



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Polimorfismos y mutaciones en el gen de la Hormona Luteinizante (LH)
y su asociación con el retraso en el desarrollo de la pubertad.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

Nayade Montero Martínez



México DF.

2008



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.

Jurado asignado

Presidente: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Vocal: Dr. José Pedraza Chaverri

Secretario: Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta

1er suplente: M. en C. Ma. De los Ángeles Granados Silvestre

2do. Suplente: Dra. María Guadalupe Ortiz López

Sitio en dónde se desarrolló el tema:

Laboratorio 202 del Edificio F. Facultad de Química, UNAM

Laboratorio de Endocrinología Molecular, Hospital Juárez de México, D.F.

Asesor: Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta

Supervisor Técnico: Dra. Guadalupe Ortiz López

Sustentante: Nayade Montero Martínez

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme vivir en este espacio y tiempo y hacerme “coincidir” con tantas personas que me han dado importantes lecciones de vida, las cuales me ayudan a caminar por este mundo.

A mis padres, que son el centro de mi existencia y que sin ellos no solo no estaría aquí, sino que no hubiera podido consumir este sueño que añoramos juntos y del que espero sea del todo satisfactorio para ellos, gracias por el apoyo, la paciencia, la confianza y el amor que me han dado. LOS AMO.

A mi hermana Aline, por quererme tanto, por dejarme ser parte de su vida, por ser mi mejor amiga e inspiración, gracias por toda tu protección que como toda buena hermana mayor tienes para conmigo. Te quiero “chapis”. A mi hermanito perdido Piñón, gracias por convertirte en un miembro más de mi familia, demostrando que la consaguineidad no lo es todo, gracias también por preocuparte por mí, por quererme, por aguantarme y por hacerme reír.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Química, que por mucho tiempo me dio asilo dentro de sus aulas, donde no solo recibí las herramientas necesarias para formarme como profesionista sino que también me enseñó que el trabajar con honestidad por un bien común y no solo por el propio, es la mejor forma de retribuirle todo lo que nos ha dado.

Al Hospital Juárez de México por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis, al Hospital Materno Infantil Inguarán donde se llevó a cabo la recolección de muestras de los niños que participaron en este proyecto.

A la Dra. Marta Menjívar, por todo su apoyo, paciencia y comprensión, por dejarme formar parte de su equipo de trabajo y por enseñarme a amar lo que uno hace, a no perder esa capacidad de asombro ante las cosas más pequeñas y a disfrutar los logros uno a uno, por sencillos que estos sean, y finalmente que descubramos que el vivir cada día es una invitación al desarrollo de nuevas metas.

A la Dra. Guadalupe Ortiz, a la Dra. Ma. de los Ángeles Granados y a la M. en C. Isela Montufar por su apoyo y su tiempo valioso brindado en la realización de esta tesis, por la

aportación de sus ideas para el mejoramiento de la misma y por darme una palmada en la espalda cuando la necesitaba. Gracias.

A Sergio, GRACIAS por darme tu corazón, amor y comprensión, por acompañarme durante todo este proceso con paciencia oriental, por TODA tu ayuda, por dedicarme horas de tu sueño solo por acompañarme, por no dejarme flaquear, por sostenerme en mis caídas y por siempre hacerme creer que puedo. Gracias por estar conmigo. Te amo.

A mis compañeros de laboratorio; a Agus por hacer más ameno el viaje, y enseñarme a que hay que reír más en los tiempos de estrés, de todos modos tienen que pasar, a Roxana y a Adriana por contestar todas mis preguntas y compartir conmigo sus conocimientos con dedicación y paciencia.

A Helena, por acompañarme y ser un apoyo importante durante la realización no solo de la tesis, sino de la carrera en general, es bueno ver una cara conocida al final del camino, gracias amiga.

A todos mis amigos que, aunque pocos, valiosísimos: a Alejandra, Marce, Miguel y mi buen amigo Zamora. A mi amiga Lilian, por compartir conmigo tantas vivencias que no solo nos hicieron crecer juntas, sino que nos hicieron desarrollar un lazo especial que con el tiempo se ha hecho resistente. A Juanito por siempre ofrecerme su ayuda incondicional, por tu amistad y cariño y por hacerme sentir especial siempre, gracias pequeño. A mis amigos de carrera: Xóchitl, Lorenzo, Gabriel, Nazul, Salo. A mi buen amigo Oswaldo por compartir parte de su vida y su corazón, por todos sus detalles inesperados e inmensamente gratos que siempre dibujaban una sonrisa en mi cara, en fin por las porras y la fe en mí. Gracias!

Y por último, pero no menos importante, a mis enanos, mi Popis y mi Guille por enseñarme el significado del amor incondicional y porque a pesar de que no hablamos el mismo lenguaje, siempre aprendo algo nuevo de ustedes, me ayudan a ser un mejor ser humano al comprender que, a pesar de lo que todos creen, no somos tan diferentes.

INDICE

Resumen	1
Introducción	3
1. Antecedentes	
1.2 Eje hipotálamo-hipófisis-gónada	3
1.3 Efectos fisiológicos de las gonadotropinas	5
1.4 Hormonas esteroideas	7
1.5 Pubertad	9
1.6 Mecanismos de la pubertad	10
1.7 Maduración del eje hipotálamo-hipófisis-gónada	11
1.8 Cambios físicos	
1.9 Cambios hormonales durante la pubertad	14
1.10 TANNER (Fases del desarrollo de características sexuales secundarias).	15
1.11 Pubertad retrasada o pubertad ausente	18
1.12 Variabilidad genética	22
1.13 Mutaciones a lo largo del eje pituitario-gonadal que afectan la maduración sexual.	24
1.13.1 Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) y su receptor (GnRHR)	24
1.13.2 Gonadotropinas	26
1.13.3 Receptores de la Hormona Luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH)	29
2. Justificación	31
3. Hipótesis	31
4. Objetivo	32
5. Objetivos específicos	32
6. Material y métodos	33
6.1 Diseño experimental	33
6.2 Determinaciones bioquímicas	34
6.3 Determinaciones hormonales	35
6.4 Extracción de DNA	36
6.5 Diseño de oligonucleótidos para el gen de LH β	36
6.6 Reacción en cadena de la polimerasa	37
6.7 Purificación del DNA amplificado	37
6.7 Polimorfismo Conformacional de Cadena Simple (SSCP)	37
6.8 Análisis estadístico	38

7. Resultados	39
7.1 Mediciones antropométricas	39
7.2 Determinaciones bioquímicas	40
7.3 Cuantificaciones hormonales	41
7.4 Pruebas moleculares	42
7.5 Análisis por SSCP del exón 2 de la LH β en controles	44
7.6 Análisis por SSCP pacientes del exón 2 de la LH β en controles	44
7.7 Purificación del DNA	47
7.8 PCR y análisis por SSCP del exón 3 de la LH β	48
7.9 Análisis de las secuencias polimórficas encontradas	51
8. Discusión	53
9. Conclusiones	58
10. Apéndice I	59
11. Apéndice II	71
12. Bibliografía	80

Lista de abreviaturas

En el texto:

- ADN: Acido desoxirribonucleico
- AMPC: Adenosin monofostato cíclico
- CYP: Complejo enzimático del citocromo P450.
- DHEA: Dehidroepiandrosterona
- DE: Desviación estándar
- ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
- FSH: Hormona folículoestimulante
- FSH β : Subunidad beta de la hormona foliculoestimulante.
- FSHR: Receptor de la hormona foliculoestimulante
- GAP: GnRH associated peptide (péptido asociado a GnRH)
- GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas.
- hCG: Gonadotropina coriónica humana
- HHG: Eje hipotálamo-hipófisis-Gónada
- INEGI: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Información.
- LH: Hormona Luteinizante
- LH β : Subunidad beta de la hormona luteinizante.
- LHR: Receptor de la hormona luteinizante
- MAPK: Mitogen-activated protein (MAP) kinases.
- SNC: Sistema Nervioso Central
- SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismos de un solo nucleótido)
- TSH: Hormona estimulante de la tiroides

Técnicas:

- ADP: Adenosin-5' difosfato
- ATP: Adenosin-5' trifosfato
- Buffer TBE: Buffer **T**ris-ácido **B**órico-**E**DTA
- Buffer TE: Buffer **T**ris-**E**DTA
- CE: Colesterol Esterasa
- COX: Colesterol Oxidasa
- DAP: Dihidroxiacetona fosfato

- EDTA: Acido etilendiaminotetraacético
- ETOH: Etanol
- GOD: Glucosa oxidasa
- G3P: Glicerol-3 fosfato
- GPO: Glicerol fosfato oxidasa
- HMI: Hospital Materno Infantil
- ICC: Índice cintura cadera.
- IMC: Índice de masa corporal
- IRMA: Ensayo inmunorradiométrico
- NaCl: Cloruro de sodio
- POD: Peroxidasa
- RIA: Radioinmunoensayo
- SDS: Dodecilsulfato de sodio.
- SSDF: Secretaría de Salud del Distrito Federal
- TEMED: N,N,N',N'-Tetrametilethilenediamina

Aminoácidos:

- Ala : Alanina
- Arg: Arginina
- Asp: Acido aspártico
- Gln: Glutamina
- Gly: Glicina
- Ile: Isoleucina
- Pro: Prolina
- Ser: Serina
- Thr: Treonina
- Trp: Triptófano
- Val: Valina

Resumen

La pubertad es un complejo proceso neuroendocrino que involucra la maduración tanto gonadal como conductual, y para el cual, los procesos primarios aún no son claros. Muchos factores pueden alterar la edad de inicio de esta. Debido al amplio rango de edad en el comienzo de la pubertad en los individuos normales en las distintas partes del mundo, se sugiere que factores tanto genéticos como ambientales, modulen su comienzo y desarrollo. Se considera un retardo puberal a la ausencia de caracteres sexuales secundarios a una edad en la cual el 95% de los sujetos de esa población ya ha iniciado la maduración sexual, por lo que la edad límite puede variar de una población a otra. De acuerdo con el II Censo de Población y Vivienda del 2005 (INEGI), en el país residen alrededor de 31,650,104 habitantes de entre 0 a 14 años de edad y, de acuerdo a datos reportados en la literatura se estima que al menos un 2 a 3 % de los niños y niñas en México presentan retraso en la pubertad. Es un problema infrecuente en pediatría, probablemente porque los padres y médicos conciben el retraso constitucional del crecimiento como una variante “normal”. El motivo de consulta es que los pacientes no han presentado la aparición rápida o aceleración de la velocidad de crecimiento comparado con la de los compañeros de escuela, que son ahora más altos. El desarrollo normal y la función del sistema reproductivo dependen de complejas interacciones hormonales. Las dos gonadotropinas hipofisarias, hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH), juegan un papel esencial en la regulación de la función gonadal de mamíferos. Su síntesis y secreción dependen de hormonas de origen hipotalámico, de hormonas de las glándulas endocrinas periféricas, e incluso del efecto de enfermedades y de muchos fármacos. La comprensión de esas interacciones ha sido útil en el diagnóstico y el tratamiento de trastornos endocrinos, así como para evaluar algunos de los efectos adversos de fármacos que afectan al sistema endocrino. Sin embargo, cuando los genes involucrados en la reproducción se ven afectados, es posible, que se altere el correcto funcionamiento del eje reproductivo en los individuos por lo cual es importante detectar dichas variantes en estos genes y encontrar su relevancia clínica. Aunque mutaciones en gonadotropinas o en sus receptores son muy raras, se han reportado mutaciones esporádicas que han sido relacionadas con padecimientos tales como la infertilidad, el síndrome de ovario poliquístico, retraso en el desarrollo puberal, entre otros, y algunas de las variantes encontradas son comunes en

diferentes partes del mundo. Los estudios de las variantes han permitido dilucidar las acciones complejas de la LH. 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 el retraso en el desarrollo de la pubertad, por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar mutaciones y/o polimorfismos en el gen de la LH relacionados con este padecimiento. En el estudio se incluyeron 25 niños sanos en diferentes etapas de la pubertad (de acuerdo a la clasificación por Tanner) y aquellos niños que acudieran a la consulta de endocrinología del Hospital Inguarán y obtuvieran diagnóstico de retraso en el desarrollo de la pubertad en un período de seis meses. Bajo este criterio se reclutaron 7 niños. Para evaluar el estado de salud se realizó un examen médico, determinaciones bioquímicas y hormonales. La gonadotropinas y esteroides sexuales se cuantificaron por ensayo inmunoradiométrico y radioinmunoanálisis, respectivamente. El estudio molecular consistió en la evaluación de los exones 2 y 3 de la LH por PCR-SSCP y finalmente se secuenciaron. Las pruebas bioquímicas y hormonales fueron congruentes con la selección de los pacientes y controles. En el análisis molecular se encontraron 9 cambios de secuencia, 8 en el exón 2 y uno en el exón 3, tres cambios fueron localizados en la zona intrónica (C₈₉₁T, C₁₀₉₅T, G₁₁₀₂A), tres cambios del tipo sinónimo G₁₀₁₅C (Val) y C₁₀₃₃A (Pro) en el exón 2 y C₂₈₅T (Gly) en el exón 3, y finalmente se encontró una variante triple heterocigota T₉₈₃C(Trp8Arg), A₉₉₀G(His10Arg) y T₁₀₀₅C(Ile15Thr). No se logró la asociación entre las variantes detectadas en la LH y el retraso puberal en los pacientes analizados. Sin embargo, es necesario realizar estudios de actividad biológica con aquellas muestras que presentan los cambios antes mencionados para descartar una posible alteración en la actividad biológica de la hormona. Finalmente, este estudio nos permitió determinar las variantes de secuencia del gen de la LH presentes en la población mexicana. Particularmente se detectó una variante triple de la LH la cual parece ser propia de la población mexicana.

Polimorfismos y mutaciones en el gen de la hormona luteinizante (LH) y su asociación en el retraso del desarrollo de la pubertad.

1. Introducción

Las células requieren de mecanismos de comunicación inter e intracelular para asegurar una respuesta coordinada que se ajuste a los cambios constantes en el ambiente interno y externo. Prácticamente todos los procesos en los organismos complejos están regulados por una o más hormonas; entre estos se encuentran la embriogénesis, la diferenciación sexual, el desarrollo y la reproducción (Nelson et al., 2006). Los sistemas endocrino y nervioso son los medios principales a través de los cuales el organismo intercambia información entre diferentes células y tejidos. (Baxter et al., 1995). La producción de la mayoría de las hormonas está controlada por un sistema de retroalimentación negativa en el que intervienen el hipotálamo (parte del encéfalo) y una glándula endocrina, la hipófisis (situada debajo del cerebro).

1.2 Eje hipotálamo-hipófisis-gónada

El hipotálamo y la hipófisis forman una unidad que ejercen control en la función de varias glándulas endocrinas –tiroides, suprarrenales y gónadas – así como en un amplio intervalo de actividades fisiológicas. (Baxter et al., 1995). El hipotálamo tiene una función nerviosa (se relaciona con el sueño y con sensaciones como la sed y el hambre) y otra endocrina (coordina toda la función hormonal). La hipófisis se encuentra ubicada en la silla turca. De acuerdo a su origen embriológico y a su estructura histológica, está formada por dos glándulas separadas: la adenohipófisis, que corresponde al lóbulo anterior y la neurohipófisis, representada por el lóbulo posterior. La hipófisis anterior secreta una serie de hormonas cuya función es crítica para la regulación del crecimiento, reproducción y metabolismo como son: Hormona del Crecimiento (GH), Prolactina, Hormona estimulante de la Tiroides (TSH) y Gonadotropinas (CG, LH, FSH,), éstas últimas importantes en este estudio por estar directamente relacionadas con el desarrollo del eje reproductivo.

Sin embargo, el control de la secreción de GnRH también es fundamental en la maduración reproductiva. GnRH es un decapeptido producido por neuronas especializadas que secretan en pulsos intermitentes la hormona desde las terminales nerviosas que se encuentran en el hipotálamo. Esta hormona entra a la circulación portal pituitaria y dirige la síntesis y secreción de las gonadotropinas pituitarias: la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH). El receptor para GnRH es una proteína que posee 7 dominios transmembranales y un dominio extracelular largo,

acoplada a proteínas G cuya señalización se ejerce vía fosfolipasa C, provocando la movilización del Ca^{2+} intracelular, estimulando la síntesis y liberación de las gonadotropinas (Krupnick et al., 1998; Sealton et al., 1997). La LH y la FSH actúan sobre sus células blanco en los testículos y ovarios para dirigir la producción de espermatozoides y de óvulos respectivamente, así como también la secreción de hormonas esteroideas (Sisk & Foster, 2004). Por lo tanto ambas hormonas, son esenciales para la función gonadal. Estas hormonas junto con la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la gonadotropina coriónica (GC), pertenecen al grupo de las hormonas glicoproteicas. Estructuralmente son heterodímeros formados por interacciones covalentes (residuos de cisteína) entre dos subunidades distintas, la subunidad α es común entre dichas hormonas y la subunidad β es específica para cada una, ambas están glicosiladas en una extensión variable (Ben-Menahem & Grotjan HE, 2007; Huhtaniemi et al., 1999), 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 (Sairam, 1989). 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 (Bishop et al., 1994; Mi Y et al., 2001). Se requiere de la estructura heterodimérica intacta para que la hormona sea biológicamente activa. Las células gonadótropas sintetizan más subunidades α que subunidades LH β y FSH β , lo que impulsa la relación de las subunidades β recién sintetizadas con subunidades α . Las subunidades α y β se combinan en el retículo endoplásmico, donde también ocurre el procesamiento inicial de los carbohidratos. En el complejo de Golgi ocurren más modificaciones (específicas para hormonas) de los carbohidratos. Las hormonas heterodiméricas maduras se almacenan en gránulos secretores dentro de la célula. (1) Las dos subunidades están codificadas por genes separados, la subunidad α en el cromosoma 6 y la subunidad β en el caso de la LH por el cromosoma 19 y de la FSH por el cromosoma 11 (Huhtaniemi et al., 1999). Así como con otras hormonas polipeptídicas, las hormonas glicoproteicas también inician su acción por interacción con receptores específicos y de alta afinidad sobre la membrana celular. Ambas subunidades contribuyen en la interacción con su receptor. El receptor se encuentra acoplado a una proteína Gs, activando la adenilato ciclasa para finalmente producir AMPc para catalizar todos los eventos celulares que conducen la respuesta hormonal (Sairam, 1989).

Tanto FSH como LH se segregan, como ya se mencionó anteriormente, bajo el estímulo pulsátil de la GnRH. La LH, por su semivida plasmática más corta (20 min), refleja mejor – con sus picos – los impulsos de la GnRH.

Los esteroides gonadales son el segundo mecanismo regulador de gonadotropinas en el sentido de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y también, sobre la hipófisis. En varones, la testosterona y el estradiol inhiben la secreción de gonadotropinas. En las mujeres, la progesterona y los estrógenos inhiben la liberación de LH y FSH.

La regulación es mucho más compleja, habida cuenta de tres péptidos descubiertos inicialmente en las gónadas: la inhibina, la folistatina y la activina. Las dos primeras frenan la secreción de FSH y la última la estimula (Flores et al., 2001).

1.3 Efectos fisiológicos de las gonadotropinas

En varones, la LH estimula la síntesis *de novo* de andrógenos, principalmente testosterona, por las células de Leydig. La testosterona secretada se requiere para la gametogénesis y para conservación de la libido y de las características sexuales secundarias. Por otro lado, la FSH no participa en la producción de esteroides gonadales en varones, pero es esencial para la producción de espermatozoides normales. Las células de Sertoli, que expresan receptores de FSH de superficie celular, se extienden desde la membrana basal hasta la luz de los túbulos seminíferos, y envuelven a los espermatozoides en desarrollo, que emigran entre dichas células hacia la luz del túbulo. Las uniones estrechas entre las células de *Sertoli* forman una barrera hematotesticular. Aunque no se comprenden a fondo los mecanismos por los cuales la FSH favorece la espermatogénesis, dicha hormona parece estimular a las células de Sertoli para que sintetice muchas de las proteínas y nutrientes que necesitan los espermatozoides en maduración. Otra consecuencia importante de los efectos de la FSH es el incremento de la síntesis de proteína de unión a andrógenos. Si bien esta última se libera en la circulación general, también se secreta de modo directo en la luz de los túbulos seminíferos. En ese sitio, sirve para proporcionar concentraciones locales altas de andrógenos, donde se necesitan para el desarrollo de los espermatozoides. Mientras que la gametogénesis depende tanto de la FSH como de la LH, la producción de esteroides gonadales en varones sólo depende de la LH (1). Figura 1

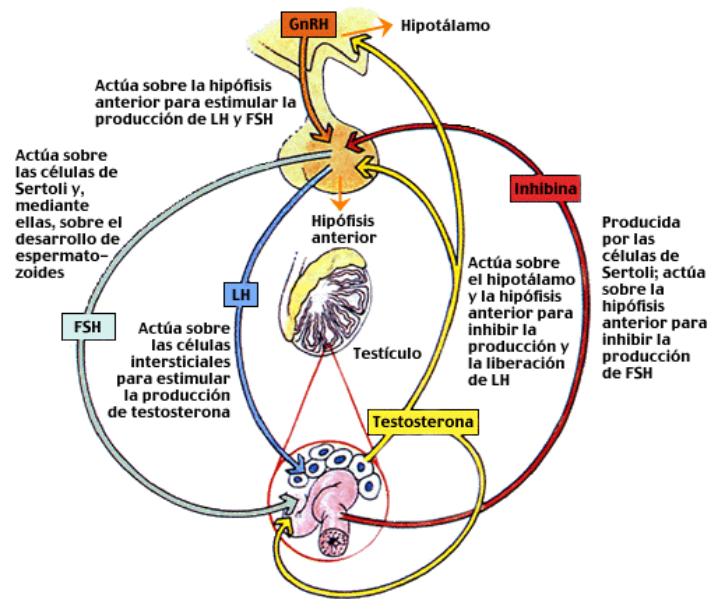


Figura 1. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo (2)

Los efectos de la LH y de la FSH en los ovarios son mucho más complejos que en los testículos y, a veces, son interdependientes. El efecto general de la FSH consiste en estimular la síntesis de estrógenos, y favorecer el crecimiento de los folículos en desarrollo, en tanto el efecto general de la LH es inducir ovulación y estimular la síntesis de progesterona. Al principio de la fase folicular de cada ciclo menstrual, se inicia el crecimiento y desarrollo de varios folículos. Durante la fase folicular, la FSH estimula la producción de estrógenos en células de la granulosa, al estimular la conversión de andrógenos en estrógenos. Los andrógenos, a su vez, se sintetizan de novo en células de la teca en respuesta a la LH, y quedan a disposición de las células de la granulosa por medio de difusión desde células de la teca adyacentes. La diferenciación de las células de la granulosa durante el crecimiento folicular incluye la adquisición (dependiente de FSH y estradiol) de receptores de LH/CG, lo que prepara a las células de la granulosa para responder al brote preovulatorio de LH que ocurre a la mitad del ciclo. Durante la foliculogénesis, normalmente sólo un folículo (el folículo dominante) se selecciona del fondo común de folículos en crecimiento, para que siga creciendo hacia el folículo preovulatorio, o de Graaf. El brote de LH origina rotura del folículo preovulatorio, y liberación del óvulo.

