



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité Académico de las Ciencias Médicas, del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, según acuerdo AA2(CM/SCA/SO/30/02) acordó designar y se formaliza por el Comité Académico del Programa, el jurado para el examen de grado de **Maestro en Ciencias**, (Plan 4006) del C. **Ernesto Sosa Eroza**, quien defenderá la tesis denominada "**Búsqueda de mutaciones del GEN del receptor de hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH) en adenomas hipofisarios productores de hormona de crecimiento (GH)**".

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
SUPLENTE
SUPLENTE

DR. FERNANDO LARREA GALLO
DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS
DR. MOISÉS MERCADO ATRI
DR. JUAN GARDUÑO ESPINOSA
DR. JUAN ANTONIO RULL RODRIGO

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria D. F., a 4 de septiembre de 2002.

DR. LUIS FELIPE ABREU H.
El Coordinador

LFAH/IST/ME/MK

NOTA: Por acuerdo del Subcomité Académico, la formalización de este Jurado de Examen de Grado, tiene una vigencia de 6 (seis) meses a partir de la fecha de aprobación del mismo. Excedido el tiempo, el alumno deberá someter a consideración del Subcomité Académico una nueva propuesta de jurado.

**TESIS CON
FALLA EN LA CALIFICACIÓN**

B

CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ANTECEDENTES	4
ONCOGÉNESIS ENDOCRINA	4
ONCOGÉNESIS DE LA ACROMEGALIA	8
ACROMEGALIA	12
JUSTIFICACIÓN	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
HIPÓTEIS	15
OBJETIVOS	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
GRUPOS DE COMPARACIÓN	17
TAMAÑO DE LA MUESTRA	18
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	18
PROCEDIMIENTOS	19
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	28
BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXOS	34

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Búsqueda de mutaciones en el gen del receptor de Hormona Liberadora de Hormona del Crecimiento (GHRH) en adenomas hipofisarios productores de Hormona del Crecimiento (GH).

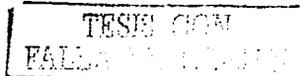
INTRODUCCIÓN. Una mutación activadora de la subunidad α de la proteína G asociada al receptor de GHRH ha sido implicada como la causa del 8 – 40% de los adenomas productores de GH con una gran variabilidad étnica. En los adenomas restantes la causa es desconocida. La ausencia de una explicación etiológica en los adenomas productores de GH gsp negativos ha enfocado la búsqueda hacia otros genes candidatos. La pérdida de la heterocigividad del cromosoma 11q 13, la hiperfunción de la vía de señalización de Pit-1 – CREB y los PTTG entre otros, han sido estudiados pero no se ha probado una asociación fuerte con la presencia de acromegalia. La proliferación de las células del somatotropo así como la producción y secreción de GH dependen de una regulación equilibrada de los péptidos hipotalámicos GHRH y SIRH. En analogía con otros tumores endocrinos autónomos (el receptor de TSH en adenomas tiroideos tóxicos), mutaciones del receptor de GHRH pueden dar origen a la activación constitutiva de las vías de señalización produciendo proliferación celular y secreción de GH autónomas. Hasta el momento no se han reportado consistentemente alteraciones génicas del gen del receptor GHRH, sin embargo este mecanismo patogénico permanece abierto.

OBJETIVO. Identificar alteraciones genéticas del gen del receptor de GHRH.

MATERIALES Y MÉTODOS. Se aisló DNA genómico de 44 adenomas productores de GH, 17 macroadenomas hipofisarios no funcionantes (MAHNF) y células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de 20 voluntarios sanos. Mediante PCR se amplificaron los exones 3, 7 y 13 del gen del receptor de GHRH y los productos obtenidos fueron secuenciados automáticamente.

RESULTADOS. No se encontraron mutaciones en los exones 3 y 7. Se encontró una mutación puntual en el exón 13 (**ATG422ACG**) que produce la sustitución de metionina por treonina en 24 de 44 somatotropinomas (54%), en 4 de 17 MAHNF (22%) y 8 de 20 (40%) de CMSP de los voluntarios sanos. La proporción de somatotropinomas con la mutación fue estadísticamente diferente de la de los MAHNF (p 0.028) pero no hubo diferencia con la de la CMSP (p 0.2). La presencia de esta mutación produce un OR de 3.5 (IC 95% 1.0-13.5) entre acromegalia y MAHNF y 1.0 (IC 95% 0.61-5.2) entre acromegalia y CMSP.

DISCUSIÓN. Varios estudios han descrito mutaciones en el receptor de GHRH pero en la mayoría de ellos no se ha probado una ganancia real de la función en la vía de señalización. La alta prevalencia de ATG422ACG en nuestros pacientes con somatotropinomas es llamativa, sin embargo, su descubrimiento en MAHNF y voluntarios sanos hace poco probable que constituya un mecanismo etiopatogénico importante aunque podría contribuir como un factor permisivo en el desarrollo de acromegalia.



ABSTRACT

Search for Mutations of the Growth Hormone (GH)-Releasing Hormone Receptor (GHRHR) Gene in GH-Secreting Pituitary Adenomas.

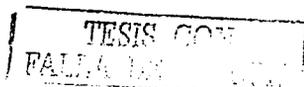
BACKGROUND. An activating mutation of the α subunit of the G protein-coupled GH-Releasing Hormone Receptor (GHRHR) has been implicated as the cause of 8 - 40% of GH-secreting adenomas with a remarkable ethnic variability. In the remaining adenomas the cause is still elusive. The lack of an etiologic explanation in gsp-negative GH-secreting adenomas has focused the search in other candidate genes. Loss of heterozygosity of chromosome 11q13, overfunction of the signaling pathway of Pit-1 - CREB and PTTG among others, have been studied, but a strong association with the presence of acromegaly has not been proven. Somatotrope cell proliferation as well as GH production and secretion depend on an equilibrated regulation of the hypothalamic peptides GHRH and SIRH. In analogy with others autonomous endocrine tumors (*v. gr.* TSH receptor in hyperfunctioning thyroid adenomas), mutations of the GHRHR could give rise to constitutive activation of the signaling pathways leading to autonomous GH production and cell proliferation of the somatotrope. No functionally significant genetic alterations of the GHRHR gene have been consistently found to date, although this pathogenic mechanism remains open.

OBJECTIVE. To identify genetic alterations of the GHRHR gene.

MATERIALS AND METHODS. Genomic DNA was isolated from 44 GH-secreting tumors, 17 Non-Functioning Pituitary Adenomas (NFPA) and Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) from 20 healthy volunteers. Exons 3, 7 and 13 of the GHRHR were amplified by PCR using specific primers and the products thus obtained were automatically sequenced.

RESULTS. No mutations were found in exons 3 and 7. A point mutation in exon 13 (**ATG422ACG**) leading to a Methionine for Threonine substitution was found in 24 out of 44 somatotropinomas (54%), but also in 4 out of 17 NFPA (22%) and 8 out of 20 (40%) of PBMC from healthy volunteers. The sequences showed that 25% (6/24) of somatotropinomas and NFPA (1/4), as well as 12.5% (1/8) of the PBMC had a homozygous pattern in the electrospherogram. The proportion of somatotropinomas harboring the mutation (54%) was statistically different from that of NFPA (22%) (p 0.028) but there was no difference with PBMC (40%) (p 0.2). The presence of this mutation leads to an OR of 3.5 (95% CI 1.0 - 13.5) among acromegaly and NFPA and 1.0 (95% CI 0.61 - 5.2) among acromegaly and PBMC.

DISCUSSION. Several studies have described mutations in the GHRHR but the biofunctional analysis have not proved an actual gain of function in the signaling pathway in most of them. The oncogenesis of acromegaly remains incompletely explained. In spite of well known pathogenic mechanisms, there is a myriad of cellular and molecular events waiting to be discovered. The high prevalence of **ATG422ACG** in our patients with somatotropinomas is striking, however, its finding in NFPA and healthy volunteers, makes it unlikely that it constitutes a major etiopathogenic mechanism, although it could contribute as a permissive factor in the development of acromegaly.



ANTECEDENTES

ONCOGÉNESIS ENDOCRINA.

Actualmente la patogénesis de la neoplasia endocrina está dominada por tres conceptos. El primero de estos conceptos parte del hecho de que todos los sistemas hormonales están regulados por mecanismos de retroalimentación, negativa o positiva, en éste se propone que los adenomas se originan como una consecuencia de la regulación fisiológica anormal (1,2,3). En el segundo se propone que los adenomas se originan por la activación de un oncogén o por la pérdida de la función de un gen supresor de tumores; y el tercer concepto argumenta que la estimulación anormal puede inducir desregulación genética o activar un oncogén (1,4).

Es muy probable que los factores que gobiernan la diferenciación celular en la hipófisis jueguen un papel importante en la determinación de la actividad hormonal y en la citodiferenciación de los adenomas hipofisarios. En la hipófisis, han sido identificadas diferentes proteínas reguladoras de la transcripción de diversos genes y han sido implicadas como elementos clave en la definición de los fenotipos celulares específicos y en la regulación de la expresión de genes codificadores de hormonas (5). El conocimiento de las vías de citodiferenciación hipofisaria (Figura 1) ha tenido avances recientes sobre todo con el advenimiento de la embriología molecular.

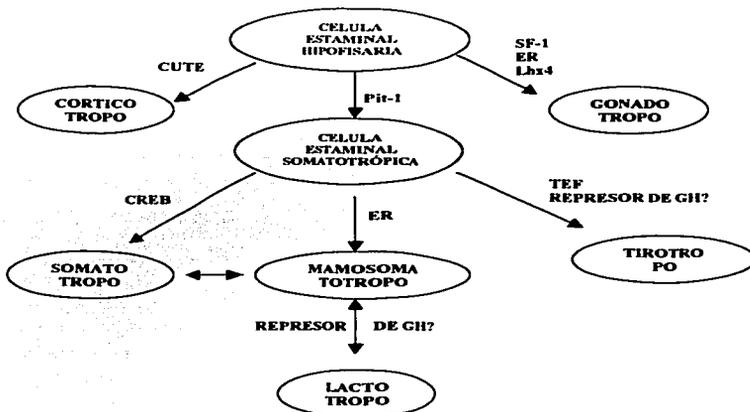
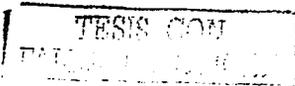


FIGURA 1. VÍAS DE CITODIFERENCIACIÓN



El desarrollo de neoplasias endocrinas requiere de todo un espectro de alteraciones genéticas sucesivas que van de la disregulación de la proliferación y diferenciación celulares, a la producción específica de hormonas. Estas alteraciones pueden ser mediadas a través de la activación de la función de un oncogén o por la inactivación de un gen supresor de tumores (6). Las mutaciones que resultan en aumento de la función son eventos **dominantes** y un solo alelo alterado provoca cambios fenotípicos, incluyendo transformación celular y secreción hormonal irrestricta (6). En contraste, las alteraciones de los genes supresores de tumores son **recesivas** y por lo tanto tienen que estar alterados ambos alelos para que se presente la proliferación celular anormal. Es aquí donde aplica la hipótesis del doble golpe (**two-hit**) propuesta por Knudson (6), en la que uno de los alelos presenta una mutación germinal congénita que no se expresa fenotípicamente hasta que se adquiere una pérdida alélica somática (Figura 2).

