a 200 V, mientras que los que contenían glicerol corrieron por 22 h a 200 V.

En la figura 16 se observa un ejemplo de SSCP para el exón 3, se muestran las cuatro condiciones de corrimiento del amplificado. En ninguna muestra de controles y pacientes se observó diferencia en el patrón de corrimiento.

SSCP, Exón 3

5.4% con glicerol

A



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

5.4% sin glicerol

B



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

8.0% con glicerol

C



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

8.0% sin glicerol

D



10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Figura 16. Análisis SSCP del ADN de los controles correspondiente al exón 3 del gen LHB. En la figura se muestran las SSCPs obtenidas: (A) 5.4% con glicerol. (B) 5.4% sin glicerol. (C) 8.0% con glicerol. (D) 8.0% sin glicerol.

8 DISCUSIÓN

El estudio de las diferencias genéticas entre las poblaciones nos ayuda, entre otras aplicaciones, a conocer de forma general características como la susceptibilidad a enfermedades o la manera en la cual se metabolizan ciertos fármacos (Evans).

En diversas investigaciones se han descubierto mutaciones y polimorfismos en los genes de las gonadotropinas y sus receptores asociados con retraso de la pubertad, desordenes hormonales e infertilidad (Layman LC). En México no existen estudios en este sentido, por lo que, los objetivos de este trabajo fueron identificar polimorfismos y mutaciones del gen de la LH y su asociación con la infertilidad primaria en la población mexicana. Así, en el presente trabajo el estudio molecular reveló la presencia de 5 SNP's en los pacientes con infertilidad primaria, tres de los cuales también fueron detectados en los sujetos control, mientras dos cambios fueron encontrados únicamente en un paciente.

Dentro de las determinaciones realizadas en este trabajo con el objeto de evaluar el incremento de peso en los sujetos control y pacientes se realizó el cálculo del índice de masa corporal (IMC) y el índice cintura cadera (ICC), ya que ambos son parámetros para determinar sobrepeso y obesidad (Villareal D). En las mujeres, la obesidad y la presencia de la grasa abdominal está claramente asociada con el riesgo de padecer diabetes tipo 2, hipertensión, ovulación irregular y en algunos casos severos infertilidad (Jevitt CM.). En promedio los sujetos control obtuvieron resultados de IMC e ICC por debajo de 25 y 1 respectivamente, indicando que los controles no tenían sobrepeso ni obesidad (Tabla 5). En el caso de los pacientes, las mujeres presentaron valores normales para los dos índices, mientras algunos de los hombres poseían un $IMC > 25$ lo que indica sobrepeso (Tabla 5). En los varones la obesidad está asociada a la pubertad retrasada y aumento en los niveles séricos de estrógenos así como disminución de los niveles de andrógenos (Hammoud A), no obstante, el sobrepeso no se ha relacionado con estas alteraciones.

Con la finalidad de descartar cambios metabólicos que pudieran alterar las cuantificaciones hormonales independientemente de la variante de LH que portaran, se realizaron cuantificaciones de glucosa, colesterol y triglicéridos (Gráfica 1 y 2) en los controles y pacientes, se ha reportado que niveles altos de glucosa e insulina se asocian con un aumento en la síntesis de andrógenos, como se observa en el síndrome de ovario poliquístico (Abbas K;Holte J), adicionalmente, el aumento de colesterol y lípidos dan como resultado problemas de disminución de la fertilidad. (M Mitchell;Papadopoulos V). Tanto los sujetos control como los pacientes presentaron perfiles bioquímicos dentro de los parámetros de referencia, lo que nos permitió determinar la ausencia de factores que contribuyeran a la infertilidad.