Durante la fase luteínica del ciclo menstrual, la LH estimula la producción de progesterona y estrógenos por el cuerpo amarillo (cuerpo lúteo). La progesterona así producida es fundamental en la preparación del útero para la implantación potencial de un óvulo fecundado. Si el óvulo queda fecundado, la producción subsecuente de CG por

el blastocisto "rescata" el cuerpo amarillo, y conserva su secreción de progesterona y estrógenos hasta que la placenta pueda sintetizar cantidades adecuadas de esas hormonas esteroides. Sin embargo, si no hay fecundación del óvulo liberado, el cuerpo amarillo degenera, por la falta de estimulación continua por CG derivada del blastocisto, y disminuye la producción de progesterona y estrógeno (1). Figura 2

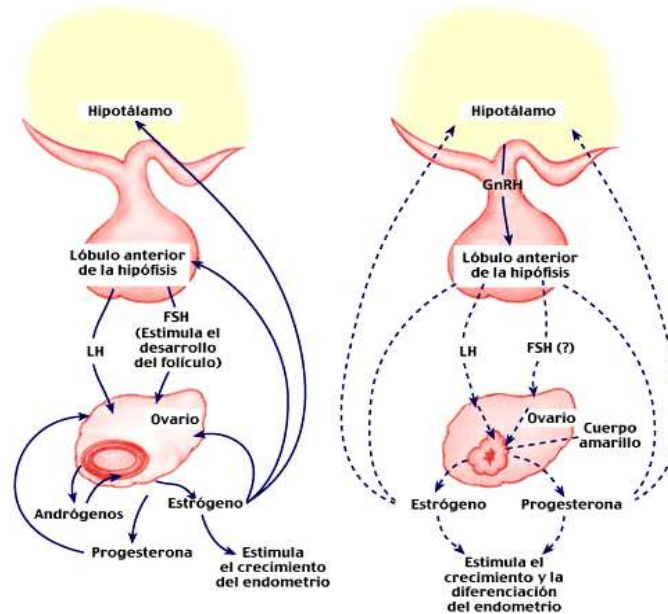


Figura 2. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario (2)

1.4 Hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas se producen en suprarrenales, testículos, placenta y, en cierta magnitud, en tejidos periféricos. Las vías generales de estas glándulas son similares, aunque las diferencias en las enzimas específicas presentes en los diversos tipos celulares generan distinciones en las vías reales que se toman para obtener el producto final y, por lo tanto, originan diferencias en los esteroides producidos (Baxter et al., 1995).

Existen en general 5 grupos de hormonas esteroideas: 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 (Miller, 1998).

El colesterol, es un esteroide consistente en 27 átomos de carbono y el precursor de la biosíntesis de hormonas esteroideas tanto de origen gonadal como suprarrenal. (Flores et al., 2001). Este colesterol puede obtenerse ya sea por síntesis *de novo* o por captación de

LDL a través de receptores de este tipo de lipoproteínas. En la mitocondria ocurre la conversión del colesterol a pregnenolona a través de las acciones de una enzima de rotura lateral P450-colesterol (P450_{scc}) localizada en la membrana mitocondrial interna (Baxter et al., 1995).

Una vez producida la pregnenolona puede seguir una de dos vías denominadas Δ^4 y Δ^5 . La pregnenolona y otros esteroides se denominan Δ^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 Δ^4 porque tienen un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 (Brown et al., 1979; Miller 1998).

La pregnenolona sale entonces de la mitocondria al retículo endoplásmico, donde se llevan a cabo los siguientes pasos de la esteroidogénesis que consisten en hidroxilaciones adicionales mediante el efecto de un complejo enzimático del citocromo P450 (CYP) consistente en hidroxilasas que transfieren electrones del NADPH, ya sea en posición 11 (CYP11A1), 17 (CYP17) o 21 (CYP21A2) (Baxter et al., 1995) Figura 3

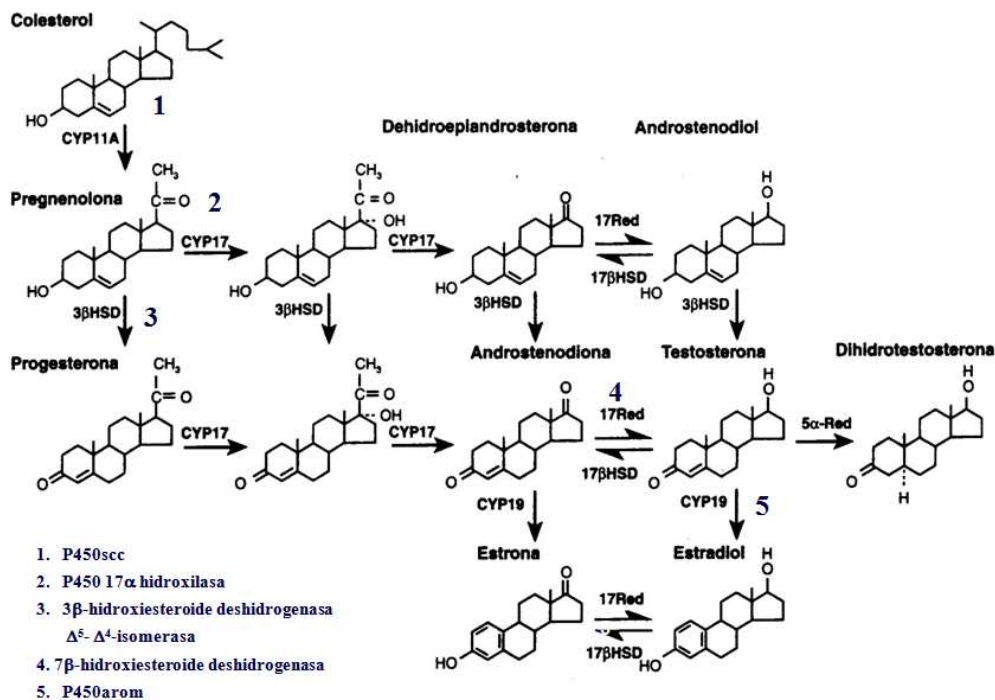


Figura 3. Esquema general de la síntesis de andrógenos y estrógenos (3).

La vía principal para la producción de testosterona en los testículos está en las células de Leydig a través de la vía Δ^5 de pregnenolona a DHEA y androstanediol, la androstenediona en testosterona y la DHEA en androstanediol y después en testosterona.

En el ovario, las células de la granulosa carecen de citocromos P450c11, P450c17 y P450c21, y por tanto producen progesterona de manera principal. Esta progesterona es captada por las células cercanas de la teca, que la convierten en androstenediona; ésta a su vez regresa a las células de la granulosa donde se vuelve estrona por las acciones de la aromatasa. Esta enzima también convierte la testosterona en estradiol; las concentraciones de aromatasa en las células de la granulosa son tales, que casi toda la testosterona se vuelve estradiol.

Una vez sintetizados, los esteroides recién formados se liberan con rapidez (Baxter et al., 1995).

1.5 Pubertad

La pubertad es una etapa en el proceso continuo del crecimiento y desarrollo que se inicia durante la gestación y prosigue hasta el final de la etapa reproductiva. Después de un intervalo de quietud en la infancia, la actividad hipotalámico – hipofisiaria – gonádica se intensifica en el periodo prepuberal, lo que lleva a aumento en la secreción de esteroides sexuales gonadales que provocan desarrollo sexual secundario, brote de crecimiento puberal y fertilidad. Se acompaña de cambios profundos en la composición corporal y en muchos de los sistemas del organismo como el haz neuroendocrino, el tamaño y la mineralización ósea y el sistema cardiovascular. Durante la pubertad se producen la maduración cognitiva y biológica. Los complejos cambios biológicos que ocurren durante la pubertad tienen un importante impacto psico-social (Robles & Altamirano, 2003). Los antecedentes históricos muestran que la edad de inicio de ciertas etapas de la pubertad en varones y mujeres en países occidentales, ha declinado constantemente durante los últimos siglos; esto quizá se deba a mejoras en las condiciones socioeconómicas, nutrición y salud general, de ese periodo. Sin embargo, esta tendencia cesó durante los últimos cinco decenios en el “primer mundo”, lo que sugiere que se llegaron a las condiciones óptimas que permiten el inicio de la pubertad a una edad genéticamente determinada.

Muchos factores pueden alterar la edad de inicio en la pubertad. La obesidad moderada puede relacionarse con un inicio temprano en la pubertad, mientras que la obesidad grave y patológica puede retrasarla. La enfermedad y desnutrición crónica a menudo retrasan la pubertad. Existe concordancia significativa de la edad de la menarquia en las parejas madre e hija y dentro de las poblaciones étnicas, lo que indica la influencia de factores genéticos (Flores et al., 2001).

1.6 Mecanismos de la pubertad

Debido al amplio rango de edad de comienzo de la pubertad en los individuos normales, en las distintas partes del mundo, se sugiere que, ambos, factores genéticos y ambientales, modulen el comienzo y la evolución de la pubertad. Los cambios puberales son secundarios a modificaciones secuenciales en la actividad neuroendocrina que pone en marcha la activación del eje HHG, lo que lleva a una modificación en el patrón de secreción de gonadotropinas (LH y FSH). Inicialmente se induce la secreción pulsátil de LH durante el sueño que posteriormente incrementa su amplitud y se extiende a lo largo de las 24 horas. Con la evolución estos pulsos aumentan en frecuencia y amplitud hasta que en los estadios finales de la pubertad se producen cada 90 minutos. Estos cambios llevan a un incremento en la secreción de esteroides sexuales: estrógenos y andrógenos. Y aunque los estrógenos intervienen en la maduración de la mama y del sistema reproductor en la niña y la testosterona estimula los cambios puberales en el varón, en los dos sexos ambos esteroides estimulan, directa o indirectamente, el crecimiento somático, siendo el estradiol la hormona que, fundamentalmente, estimula la maduración esquelética en ambos sexos. La pubertad suele comenzar al final de la primera o comienzo de la segunda década de la vida, más precozmente en las niñas, con amplias variaciones cronológicas. El eje HHG está ya activo intra-útero y durante el primer año de vida, posteriormente hay una secreción escasa de gonadotropinas hasta el inicio puberal cuando hay una reactivación del eje HHG con secreción episódica de GnRH (hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas) que lleva a un incremento de la amplitud de la pulsatilidad de las gonadotropinas. Están muy discutidos los mecanismos que intervienen en la reactivación de la GnRH causante de la puesta en marcha de la pubertad, se involucran influencias inhibitoras y estimuladoras (Baxter et al., 1995; Flores et al., 2001).

El comienzo puberal está relacionado con la raza, etnicidad, condiciones ambientales, geográficas y de nutrición. El comienzo y evolución de la pubertad sigue un patrón familiar, aproximadamente un 74% de las variaciones involucra a factores genéticos y un 26% a efectos ambientales. El adelanto puberal evidenciado en la última década se ha atribuido, entre otras cosas, al incremento en la prevalencia de obesidad. Por ello, se ha propuesto la existencia de un peso crítico como determinante del desarrollo y mantenimiento de la pubertad, pero existen otros factores. Se ha involucrado a la leptina producida por los adipocitos y se apunta que esta influye la maduración del eje HHG. En ratas con déficit de leptina no desarrollan la pubertad y al administrarla comienza.

En niñas, los niveles más elevados de leptina se asocian a un incremento de la grasa corporal y a un comienzo más precoz de la pubertad. No se conocen del todo los neurotransmisores implicados en la activación del eje HHG ni las interrelaciones entre ellos (Flores et al., 2001; Robles & Altamirano, 2003).

1.7 Maduración del eje Hipotálamo-hipofisiario-gonadal

La diferenciación sexual es un proceso ordenado, interrelacionado y secuencial que incluyen las siguientes etapas:

- Determinación del sexo genético al momento de la fertilización
- Diferenciación y desarrollo funcional de la gónada primitiva en testículo u ovario.
- Diferenciación de genitales internos y externos, resultado de las funciones genéticas y endócrinas determinadas por el tipo de gónada presente. (Flores et al., 2001)

Durante la vida fetal, las neuronas productoras de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) emigran desde la placoda olfativa hasta los núcleos hipotalámico mediobasal y arqueado, donde van a formar el mecanismo generador de pulsos secretorios de GnRH. Desde la duodécima semana la unidad hipotálamo hipofisiaria es funcional. Hacia las 20-24 semanas de gestación las gonadotropinas fetales, se elevan e intervienen en el desarrollo de las gónadas. En el varón, la elevación de la testosterona sigue a la elevación de las gonadotropinas y, conduce a la diferenciación de los genitales internos y externos.

Este eje está sometido desde los primeros días de vida al control negativo de los esteroides sexuales y de la inhibina y en este momento los niveles de gonadotropinas se encuentran elevados. Después de los seis meses de vida el eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal entra en reposo hasta la edad de comienzo de la pubertad, los niveles de gonadotropinas descienden y hacia los dos años se encuentran en los niveles más bajos. La aparición de los primeros signos de pubertad va precedida por el aumento de la secreción de gonadotropinas, sobre todo de LH, que adquiere un marcado patrón pulsátil. La pulsatilidad primero es nocturna y, conforme avanza la pubertad, también se hace diurna (Flores et al., 2001).

1.8 Cambios físicos relacionados con la pubertad

Los estándares descriptivos propuestos por Tanner para determinar el desarrollo puberal en varones y mujeres, se utilizan ampliamente. Estos enfocan la atención en detalles específicos de la exploración y hacen posible registrar de manera objetiva el progreso sutil del desarrollo sexual secundario que de otro modo podría pasar desapercibido.

✓ Cambios en la mujer

El primer signo de pubertad en la mujer según se aprecia en estudios longitudinales, es un incremento en la velocidad de crecimiento, que precede el inicio del brote de crecimiento puberal; la niñas en general no se examinan con suficiente frecuencia como para demostrar este cambio en la práctica clínica, de manera que el desarrollo de las mamas es el primer signo de pubertad que se aprecia en la mayoría de los examinadores. El desarrollo de las mamas se estimula principalmente por la secreción de estrógenos ováricos, aunque otras hormonas también pueden tener alguna participación. Las modificaciones que se producen a nivel de la glándula mamaria dependen de la producción de 17- β estradiol ovárico y del derivado de la aromatización periférica de los andrógenos adrenales, así como de la sensibilidad de los receptores tisulares para éstos (Beas et al., 2002). El tamaño y apariencia de las mamas puede determinarse por factores genéticos y nutricionales, pero las características de las etapas son las mismas en todas las mujeres. El diámetro de los pezones cambia poco desde el Tanner I a III (aproximadamente 3 a 4 mm); pero crece mucho en las etapas subsecuentes (aproximadamente 7.4 mm en la etapa IV, a 10 mm en la etapa V), quizá como resultado del aumento en la secreción de estrógenos al momento de la menarquía. Otras características que reflejan actividad de estrógenos incluyen crecimiento de los labios menores y mayores, engrosamiento de la mucosa vaginal y producción de una secreción vaginal clara o levemente blanquizca antes de la menarquía. El desarrollo del vello púbico se determina principalmente por la secreción de andrógenos suprarrenales y ováricos. El desarrollo de las mamas y el crecimiento de vello púbico usualmente proceden en índices similares, pero debido a que hay posibles discrepancias en los índices de avance, es mejor detallar las etapas de desarrollo de las mamas por separado del crecimiento progresivo del vello púbico.

El tamaño y apariencia uterina cambian con el desarrollo puberal; con la estimulación prolongada de los estrógenos aumenta la relación fondo/cuello uterino, lo que lleva a

una forma bulbosa y el útero crece de menos de 3 cm hasta 5 cm. Los ovarios crecen con la pubertad desde un volumen menor a 1 mL hasta 2 a 10 mL.

En la población indígena latinoamericana se encuentran no solo diferencias en la edad cronológica a la que se inicia y termina el desarrollo mamario, sino también en la sensibilidad a estrógenos, esto último fundamentado por el hecho de que sin existir variaciones étnicas estadísticamente significativas con relación a los niveles séricos de estrógenos y el porcentaje de estradiol libre, ni de su proteína transportadora, existe una diferencia de un año para alcanzar cada uno de los estadios de maduración mamaria, aunque el tiempo requerido para terminar el proceso es similar ($14,1 \pm 1,3$ años), y hasta el 40 o 50% de la población indígena detiene la progresión en la etapa III, y solo avanza hacia las etapas IV durante la primera gestación, para alcanzar el estadio V al término del primer periodo de lactancia (Beas et al., 2002).

✓ **Cambios en los varones.**

El primer signo de pubertad normal en varones por lo general es el aumento de tamaño de los testículos hasta más de 2.5 cm en el diámetro mayor, excluido el epidídimo. Gran parte del aumento en el tamaño testicular se debe a desarrollo de túmulos seminíferos secundario a estimulación por FSH, pero un componente menor se debe a la estimulación de las células de Leydig por la LH. El desarrollo de vello púbico está provocado por andrógenos suprarrenales y testiculares, y se clasifica por separado del desarrollo genital. La aparición de espermatozoides en las primeras muestras de orina matutina (espermarca) se presenta a una edad cronológica promedio de 13.4 años o una edad ósea similar en la etapa gonadal 3 a 4 y la etapa de vello púbico 2 a 4; si la pubertad inicia antes o después, la edad de la espermarca cambia de acuerdo con esto (Beas et al., 2002). En la Figura 4 se muestran las Etapas del desarrollo puberal para ambos sexos.

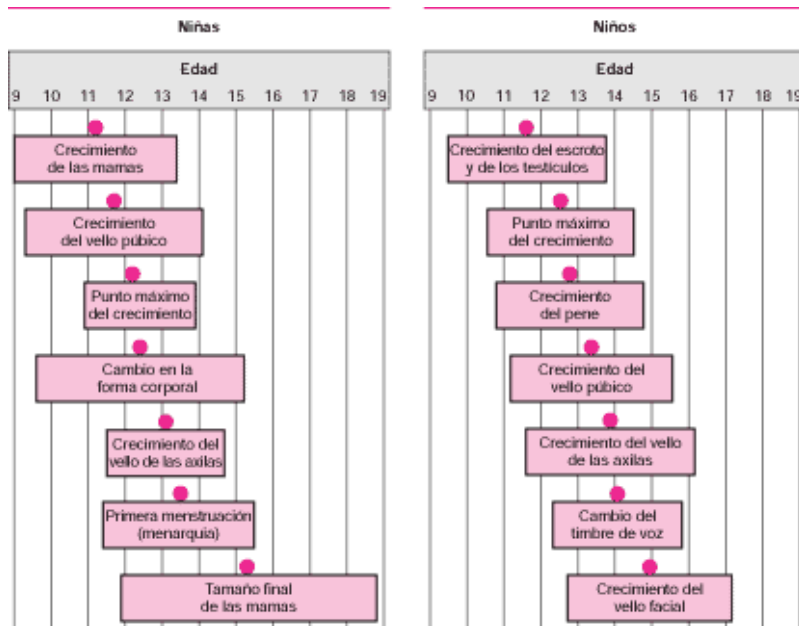


Figura 4. Etapas del desarrollo puberal. Durante la pubertad, el desarrollo sexual normalmente se presenta en una secuencia preestablecida. El momento en que comienza el cambio varía de una persona a otra, pero siempre se manifiesta dentro de un período de edades determinado, indicado por un cuadro en el diagrama. El promedio de edad, en el cual un cambio comienza, está indicado por un círculo rojo (4).

