



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE VARIANTES GENÉTICAS
EN EL GEN *OPRK1* EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA
OVÁRICA PREMATURA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

FABIAN MAÑÓN HERNÁNDEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2024



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.



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado "Identificación y análisis de variantes genéticas en el gen *OPRK1* en pacientes con Insuficiencia Ovárica Prematura" que presenté para obtener el título/grado de Químico Farmacéutico Biólogo, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi Entidad Académica, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente

Fabian Mañón Hernández, número de cuenta: 317088492



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
VOCAL: Profesor: Dr. José Pedraza Chaverri
SECRETARIO: Profesor: Dr. Luis Ramos Tavera
1er. SUPLENTE: Profesora: Dra. Aliesha Araceli González Arenas
2° SUPLENTE: Profesora: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE BIOQUÍMICA
HORMONAL DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, INSTITUTO
NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”**

ASESOR DEL TEMA: DR. LUIS RAMOS TAVERA _____

SUPERVISORA TÉCNICA: Q.F.B. AIDET RUIZ GARDUÑO _____

SUSTENTANTE: FABIAN MAÑÓN HERNÁNDEZ _____



ÍNDICE

1. RESUMEN	- 8 -
2. ANTECEDENTES	- 9 -
2.1 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO)	- 9 -
2.2 Foliculogénesis	- 11 -
2.3 Hormonas sexuales femeninas	- 13 -
2.4 Insuficiencia ovárica prematura	- 16 -
2.5 Neuronas KNDy	- 19 -
2.6 <i>OPRK1</i>	- 22 -
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	- 25 -
3.1 HIPÓTESIS	- 26 -
3.2 OBJETIVOS	- 26 -
3.2.1 GENERALES	- 26 -
3.2.2 PARTICULARES	- 26 -
4. MATERIALES Y MÉTODOS	- 27 -
4.1 Participantes	- 27 -
4.2 Extracción de DNA genómico	- 28 -
4.3 Amplificación del gen <i>OPRK1</i> mediante PCR punto final	- 29 -
4.3.1 Diseño de oligonucleótidos	- 29 -
4.3.2 Estandarización de condiciones de PCR	- 30 -
4.3.3 Amplificación del gen <i>OPRK1</i> en pacientes y controles sanos.	- 31 -
4.4 Análisis de mutaciones mediante SSCP	- 33 -
4.5 Purificación de productos por electroelución	- 34 -
4.6 Secuenciación Sanger de muestras purificadas	- 35 -
4.7 Análisis del equilibrio Hardy-Weinberg y prueba estadística χ^2	- 36 -
5. RESULTADOS	- 37 -
6. DISCUSIÓN	- 43 -
7. CONCLUSIONES	- 47 -
8. PERSPECTIVAS	- 48 -
9. REFERENCIAS	- 49 -
ANEXO I. Carta de consentimiento informado	- 57 -
ANEXO II. Aprobación del Proyecto BRE-3594-21-24-1	- 64 -



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.....	- 10 -
Figura 2. Foliculogénesis.....	- 12 -
Figura 3. Síntesis de esteroides sexuales femeninos.....	- 15 -
Figura 4. Estructura y secuencia de aminoácidos de neuropéptidos de..... las neuronas KNDy.	- 20 -
Figura 5. Generación de GnRH a partir de neuronas KNDy.....	- 21 -
Figura 6. Vía de señalización del receptor de dinorfina.....	- 23 -
Figura 7. <i>OPRK1</i> y R-DYN.....	- 24 -
Figura 8. Representación de alineamiento de los oligonucleótidos diseñados.....	- 29 -
Figura 9. Estandarización de las condiciones de PCR.....	- 38 -
Figura 10. Imagen representativa de la amplificación del gen <i>OPRK1</i>	- 38 -
Figura 11. Imagen representativa del análisis por la técnica de SSCP.....	- 39 -
Figura 12. Imagen representativa del análisis por la técnica de SSCP.....	- 40 -
Figura 13. Parte de la secuencia de la región 1A del gen <i>OPRK1</i>	- 41 -



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para el gen <i>OPRK1</i>	- 29 -
Tabla 2. Volúmenes (μL) para PCR a 2.0 mM de MgCl_2	- 30 -
Tabla 3. Volúmenes (μL) para PCR a 2.5 mM de MgCl_2	- 30 -
Tabla 4. Condiciones de PCR.....	- 31 -
Tabla 5. Valores estandarizados para las PCR.....	- 32 -
Tabla 6. Preparación de geles de poliacrilamida.....	- 33 -
Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas en.....	- 41 -
pacientes con POI y controles sanos	
Tabla 8. Frecuencias genotípicas esperadas en pacientes.....	- 41 -
con POI y controles sanos	
Tabla 9. Comprobación de equilibrio H-W por análisis estadístico con χ^2	- 42 -



ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa	MOR	Receptor opioide Mu
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	MPM	Marcador de peso molecular
ARC	Núcleo arcuato hipotalámico	MT	Menopausia temprana
dCTP	Citosina trifosfato	NKB	Neuroquinina B
DEL	Deleciones	NOR	Receptor opioide Nociceptina
DMSO	Dimetilsulfóxido	P4	Progesterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DOR	Receptor opioide Delta	PKA	Proteína Cinasa A
DUP	Duplicaciones	POI	Insuficiencia ovárica prematura
DYN	Dinorfina	R-DYN	Receptor de dinorfina
DYN-A	Dinorfina A	SDS	Dodecil sulfato de sodio
E1	Estrona	SNV	Variantes de un solo nucleótido
E2	Estradiol	SSCP	Polimorfismo conformacional de cadena sencilla
E3	Estriol	ssDNA	DNA de cadena sencilla
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	StAR	Proteína esteroideogénica de regulación aguda
FSH	Hormona foliculoestimulante	TBE	Tris-Borato-EDTA
FSHR	Receptor de la hormona foliculoestimulante	TEMED	N-N-N'-N'- tetrametiletildiamina
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas		
GnRHR	Receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas		
HHO	Hipotálamo-Hipófisis-Ovario		
H-W	Hardy-Weinberg		
IN/DEL	Inserciones/Deleciones		
INHA	Inhibina A		
INS	Inserciones		
KISS	Kisspeptina		
KOR	Receptor opioide Kappa		
LH	Hormona luteinizante		
LHR	Receptor de la hormona luteinizante		



1. RESUMEN

Introducción La insuficiencia ovárica prematura (POI) es un padecimiento que abarca un amplio espectro de anomalías clínicas caracterizadas por la pérdida de la función ovárica de forma prematura, a consecuencia de un problema con el ovario, la hipófisis o el hipotálamo. Este padecimiento afecta alrededor del 1–3% de la población femenina menor de 40 años con un cariotipo normal 46, XX. Se le relaciona clínicamente con mayor propensión a padecer trastornos cardiovasculares, osteoporosis, deterioro cognitivo e infertilidad. El gen *OPRK1* codifica para el receptor de dinorfina (neuropéptido localizado en las neuronas KNDy del núcleo arcuato hipotalámico), cuya función es inhibir la liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). **Objetivo** Identificar y determinar variantes o mutaciones en el gen *OPRK1* en pacientes con POI con etiología molecular desconocida. **Material y métodos** Para comprobar la relación del gen *OPRK1* con POI se estudió la región exónica empleando el tamizaje molecular con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla (PCR-SSCP) y secuenciación Sanger en muestras de 14 pacientes con POI idiopático y 100 mujeres sanas para la identificación de variantes genéticas. **Resultados** Los ensayos de PCR mostraron una ampliación específica de las regiones con una talla esperada entre 200–300 nucleótidos, lo cual descartó inserciones, deleciones o duplicaciones de gran tamaño. Mediante SSCP se detectó una variación en la migración electroforética del exón 1 lo que indica una variante genética que fue determinada por secuenciación Sanger. La variante genética fue identificada como c.36G>T (p.Pro12=) en una de las pacientes. La variante de un solo nucleótido se genotipificó mediante PCR-SSCP en 100 sujetos libres de POI y se encontró que sus frecuencias alélicas fueron similares a las del grupo de pacientes. **Conclusión** Los estudios realizados en el gen *OPRK1* permitieron identificar una variante genética c.36G>T, sin embargo, no se obtuvo evidencia que vincule esta variante a la causalidad de la POI, por lo que puede representar únicamente una variante normal en el genoma humano.



2. ANTECEDENTES

2.1 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO)

El eje HHO es un sistema hormonal importante en la fertilidad, el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios (Tresguerres, 2016). El eje está estructurado por tres partes que pueden interactuar fisiológicamente para mantener la homeostasis del eje mediante circuitos de retroalimentación positiva y negativa (Araujo et al., 2020). Inicialmente se encuentra el hipotálamo, glándula donde se encuentran las neuronas reguladoras de la GnRH que sintetizan y liberan en forma de pulsos irregulares a la GnRH (Pacheco, 2010). Los pulsos de GnRH actúan sobre las células gonadotropas hipofisarias ubicadas en la hipófisis anterior o adenohipófisis, y que se van a encargar de sintetizar y liberar dos de las gonadotropinas, la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH). Estas hormonas son liberadas en función del estímulo y de los pulsos de GnRH (Romeu, et al., 2016). Por último, en las gónadas femeninas u ovarios, la FSH y la LH actúan sobre las células de la granulosa y la teca para estimular la foliculogénesis, que da lugar a la ovulación, y la producción de diversos esteroides sexuales (estrógenos, progesterona y andrógenos), péptidos gonadales (activina, inhibina y folistatina) y factores de crecimiento (**Figura 1**). Estos factores retroalimentan el eje hipotálamo-hipófisis con el objetivo de inhibir o aumentar la secreción de GnRH y gonadotropinas (Potau & Carreño, 2007).

En las gónadas femeninas u ovarios se ha descrito la presencia de dos regiones anatómicas esenciales: la médula central y el córtex externo (Valdez & García, 2017). La médula es la porción central y se compone por tejido conectivo laxo, donde se encuentran incorporados los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos y los nervios (Silva, et al., 2020). Por otro lado, el córtex externo está formado por células germinales (ovocitos) rodeados por complejos celulares en el estroma, donde se forman los folículos ováricos, recubiertos por epitelio germinal (Filipiak, et al., 2016). El córtex ovárico es de importancia biológica, ya que en esta estructura ocurren la mayoría de los cambios asociados con el funcionamiento de la gónada. Sus estructuras fundamentales son los folículos ováricos,

complejas unidades funcionales y anatómicas, con la función principal de formación y manutención de un ovocito competente, que es liberado mediante la ovulación (Barrios de Tomasi, et al., 2012). Las células germinales van a presentar cambios en su organización y composición según el grado de diferenciación y desarrollo de los ovocitos que contengan. Relacionándose estrechamente con las funciones desempeñadas por el ovario. La producción de los gametos femeninos para su posible fecundación y la producción y secreción de las hormonas sexuales (Ge, et al., 2019).

