

35
zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTUDIO POR REACCION EN CADENA DE LA
POLIMERASA DE DELECCIONES EN EL GEN DEL
SINDROME DE KALLMANN LIGADO AL
CROMOSOMA X EN EL HUMANO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

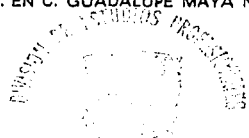
P R E S E N T A :

ELSA VERONICA DE LA CHESNAYE CARAVEO



TUTOR: M. EN C. GUADALUPE MAYA NÚÑEZ

MEXICO, D. F.



1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

FACULTAD DE CIENCIAS
SECRETARÍA ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Estudio por reacción en cadena de la polimerasa de deleciones en el gen del síndrome de Kallmann ligado al cromosoma X en el humano" realizado por Elsa Verónica de la Chesnaye Caraveo

con número de cuenta 9251721-9 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

M. en C. Guadalupe Maya Núñez

Propietario

M. en C. Ileana Patricia Canto Cetina

Propietario

Dra. Marcela Aguilar Morales

Supiente

Biol. Miguel Angel Palomino Garibay

Supiente

Biol. Victor Coffe Ramirez

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Comiso Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

DEDICATORIA

A mis padres: ya que esta tesis es resultado de el cariño, apoyo y comprensión que de ellos he recibido siempre.

AGRADECIMIENTOS

M. en C. Guadalupe Maya Núñez

Dr. Juan Pablo Méndez Blanco

M. en C. Ileana Patricia Canto Cetina

M. en C. Cristina Aleida Olivares Segura

Biol. Cecilia Castro Fernández

Dra. Marcela Aguilar Morales

Biol. Miguel Angel Palomino Garibay

Biol. Victor Coffe Ramírez

INDICE

RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Eje hipotálamo-hipófisis-gónada.....	3
Pubertad.....	7
Síndrome de kallmann.....	9
Reacción en cadena de la polimerasa.....	16
OBJETIVOS.....	28
HIPOTESIS.....	28
MATERIAL Y METODOS.....	29
Pacientes.....	29
Extracción de DNA genómico.....	31
Síntesis de oligonucleótidos.....	33
Reacción en cadena de la polimerasa.....	34
RESULTADOS.....	37
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	38
REFERENCIAS.....	42
APENDICE I.....	51

RESUMEN

El síndrome de Kallmann se caracteriza por la asociación de hipogonadismo hipogonadotrópico y anosmia o hiposmia.

En este síndrome se han descrito patrones de herencia autosómico dominante, autosómico recesivo y recesivo ligado al cromosoma X. El gen involucrado en el síndrome de Kallmann ligado al cromosoma X se localiza en la región Xp22.3. Dicho gen está constituido de 14 exones y abarca 210 kb en el genoma. Se han descrito 17 deleciones (6 de ellas son intragénicas) y 12 mutaciones puntuales del gen KAL en pacientes afectados.

En el DNA obtenido de sangre periférica se realizó la amplificación enzimática de los 14 exones del gen KAL mediante la técnica de PCR. Dicho análisis demostró deleción de los exones 3 al 5 del gen en 2 pacientes y deleción de los exones 1 al 3 en otro individuo, en el resto de los sujetos se observó la amplificación normal de los 14 exones.

Las 2 deleciones existentes no habían sido descritas previamente en la literatura. En conclusión confirmamos que existe una gran heterogeneidad en las mutaciones responsables de la presencia del síndrome de Kallmann.

INTRODUCCION

Eje hipotálamo-hipófisis-gónada

En 1949 Everet et al., propusieron que la regulación de la síntesis y secreción de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), se encontraba mediada por la acción que el sistema nervioso central ejercía sobre la hipófisis anterior. Dentro de los eventos que conducen a la síntesis y secreción de gonadotropinas, se ha demostrado desde hace varios años que la acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) producida en el hipotálamo es un factor determinante para este proceso. Mc Cann et al. (1960) demostraron que la inyección de extractos hipotalámicos a ratas inducía la secreción de LH por la hipófisis anterior. Los trabajos tanto de Matsuo (1971) como de Shally (1971), indicaron que un decapeptido era el responsable de la estimulación del gonadotropo denominándosele desde entonces, como hormona liberadora de gonadotropinas.

El sistema nervioso central se comunica con la hipófisis anterior a través de una vía vascular. La síntesis de GnRH se efectúa en las neuronas especializadas del hipotálamo preóptico (Marshall et al., 1988). Este péptido es secretado, siempre en forma pulsátil por las terminales neuronales, hacia una red capilar especializada que rodea a la eminencia media. Una vez que alcanza la circulación porta-hipofisiaria, es transportado hacia la hipófisis anterior donde estimula la síntesis y secreción tanto de LH como de FSH (Bergland y Page, 1978).

La acción ejercida por la GnRH sobre la hipófisis anterior se inicia con la unión, por parte de la hormona, a receptores específicos localizados en la membrana citoplasmática del gonadotropo. Esta unión promueve un aumento en las concentraciones de calcio intracelular, en la hidrólisis de inositol fosfato y en la fosforilación de la proteína cinasa C, lo cual provoca un incremento en la síntesis y liberación de gonadotropinas después de la exposición a GnRH (Huckle y Conn, 1988; Conn, 1989).

Las gonadotropinas son glicoproteínas estructuralmente similares formadas por dos subunidades unidas no covalentemente, denominadas subunidad α y subunidad β . La subunidad α es común a ambas pero la β es única para cada gonadotropina y le confiere su actividad biológica específica. Las gonadotropinas ejercen su acción sobre las gónadas (testículos u ovarios), al estimular la secreción de esteroides, así como la maduración de los gametos (Chappel et al., 1983). En los testículos, la FSH actúa sobre las células de Sertoli al estimular la espermatogénesis; en el ovario, también estimula la ovogénesis. La LH estimula la síntesis y secreción de andrógenos en las células de Leydig, siendo el principal de éstos la testosterona; en la mujer la LH estimula la esteroidogénesis ovárica (Catt y Dufau, 1976; Ulloa-Aguirre et al., 1985).

La GnRH liberada en forma pulsátil condiciona dos tipos de patrones de secreción de gonadotropinas: tónico y cíclico. El tónico es el patrón de secreción observado en los varones

y uno de los mecanismos de control en la mujer. La secreción cíclica es exclusiva de la mujer en edad reproductiva. Por otro lado, es importante señalar que la secreción de gonadotropinas probablemente siempre es pulsátil o episódica ya sea que el patrón sea tónico o cíclico sin importar la edad (en el feto, en el recién nacido, en el niño, en el adolescente y en el adulto). Sin embargo, debido a limitaciones metodológicas, existe dificultad para detectar los pequeños pulsos cuando la concentración de las gonadotropinas es baja, como sucede en los individuos prepuberales (Spratt et al., 1988).

La hipófisis responde solamente al estímulo de tipo pulsátil de la GnRH, ya que cuando se expone a la glándula continuamente a la acción de esta hormona se observa una falta de respuesta al estímulo presentándose el fenómeno de regulación decreciente o de desensibilización por parte de los receptores de la hormona (Lalloz et al., 1988). La desensibilización significa que una exposición prolongada de la célula blanco a una concentración hormonal elevada conduce a una respuesta hormonal disminuida. Este fenómeno es secundario a ciertos cambios en la concentración y/o afinidad del receptor y tiene como función fisiológica el prevenir la sobre-estimulación de la célula (Ascoli, 1982). Asimismo, se ha observado que tanto la frecuencia como la amplitud de los pulsos de GnRH modulan el tipo de respuesta hipofisiaria. La frecuencia en la pulsatilidad de GnRH varía de acuerdo al ambiente endócrino existente. Por ejemplo, se ha demostrado

que esta frecuencia presenta variaciones a lo largo del ciclo ovulatorio (Marshall et al., 1991). Por lo tanto, el sistema nervioso central modifica la descarga de las neuronas productoras de GnRH en el hipotálamo conforme al ambiente endócrino existente (Kow y Pfaff, 1984).

Las tres clases de esteroides secretados por las gónadas (estrógenos, progestágenos y andrógenos) se unen a receptores específicos en la hipófisis e influyen directamente en la secreción de gonadotropinas. Los receptores esteroideos han sido localizados ampliamente en las células cerebrales, donde se han relacionado con la regulación de la conducta sexual, la regulación de la secreción de GnRH y la diferenciación del cerebro (Seyler et al., 1980).

Pubertad

La pubertad constituye el período comprendido entre la inmadurez sexual y el desarrollo sexual adulto. Durante esta etapa se desarrollan las características sexuales secundarias, como consecuencia de la síntesis y secreción de esteroides gonadales. La edad de aparición de la pubertad es variable puesto que depende de factores genéticos, constitucionales y medio-ambientales. El eje hipotálamo-hipófisis-gónada (H-H-G) se activa nuevamente durante esta etapa de la vida, después de haber permanecido en una pausa fisiológica relativa durante la infancia. Los mecanismos que dan inicio a la pubertad no se han dilucidado perfectamente, pero es la activación del eje H-H-G lo que genera todos los cambios somáticos característicos de esta etapa. La síntesis y secreción de GnRH por parte del hipotálamo, estimula la secreción de LH y de la FSH por la hipófisis. Estas estimulan a su vez a las gónadas en sus dos funciones principales: la esteroidogénesis y la gametogénesis (Ulloa-Aguirre et al., 1985; Grumbach y Kaplan, 1990).

En algunos individuos la pubertad puede presentarse tardíamente (pubertad retardada) o nunca iniciarse (hipogonadismo). La pubertad retardada es, en muchos casos, fácilmente atribuible a otro proceso patológico preexistente, como por ejemplo: enfermedad sistémica crónica severa. En otros casos, la etiología del retardo puberal es menos evidente y la causa debe ser determinada mediante procedimientos diagnósticos específicos (Toublanc et al.,

1991). Los sujetos con retardo puberal deberán ser diferenciados de aquellos con alteraciones hormonales que condicionan retraso puberal patológico (hipogonadismo). La determinación de gonadotropinas en sangre permite dividir a los sujetos con hipogonadismo en dos categorías generales: hipogonadismo hipergonadotrópico, definido como una alteración gonadal primaria con un aumento secundario de gonadotropinas e hipogonadismo hipogonadotrópico, el cual se define como una alteración primaria del eje hipotálamo-hipófisis que condiciona disminución en la secreción de gonadotropinas y secundariamente de esteroides gonadales (Matsumoto, 1994). Este último, generalmente es secundario a un defecto hipotalámico de origen desconocido. En la actualidad no existe una prueba que pueda precisar certeramente, el que un individuo determinado presente pubertad retardada fisiológica o hipogonadismo hipogonadotrópico. Si no es posible atribuir el proceso patológico a una causa determinada, se tendrá que esperar hasta los límites de edad establecidos (16 años en la mujer y 18 en el varón) con el fin de poder precisar el diagnóstico de certeza, puesto que tanto en la pubertad retardada como en cualquier estado de hipogonadismo hipogonadotrópico, las gonadotropinas al igual que los esteroides sexuales estarán disminuidos (Toublanc et al., 1991).