1.9 Cambios hormonales durante la pubertad

Los niveles de LH, FSH, estradiol y testosterona se incrementan antes de que se manifiesten los cambios físicos, pero estos incrementos iniciales pueden ser difíciles de evidenciar en cada sujeto. La respuesta puberal de LH y FSH (con predominio de la respuesta de LH) a GnRH es un marcador de la pubertad. En el varón, la LH es el estímulo primario para la síntesis testicular de testosterona y la FSH es el estímulo primario para la espermatogénesis. Se evidencia una disminución de la hormona antimülleriana la cual tiene una correlación inversa con los niveles de testosterona.

Ambas gonadotropinas son necesarias para la hormonogénesis esteroidea y la ovulación en la mujer aunque la FSH juega un papel primario en la maduración del óvulo (Robles & Altamirano, 2003).

1.10 TANNER. Fases del desarrollo de características sexuales secundarias

- Etapas del desarrollo de las mamas.
 - I Preadolescente; elevación solo de la papila
 - II Etapa de brote mamario; elevación de la mama y la papila como un pequeño montecillo y crecimiento del diámetro areolar.
 - III Crecimiento posterior de la mama y areola sin separación de sus contornos.
 - IV Proyección de la areola y papila para formar un montecillo secundario por encima del nivel de la mama.
 - V Etapa madura; proyección solo de la papila debido a recesión de la areola hacia el contorno general de la mama.

Tabla 1. Maduración mamaria en la población mexicana.

Estadio	Edad de aparición
Tanner II	10,2 ± 1,2
Tanner III	11,2 ± 1,2
Tanner IV	12,1 ± 1,2
Tanner V	15,3 ± 1,7

Fuente: Faulhaber J, Sáenz F. Terminando de crecer en México. Instituto de Investigaciones Antropológicas. Universidad Nacional Autónoma de México, 1994 (Robles & Altamirano, 2002).

- Etapas del desarrollo de vello púbico femenino:
 - I Preadolescente; el vello sobre el pubis no está más desarrollado que el vello de la pared abdominal anterior, es decir, no hay vello púbico.
 - II Crecimiento diseminado de cabello largo, suave, levemente pigmentado, recto o un poco crespo, que aparece principalmente a lo largo de los labios.
 - III El pelo es considerablemente mas oscuro, grueso y ensortijado. El cabello se difunde escasamente en la unión del pubis.
 - IV El cabello es ahora de tipo adulto, pero el área que abarca es aún considerablemente menor que en la mayoría de los adultos. No hay diseminación hacia la superficie medial de los muslos.

- V El pelo es adulto en cantidad y tipo, distribuido como un triángulo inverso en la pauta femenina clásica. La distribución es hacia la superficie medial de los muslos, pero no hacia la línea alba o alguna otra parte por encima de la base de ángulo inverso.

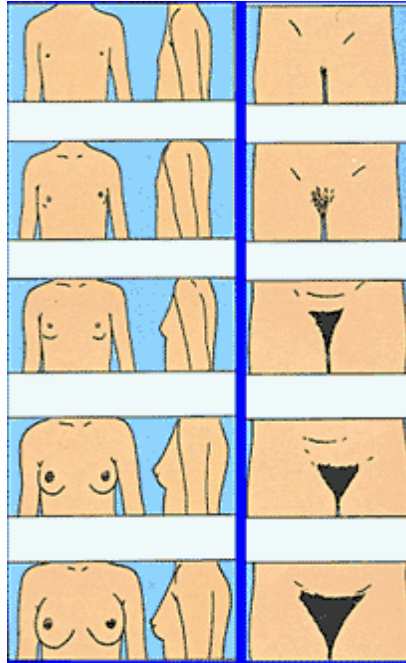


Figura 5. Tanner Femenino. Fases del desarrollo de las características sexuales secundarias

➤ Etapas de desarrollo genital masculino y del vello púbico

- I Preadolescente: los testículos, escroto y pene son de alrededor del mismo tamaño y proporción que en la infancia.
- II El escroto y los testículos han crecido y existe un cambio en la textura y cierto enrojecimiento de la piel del escroto.
- III Se ha presentado crecimiento del pene al inicio principalmente en longitud, pero con cierto aumento de grosor; mayor crecimiento de testículos y escroto.
- IV Mayor crecimiento del pene en longitud y circunferencia con desarrollo del glande. Mayor crecimiento de testículos y escroto. La piel escrotal se ha oscurecido más aún.
- V Genitales de tamaño y apariencia de adulto. Ya no hay un mayor crecimiento después de que se ha alcanzado la etapa V.

➤ Etapas del crecimiento del vello púbico masculino:

- I Preadolescente. El vello por encima del abdomen no está más desarrollado que el de la pared abdominal, es decir, no hay vello púbico.
- II Crecimiento escaso de pelos largos levemente pigmentados, rectos o un poco curvados, que aparecen principalmente en la base del pene.
- III El vello es considerablemente más oscuro, grueso y ensortijado, y se distribuye escasamente sobre la unión del pubis.
- IV El vello es ahora de tipo adulto pero el área que cubre es aún considerablemente menor que la mayoría de los adultos. No hay diseminación hacia la superficie medial de los muslos.
- V El vello es adulto en cantidad y tipo, distribuido como un triángulo inverso. La diseminación es hacia la superficie medial de los muslos, pero no hacia arriba de la línea alba o alguna otra parte por encima de la base del triángulo inverso. La mayoría de los varones presentaran una posterior diseminación del vello púbico (Baxter et al., 1995).

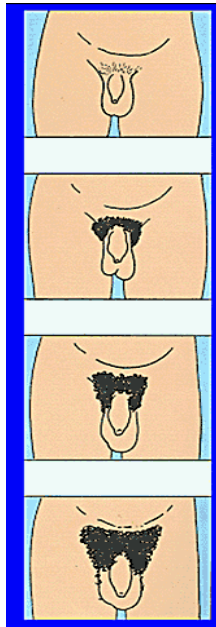


Figura 6. Tanner Masculino. Fases del desarrollo de características sexuales secundarias.

1.11 Pubertad retrasada o pubertad ausente.

El retraso puberal se define clínicamente por la ausencia de los caracteres sexuales secundarios a la edad límite de iniciación de la pubertad normal, es decir, a una edad cronológica de + 2DE (desviación estándar) por encima de la media de la población de referencia o lo que es lo mismo, la ausencia de telarquía a los 13 años o menarquia a los 15 años en la niña y, presentar un volumen testicular inferior a 4 mL a la edad de 14 años en el varón.

Sin embargo, existen diferentes causas y por lo tanto clasificaciones de este padecimiento.

La pubertad retrasada es secundaria a una inadecuada secreción de los esteroides gonadales, en la mayoría, debido a un defecto en la secreción de la GnRH que lleva a disminución de las gonadotropinas (**hipogonadismo secundario**). Puede ser por una alteración funcional como en el retraso constitucional, malnutrición o enfermedades crónicas o secundarias a alteraciones genéticas, orgánicas hipotálamo-hipofisarias o idiopáticas. Las concentraciones elevadas de LH y FSH indican alteración gonadal primaria como causa del retraso puberal y se conoce como **hipogonadismo primario** (Robles & Altamirano, 2003).

Un paciente con retardo en el inicio del desarrollo sexual secundario, que tiene antecedentes de haber sido siempre más bajo que sus compañeros, pero que mantiene una velocidad normal y consistente de crecimiento para su edad ósea y cuyo desarrollo del esqueleto está retrasado más de 2 DE de la media, es probable que tenga **retardo constitucional** de la pubertad. A menudo existen antecedentes familiares de una pauta similar de desarrollo en un padre o hermano. El sujeto habitualmente es delgado. Estos pacientes son el extremo de más edad de la curva de distribución de edad al inicio de la pubertad. En muchos casos, incluso si no muestran signos físicos de pubertad al momento del examen, ya ha comenzado la elevación inicial de esteroides sexuales gonadales o su respuesta de LH plasmática a GnRH intravenosa es de tipo puberal (elevación en LH de más de 15.6 mUI/mL). Estos resultados sugieren que el desarrollo sexual secundario comenzará en los siguientes seis meses. Sin embargo, en algunos casos, la observación de signos físicos o endocrinos de la pubertad deberá continuar por un periodo de meses o años antes de hacer el diagnóstico. Generalmente, los signos de pubertad aparecerán después de que el paciente alcanza la edad ósea de 11 años (mujeres) o 12 años (varones). Los pacientes con retardo constitucional en la

adolescencia, casi siempre manifiestan desarrollo sexual secundario a los 18 años de edad cronológica.

✓ **Etiología**

Lo más frecuente es el retraso simple de la pubertad conocido como “*retraso constitucional del crecimiento y desarrollo*”.

El retraso constitucional es una variante en el ritmo de maduración que se caracteriza por desaceleración del crecimiento en los 2 primeros años de la vida junto a retraso madurativo, estatura baja durante la infancia con velocidad de crecimiento normal, pubertad retrasada con estirón puberal tardío y atenuado y talla final habitualmente de acuerdo con su talla diana genética, pero en general, en el nivel más bajo de la misma. Es más frecuente en los varones y suelen existir antecedentes familiares del retraso puberal, lo que sugiere la implicación de factores genéticos. Está discutido que la pubertad tardía pueda afectar a la mineralización ósea. Pueden manifestar una insuficiencia transitoria de GH relacionada con el déficit de impregnación de los esteroides sexuales en el periodo prepuberal que no precisa tratamiento con GH.

Afecta al 0,6% de los niños y en general, este tipo de retraso tiene pocas implicaciones clínicas excepto la repercusión psicológica y este puede ser el motivo de precisar la inducción de la pubertad utilizando esteroides sexuales. El tratamiento a dosis adecuadas se ha visto que no compromete la talla final (Robles & Altamirano, 2003).

Causas etiológicas de pubertad retrasada o ausente

1. Idiopática o constitucional

2. Hipogonadismo secundario (*gonadotropinas normales o bajas*)

a. Congénito:

- i. Malformaciones congénitas asociadas a anomalías craneofaciales
- ii. Déficit de GnRH
 1. Síndrome de Kallmann (con anosmia): ligado al X (KAL), autosómico dominante, autosómico recesivo
 2. Sin anosmia
 3. Asociado a hipoplasia suprarrenal congénita (DAX1)
 4. Síndrome de Prader Willi, Laurence-Moon, CHARGE.
 5. Asociados a múltiples déficits hormonales tales como HESX1, LHX3, PROP1.

6. Alteración del gen del receptor de GnRH

iii. Idiopático: retraso constitucional del crecimiento y desarrollo

b. Adquirido:

i. Déficit funcional de gonadotropinas

1. Trastornos del comportamiento alimenticio, malnutrición
2. Enfermedad crónica sistémica
3. Enfermedad de Cushing, diabetes, hiperprolactinemia, hipotiroidismo

ii. Causas físicas

1. Tumores SNC: craneofaringiomas, gliomas hipotalámicos, gliomas del óptico, tumores hipofisarios
2. Enfermedades infiltrativas: histiocitosis, granulomatosis, hemocromatosis
3. Traumatismo craneoencefálico
4. Irradiación craneal.

3. Hipogonadismo primario (*gonadotropinas altas*)

a. Congénito

- i. Anomalías cromosómicas: Turner, Klinefelter, disgenesia gonadal mixta (46,XY/45,X)
- ii. Testículos evanescentes
- iii. Alteraciones de la síntesis y acción de los esteroides sexuales

b. Adquirido

- i. Secundarias a cirugía o traumatismo
- ii. Secundarias a radioterapia o quimioterapia
- iii. Autoinmune
- iv. Post-infecciosa
- v. Metabólica (galactosemia)

• *Primaria o simple Constitucional.* Es la causa más frecuente del retraso puberal temporal en los varones (60%). La relación frente a las niñas es 9:1. Se trata de una variante a la normalidad y en un porcentaje muy elevado de los casos se encuentran antecedentes familiares. A pesar del retraso del estirón puberal, generalmente la talla se recupera, aunque hay un 20 - 30% de los casos que quedan con talla inferior.

En ocasiones se presenta una verdadera dificultad diagnóstica con el hipogonadismo hipogonadotropo. Es importante además descartar la presencia de enfermedad sistémica y crónica. Lo más significativo es la repercusión psicológica induce a iniciar un tratamiento de adelanto de la pubertad en muchos casos.

- *Secundaria a enfermedades crónicas.* La causa más significativa es la desnutrición. Si la enfermedad aparece durante la pubertad, la pubertad se enlentece y los cambios puberales se detienen y/o regresan. Si desaparece la causa, la velocidad de crecimiento aumenta y los cambios puberales se ponen en marcha.

Fracaso del desarrollo puberal

- En el *hipogonadismo hipogonadotropico* hay un fallo hipotálamo hipofisario que determina un déficit de gonadotropinas permanente y un déficit de esteroides sexuales.

En cuanto al hipogonadismo hipogonadotropo congénito consiste en un déficit aislado de gonadotropinas. Puede deberse a múltiples causas, panhipopituitarismo, déficit de gonadotropinas con anosmia (Kallman), sin anosmia (esporádico o familiar), déficits de FSH y LH, síndromes malformativos (displasia septo-óptica y el síndrome de Prader-Willis).

Los hipogonadismos hipogonadotropos adquiridos, como tumores, craneofaringiomas, germinomas, las histiocitosis X, radioterapia, cirugía, traumatismos, etc. Son los que mayores problemas presentan a la hora del diagnóstico vs. retraso puberal simple, y retraso constitucional de crecimiento y desarrollo.

- El *hipogonadismo hipergonadotropo*, se produce por un fallo primario gonadal, una disminución de los esteroides sexuales, falta de retroalimentación negativa en la hipófisis y aumento de producción de gonadotropinas.

Multitud de patologías se encuentran clasificadas dentro de este grupo, las más significativas en el varón podrían ser: el síndrome de Klinefelter y sus variantes, los síndromes de regresión testicular haciendo hincapié en la anorquia congénita y por supuesto los síndromes de resistencia hormonal, insensibilidad a andrógenos, el síndrome de Morris completo e incompleto y síndromes polimalformativos de los cuales el más importante es el Noonan.

En las mujeres, se encuentran el síndrome de Turner, la resistencia ovárica a gonadotropinas, el déficit ovárico prematuro, y síndromes malformativos. En los *hipogonadismos hipergonadotropos adquiridos* masculinos encontramos orquitis bilateral, castración quirúrgica o traumática, o las situaciones de quimioterapia y radioterapia que afectan primordialmente a las gónadas. En el femenino, las

castraciones quirúrgicas o traumáticas, las ovaritis asociadas a enfermedades autoinmunes, la quimioterapia y radioterapia y el fallo ovárico precoz idiopático.

La gran problemática se presenta al diferenciar el retraso constitucional del hipogonadismo hipogonadotrofo. En la siguiente tabla se recogen todas las variables posibles (Oliver, 2005).

Tabla 2. Diagnóstico diferencial (Oliver, 2005)

	Retraso constitucional	Hipogonadismo hipogonadotrofo
Frecuencia	Muy elevada	Baja
Antecedentes familiares	Muy frecuentes	Posibles
Velocidad de crecimiento prepuberal	Lenta	Normal
Velocidad de crecimiento puberal-postpuberal	Lenta	Lenta
EO prepuberal	Retrasada	Normal
EO puberal	Retrasada	Retrasada
Proporciones corporales postpuberales	Infantil/eunocoide	Eunocoide
Genitales	Infantil	Hipoplásicos
Adrenarquía	Retrasada. Normal normal	Normal
LH	Normal	Baja
FSH		
LH nocturna	Picos	No picos
Test HCG	Normal	Bajo
Evolución espontánea	Aparece pubertad	No aparece pubertad

1.12 Variabilidad Genética

El DNA en el genoma humano está compuesto por 24 cromosomas distintos (22 autosomas + 2 cromosomas sexuales (X, Y) con un tamaño total aproximado de 3200 millones de pares de bases de ADN (3200 Mb) que contienen unos 20.000-25.000 genes (4). Si bien dos seres humanos del mismo sexo comparten un porcentaje elevadísimo (en torno al 99,9%) de su secuencia de ADN, lo que nos permite trabajar con una *única* secuencia de referencia, pequeñas variaciones genómicas fundamentan buena parte de la variabilidad fenotípica interindividual. Una variación en el genoma, por sustitución, delección o inserción, se denomina polimorfismo o alelo genético. No todo polimorfismo

genético provoca una alteración en la secuencia de una proteína o de su nivel de expresión, es decir, muchos son silenciosos y carecen de expresión fenotípica (9).

Un polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (Single Nucleotide Polymorphism, pronunciado *esnip*) es una variación en la secuencia de ADN que afecta a un solo nucleótido (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) del genoma (Figura 7). Una de estas variaciones debe darse al menos en un 1% de la población para ser considerada como un SNP. Los SNP forman hasta el 90% de todas las variaciones genómicas humanas, y aparecen cada 100--300 bases a lo largo del genoma humano. Estas variaciones en la secuencia del ADN pueden afectar la respuesta de los individuos a enfermedades, bacterias, virus, productos químicos, fármacos, etc. Debido a que los SNP no cambian mucho de una generación a otra, es sencillo seguir su evolución en estudios de poblaciones. Los SNP se consideran una forma de mutación puntual que ha sido lo suficientemente exitosa evolutivamente para fijarse en una parte significativa de la población de una especie (6).

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 (Gibson & Muse, 2004).

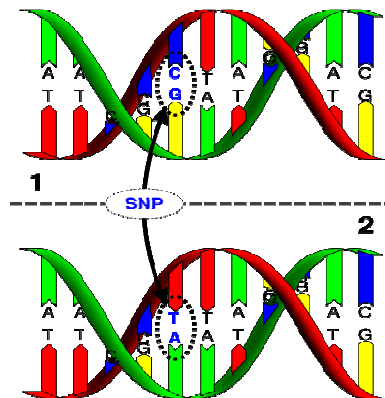


Figura 7. Polimorfismo de un solo nucleótido (7).

1.13 Mutaciones a lo largo del eje pituitario-gonadal que afectan la maduración sexual

Durante los últimos 10 años, numerosas mutaciones tanto activantes como inactivantes han sido detectadas en genes que codifican las dos principales gonadotropinas: la

hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH), así como también en sus receptores afines (R), LHR y FSHR (Figura 8). La activación del eje hipotálamo-pituitario-gonadal es un evento crucial en la aparición y progreso de la pubertad, mutaciones que afecten la acción de las gonadotropinas influyen en este proceso. Muchos de los efectos fenotípicos han sido esperados en base a la información existente acerca de la acción gonadotrópica (por ejemplo la pubertad retrasada), pero también muchos efectos no lo han sido, incluyendo la carencia de fenotipo en mujeres con mutaciones activantes en la LHR, y la discrepancia en fenotipos de hombre con mutaciones inactivantes de la FSH β (azoospermia e infertilidad) y FSHR (oligozoospermia y subfertilidad) (Huhtaniemi, 2006).

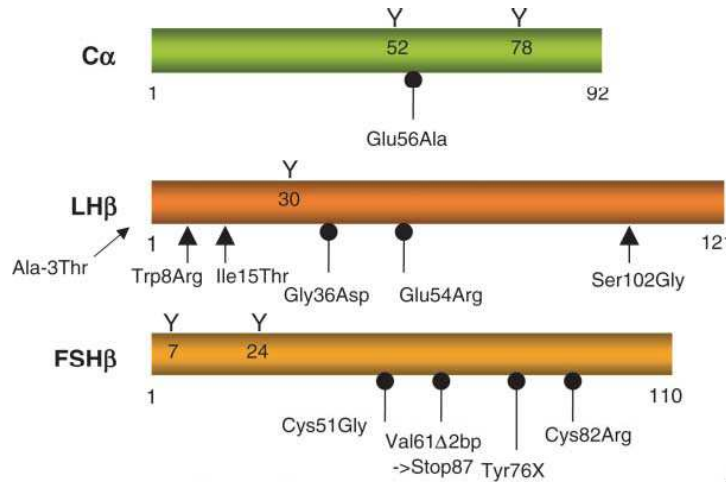


Figura 8. Mutaciones y polimorfismos conocidos que alteran aminoácidos en la subunidad α común y en los genes de la LH β y FSH β (Themmen, 2005)

1.13.1 Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) y su receptor (GnRHR).

El gen que codifica para esta hormona se encuentra en el cromosoma 8, el cual tiene 4 exones. La secuencia de codificación transcribe una proteína precursora de 92 aminoácidos que origina la GnRH y un péptido de 56 aminoácidos llamado GAP (péptido asociado con GnRH). El primer exón consiste de una región 5'-no transcrita que difiere en los DNA codificados de la placenta y el hipotálamo. El segundo exón codifica para el péptido señal, GnRH (10 aa) y los primeros 11 residuos de aminoácidos de GAP. El tercer exón codifica para los residuos 12-43 de GAP. El cuarto exón codifica para los 13 residuos de aminoácidos terminales de GAP y el restante mRNA no

se transduce. Diversas especies, contienen dos o más formas de GnRH. Una forma hipotalámica (GnRH-I), la cual varía en estructura entre las diferentes especies- y una forma altamente conservada que se encuentra en el tejido cerebral extrahipotalámico, sitio en el que se propone actúa como un neuromodulador. Actualmente se le conoce como GnRH II. La molécula de la GnRH, puede sufrir cambios conformacionales que le permiten ir desde una forma completamente extendida hasta una forma altamente enrollada (Antelli et al., 2006).

La GnRH actúa principalmente estimulando la hipófisis anterior para que sintetice y secrete las gonadotropinas FSH y LH. Ejerce tres acciones principales sobre la hipófisis anterior (Figura 9):

- Síntesis y almacenamiento de gonadotropinas
- Activación: el movimiento de las gonadotropinas de una reserva a un pool listo para la acción directa
- Liberación inmediata (secreción directa) de gonadotropinas (8).