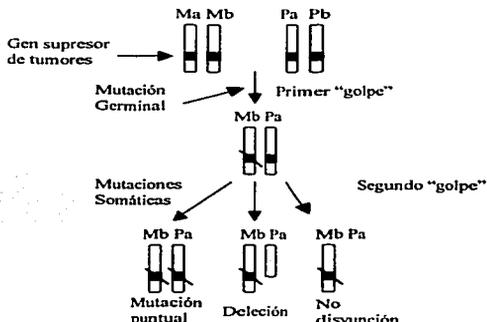
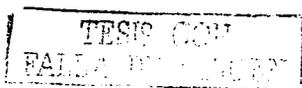


FIGURA 2. MODELO DE KNUDSON. Ma y Mb: Alelos maternos. Pa y Pb: Alelos paternos

Mutaciones Inactivadoras: La Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 1 (MEN 1) es una condición con patrón de herencia autosómico recesivo que se caracteriza por el desarrollo de neoplasias endocrinas principalmente en paratiroides, páncreas insular e hipófisis. El hiperparatiroidismo primario por hiperplasia o adenomatosis múltiple es la anomalía hormonal más frecuente, seguida por tumores endocrinos del páncreas (fundamentalmente gastrinomas e insulinomas) y adenomas hipofisarios. Los tumores del lactotrofo son los más

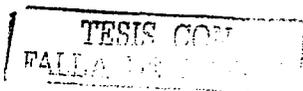


frecuentes, pero también hay familias con acromegalia y síndrome de Cushing hipofisario. Los mecanismos moleculares de la NEM-1 son complejos pero en la actualidad, el defecto se ha localizado al cromosoma 11q13, locus donde se encuentra un gen supresor de tumores que codifica una proteína recientemente denominada "menina" (6-9). Aunque se han buscado en forma intencionada, no se han encontrado mutaciones del gen de la menina en la acromegalia. En algunos casos de acromegalia familiar aislada se ha demostrado pérdida del estado heterocigoto del cromosoma 11q13, lo cual sugiere que algún gen supresor de tumores en esta región, diferente al gen de la menina, puede estar involucrado en la oncogénesis de estos tumores. En forma similar, se ha descrito en algunos casos, pérdida del estado heterocigoto de las regiones cromosómicas 13q y 9q21, que es donde se codifican las proteínas RB y P16, respectivamente, ambas involucradas en la regulación del ciclo celular (10,11). A pesar de todos estos resultados, no ha sido identificada en forma consistente la pérdida de la actividad de algún gen supresor de tumores en los adenomas hipofisarios esporádicos.

Mutaciones Activadoras: Se ha demostrado la presencia de mutaciones del gen *gsp-alfa*, que condicionan la activación constitutiva de la proteína G asociada al receptor de GHRH en la acromegalia. Esta mutación, explica, en el mejor de los casos, sólo el 40% de los tumores productores de GH. Recientemente se ha aislado el DNAC de un grupo de genes conocido como *gen transformador de tumor hipofisario* (PTTG) a partir de tumores hipofisarios de rata (9,12). Se ha comprobado *in vitro* que el producto proteico de este gen promueve la transformación tumoral (12). Hasta el momento se han descrito 5 genes, el primero de ellos, fue localizado en el cromosoma 5p33, que es conocido por su predisposición para el desarrollo de diversas neoplasias malignas (13). Existe una expresión concordante entre el PTTG y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), por lo que se ha propuesto que entre los dos integren un asa de regulación paracrina (12).

En el contexto de alteraciones genéticas que producen ganancia de función, se han descrito mutaciones puntuales en diferentes regiones de receptores que pertenecen a la misma familia del GHRHR, éstas condicionan activación constitutiva del receptor y eventualmente, formación de tumores. Así, existen mutaciones activadoras en el gen del receptor de TSH que causan adenomas tiroideos hiperfuncionantes (14-17), mutaciones en los genes de los receptores de FSH y LH como causa de pubertad precoz (18) y adenomas hiperfuncionantes de ovario y/o testículo (19,20). Experimentalmente, la inoculación de ratones con fibroblastos que poseen mutaciones activadoras del gen del receptor adrenérgico alfa1B induce transformación maligna (21).

Aunque en los ejemplos anteriores se ha observado una gran diversidad en los sitios de las mutaciones que producen ganancia de función, parece ser que los sitios de la molécula más frecuentemente alterados son la región extracelular, la tercera asa intracelular y el quinto y sexto dominios transmembrana (22). Estos sitios de la molécula de los receptores acoplados a



extracelular, la tercera asa intracelular y el quinto y sexto dominios transmembrana (22). Estos sitios de la molécula de los receptores acoplados a proteínas G, son importantes debido a su interacción con el ligando y la proteína G asociada (22).

Múltiples mecanismos participan en los complejos eventos que culminan en la formación de un adenoma hipofisario; éstos incluyen mutaciones tempranas que probablemente causen la pérdida de la inhibición del crecimiento de células hipofisarias estaminales, mutaciones activadoras que ocurren cerca de los factores de crecimiento y expansión clonal sujeta al estímulo de diversos factores permisivos (6) (Figura 3).

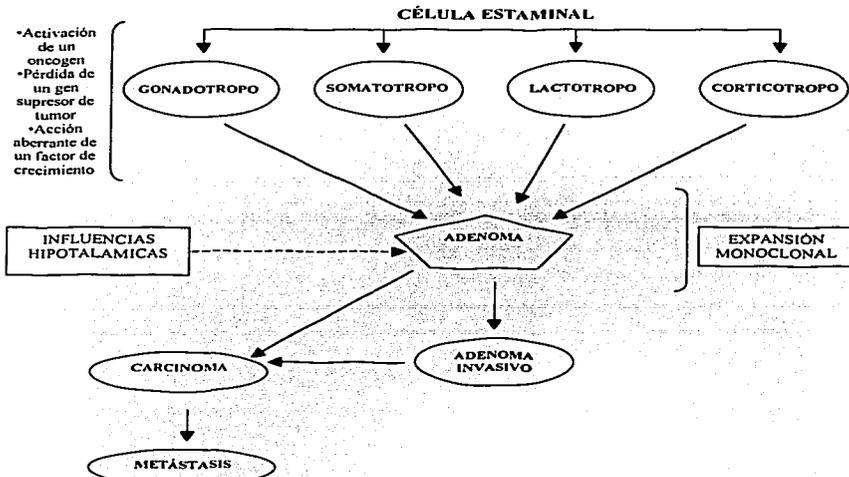


FIGURA 3. CASCADA DE EVENTOS ENVUELTOS EN LA GÉNESIS TUMORAL HIPOFISARIA

ONCOGÉNESIS DE LA ACROMEGALIA

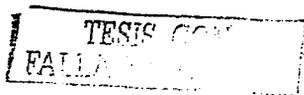
Para el caso particular de la patogénesis de tumores hipofisarios productores de GH que causan acromegalia, los estudios dirigidos a encontrar alteraciones genéticas han resultado en la descripción de las mutaciones del gen de la menina en el cromosoma 11q13 en acromegalia relacionada con NEM 1 (7,8), mutaciones activadoras del oncogén gsp-alfa en diversas poblaciones (6,23-28), alteraciones en la señalización del CREB-Pit-1 y más recientemente el PTTG (12).

En un número variable de tumores productores de GH se han encontrado mutaciones en la proteína G (gen gsp- α). La prevalencia de estas mutaciones en pacientes acromegálicos es de hasta un 40% en poblaciones caucásicas (25). Las mutaciones del gen gsp-alfa son infrecuentes en pacientes acromegálicos japoneses (4-9%) (26,27), mientras que investigadores coreanos han encontrado estas mutaciones hasta en un 50% de sus pacientes (28). Recientemente, nuestro grupo ha estudiado la prevalencia de las mutaciones del gen gsp- α la población mestiza mexicana. Nuestros resultados muestran una prevalencia de 28% en esta población, de forma interesante, no se demostró ninguna relación entre la presencia de mutaciones y el comportamiento clínico o biológico de los adenomas (29).

Además del anteriormente descrito PTTG, se ha propuesto que puede existir una alteración en la fosforilación de la unidad de señalización del CREB y el Pit-1 (5), como lo sugiere la fosforilación excesiva de los residuos de serina en el CREB observada en una subpoblación de somatotropinomas (6).

Los polipéptidos inhibidores y liberadores del hipotálamo regulan selectivamente la expresión genética y la secreción de las hormonas hipofisarias. Ya que ha sido demostrado que la GHRH aumenta la síntesis de DNA en el somatotropo y que los ratones transgénicos para GHRH también desarrollan hiperplasia del somatotropo y finalmente adenomas (30), es probable que las acciones paracrina o endocrina alteradas de GHRH sean permisivas para el crecimiento tumoral en la hipófisis. Estos adenomas hipofisarios se originan a partir de la expansión clonal de células diferenciadas capaces de secretar los productos del gen de GH. Desde el punto de vista celular, estos tumores provienen de células del somatotropo, mamosomatotropo (productoras de GH y PRL) o células estaminales acidofílicas más primitivas. Sin importar su origen celular, la transformación y la replicación subsecuente de éstas, resulta tanto en formación de adenoma como en secreción irrestricta de GH (6).