Para evaluar el correcto funcionamiento de los diversos componentes del eje H-H-G se realizó el perfil hormonal (LH, FSH, estradiol, testosterona y progesterona), en las mujeres control dicho perfil mostró el patrón característico del ciclo menstrual (Gráfica 3, 4, 5 y 6), de manera que las concentraciones de LH y FSH incrementan hacia la mitad del ciclo (fase ovulatoria) y dicho aumento está asociado con el incremento del estradiol, ya que el inicio de la oleada de gonadotropinas es consecuencia de la acción de retroalimentación positiva del estradiol, otra característica es el aumento de progesterona en la fase lútea, resultado de la formación del cuerpo lúteo (Filicori M;Alliende ME), por otro lado, en las mujeres con infertilidad primaria, la cuantificación hormonal refleja la incapacidad del eje H-H-O de generar la expresión cíclica normal, cabe mencionar que las pacientes presentaban desordenes del ciclo menstrual y algunas amenorrea. En cuanto a la cuantificación hormonal en los hombres control los resultados se encontraron dentro de los valores normales (gráfica 7, tabla 6), mientras que en los hombres con infertilidad primaria la LH presentaron valores de LH significativamente mayores con respecto a los sujetos control, lo que es indicio de las alteraciones hormonales.

Es importante resaltar que se han detectado pocas mutaciones en los genes de las gonadotropinas, esto debido al papel fundamental de estas hormonas en la función reproductiva. Sin embargo, existen diversos polimorfismos que por su menor impacto en la fertilidad pueden ser detectados. De esta manera, en los pacientes con infertilidad primaria

las variantes encontradas fueron cinco SNP's, el primer cambio dentro del intrón 1-2 C₈₈₉-T y cuatro cambios dentro de el exón 2, de los cuales dos son los cambios silenciosos G₁₀₁₈-C (Pro) y C₁₀₃₄-A (Val) y dos mutaciones de sentido equivocado T₈₂C (Trp8Arg) y T₁₀₄C (Ile15Thr).

El cambio C₈₈₉-T se encuentra a 30 nucleótidos de distancia del sitio de inicio de la transcripción. En este sentido, se han asociado otras mutaciones cercanas al sitio de inicio del exón con la introducción de nuevos sitios de inicio de la transcripción, como en el caso de un tipo de hiperapolipoproteinemia en población japonesa, la cual es producida por una mutación intrónica (Nagano M). Sin embargo, al realizar la prueba de actividad biológica para las muestras de los portadores de la variante C₈₈₉-T no se encontraron cambios significativos con respecto a la variante silvestre (tablas 7, 8 y 9) adicionalmente, este cambio se encontró en los sujetos control fértiles con una frecuencia alélica semejante (tabla 9), por lo que es posible que este cambio no tenga efecto sobre la eficiencia de la transcripción, ya que tanto la cantidad de hormona como su actividad son normales.

Por otro lado, los cambios G₁₀₁₈-C (Pro) y C₁₀₃₄-A (Val) son mutaciones silenciosas localizadas dentro del exón 2, este tipo de cambios, a pesar de no variar la secuencia de aminoácidos se han relacionado con alteraciones de la velocidad de la transcripción y splicing alternativo (Cáceres JF). Sin embargo, debido a que en las pruebas de cuantificación de LH y en el ensayo de actividad biológica no se encontró diferencia significativa con respecto a la variante silvestre, es claro que no tienen efecto sobre la transcripción ni el splicing, adicionalmente, estos cambios también se encontraron en sujetos control. Cabe mencionar que se encontraron portadores heterocigotos y homocigotos para todas las variantes en sujetos control y pacientes infértiles. Estas variantes de secuencia han sido reportadas en población japonesa con una frecuencia alélica semejante a la encontrada en el presente estudio (tabla 9) (Takashi K).

Los cambios en el exón 2 T₈₂C (Trp8Arg) y T₁₀₄C (Ile15Thr) únicamente fueron encontrados en un paciente. El sujeto de sexo masculino, 37 años y diagnóstico de infertilidad primaria presentaba azoospermia, niveles normales de LH (6.6m UI/mL), testosterona (4.9 ng/mL) y