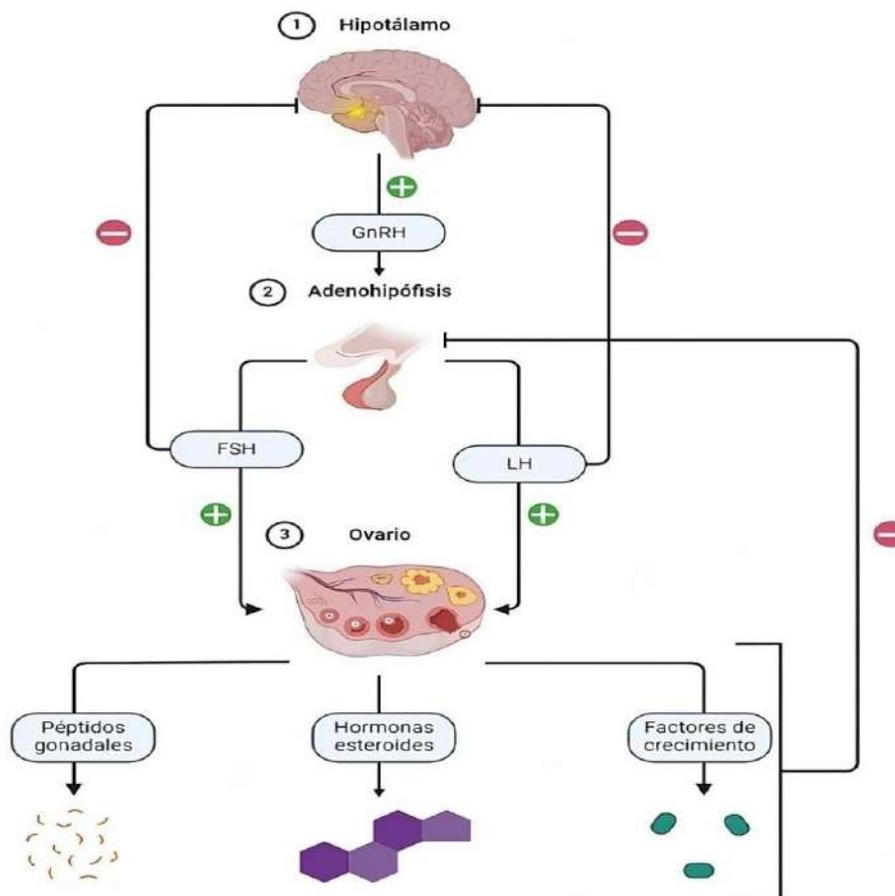


Figura 1. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. Representación de la vía por la que interactúan las tres partes del eje: Iniciando por la secreción de GnRH en hipotálamo estimulando la síntesis y liberación de FSH y LH en hipófisis y finaliza en la síntesis y secreción de las hormonas esteroides sexuales, péptidos gonadales y factores de crecimiento en el ovario. **GnRH.** Hormona liberadora de gonadotropinas. **FSH.** Hormona foliculoestimulante. **LH.** Hormona luteinizante. (Imagen elaborada en el Laboratorio de Bioquímica Hormonal, Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ).



2.2 Foliculogénesis

En el ovario se encuentran los folículos, que constituyen las unidades funcionales básicas de la gónada femenina. Son estructuras especializadas que se encargan de la producción y crecimiento de los ovocitos (Hsueh, et al., 2015). Su proceso de desarrollo ocurre en el córtex ovárico, durante el cual los folículos sufren distintas transformaciones que permiten al ovario cumplir dos funciones principales: la síntesis de hormonas esteroideas, que coadyuvan a la maduración y crecimiento del ovocito contenido en cada folículo (Fiorentino, et al., 2022). Estos dos procesos tienen la finalidad de desencadenar los mecanismos de ovulación y promover una posible fecundación (Ventura & Hernández, 2019).

La foliculogénesis inicia desde la vida fetal y está dividida en distintos estadios (**Figura 2**). Inicialmente se forman los folículos primordiales, conformados únicamente por un ovocito primario y células foliculares. Los folículos son reclutados hacia un almacén en crecimiento dónde pasan por una serie de mecanismos de proliferación y diferenciación para ser transformados en folículos pre-antrales mediante una regulación autocrina/paracrina la cual es controlada por factores de crecimiento (independiente de gonadotropinas) locales (Hsue, et al., 2015).

Al iniciar la pubertad ocurre la selección y crecimiento del folículo de Graaf (preovulatorio). Su maduración es regulada principalmente por la LH y la FSH, asimismo múltiples factores de crecimiento locales participan en la regulación positiva y negativa de la foliculogénesis, la ovulación y la luteogénesis (Filipiak, et al., 2016). Este folículo madura lo suficiente culminando en su rompimiento y liberación del ovocito para ser transportado al interior del útero y estar disponible para una posible fecundación. Si este folículo no madura lo suficiente puede sufrir atresia, que se caracteriza por cambios morfológicos e histológicos que conllevan a defectos en las funciones de los folículos y culmina en apoptosis celular (Ascona, 2013). A partir de los restos del folículo maduro se forma el cuerpo lúteo, que será responsable de la producción y secreción de hormonas esteroideas sexuales durante la fase post-ovulatoria del ciclo menstrual. Sí no se lleva a cabo la fecundación, ocurre la regresión del cuerpo lúteo en la que los

niveles de hormonas esteroides sexuales disminuyen permitiendo que ocurra otra ovulación y una nueva oportunidad de fecundación (Aréchiga, et al., 2019).