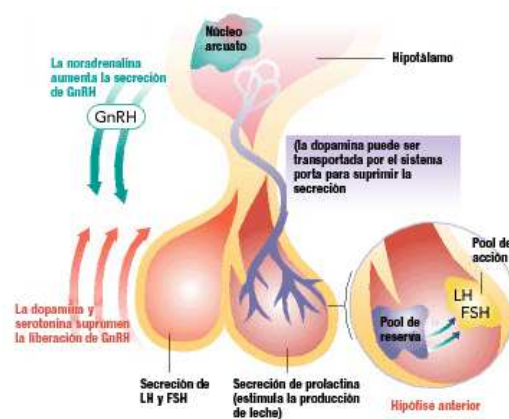


Figura 9. Acciones de la GnRH sobre la hipófisis anterior (8).

Los receptores a la GnRH se encuentran exclusivamente en membranas plasmáticas. El principal sitio blanco de esta hormona es el gonadótropo de la adenohipófisis. Sin embargo, receptores a esta hormona se han encontrado en gónadas de rata y de humano, en placenta, en tejido adrenal, algunos tejidos cancerígenos de mama y en el sistema nervioso central. La configuración del receptor tiene los rasgos característicos de los receptores acoplados a proteínas G; consiste de una sola cadena de aminoácidos con una amina extracelular, siete segmentos hidrofóbicos transmembranales conectados por asas extra e intracelulares y termina con un grupo carboxilo intracelular.

El gen del receptor de la GnRH de 20kb, se localiza en el cromosoma 4q13. Su secuencia codificante comprende 3 exones que codifica para una proteína de 328 aminoácidos. 18 mutaciones en este gen han sido identificados hasta ahora, algunas de las cuales han sido vinculadas con padecimientos tales como el hipogonadismo hipogonadotrópico (Antelli et al., 2006).

Mutaciones homocigotas de pérdida parcial de la función en el receptor de la GnRH, tales como la R262Q y la Q106R, pueden presentarse con fenotipos variables incluyendo pubertad retrasada (Lin et al., 2006).

1.13.2 Gonadotropinas

Como ya se ha mencionado, las hormonas glicoproteicas son heterodímeros consistentes en dos subunidades la α y β , la primera común a todas ellas y la segunda que le proporciona especificidad a cada una. Aunque ambas subunidades no muestran una secuencia de aminoácidos similar, sus estructuras tridimensionales son remarcablemente parecidas, estabilizadas por puentes disulfuro. Las gonadotropinas son miembros de la superfamilia de factores de crecimiento (Themmen, 2005).

a) Subunidad α

Esta subunidad se encuentra 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 (Ryan et al., 1988).

b) Subunidad beta de la Hormona Foliculoestimulante (FSH)

La subunidad β de la FSH está codificada en un gen localizado en el cromosoma 11p13, contiene 3 exones. El RNAm codifica para un precursor que incluye un péptido señal de 20 aminoácidos y un residuo apoproteico de 110 aminoácidos (Jameson et al., 1988).

La función biológica de la FSH tiene dos requerimientos estructurales: la heterodimerización y la unión específica a su receptor. Como ya se dijo previamente, la subunidad α es común en todas las hormonas glicoproteicas y la subunidad β permite la correcta interacción con el sitio de unión y el dominio extracelular del receptor de membrana (Huhtaniemi et al., 2005). Ambas subunidades contienen residuos de

carbohidratos unidos a asparagina localizados en las posiciones 52 y 78 sobre la subunidad α y en las posiciones 7 y 24 en la subunidad β . Estas cadenas de carbohidratos están involucradas en la regulación de la actividad biológica de la FSH, incluyendo la transducción de señales y la unión al receptor (Bishop et al., 1994).

Considerando a la subunidad β de la FSH, se han reportado 4 mutaciones inactivantes, con alteraciones sencillas en aminoácidos o nucleótidos eliminados dando como resultado codones de paro prematuro y proteínas FSH β truncadas. Los fenotipos característicos causados por estas mutaciones en ambos sexos son severos, resultando en ausencia o desarrollo incompleto de la pubertad e infertilidad. Sin embargo, en algunas poblaciones se encontró que la secuencia para el gen de la FSH humana es altamente conservada en algunas poblaciones y las mutaciones que dan lugar a cambios en los aminoácidos son aparentemente raras (Huhtaniemi et al., 2005).

Tabla 3. Mutaciones y polimorfismos en el gen de la subunidad β de la FSH (Huhtaniemi et al., 1999)

Gen	Mutación	Tipo	Cambio de aminoácido
FSH β	1.GTG—GXX	Delección 2pb/codón de stop prematuro	Val61—X Stop 87
	2.GTG---GXX	Compuesto heterocigoto	Val61—X
	TGT---GGT	Delección 2pb/codón de stop prematuro	Stop 87 Cys51—Gly
	3.TGT----CGT	Mutación puntual	Cys82—Arg

c) Subunidad beta de la hormona luteinizante (LH β)

La subunidad β de la hormona luteinizante (LH) se encuentra codificada por un solo gen de 1.1 kb, el cual está localizado en el cromosoma 19q13.3. Contiene 3 exones, el RNAm posee 700 nucleótidos y codifica para una proteína con un péptido señal de 24 aminoácidos y una apoproteína de 121 aminoácidos (Gharib et al., 1990)

Mutaciones en los genes de gonadotropinas y de sus receptores son muy raras. La selección es aparentemente efectiva debido a los efectos directos de dichas mutaciones sobre la fertilidad y la reproducción. (Huhtaniemi & Lamminen, 2001). Se ha detectado una serie de variantes genéticas en el gen de la subunidad beta de la hormona luteinizante (LH). Entre estos cambios se encuentran 2 mutaciones puntuales en el

codón 8 (TGG---CGG; Trp---Arg), y otra en el codón 15 (ATC---ACC; Ile---Thr), las moléculas resultantes poseen una alta bioactividad *in vitro*, pero una vida corta en circulación, lo cual está aparentemente relacionado con las alteraciones en la función de la LH que se han observado en individuos homo y heterocigotos para el alelo LH β variante (Huhtaniemi et al., 1999). La primera mutación es la principal responsable de la inmunoreactividad alterada y la segunda introduce un sitio de glicosilación extra en la Asn13 del péptido mutado. La frecuencia de esta variante alélica LH β difiere ampliamente entre grupos étnicos, por ejemplo en la población japonesa estas variantes se han asociado con disfunción ovárica primaria y con el síndrome del eunuco (Huhtaniemi & Lamminen, 2001).

Tabla 4. Mutaciones y polimorfismos en el gen de la subunidad β de la LH (Huhtaniemi & Pettersson, 1998)

Locus	Tipo	Cambio de nucleotide	Cambio de aminoácido	Fenotipo masculino	Fenotipo femenino	Alteración en la bioactividad	Inmunoreactividad
Exón 3	Sin sentido	CA ²²¹ G-CGG	Gln ⁵⁴ -Arg	Ausencia de pubertad espontánea.		Ausente	Normal
Exón 2	Sin sentido	T ⁸² GG-CGG AT ¹⁰⁴ ACC	Trp ⁸ -Arg Ile ¹⁵ -Thr	Retraso temporal en la progresión de la pubertad.	Ligera supresión de la fertilidad.	Incrementada <i>in vitro</i> Disminución del T1/2 en circulación.	Pobremente detectada por anticuerpos específicos.
Exón 3	Sin sentido	G ³⁶⁴ GT-AGT	Gly ¹⁰² -Ser	Infertilidad.	Desordenes menstruales, infertilidad	Disminuye <i>in vitro</i> .	Normal
Exón 3	Sin sentido	G ⁵² CA-ACA	Ala ³ --Thr	Activa la vía de transducción de señales IP3 <i>in vitro</i> .		Normal	Normal
Exón 2	---	---	Gly ³⁶ -Asp	Retraso de la pubertad e hipogonadismo		No se ha estudiado	No se ha estudiado
---	Seis polimorfismos	---	---	No se ha reportado alteraciones		Normal	Normal

1.13.3 Receptores de la hormona luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH)

Los receptores pertenecen a la familia rodopsina de 7 dominios transmembranales, están acoplados a proteína G y se caracterizan por un largo ectodominio que constituye aproximadamente la mitad del receptor y una alta afinidad por su ligando. El receptor de

la hormona luteinizante (LHR) acopla tanto a la LH proveniente de la pituitaria como a la hormona placentaria; la gonadotropina coriónica (CG), esto por el alto grado de homología secuencial que existe entre las dos – subunidades, mientras que el receptor de la FSH se une sólo a la FSH.

La vía de señalización primaria activada por estos receptores es la vía del AMPc mediada por $G\alpha_s$ (Figura 10). LHR también activa fosfolipasa C con a subsecuente inducción de fosfatidil inositol, así como la vía MAPK en algunos tipos celulares (Meehan & Narayan, 2007).

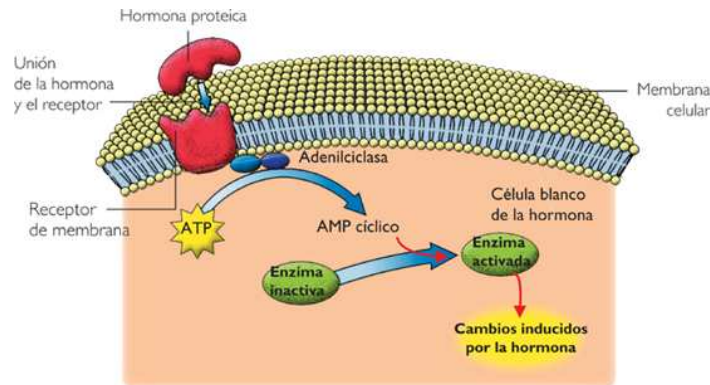


Figura 10. Vía de señalización mediada por AMPc (9).

Existen mutaciones activantes e inactivantes para los receptores (Figura 11), las primeras causan activación constitutiva de la vía de señalización, mientras que el segundo tipo produce la respuesta contraria.

Mutaciones activantes en el gen del receptor de la hormona luteinizante (LHR) son las más comunes encontradas en los genes del receptor para gonadotropinas. Hombres con este tipo de mutaciones presentan pubertad precoz, mientras que las mujeres no poseen un fenotipo obvio (Meehan & Narayan, 2007). Las mutaciones inactivantes, aunque son pocas se han localizado y algunas se han vinculado con el desarrollo del ovario hipergonadotrófico, entre otras cosas (Themmen, 2005).

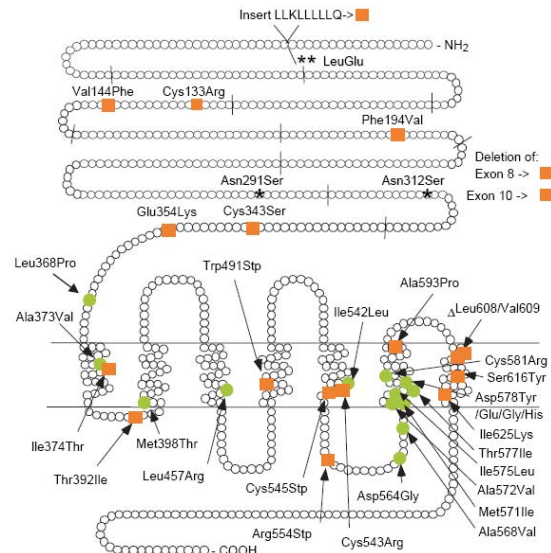


Figura 11. Mutaciones y polimorfismos encontrados comúnmente que alteran aminoácidos en el gen del receptor de la LH. Los círculos verdes muestran las mutaciones activantes, los cuadros rojos mutaciones inactivantes, y los asteriscos los polimorfismos. Stp=sin sentido. (Themmen, 2005)

En cuanto a mutaciones en el receptor de la FSH (FSHR) también presenta mutaciones tanto activantes como inactivantes (Figura 12). Entre las activantes se han encontrado algunas que parecen relacionarse con falla ovárica, formación de tumores ováricos, desarrollo de megalotestículos, pubertad precoz, entre otros. Se han encontrado 9 mutaciones inactivantes, algunas de ellas relacionadas con hipogonadismo hipergonadotrópico, desarrollo variable de caracteres sexuales secundarios, arresto de la maduración folicular, entre otras (Themmen, 2005).

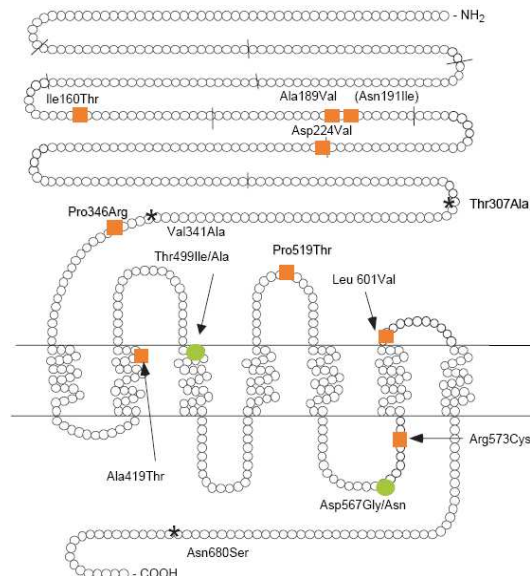


Figura 12. Mutaciones y polimorfismos conocidos que alteran la secuencia de aminoácidos en el gen del receptor de la FSH humana. Los círculos verdes representa las mutaciones activantes, los cuadros rojos las mutaciones inactivantes, y los asteriscos los polimorfismos (Themmen, 2005).

1. Justificación

Es importante considerar la base genética de los desórdenes de las hormonas gonadotrópicas, entre ellas la hormona luteinizante (LH) es una de las principales ya que es esencial para que se lleve a cabo el correcto funcionamiento del eje reproductivo. Identificando, mediante técnicas moleculares; mutaciones y polimorfismos que ocurren de manera natural se provee de información acerca del papel que estos genes juegan en el desarrollo sexual humano y la fertilidad, y permite el desarrollo de mejores tratamientos para padecimientos tales como la infertilidad y en este caso el retraso en el desarrollo puberal permitiendo un asesoramiento más adecuado para el paciente y su familia.

2. Hipótesis

- Se encontrarán polimorfismos del gen de la LH con una frecuencia propia de la población mexicana
- En pacientes con retraso en el desarrollo de la pubertad es probable que se encuentren mutaciones en el gen de la LH que expliquen esta falla.

3. Objetivos

- Identificar polimorfismos en el gen de la LH β en población Mexicana y encontrar una relación entre estas variaciones y el retraso en el desarrollo de la pubertad.

4. Objetivos específicos

- Determinar la presencia de variantes polimórficas en el gen de la LH β propias de la población mexicana.
- Establecer si existe alguna relación entre las variantes encontradas del gen con el retraso en el desarrollo de la pubertad.

1. Material y métodos

6.1 Diseño experimental.

Se reclutaron un total de 25 niños controles y 7 pacientes prepúberes en un periodo de 6 meses, a ambos grupos se les tomó una muestra sanguínea de entre 5 y 10 mL, la cuál se dividió en dos alícuotas, la primera fue utilizada para extracción de DNA y la segunda para pruebas bioquímicas y cuantificaciones hormonales. Se realizaron mediciones antropométricas (cintura, cadera, estatura y peso), posteriormente se calcularon el Índice Cintura Cadera (ICC) y el Índice de Masa Corporal. Una vez extraído el DNA se realizó el análisis de PCR-SSCP y finalmente la secuenciación.

Criterios de Selección:

Controles

- Niñas y niños de entre 10 y 18 años de edad.
- Correspondencia con su Tanner de acuerdo a su edad
- Padres y abuelos mexicanos.

Pacientes

- Niñas y niños diagnosticados con retraso en el desarrollo puberal.
- Padres y abuelos mexicanos

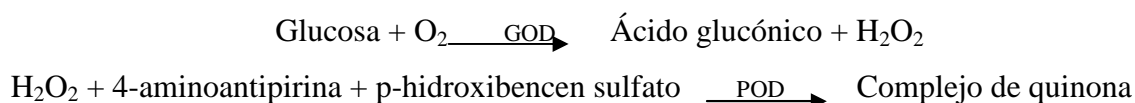
Los padres de los menores involucrados en este proyecto firmaron una carta de aceptación, en la cual dieron su consentimiento de participación voluntaria en el proyecto (apéndice I). La toma de muestra se llevo a cabo en el Hospital Materno Infantil (HMI) Inguarán, y el Comité de Etica de la Secretaría de Salud del Distrito Federal (SSDF) aprobó este proyecto. Es importante señalar que la Secretaría de Salud sugirió que la toma de muestras se llevara a cabo por un periodo de 6 meses y solamente se reclutaron los pacientes que llegaron en ese periodo de tiempo.

6.2 Determinaciones bioquímicas

Se realizaron pruebas de glucosa, triglicéridos y colesterol, para las cuales se utilizaron estuches comerciales de la marca Stanbio Laboratory (LICON, Boerne TX).

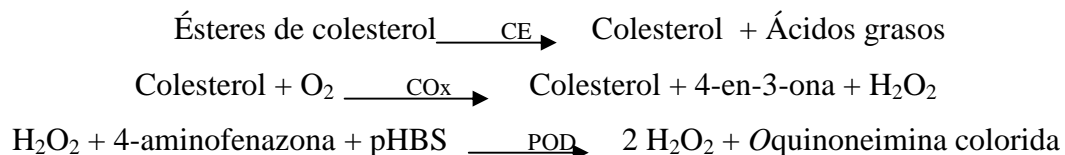
✓ Glucosa

Este método es enzimático-colorimétrico y se basa en la oxidación de la glucosa en presencia de la enzima glucosa oxidasa (GOD) a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno formado, bajo la influencia de la peroxidasa (POD) y 4-aminoantipiridina reaccionan para formar un complejo rojo violeta de quinona. La intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa. El compuesto colorido se lee a 500 nm.



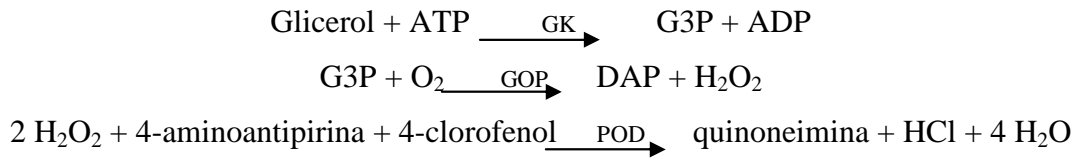
✓ Colesterol total

Método enzimático-colorimétrico. El método se basa en la capacidad de la Colesterol Esterasa (CE) para hidrolizar los ésteres de colesterol, produciendo colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre se oxida en presencia de la Colesterol Oxidasa (COX) para dar colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno reacciona con 4-aminofenazona y fenol (contenido en el buffer), en presencia de la Peroxidasa (POD) para formar una quinonimina de color rojo. La intensidad del color rojo final es proporcional a la concentración total de colesterol. El compuesto también se lee a 500 nm.



✓ Triglicéridos

Método enzimático-colorimétrico. Se basa en la acción de la lipasa sobre los triglicéridos produciendo glicerol y ácidos grasos. En la 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. Estos últimos reaccionan con la 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 triglicéridos.



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. 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 ¹²⁵I a cada tubo. Se incubaron todos los tubos por dos horas a temperatura ambiente. Se decantaron todos los tubos, 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 ® PREGESTERONE 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), compite 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. 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)

6.4 Extracción de DNA

Se extrajeron aproximadamente 5 mL de sangre periférica y se depositaron en tubos cónicos, lo cuales contenían 200 μL de EDTA como anticoagulante. El DNA genómico se obtiene de los leucocitos presentes en la sangre. Posteriormente se lavó con una solución de sacarosa tritón 2x y se centrifugó, se decantó y el botón fue lavado nuevamente con sacarosa tritón 1x, ya una vez obtenido el segundo botón se le agrega buffer de lisis nuclear, SDS al 10% y proteinasa K para lisar las células y el núcleo y exponer el DNA. Se incubó en baño María a 37° C toda la noche. Después se le agrega una solución de NaCl saturado para precipitar las proteínas, se centrifugó para separar el precipitado, se separó el sobrenadante y finalmente se le agregó una solución de etanol absoluto frío para precipitar el DNA, se colectó, se lavó con etanol al 70% y, para terminar, el DNA obtenido se resuspendió en buffer TE. (Ver apéndice I)

6.5 Diseño de oligonucleótidos para el gen de LH β

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

Exón	Secuencia	Tamaño Esperado	Temperatura de alineamiento
2	F2 GGTCCTGAATAGGAGATGCCA R2 CCATTCCCCAACCGCAGG	400 pb	60° C
3	F3 AGTCTGAGACCTGTGGGGTCAGCTT R3 TAAAGACCCTCCCCGCAGCCTTCCA	350 pb	65° C

6.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En cada tubo se colocó 1 µL de DNA de las muestras a examinar, 0.7 µL de Buffer 10X, 0.4 µL de cada oligo y de cada dNTP's, 0.26 µL de DMSO y, finalmente 0.13 µL tanto de Taq polimerasa como de marca [³²P] dCTP.

La amplificación de la reacción se llevó a cabo en un Termociclador (Mastercycler gradiente eppendorf), en 25 ciclos, con una temperatura de desnaturalización de 95° C durante 30 seg, una temperatura de alineamiento de 60 o 65° C (dependiendo el exón) durante 30 seg, y una temperatura de extensión de 72° C durante 30 seg. Se verificó la reacción corriendo un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y amortiguador TBE 1X durante 30 min a 80 V (Ver apéndice I).