Síndrome de Kallmann

La asociación de anosmia con hipogonadismo fue descrita por Maestre de San Juan (1856), al observar en la autopsia de un varón genitales poco desarrollados y ausencia de lóbulos olfatorios. Kallmann et al. (1944) describieron una etiología genética para este síndrome. Posteriormente, deMorsier (1954, 1962) describió con el nombre de "displasia olfatorial" a una serie de 14 pacientes afectados con hipogonadismo y anosmia, postulando un origen hipotalámico para el hipogonadismo.

En la actualidad, el término de síndrome de Kallmann se utiliza para definir a aquella alteración hereditaria caracterizada por la asociación de hipogonadismo hipogonadotrópico y anosmia o hiposmia. El hipogonadismo es debido a una disminución en la secreción de GnRH por el hipotálamo (Naftolin et al., 1971). El grado de deficiencia de GnRH en pacientes con síndrome de Kallmann puede variar desde deficiencias completas hasta parciales. Se ha descrito una amplia heterogeneidad fenotípica en el síndrome de Kallmann, ya que incluso se han reportado casos de pacientes con esta afección en los cuales se ha demostrado fertilidad (Turner et al., 1974).

El defecto en la olfacción es debido a la aplasia o hipoplasia de los tractos y bulbos olfatorios (Rugarli y Ballabio, 1993); además de las características antes mencionadas algunos de los pacientes con síndrome de Kallmann pueden presentar: ataxia cerebelar, nistagmus horizontal,

paladar alto, ginecomastia, micropene, agenesia renal unilateral, pie cavo, hábito eunucoide y sinquinesia (movimientos en espejo) y en algunos casos se ha reportado criptorquidia (Turner et al., 1974; Lutz et al., 1993).

La incidencia de este síndrome se ha estimado en 1:10,000 varones y en 1:50,000 mujeres, posee una prevalencia de 1 de cada 25 pacientes anósmicos o hipósmicos y de 1 en 30 varones con hipogonadismo (Rugarli y Ballabio, 1993).

Se han descrito patrones hereditarios autosómico dominante, autosómico recesivo y recesivos ligados al cromosoma X lo cual demuestra la heterogeneidad génica en esta entidad patológica (White et al., 1983; Hermanussen y Sippell, 1985). La existencia de 5 a 7 varones afectados por cada mujer sugiere que la forma ligada al X es la más frecuente.

El síndrome de Kallmann presenta una penetrancia variable ya que en gemelos idénticos se ha reportado discordancia para dicho síndrome (Hipkin et al., 1990). La expresividad también presenta variabilidad y por ello el fenotipo muchas veces difiere tanto inter como intrafamiliarmente (White et al., 1983; Hermanussen y Sippell, 1985; Parenti et al., 1991).

Para investigar si la deficiencia de GnRH era debida a una mutación en el gen que codifica para esta hormona, Mason et al. (1989) estudiaron al gen de GnRH en un modelo murino, el ratón hipogonadal (hpg), encontrando una gran deleción de los exones 2 al 4 de dicho gen. Mediante análisis por

Southern blot. El gen humano que codifica para la GnRH fue localizado en el cromosoma 8 (8p11.2-p21) (Yang-Feng et al., 1986). Posteriormente, Weiss et al. (1989) realizaron un estudio en pacientes con deficiencia de GnRH y mediante el análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica y secuenciación del gen demostraron que no existía ningún tipo de mutación en el gen de GnRH. De este modo, una mutación en este gen parece no ser la causa de por lo menos algunos de los casos de hipogonadismo hipogonadotrópico en humanos (Whitcomb y Crowley, 1993).

Ballabio et al. (1986) realizaron el estudio de una familia en la que varios sujetos masculinos presentaban asociación de síndrome de Kallmann con ictiosis ligada al cromosoma X (alteración debida a la deficiencia de la enzima sulfatasa esteroidea); esto condujo a suponer que estos pacientes estaban afectados con un síndrome de genes contiguos, consecuencia de una codelección de los genes responsables del síndrome de Kallmann (KAL) y de la ictiosis ligada al cromosoma X (STS). Con base en lo anterior, se postuló tentativamente que el gen KAL se encontraba próximo al locus del gen STS en la región Xp22.3.

La caracterización molecular de pacientes con síndrome de genes contiguos quienes portaban deleciones o translocaciones en la región Xp22.3, permitió la construcción de un mapa de delección para esta región, así como también permitió la asignación del gen KAL en una región específica dentro de este intervalo (Ballabio et al., 1989; Ballabio y

Andria, 1992). Posteriormente, dos grupos independientes (Franco et al., 1991; Legouis et al., 1991), lograron el aislamiento de un gen localizado dentro de dicho intervalo por medio de estrategias de clonación posicional. El análisis molecular de dos hermanos quienes portaban una delección intragénica de 3,300 pb en el gen KAL, confirmó la participación de este gen en el síndrome de Kallmann ligado al cromosoma X (Bick et al., 1992).

El gen KAL está constituido por 14. exones que abarcan 210 kb en la región Xp22.3. El homólogo de KAL en el cromosoma Y (KAL-Y) localizado en la región Yq11.2, no es funcional y a diferencia del gen KAL en el cromosoma X carece de los exones 3, 8 y 9 (del Castillo et al., 1992; Incerti et al., 1992).

El gen KAL escapa a la inactivación del cromosoma X y está altamente conservado en diversas especies no relacionadas evolutivamente excepto el ratón y el hámster (Franco et al., 1991; Rugarli et al., 1993).

Hasta el momento se han descrito 9 delecciones completas del gen KAL con presencia de síndrome de genes contiguos (Ballabio et al., 1989; Bouloux et al., 1993; Meindl et al., 1993; Klink et al., 1994; Paige et al., 1994; Martul et al., 1995). Hardelin et al. (1993b), encontraron que en 21 pacientes con síndrome de Kallmann ligado al cromosoma X existían 2 delecciones que incluían solo a el gen KAL. También se han reportado delecciones intragénicas del gen KAL.

Bick et al. (1992) estudiaron a 59 pacientes con síndrome de Kallmann y encontraron una deleción intragénica de 3,300 pb en dos hermanos, esta deleción se localiza en la la región 3' del gen. Parenti et al. (1995) reanalizaron a un paciente reportado por Ballabio et al. en 1989 y observaron una deleción intragénica que comprende desde el exón 2 hasta el exón 14 del gen KAL con presencia de síndrome de genes contiguos. Quinton et al. (1996) reportaron 2 deleciones intragénicas del gen KAL, la primera de ellas incluye solo al exón 1 y la segunda solo al exón 11. Por último, Georgopoulos et al. (1997) reportaron una deleción intragénica de 14 pb localizada en el exón 10, esta deleción produce un cambio en el marco de lectura dando lugar a un codón de terminación prematuro en el exón 11; estos autores encontraron además otra deleción de 9 pb localizada en el extremo 3' del exón 8 que abarca 2 pb de la región intrónica.

Hardelin et al. (1992, 1993a) describieron cinco mutaciones puntuales que consisten en transiciones de bases (una en el exón 5, 2 en el exón 6 y 2 en el exón 9) que producen un codón de terminación prematuro. Asimismo, reportaron el cambio de Lys por Asn₂₆₇ (exón 6), deleción de la C₃₈₁ del mismo exón y la inserción de una A en la base 1166 en el exón 7. También describen una mutación en el sitio aceptor del corte y empalme ("splicing") del intrón 12. Quinton et al. (1996) reportaron la deleción de la C₁₄₄₇ en el exón 12, lo que produce un corrimiento en el marco de lectura y la creación de un codón de terminación prematuro.

Georgopoulos et al. (1997) describieron la creación de un codón de terminación prematuro en la Tyr₃₂₈ y en otro paciente encontraron el cambio de Leu por Phe₃₁₇, (exón 11) (tabla 1).

Por otro lado, se ha reportado un polimorfismo genético para un dinucleótido de repetición (C-A) localizado 3 kb corriente arriba del extremo 3' del gen KAL. En los estudios reportados, se analizaron 103 cromosomas de sujetos normales habiéndose identificado seis fragmentos en geles de secuenciación, los cuales difirieron en tamaño del producto predicho (179 pb) (Bouloux et al., 1991; Zhang et al., 1993). Hardelin et al. (1993a) demostraron dos polimorfismos de una sola base, uno de estos se localiza en el exón 11 y es el cambio de A por G que sustituye Val por Ile₃₃₄. El otro se encuentra en el exón 12 y sustituye T por C en la base 1983 sin producir cambio en el residuo de aminoácido. Georgopoulos et al. (1997) encontraron otros dos polimorfismos diferentes, el primero es el cambio de His por Arg₆₆₈ (exón 14) y el segundo, es el cambio de A por G en el codón 651 del exón 13, esta sustitución no genera cambio en el aminoácido (arginina).