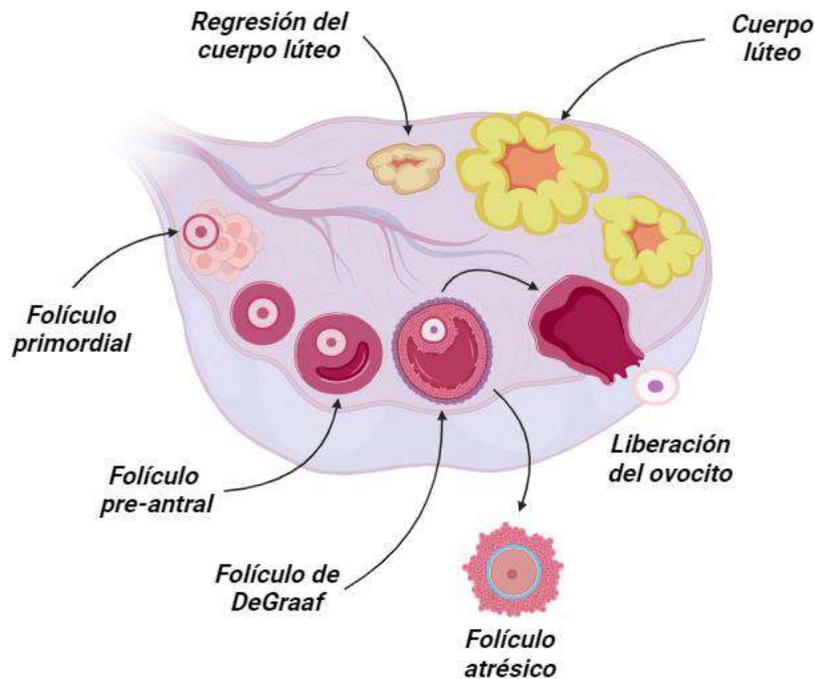


Figura 2. Foliculogénesis. Representación de los distintos estadios de la foliculogénesis que ocurre en el córtex ovárico. Abarcando desde la formación del folículo primordial hasta la regresión del cuerpo lúteo y considerando las dos vías para el folículo de Graaf, atresia y liberación del ovocito. (Imagen elaborada en el Laboratorio de Bioquímica Hormonal, Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ).



2.3 Hormonas sexuales femeninas

Estudios previos han determinado y caracterizado el papel biológico que desempeñan los esteroides sexuales en el control de las actividades del eje HHO y de los procesos como la reproducción, diferenciación y determinación sexual, metabolismo, respuesta inmune, osmorregulación, ritmos circadianos, señalización de feromonas y apareamiento (Nieto, et al., 2020). Los ovarios son los responsables de la producción de las hormonas esteroides sexuales en la vida reproductiva femenina, por lo que conservar los niveles fisiológicos normales es importante para la reproducción y la salud somática (Damdimopoulou, et al., 2019).

Las hormonas esteroides sexuales como los andrógenos, estrógenos y progesterona (P4) son sintetizados principalmente en las glándulas suprarrenales y las gónadas (Almaraz, et al., 2003). En el sexo femenino, las hormonas esteroides sexuales principales son la P4 y los estrógenos [estrone (E1), estradiol (E2) y estriol (E3)] que regulan numerosos procesos fisiológicos, como el crecimiento celular, el desarrollo, la regulación de genes específicos del tracto reproductivo, el mantenimiento del metabolismo óseo y la regulación del sistema inmunológico (Avila, et al., 2019), al privar prematuramente de los esteroides sexuales, se activa una serie de eventos que afectan a los sistemas urogenital, esquelético, cardiovascular y neurocognitivo, culminando en un deterioro general de la salud en mujeres (Kodaman, 2010). Es por ello que el preservar su concentración en niveles óptimos es de vital importancia, ya que son necesarios para mantener la homeóstasis fisiológica, permitiendo que distintos órganos como los ovarios, el corazón, el cerebro y los huesos, realicen sus funciones y mantengan su composición y morfología adecuada.

Los estrógenos son responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y cumplen un papel importante en la función reproductiva femenina. Junto con la hormona del crecimiento, regulan el crecimiento y desarrollo de la composición corporal específica de cada sexo (Leung, et al., 2004).



Por su parte, la P4, es sintetizada principalmente en los ovarios, la placenta y las glándulas suprarrenales, siendo en ovario las células teca-luteínicas las principales productoras (Buitrón, et al., 2017). La función de la P4 radica en regular múltiples funciones como la conducta sexual, el embarazo, la neuroprotección y la inmunoprotección (Kolatorova, et al., 2022). Durante la segunda fase del ciclo menstrual contrarresta los cambios endometriales inducidos por los estrógenos e induce la preparación del endometrio para la implantación embrionaria durante el embarazo, permitiendo la transición de la fase proliferativa a la secretora (Taraborrelli, 2015).

La biosíntesis de hormonas esteroides sexuales es denominada esteroidogénesis y es una ruta esencial en donde se lleva a cabo la conversión del colesterol mediante hidroxisteroide deshidrogenasas y enzimas oxidativas como los citocromos P450 (León, 2022) (**Figura 3**). La esteroidogénesis es regulada principalmente a través de la vía de la Proteína Cínasa A (PKA). Esta ruta es un mecanismo dependiente del adenosín monofosfato cíclico (AMPc), generado por la activación de la adenilato ciclasa (AC) y además por la unión de las gonadotropinas a sus respectivos receptores acoplados a proteína G. La PKA cumple con la función de fosforilar proteínas involucradas en el transporte de colesterol (Steroidogenic acute regulatory protein, StAR) durante el proceso de esteroidogénesis (Gómez, et al., 2012).