6.7 Purificación del DNA

El amplificado se purificó para realizar la secuenciación utilizando un kit de INVITROGEN (Ver apéndice 1).

6.8 Polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP)

La sustitución de una sola base es suficiente para alterar la movilidad de una sola cadena de DNA que es sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizante. Dicha movilidad es atribuida a cambios conformacionales, resultantes de sustituciones, inserciones o deleciones en una cadena del DNA. Así pues, este método permite detectar alguna alteración del DNA, basándose en la digestión del DNA por medio de enzimas de

restricción, su desnaturalización y electroforesis en un gel de poliacrilamida. Se mezclaron 2 μL del producto de PCR y 28 μL de amortiguador de carga para SSCP, se desnaturalizó a 95° C durante 5 min e inmediatamente después se colocó en hielo. 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 Whatman 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 casete y se expuso a una placa radiográfica, durante 24 h, para después revelarlo (Ver apéndice I).

6.9 Secuenciación automática

Se enviaron a secuenciar las muestras al Instituto de Fisiología Celular y al Instituto de Biotecnología (IBT), UNAM.

La principal diferencia entre método enzimático de terminación de cadena y el método automático de secuenciación radica, en primer lugar en el tipo de marcaje. En el método automático en vez de radiactividad se utiliza fluorescencia y lo habitual es realizar cuatro mezclas de reacción, cada una con nucleótido trifosfato (dTTP) marcado con un fluorocromo distinto. Este sistema permite automatizar el proceso de manera que es posible leer al mismo tiempo los ADNs de nueva síntesis producto de las cuatro mezclas de reacción.

La segunda diferencia radica en el sistema de detección de los fragmentos de ADN. La detección del tipo de fluorescencia correspondiente a cada reacción se lleva a cabo al mismo tiempo que la electroforesis, de manera que los fragmentos de ADN de menor tamaño que ya han sido detectados se dejan escapar del gel, permitiendo este sistema aumentar el número de nucleótidos que se pueden determinar en cada electroforesis y, por consiguiente, en cada secuenciación (Ver apéndice I).

6.10 Análisis estadístico

Los resultados de las determinaciones bioquímicas y hormonales se compraron utilizando la prueba “t” de Student no pareada, empleando el programa estadístico Graph Pad Prism versión 3.0, Graph Pad Software Inc. San Diego, CA. 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

7.1 Mediciones antropométricas

Se realizaron mediciones antropométricas tanto a los pacientes como a los controles: peso, estatura, cintura y cadera, datos con los cuales se calcularon el resto de la mediciones: índice de masa corporal (IMC) y el índice cintura cadera (ICC). Los resultados se muestran en la Tabla 5.

	Peso	Estatura	Cintura	Cadera	IMC	ICC
Niñas						
Controles	44.09±11.32	1.48±0.08	73.2±13.12	82.6±11.44	19.9±4.79	0.88±0.06
Niños						
Controles	56.49±12.46	1.61±0.09	79.33±11.42	85.93±12.71	21.5±4.12	0.93±0.05
Niñas						
Pacientes	46.26±8.33	1.46±0.17	76.0±4.35	88.33±17.55	21.7±2.28	0.88±0.14
Niños						
Pacientes	37.17±5.56	1.36±0.09	70.75±5.18	73.25±4.5	20.0±2.6	0.97±0.06

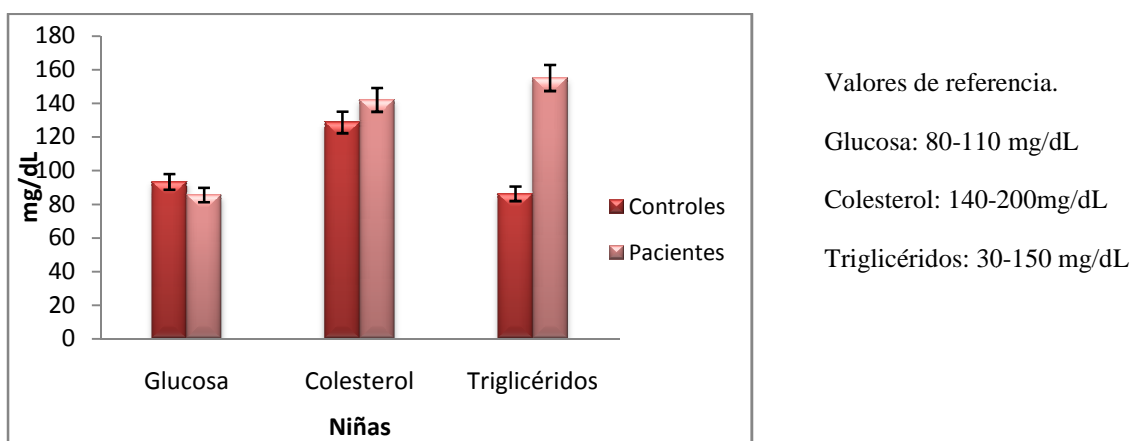
Tabla 5 Mediciones antropométricas tanto de sujetos control como pacientes. Valores expresados como promedio \pm EEM, (n=25 controles y n= 7 pacientes), $P < 0.05$.

Como puede verse en la tabla el valor promedio tanto del índice de masa corporal (IMC) como en el índice cintura cadera (ICC) se encuentran dentro del valor normal en ambas mediciones tanto para controles como para pacientes. Tomando como valores de referencia los siguientes: IMC<25 Normal, IMC 25-30 sobrepeso, IMC>30 obesidad y un ICC<1 como normal.

7.2 Determinaciones bioquímicas

Las cuantificaciones bioquímicas: glucosa, colesterol y triglicéridos en controles y en pacientes. Los resultados se muestran en las siguientes gráficas.

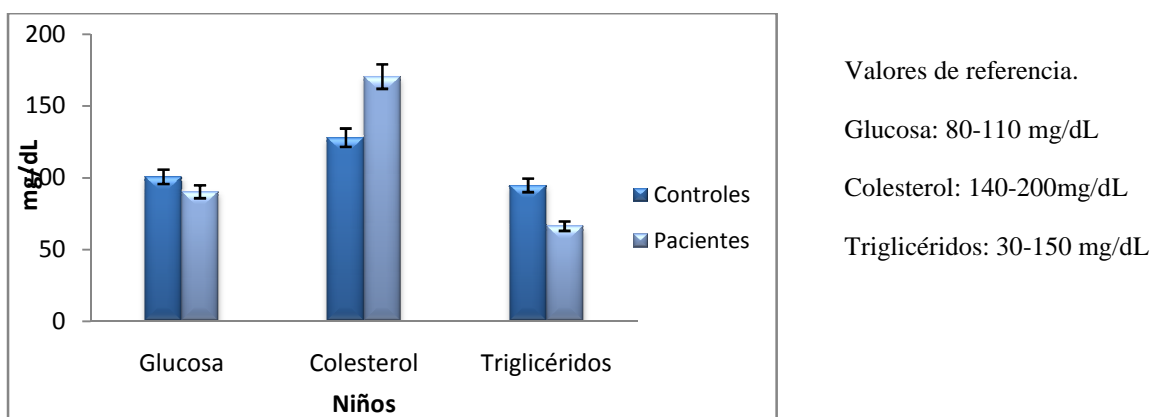
❖ Niñas



Gráfica 1. Determinaciones bioquímicas de controles y pacientes niñas. Valores expresados como promedio \pm EEM.

Los resultados de las determinaciones bioquímicas en las niñas y niños control y pacientes (gráfica 1 y 2 respectivamente) se encuentran dentro de los límites de referencia. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

❖ Niños

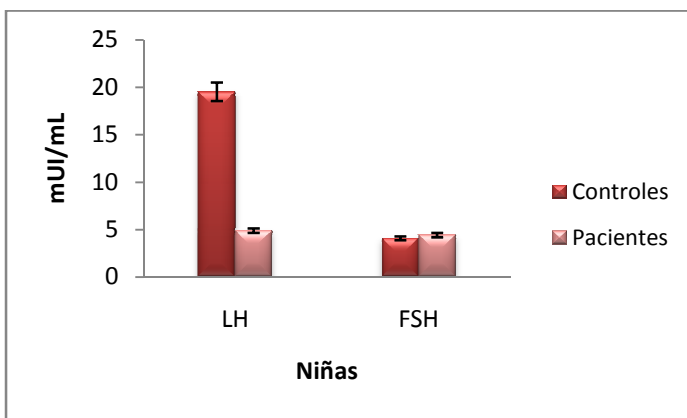


Gráfica 2. Determinaciones bioquímicas de controles y pacientes niños. Valores expresados como promedio \pm EEM.

7.3 Cuantificaciones hormonales.

Los resultados de las cuantificaciones de la hormona luteinizante (LH), la hormona foliculoestimulante (FSH), la progesterona y la testosterona se muestran en las siguientes gráficas. Estas pruebas se realizaron tanto en sujetos control como en pacientes y se manejaron por separado para niñas y niños. No se mostraron diferencias estadísticamente significativas para ningún parámetro.

❖ Niñas



Valores de referencia.

LH mUI/mL

Prepúberes: 1.0-3.7

Fase folicular 1.0-18.5

Fase ovulatoria 4.8-72.2

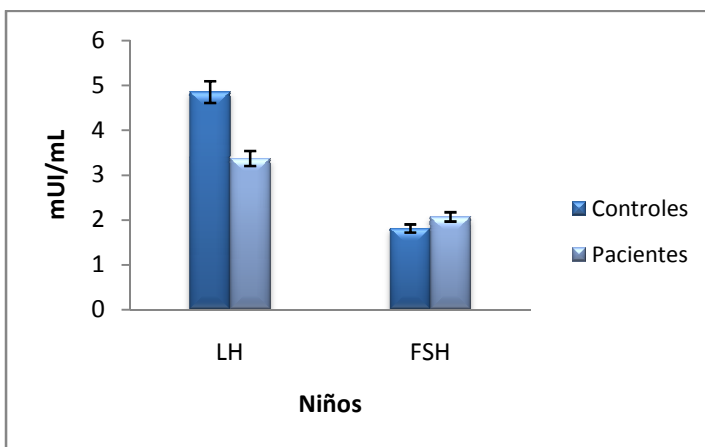
Fase lútea 1.0-21.6

FSH mUI/mL

Mujeres 2.5-8.0

Gráfica 3. Determinaciones hormonales (LH y FSH) de controles y pacientes niñas. Valores expresados como promedio \pm EEM.

❖ Niños



Valores de referencia.

LH mUI/mL

Hombres 1.1-8.3

FSH mUI/mL

Hombres 1.5-5.8

Gráfica 4. Determinaciones hormonales (LH y FSH) de controles y pacientes niños. Valores expresados como promedio \pm EEM.

La cuantificación realizada de testosterona en hombres y progesterona en mujeres se muestra en la siguiente tabla. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

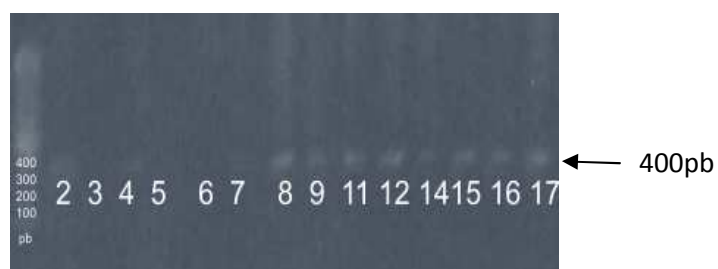
Hormona	Valor	Valores de referencia
Testosterona (ng/mL) Hombres	Controles 3.0 ± 2.38	3.0-10.0 ng/mL
	Pacientes 1.25 ± 0.67	
Progesterona (ng/mL) Mujeres	Controles 5.58 ± 0.36	2.0-20.0 ng/mL
	Pacientes (3) 5.99 ± 8.08	

Tabla 6 Mediciones hormonales de testosterona y progesterona tanto de sujetos control como pacientes. Valores expresados como promedio \pm EEM, (n=25 controles y n= 7 pacientes), $P < 0.05$.

7.4 Pruebas moleculares.

- Amplificación del exón 2 del gen de la subunidad β de la LH mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de niños control.

A continuación (Figura 13) se muestran los corrimientos electroforéticos de los productos de la reacción de las muestras de los niños control.



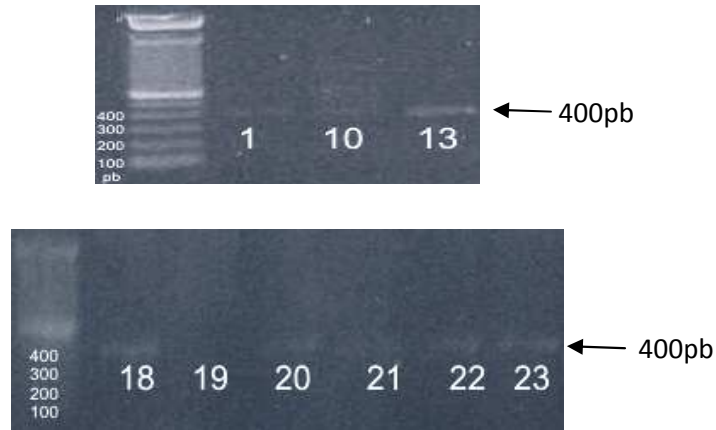
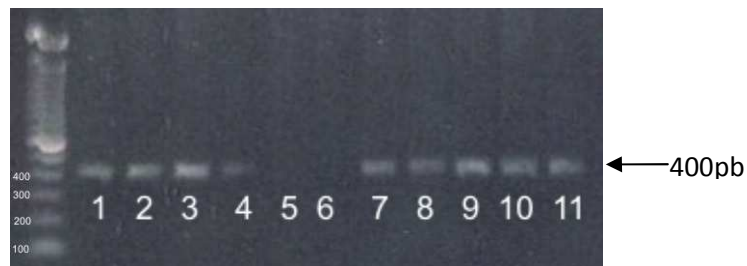


Figura 13. Amplificación del exón 2 de la LH β . Niños control. La temperatura de alineamiento utilizada para este exón fue de 60° C y el tamaño del exón es de 400 pb. Para el corrimiento se utilizó un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se corrió a 80 V durante 25 min.

Nota: Aquellas muestras que no salieron a la primera fueron nuevamente amplificadas, sin embargo se les tomó la foto junto con el producto de la amplificación de los pacientes.

- Amplificación del exón 2 por PCR en muestras de pacientes

En la figura 14 se observa el corrimiento electroforético de los productos de amplificación por PCR del exón 2 de las muestras de los pacientes.



Se repitieron las muestras 5 y 6

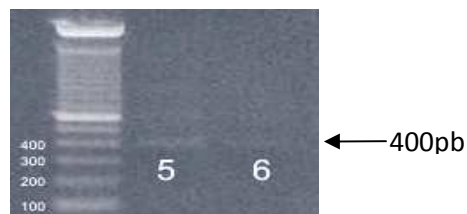


Figura 14. Amplificación del exón 2 de la LH β . Pacientes y controles. Temperatura de alineamiento: 60° C tamaño del exón: 400 pb. Condiciones de corrimiento en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio: 25 min a 80 V.

Nota: La amplificación de las muestras de pacientes en el primer gel corresponden a las primeras 7 líneas, las últimas 4 corresponden a las muestras de algunos sujetos control que fueron nuevamente amplificados.

7.5 Análisis por SSCP controles

El corrimiento electroforético de esta técnica se llevó a cabo en 4 diferentes condiciones variando principalmente la concentración de acrilamida del gel: 5.4% de acrilamida con y sin glicerol y 8.0% de acrilamida con y sin glicerol. Todos los geles se corrieron por 24 horas a 200 volts. En la Figura 15 se muestran los 4 geles obtenidos del análisis SSCP del exón 2 del gen de la LH β , en ellos se observaron 8 patrones de migración diferentes señalados por las flechas, los cuales se mandaron secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Mor.) y al Instituto de Fisiología Celular UNAM una muestra de cada patrón encontrado; aquellas muestras de los siguientes carriles: C1 (P-3), C3 (P-22), C5 (P35), C8 (P-37), C12 (P-36), C15 (P-8), C22 (P-21) y C23 (P-26)

7.6 Análisis por SSCP pacientes

En la figura 16 se muestran los patrones de corrimiento obtenidos en las muestras de los pacientes, como puede verse se obtuvieron 5 patrones diferentes para este exón 2, los cuales fueron enviados a secuenciar, los carriles fueron C1 (i-1), C2 (i-2), C3 (i-3), C4 (i-5), C5 (i-6).

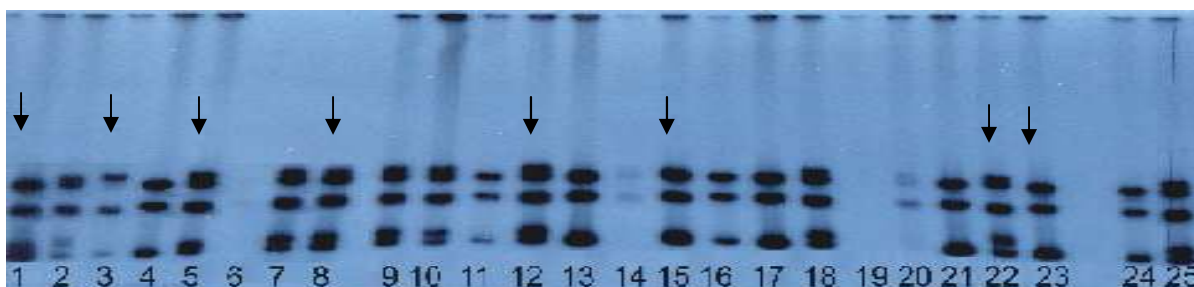
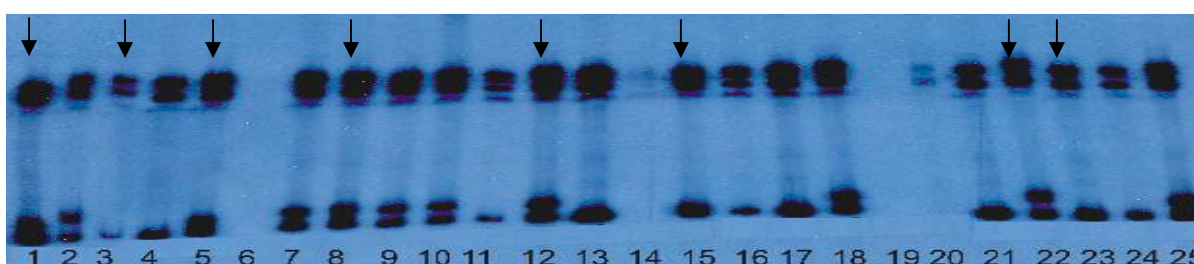
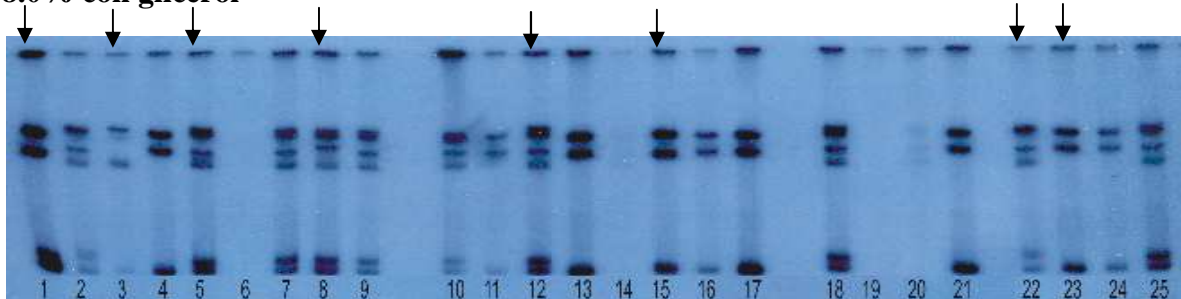
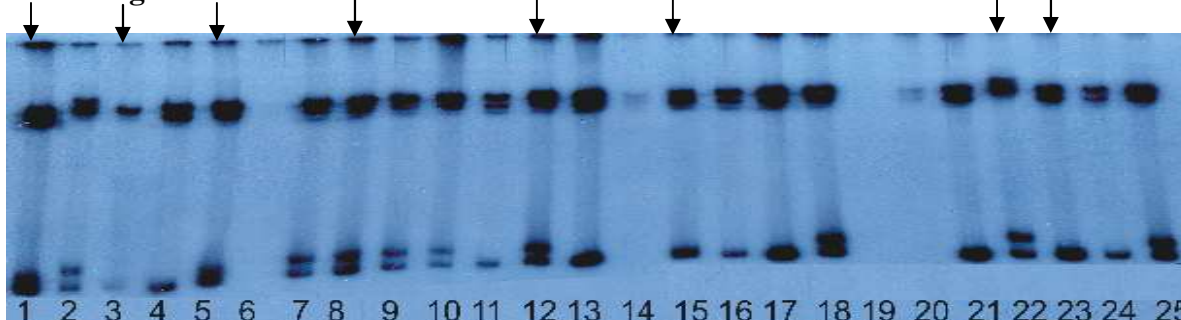
SSCP, exón 2. Controles**5.4% con glicerol****5.4% sin glicerol****8.0% con glicerol****8.0% sin glicerol**

Figura 15. Análisis SSCP del ADN de los controles correspondiente al exón 2 del gen LH β . En la figura se muestran los geles obtenidos en esta técnica en las 4 condiciones ya antes mencionadas: (A) 5.4% con glicerol, (B) 5.4% sin glicerol, (C) 8.0% con glicerol y (D) 8.0% sin glicerol. Las flechas indican los diferentes patrones de migración.