En condiciones normales, la secreción de GH por las células somatotrópicas de la hipófisis anterior está regulada por el influjo de factores hipotalámicos y la retroalimentación negativa de IGF-I. La GHRH hipotalámica es un estimulador pulsátil de la GH, mientras que la somatostatina (SRIH), ejerce una acción inhibitoria de tipo tónico (30). Más recientemente se ha identificado a la "ghrelina", que es ligando endógeno para un receptor llamado



ejerce una acción inhibitoria de tipo tónico (30). Más recientemente se ha identificado a la "ghrelina", que es ligando endógeno para un receptor llamado *secretagogo de GH* (GHS-R), que también forma parte de las asas de regulación (31). La GHRH interactúa con un receptor de membrana específico en las células somatotrópicas, lo cual resulta en un aumento de los niveles de AMPc, promoviendo la expresión del gen de GH y estimulando la proliferación de las células somatotrópicas (32,33). El GHRH es un receptor cuya estructura cruza siete veces la membrana celular y se encuentra asociado a proteínas Gs (34,35). La identificación molecular de este receptor se concluyó en 1992 (35). A partir del estudio de tejido hipofisario de tumores productores de GH, se consiguió aislar un cDNA con una extensión total de 1269 pares de bases (bp). La extensión total de los 1269 bp codifica para una proteína de 423 aminoácidos con un peso molecular de 47,402 daltons (36). Un perfil hidropático de esta proteína confirmó su asociación a proteínas G y también la presencia de 7 regiones hidrofóbicas que corresponden a los dominios transmembrana, así como un probable péptido señal en la región amino terminal (36). Existe la posibilidad que los aminoácidos 50 - 52 (Asn-Thr-Thr) correspondan a un sitio de glucosilación (36). La proteína obtenida tiene una relación estructural importante con los receptores de VIP y secretina, seguido por los de parathormona (PTH) y calcitonina (homología de 387, 388, 262 y 367 aminoácidos respectivamente) (36). Los receptores para GHRH clonados en ratas y en humanos, tienen una importante homología, lo cual demuestra la conservación evolutiva de esta proteína y su importancia filogenética, sobretudo en los dominios transmembrana 1, 2, 5, 6 y 7, así como en la región amino terminal rica en residuos de cisteína (35). Esta región probablemente represente el dominio de unión con el ligando y se presenta de forma similar con 6 residuos de cisteína conservados en los receptores de secretina y VIP. Figura 4.

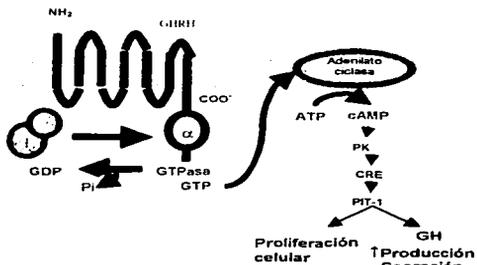
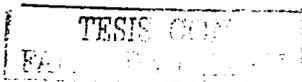


FIGURA 4 Esquema general de receptores heptahélicos.

Los defectos en la señalización dependiente de GHRH podrían jugar un papel en algunas de las alteraciones del crecimiento. El modelo murino de enanismo conocido como "little mouse" y el síndrome caracterizado en 1998 como el "Enanismo de Sindh" son ejemplos de esta clase de alteraciones (36,37). En estas condiciones se han demostrado mutaciones del gen de GHRHR que resultan en una molécula trunca que no produce señalización intracelular y bloquea la respuesta a la estimulación con análogos de GHRH (36,37).

De la misma forma que existen mutaciones activadoras de diferentes receptores pertenecientes a la familia del GHRHR que resultan en ganancia de la función y posiblemente en desarrollo de adenomas (14-21 y 38-41), es probable que también existan alteraciones de la señalización del GHRHR que tengan un papel en el desarrollo de adenomas hipofisarios, ya que la actividad y proliferación de las células del somatotropo son controladas, en parte, por GHRH (32,33).

Existe información limitada y controvertida con respecto a las alteraciones del GHRHR en pacientes acromegálicos. En un reporte en el que se estudió el mRNA del gen de GHRHR en 16 adenomas hipofisarios y 2 hipófisis normales (42) usando hibridación *in situ*, se encontró que éste se localiza específicamente en el somatotropo de la hipófisis normal y que todos los tumores productores de GH provenientes de pacientes acromegálicos presentaban regulación a la alta (up-regulation) del mRNA de GHRHR en comparación con las hipófisis normales (42). Recientemente, Petersen y cols. (43), describieron dos mutaciones puntuales del gen de GHRH-R en 3 de 15 tumores hipofisarios productores de GH. Utilizando análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP), estos investigadores encontraron diferencias de una base en el cDNA de 3 tumores. La secuenciación de los productos amplificados por RT-PCR reveló la presencia de 2 mutaciones puntuales. La primera de estas mutaciones (G169A), cambia Alanina por Treonina en la posición 57, cerca del extremo amino (extracelular) del GHRH-R. La segunda mutación, encontrada en dos tumores (T1265C), cambia Metionina por Treonina en la posición 422, en el extremo carboxilo (intracelular). La expresión *in vitro* de estas mutaciones parece conferir una respuesta incrementada de cAMP a la estimulación con GHRH, pero solamente la mutación localizada en el extremo carboxilo parece producir niveles basales elevados de cAMP, lo que se interpreta como activación constitutiva del receptor. Estos resultados hacen pensar que la mutación en el extremo amino es un polimorfismo, ya que esta sustitución había sido previamente descrita en sujetos con deficiencia de GH. Este trabajo dió origen a uno más en el cual se buscó intencionadamente el cambio G169A (Alanina57Treonina) en 5 somatotropinomas (44), mediante amplificación del exón 3 del gen del GHRH-R y secuenciación directa. El cambio fue encontrado en 2 de ellos y al evaluar la producción *in vitro* de cAMP, se encontró una elevación de entre 40 y 200 veces mayor que en los tumores control.



En contraste, Salvatori *et al* estudiaron los 13 exones del gen del receptor de GHRH en 26 somatotropinomas mediante Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE) y no encontraron ninguna alteración (45). Una colaboración estadounidense y coreana (46), reportó 12 cambios puntuales en la secuencia del gen al estudiar un grupo de 54 somatotropinomas mediante secuenciación directa; 4 de los tumores alterados presentó el cambio G169A antes mencionado, pero no encontraron el cambio en la posición 422. El estudio biofuncional en células transfectadas transitoriamente, reportó que la afinidad por el ligando y la producción de cAMP no eran diferentes a las encontradas en células que expresan el receptor silvestre, por lo tanto, no fue posible establecer que alguna de estas alteraciones genéticas producen un aumento en la actividad biológica o en la señalización del receptor. Figura 5.

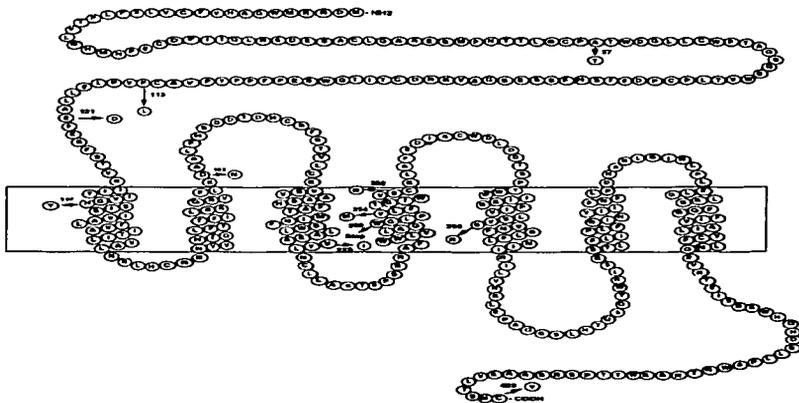
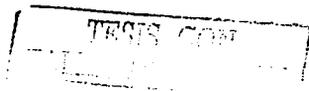


FIGURA 5. Cambios puntuales encontrados en el gen de GHRH-R (46)



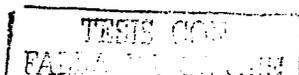
<u>Nucleótido</u>	<u>Aminoácid</u>	<u>Posición</u>	<u>N</u>
169, G>A	A57T	EC	4
338, C>T	P113L	EC	1
363, G>T	E121D	EC	2
409, C>T	H137Y	TM(1)	1
547, G>A	D183N	Asa EC(1)	1
673, G>A	V225I	TM(3)	2
749, G>A	W250stop	TM(4)	1
760, G>A	V254M	TM(4)	1
785, G>A	S262N	TM(4)	1
880, G>A	G294S	TM(5)	1
1268, G>A	C423Y	IC	1

TABLA 1. Cambios puntuales encontrados en el gen de GHRH-R (46)

Hasta el momento actual los datos referentes a alteraciones genéticas del receptor de GHRH son controvertidos y la idea inicial de que una mutación podría resultar en una activación constitutiva del receptor y de esta forma el gen del receptor de GHRH podría considerarse como un "oncogén", no ha podido ser sustentada. Los resultados más consistentes en los trabajos mencionados dirigen la atención hacia tres puntos específicos del gen del receptor de GHRH: en todos los trabajos han sido encontrados cambios puntuales en los exones 3, 7 y 13 de este gen que desde el punto biológico son importantes, ya que constituyen las porciones extracelular, cuarta asa transmembrana e intracelular de la cadena polipeptídica del receptor respectivamente y tienen relación con los sitios de unión al ligando y a la proteína G asociada.

ACROMEGALIA.

La acromegalia es una enfermedad rara (aproximadamente 8 casos por millón de habitantes) que se produce casi siempre (>95%) como resultado de un tumor hipofisario productor de hormona de crecimiento (GH). Cuando esto ocurre después de la pubertad, situación en la que las epífisis óseas se han cerrado y ya no es posible un mayor crecimiento longitudinal del hueso, las principales características clínicas son crecimiento visceral y de tejidos blandos por otra parte, si la hipersecreción de GH ocurre antes de que los cartílagos de crecimiento se cierren, entonces se produce un estado patológico conocido



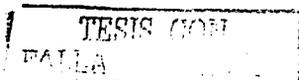
como gigantismo. Lo anterior produce un fenotipo característico, así como todas las alteraciones metabólicas propias de la condición de hormona contrarreguladora que posee la GH (47-49).