estradiol (34.9 pg/mL) y niveles elevados de FSH (23.5 mUI/mL). La variante combinada T₈₂C (Trp8Arg) y T₁₀₄C (Ile15Thr) se encuentra ampliamente distribuida alrededor del mundo, con frecuencias que varían desde 0% hasta 52% (Nilsson C;Starka L) y ha sido asociada en población japonesa con alteraciones reproductivas, como trastornos menstruales e infertilidad, mientras que las mujeres finlandesas portadoras de la variante son fértiles (Akhmedkhanov A;Nilsson C;Suman L;Tapanainen JS). A pesar de que esta variante se ha relacionado con un aumento en la actividad biológica (Suganuma N), la muestra del paciente identificado como portador de la variante doble, no mostró cambios en la actividad biológica, probablemente por mecanismos compensatorios propios de su fondo genético Mexicano. Por otro lado, al realizar estudios de comparación entre la estructura de la hCG y la de la variante de LH que presenta este doble cambio, se ha propuesto la posibilidad de que el gen de la variante represente una forma ancestral de la LH, la cual está siendo reemplazada por la forma silvestre o actual, tal vez esto explique la baja frecuencia con la que se encontró esta variante en este estudio debido a que la población en América es evolutivamente más reciente, por lo que sería importante realizar un estudio de frecuencias de esta variante en una población antigua como la Africana (Talmadge K).

Se encontraron alteraciones de la actividad biológica en algunos pacientes (Tabla 8-9), sin embargo no se pudo correlacionar la variante de LH encontrada con esta alteración, a pesar de esto debe de hacerse una evaluación más profunda de cada uno de estos casos, ya que no se pueden descartar cambios en el gen de la LH no detectados porque escapan a la sensibilidad de la técnica de SSCP o por estar localizados dentro de las zonas intrónicas no estudiadas, así como también se debe investigar la presencia de otros factores desconocidos que afecten la función de la hormona. Adicionalmente debe de realizarse la búsqueda de polimorfismos y mutaciones en un grupo mayor de personas.

La variación genética esta determinada por mutaciones, procesos biológicos y demográficos, de manera que los cambios de secuencia que encontramos en la actualidad son resultado de la selección natural y las migraciones de nuestros ancestros. Especialmente, es importante conocer las variantes moleculares presentes en la población mexicana para evaluar padecimientos hereditarios y susceptibilidad a enfermedades.

9. CONCLUSIONES

La variante alélica Trp8Arg/Ile15Thr de la subunidad β de la LH es un polimorfismo común para diversas poblaciones del mundo incluida la mexicana, sin embargo, depende del fondo genético para que este se asocie con alteraciones endocrinas.

Las variantes alélicas C₈₈₉-T, G₁₀₁₈-C (Pro) y C₁₀₃₄-A (Val) del gen de la LH, no producen alteraciones de la actividad biológica y presentan una frecuencia similar en sujetos control y pacientes, lo cual las excluye como causa de infertilidad primaria en la población mexicana.

10. REFERENCIAS

1. Greenspan FS, Gardner DG. "Hipotálamo e Hipófisis." Endocrinología básica y clínica. Ed. Manual Moderno. 5ª ed. México: 111-130; 2003.
2. Nelson DL, Michael MC. "Integración y Regulación Hormonal del Metabolismo de los Mamíferos." Lehninger Principios de Bioquímica. Ed. Ediciones Omega. 3ª ed. España: 869-906; 2006.
3. Denton DA, McKinley MJ, Weisinger RS. Hypothalamic integration of body fluid regulation. Proc Natl Acad Sci 93[14], 7394-7404; 1996.
4. Yen SC, Robert BJ. "Hormonas Gonadotróficas: Biosíntesis, Secreción, Receptores y Acciones." Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico. Ed. Médica Panamericana. 3a ed. Argentina: 136-175; 1993.
5. Jennes L, Eyigor O, Janovick JA, Conn PM. Brain gonadotrophin releasing hormone receptors: localization and regulation. Recent Prog Horm Res 52, 475-491; 1997.
6. Marshall JC, Griffin ML. The role of changing pulse frequency in the regulation of ovulation. Hum Reprod 8, Suppl 2:57-61; 1993.
7. Krupnick JG, Benovic JL. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. Annu Rev Pharmacol Toxicol 38, 289-319; 1998.
8. Sealfon SC, Weinstein H, Millar RP. Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotrophin-releasing hormone receptor. Endocr Rev 18, 180-205. 1997.
9. Gray CJ. Glycoprotein gonadotropins. Structure and synthesis. Acta Endocrinol Suppl 288, 20-27; 1988.
10. Sairam MR. Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. FASEB J 3, 1915-1926; 1989.
11. Mi Y, Shapiro SD, Baenziger JU. Regulation of lutropin circulatory half-life by the mannose/N-acetylgalactosamine-4-SO₄ receptor is critical for implantation in vivo. J Clin Invest 109, 269-276, 2001.
12. Brown P, McNeilly AS. Transcriptional regulation of pituitary gonadotrophin subunit genes. Rev Reprod 4, 117-124; 1999.
13. Levine JE, Legan SJ, Meredith JM. Neuroendocrine regulation of the luteinizing hormone releasing hormone pulse generator in the rat. Recent Prog Horm Res 47, 97-151; 1991.
14. Plant TM, Marshall GR. The Functional Significance of FSH in Spermatogenesis and the Control of Its Secretion in Male Primates. Endocr Rev 22, 764-786; 2001.

15. Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev* 15, 462-99; 1994.
16. Tilbrook AJ, Clarke IJ. Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin releasing hormone in males. *Biol Reprod* 64, 735-42; 2001.
17. Means AR, Fakunding JL, Tindall DJ. Follicle-stimulating hormone, the Sertoli cell and spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 32, 477-527; 1976.
18. Arias P. "Endocrinología De La Reproducción." Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. Ed. Panamericana. 13a ed. Argentina: 659-99; 2003.
19. Richards JS. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev* 60, 51-89; 1980.
20. Carlson BM. "Preparación Para La Gestación." Embriología humana y del desarrollo. Ed. Ed.Harcut. 2a ed. España: 2-24, 2003.
21. Hodgen GD. The dominant ovarian follicle. *Fertil Steril* 38(3):281-300;1982.
22. Ferenczy A, Bergeron C. Histology of the human endometrium: from birth to senescence. *Ann NY Acad Sci* 622, 6-27; 1991.
23. Gougeon A, Busso D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Mol Cell Endocrinol* 163, 33-42; 2000.
24. Udoff L, Adashi E. Intraovarian growth factors and follicular development. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 3, 478-480; 1996.
25. Filicori M, Cognini GE. Roles in and novel regimens of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in ovulation induction. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1437-41; 2001.
26. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21, 200; 2000.
27. Chabbert-Buffet N, Bouchard P. The normal human menstrual cycle. *Rev Endocr Metab Disord* 3, 173-83; 2002.
28. Pru JK, Tilly JL. Programmed cell death in the ovary: insights and future prospects using genetic technologies. *Mol Endocrinol* 15, 845; 2001.
29. Filicori M. The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertil Steril* 71, 405-14; 1999.
30. Terranova PF. Regulation of the granulosa cell: growth factor interactions. *Semin Reprod Endocrinol* 9, 313-20; 1991.
31. Zeleznik AJ, Somers JP. Regulation of the primate corpus luteum: cellular and molecular perspectives. *Trends Endocrinol Metab* 10, 189-193; 1999.

32. Miller W. Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis. *Endo Rev* 9, 295-316. 1988.
33. Brown MS, Kovenen PT Goldstein JL. Receptor mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. *Recent Prog Horm Res* 35, 215-21. 1979.
34. Hales DB. "Cytokines and Testicular Function." Cytokines and Testicular Function. 1 ed. New York: John Wiley & Sons, 2000. 17-42.
35. Vite V, Ortiz D, Hernández I, Tovar JM, Ayala A. Análisis epidemiológico de la infertilidad en una población mexicana. *Ginecol Obstet Mex* 73, 360. 2005.
36. Berek JS. "Infertilidad." Ginecología de Novack. 12a ed. México: ed. McGraw-Hill Interamericana, 915-944;1999.
37. Shah K, Sivapalan G Gibbons N Tempest H Griffn DK. The genetic basis of infertility. *Reproduction* 126, 13-25; 2003.
38. Rowe PJ, Comhaire FH Hargreave TB Mellows HJ. "WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple." Ed. Geneva: World Health Organization. 1993.
39. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic Medicine - A Primer. *N Engl J Med* 347, 1512-1520; 2002.
40. Reich DE, Schaffner SF, Daly MJ, McVean G, Mullikin JC, Higgins JM, Ritcher DJ, Lander ES, Altshuler D. Human genome sequence variation and the influence of gene history, mutation and recombination. *Nat Genet* 32, 135-142; 2002.
41. Saunders AM Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ. Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1467-1472; 1993.
42. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22, 231-238; 1999.
43. Huhtaniemi I, Jiang M Nilsson C Pettersson K. Mutations and polymorphisms in gonadotropin genes. *Mol Cell Endocrinol* 151, 89-94; 1999.
44. McDonough PG. Molecular Abnormalities of FSH and LH action. *Ann NY Acad Sci* 997, 22-34; 2003.
45. Achermann JC, Weiss J, Lee E, Jameson JL. Inherited disorders of the gonadotropin hormones. *Mol Cell Endocrinol* 179, 89-96; 2001.