La estimulación de su cascada de señalización ejerce dos tipos de respuesta, aguda y crónica según el tiempo de respuesta. La respuesta aguda promueve la rápida conversión de colesterol a pregnenolona mediante la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P450_{scc}), ubicada en la mitocondria y causando una síntesis rápida de nuevos esteroides (Miller & Bose, 2011). Mientras que, la respuesta crónica afecta a nivel de la transcripción de genes, induciendo enzimas esteroidogénicas e incrementando la capacidad sintética celular de esteroides (Hu, et al., 2010).



2.4 Insuficiencia ovárica prematura

La POI es definida clínicamente como un tipo de hipogonadismo hipergonadotrópico en mujeres menores de 40 años con un cariotipo normal 46, XX (Graff & Christin-Maitre, 2019). Es caracterizada por un estado en donde los ovarios de una mujer menor de 40 años (edad aproximada en la que inicia la perimenopausia) dejan de funcionar, presentando un déficit o ausencia de actividad. Esto probablemente a consecuencia de un problema con la hipófisis o el hipotálamo. Alrededor del 1–3% de mujeres menores de 40 años presentan este padecimiento, siendo menos común en mujeres más jóvenes (Chelsom, et al., 2022), 0.1% en mujeres menores de 30 años y 0.01% en mujeres menores de 20 años. Algunos estudios indican que la prevalencia puede variar según diferencias étnicas, regionales, de estilo de vida y/o por factores ambientales (Graff & Christin-Maitre, 2019).

Esta insuficiencia se caracteriza por alteraciones en el ciclo menstrual que se pueden presentar como amenorrea primaria o secundaria, disminución en la función y reserva ovárica, así como de los niveles de estrógenos. En gran parte de los casos provoca infertilidad, debido principalmente a la deficiencia de estrógenos (Ishizuka, 2021). A largo plazo puede asociarse con un incremento en el riesgo de padecer trastornos cardiovasculares, osteoporosis, atrofia vulvovaginal, deterioro cognitivo y una reducción general de la expectativa de vida (Tsiligiannis, et al., 2019). Gran parte de las pacientes presentan la sintomatología de menopausia temprana (MT) como sofocos, sudores nocturnos, dispareunia y problemas del sueño, que derivan a un deterioro en el estado de ánimo, desempeño laboral, en algunos casos en depresión y reducción de la libido (Sullivan, et al., 2016). Por ello, se suele confundir con la MT, aunque es posible diferenciarlas ya que en las mujeres que padecen de POI pueden presentar períodos menstruales intermitentes e incluso concebir después del diagnóstico, mientras que las mujeres con MT, no. Además, las pacientes con POI pueden presentar estos síntomas desde la adolescencia (Hamoda & Sharma, 2024).



Para un diagnóstico adecuado de POI se debe basar en la presencia de un trastorno menstrual, en el que durante al menos 4 meses se presenten menstruaciones impredecibles o ausentes antes de cumplir 40 años y una confirmación bioquímica que se basa en dos determinaciones con un intervalo de al menos un mes de diferencia en el que los niveles de FSH en suero se encuentren dentro del rango de menopausia (Sherman, et al., 2018), es decir, que superen valores de 40 UI/L, siendo estos característicos de la enfermedad. De igual forma se recomienda evaluar la actividad de las glándulas suprarrenales y de la tiroides para descartar que parte de la sintomatología sea derivada de algún fallo en estas (Nelson, 2009).

La POI es un trastorno heterogéneo de origen multifactorial, algunas de sus principales causas se encuentran relacionadas a enfermedades genéticas y anomalías cromosómicas, como es el caso del síndrome de X frágil o el síndrome de Turner (Rebar, 2008); enfermedades autoinmunes como la tiroiditis y la enfermedad de Addison (Nelson, 2009); causas iatrogénicas como cirugías, radioterapias y quimioterapias (Welt, 2008); trastornos metabólicos y la exposición a algunos xenobióticos ambientales como productos químicos, virus, toxinas y pesticidas (Vujović, 2009). Entre el 74–90% de los casos de POI son idiopáticas o causas desconocidas (Vujović, et al., 2012).

Distintos factores parecen indicar un aumento en la propensión de padecer POI, como lo es tener familiares con la enfermedad, cambios y enfermedades genéticas (Cordts, et al., 2011), padecer de alguna enfermedad autoinmune, infecciones virales, estar bajo tratamiento contra el cáncer con radioterapias y/o quimioterapias.

Actualmente se realizan distintas investigaciones sobre la relación de la POI con problemas de los folículos, como su disfunción, función inadecuada o disminución drástica en su conteo (De Vos, et al., 2010). Derivados de estas investigaciones se han determinado genes que tienen una posible relación a la causalidad de la enfermedad, a partir del conocimiento sobre sus funciones en esteroidogénesis, foliculogénesis y su papel como factores de crecimiento de la foliculogénesis (Peralta & Nicolás, 2013, Yang, et al., 2021). Entre los que