El Servicio de Endocrinología del Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda" del CMN SXXI es el principal sitio de referencia de los pacientes acromegálicos derechohabientes al Instituto Mexicano del Seguro Social. De 1995 hasta el primer semestre del año 2001, se han registrado más de 120 pacientes y casi todos son objeto de seguimiento y evaluación periódicos. Se presenta aproximadamente un paciente nuevo cada mes. El 65% de estos pacientes se ha presentado con un tumor hipofisario mayor de 1 cm de diámetro y la ruta crítica que se ha establecido para su diagnóstico, tratamiento y seguimiento es la siguiente:

El diagnóstico bioquímico se establece mediante la falta de supresión de GH después de una carga oral de 75 g de glucosa (normal <1 ng/mL) (49), así como niveles elevados de factor de crecimiento insulinoide de tipo I (IGF-I) ajustados para edad y sexo (50). La resonancia magnética nuclear y/o tomografía computarizada completan el estudio de imagen (51) y una campimetría computarizada valora las alteraciones estructurales ocasionadas por compresión quiasmática. Además, se evalúan las hormonas hipofisarias para conocer la reserva hipofisaria y las deficiencias hormonales asociadas para lograr una adecuada sustitución (52).

Una vez establecido el diagnóstico se comienza tratamiento médico con inyecciones subcutáneas del análogo de somatostatina, octreótido (53,54). Se ha demostrado que hasta el 70% de los pacientes presenta mejoría en lo que respecta a la disminución de los niveles de GH y de IGF-I y en menor grado a disminución del tamaño tumoral (54), hasta que se realiza la neurocirugía (la mayoría de las veces por abordaje transesfenoidal), aproximadamente 2 meses después.

El seguimiento postoperatorio se realiza mediante curvas de supresión de GH con 75 g de glucosa oral al primero, tercer y sexto meses así como IGF-I, evaluación clínica y resonancia magnética nuclear para definir la curación desde los puntos de vista clínico, por imagen y bioquímico. Tomando en cuenta los criterios de curación de acuerdo a la sensibilidad y especificidad el ensayo para GH con el que se cuenta en nuestro laboratorio de hormonas (supresión a <1 ng/mL) y normalización del IGF-I, se ha conseguido la curación en aproximadamente 50% de nuestros pacientes, 34% persiste con actividad bioquímica y el 16% restante muestra discrepancia con los criterios de curación (55).



JUSTIFICACIÓN

1. La oncogénesis de los tumores endocrinos en general y de los tumores hipofisarios en particular es compleja. Hasta el momento se han descrito varias alteraciones genéticas que individualmente explican la génesis de estos tumores de forma incompleta y no en todos los pacientes, de esta manera, el evento fundamental sigue siendo ignorado.
2. Debido a la importancia que tiene la señalización de GHRH en la secreción de GH y la proliferación del somatotropo, consideramos indispensable el estudio sistemático de la presencia de mutaciones del gen del receptor de GHRH que pudieran resultar en aumento de la producción de GH y proliferación del somatotropo.
3. Tomando en cuenta que se han descrito mutaciones puntuales en receptores de la misma familia que el GHRHR que condicionan activación constitutiva de los mismos y eventualmente la formación de tumores, consideramos que la identificación de mutaciones de GHRHR sentaría la base para que estudios posteriores confirmaran esta ganancia de la función y se estableciera de forma más firme su papel causal.

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. ¿Existen mutaciones en los exones 3, 7 y 13 del gen del Receptor de Hormona Liberadora de Hormona del Crecimiento (GHRHR) en adenomas hipofisarios productores de GH en una muestra de los pacientes atendidos en el Hospital de Especialidades del CMN SXXI del IMSS?
2. ¿Cuál es la asociación entre la presencia de estas mutaciones y la presencia de adenomas hipofisarios productores de GH?

HIPÓTESIS

1. Los adenomas hipofisarios productores de GH tienen mutaciones en los exones 3, 7 y 13 del gen de GHRHR en una mayor proporción que los adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes y que los leucocitos de sangre periférica obtenidos de sujetos sanos.
2. Las mutaciones en el gen de GHRHR están asociadas con la presencia de adenomas hipofisarios productores de GH.

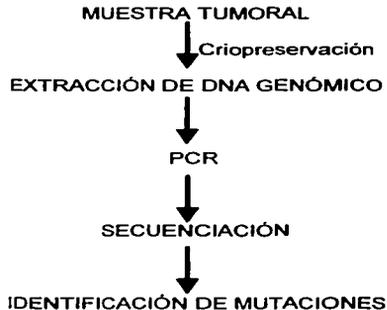
OBJETIVOS

1. Identificar, cambios en la secuencia genética conocida de los exones 3, 7 y 13 del gen del GHRHR en los tumores de pacientes acromegálicos con adenoma hipofisario productor de GH.
2. En caso de encontrarse algún cambio de la secuencia genética de los exones 3, 7 y 13 del gen de GHRH-R, se buscará intencionadamente ese mismo cambio en tumores clínicamente no funcionantes, así como en células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos.
3. Calcular la fuerza de asociación entre mutaciones en el gen de GHRHR y adenomas hipofisarios productores de GH.

TESIS CON
FALLA DE CALIDAD

MATERIAL Y MÉTODOS

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO



TIPO DE ESTUDIO

Básico. Transversal Comparativo.

UNIVERSO DE TRABAJO

LUGAR: Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Departamento Clínico de Endocrinología y Unidad de Investigación Médica en Endocrinología Experimental.

POBLACIÓN: Pacientes con diagnóstico clínico, bioquímico y de imagen de tumor productor de GH en el grupo de estudio.

GRUPO DE ESTUDIO:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Fragmentos de adenomas hipofisarios productores de GH obtenidos mediante cirugía. Con diagnóstico corroborado por histopatología e Inmunohistoquímica

CRITERIOS DE NO-INCLUSIÓN:

Tratamiento previo con radioterapia.

GRUPOS DE COMPARACIÓN:

Macroadenomas Hipofisarios Clínicamente no Funcionantes

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Fragmentos de adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes obtenidos mediante cirugía.

CRITERIOS DE NO-INCLUSIÓN:

Tratamiento previo con radioterapia.

Sujetos Sanos

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Cualquier género

Mayores de 18 años

Sin antecedente personal ni familiar de Acromegalia, Gigantismo, Enanismo de cualquier tipo o alguna otra enfermedad hipotálamo hipofisaria.

Aceptación y firma de la carta de consentimiento informado (Anexo 1)

VARIABLE DE DESENLACE

Adenoma Hipofisario Productor de GH

Definición Operativa: Tumor hipofisario obtenido quirúrgicamente de un paciente acromegálico con confirmación histológica e inmunohistoquímica de producción de GH.

Escala de medición: nominal, dicotómica.

Categoría: presente, ausente.

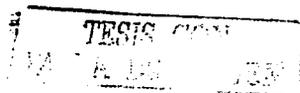
VARIABLE PREDICTORA

Mutaciones del Receptor de Hormona Liberadora de Hormona del Crecimiento (GHRHR).

Definición Operativa: Cuando el resultado de la secuenciación de los productos obtenidos de PCR sea diferente a la secuencia de bases conocida para el gen de GHRHR.

Escala de medición: nominal dicotómica. Dependiendo de los resultados observados, esta variable puede ser categórica, ya que es probable encontrar más de una mutación en un mismo exón o en exones diferentes. En caso de identificarse más de una mutación, no existirá ninguna diferencia metodológica entre una y otra y para efecto de análisis de riesgos, serán evaluadas como dicotómicas.

Categoría: presente, ausente.



TAMAÑO DE LA MUESTRA:

El diseño del protocolo permite decidir el número de sujetos de estudio sin calcular el tamaño de la muestra. Sin embargo, el siguiente ejercicio metodológico pretende establecer un tamaño aproximado de la misma.

No existen suficientes datos para establecer la diferencia en la proporción esperada de mutaciones en el grupo de estudio y los grupos de comparación. Los reportes previos describen prevalencias de 20% (43), 40%(44), 0%(45) y 22%(46) en adenomas productores de GH y 7.5%(46) en sujetos sanos. Las prevalencias mencionadas no corresponden a una sola mutación, sino a diferentes cambios puntuales en la secuencia del gen de GHRH-R, así que solamente podemos tomarlas como una referencia aproximada para la proporción que probablemente encontraremos. Para fines prácticos, la información limitada y contradictoria no permite establecer un tamaño preciso del efecto. La media ponderada de las prevalencias en los estudios reportados es 17% y el único dato de sujetos sanos con el que contamos es 7.5% (46), así que la diferencia esperada es 44%.

Para encontrar una diferencia de proporciones entre 2 grupos con un valor α de 0.05 y β de 0.20, se requieren 18 sujetos por grupo. Para la evaluación de riesgo, se construyeron diferentes tablas de contingencia hipotéticas basadas en los reportes previos para obtener una Razón de Prevalencias de 3.0, con las cuales se obtuvo el aproximado de 20 sujetos por grupo.

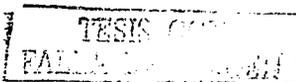
Se incluyeron en el estudio los tejidos obtenidos por muestreo no probabilístico de casos consecutivos durante el periodo comprendido entre julio de 1999 y septiembre de 2001.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se presentan los resultados con estadística descriptiva apropiada. Por medio de Chi cuadrada se analiza la diferencia de proporciones entre el grupo de estudio y cada uno de los grupos de comparación (por separado). El análisis de riesgo se realiza por medio del cálculo de Razón de Prevalencias con Intervalos de Confianza del 95% con tablas de 2 X 2 construidas con los datos obtenidos del grupo de estudio y cada uno (por separado) de los grupos de comparación.

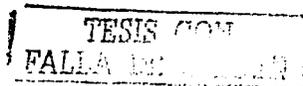
ASPECTOS ÉTICOS:

La realización del estudio no significó ningún riesgo para el paciente, ya que no se realizaron procedimientos adicionales o diferentes a los recomendados para el estudio y tratamiento de la acromegalia ni de los adenomas clínicamente no funcionantes.



PROCEDIMIENTOS:

- 1. Obtención del Material Biológico.** El servicio de Neurocirugía del HE CMN SXXI programa la fecha quirúrgica de los pacientes, el día de la intervención, nos proporcionan un fragmento macroscópicamente representativo del tumor, el cual es congelado por inmersión en nitrógeno líquido y criopreservado en un congelador a -70°C hasta el momento de su procesamiento. Cabe señalar que la pieza completa, de la cual fue extraído el fragmento, es estudiada mediante microscopía de luz, inmunohistoquímica y en algunos casos microscopía electrónica en el servicio de Patología de la misma Unidad para confirmar la línea celular y producción hormonal.
- 2. Extracción de DNA Genómico:** Todos los fragmentos fueron sometidos a una técnica estándar de extracción de DNA genómico descrita en el Anexo 2.
- 3. Amplificación:** Mediante PCR se amplificaron los exones 3, 7 y 13 del gen de GHRH-R en cada una de las muestras de DNA genómico obtenidas. Los Primers, temperatura de alineamiento (TM), tamaño esperado del producto y condiciones técnicas del protocolo de PCR se detallan en el Anexo 3.
- 4. Secuenciación:** Los productos de PCR se secuenciaron de forma automatizada, los resultados de la secuenciación se compararon con la secuencia genómica conocida para identificar cambios. Anexo 4.