46. Seminara SB, Hayes FJ, Crowley WF. Gonadotropin-Releasing Hormone Deficiency in the Human (Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's Syndrome): Pathophysiological and Genetic Considerations. *Endocr Rev* 19[5], 521-39; 1998.
47. DeRoux NJ, Young M. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N Engl J Med* 337, 521-39; 1997.
48. Layman LC, Cohen DP, Jin M. Mutations in the gonadotropin releasing hormone receptor cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Genet* 18, 14-15; 1998.
49. Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones structure and function. *Ann Rev Biochem* 50, 465-95; 1981.
50. Baenziger JU, Greend ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides on lutropin follitropin and thyrotropin. *Biochem et Biophys Acta* 947, 287-306; 1988.
51. Ryan RJ, Charlestown MC, McCormick DJ, Milijus RP, Keutmann HT. The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationship. *FASEB J* 2, 2661-69; 1988.
52. Kendall SK, Samuelson LC, Saunders TL. Targeted disruption of the pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit produces hypogonadal and hypothyroid mice. *Genes Dev* 9, 2007-2019; 1995.
53. Jameson JL, Becker CB, Lindell CM. Human follicle stimulating hormone β subunit gene encodes multiple messenger ribonucleic acids. *Mol Endocrinol* 2, 806-815; 1988.
54. Layman LC, Lee EJ, Peak DB. Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle stimulating hormone β subunit. *N Engl J Med* 337, 607-611; 1997.
55. Phillip M, Arbelle JE, Segev Y. Male hypogonadism due a mutation in the gene for the β subunit of follicle stimulating hormone. *N Engl J Med* 338, 1729-1732. 1998.
56. Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* 11, 177-199; 1990.
57. Weiss J, Axelrod L, Whitcomb RW, Harris PE, Crowley WF, Jameson JL. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the β subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med* 326, 179-183; 1992.
58. Pettersson K, Ding YQ, Huhtaniemi I. An immunologically anomalous luteinizing hormone variant in a healthy woman. *J Clin Endocrinol Metab* 74, 164-171; 1992.
59. Furui K, Saganuma N, Tsukahara S, Asada Y, Kikkawa F, Tanaka M, Ozawa T, Tomoda Y. Identification of two points of mutations in the gene coding luteinizing hormone (LH) β -subunit, associated with immunologically anomalous LH variants. *J Clin Endocrinol Metab* 78, 107-113; 1994.