El gen KAL codifica para una proteína de 680 aminoácidos, la cual contiene un péptido señal de 19 aminoácidos y carece de un dominio transmembranal o sitio de unión a fosfatidilinositol. En la región amino terminal tiene un dominio rico en cisteínas (centro de cuatro disulfuros), este dominio se encuentra en aquellas proteínas tales como inhibidores de proteasas, neurotoxinas y aglutinina de germen

MUTACIONES DESCRITAS EN EL GEN KAL

PACIENTES	MUTACION	REFERENCIA
6	Tres deleciones completas del gen con síndrome de genes contiguos Delección intragénica que comprende desde el exón 2 hasta el exón 14	Ballabio et al., 1989 Parenti et al., 1995
59	Delección intragénica de 3300 pb	Bick et al., 1992
1	Delección completa del gen con síndrome de genes contiguos	Meindl et al., 1993
4	Delección completa del gen con síndrome de genes contiguos	Bouloux et al., 1993
21	Dos deleciones completas del gen Trp ₂₁₁ →codón de terminación (exón 5) Arg ₂₁₇ →codón de terminación (exón 6) Trp ₂₁₈ →codón de terminación (exón 6) Asn ₂₁₇ →Lys (exón 6) Gln ₄₂₁ →codón de terminación (exón 9) Arg ₄₂₁ →codón de terminación (exón 9) Delección de una citocina en la posición 981 (exón 6) Inserción de una adenina en la posición 1166 (exón 7) Mutación en el sitio aceptor del intrón 12	Hardelin et al., 1992-1993a,b
6	Dos deleciones del exón 2 del gen con síndrome de genes contiguos	Paige et al., 1994
1	Delección completa del gen con síndrome de genes contiguos	Klink et al., 1994
3	Delección completa del gen con síndrome de genes contiguos	Martul et al., 1995
12	Delección del exón 1 Delección del exón exón 11 Delección de una citocina en la posición 1847 (exón 12)	Quinton et al., 1996
24	delección intragénica de 14 pb (exón 10) delección intragénica de 9 pb (extremo 3' del exón 8) Tyr ₁₀₈ → codón de terminación (exón 7) Phe ₅₁ → Leu (exón 11)	Georgopoulos et al., 1997

de trigo (Drenth et al., 1980). Dos terceras partes de la región carboxilo terminal presentan gran similitud con los repetidos de fibronectina tipo III (figura 1). Estos repetidos están presentes en moléculas de adhesión celular neural (Lander, 1989) y en cinasas y fosfatasa ligadas a receptores (Fisher et al., 1991). Muchas de estas moléculas que contienen repetidos de fibronectina tipo III están implicadas en rutas de migración neuronal y axonal (Dodd y Jessell, 1988; Chiquet et al., 1991; Reichardt y Tomaselli, 1991; Hynes y Lander, 1992). Con todo esto la proteína codificada por el gen KAL comparte homología con moléculas de adhesión celular neural implicadas en procesos de migración neuronal.

Por medio de inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, se demostró en embriones de ratón que las neuronas que secretan GnRH se originan en la placa olfatoria; durante el desarrollo, las neuronas de GnRH migran a lo largo de las neuronas olfatorias y cruzan el bulbo olfatorio para llegar finalmente a su localización en el hipotálamo (Schwänzel-Fukuda y Pfaff, 1989; Wray et al., 1989). A partir de lo anterior, resulta evidente que las interacciones entre los axones de las neuronas olfatorias y las células mitrales localizadas en el bulbo son importantes para la migración de las neuronas productoras de GnRH. La evidencia de que una de estas moléculas está ausente en el síndrome de Kallmann, fue confirmada mediante el análisis histopatológico de un feto de 19 semanas con síndrome de Kallmann ligado al cromosoma X

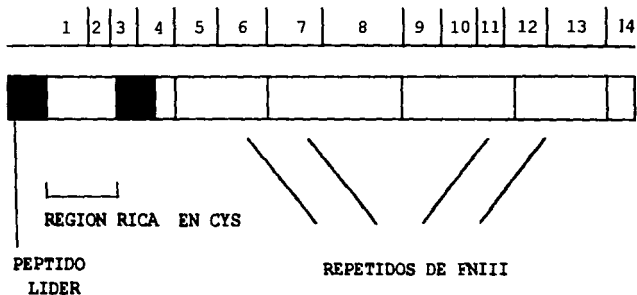


Figura 1. Esquema completo del gen KAL. En la parte inferior se señalan las regiones de mayor importancia de la proteína codificada por este gen (del Castillo et al., 1992).

(Schwanzel-Fukuda et al., 1989). En este caso, los axones olfatorios se desarrollaron normalmente e iniciaron su migración hacia el cerebro anterior, pero se detuvieron prematuramente en las meninges entre la placa cribiforme y el cerebro anterior. Estos datos sugirieron que un defecto en la interacción neuronal y/o sinaptogénesis más que en la migración, constituye el defecto primario en el síndrome de Kallmann (Schwanzel-Fukuda y Pfaff, 1989). La proteína codificada por el gen KAL puede ser el sustrato de una molécula de adhesión que promueva la interacción entre las dendritas de las células mitrales y los axones olfatorios. En ausencia de KAL, estas interacciones no pueden establecerse y podría generarse la regresión de los bulbos olfatorios después de una fase normal de desarrollo (Rugarli y Ballabio, 1993).

Los avances en la biología molecular han permitido establecer el defecto genético preciso de enfermedades hereditarias. En particular, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede detectar deleciones totales o parciales de un gen y establecer así el diagnóstico molecular exacto.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene como finalidad la amplificación enzimática de una secuencia de DNA específica a partir de un molde de ácido nucleico (DNA o RNA). La especificidad de la amplificación se debe a la

hibridación de un par de oligonucleótidos (secuencias cortas de nucleótidos), con secuencias complementarias a las regiones que flanquean al segmento de DNA de interés (Erich et al., 1988).

La reacción involucra una serie de ciclos de desnaturalización del DNA por calor, alineamiento de los oligonucleótidos a sus secuencias complementarias y la extensión de los oligonucleótidos alineados por medio de una DNA polimerasa. El producto obtenido de un ciclo de amplificación sirve como templado para el ciclo siguiente; de esta forma, en cada ciclo se duplica la cantidad del segmento deseado lo que resulta en una acumulación exponencial de 2^n del mismo, donde n representa el número de ciclos a los que se somete el DNA. Las regiones flanqueantes del DNA amplificado están definidas por los extremos 5' de los oligonucleótidos utilizados (figura 2) (Erich et al., 1988).

La amplificación exponencial de secuencias de DNA no es un proceso ilimitado, durante la reacción de PCR se alcanza un nivel de amplificación en donde se acumula una cantidad de sustrato mayor del que la DNA polimerasa puede extender durante el tiempo establecido. Cuando lo anterior ocurre la eficiencia de la reacción disminuye y el producto amplificado se acumula en forma lineal en lugar de una forma exponencial; esto se conoce como efecto "plateau" o efecto meseta (Erich et al., 1988; Innis et al., 1990).

La composición de una mezcla de PCR incluye al DNA molde, el amortiguador de amplificación, los

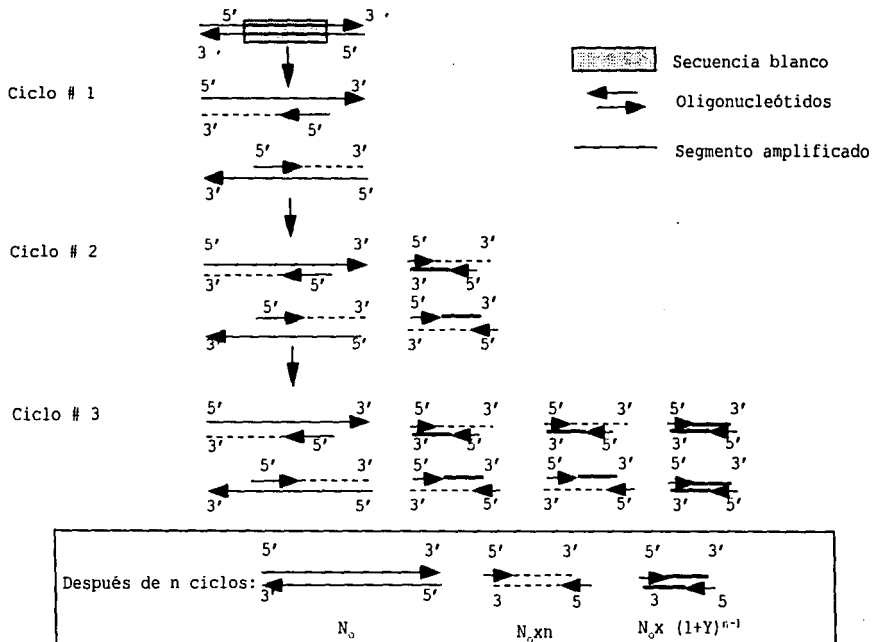


Figura 2: Representación esquemática de la PCR. La amplificación de la secuencia blanco sucede de manera exponencial de acuerdo a la fórmula $N_f = N_0(1+Y)^{n-1}$ donde:

N_f = número de copias final de la secuencia blanco de doble cadena

N_0 = número de copias inicial

Y = eficiencia de extensión del oligonucleótido por ciclo

n = número de ciclos

oligonucleótidos, los desoxirribonucleótidos trifosfatados y la DNA polimerasa (Sambrook et al., 1989).

DNA molde

Pueden ser sustratos para una reacción de PCR: DNA genómico, DNA de plásmidos, DNA de fagos, producto de PCR, DNA complementario y RNA mensajero (Cha y Thilly, 1995).

Con esta técnica podemos obtener con tan solo 10^{-6} μ g de templado y de 30 a 35 ciclos de amplificación entre 0.5 y 1.0 μ g de producto amplificado (Sambrook et al., 1989).

Amortiguador de amplificación

La solución amortiguadora estándar al 10X para PCR contiene: KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM (pH 8.3 a temperatura ambiente), MgCl₂ 1.5 mM y 0.01% de gelatina (Innis et al., 1990). La presencia de cationes divalentes es crítica, ya que la eficiencia y especificidad de la reacción dependen de la concentración de estos iones. El DNA a utilizar como templado no debe contener altas concentraciones de agentes quelantes como EDTA o grupos iónicos cargados negativamente ya que pueden interactuar con los iones Mg²⁺ presentes en el amortiguador y por lo tanto inhibir la reacción (Erllich, 1989).

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos ("primers") utilizados en una PCR generalmente están compuestos de 18 a 28 nucleótidos.

La secuencia de éstos debe ser complementaria con las regiones flanqueantes al segmento de DNA de interés; además, estos oligonucleótidos no deben ser complementarios entre sí ya que durante la reacción de amplificación pueden aparearse entre ellos (Innis et al., 1990).