RESULTADOS

Durante el periodo destinado a la recolección de material biológico, se obtuvieron 44 fragmentos de adenomas hipofisarios productores de Hormona del Crecimiento, 17 fragmentos de adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes y muestras de sangre periférica de 20 sujetos sanos. Todas estas muestras fueron sometidas a la técnica descrita (anexo 1) de extracción de DNA genómico, obteniendo diferentes concentraciones del mismo, que variaron entre 75 y 300 ng/ μ L. En la figura 6 se muestra un gel con el DNA genómico extraído de adenomas productores de GH.

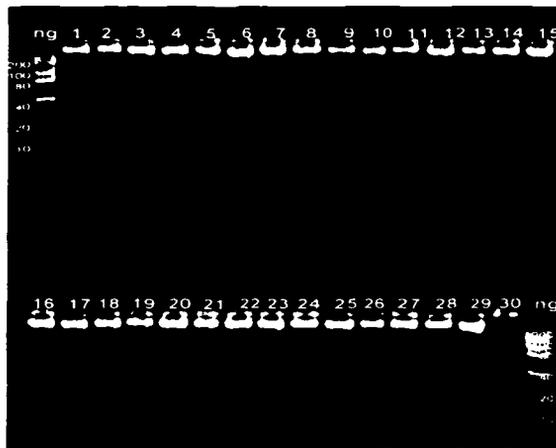


FIGURA 6. DNA genómico extraído de adenomas Productores de GH.

Ocupando una cantidad de entre 100 y 300 ng de DNA genómico, se amplificaron los exones 3, 7 y 13 del gen del receptor de GHRH de todos los somatotropinomas, los adenomas hipofisarios no funcionantes y las células mononucleares de sangre periférica de los sujetos sanos. La figura 7 muestra los productos de PCR correspondientes a los exones 3, 7 y 13 del gen de GHRH-R obtenidos con el DNA genómico extraído de un fragmento de adenoma hipofisario productor de GH.

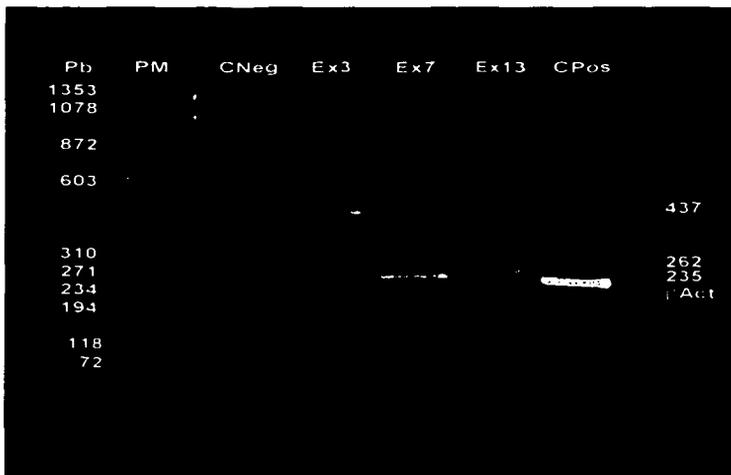
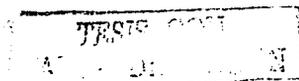


FIGURA 7. Productos de PCR de los exones 3, 7 y 13 del gen del receptor de GHRH. Pb=número de pares de bases; PM= marcador de peso molecular; CNeg= Control Negativo; CPos= Control Positivo, Beta-Actina.



Se realizó por medio de un método estándar la secuenciación directa de los exones 3, 7 y 13 del gen de GHRHR de todos los fragmentos obtenidos de adenomas hipofisarios productores de GH. En el exón 3 no se encontró ningún cambio con respecto a la secuencia conocida. La figura 8 muestra el fragmento de la secuencia obtenida en la que previamente se había encontrado el cambio GCG57ACG (43, 44, 46) que en todas nuestras muestras fue normal.

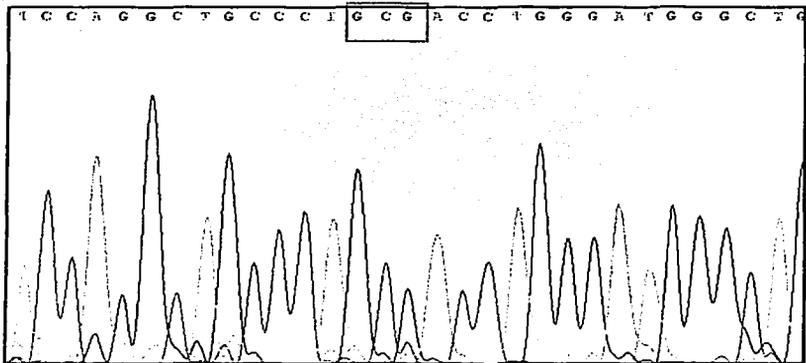


FIGURA 8. Fragmento de la secuencia normal del Exón 3 del gen del receptor de GHRHR obtenida de un adenoma hipofisarios productor de GH. En el recuadro se encuentra marcado el codón 57.

La secuenciación directa del exón 7 se realizó también en todos los somatotropinomas. Ninguna diferencia con la secuencia conocida fue encontrada. Figuras 9 y 10.

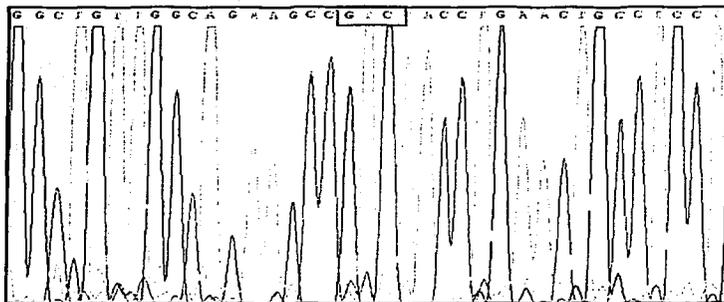


FIGURA 9. Fragmento de la secuencia del exón 7 del gen del GHRHR. En el recuadro se muestra el codón 225, previamente reportado como sitio de un cambio puntual (GTC225ATC) (45, 46), pero en todas nuestras muestras fue normal.

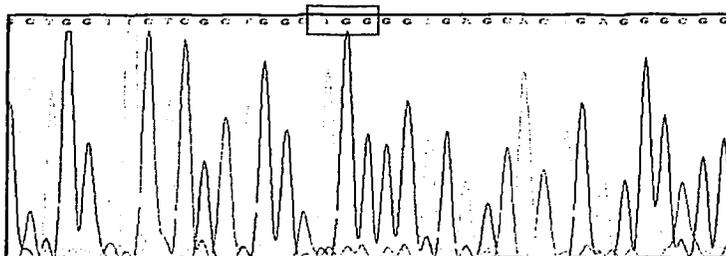


FIGURA 10. Fragmento de la secuencia del exón 7 del gen del GHRHR. En el recuadro se muestra el codón 250, previamente reportado como sitio de un cambio puntual (TGG250TAG) (46), pero en todas nuestras muestras fue normal.

RECEIVED
FEB 19 1991

En el exón 13 se han reportado dos cambios puntuales diferentes: ATG422ACG (43) y TGC423TAC (46) (Figura 11).

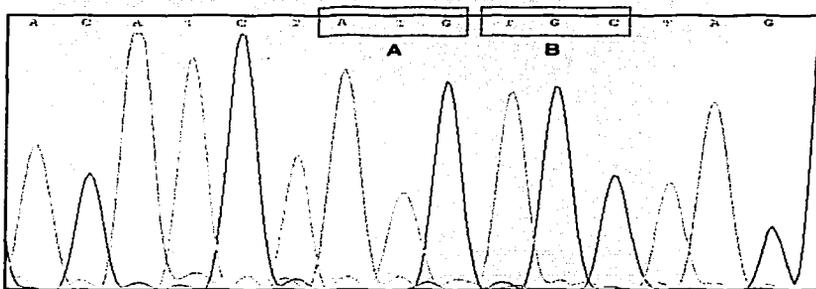


FIGURA 11. Fragmento de la secuencia normal del exón 13. **A** muestra el codón 422, sitio identificado de cambio puntual previamente (43); **B** muestra el codón 423, sitio identificado de cambio puntual previamente (46).

RECIBO
LABORATORIO
GENÉTICA

La secuenciación directa del exón 13 del gen de GHRHR dio como resultado el hallazgo de un cambio puntual en el codón 422. Este cambio (ATG422ACG) produce la sustitución del aminoácido metionina por treonina en la penúltima posición de la cadena polipeptídica, localizada en el extremo intracelular del receptor. El cambio puntual ATG422ACG fue encontrado en 24 de los 44 somatotropinomas (54%) (Figura 12).

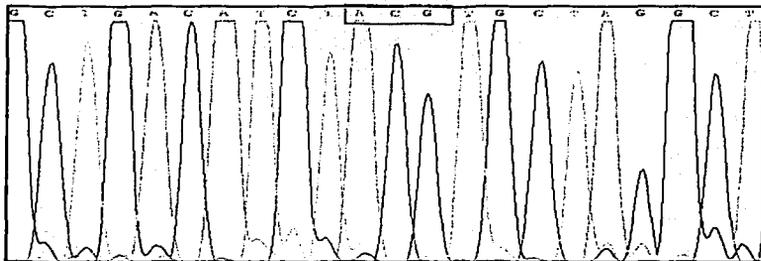
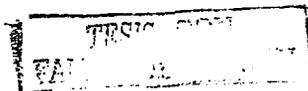


FIGURA 12. Fragmento de la secuencia del exón 13. El recuadro muestra el codón 422, sitio en el que fue encontrado el cambio puntual ATG422ACG en 24 de 44 somatotropinomas.