destacan los genes de la subunidad β de las gonadotropinas FSH y LH (**FSHB** y **LHB**), así como sus respectivos receptores (**FSHR** y **LHR**) que van a estar relacionados con el desarrollo de folículos, espermatogénesis y ovulación. Alteraciones en estos puede causar fenotipos variables, desde retraso puberal, amenorrea primaria, infertilidad, hipogonadismo e incluso hermafroditismo (Labarta, et al., 2021); el gen **NR5A1** denominado como proteína de unión a Ad4 o factor esteroideogénico 1 (SF-1), es un receptor nuclear y regulador transcripcional clave en genes involucrados en el desarrollo sexual y reproducción, se ha demostrado que cambios en él están asociados al deterioro del desarrollo y la función ovárica (Lourenço, et al., 2009); el gen **FIGLA** (Factor en la Línea Germinal Alfa) y el gen **NOBOX** (Homeobox de la ovogénesis) son factores transcripcionales de la ovogénesis (Zhao, et al., 2008). Son esenciales para la foliculogénesis y la regulación de genes específicos de ovocitos (Huntriss, et al., 2006); el gen **FOXL2**, responsable de la regulación de numerosos genes que dan lugar a los folículos ováricos. Su función esencial es la diferenciación y el mantenimiento de los ovarios, así como la represión transcripcional de **SOX9**, uno de los genes relacionados con la diferenciación somática testicular, manteniendo la estructura del ovario (Llano, et al., 2022); **INHA** (Inhibina A), hormona glucoproteica que participa en el control de retroalimentación negativa de la secreción de FSH (Messinis, et al., 2014); y el gen **GDF9** (Factor de Diferenciación del Crecimiento 9) es un miembro relevante de la superfamilia TGF- β (Factor de Crecimiento Transformante Beta), que codifican proteínas que contribuyen a crear un entorno que favorece la selección y crecimiento de folículos, se ha encontrado que variantes en este gen tienen una alta incidencia en el fenotipo de POI (Liu, et al., 2021).



2.5 Neuronas KNDy

En mamíferos, el núcleo arcuato hipotalámico (ARC) contiene un subconjunto de neuronas que coexpresan tres neuropéptidos importantes en la función neuroendocrina reproductiva que son: Kisspeptina (KISS), Neuroquinina B (NKB) y Dinorfina (DYN), por lo que a las células productoras se les ha denominado neuronas KNDy (Uenoyama, et al., 2021). Este tipo de neuronas están presentes en una gran cantidad de especies, incluidas ratas, ovejas y humanos (Moore, et al., 2018) y participan en el control de la retroalimentación negativa de esteroides y como componente de los pulsos de GnRH. Se ha hipotetizado que alteraciones en los péptidos sintetizados en las neuronas KNDy pueden ser los responsables de algunos defectos neuroendocrinos asociados a trastornos reproductivos clínicos (Lehman, M.N., et al., 2010).

Los tres neuropéptidos coexpresados por KNDy provienen de diferentes genes que se expresan como pro-hormonas que pueden ser escindidas a isoformas de estos péptidos, siendo la más afines a sus receptores respectivos las isoformas Dinorfina A 1-13 (Brugos & Hochhaus, 2004) y Neuroquinina B (Pineda, et al., 2016) (no hay reportes de alguna isoforma de kisspeptina con mayor afinidad) presentando diferencias en el tamaño y estructura de cada una de ellas (**Figura 4**), asimismo pertenecen a tres familias diferentes, Kisspeptina a la familia de las kisspeptinas (Harter, et al., 2018), Dinorfina a los péptidos opioides endógenos (Brugos & Hochhaus, 2004) y la Neuroquinina B a las taquininas (Pineda, et al., 2016).

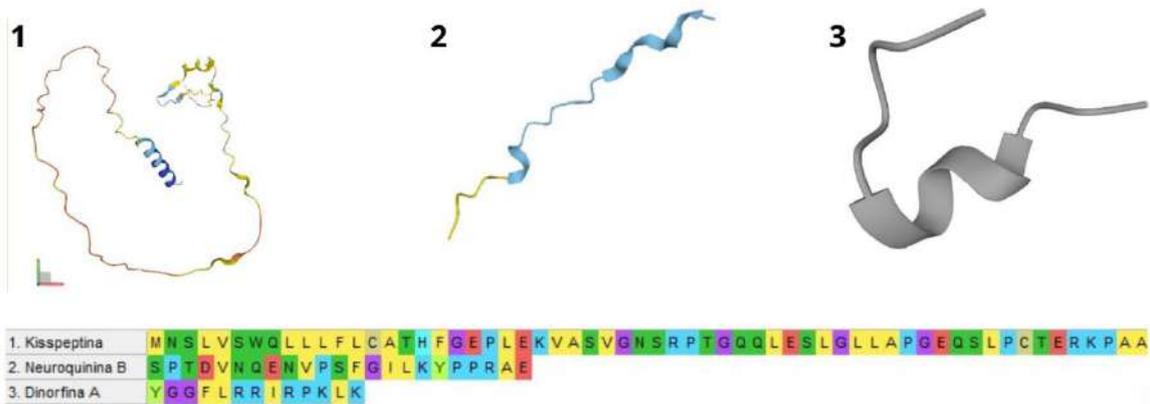


Figura 4. Estructura y secuencia de aminoácidos de neuropéptidos de las neuronas KNDy. Se muestra la secuencia de aminoácidos así como la estructura predicha de los tres neuropéptidos que se coexpresan en las neuronas KNDy, **1.** Kisspeptina, **2.** Neuroquinina B y **3.** Dinorfina A. (Imagen elaborada en el Laboratorio de Bioquímica Hormonal, Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ; estructura y secuencias extraídas de la base de datos Uniprot, el 04/10/2024).

Existe evidencia científica la cual ha propuesto que la población de neuronas KNDy en el ARC se encuentran interconectadas y actúan de forma sincronizada, siendo necesarias y suficientes para la liberación pulsátil de GnRH (Moore, et al., 2023). Los tres neuropéptidos cumplen una función distinta en la regulación de la secreción de GnRH. Se ha reportado que DYN funge como un inhibidor (Smith & Lee, 1988), mientras que NKB y KISS son estimulantes de la liberación de GnRH (Capera & Gómez, 2019, Xie, et al. 2022).