La concentración de oligonucleótidos para una reacción de PCR de por lo menos 30 ciclos de amplificación es de entre 0.1 y 0.5 μ M. Una mayor concentración de éstos puede producir alineamientos inespecíficos en el DNA, lo que conduce a la amplificación de segmentos erróneos (Innis et al., 1990). Del mismo modo, si la cantidad de oligonucleótidos a utilizar resulta escasa, la reacción se vuelve ineficiente; por lo tanto, es importante determinar la cantidad específica de oligonucleótidos para cada reacción en particular con el fin de obtener los resultados adecuados (Sambrook et al., 1989).

La temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos a la secuencia de interés determina la especificidad de la reacción. Temperaturas por debajo de la temperatura óptima de alineamiento ocasionan apareamientos inespecíficos; en cambio, temperaturas por arriba de la óptima evitan la unión de los oligonucleótidos al DNA. (Innis et al., 1990).

El contenido de G+C en los oligonucleótidos determina la temperatura de fusión (T_m), la cual corresponde a la temperatura en la cual la mitad del DNA se encuentra como cadena sencilla y un aumento de estas dos bases es directamente proporcional al incremento de T_m (Sambrook et al., 1989).

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Conociendo el valor de la T_m para un par de oligonucleótidos se podrá calcular la temperatura teórica de alineamiento (T_a), de acuerdo a la siguiente ecuación (Innis et al., 1990):

$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$$

Desoxirribonucleótidos Trifosfatados (dNTPs)

La DNA polimerasa incorpora los dNTPs complementarios al DNA molde. Durante la reacción de PCR se utilizan a concentraciones entre 20 y 200 μM para cada uno; deben mantenerse concentraciones equivalentes de los cuatro dNTPs para minimizar errores de incorporación (Innis et al., 1990).

Un cambio en la concentración de los mismos afecta los niveles de Mg^{2+} libre en solución debido a la formación de complejos dNTP-Mg. Si la concentración de cada dNTP excede los 50 mM, puede ocurrir inhibición total de la actividad de la DNA polimerasa (Erlich, 1988).

DNA polimerasa

La DNA polimerasa incorpora los dNTPs al formar un enlace fosfodiéster entre el grupo hidroxilo libre en el extremo 3' del último nucleótido y el grupo fosfato en 5' del nucleótido entrante. La energía para esta reacción proviene de la hidrólisis del fosfato y de cada dNTP que se incorpora (Ausubel et al., 1990).

Todas las DNA polimerasas *in vivo* necesitan un cebador que se encuentre en el lugar de inicio de la síntesis de la cadena complementaria al DNA molde. El cebador es un pequeño fragmento de RNA que proporciona el extremo 3'-OH libre para que actúe la enzima (Sambrook et al., 1989). *In vitro*, las DNA polimerasas utilizan como cebador a una serie de desoxirribonucleótidos sintéticos (oligonucleótidos), cuya secuencia es complementaria con las regiones flanqueantes al segmento de DNA que se quiere amplificar (Erlich et al., 1988).

En los protocolos originales para la realización de la PCR (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986; Mullis y Faloona, 1987), se empleó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli*. Las reacciones con esta enzima resultaron exitosas para la amplificación de fragmentos pequeños de DNA (<200 pb); sin embargo, los resultados obtenidos con fragmentos mayores no fueron los esperados ya que la cantidad de producto final era poca y de tamaño heterogéneo. El fragmento Klenow de la DNA polimerasa I se inactiva a las temperaturas necesarias para desnaturalizar el DNA (Cha y Thilly, 1995). Poco después se utilizó otra DNA polimerasa termoestable, que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*, llamada Taq polimerasa, que crece en aguas termales con temperaturas aproximadas a los 70°C (Saiki et al., 1988). Debido a su carácter termoestable la Taq polimerasa ha sido la más utilizada en PCR, ya sea en su

forma nativa, extraída de *T. aquaticus*, o la recombinante obtenida en *E. coli* (Innis et al., 1990).

La actividad de esta enzima, tiene una vida media de aproximadamente 2 horas a 92.5°C, de 40 min a 95°C y de 5 min a 97.5°C (Innis et al., 1990). La alta especificidad catalítica de esta enzima permite la amplificación de un segmento 4×10^6 veces en aproximadamente 25 ciclos lo que puede ocasionar que la reacción entre en una fase estacionaria y se origine un efecto meseta (Saiki et al., 1988). A partir de este punto, a medida que transcurren más ciclos, el producto amplificado comienza a desaparecer, esto debido a la actividad exonucleasa 5'→3' de la Taq DNA polimerasa (Erlich y Arnheim, 1992).

Para catalizar una reacción estándar de PCR se necesitan aproximadamente 2 U de Taq DNA polimerasa. La adición en exceso de esta enzima puede ocasionar amplificación de secuencias inespecíficas (Sambrook et al., 1989).

Una vez que los oligonucleótidos se han alineado a sus secuencias complementarias en el DNA molde, se inicia la extensión de los oligonucleótidos a 72°C (temperatura de actividad óptima de la Taq polimerasa) (Saiki et al., 1988).

Se sabe que la Taq DNA polimerasa tiene un índice de error de 2×10^{-4} nucleótidos por ciclo, la probabilidad de que este evento ocurra es de 10^{-3} . La frecuencia de error aumenta a medida que las concentraciones de dNTPs y Mg^{2+} son mayores (Cha y Thilly, 1995).

Aplicaciones de la PCR

La técnica de PCR es de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades genéticas (Wong et al., 1987; Engelke et al., 1988); en la detección de secuencias de ácidos nucleicos de organismos patógenos en muestras clínicas (Kwok et al., 1987; Ou et al., 1988), en la identificación genética de muestras forenses como cabellos (Higuchi et al., 1988), ó semen (Li et al., 1988) y en el análisis de mutaciones en oncogenes activados (Bos et al., 1987; Farr et al., 1988). La técnica de PCR descrita originalmente por Mullis y Faloona (1987) ha sufrido modificaciones, esto permitió su utilización en diversos campos de investigación. En la actualidad existen muchas variantes de la técnica original, a continuación se describen algunas de estas:

PCR *in situ*

Esta técnica permite llevar a cabo la amplificación de secuencias de DNA de interés a partir de muestras que se han procesado histológicamente y que se conservan en laminillas (Bagasra et al., 1992).

La PCR *in situ* se realiza directamente en el tejido y todos los componentes de la reacción se adicionan al mismo. (Gressens y Martin, 1994).

Transcripción reversa-PCR (RT-PCR)

A la técnica de PCR se incorporó un paso de transcripción reversa con la finalidad de poder evaluar la expresión de un gen en tejidos específicos. Para ello, se utiliza una transcriptasa reversa que sintetiza el DNA complementario (cDNA) a partir del RNA mensajero (mRNA) que se desea estudiar. Y una vez obtenido este cDNA se procede a la amplificación de la secuencia de DNA de interés (Ausubel et al., 1990).

PCR anidada

Esta técnica se utiliza para eliminar los segmentos ectópicos a la secuencia de interés que se han amplificado junto con ella. La PCR anidada consiste en someter una pequeña alícuota de esa primera reacción a una segunda PCR utilizando un par de oligonucleótidos internos a las regiones flanqueantes de la primera reacción, lo cual incrementa la sensibilidad de la reacción (Mullis y Faloona, 1987; Gibbs, 1990; Zhang y Ehrlich, 1994; Zimmerman et al., 1994).

Amplificación de cDNA con oligonucleótidos mixtos (MOPAC-PCR)

En esta técnica se utiliza como templado mRNA para sintetizar cDNA por medio de la transcriptasa reversa. En esta reacción se emplean dos grupos ("pools") de oligonucleótidos degenerados que tienen la capacidad de alinearse a varias secuencias con cierta homología, incluyendo la secuencia de interés. Esta técnica se utiliza

para construir sondas o cDNAs que se desean clonar y su ventaja consiste en que se generan de manera rápida sondas de secuencia única (Lee et al., 1988).

Anclaje por PCR (Anchored PCR)

Esta metodología resulta una modificación de la técnica MOPAC-PCR; en ella, la primera cadena de cDNA se sintetiza de manera convencional. Posteriormente, al cDNA obtenido se le adiciona una cola de poli(dG) en el extremo 3', utilizando una terminal transferasa. El segmento de interés es amplificado con un oligonucleótido que consiste de una cola de poli(dC) unida a una secuencia que contiene sitios de restricción específicos, denominados ancla ("anchor") y el segundo oligonucleótido sintético es complementario a un segmento de la secuencia de interés. La adición de secuencias para sitios de restricción específicos, permiten la clonación de genes (Loh et al., 1989).

Caminando un cromosoma por medio de PCR semi-aleatorio (SRPCW)

Esta metodología sirve para identificar secuencias desconocidas dentro de un templado muy extenso, para ello se utiliza un par de oligonucleótidos de los cuales uno presenta una secuencia complementaria a una región flanqueante conocida y el otro contiene una secuencia al azar. Bajo condiciones de bajo rigor se obtendrán varios fragmentos que se podrán secuenciar. Posteriormente se realiza una segunda

PCR de los fragmentos ya secuenciados con el fin de seleccionar regiones que nuevamente se pueden secuenciar (Ge y Charon, 1997).

PCR invertida (IPCR)

La PCR invertida permite caracterizar segmentos de secuencia desconocida que flanquean una secuencia blanco. En esta técnica se utilizan dos oligonucleótidos que son complementarios a los extremos 5' de ambas cadenas complementarias. El producto de PCR resultante es una molécula lineal de DNA de doble cadena que consiste de una serie de secuencias arregladas de "cabeza a cola" que flanquean un segmento de DNA de interés (Ochman et al. 1988).

Amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE-PCR)

Este método permite caracterizar la secuencia de la regiones 5' o 3' de un segmento específico de DNA (Stappert J, 1994).

Para determinar la secuencia del extremo 3' se realiza un RT-PCR del mRNA utilizando un oligo (dT) como primer; este oligonucleótido tiene además una región conocida. Posteriormente, se sintetiza la cadena complementaria utilizando un primer que se aparea con las secuencias conocidas del oligo (dT). Una vez obtenido el DNA de doble cadena se realiza una PCR anidada (Stappert J, 1994).

En el caso de que se desee caracterizar la región 5' del gen se realiza un RT-PCR utilizando un oligonucleótido

complementario a la región 3' del mismo, que tiene además una secuencia conocida. Después se le introduce un poli (dC) en el extremo 3' del gen por medio de una terminal transferasa. El DNA de doble cadena se sintetiza utilizando un oligonucleótido complementario al poli (dC). Posteriormente se realiza una PCR anidada (Stappert J, 1994).