El electroferograma obtenido por secuenciación automatizada no es un método preciso para establecer si una alteración genética es homocigota o heterocigota, sin embargo, la pureza de la señal permite hacer suposiciones sobre este estado. Para describir mejor nuestros resultados, a partir de este momento llamaremos *homocigoto* al cambio puntual que se aprecie como una señal única en el electroesferograma y *heterocigoto* si aparecen en la misma posición las señales de dos nucleótidos. De los 24 tumores en los que identificó el cambio ATG422ACG, 18 (75%) fueron heterocigotos y 6 (25%) homocigotos. Figura 13.



EXON 13
CODON
422

A
ATG

B
T C
A C G

C
ACG

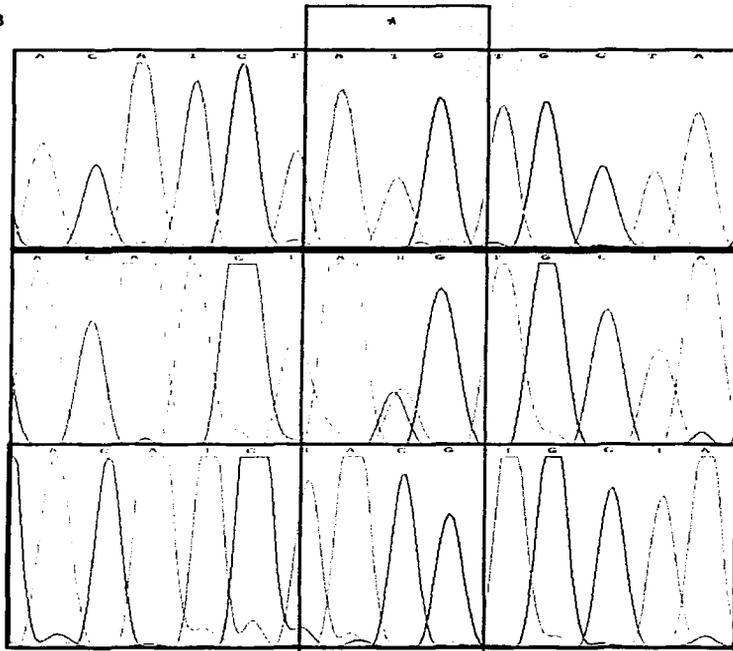
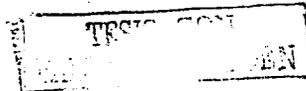


FIGURA 13. Panorama comparativo de un fragmento de la secuencia del exon 13. El recuadro muestra el codón 422 y el asterisco el nucleótido que fue diferente en nuestras muestras. En el PANEL A se muestra la secuencia normal (WT). El PANEL B presenta el esferograma con una doble señal (T y C), por lo que se considera como heterocigoto, 18 de los 24 somatotropinomas con alteración



En la secuenciación directa de los 17 adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes se identificó el mismo cambio ATG422ACG en 4 muestras (22%), una de ellas presentó el patrón homocigoto. El estudio del DNA genómico extraído de células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos, mostró que 8 de las 20 muestras (40%) presentan el mismo cambio puntual y sólo una de ellas con patrón homocigoto.

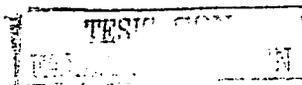
La proporción de tejidos con el cambio ATG422ACT fue significativamente mayor en el grupo de Acromegalia ($p = 0.028$) que en el grupo de adenomas hipofisarios no funcionantes. Sin embargo al comparar la proporción encontrada en el grupo de Acromegalia con el grupo de sujetos sanos, no hubo diferencia significativa ($p = 0.209$). El análisis de riesgo se muestra en las tablas 2 y 3.

TABLA 2.

	ACROMEGALIA	MAHNF	SANOS	Total
ATG422ACG	24	4	8	36
ausente	20	13	12	45
Total	44	17	20	81

TABLA 3. Asociación entre la presencia del cambio ATG422ACG Y Acromegalia.

	Razón de Prevalencias	IC (95%)	P
Acromegalia/ MAHNF	3.5	1.0 – 13.8	0.028
Acromegalia/ Sanos	1.6	0.61 – 5.2	0.2

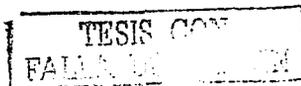


DISCUSIÓN.

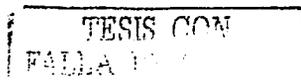
La producción normal de Hormona de Crecimiento depende de la correcta señalización intracelular de GHRH al unirse a su receptor específico en las células del somatotropo. En esta sútil interacción hormona-receptor ocurre una secuencia de eventos que involucra a la cadena polipeptídica del receptor *per se* y a la proteína G asociada a éste. Existe suficiente evidencia experimental para afirmar que mutaciones en la subunidad α de la proteína G producen activación constitutiva del receptor en entidades clínicas como el Síndrome de McCune Albright y algunos casos de Acromegalia aislada. Tomando en cuenta la importancia funcional que el receptor heptahélico tiene en la señalización, se ha generado información acerca de la participación etiológica de alteraciones en los genes que codifican para estas proteínas. En la actualidad se han identificado situaciones como el nódulo tiroideo tóxico, el bocio multinodular tóxico y algunos estados de hiperfunción gonadal en las que mutaciones puntuales que resultan en el cambio de un aminoácido en la cadena polipeptídica producen una activación constitutiva de la vía de señalización. Estos dos hechos, la importancia funcional por un lado y el antecedente de alteraciones semejantes en otras enfermedades, han apoyado la búsqueda de alteraciones en el gen del receptor de GHRH en Acromegalia.

Estudios han reportado mutaciones puntuales en diferentes sitios de la cadena polipeptídica del GHRH-R, sin embargo existe gran diferencia en la proporción de somatotropinomas con este tipo de alteraciones y la localización de ellas, pero el dato presente en casi todos los estudios es la ausencia de hiperfunción en las células que expresan la proteína alterada. La mutación descrita por Peterssen y cols., en el año 2000 que cambia un aminoácido en la posición 422 del receptor de GHRH constituye una excepción a lo anterior. El estudio funcional realizado por ese grupo, demostró un aumento en las concentraciones de cAMP tanto basales como estimuladas por GHRH. Es cierto que en ese estudio la cantidad de somatotropinomas estudiados fue pequeña, pero realizaron una comprobación experimental del aumento de la función. Ningún otro grupo había reportado la misma mutación hasta el momento. Nosotros encontramos una proporción muy alta de este cambio puntual en nuestro grupo de somatotropinomas, pero también fue encontrado muy frecuentemente en sujetos sanos. Al realizar el análisis de riesgo entre Acromegalia y adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes, obtuvimos una razón de prevalencias de 3.5 con un intervalo de confianza muy amplio (1.0-12.6); al analizar los grupos de Acromegalia y sujetos sanos, el riesgo no tuvo significancia estadística. Una fase posterior de este estudio incluye la evaluación funcional de este receptor alterado.

Cada vez con mayor frecuencia se describen polimorfismos genéticos asociados a diferentes estados patológicos, y por lo tanto no se puede descartar que esta serie de cambios puntuales en la secuencia del gen de GHRH-R constituyan circunstancias permisivas o coadyuvantes para el desarrollo de Acromegalia. Es muy probable que existan múltiples eventos



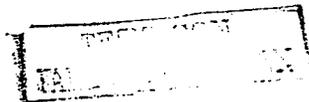
permisivas o coadyuvantes para el desarrollo de Acromegalia. Es muy probable que existan múltiples eventos moleculares y mecanismos biológicos que resultan en la formación de adenomas productores de GH, hasta el momento no ha podido establecerse cuál, o cuáles de ellos, pueden considerarse como necesarios, suficientes o componentes.



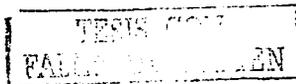
BIBLIOGRAFÍA

1. Reichlin S. Foreword in: Mazzaferri EL, Samaan N, (eds) *Endocrine Tumors*. 1995 Blackwell Scientific Publications Inc. Cambridge, pp xi – xiii.
2. Furth J: Experimental pituitary tumors. *Rec Prog Horm Res* 1955;11:221-249.
3. Furth J, Clifton KH. *Endocrine Tumors Oncogenesis* In: Harris GW, Donovan BT, (eds). *Molecular Medicine Vol 2*. London: Butterworths, 1966:461-497.
4. Herman V, Kovacs K, Melmed S, Fagin J, Gonsky R. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1427-1433.
5. Asa S, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocrine Rev* 1998;19(6):798-827.
6. Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999;28(1):1-13.
7. Prezant T, Levine J, Melmed S. Molecular characterization of the MEN 1 tumor suppression gene in sporadic pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1388-1391.
8. Shimon I, Melmed S. Pituitary tumors pathogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1675-1681.
9. Heaney AP, Melmed S. New Pituitary Oncogenes. *Endocrine-Related Cancer* 2000;7:3-15.
10. Boggild MD, Jenkinson S, Pistorello M, *et al*. Molecular genetic studies of sporadic pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:387-392.
11. Pei L, Melmed S, Scheithober B, *et al*. Frequent loss of heterozygosity at the retinoblastoma susceptibility gene (RB) locus in aggressive pituitary tumors. Evidence of a chromosome 13 tumor suppressor gene other than RB. *Cancer Res* 1995;55:1613-1616.
12. Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-specific transferring gene. *Mol Endocrinol* 1997;11:433-441.
13. Zhang X, Herwitz GA, Prezant T, *et al*. Structure, expression and function of human pituitary tumors transferring gene (PTTG). *Mol Endocrinol* 1999;13:156-166.
14. Khoo DH, Parma J, Rajasoorya C, Ho SC, Vassart G. A germline mutation of the thyrotropin receptor gene associated with thyrotoxicosis and mitral valve prolapse in a Chinese family. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(4):1459-62
15. Kopp P, Muirhead S, Jourdain N, Gu WX, Jamesos JL, Rodd C. Congenital hyperthyroidism by a solitary toxic adenoma harboring a novel somatic mutation (serine281-->isoleucine) in the extracellular domain of the thyrotropin receptor. *J Clin Invest* 1997;100(6):1634-9
16. Russo D, Tumino S, Arturi F, Vigneri P, Grasso G, Pontecorvi A, Filetti S, Belfiore A. Detection of an activating mutation of the thyrotropin receptor in a case of an autonomously hyperfunctioning thyroid insular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(3):735-8
17. Parma J, Van Sande J, Swillens S, Tonachera M, Dumont J, Vassart G. Somatic mutation causing constitutive activity of the thyropropin receptor are