Las evidencias científicas revelaron que NKB y DYN operan de forma recíproca para modular fina y diferencialmente la liberación de KISS y con ello la secreción de GnRH y las gonadotropinas (Plain, et al., 2022). Cuando el receptor de NKB es activado y el receptor de DYN se inhibe, se ha reportado una inducción en la liberación de LH; en cambio, si se inhiben simultáneamente se induce la secreción de FSH (Ruiz, et al., 2015).

Actualmente no se ha establecido la vía de señalización para la generación de pulsos de GnRH por acción de las neuronas KNDy, sin embargo, se ha propuesto una secuencia hipotética (**Figura 5**): Inicialmente ocurre la activación de las neuronas KNDy y la liberación de NKB promoviendo el reclutamiento de otras

neuronas KNDy. Posteriormente se libera KISS en la periferia de las dendritas de las neuronas GnRH y se activan por la unión de KISS con su receptor, estimulando la liberación de pulsos de GnRH. Finalmente, las neuronas KNDy secretan DYN cuando existe un exceso de KISS para la desactivación del circuito a través del receptor de DYN (Constantin, 2022).

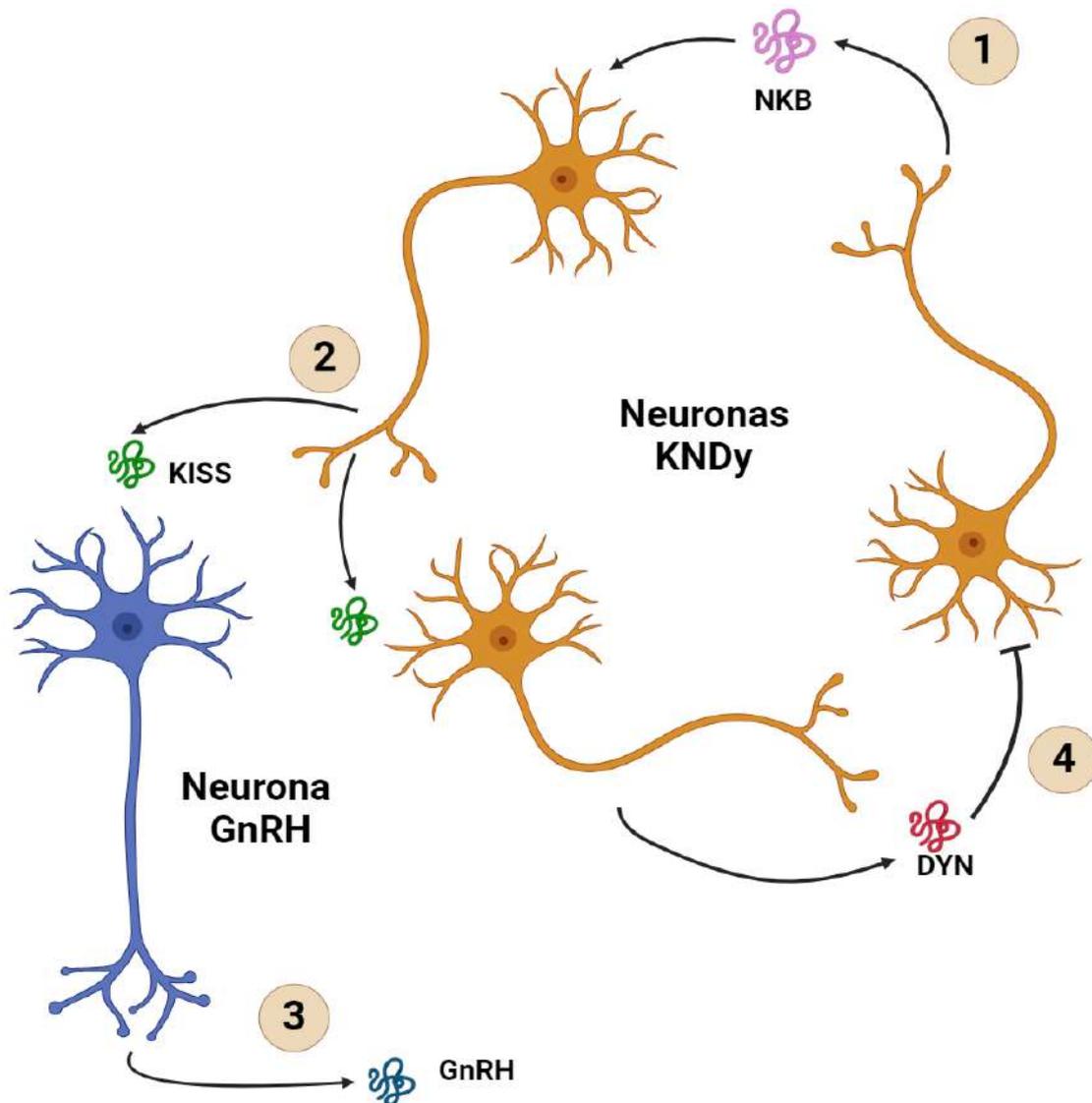


Figura 5. Generación de GnRH a partir de neuronas KNDy. Señalización paracrina de neuronas KNDy por actividad de sus tres neuropéptidos. **NKB.** Neuroquinina B, estimula la liberación de KISS por parte de otras neuronas KNDy. **KISS.** Kisspeptina, promueve la actividad de las neuronas GnRH, aumentando la producción de GnRH. **DYN.** Dinorfina, inhibe a otras neuronas KNDy cuando existe un exceso de KISS, finalizando el ciclo de señalización paracrino. (Imagen elaborada en el Laboratorio de Bioquímica Hormonal, Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ).