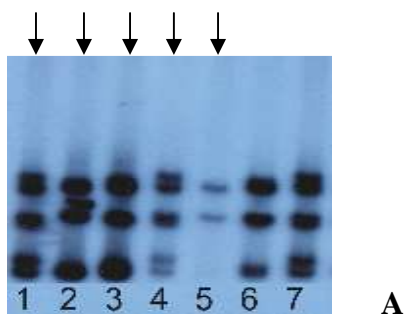
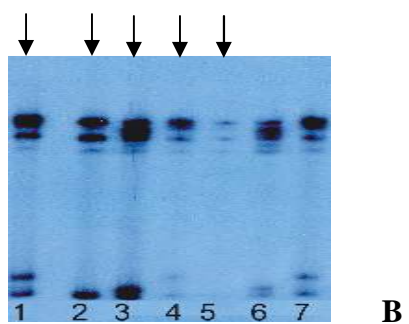
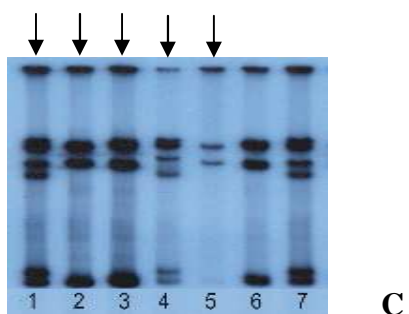
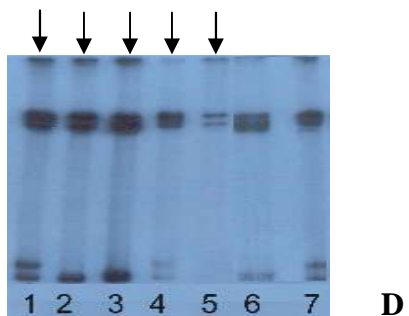
SSCP, Exón 2. Pacientes**5.4% con glicerol****5.4% sin glicerol****8.0% con glicerol****8.0% sin glicerol**

Figura 16: Análisis SSCP del DNA de los pacientes que corresponde al exón 2 del gen de la LH β . Lo que se muestra en la figura son las muestras 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.

7.7 Selección de las muestras para secuenciar y purificación del producto de PCR.

De acuerdo al corrimiento electroforético de las pruebas anteriores (SSCP's) del exón 2 tanto de controles como de pacientes, se eligieron las siguientes muestras a secuenciar por presenciar diferentes patrones de corrimiento: p36, p26, p21, p8, p37, p22, p35, p3, i1, i2, i3, i5 e i6.

En la siguiente figura 17 (A) se muestra el producto de PCR de la amplificación del exón 2 de la LH β de las muestras antes mencionadas. Posteriormente se realizó la purificación que se muestra en las figura 17 (B).

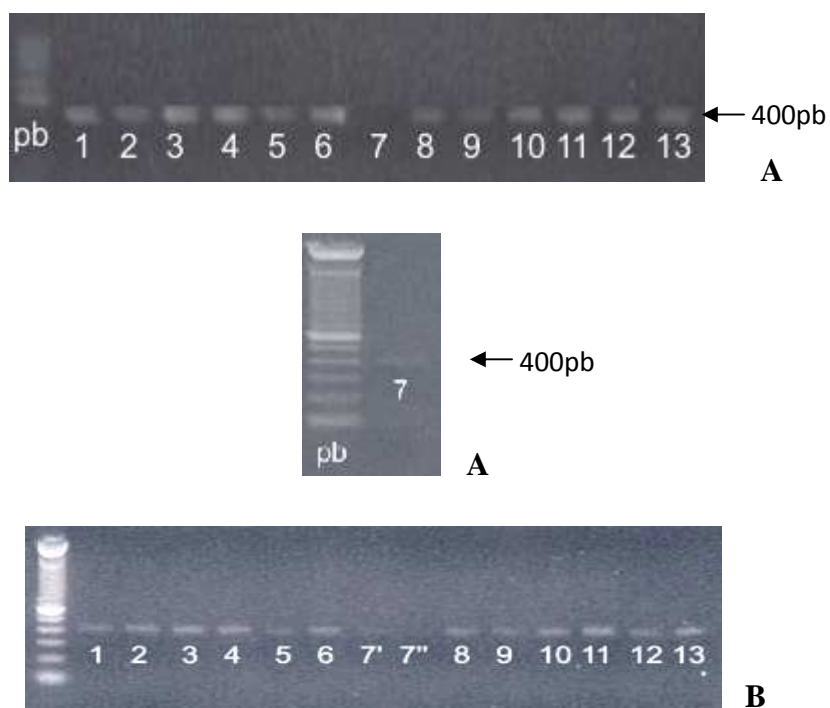


Figura 17. Amplificación del exón 2 del gen de LH β de las muestras que mostraron diferentes control de corrimiento electroforético (A). Purificación del producto de PCR de estas muestras (B).

7.8 PCR y análisis por SSCP Exón 3.

En la figura 18 y 19 se muestra el corrimiento electroforético de los productos de amplificación por PCR del exón 3 del gen de la subunidad β de la LH tanto en controles como en pacientes, respectivamente. Posteriormente y, al igual que con el exón 2 se realizó el análisis por SSCP con 4 corrimientos electroforéticos variando la concentración de acrilamida del gel. La figura 20 muestra estos corrimientos realizados en sujetos control y la figura 21 el de los pacientes.

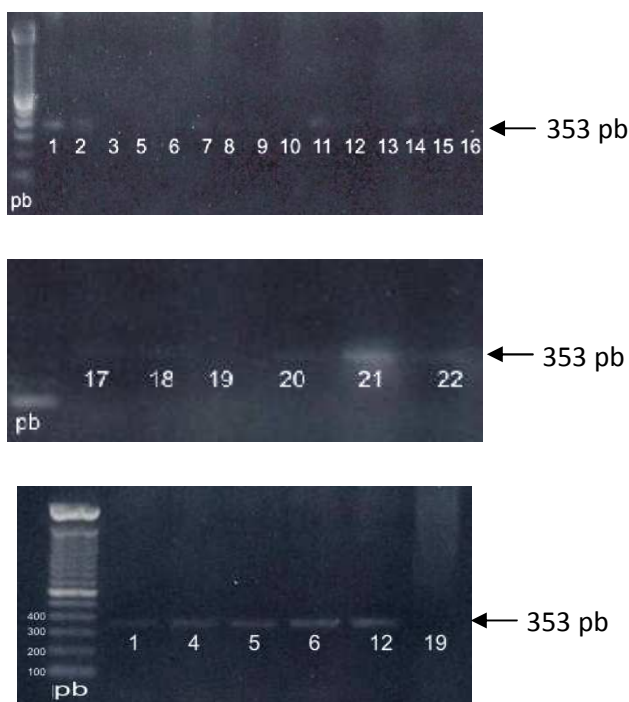


Figura 18. PCR del Exón 3 de la LH β controles. Temperatura de alineamiento: 65° C. Tamaño del exón: 353 pb. El gel utilizado para este corrimiento fue de agarosa en una proporción del 1% teñido con bromuro de etidio y se corrió a 60 v por 25 min.



Figura 19. PCR del Exón 3 de la LH β pacientes. Temperatura de alineamiento: 65° C. Tamaño del exón: 353 pb. El gel utilizado para este corrimiento fue de agarosa en una proporción del 1% teñido con bromuro de etidio y se corrió a 60 v por 25 min.

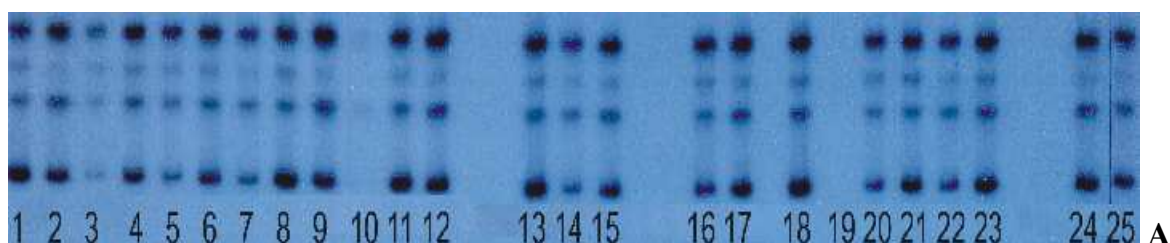
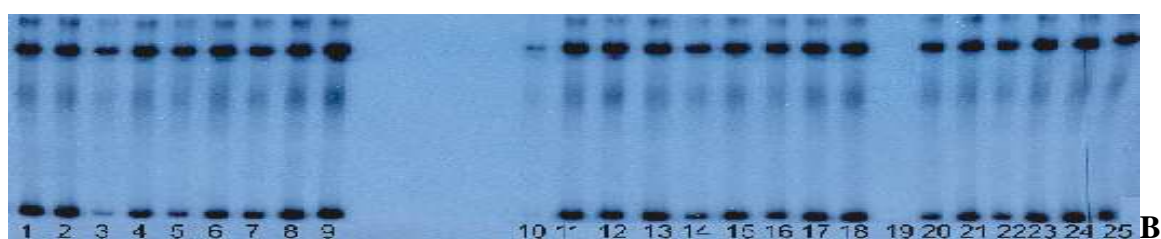
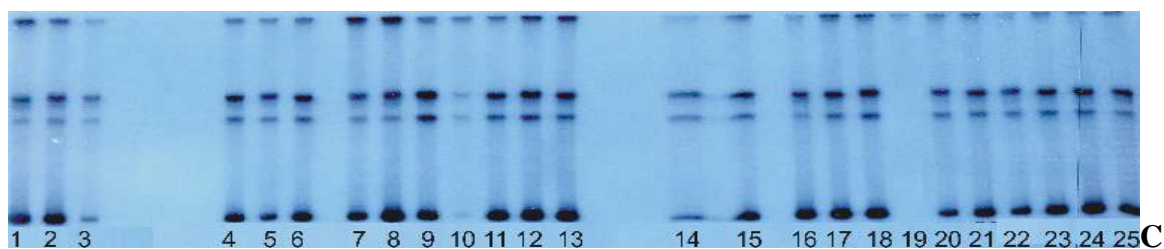
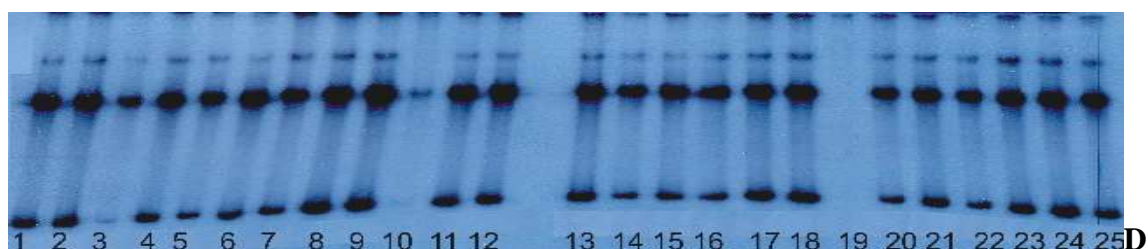
SSCP, Exón 3. Controles**5.4% con glicerol****5.4% sin glicerol****8.0% con glicerol****8.0% sin glicerol**

Figura 20: Análisis SSCP del DNA de los pacientes que corresponde al exón 3 del gen de la LH β . Lo que se muestra en la figura son las muestras obtenidas: (A) 5.4% acrilamida con glicerol, (B) 5.4% acrilamida sin glicerol, (C) 8.0% acrilamida con glicerol, (D) 8.0% acrilamida sin glicerol. No hay diferencia en los patrones de corrimiento.

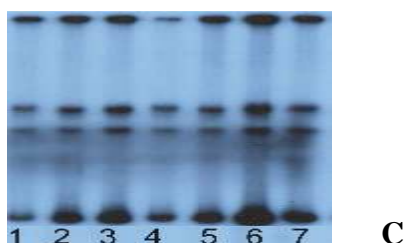
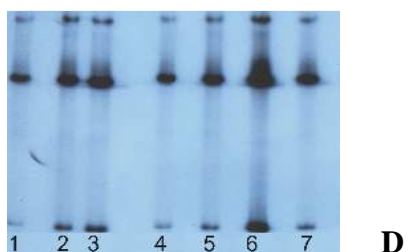
SSCP, Exón 3. Pacientes**5.4% con glicerol****5.4% sin glicerol****8.0% con glicerol****8.0% sin glicerol**

Figura 21: Análisis SSCP del DNA de los pacientes que corresponde al exón 3 del gen de la LH β . Lo que se muestra en la figura son las muestras obtenidas: (A) 5.4% acrilamida con glicerol, (B) 5.4% acrilamida sin glicerol, (C) 8.0% acrilamida con glicerol, (D) 8.0% acrilamida sin glicerol. No hay diferencia en los patrones de corrimiento.

Análisis por SSCP exón 3

Al igual que con el exón 2, se realizaron cuatro corrimientos electroforéticos, variando la concentración de acrilamida del gel: 5.4% con y sin glicerol y 8.0% con y sin glicerol. Todos los geles se corrieron a 200 V por 24 horas. En las figuras 20 y 21 se muestran las SSCP realizadas a controles y pacientes respectivamente, y como puede verse no existe diferencia en los patrones de corrimiento en ningún grupo. Sin embargo, se mandaron secuenciar un par de muestras de cada uno.

7.9 Análisis de las secuencias polimórficas encontradas tanto en sujetos control como en pacientes

En el apéndice II se presentan los electroferogramas correspondientes a la secuenciación del exón 2 y 3 del gen de la LH β de los diferentes grupos evaluados y en la tabla 7 se muestra en resumen los cambios encontrados, los cuales se obtuvieron a partir de comparar los electroferogramas con la secuencia silvestre de los exones correspondientes reportados en el GeneBank No. de acceso X00264.

La tabla muestra 9 cambios de secuencia, 8 en el exón 2 y uno en el exón 3, tres cambios fueron localizados en la zona intrónica (C₈₉₁T, C₁₀₉₅T, G₁₁₀₂A), tres cambios del tipo sinónimo G₁₀₁₅C (Val) y C₁₀₃₃A (Pro) en el exón 2 y C₂₈₅T (Gly) en el exón 3, y finalmente se encontró una variante triple heterocigota T₉₈₃C(Trp8Arg), A₉₉₀G(His10Arg) y T₁₀₀₅C(Ile15Thr).

Tabla 7. Polimorfismos encontrados en el gen de la LH β . Las secuencias se muestran en el apéndice II.

Locus	Cambio de nucleótido/ aminoácido	Tipo de cambio	Niñas controles	Niñas pacientes	Niños controles	Niños pacientes
Exón 2 (Fig. 25)	G/C (1015) Val18Val C/A (1033) Pro24Pro C891T C1095T G1102A	Sinónimo Sinónimo intrónico intrónico intrónico	4 (36%)	0	4 (29%)	3 (75%)
Exón 2 (Fig. 24)	T/C (983) Trp8Arg A/G (990) His10Arg T/C (1005) Ile15Thr G/C (1015) Val18Val	*Sentido equivocado **Sinónimo	0	0	2 (14.3%)	0
Exón 2 (Fig.23) (Fig.26)	C/A (1033) Pro24Pro	Sinónimo	1 (homocigoto) (9.1%)	1 (33%)	0	0
Intrón 1 Intrón 2	C891T C1095T G1102A	Intrónico	1 (9.1%)	0	0	0
Exón 2 (Fig. 30)	G/C (1015) Val18Val C/A (1033) Pro24Pro C891T C1095T G1102A	Sinónimo Sinónimo intrónico intrónico intrónico	0	0	1 (7.1%) (homocigoto)	0
Exón 2 (Fig. 27)	G/C (1015) Val18Val C891T	Sinónimo Intrónico	1 (9.1%)	0	0	0
Exón 2 (Fig.28)	T/C (1005) Ile15Thr C/A (1033) Pro24Pro	Sentido equivocado Sinónimo	0	0	1 (7.1%)	0
Exón 3 (Fig. 29)	C/T (285) Gly75Gly	Sinónimo	0	0	1 (7.1%)	0

Discusión

Desde hace algunos años diferentes investigadores han reportado de manera general mutaciones y polimorfismos en los genes de las subunidades de las gonadotropinas, así como también en sus receptores relacionándolos con desórdenes hormonales, infertilidad y retraso de la pubertad (Huhtaniemi & Pettersson, 1998). Basándonos en diferentes reportes y tomando en consideración que en México no existen estudios al respecto, en este trabajo analizamos variantes de secuencia del gen de la LH β en pacientes con diagnóstico de retraso en la pubertad y en sujetos sanos. Los resultados obtenidos en este estudio revelaron 9 SNP's distribuidos entre los sujetos control y los pacientes con retraso puberal.

El estudio se llevó a cabo en dos partes; en la primera se evaluó el estado físico, metabólico y hormonal de ambos grupos, este fue analizado a través de mediciones antropométricas (índice de masa corporal IMC e índice cintura cadera ICC) y de parámetros bioquímicos y hormonales con la finalidad de descartar alguna otra afección metabólica que pudiera interferir con el desarrollo de la pubertad por ejemplo la diabetes tipo 1, la obesidad, el sobrepeso, entre otras (Robles et al., 2003). Se calcula que entre el 20% y 40% de las niñas con diabetes mellitus tipo 1 (DM) ven afectado el buen funcionamiento de su ovario, lo que provoca irregularidades menstruales, hirsutismo (exceso de vello corporal), hiperandrogenismo, aumento de la grasa abdominal y, eventualmente, síndrome de ovario poliquístico, que en algunos casos se traduce en infertilidad, además se ha visto que los niños y niñas que padecen esta enfermedad desarrollan una pubertad mas tardía. (Picardi et al., 2008; Rohrer et al., 2007). Por otro lado, la obesidad moderada puede relacionarse con un inicio temprano en la pubertad, mientras que la obesidad grave y patológica y la desnutrición, pueden retrasarla. (Albarrán 2001; Heys et al., 2007; Mantzoros 2000; Pinhas-Hamiel et al., 2007). Cabe señalar que los pacientes y los sujetos control pertenecen al mismo estrato social (medio), y aunque este no es un parámetro importante en sí mismo, si puede influir de manera significativa en los parámetros a evaluar por lo que se eligió un grupo homogéneo para la realización del estudio (Hernández et al., 2007).

En promedio tanto sujetos control como pacientes presentaron valores de IMC por arriba de 18.5 y por debajo de 25 y valores de ICC menores de 1 (Tabla 5), lo cual nos indica que ningún grupo padecía desnutrición, sobrepeso u obesidad, esto de acuerdo a los parámetros reportados para el Distrito Federal en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006. Por otra parte el perfil bioquímico de ambos grupos (Gráfica 1 y 2) se encontró dentro de los parámetros de referencia excepto el de una paciente que mostró un valor elevado de triglicéridos (261 mg/dL) en sangre, no obstante la paciente no fue descartada del estudio ya que su IMC es de 21.9 (no obesa), los demás parámetros bioquímicos se encuentran dentro de los valores de referencia, y además no se ha reportado asociación entre la hipertrigliceridemia y el retraso puberal sino por el contrario se ha visto que la adelanta (Antelli et al., 2006; Mantzoros 2000; Mitchell et al., 2005), sin embargo, es importante considerar que si se han vinculado el aumento de colesterol y lípidos con problemas de disminución de la fertilidad (Mitchell et al., 2005; Papadopoulos, 2005).

La pubertad retardada, a diferencia de la pubertad precoz, es un cuadro más frecuente en hombres que en mujeres (Robles et al., 2003), esto lo pudimos observar en este estudio ya que, a pesar de ser una población pequeña, el 62.5% de los pacientes fueron varones. Ambos grupos fueron divididos de acuerdo a su género para realizar el análisis de los resultados hormonales (Gráficas 3 y 4). En el grupo de niñas control se encontró una gran dispersión en los valores de LH aunque dentro de los valores normales, esto debido a que las muestras de sangre fueron obtenidas en diferentes etapas del ciclo ovulatorio y, en el caso de las pacientes con retraso puberal, se observa que sus concentraciones son menores en comparación con el grupo control lo cual indica que se encuentran en un estado anovulatorio. Las concentraciones de los otros parámetros hormonales como: FSH, testosterona y progesterona para ambos grupos no tuvieron cambios significativos y se encontraron dentro de los valores de referencia para la población que se estudió (Tabla 6).