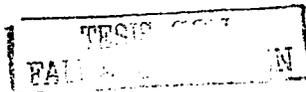
- the major cause of hyperfunctioning thyroid adenomas: identification of additional mutation activating both the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and inositol phosphate-Ca²⁺ cascades. *Mol Endocrinol* 1995;9(6):725-53.
18. Nordhoff V, Gromoll J, Simoni M. Constitutively active mutations of G protein-coupled receptors: the case of the human luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors. *Arch Med Res* 1999;30(6):501-9
 19. Beck-Peccoz P, Persani L, Romoli R, Asteria C, Borgato S. Activating mutations of the gonadotrophin receptors. *Arch Pediatr* 1998;5 Suppl 4:380S-384S.
 20. Gromoll J, Simoni M, Nordhoff V, Behre HM, De Geyter C, Nieschlag E. Functional and clinical consequences of mutations in the FSH receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1996;125(1-2):177-82
 21. Allen LF, Lefkowitz RJ, Caron MG, Cotecchia S. G protein receptor genes as protooncogenes: Constitutively activating mutation of the alfa1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:11354-8.
 22. Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine Rev* 2000;21(1):90-113.
 23. Landis CA, Masters SB, Spada A, et al. GTPase inhibiting mutations activates the alpha chain of Gs stimulate adenilicicase in human pituitary tumors. *Nature* 1987;34:692-696.
 24. Landis C, Hash G, Lyons J, et al. Clinical characteristics of acromegalic patients whose pituitary tumors contain mutant Gs protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1416-1420.
 25. Harris PE. Gs protein mutation on the pathogenesis and function of pituitary tumor. *Metabolism* 1996;45(suppl 1):120-122.
 26. Hosoi E, Yokogoshi Y, Horie H et al. Analysis of the gsp alpha gene in growth hormone-secreting pituitary adenomas by the polymerase chain reaction-direct sequencing method using paraffin-embedded tissues. *Acta Endocrinol* 1993;129:301-306.
 27. Yoshimoto K, Iwahana H, Fukuda A, Sano T, Itakura M. Rare mutation of de gsp-alpha subunit gene in human endocrine tumor. *Cancer* 1993;72:1386-1393.
 28. Yang I, Park S, Ryu M, et al. Characteristics of gsp-positive growth hormone-secreting pituitary tumors in Korean acromegalic patients. *Eur J Endocrinol* 1996;134:720-726.
 29. Mendoza V, Salcedo M, Cabrera L, Espinosa de Los Monteros AL, Mercado M. Prevalence of gsp-alpha Mutations in Mexican Patients with Acromegaly. Abstract 2189. The Endocrine Society 82nd Annual Meeting Endo 2000. June 2000.
 30. Thapar K, Kovacs K, Stefaneanu L, et al. Over expression of GHRH gene in acromegaly associated pituitary tumors: an event associated with neoplastic progression and aggressive behavior. *Am J Pathol* 1997;151:769-784.



31. Kojima M, Hodosa H, Date Y, Nakasato M, Matusuo H, Kangawua K. Ghrelin is a Novel Growth Hormone Realizing Acylated Peptide. Abstract 666. The Endocrine Society 82nd Annual Meeting Endo 2000. Junio 2000.
32. Melmed S, Casanueva F. Physiology of growth hormone secretion and action. *Endocrinol Metabol Clin North Am* 1992;21(3):483-518.
33. Barinaga M, Yamamoto G, River C, Vale W, Evans R, Rosenfelt MG. Transcriptional regulation of growth hormone gene expression by GHRH. *Nature* 1983;306:84-85.
34. Billestrup N, Swanson LW, Vale W. GHRH stimulates proliferation of somatotrophs *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:6854-6857.
35. Mayo K. Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for GHRH. *Mol Endocrinol* 1992;6(10):1734-1744.
36. Gaylinn B, Harrison J, Zysk J, Lyons C, Linch K, Thorner M. Molecular cloning and expression of a human pituitary receptor for GHRH. *Mol Endocrinol* 1993;7(1):77-84.
37. Maheshwari M, Bernard L, Dupois J, Baumann G. Phenotype and genetic analysis of a syndrome caused by an inactivating mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor: Dwarfism of Sindh. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(11):4065-4074.
38. Maheshwari M, Rahin A, Shalet S, Baumann G. Selective lack of growth hormone (GH) response to the GH releasing peptide hexarelin in patients with GH-releasing hormone receptor deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(3):956-959.
39. Ligtenberg MJ, Siers M, Themmen AP, Hanselaar TG, Willemsen W, Brunner HG. Analysis of mutations in genes of the follicle-stimulating hormone receptor signaling pathway in ovarian granulosa cell tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 Jun;84(6):2233-4.
40. Khoo DH, Parma J, Rajasoorya C, Ho SC, Vassart G. A germ line mutation of the thyrotropin receptor gene associated with thyrotoxicosis and mitral valve prolapse in a Chinese family. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 Apr;84(4):1459-62.
41. Wu SM, Leschek EW, Brain C, Chan WY. A novel luteinizing hormone receptor mutation in a patient with familial male-limited precocious puberty: effect of the size of a critical amino acid on receptor activity. *Mol Genet Metab* 1999 Jan;66(1):68-73.
42. Lopes B, Gaylinn B, Thorner M, Stoler M. Growth hormone-releasing hormone receptor mRNA in acromegalic pituitary tumors. *Am J Pathol* 1997;150:1885-1891.
43. Petersen S, Schneider-Merck T, Lueddecke D, Beil F, Heinrich M. Mutations of the Growth Hormone Releasing Hormone Receptor in Somatotrophic Pituitary Adenomas. Abstract 650. The Endocrine Society 82nd Annual Meeting Endo 2000. Junio 2000.
44. Adams EF, Symowski H, Buchfelder M, Poyner DR. A polymorphism in the Growth Hormone (GH)-Releasing Hormone (GHRH) Receptor Gene is Associated with elevated response to GHRH by Human Pituitary



- Somatotrophinomas in vitro. Biochem Biophys Res Commun 2000;275(1):33-6
45. Salvatori R, Thakker RV, Lopes MB, Fan X, Eswara JR, Ellison D, Lees P, Harding B, Yang I, Levine MA. Absence of mutations of the growth hormone releasing receptor gene in GH-secreting pituitary adenomas. Clin Endocrinol (Oxf) 2001 Mar;54(3):301-307
 46. Lee EJ, Kottar TJ, Ciric I, Lee MY, Lim SK, Lee HC, Huh KB, Mayo KE, Jameson JL. Absence of Constitutively Activating Mutations in the GHRH Receptor in GH-Producing Pituitary Tumors. J Clin Endocrinol Metab 2001;86(8):3989-95
 47. Melmed S. Acromegaly. N Engl J Med 1990;322:966-977.
 48. Melmed S. Etiology of pituitary acromegaly. Endocrinol Metab Clin North Am 1992;21:529-551.
 49. Chapman MI, Hartman ML, Straume ML, et al. Enhanced sensitivity growth hormone (GH) chemiluminescence assay reveals lower post glucose nadir GH concentration in men and women. J Clin Endocrinol Metab 1994;78:1312-1319.
 50. Barkan AL, Beitins IZ, Kelej RP. Plasma insulin-like growth factor-binding protein-3 levels in the diagnosis of acromegaly. J. Clin Endocrinol Metab 1988;67:69-73.
 51. Zimmerman RA. Imaging of the sellar region. Sem Roentgen 1990;26:703-723.
 52. Molitch ME- Clinical manifestations of acromegaly. Endocrinol Metab Clin North Am 1992;21:597-614.
 53. Lamberts SWJ, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ. Octreotide. N Engl J med 1996;334:246-254.
 54. Ezzat S, Snyder P, William F, et al. Octreotide treatment of acromegaly a randomized, multicenter study. Ann Int Med 1992;117:711-718.
 55. Espinosa-de-los-Monteros AL, Mercado M, Sosa E, Lizama O, Guinto G, Lopez-Felix B, Garcia O, Hernandez I, Ovalle A, Mendoza V. Changing patterns of insulin-like growth factor-I and glucose-suppressed growth hormone levels after pituitary surgery in patients with acromegaly. J Neurosurg. 2002 Aug;97(2):287-92.
 56. Lyos J, Landis C, Griffith H, Vallar L et al. Two G protein Oncogenesis in Human Endocrine Tumors. Science 1990;249:655-9
 57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/GHRH-Receptor>



ANEXO 1
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SXXI
FORMA DE CONSENTIMIENTO
Búsqueda de Mutaciones del Receptor de GHRH Acromegalia y MAHNF
Investigadores:
Dr. Ernesto Sosa-Eroza, Dr. Moisés Mercado

Introducción/Propósito

A usted se le ha solicitado participar en este estudio para buscar la presencia de una alteración genética que se encuentra en personas que padecen una enfermedad llamada Acromegalia. Es probable que esta alteración se encuentre presente tanto en personas sanas como enfermas, de ser así, la importancia que tendría para establecer la causa de la enfermedad se diluiría mucho, y se establecería que la alteración encontrada constituye un polimorfismo, o sea, que es una diferencia biológica sin traducción clínica. Por ello, se le ha solicitado su participación para integrar el grupo de personas sanas en las que buscará la alteración.

Procedimientos

Como parte de la evaluación previa a la donación de sangre, se le toman algunas muestras, una vez que el personal de Banco de Sangre realice las pruebas necesarias, se tomarán 200 µL (aproximadamente 4 gotas gruesas) de la muestra restante. De las células de su sangre se extraerá DNA y se buscará la mutación en ellas.

Beneficios

Usted no recibirá ningún beneficio médico por su participación en este estudio. Sin embargo, pueden existir beneficios para usted y para la raza humana si este estudio permite un mejor entendimiento de la manera en que se producen algunas enfermedades.

Riesgos

No existe ningún riesgo adicional para usted, ya que ha decidido voluntariamente hacer su donación de sangre.

Procedimientos Alternativos

Usted tiene la posibilidad de decidir si participa o no en el estudio.

Confidencialidad

Como participante en este estudio, su identidad y los datos referentes a usted en este estudio serán confidenciales. Usted no será identificado por nombre o iniciales en ninguna publicación que se origine de este estudio.

Costos

No habrá ningún costo para usted.

Consentimiento:

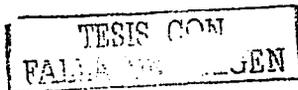
Mi participación en este estudio es completamente voluntaria. Puedo rehusarme a participar y si, por cualquier razón deseo dejar de participar, soy libre de hacerlo, por lo anterior no tendré ningún efecto sobre mi atención futura o tratamiento por mi médico ni por este hospital.