OBJETIVO

Identificar posibles deleciones en la región Xp22.3 en pacientes con diagnóstico comprobado de síndrome de Kallmann.

HIPOTESIS

Algunos pacientes con síndrome de Kallmann ligado al cromosoma X presentan deleciones en el gen del Síndrome de Kallmann.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 27 pacientes con diagnóstico comprobado de síndrome de Kallmann.

Criterios de inclusión

- 1) Sujetos masculinos mayores de 18 años de edad o hermanos de sujetos previamente diagnosticados con síndrome de Kallmann.
- 2) Diagnóstico clínico y de laboratorio de síndrome de Kallmann:
 - A) Desarrollo puberal Tanner 1.
 - B) Anosmia o hiposmia.
 - C) Concentraciones basales prepuberales de gonadotropinas y testosterona.
 - D) Placa simple de cráneo sin alteración.

Criterios de exclusión

- 1) Procesos inflamatorios crónicos del tracto respiratorio.
- 2) No cumplir con alguno de los criterios de inclusión.

Al ingreso de cada paciente se practicó una evaluación clínica detallada con el fin de diagnosticar el síndrome de Kallmann. Las características clínicas de cada sujeto se pueden observar en la tabla 2. Para establecer el diagnóstico se consideró que un paciente presentaba dicho síndrome cuando se encontraba en estadio 1 de la clasificación de Marshall y Tanner (1970) y además presentaba anosmia o hiposmia

TABLA 2
CARACTERISTICAS CLINICAS Y CITOGENETICAS DE LOS 27 PACIENTES CON
SINDROME DE KALLMANN

PACIENTE	EDAD	ALTERACION EN LA OLFACION
1	10	Hiposmia
2	21	Hiposmia
3	20	Hiposmia
4	51	Anosmia
5	34	Anosmia
6	24	Anosmia
7	20	Anosmia
8	26	Anosmia
9	19	Anosmia
10	20	Hiposmia
11	19	Hiposmia
12	19	Anosmia
13	20	Anosmia
14	9	Anosmia
15	18	Hiposmia
16	18	Anosmia
17	19	Hiposmia
18	25	Anosmia
19	28	Anosmia
20	20	Anosmia
21	23	Anosmia
22	28	Hiposmia
23	18	Anosmia
24	18	Hiposmia
25	23	Anosmia
26	29	Anosmia
27	18	Anosmia

Todos los sujetos presentaron cariotipo 46,XY sin alteraciones estructurales

asociadas. Para determinar la alteración olfatoria, se practicaron pruebas de olfacción de acuerdo a la metodología descrita por Rosen et al. (1979). Estas pruebas consisten en la evaluación de la olfacción mediante la identificación de diversos aromas que ya han sido estandarizados previamente. Al paciente con los ojos vendados se le presentan estos aromas en recipientes opacos, iniciándose con el aroma menos penetrante, para finalmente utilizar el más penetrante. Se utilizaron los siguientes aromas: dentífrico, vainilla, café, colonia y alcohol. Se consideró que el paciente era anósmico cuando no percibió ninguno de los 5 aromas probados; se clasificó al individuo como hipósmico cuando no percibió alguno(s) de los aromas presentados. Desde luego, la prueba se difirió en caso de existir alguna anomalía por la cual la olfacción estuviese alterada circunstancialmente, por ejemplo: gripa, rinitis alérgica, etc.

Se consideró que el padecimiento presentaba transmisión ligada al cromosoma X cuando existió por lo menos un hombre afectado en la familia de la madre del propósito, ausencia de mujeres afectadas en la familia y ausencia de consanguinidad.

Solamente se incluyeron en el proyecto aquellos pacientes que presentaron concentraciones basales de LH, FSH y testosterona por debajo de los valores de referencia para un adulto normal, esto es: LH= 3-12mUI/ml, FSH= 0.5-5.0 mUI/ml y testosterona > 3.8ng/ml. La metodología para la determinación de estas hormonas se ha descrito previamente. (Ulloa-Aguirre et al., 1988; Méndez et al., 1989; García-Rubí

et al., 1992). En la tabla 3 se presentan las concentraciones hormonales plasmáticas de los 27 sujetos estudiados.

Se excluyó la posibilidad de una lesión tumoral que estuviera condicionando el hipogonadismo hipogonadotrópico mediante placas de cráneo AP y lateral. Asimismo, mediante la historia clínica detallada se excluyeron otras causas de hipogonadismo hipotalámico.

Para el análisis de los 14 exones del gen KAL se extrajeron 5 ml de sangre periférica a cada uno de los pacientes que se incluyeron en el estudio.

Extracción de DNA genómico

El DNA genómico tanto de los pacientes como de los controles se obtuvo mediante una técnica previamente descrita (Buffone y Darlington, 1985; Kempter y Grossbadern, 1992) con algunas modificaciones (Cuevas-Covarrubias et al., 1997).

1. Se tomaron 5 ml de sangre de cada sujeto y se colocaron en tubos que contenían EDTA como anticoagulante. Se invirtieron los tubos para homogeneizar.
2. Se colocó la sangre en tubos Falcon de 25 ml y se agregó 5ml de un amortiguador de TTS (apéndice I) y se mezclaron perfectamente.
3. Se transfirió la mezcla anterior a microtubos de 1.5 ml de capacidad y se agitaron vigorosamente.
4. Todos los tubos se centrifugaron a 9,221 g durante 2 min y se descartó el sobrenadante.

TABLA 3
CONCENTRACIONES HORMONALES BASALES DE LOS 27 PACIENTES CON
SINDROME DE KALLMANN

PACIENTE	LH (mUI/ml)	FSH (mUI/ml)	T (ng/ml)
1	0.2	0.4	0.1
2	-	-	-
3	1.1	0.7	1.1
4	-	-	0.3
5	-	0.3	0.4
6	1.0	-	0.8
7	1.2	0.4	0.4
8	0.9	0.6	0.5
9	0.4	0.2	0.45
10	0.7	0.3	0.32
11	1.3	0.1	0.4
12	2.4	-	0.33
13	0.9	-	0.16
14	0.3	0.2	0.3
15	0.5	0.2	0.3
16	0.5	0.1	0.32
17	0.7	0.2	0.32
18	2.0	0.2	0.21
19	1.4	0.3	0.4
20	0.1	0.3	1.4
21	0.8	0.4	1.2
22	1.2	0.3	0.4
23	1.6	0.3	0.38
24	1.1	-	0.51
25	0.2	0.2	0.36
26	2.6	-	0.19
27	0.1	0.3	0.28

Valores de referencia:

LH= 3-12 mUI/ml

FSH= 0.5-5.0 mUI/ml

Testosterona > 3.8 ng/ml

5. Todos los botones se resuspendieron en 1 ml del mismo amortiguador, se agitaron y se centrifugaron a 9,221 g durante 2 min.
6. Se repitió el paso 5 las veces que fueron necesarias hasta obtener un botón de glóbulos blancos limpio.
7. Se resuspendieron los botones en 570 μ l de NaCl 50 mM y se agregaron 30 μ l de SDS al 10% (apéndice I). Las muestras se agitaron durante 5 minutos.
8. Las proteínas se precipitaron adicionando 250 μ l de NaCl saturado (apéndice I). Las muestras se agitaron durante 5 minutos.
9. Posteriormente, se centrifugaron a 9,221 g durante 15 min a 4°C.
10. El sobrenadante se transfirió a un tubo Córrex estéril de 50 ml y se adicionó 2.5 veces el volumen de etanol absoluto frío (-20°C) Se agitó cuidadosamente.
11. Se recolectó el DNA precipitado de cada sujeto con una pipeta Pasteur estéril de punta curva.
12. El DNA se lavó con etanol al 70%. y se dejó secar a temperatura ambiente.
13. El DNA se resuspendió en 200 μ l de un amortiguador de TE (apéndice I). Todas las muestras se guardaron a -20°C.

En todas las muestras obtenidas se realizó un análisis espectrofotométrico mediante las lecturas a 260 y 280 nm. La

concentración de DNA se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{260}) (\text{dilución}^{-1}) (0.05\mu\text{g}/\mu\text{l})$$

Sabiendo que $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de DNA = 1 D.O.₂₆₀.

La relación 260/280 indica la pureza del DNA obtenido. Se considera que las relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.0 unidades de D.O.₂₆₀ son las óptimas.

Para determinar la calidad de la muestras se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio al 0.0002%.

Síntesis de oligonucleótidos

La síntesis de los oligonucleótidos para los 14 exones del gen del síndrome de Kallmann se realizó de manera automática en un sintetizador Oligo 100, DNA Synthetisizer de Beckman. Todos los reactivos utilizados se adquirieron de Beckman (California, USA).

1. Se colocó en el aparato la columna que tenía unido el nucleótido en posición 3' del primer que se sintetizó.
2. Se removió el dimetoxitril de la posición 5' del nucleótido unido al soporte por liberación de ácido tricloroacético.
3. Se agregó tetrazol y se mezcló con los monómeros de fosforamidita.
4. Se formó un intermediario activo entre la fosforamidita y el tetrazol.

5. El intermediario se acopló con el grupo 5'-OH expuesto del nucleótido unido al soporte.
6. Se unieron grupos acetilos a grupos hidroxilos libres que podfan intervenir en la reacción.
7. Se oxidó el fósforo trivalente de la cadena naciente con H_2O, I_2 .
8. Este ciclo se repitió hasta completar la síntesis del oligonucleótido.
9. Este se desprendió del soporte sólido al lavarse con hidróxido de amonio.
10. Se secó mediante centrifugación al vacío y se resuspendió en 200 μ l de agua bidestilada estéril.
11. Todos los oligonucleótidos se almacenaron a $-20^\circ C$.