60. Roy AC, Liao WX, Chen Y, Arulkumaran S, Ratnam SS. Identification of seven novel mutations in LH- β -subunit gene by SSCP. *Mol Cell Endocrinol* 165, 151-163; 1996.
61. Lamminen T, Jiang M, Manna PR, Pakarinen P, Simonsen H, Herrera RJ, Huhtaniemi I. Functional study of a recombinant form of human LH β -subunit variant carrying the Gly(102)Ser mutation found in Asian Populations. *Mol Hum Reprod* 8[10], 887-892; 2002.
62. Huhtaniemi IT. Polymorphism of gonadotropin action: clinical implications. *Asian J Adrol* 2, 241-46; 2000.
63. Jiang M, Lamminen T, Pakarinen P, Hellman J, Manna P, Herrera RJ, Huhtaniemi I. A novel Ala(-3)Thr mutation in the signal peptide of human luteinizing hormone β -subunit: potentiation of the inositol phosphate signaling pathway and attenuation of the adenylate cyclase pathway by recombinant variant hormone. *Mol Hum Reprod* 8[3], 201-212; 2002.
64. Nam KK, Yoon SN, Jung JK, Hyung MC, Ki WC, Kwang YC. The luteinizing hormone β -subunit exon 3 (Gly102Ser) gene mutation is rare in Korean women with endometriosis and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 75[6], 1238-1239; 2001.
65. Kalantaridou SN, George PC. Monogenic disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 78, 1052-1058; 2001.
66. Valdes-Socin H, Salvi R, Daly AF, Gaillard RC, Quatresooz P, Tebeu PM, Pralong FP, Beckers A. Hypogonadism in a Patient with a Mutation in the Luteinizing Hormone β -Subunit Gene. *N Engl J Med* 351, 2619-2625; 2004.
67. Gromoll J, Eiholzer U, Nieschlag E, Simoni M. Male Hypogonadism caused by homozygous deletion of exon 10 of the luteinizing hormone receptor; differential action of the luteinizing hormone (LH) and the human chorionic gonadotropin (hCG). *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2281-2286; 2000.
68. Themmen AP, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: Elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endo Rew* 21[5], 551-583; 2000.
69. Aittomäki K, Dieguez JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 82, 959-968; 1995.
70. Beau I, Touraine P, Meduri G, Gougeon A, Desroches A, Matuchansky C, Milgrom E, Kuttann F, Misrahi M. A novel phenotype related to partial loss of function mutation of the follicle stimulating hormone receptor. *J Clin Invest* 102, 1352-1359; 1998.
71. Laue L, Wu SM, Kudo M, Hsueh AJW, Cutler Jr GB, Jelly DH, Diamond FB, Chan WY. Heterogeneity of activating mutations of the human luteinizing hormone receptor in male-limited precocious puberty. *Biochem Mol Med* 58, 192-198; 1998.

72. Toledo SP, Brunner HG, Kraaij R, Post M, Dahia PL, Hayashida CY, van Reen M, Milgrom E, Ropers HH, Mariman E, Themmen APN, Brunner HG. Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene. *Nat Genet* 9, 160-164; 1995.
73. Miles LEM, Lipschitz DA, Bieber CP, Cook JD. Measurement of serum ferritin by two-site immunoradiometric assay. *Analyt Biochem* 61, 209-24; 1974.
74. Abbas Ak. "Anticuerpos y Antígenos." Inmunología Celular y Molecular. 2ª ed. Interamericana McGraw-Hill, 63-64; 1996.
75. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci* 86, 2766-2770; 1989.
76. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74, 5463-67; 1977
77. Evans, W. E. & Relling M. V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286, 487-491; 1999.
78. Layman LC. Human gene mutations causing infertility. *J Med Genet* 39, 153. 2002.
79. Villareal D, Apovian C, Kushner F, Klein S. Obesity in older adults: technical review and position statement of the American Society for Nutrition and NAASO, The Obesity Society. *Am J Clin Nutr* 82[5], 923-34; 2005.
80. Jevitt CM. Weight management in gynecologic care. *J Midwifery Womens Health* 50[5], 427-30; 2005.
81. Hammoud A, Gibson M, Peterson M, Hamilton B, Carrell D. Obesity and Male Reproductive Potential. *Journal of Andrology* in press; 2006.
82. Kitabchi AE, Imseis RE, Bush AJ, Williams-Cleaves B, Pourmotabbed G. Racial differences in the correlation between gonadal androgens and serum insulin levels. *Diabetes Care* 22[9], 1524-1529; 1999.
83. Holte J, Bergh T, Berne C, Berglund L, Lithell H. Enhanced early insulin response to glucose in relation to insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome and normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* 78, 1052-1058; 2006.
84. Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction* 130, 583-597; 2005.
85. Papadopoulos V. Cholesterol Homeostasis and Infertility: The Liver X Receptor Connection. *Endocrinology* 146[6], 2517-2518; 2005.