He leído esta forma de consentimiento y he discutido con el Dr. Mercado o el Dr. Sosa-Eroza los procedimientos descritos anteriormente. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas, las cuales han sido respondidas a mi satisfacción. Firmo al calce aceptando participar en el estudio.

Participante

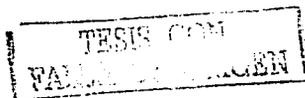
Firma

Fecha



ANEXO 2
PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO A PARTIR DE TEJIDO FRESCO. QIAamp DNA Mini Kit.

1. Cortar 25mg de tejido en pequeños trozos, colocarlo en un tubo para microcentrifuga de 1.5 mL y añadir 180 μ L de Buffer ATL. Si el tejido es mayor, aumentar proporcionalmente la cantidad de Buffer ATL.
2. Añadir 20 μ L de Proteinasa K, mezclar mediante vortexeo e incubar a 56°C hasta que el tejido esté completamente lisado. La lisis durante toda la noche es posible y no afecta la preparación.
3. Centrifugar brevemente el tubo de 1.5 mL para remover las gotas que estén en las paredes. Añadir 200 μ L de Buffer AL a la muestra, mezclar por vortexeo pulsátil durante 15 segundos, e incubara 70°C por 10 minutos. Centrifugar brevemente para remover las gotas de las paredes.
4. Añadir 200 μ L de etanol puro (96-100%) y mezclar por vortexeo pulsátil por 15 segundos, posteriormente centrifugar brevemente para remover las gotas que pudieron haber quedado en las paredes.
5. Colocar cuidadosamente la mezcla obtenida del paso 4 (incluyendo el precipitado) en la columna *QIAamp spin* (dentro de un tubo de colección de 2 mL) sin mojar la boca. Cerrar la tapa y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto (o hasta que haya pasado toda la solución).
6. Abrir cuidadosamente la columna *QIAamp spin* y añadir 500 μ L de Buffer AW1 sin mojar la boca de la columna. Cerrar la tapa y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto (o hasta que haya pasado toda la solución). Colocar la columna *QIA spin* en un nuevo tubo de colección de 2 mL y desechar el tubo que contiene el filtrado anterior. No es necesario aumentar la cantidad de Buffer AW1 si la cantidad inicial de tejido fue mas de 25 mg.
7. Abrir cuidadosamente la columna *QIAamp spin* y añadir 500 μ L de Buffer AW2 sin mojar la boca del tubo. Cerrar la tapa y centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos. **OPCIONALMENTE** se puede colocar la columna en un nuevo tubo de 2 mL y centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto para remover todos los residuos de AW2 del material extraído.
8. Colocar la columna en un tubo limpio de 1.5mL y desechar el tubo de colección que contiene el filtrado anterior. Abrir cuidadosamente la columna *QIAamp spin* y añadir 200 μ L de Buffer AE. Incubar a temperatura ambiente durante 1 - 5 minutos y después centrifugar a 8000 rpm durante un minuto. Volúmenes mayores de 200 μ L no deben centrifugarse en tubos de 1.5mL porque la solución haría contacto con la membrana de la columna y se formarían aerosoles.
9. Repetir el paso 8.
10. La solución obtenida contiene DNA purificado y debe conservarse a -20°C. Una muestra de 25 mg de tejido provee entre 10 y 30 μ g de DNA en un volumen de 400 μ L (25-75 ng/ μ L).



ANEXO 3

Protocolo de PCR.

La secuencia del DNA genómico del Receptor de Hormona Liberadora de Hormona de Crecimiento (GHRHR) se ha descrito recientemente (57). Este gen se encuentra en el cromosoma 7 y está formado por aproximadamente 15.5 Kb, de las cuales el 10% conforma la porción codificadora. Tiene en su estructura 13 exones y 12 intrones.

Se amplificarán mediante PCR los exones 3, 7 y 13 del gen de GHRHR.

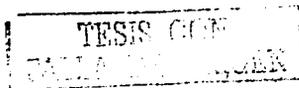
En la siguiente tabla se especifican los tamaños esperados de cada uno de los productos a secuenciar en PCR, los iniciadores (primers) y las temperaturas de alineamiento (TM) que serán utilizados.

Producto	Tam.	Sentido	TM	Antisentido	TM
Exon 3	437	<u>gacaccccaaaaggcttggctcat</u>	70	<u>gaggtgctttcatctggaagtggc</u>	74
Exon 7	235	<u>tgggtgtcccagctctgaaqcac</u>	74	<u>tggccaccatggggagggtaa</u>	68
Exon 13	262	<u>gaccttctaactcctcttc</u>	64	<u>gccacatccccacccagctg</u>	72

Se amplificará cada uno de los exones por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los pares de oligonucleótidos en DNA genómico obtenido de los productos biológicos.

El protocolo general de PCR es el siguiente:

- 100 – 300 ng de DNA genómico.
- 10 μ L de buffer de PCR a 10X (500mM KCl 100mMTris-HCl pH 8.4, 15nM MgCl₂)
- 10 μ L de mezcla de dNTP's a 10X (dCTP, dGTP, dATP, dTTP a 2 mM todos)
- 10 μ L de una solución 10X de oligonucleótido sentido a una concentración de 2.5 μ M
- 10 μ L de una solución 10X de oligonucleótido antisentido a una concentración de 2.5 μ M
- 2.5 unidades de Taq DNA polimerasa (Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT)
- Volumen final de reacción: 50 μ L



Los parámetros de amplificación incluyen para todas las reacciones un ciclo inicial de desnaturalización a 92°C por 5 minutos. Durante los ciclos siguientes, el paso de desnaturalización será a 92°C por 30 segundos. El paso de alineación durará 30 segundos a temperaturas variables en cada uno de los productos de amplificación. El paso de extensión o elongación se realizará a 72°C por 2 minutos. Con los parámetros antes mencionados la PCR se llevará a cabo por 30 ciclos en una Termociclador GeneAmp PCR System 2400, PerkinElmer-Applied Biosystems.

Los productos de amplificación, cuyos tamaños van de 235 a 437 pares de bases, se visualizarán mediante la transiluminación con luz ultravioleta de los geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio en un analizador de imágenes (Multimage Light Cabinet Alpha Innotech Corporation), utilizando marcadores apropiados de peso molecular (ϕ X174 RF DNA/Hae III Fragments, Gibco BRL, Life Technologies).

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

ANEXO 4

Purificación de los productos de PCR.

Una vez confirmado que el tamaño del producto amplificado es el esperado, se procede a extraerlo del gel de agarosa y purificarlo (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, 1999).

1. Con ayuda de una hoja de bisturí se corta la banda identificada mediante transiluminación con luz ultravioleta, minimizando el tamaño de la rebanada del gel.
2. Pesar la banda y añadir 3 volúmenes de Buffer QG.
3. Incubar a 50°C hasta que la agarosa se funda.
4. Añadir un volumen de isopropanol y mezclar.
5. La unión del DNA a la membrana de sílica-gel se consigue haciendo pasar la muestra a través de la columna del Kit de purificación.
6. El lavado del producto fijado se consigue con los Búferes QG y PE que liberan los detritus celulares y los restos de agarosa.
7. Mediante un bufer alcalino (EB) se consigue la elusión del material genético correspondiente al producto de PCR.

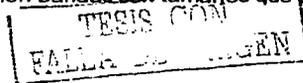
Cuantificación del Producto.

La solución obtenida del procedimiento previo contiene concentraciones diferentes para cada muestra de los productos de PCR purificados, por ello, la concentración de DNA de cada una de las muestras debe ser cuantificada para permitir calcular la cantidad con la que se realizará la PCR de secuenciación.

Se utilizó un método semicuantitativo comercialmente disponible (Low DNA Mass Ladder, GIBCO-BRL, Life Technologies). El producto de PCR teñido con bromuro de etidio se visualiza en un analizador de imágenes y se compara con el patrón de intensidades conocidas del marcador, de esta forma se puede estimar la cantidad de DNA, en ng/ μ L.

Secuenciación.

El fundamento de todas las técnicas de secuenciación de DNA es todavía el mismo que Sanger utilizó en sus trabajos iniciales. Tomando un template de DNA específico (que puede ser un producto de PCR) se realiza una amplificación con todos los componentes de una PCR habitual, pero se agrega a la mezcla maestra una concentración conocida y equilibrada de dinucleótidos trifosfatados (dNTP's) reducidos (dideoxi-NTP's) que tienen la característica de no poder formar nuevos enlaces fosfodiéster y terminar prematuramente la elongación de la molécula. De esta forma, al correr los productos de esta PCR en un gel de poliacrilamida, se obtienen bandas con tamaños que difieren entre



sí por una sola base. El análisis del dideoxi-NTP que termina cada una de las moléculas de diferentes tamaños, permite conocer la secuencia del producto completo.

En las técnicas automatizadas de secuenciación los dideoxiNTP's se sustituyen por dNTP's marcados con un fluorógeno que al ser estimulado por un rayo láser emite luz con diferentes longitudes de onda que al ser analizadas por una computadora son mostradas como colores y se elabora una secuencia de picos de señal que identifica colorimétricamente cada uno de los nucleótidos. En este trabajo fue utilizado el secuenciador automático ABI PRISM 310, Genetic Analyzer, PerkinElmer/Applied Biosystems.

La PCR de secuenciación fue realizada con un kit comercialmente disponible (DNA Sequencing Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, ABI PRISM, PerkinElmer/Applied Biosystems). El template de DNA utilizado fue cada uno de los productos de PCR previamente extraídos del gel y purificados, a una concentración de entre 10 y 40 ng por reacción, según el tamaño del producto. Al término de la PCR de secuenciación, existen en el tubo de la reacción dNTP's marcados con fluorógeno que no fueron incorporados a las moléculas y pueden dar lecturas falsas en el analizador y por ello debe ser nuevamente purificado. Al hacer pasar la solución obtenida por una columna que contiene una resina de filtración, mecánica y químicamente se retienen los fluorógenos y se filtran las moléculas de diferentes tamaños sin perder su estructura físico-química (DyeEx, QIAGEN).

La solución purificada se liofiliza en una centrifuga al vacío y se resuspende con un buffer desnaturalizante de formamida, se hace correr en un gel de poliacrilamida durante 10-12 hrs y posteriormente el gel es analizado por medio de un rayo laser y la secuencia se obtiene en forma de un electroesferograma.