Cada oligonucleótido se diluyó 1:500 y se realizó la lectura espectrofotométrica a 260 nm. La concentración de cada uno se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{oligonucleótido}], (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{260}) (\text{dilución}^{-1}) (0.03\mu/\mu\text{l})$$

donde $0.03 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de oligonucleótido = 1 D.O.₂₆₀

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizaron los pares de oligonucleótidos correspondientes a los 14 exones del gen KAL (Hardelin et al., 1993a). La secuencia de cada oligonucleótido, el tamaño de los productos de amplificación y la temperatura de alineamiento se describen en la tabla 4. Los reactivos para llevar a cabo la reacción de PCR se adquirieron a Perkin-

TABLA 4
CONDICIONES DE PCR

EXON	OLIGONUCLEOTIDOS EN DIRECCION 5'→3'	TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO	PRODUCTO AMPLIFICADO (pb)
1	CCTCGCCCTCGCCCTCGACCCGAG GAACTTTGCGAGCCAGGCTGGGA G	63 (4% DMSO)	329
2	TTGGAAGGGAAGGACAAGCAGG GCACCATTCATACAGGTATAG	55	230
3	TCTCAGCTTTGTTTGTTC CGTAAGCATAGTCAGATTTGG	55	174
4	ATGTCTTGGAAATCAGACTTC ATGTGACACTGCATGTGTCTT	55	334
5	CAGATTGTTTAATTGATACG GCAGACACTACCTCCAGGATG	55	267
6	AGTGACATGTTCCCTGTGCTC CTGGTAGCAAGGATAGTATTC	55 (4% DMSO)	218
7	ATGATGTGTCTTTGTACTGGG TGGGAATAACAATCCTTCTC	55	269
8	GACGTGGAAGGTTTGTAAACGC ATCATGTCAATCATCTTGA	55	237
9	TGCCAGGAATCTATAATTAC ACTATCTCTATAATTACTGTGC	55	266
10	ACCTGGAATGTAACATCCAGC ACCATTCTGCTTCCACTTCC	55 (10% DMSO)	293
11	AATATGATTTCAATCTTGCC GATGTAGAAGTCCTTCAGGTG	55 (2% DMSO)	272
12	TCTCCAGTCGCCTAATCCTGG CCAATGACACAGACATAGTAC	55	302
13	GTGCATTGCATGTTGTCTCTG TGACAGGATGGCTTAATGCCC	55	241
14	ATGTTACTGACATATTTTGTG GGCCGAAGTTCAACAAGCTTA	55	147

DMSO= dimetilsulfóxido

Elmer (New Jersey, USA). Los programas de amplificación se realizaron en el equipo DNA Thermal Cyclor 480 de Perkin-Elmer.

En un tubo estéril para microcentrífuga se agregaron a un volúmen final de 50 µl lo siguiente:

1. Amortiguador de amplificación 10X a una concentración final de 1X.
2. DMSO al 4% para el exón 1 y 6, al 10% para el exón 10 y al 2% para el exón 11.
3. Mezcla de los 4 dNTPs a una concentración final de 20 µM.
4. Oligonucleótidos a una concentración final de 250 nM.
5. Entre 0.5 y 1.0 µg de DNA.
6. Se añadieron 2 U de Taq polimerasa.
7. Se cubrió la mezcla de reacción con 100 µl de aceite mineral.
8. El programa de amplificación fue:

	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
30 ciclos	1 min a 94°C	55°C durante 1 min (excepto para el exón 1 en donde la temperatura de alineamiento fue a 63°C)	1 min a 72°C
Extensión prolongada			5 min a 72°C

Los productos de cada reacción de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio 0.0002%, en todos los casos se

incluyó un marcador de peso molecular (escalera de 100 y 123 pb, Gibco BRL, Life Technologies, Inc. Meryland, USA).

RESULTADOS

Los estudios de los arboles genealógicos, practicados a todos los pacientes permitieron confirmar el patrón hereditario ligado al cromosoma X en 7 familias (12 sujetos) (figura 3). Todas las familias pertenecieron a genealogías diferentes.

En el análisis por PCR del DNA genómico de los 27 pacientes estudiados, se demostró que el tamaño de los productos de DNA fue el esperado de acuerdo a su peso molecular y que existía amplificación de los 14 exones del gen. En dos pacientes (#5 y #6) hermanos, se observó amplificación normal de los exones 1 y 2 así como del 6 al 14, en tanto que no se observó amplificación de los exones 3 al 5 lo cual demostró una nueva delección intragénica (figura 4).

En otro paciente (#7) se encontró amplificación normal de los exones 4 al 14 por PCR; sin embargo, los exones 1, 2 y 3 se encontraban deletados lo que demuestra la existencia de otra nueva delección intragénica (figura 5).

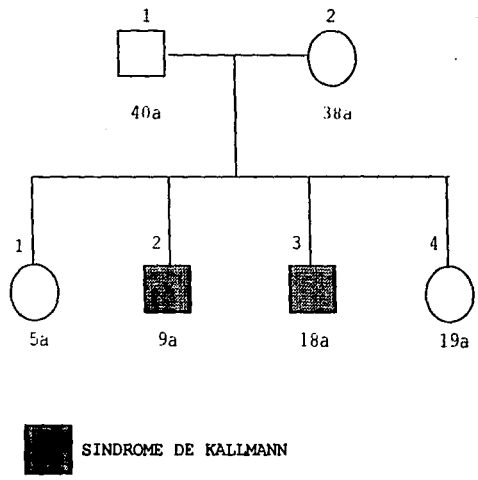


Figura 3. Arbol genealógico de los pacientes #13 y #14. Se puede apreciar que en esta familia dos sujetos se encontraban afectados.

E X O N

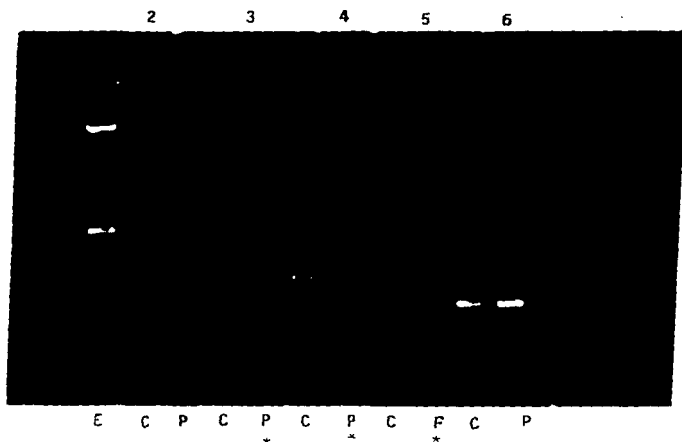


Figura 4. Reacción en cadena de la polimerasa llevada a cabo en el DNA del paciente #5, así como en un control masculino sano. Obsérvese la ausencia de los exones 3 al 5, así como la presencia de los exones 2 al 6 en el sujeto afectado. En el control se observa la presencia de los exones 2 al 6.

E= Escalera de 123 pb

C= Control

P= Paciente

* = DELECIION

E X O N

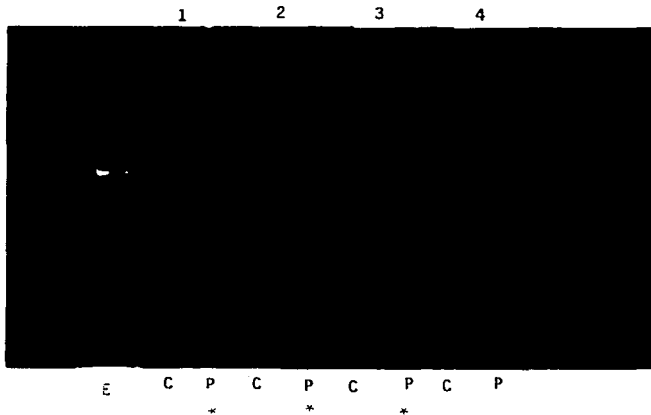


Figura 5. Reacción en cadena de la polimerasa. Obsérvese la amplificación enzimática del exón 4, así como la ausencia de productos de PCR de los exones 1 al 3 del gen KAL en el sujeto estudiado.

E= Escalera de 100 pb

C= Control

P= Paciente #7

* = DELECIÓN

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En este trabajo realizamos el estudio molecular de 27 pacientes con diagnóstico de síndrome de Kallmann, entidad que se caracteriza por la asociación de hipogonadismo hipogonadotrópico con anosmia o hiposmia (Kallmann, 1944). Este síndrome posee un patrón hereditario variable; sin embargo, la existencia de un mayor número de varones que de mujeres afectados sugiere que la forma ligada al cromosoma X es la más frecuente (Hermanussen y Sippell, 1985; White et al., 1993). El gen que al encontrarse alterado es el responsable de la forma ligada al cromosoma X fue localizado en el brazo corto de dicho cromosoma en la región 22.3, en una posición adyacente a sitios conocidos como los responsables de la condrodisplasia punctata y de la ictiosis con deficiencia de sulfatasa esteroidea (Ballabio et al., 1986).

Hasta ahora se han estudiado molecularmente 137 pacientes afectados con síndrome de Kallmann. Los 6 pacientes estudiados por Ballabio et al. (1989) presentaban delección completa del gen KAL asociada a delección de otros genes contiguos. Posteriormente Parenti et al. (1995) al reanalizar a uno de los sujetos estudiados por Ballabio, demostraron que la delección génica en este sujeto no era total sino que incluía desde el exón 2 hasta corriente abajo del exón 14.

Bick et al. (1992) estudiaron a 59 pacientes comprobándose el patrón hereditario ligado al cromosoma X en solo 16 de estos sujetos. El análisis en estos individuos

demostró una delección intragénica del gen KAL de 3300 pb que incluye los dos últimos intrones así como el penúltimo y parte del último exón. Así la frecuencia de delecciones intragénicas en esta población corresponde al 1.7% de los sujetos estudiados. En el resto de los individuos no se observó delección alguna. Hardelin et al. (1992, 1993a,b) analizaron a 21 pacientes con síndrome de Kallmann ligado al cromosoma X, encontrándose delección completa del gen KAL en dos sujetos y 9 mutaciones puntuales. Paige et al. (1994) estudiaron a 6 individuos con esta entidad llevando a cabo amplificación por PCR exclusivamente del exón 2. En 5 de estos sujetos se encontró deletado dicho exón, sin establecerse con precisión la longitud de la alteración molecular. Bouloux et al. (1993), Meindl et al (1993), Klink et al. (1994) y Martul et al. (1995) describieron 4 familias con síndrome de Kallmann ligado al cromosoma X en las cuales se observó delección completa del gen asociado a delecciones de otros genes contiguos. Quinton et al. (1996) describieron en 12 pacientes dos delecciones intragénicas, la primera de ellas comprende al exón 1 y la segunda al exón 11 del gen KAL, así como delección de la C₁₈₄₇ en el exón 12. Georgopoulos et al. (1997) describieron en un paciente, con deficiencia aislada de gonadotropinas, una delección intragénica de 14 pb en el exón 10 y en 3 pacientes con síndrome de Kallmann una delección intragénica de 9 pb en el extremo 3' del exón 8, la creación de un codón de terminación prematuro en la Tyr₁₂₈ y un cambio de Leu por Phe₅₁₇ en el exón 11.