86. Filicori M, Butler JP, Crowler WF. Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human. Evidence for pulsatile progesterone secretion. *J Clin Invest* 73, 1638-1647; 1984.
87. Alliende ME. Mean versus individual hormonal profiles in the menstrual cycle. *Fertil Steril* 78[1], 90-95; 2002.
88. Nagano M, Yamashita S. Molecular mechanisms of cholesteryl ester transfer protein deficiency in Japanese. *J Atheroscler Thromb* 11[3], 110-121; 2004.
89. Cáceres JF, Kornblihtt AR. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet* 18[4], 186-193; 2002
90. Takashi K, Karino K, Kanasi H, Kirioka H, Ozaki T, Yonehara T, Miyazaki K. Influence of misense mutation and silent mutation of LH- β -subunit gene in Japanese patients with ovulatory disorders. *Eur J Hum Genet* 11, 402-408; 2003.
91. Nilsson C, Pettersson K, Millar R, Coerver KA, Matzuk MM, Huhtaniemi IT. World frequency of a common genetic variant of luteinizing hormone: an international collaborative research. *Fertil Steril* 67[6], 998-1004; 1997.
92. Starka L, Hill M, Halml R, Huhtaniemi IT. Genetic variant of luteinizing hormone in Czech Republic. *Endocr Regul* 33, 103-108; 1999.
93. Akhmedkhanov A, Toniolo P, Zeleniuch-Jacquotte A, Pettersson KS, Huhtaniemi IT. Luteinizing hormone, its α -subunit variant, and epithelial ovarian cancer: the gonadotropin hypothesis revisited. *Am J Epidemiol* 154[1], 43-49; 2001.
94. Suman L, Nam KK, Hyun-Joo K, Sook-Hwan L, Hye-Jin J, Kwang YC. Genetic analysis of three polymorphic sites of the luteinizing hormone β -subunit gene in infertile Korean men with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 79[3], 517-521; 2003.
95. Tapanainen JS, Koivunen R, Fauser BC, Taylor A, Clayton RN, Rajkova M, White D, Franks S, Anttila L, Pettersson KS, Huhtaniemi IT. A new contributing factor to polycystic ovary syndrome: The genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 84[5], 1711-1715; 1999.
96. Suganuma N, Furui K, Kikkawa F, Tomoda Y, Furuhashi M. Effects of the Mutations (Trp⁸-Arg and Ile¹⁵-Thr) in Human Luteinizing Hormone (LH) β -subunit on LH Bioactivity *in Vitro* and *in Vivo*. *Endocrinology* 137[3], 831-838; 1996.
97. Talmadge K, Vamvakopoulos NC, Fiddes JC. Evolution of the genes for the β subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *Nature* 307[5], 37-40; 1984.

ANEXO

Hospital Juárez de México

Endocrinología Molecular

Laboratorio 6 de investigación



CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN:

IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS DE GONADOTROPINAS Y RECEPTORES DE GONADOTROPINAS EN PACIENTES CON INFERTILIDAD

México D.F., Fecha: _____

A quien corresponda:

Yo, _____
signatario de la presente, de _____ años de edad, en forma libre y voluntaria acepto participar en el estudio “Identificación de variantes genéticas de los genes de gonadotropinas y receptores de gonadotropinas en pacientes con infertilidad”, el cual se llevará a cabo en el Hospital Juárez de México y cuyos objetivos consisten en evaluar los trastornos en los genes de las hormona LH y FSH, así como de sus receptores en pacientes con infertilidad primaria.

Se me ha informado de los motivos y forma en que se llevará a cabo el estudio, así como la manera y condiciones en las que se me tomará una muestra de sangre, dándome la oportunidad para hacer preguntas libremente, por lo que estoy satisfecho de la información y respuestas recibidas.

Estoy enterado de que puedo retirarme del estudio en el momento en que yo lo decida, sin que esto repercuta en mi atención subsiguiente como paciente de este Hospital.

Firma del Paciente _____ Expediente _____

Nombre y firma del Testigo

Dirección

Nombre y firma del Testigo

Dirección

Firma del Investigador