Es importante remarcar que se han encontrado muy pocas mutaciones en genes de hormonas gonadotrópicas, esto debido a que juegan un papel determinante en el correcto funcionamiento del eje reproductivo, así los pacientes identificados hasta la fecha probablemente representan la parte más severa del espectro fenotípico, en tanto que desórdenes asociados con fenotipos más leves pueden ser más comunes. (Achermann et al.,

2001). Actualmente se conocen seis polimorfismos silenciosos diferentes, presentes tanto en exones como en intrones del gen de la LH β (Huhtaniemi & Pettersson, 1998). Uno de estos polimorfismos (T82C/T104C) cuya combinación da como resultado el cambio en dos aminoácidos (Trp₈Arg/Ile₁₅Thr) y que además se ha visto que incrementa la actividad biológica de la hormona pero disminuye su vida media (Furui et al., 1994), fue localizado en el presente estudio en dos niños control (14.3%), éste cambio es el que más se ha estudiado y se ha denominado comúnmente como variante de la LH (V-LH), esta variante se encuentra en todo el mundo con una frecuencia altamente variable (de 0 hasta 52%) en cohortes estudiadas en diferentes países y en diferentes grupos étnicos, con diferentes efectos entre ellos, por ejemplo, en la población Finlandesa que porta esta variable son aparentemente sanos ya que no se han reportado casos de infertilidad o subfertilidad, en cambio en la población Japonesa esta variante está relacionada con la infertilidad y con diversos desórdenes menstruales (Takahashi et al., 2003). Adicionalmente, en los sujetos control de nuestro estudio se encontró otro cambio (His₁₀Arg) cuyo efecto sobre la LH β aún no se conoce. Este es un hallazgo interesante ya que se trata de un polimorfismo triple heterocigoto que no ha sido reportado previamente y, por lo tanto se carece de información acerca del impacto que esta combinación pudiera tener en la función de la proteína. Estos cambios en la secuencia de aminoácidos (Trp₈Arg, Ile₁₅Thr e His₁₀Arg) hacen a la LH semejante de la hCG, de acuerdo a Furui y cols., 1994. Es posible que estos cambios resulten de la recombinación homóloga entre el gen de la LH β y uno de los 6 genes de la CG β (Maston & Ruvolo, 2002). Por otra parte, también mencionan que estas dos hormonas poseen actividades biológicas similares (Furui et al., 1994), lo cual podría explicar el que estos niños tengan un desarrollo puberal normal, de manera que el triple cambio mantiene un porcentaje importante de la actividad biológica normal, sin embargo no se puede descartar que estas variaciones impliquen alguna consecuencia en dichos sujetos en un futuro, por lo tanto es necesario realizar un seguimiento en estos niños para detectar efectos posteriores, además de que sería interesante incrementar el número de personas a estudiar que posean estas variantes, así como realizar ensayos de actividad biológica para determinar si la variante triple tiene un efecto importante sobre la función de la proteína final que pudiera relacionarse con padecimientos tales como la infertilidad, alteraciones

menstruales, entre otros o simplemente se trata de un polimorfismo triple propio de la población mexicana.

Por otra parte, en nuestro estudio también fueron encontrados otros 2 tipos de cambios (SNP's); el primero del tipo sinónimo o silencioso G₁₀₃₃C (Pro) y C₁₀₁₅A (Val) en el exón 2 en un porcentaje del 60% en controles y un 57.14% en pacientes y un cambio C₂₈₅T (Gly) en el exón 3 en un niño control (4%); este tipo de cambios a menudo se piensa que no tienen ninguna consecuencia al tratarse de cambios de una sola base en un triplete que codifica para el mismo aminoácido, no obstante se ha visto que pueden estar relacionadas con alteraciones en la velocidad de transcripción, el splicing alternativo y en el ritmo al que una proteína se pliega pudiendo afectar de manera sutil la estructura terciaria de la proteína y por ende su función (Cáceres & Kornblihtt, 2002; Kimchi-Sarfaty et al., 2007; Pagani et al., 2005). Los otros cambios detectados son del tipo intrónico (C₈₉₁T, C₁₀₉₅T, G₁₁₀₂A), en este caso se cree que al localizarse en zonas no codificantes no se encuentran asociados con alguna anormalidad en la función de la proteína final ya que ésta es resultado únicamente de la traducción de los exones; sin embargo se han asociado mutaciones cercanas al sitio de inicio del exón con la introducción de nuevos sitios de inicio de la transcripción, también se han encontrado alteraciones en las secuencias de empalme (dependiendo de la distancia entre el cambio y la secuencia de inicio) y mutaciones que pudieran afectar la función de elementos regulatorios del splicing vinculados con enfermedades tales como el cáncer (Nagano & Yamashita, 2004); todas estas variantes en el gen de la LHβ han sido registradas, pero su relevancia clínica no ha sido reportada por lo que, al igual que en el polimorfismo triple, es necesario realizar estudios de actividad biológica.

Estos estudios son muy interesantes ya que no solo nos muestran la distribución de estas variantes alrededor del mundo, sino también los diferentes efectos que pudieran tener dependiendo del lugar donde se presente lo cual reafirma el término de variabilidad genética, que puede estar causada por mutaciones, recombinaciones y alteraciones en el cariotipo. Los procesos que eliminan variabilidad genética son la selección natural y la deriva genética, por lo tanto también es importante considerar la antigüedad de las poblaciones estudiadas ya que algunas formas del gen pueden ser formas ancestrales, por ejemplo que son sustituidas por otras conforme fueron emigrando nuestros ancestros por el

mundo e incluso se especula que estas variantes pudieran ofrecer una ventaja en condiciones ambientales específicas.

Por último, es importante analizar de manera particular las variantes moleculares que se encuentran en la población mexicana para evaluar padecimientos hereditarios y de susceptibilidad a enfermedades para que, definiendo la base genética, se pueda dar un mejor manejo terapéutico, proporcionar un asesoramiento más adecuado para el paciente y su familia, así como también permita el desarrollo de nuevos y mejores tratamientos para este tipo de padecimientos en un futuro (Achermann et al., 2001).

Conclusiones

- La variante triple Trp8Arg/His10Arg/Ile15Thr de la subunidad β de la LH se encuentra en la población mexicana y no parece estar relacionada con el retraso en el desarrollo puberal.
- Variantes del tipo intrónico (C₈₉₁T, C₁₀₉₅T, G₁₁₀₂A) y sinónimos: G₁₀₁₅C (Val) y C₁₀₃₃A (Pro) en el exón 2 y C₂₈₅T (Gly) en el exón 3, fueron encontrados tanto en sujetos control como en pacientes por lo que podrían ser también excluidas como posibles causas de este padecimiento, sin embargo para ambos casos es necesario realizar ensayos biológicos para descartar totalmente la posibilidad, así como valorar sus efectos en el desarrollo y función posterior.

APÉNDICE I

EXTRACCIÓN DE DNA

Reactivos:

- ✓ Sacarosa Tritón 2X
- ✓ Sacarosa Tritón 1X
- ✓ Buffer de Lisis Nuclear
- ✓ SDS 10%
- ✓ Proteínasa K 5 mg/mL
- ✓ NaCl saturado
- ✓ Etanol 100%
- ✓ Etanol 70%
- ✓ Buffer TE
- ✓ Hipoclorito de Sodio

Preparación de Reactivos:

- ✓ *Sacarosa Tritón 2X*: Sacarosa 219 g (0.64 M)
Tris-Base 2.42 g (0.02 M)
MgCl₂ 2.03 g (0.01 M)
Tritón 100X 10 mL (2%)

Vaciar todos los reactivos a un vaso de precipitados de 1000 mL y agregar aproximadamente 800 mL de agua desionizada.

Mezclar en el agitador magnético hasta que se homogenice.

Ajustar el pH a 7.6

Aforar a 1L

Filtrar con membrana

Almacenar a 4°C

Sacarosa Tritón 1X: Tomar un volumen de Sacarosa 2X y agregar un volumen igual de agua desionizada. Mezclar hasta homogenizar. Almacenar a 4°C.

✓ **Buffer Lisis Nuclear:** Tris-Base 1.21 g (10 mM)

NaCl₂ 23.4 gr (400 mM)

Na₂EDTA 0.75 gr (2 mM)

Vaciar todos los reactivos a un vaso de precipitados de 500 mL y agregar aprox. 300 mL de agua desionizada.

Mezclar en el agitador magnético hasta que se homogenice.

Aforar a 500 mL.

Esterilizar en autoclave.

Almacenar a Temperatura ambiente

✓ **Proteinasa K 5 mg/mL:** Pesar 50 mg de la proteinasa (0.050 g)

Llevar a 10 mL

Mezclar completamente

Hacer alícuotas de 500 µL

Almacenar a -20°C

✓ **NaCl saturado:** Disolver 35gr de NaCl en 100 mL de agua desionizada.

Solubilizar lo más posible. (Queda una capa de sal en el fondo).

Almacenar a temperatura ambiente.

✓ **Etanol 70%:** Tomar 70 mL del alcohol absoluto (100%) y agregar 30 mL de agua desionizada. Mezclar hasta homogenizar. Almacenar a 4°C.

✓ **Buffer TE :** Tomar 1 mL de Tris/HCL 10 mM a pH 8.0

Agregar 200 µl de EDTA 0.5 M a pH 8.0

Aforar a 100 mL

Almacenar a temperatura ambiente.

✓ *Tris/HCl 10mM a pH 8.0* : Pesar 30.275 g de Tris/HCl

Disolver con 150 mL de agua desionizada.

Ajustar el pH a 8.0

Aforar a 250 mL

Almacenar a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO

La técnica se hace en dos partes:

1ª Parte

1. Sacar del congelador los tubos con 10 mL de sangre total (de preferencia sólo 5 por sesión) y permitir que alcancen la temperatura ambiente (la sangre debe estar totalmente descongelada).
2. Mezclar suavemente por inversión y colocar en hielo.
3. Llevar, cada tubo, a un volumen de 35 mL con solución sacarosa-tritón 2X fría.
4. Llevar a un volumen final de 50 mL con agua desionizada y estéril.
5. Mezclar suavemente por inversión y dejar incubar 10 min en hielo (mezclando de vez en cuando).
6. Centrifugar a 2000 rpm durante 15 min a 4°C.
7. Decantar el sobrenadante en un recipiente con hipoclorito de sodio y desechar.
8. Lavar el botón que queda con 5 mL de solución sacarosa triton 1X fría.
9. Centrifugar a 2000 rpm durante 15 min a 4°C.
10. Decantar el sobrenadante en un recipiente con hipoclorito de sodio y desechar. Se debe ver un pellet rosado, si no lavar nuevamente con sacarosa tritón 1X fría. (Si el botón no se utiliza inmediatamente, congelar a -70°C hasta su uso).
11. Agregar 3 mL de buffer de lisis nuclear, al pellet, y resuspender con una pipeta pasteur sellada de la punta.
12. Agregar 216 µL de SDS al 10%, mezclar suavemente con la pipeta.
13. Agregar 100 µL de Proteinasa K (5 mg/mL) y mezclar suavemente con la pipeta.
14. Incubar en Baño María a 37°C con agitación suave toda la noche (mín. 8 – 10 hrs).

2ª Parte

15. Transferir toda la muestra a tubos cónicos estériles de 15 mL.
16. Agregar 1 mL de NaCl saturado y agitar vigorosamente (hay formación de espuma)
17. Centrifugar a 2000 rpm durante 15 min a 4 °C.
18. Transferir , *con mucho cuidado y con micropipeta*, el sobrenadante a otro tubo cónico de 15 mL (**EL SOBRENADANTE ES LO QUE SIRVE**).
19. Agregar un volumen 2 veces igual al de la muestra de etanol al 100% frío.
20. Mezclar suavemente por inversión (Se observa la hebra de DNA).
21. Sacar el DNA precipitado con una pipeta pasteur sellada de la punta.
22. Lavar el DNA precipitado con etanol al 70%, dentro de un tubo eppendorf, moviendo suavemente la pipeta.
23. Dejar secar completamente, a temperatura ambiente, el DNA que está adherido en la pipeta pasteur (Con la punta hacia arriba. El DNA seco es transparente).
24. Depositar el DNA en aprox. 200 µL de buffer TE en un tubo eppendorf estéril y dejar el tubo, con la pipeta dentro, 20 min a 37°C para incorporar la mayor cantidad posible de DNA.
25. Cuantificar el DNA (Lectura esperada de 1.7-2.0)

***Cuantificación de DNA.**- Hacer una dilución 1:200 de los 200 µL de TE donde está contenido el DNA (5 µL muestra + 995 µL de agua desionizada). Mezclar en el vortex 1-2 seg. Leer por duplicado a 260 y 280 nm. *Las preparaciones puras tienen valores de 1.7–2.0.*

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON P³²

Reactivos:

- ✓ Super agua
- ✓ DMSO (dimetilsulfóxido) estéril
- ✓ Buffer 10X (*Promega*)
- ✓ Solución de MgCl₂ 25 mM (*Promega*)
- ✓ Solución de dNTP (20 mM, pH 8.0), la cual contiene los cuatro dNTPs.
- ✓ Buffer de carga ADN
- ✓ Bromuro de etidio
- ✓ Hielo

Enzimas:

DNA polimerasa termoestable (Taq ADN polimerasa) de marca *Promega*

Ácidos nucleicos y oligonucleótidos:

- ADN genómico humano disuelto en solución de TE a 10 µg/mL, pH 7.6
- Primers 5'-3' y 3'-5' en concentración de 20 µM cada uno y pH 7.6
- Marcador de pares de bases (100 pb)

Preparación de reactivos:

- ✓ **Buffer 10X para la Taq polimerasa (*Promega*):**

600 µL de MgCl₂ 25 mM + 400 µL de Buffer 10X

Guardar a -20°C

- ✓ **Solución de dNTPs (25 mM, pH 8.0):**

Para 10 mM se colocan 25 µL de dATP, dTTP, dCTP y dGTP

Aforara a 500 µL con 400 µL de super agua

Guardar a -20°C

- ✓ **Super agua:** Se filtra por una membrana de 0.45 µm y se esteriliza en autoclave.

PROCEDIMIENTO

1. Hacer la mezcla de reacción, en un tubo eppendorf de 1 mL, que debe contener por cada muestra de DNA que se va a procesar:

Solución dNTP 25 mM	0.4 µL
Buffer 10X	0.7 µL
Oligo 5' 20 µM	0.4 µL
Oligo 3' 20 µM	0.4 µL
[α - ³² P] dCTP	0.13 µL
DNA polimerasa termoestable	0.13 µL
DMSO	1.0 µL
Agua desionizada	3.8 µL

2. Agregar 5.5 µL de la mezcla de reacción a cada tubo eppendorf de 500 µL.
3. Agregar 1 µL de DNA genómico, en el tubo correspondiente
4. Colocar los tubos con la mezcla de reacción y DNA genómico en el termociclador.
5. Escoger el programa correspondiente al gen que se está estudiando.
6. Dejar que corra el programa.
7. Al terminar, realizar una electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para verificar que se haya amplificado el segmento de DNA deseado.

PREPARACIÓN DE UN GEL DE AGAROSA

Reactivos:

- ✓ Agarosa
- ✓ Buffer TBE 1X
- ✓ Bromuro de etidio
- ✓ Buffer de carga (Azul de Bromofenol 0.25%, cianol-xileno 0.25%, Ficoll 400 15%)

PROCEDIMIENTO

1. Debe prepararse suficiente buffer de electroforesis (TBE 1X) para llenar el tanque y preparar el gel.
2. Adicionar la cantidad necesaria de agarosa a una cantidad medida de buffer en un matraz Erlenmeyer. (El buffer no debe ocupar más del 50% del volumen del matraz)
3. Calentar en el microondas hasta que se disuelva la agarosa (15-20 seg.)
4. Enfriar la solución aprox. a 60°C y adicionar el bromuro de etidio (1 µL por cada 50 mL) y mezclar completamente.
5. Agregar la solución tibia al molde de la cámara, *que previamente tiene colocado el peine.*
6. Dejar que gelifique (30-45 min) y retirar el peine.
7. Adicionar el buffer de electroforesis al tanque hasta cubrir el gel aprox. 1mm.
8. Mezclar 5µL de las muestras de DNA con 3 µL de buffer de carga.
9. Cargar lentamente la mezcla en los pozos del gel. (*También debe cargarse un marcador de DNA de tamaño conocido en un extremo.*)
10. Tapar el tanque y conectar los electrodos. (*El DNA migra hacia el ánodo, que es el cable rojo.*)
11. Aplicar un voltaje de 80 V
12. Se corre el gel hasta que los colorantes hayan migrado una distancia apropiada a través del gel.
13. Apagar la corriente y quitar los electrodos.
14. Observar el gel con luz UV

ANÁLISIS POLIMÓRFICO CONFORMACIONAL DE CADECA SIMPLE (SSCP)

La sustitución de una sola base es suficiente para alterar la movilidad de una sola cadena de DNA que es sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizados. Dicha movilidad es atribuida a cambios conformacionales, resultantes de sustituciones, inserciones o deleciones en una cadena del DNA. Así pues, este método permite detectar alguna alteración del DNA, basándose en la digestión del DNA por medio de enzimas de restricción, su desnaturalización y electroforesis en un gel de poliacrilamida (Estrada-Cuzcano et al., 2005).

El análisis SSCP implica tres pasos:

- a) Amplificación de la región de interés mediante PCR
- b) Desnaturalización de los productos obtenidos en el PCR
- c) Electroforesis del ADN de cadena simple por medio de un gel de poliacrilamida a pH neutro.

Reactivos:

- ✓ DNA amplificado por PCR P³²
- ✓ dNTPs para SSCP
- ✓ Buffer de carga para SSCP
- ✓ TBE 1X
- ✓ TBE 10X
- ✓ Hielo
- ✓ Acrilamida al 30%
- ✓ TEMED (N,N,N', N'-tetrametiletilendiamina)
- ✓ Persulfato de amonio 10% w/v
- ✓ Cloruro de calcio
- ✓ Glicerol
- ✓ Agua destilada y estéril

Geles:

Gel neutro de poliacrilamida al 5.4% sin glicerol

Gel neutro de poliacrilamida al 5.4% con glicerol

Gel neutro de poliacrilamida al 8.0% sin glicerol

Gel neutro de poliacrilamida al 8.0% con glicerol

Preparación de reactivos:

✓ *dNTPs para SSCP:*

Para una concentración de 10mM se colocan en un tubo eppendorf de 0.5 mL

25 µL de dATP, dTTP y dGTP, respectivamente.

12.5 µL de dCTP y 12.5 µL de dCTP que contiene ³²P como marcador radiactivo.

Aforar a 400 µL con 312.5 µL de super agua.

Guardar a -20°C

✓ *Buffer de carga para SSCP:*

Azul de bromofenol 25 mg

Cianol-Xileno 25 mg

Llevar a 10 mL, filtrar con membrana de 0.45 µm y tomar alícuotas de 500 µL

✓ *Gel neutro de poliacrilamida al 5.4% sin glicerol:*

Agua destilada 42.91 mL

TBE 5X 14.0 mL

Acrilamida:Bisacrilamida 30% 12.6 mL

Para un volumen de 70 mL, degasificar con agitación al vacío durante 5', adicionar persulfato de amonio al 10% y 15 µL de TEMED.

✓ *Gel neutro de poliacrilamida al 5.4% con glicerol:*

Agua destilada 35.91 mL

Glicerol 7.0 mL

TBE 5X 14.0 mL

Acrilamida:Bisacrilamida 30% 12.6 mL

Para un volumen de 70 mL, degasificar con agitación al vacío durante 5', adicionar persulfato de amonio al 10% y 15 µL de TEMED.

✓ *Gel neutro de poliacrilamida al 8.0% sin glicerol:*

Agua destilada	36.85 mL
TBE 5X	14.0 mL
Acrilamida:Bisacrilamida 30%	18.6 mL

Para un volumen de 70 mL, degasificar con agitación al vacío durante 5',
adicionar persulfato de amonio al 10% y 15 µL de TEMED.

✓ *Gel neutro de poliacrilamida al 8.0% con glicerol:*

Agua destilada	29.85 mL
Glicerol	7.0 mL
TBE 5X	14.0 mL
Acrilamida:Bisacrilamida 30%	18.6 mL

Para un volumen de 70 mL, degasificar con agitación al vacío durante 5',
adicionar persulfato de amonio al 10% y 15 µL de TEMED.

PROCEDIMIENTO

1. Preparar el gel de poliacrilamida.
2. Tomar 2 µL de cada muestra de PCR P³².
3. Agregar, a cada muestra, 28 µL de buffer de carga para SSCP.
4. Desnaturalizar las muestras a 95° C durante cinco minutos.
5. Dejar reposar otros cinco minutos en hielo.
6. Colocar, en la cámara de electroforesis, los vidrios que contienen el gel de poliacrilamida.
7. Llenar la cámara con buffer TBE 1X.
8. Colocar de 3 µL de cada muestra desnaturalizada en los pozos del gel.
9. Aplicar una corriente de 190V por 22 horas para geles sin glicerol

10. Al término de la electroforesis, separar los vidrios (*con mucho cuidado para no romper el gel*).
11. Transferir el gel a un papel filtro Whatman 3MM.
12. Secar, el gel, en un desecador (Gel Dryer GD2A, Labnet) por 60 minutos a 75° C.
13. Colocar, el gel adherido al papel, en un cartucho con pantallas intensificadoras y se exponer a una placa para rayos X durante 24 horas a temperatura ambiente.
14. Revelar la placa.

SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

El siguiente esquema representa de forma abreviada el método automático de

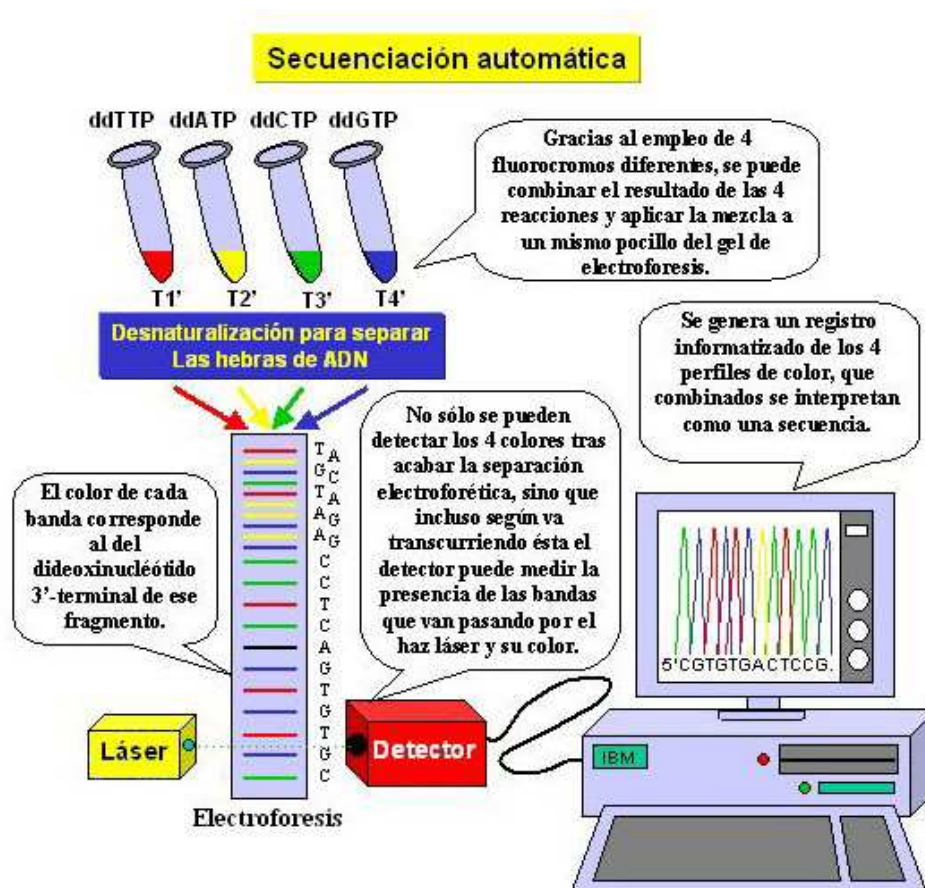
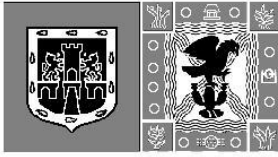


Figura 22. Secuenciación automática



HOSPITAL MATERNO INFANTIL INGUARÁN
Clínica de Atención Integral para la Salud de la
Adolescencia
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO
Laboratorio de Endocrinología Molecular



CARTA CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN LA
INVESTIGACIÓN:

**BÚSQUEDA DE POLIMORFISMOS Y MUTACIONES EN EL GEN DE LA
HORMONA LUTEINIZANTE Y SU ASOCIACIÓN CON EL RETRASO EN EL
DESARROLLO DE LA PUBERTAD**

México D.F., Fecha: _____

A quien corresponda:

Yo, _____
signatario de la presente, en forma libre y voluntaria autorizo que mi hijo
_____ de _____
años de edad participe en el estudio **“Búsqueda de polimorfismos y mutaciones en el gen
de la hormona luteinizante y su asociación con el retraso en el desarrollo de la
pubertad”**, el cual se llevará a cabo en el Hospital Juárez de México y cuyos objetivos
consisten en evaluar los cambios en el gen de la hormona luteinizante, así como de su
receptor en pacientes con retraso en el desarrollo de la pubertad.

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 le 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 retirar a mi hijo del estudio en el momento en que yo lo
decida, sin que esto repercuta en su atención subsiguiente como paciente de este Hospital.

Firma del Padre (Madre) _____

Nombre y firma del Testigo _____

Dirección _____

Nombre y firma del Testigo _____

Dirección _____

Firma del Investigador _____

Apéndice II



Figura 22. Secuenciación del exón 2 del gen LHβ paciente i-2 (wt)

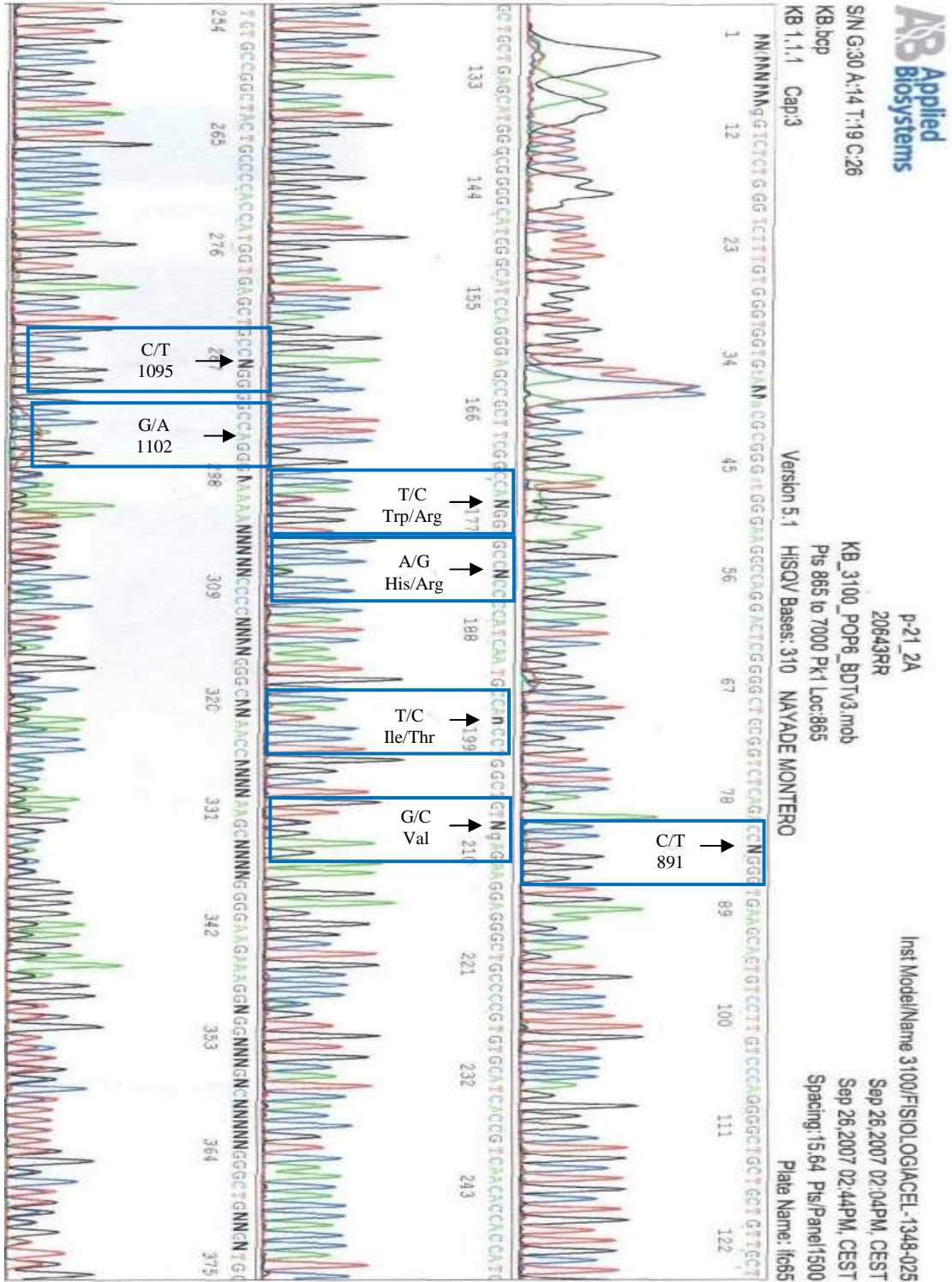


Figura 24. Secuenciación del exón 2 del gen LHβ control p-21.

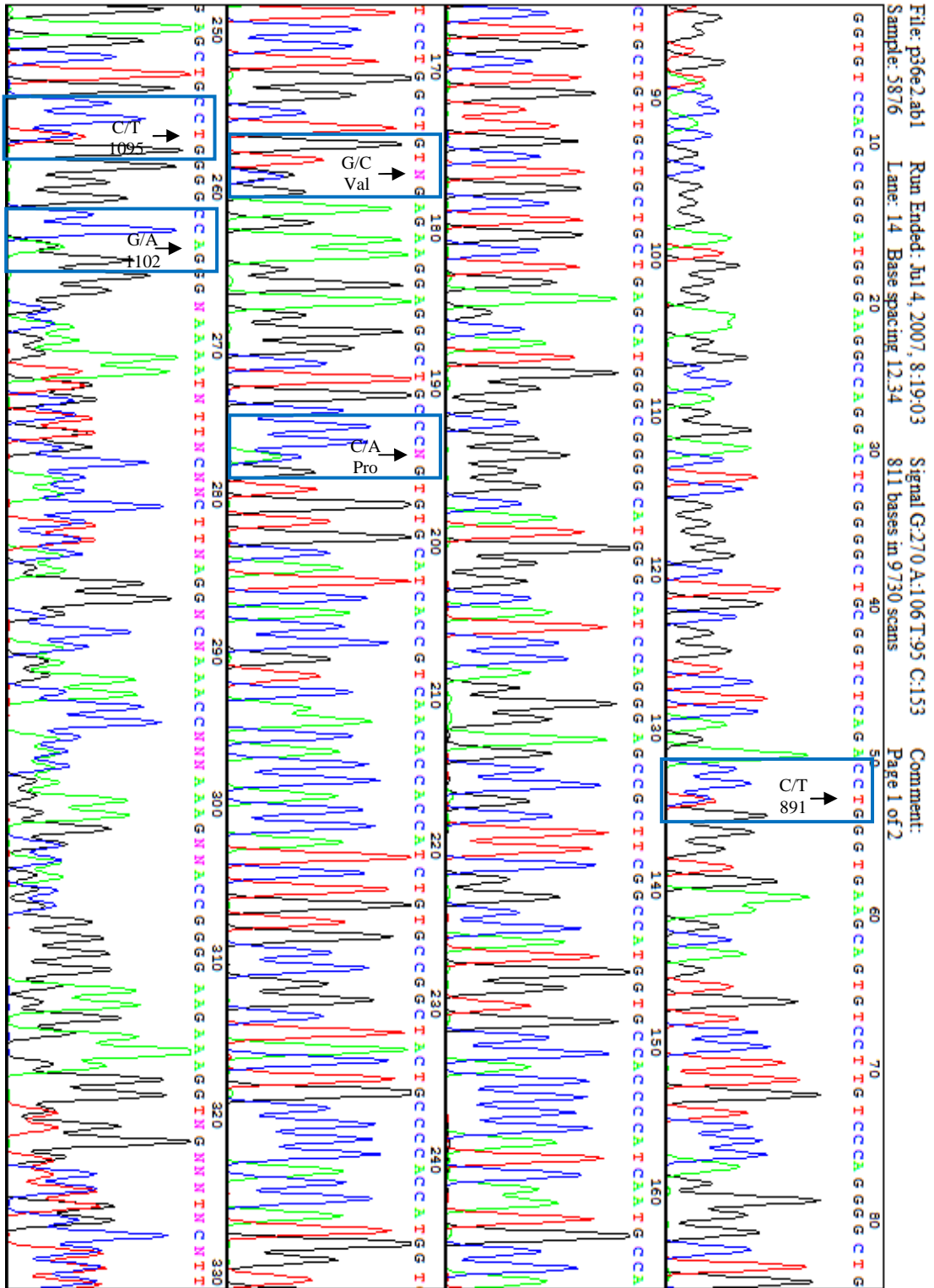


Figura 30. Secuenciación del exón 2 del gen LHβ control p-36.

Bibliografía

- Achermann JC, Weiss J, Lee EJ, Jameson JL. Inherited disorders of the gonadotropin hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* 179, 89-96; 2001.
- Albarrán J. “Conceptos generales, Patología endócrina, Diferenciación sexual” Endocrinología. Edit. Méd. Panamericana. España; 2001.
- Antelli A, Baldazzi L, Balsamo A, Pirazzoli P, Nicoletti A, Gennari M, Cicognani A. Two novel GnRHR gene mutations in two siblings with hypogonadotropic hypogonadism. *Eur. J. Endocrinol.* 155, 201-205; 2006.
- Barness LA, Opitz JM, Gilbert-Barness E. Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects. *Am. J. Med. Genet. A.* 143, 3016-3034; 2007.
- Baxter DJ, Greenspan FS. “Conceptos generales de Endocrinología” Endocrinología básica y Clínica. Ed. El Manual Moderno S.A. de C.V. 3ª ed. 1-61pp México: 1995.
- Beas F. Endocrinología del niño y el adolescente. Edit. Mediterráneo. 2ª edición. Chile; 2002.
- Ben-Menahem D, Grotjan H.E. Strategies for construction of luteinizing hormone beta subunit analogs with carboxyl terminal extensions in non-primate, non-equid mammalian species. *Mol. Cell. Endocrinol.* 260-262, 205-211; 2007.
- Bishop LA, Robertson DM, Cahir N, Schofield PR. Specific roles for the asparagine-linked carbohydrate residues of recombinant human follicle stimulating hormone in receptor binding and signal transduction. *Mol. Endocrinol.* 8, 722-731; 1994.
- Brown MS, Kovanen 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.
- Cáceres JF, Kornblihtt AR. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.* 18, 186-193; 2002.

- Estrada-Cuzcano A, Sandoval J, L. Guevara-Fujita LM, Fujita R. Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano. Rev. Peru. Biol. Facultad de Ciencia Biológicas UNMSM, 349-358; 2005.
- Flores F, Cabeza A, Calarco E. Endocrinología. Méndez Editores. 241-274 pp. México, 2001.
- Furui K, Suganuma N, Tsukahara S, Asada Y, Kikkawa F, Tanaka M, Ozawa T, Tomoda Y. Identification of two point mutations in the gene coding luteinizing hormone (LH) β -subunit, associated with immunologically anomalous LH variants. J. Clin. Endocrinol. Metab. 76: 107-113; 1994.
- Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. Endocr. Rev. 11, 177-199; 1990.
- Gibson & Muse. A Primer of Genome Science, 2nd Edition. Sinauer Associates. 2004.
- Heys M, Schooling CM, Jiang C, Cowling BJ, Lao X, Zhang, W, Cheng KK, Adab P, Thomas GN, Lam TH, Leung GM. Age of menarche and the metabolic syndrome in China. Epidemiol. 18, 740-746; 2007.
- Hernández MI, Unanue N, Gaete X, Cassorla F, Codner E. Edad de la menarquía y su relación con el nivel socioeconómico e índice de masa corporal. Rev. méd. Chile 135, 1429-1436; 2007.
- Huhtaniemi I, Pettersson K, Qing DY. An immunologically Anomalous Luteinizing Hormone Variant in a Healthy Woman. J. Clin. Endocrinol. Metab. 74, 164-171; 1992.
- Huhtaniemi I, Pettersson K. Mutations and polymorphisms in the gonadotropin genes; clinical relevance. Clin. Endocrinol. 48, 675-682; 1998.
- Huhtaniemi I, Jiang M, Pakarinen P, Zhang FP, El-Hefnawy T, Koskimies P, Pettersson K. A common polymorphic allele of the Human Luteinizing Hormone beta subunit gene: additional mutations and differential function of the promoter sequence. Hum. Mol. Genet. 8, 2037-2046; 1999.

- Huhtaniemi I, Jiang M, Nilsson C, Pettersson K. Mutations and polymorphisms in gonadotropin genes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 151, 89-94; 1999.
- Huhtaniemi I, Lamminen T. A common genetic variant of luteinizing hormone: relation to normal and aberrant pituitary-gonadal function. *Eur. J. Pharmacol.* 414, 1-7; 2001.
- Huhtaniemi I, Lamminen T, Jokinen P, Jiang M, Pakarinen P, Simonsen H, et al. Human FSH β subunit gene is highly conserved. *Mol. Hum. Reprod.* 11, 601-605; 2005.
- Huhtaniemi I, Themmen A. Mutations in human gonadotropin and gonadotropin-receptor genes. *Endocrine* 26, 207-217; 2005.
- Huhtaniemi I. Mutations along the pituitary-gonadal axis affecting sexual maturation: Novel information from transgenic and knockout mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 254-255, 84-90; 2006.
- Jameson JL, Becker CB, Lindell CM, Habener JF. Human follicle stimulating hormone β subunit gene encodes multiple messenger ribonucleic acids. *Mol. Endocrinol.* 2, 806-815; 1988.
- Kimchi-Sarfaty C, Mi Oh J, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. A "Silent" Polymorphism in the *MDR1* Gene Changes Substrate Specificity. *Science* 315, 525-528; 2007.
- 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
- Lin L, Conway GS, Hill NR, Dattani MT, Hindmarsh PC, Achermann JC. A homozygous R262Q mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor (*GNRHR*) presenting as constitutional delay of growth and puberty with subsequent borderline oligospermia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 5117-5121; 2006.
- Mantzoros CS. Role of leptin in reproduction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 900, 174-183; 2000.

- Maston GA, Ruvolo M. Chorionic Gonadotropin Has a Recent Origin Within Primates and an Evolutionary History of Selection. *Mol. Biol. Evol.* 19, 320-335; 2002.
- Meehan TP, Narayan P. Constitutively active luteinizing hormone receptors: consequences of in vivo expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 260-262, 294-300; 2007.
- 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.
- Miller W. *Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis.* *Endocr. Rev.* 9, 295-316. 1998.
- Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction* 130, 583-597; 2005.
- Nagano M, Yamashita S, Hirano K, Takano M, Maruyama T, Ishihara M, Sagehashi Y, Kujiraoka T, Tanaka K, Hattori H, Sakai N, Nakajima N, Egashira T, Matsuzawa Y. Molecular mechanisms of cholesteryl ester transfer protein deficiency in Japanese. *J. Atheroscler. Thromb.* 11, 110-121; 2004.
- Nelson DL, Michael MC. “Integración y Regulación Hormonal del Metabolismo de los Mamíferos” *Lenhinger. Principios de Bioquímica.* Ed. Ediciones Omega. 3ª ed. España: 869-906; 2006
- Oliver A. “Concepto, Clasificación y Diagnóstico de la pubertad tardía”. *Symposium de la Pubertad Precoz.* España; 2005.
- Pagani F, Raponi M, Baralle FE. Synonymous mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 6368-6372; 2005.
- Papadopoulos V. Cholesterol Homeostasis and Infertility: The Liver X Receptor Connection. *Endocrinology* 146, 2517-2518; 2005.

- Picardi A, Cipponeri E, Bizzarri C, Falluca S, Guglielmi C, Pozzilli P. Menarche in type 1 diabetes is still delayed despite good metabolic control. *Fertil. Steril.* ; en prensa, 2008.
- Pinhas-Hamiel O, Lerner-Geva L, Copperman NM, Jacobson MS. Lipid and insulin levels in obese children: change with age and puberty. *Obesity* 15, 2825-2831; 2007.
- Prieto-Gómez B, Velázquez Paniagua M. Fisiología de la Reproducción : Hormona Liberadora de Gonadotropinas. Monografía Rev. Fac. Med. UNAM 45, 1-6; 2002.
- Robles VC, Altamirano BN. Pubertad Precoz y pubertad retrasada. *Acta Pediátrica México* 24, 130-144; 2003.
- Rohrer T, Stierkob E, Heger S, Karges B, Raile K, Schwab KO, Holl RW, DPV. Delayed pubertal onset and development in German children and adolescents with type 1 diabetes: cross-sectional analysis of recent data from the DPV diabetes documentation and quality management system. *Eur. J. Endocrinol.* 157, 647-653; 2007.
- Ryan RJ, Charlestown MC, McCormick DJ, Milijus RP, Keutmann HT. The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationship. *FASEB J.* 2, 2661-2669; 1988.
- Sairam MR. Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. *FASEB J.* 3, 1915-1926; 1989.
- Sealfon SC, Weinstein H, Millar RP. Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr. Rev.* 18, 180-205; 1997.
- Slyper AH. Childhood obesity, adipose tissue distribution, and the pediatric practitioner. *Pediatrics* 102, 1-11; 1998.
- Sisk CL, Foster DL. The neural basis of puberty and adolescence. *Nat. Neurosci.* 7, 1040-1047; 2004.

- Takahashi K, Karino K, Kanasaki H, Kurioka H, Ozaki T, Yonehara T, Miyazaki K. Influence of missense mutation and silent mutation of LH β -subunit gene in Japanese patients with ovulatory disorders. Eur. J. Hum. Genet. 11, 402-408; 2003.
- Themmen APN. An update of the pathophysiology of human gonadotropin subunit and receptor gene mutations and polymorphisms. Reproduction 130, 263-274; 2005.

Tomado de la red:

- 1) Tovar Franco J.A. Curso Neurobioquímica. Sistemas peptidérgicos. Hormona Liberadora de Gonadotropina (LHRH).
<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/neurobioquimica/programneuro.htm>
- 2) www.vi.cl/foro/index.php?showtopic=7194
- 3) http://www.kalipedia.com/ciencias-vida/tema/funcionamiento-hormonas.html?x1=20070417klpcnavid_164.Kes&x=20070417klpcnavid_165.Kes
- 4) http://www.fertilityspain.com/spain/treatment/Female_Treatments/Second_Step/Gonadotropin_releasing_Hormone.jsp
- 5) <http://www.laflecha.net/canales/ciencia/noticias/el-10-del-genoma-humano-ha-mutado-en-los-ultimos-100000-anos>
- 6) http://es.wikipedia.org/wiki/Genoma_humano
- 7) http://es.wikipedia.org/wiki/Polimorfismo_de_nucle%C3%B3tido_simple
- 8) http://en.wikipedia.org/wiki/Single_nucleotide_polymorphism
- 9) msd-espana.com/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_23/seccion_23_258.html