Solo se han reportado 6 deleciones intragénicas del gen KAL, Bick et al. (1992) demostraron la existencia de una deleción de 3,300 pb hacia el extremo 3' del gen. Parenti et al. (1995) describieron una deleción intragénica que comprende desde el exón 2 hasta corriente abajo del exón 14. La deleción de solo 3 exones del gen KAL en este individuo incluye sólo la región rica en Cys de la proteína. Hay que señalar que esta deleción se localiza hacia el extremo 5' del gen, sitio en donde solo se ha reportado una deleción lo que confirma que dicha región es importante para la funcionalidad de la proteína. Con los hallazgos obtenidos podemos establecer que el 7.4% de nuestros pacientes con síndrome de Kallmann presentan deleciones intragénicas de este gen.

El análisis por PCR demostró deleción de los exones 3 al 5 en 2 pacientes que son hermanos (#5 y #6). Dicha deleción incluye la región rica en Cys así como parte de los repetidos de fibronectina tipo III de la proteína codificada por este gen, esta nueva deleción confirma resultados previos que demuestran que esta región es importante para la función de la proteína; ya que Hardelin et al. (1992 1993a,b) reportaron que las mutaciones puntuales en el exón 5 en individuos afectados son determinantes para la existencia de síndrome de Kallmann. En otro individuo (#7) se pudo comprobar una deleción en Xp22.3 que comprende los exones 1 al 3 del gen KAL.

Al igual que en otros estudios previos (Bick et al., 1992; Hardelin et al., 1992, 1993) en nuestro trabajo se

demuestra que las deleciones del gen KAL son poco frecuentes en los individuos afectados con esta entidad. Sin embargo, también hay que considerar que Ballabio et al. (1989) demostraron deleción del gen en los 6 pacientes estudiados. Ahora bien, de los 21 pacientes en los cuales el gen KAL ha sido secuenciado, solamente se ha demostrado mutación puntual en 9 sujetos. El número pequeño de sujetos estudiados hasta ahora y lo parcial de las técnicas moleculares empleadas en los estudios previamente descritos, incluido el nuestro, no permiten por el momento concluir cual es la frecuencia real de las alteraciones moleculares específicas que condicionan la entidad patológica en cuestión.

El análisis por PCR del gen KAL de nuestros pacientes nos permitió identificar dos nuevas deleciones intragénicas. Esto demuestra que la técnica de PCR es un método de Biología molecular útil y sencillo que permite identificar de manera inequívoca la presencia de deleciones intragénicas. En el resto de los sujetos en los que no se encontraron deleciones es probable que la causa del síndrome de Kallmann, en estos individuos, se deba a la existencia de mutaciones puntuales.

En conclusión, confirmamos que existe una gran heterogeneidad en las mutaciones responsables de la presencia del síndrome de Kallmann, ya que describimos una nueva deleción hacia el extremo 5' del gen KAL que ocasiona la misma patología que otras mutaciones descritas anteriormente en otras regiones de este gen.

REFERENCIAS

- Ascoli M. Internalization and degradation of receptor-bound human choriogonadotropin in Leydig tumor cells. Fate of the hormone subunits. *J Biol Chem* 257: 13306, 1982.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Current protocols in molecular biology. Vol 2. John Wiley & Sons, USA. p. 15.0.1, 1990.
- Bagasra O, Hauptman SP, Lischner HW, et al. Detection of human immunodeficiency virus type 1 provirus in mononuclear cells by *in situ* polymerase chain reaction. *N Engl J Med* 326: 1385, 1992.
- Ballabio A, Parenti G, Tippet P, et al. X-linked ichthyosis due to steroid sulphatase deficiency associated with Kallmann syndrome (hypogonadotropic hypogonadism and anosmia): Linkage relationships with Xg and cloned DNA sequences from the distal short arm of the X chromosome. *Hum Genet* 72: 237, 1986.
- Ballabio A, Bardoni B, Carrozzo R, et al. Contiguous gene syndromes due to deletions in the distal short arm of the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci* 86: 1001, 1989.
- Ballabio A, Andria G. Deletions and translocations involving the distal short arm of the human X chromosome: review and hypotheses. *Hum Mol Genet* 1: 221, 1992.
- Bergland RM, Page RB. Can the pituitary secrete directly to the brain? (affirmative anatomical evidence). *Endocrinology* 102: 1325, 1978.
- Bick D, Franco B, Sherins RJ, et al. Intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmann's syndrome. *N Engl J Med* 326: 1752, 1992.
- Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Prevalence of *ras* gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327: 293, 1987.
- Bouloux PM, Hardelin JP, Munroe P, et al. A dinucleotide repeat polymorphism at the Kallmann locus (Xp22.3). *Nucl Ac Res* 19: 5453, 1991.
- Bouloux PM, Kirk J, Munroe P, et al. Deletion analysis maps ocular albinism proximal to the steroid sulphatase locus. *Clin Genet* 43: 169, 1993.
- Buffone GJ, Darlington GJ. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem* 31: 164, 1985.

- Catt KJ, Dufau ML. Basic concepts of mechanism of action of peptide hormones. *Biol Reprod* 14: 1, 1976.
- Cha RS, Thilly WG. Specificity, Efficiency, and Fidelity of PCR. En: Dieffenbach CW, Dveksler GS. eds. PCR primer a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. p.37, 1995.
- Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. Biosynthesis and secretion of follicle stimulating hormone. *Endo Rev* 4: 179, 1983.
- Chiquet M, Wehrle-Haller B, Koch M. Tenascin (cytotactin): An extracellular matrix protein involved in morphogenesis of the nervous system. *Semin Neurosci* 3: 341, 1991.
- Conn PM. GnRH regulation of gonadotropin release and target cell responsiveness. En: de Groot LJ, Besser GM, Cahill GF Jr, et al., eds. *Endocrinology*. WB Saunders, Philadelphia. p. 284, 1989.
- Cuevas-Covarrubias SA, Maya-Núñez G, Kofman-Alfaro SH. A modified quick method for DNA extraction from leucocytes. *Arch Med Res. Enviado a Publicación*, 1997.
- del Castillo I, Cohen-Salmon M, Blanchard S, et al. Structure of the X-linked Kallmann syndrome gene and its homologous pseudogene of the Y chromosome. *Nature Genet* 2: 305, 1992.
- deMorsier G. Etudes sur les dysraphies cranio-encephaliques. Agénésie des lobes olfactifs (telencephaloschizis lateral) et des commissures calleuse et antérieure (telencephaloschizis median). La dysplasie olfacto-génitale. *Schweiz Arch Neurol Nurochir Psychiatr* 74: 309, 1954.
- deMorsier G. Median cranioencephalic dysraphias and olfactogenital dysplasia. *World Neurol* 3: 485, 1962.
- Dodd J, Jessell TM. Axon guidance and the patterning of neuronal projections in vertebrates. *Science* 242: 692, 1988.
- Drenth J, Low BM, Richardson JS, Wright CS. The toxin- α glutinin fold. *J Biol Chem* 225: 2652, 1980.
- Engelke DR, Hoener PA, Collins FS. Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci* 85: 544, 1988.
- Erllich HA, Gelfand DH, Saiki RK. Specific DNA amplification. *Nature* 331: 461, 1988.
- Erllich HA. PCR Technology. Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, New York. 1989.

- Erlich HA, Arnheim N. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annu Rev Genet* 26: 479, 1992.
- Everet JW, Sawyer CH, Markee JE. A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology* 44: 234, 1949.
- Farr CJ, Saiki RK, Erlich HA, et al. Analysis of ras gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci* 85: 1629, 1988.
- Fisher EH, Carbonneau H, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* 253: 401, 1991.
- Franco B, Guioli S, Pragliola A, et al. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path finding molecules. *Nature* 353: 529, 1991.
- García-Rubí E, Vázquez-Alemán D, Méndez JP, et al. The effects of opioid blockade and GnRH administration upon luteinizing hormone secretion in patients with anorexia nervosa during the stages of weight loss and weight recovery. *Clin Endocrinol* 37: 520, 1992.
- Ge Y, Charon NW. Identification of a large motility operon in *Borrelia burgdorferi* by semi-random PCR chromosome walking. *Gene* 189: 195, 1997.
- Georgopoulos NA, Pralong FP, Seidman CE, et al. Genetic heterogeneity evidenced by low incidence of KAL-1 gene mutations in sporadic cases of gonadotropin-releasing hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 213, 1997.
- Gibbs RA. DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Anal Chem* 62: 1202, 1990.
- Gressens P, Martin JR. *In situ* polymerase chain reaction: localization of HSV-2 DNA sequences in infections of the nervous system. *J Virol Methods* 46: 61, 1994.
- Grumbach MM, Kaplan SL. The neuroendocrinology of human puberty: an ontogenetic perspective. En: Grumbach MM, Sizonenko PC, Aubert ML, eds. Control of the Onset of Puberty. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 1, 1990.
- Hardelin JP, Levilliers J, del Castillo I, et al. X chromosome-linked Kallmann syndrome: stop mutations validate the candidate gene. *Proc Natl Acad Sci* 89: 8190, 1992.

Hardelin JP, Levilliers J, Blanchard S, et al. Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Hum Mol Genet* 2: 373, 1993a.

Hardelin JP, Levilliers J, Young J, et al. Xp22.3 deletions in isolated familial Kallmann's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 827, 1993b.

Hermanussen M, Sippell WG. Heterogeneity of Kallmann's syndrome. *Clin Genet* 28: 106, 1985.

Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA. DNA typing from single hairs. *Nature* 332: 543, 1988.

Hipkin LJ, Casson IF, Davis JC. Identical twins discordant for Kallmann's syndrome. *J Med Genet* 27: 198, 1990.

Huckle WR, Conn PM. Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone action. II. The effector system. *Endocr Rev* 9: 387, 1988.

Hynes RO, Lander AD. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* 68: 303, 1992.

Incerti B, Guioli S, Pragliola A, et al. Kallmann syndrome gene on the X and Y chromosomes: implications for evolutionary divergence of human sex chromosomes. *Nat Genet* 2: 311, 1992.

Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ. Optimization of PCRs. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, eds. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, USA. 1990.

Kallmann FJ, Schonfeld WA, Barron SE. The genetic aspects of primary eunuchoidism. *Am J Ment Defic* 48: 203, 1944.

Kempton B, Grossbadern K. Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *TIG* 8: 226, 1992.

Klink A, Meindl A, Hellebrand H, et al. A patient with an interstitial deletion in Xp22.3 locates the gene for X-linked recessive chondrodysplasia punctata to within a one megabase interval. *Hum Genet* 93: 463, 1994.

Kow LM, Pfaff D. Suprachiasmatic neurons in tissue slices from ovariectomized rats: electrophysiological and neuropharmacological characterization and the effects of estrogen treatment. *Brain Res* 297: 275, 1984.

Kwok S, Mack DH, Mullis KB, et al. Identification of human immunodeficiency virus sequences by using *in vitro* enzymatic

- amplification and oligomer cleavage detection. *J Virol* 61: 1960, 1987.
- Laloz MRA, Detta A, Clayton RN. Gonadotropin-releasing hormone desensitization preferentially inhibits expression of the luteinizing hormone β -subunit gene *in vivo*. *Endocrinology* 122: 1689, 1988.
- Lander AD. Understanding the molecules of neural cell contacts: emerging patterns of structure and function. *Trends Neurosci* 12: 189, 1989.
- Lee CC, Wu X, Gibbs RA, et al. Generation of cDNA probes directed by amino acid sequence: Cloning of urate oxidase. *Science* 239: 1288, 1988.
- Legouis R, Hardelin JP, Levilliers J, et al. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 67: 423, 1991.
- Li H, Gyllensten UB, Cui X, et al. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 335: 414, 1988.
- Loh EY, Elliott JF, Cwirla S, et al. Polymerase chain reaction with single-sided specificity: Analysis of T cell receptor δ chain. *Science* 243: 217, 1989.
- Lutz B, Rugarli EI, Eichele G, et al. X-linked Kallmann syndrome. A neuronal targeting defect in the olfactory system? *FEBS letters* 235: 128, 1993.
- Maestre San Juan A. Teratología: Falta total de los nervios olfatorios con anosmia en un individuo en quien existía atrofia congénita de los testículos y miembro viril. *El Siglo Med* 3: 211, 1856.
- Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 45: 13, 1970.
- Marshall LA, Monroe SE, Jaffe RB. Physiologic and therapeutic aspects of GnRH and its analogs. En: Martini L, Gangong WF, eds. *Frontiers in Neuroendocrinology*. Raven, New York. p. 239, 1988.
- Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, et al. Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res* 47: 155, 1991.
- Martul P, Pineda J, Levilliers J, et al. Hypogonadotrophic hypogonadism with hyposmia, X-linked ichthyosis, and renal malformation syndrome. *Clin Endocrinol* 42: 121, 1995.

- Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, et al. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* 234: 1366, 1989.
- Matsumoto T, Sakura N, Veda A. Steroid sulfatase activity in nails: screening for X-linked ichthyosis. *Pediatr Dermatol* 7: 226, 1990.
- Matsumoto AM. Hormonal therapy of male hypogonadism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 23: 587, 1994.
- Matsuo H, Baba Y, Mair RMV, et al. Structure of the porcine LH and FSH-releasing hormone. 1. The proposed aminoacid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 43: 393, 1971.
- Mc Cann SM, Taleisnik S, Friedman HM. LH releasing activity in hypothalamic extracts. *Soc Exp Biol Med Proc* 104: 432, 1960.
- Meindl A, Hosenfeld D, Wolfgang B, et al. Analysis of a terminal Xp22.3 deletion in a patient with six monogenic disorders: implications for the mapping of X-linked ocular albinism. *J Med Genet* 30: 838, 1993.
- Méndez JP, García E, Salinas JL, et al. Anorexia nervosa: función endócrina durante las fases de pérdida y recuperación de peso corporal. *Rev Inv Clín* 41: 337, 1989.
- Mullis KB, Faloona F, Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51: 263, 1986.
- Mullis KB, Faloona F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335, 1987.
- Naftolin F, Harris Gw, Bobrow M. Effect of purified luteinizing hormone releasing factor on normal and hypogonadotropic anosmic men. *Nature* 232: 496, 1971.
- Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621, 1988.
- Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, et al. DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 239: 295, 1988.
- Paige DG, Emilion GG, Bouloux PMG, et al. A clinical and genetic study of X-linked recessive ichthyosis and contiguous gene defects. *Br J Dermatol* 131: 622, 1994.

Parenti G, Carrozzo R, Ghezzi M, et al. Molecular studies on the clinical heterogeneity in a family with X-linked ichthyosis and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet (suppl)* 49: 155, 1991.

Parenti G, Grazia-Rizzolo M, Ghezzi M, et al. Variable penetrance of hypogonadism in a sibship with Kallmann syndrome due to a deletion of the KAL gene. *Am J Med Genet* 57: 476, 1995.

Quinton R, Duke VM, Priyal A, et al. The neuroradiology of Kallmann's syndrome: A genotypic and phenotypic analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3010, 1996.

Reichardt LF, Tomaselli KJ. Extracellular matrix molecules and their receptors: Functions in neural development. *Annu Rev Neurosci* 14: 531, 1991.

Rosen SW, Gahn PK, Rogol AD. Congenital anosmia: Detection thresholds for seven odorant classes in hypogonadal and eugonadal patients. *Ann Otol* 88: 288, 1979.

Rugarli EI, Ballabio A. Kallmann Syndrome. *From Genetics to Neurobiology*. *JAMA* 8: 2713, 1993.

Rugarli EI, Lutz B, Kuratani SC, et al. Expression pattern of the Kallmann syndrome gene in the olfactory system suggests a role in neuronal targeting. *Nat Genet* 4: 19, 1993.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (eds). *Molecular-cloning: A Laboratory Manual*. 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York. p. 14.7, 1989.

Saiki R, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350, 1985.

Saiki R, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487, 1988.

Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Mol Brain Res* 6: 311, 1989.

Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origin of luteinizing hormone neurons. *Nature* 338: 161, 1989.

Seyler LE Jr, Graze K, Canalis E, et al. Effect of sex steroid priming on pituitary response to LHRH. En: Beiling CG, Wentz AC, eds. *The LH Releasing Hormone*. Masson, New York. p. 87, 1980.

- Shally A, Arimura A, Baba Y, et al. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 43: 1334, 1971.
- Spratt DI, O'dea LSL, Schoenfeld D, et al. Neuroendocrine-gonadal axis in men: frequent sampling of LH, FSH and testosterone. *Am J Physiol* 254: 658, 1988.
- Stappert J. Amplification of unknown flanking DNA by single-specific-primer PCR. En: PCR technology. Current Innovations. Griffin HG, Griffin AM. (eds). CRC press, USA. p. 29, 1994.
- Toublanc JE, Roger M, Chaussain JL. Etiologies of late puberty. *Horm Res* 36: 136, 1991.
- Turner RC, Bobrow LG, MacKinnon PCB, et al. Cryptorchidism in a family with Kallmann's syndrome. *Proc R Soc Med* 67: 33, 1974.
- Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Díaz-Sánchez V, et al. Self priming effect of LH/hCG upon the biphasic testicular response to exogenous hCG. I. Plasma testosterone profile. *J Clin Endocrinol Metab* 61: 926, 1985.
- Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, González A, et al. Changes in the responsiveness of luteinizing hormone secretion of the opioid antagonist naloxone throughout male sexual maturation. *Clin Endocrinol* 29: 17, 1988.
- Weiss J, Crowley WF Jr, Jameson JL. Normal structure of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene in patients with GnRH deficiency and idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 69: 299, 1989.
- Whitcomb RW, Crowley WF Jr, Male hypogonadotropic hypogonadism. *Endocrinol and Metab Clin NA* 22: 125, 1993.
- White B, Rogol AD, Brown KS, et al. The syndrome of anosmia with hypogonadism. A genetic study of 18 new families and a review. *Am J Med Genet* 15: 417, 1983.
- Wong C, Dowling CE, Saiki RK, et al. Characterization of β -thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* 330: 384, 1987.
- Wray S, Grant P, Bainer H. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Natl Acad Sci* 86: 8132, 1989.

Yang-Feng TL, Seeburg PH, Francke U. Human luteinizing hormone-releasing hormone gene (LHRH) is located on the short arm of chromosome 8 (region 8p11.2-p21). Somat Cell Mol Genet 12: 95, 1986.

Zimmermann K, Pischinger K, Mannhalter JW. Nested primer PCR detection limits of HIV-1 in a background of increasing numbers of lysed cells. BioTechniques 17: 18, 1994.

Zhang Y, McMahon R, Charles SJ, et al. Genetic mapping of the Kallmann syndrome and X linked ocular albinism gene loci. J Med Genet 30: 923, 1993.

Zhang X-Y, Ehrlich M. Detection and quantitation of low numbers of chromosomes containing *bcl-2* oncogene translocations using seminested PCR. BioTechniques 16: 502, 1994.

APENDICE I

Amortiguador de Amplificación 10X

Cloruro de potasio (KCl) 500 mM

Tris-Cloruro (Tris-Cl) 100 mM pH 8.3 a temperatura ambiente

Cloruro de Magnesio (MgCl₂) 15 mM

Gelatina al 0.1%

Etilendiaminotetracético disódico 0.5 M pH 8.0. (EDTA)

Dimetilsulfóxido (DMSO)

Cloruro de sodio 50 mM (NaCl)

Cloruro de sodio saturado (NaCl)

Amortiguador de Tris-HCl Tritón X-100 y Sacarosa (TTS)

Tris-HCl 10mM pH 7.4

Tritón X-100 1%

Sacarosa 300 mM

Amortiguador de Tris-EDTA (TE)

Tris-HCl 10 mM pH 8.0

EDTA 1mM pH 8.0

Sulfato dodecilico sódico al 10% (SDS)