2.6 OPRK1

La dinorfina es un neuropéptido endógeno aislado inicialmente de la pituitaria porcina con una actividad opioide particularmente potente en la regulación hormonal, existen distintas isoformas de distintos tamaños, siendo la más afín al receptor de dinorfina (R-DYN) y la que se sintetiza con mayor frecuencia, la dinorfina A 1-13 (DYN-A) (Ferré, et al., 2019). Su señalización endógena se lleva a cabo de manera paracrina sobre otras neuronas a través de la interacción con R-DYN (Coutinho, et al., 2022). Se sabe que la interacción de DYN/R-DYN produce una inhibición de la frecuencia de la liberación pulsátil de GnRH, sin embargo, no se ha esclarecido si esta señal inhibitoria afecta directamente a las neuronas KNDy o a las neuronas no KNDy que expresan a RD en el ARC (Dai, et al., 2021).

Existen cuatro tipos de receptores opioides, mu (MOR), kappa (KOR), delta (DOR) y nociceptina (NOR). R-DYN está categorizado como un KOR (Álvarez & Farré, 2005), el cual forma parte de los receptores acoplados a proteínas G, específicamente con respuesta de tipo $G_{i/o}$ (Han, et al., 2023). Cuando ocurre la activación de las proteínas $G_{i/o}$ por la unión de su ligando, en este caso la DYN-A, se inhibe la actividad de la AC disminuyendo la concentración de AMPc (Ferré, et al., 2019), resultando en la activación de los canales de potasio así como la inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje, lo que modula la actividad neuronal y la transmisión sináptica (Neves, et al., 2002). Como ya se ha mencionado, la AC junto con el AMPc están implicadas en la regulación de la esteroidogénesis (**Figura 6**), la función reproductiva y otros efectos evocados por hormonas, neurotransmisores y diversos ligandos paracrinos (Gómez, et al., 2012).

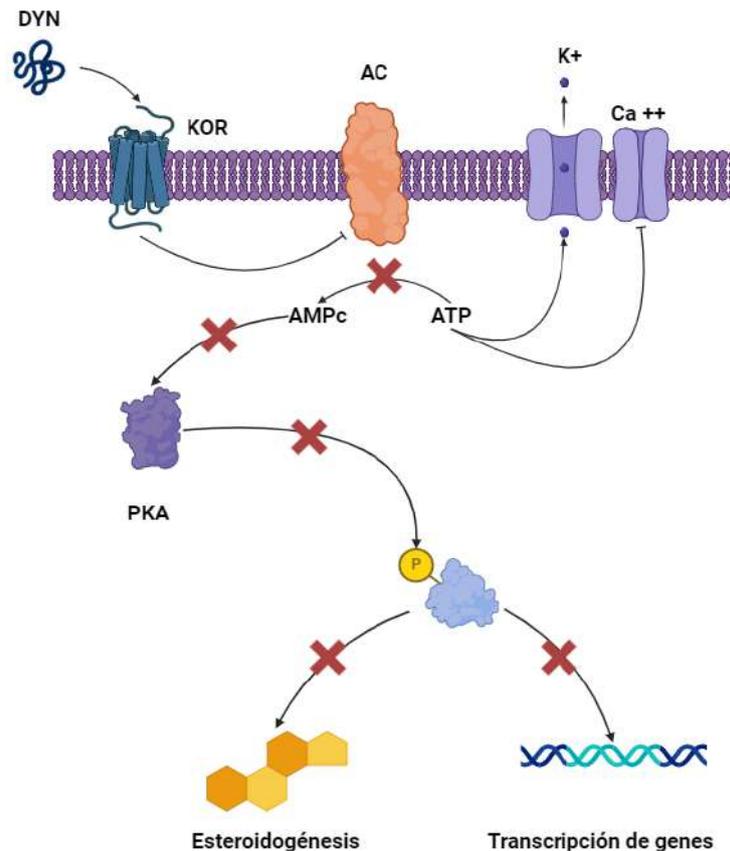


Figura 6. Vía de señalización del receptor de dinorfina. Activación de un receptor KOR por la interacción con DYN, promoviendo la inhibición de la AC, lo que inhibe la producción de AMPc y la actividad de la PKA encargada de fosforilar proteínas implicadas en la esteroidogénesis y la transcripción de una gran variedad de genes. **KOR.** Receptor opioide Kappa. **DYN.** Dinorfina. **AC.** Adenilato ciclasa. **AMPc.** Adenosín Monofosfato cíclico. **PKA.** Proteína cinasa A. **ATP.** Adenosina Trifosfato. (Imagen elaborada en el Laboratorio de Bioquímica Hormonal, Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ).

R-DYN dentro del genoma humano está codificado por el gen *OPRK1* por un total de 1143 pares de bases (pb), se ubica en el brazo corto del cromosoma 8 (8p11.23) y lo constituyen 3 exones [Exón 1: 257 pb. Exón 2: 353 pb. Exón 3: 533 pb] (**Figura 7**) que codifican para 380 aminoácidos (Uniprot, P41145-OPRK_HUMAN,03-2024). R-DYN presenta 3 dominios: uno extracelular, que al interactuar con su ligando, la dinorfina A, puede formar heterómeros con otros receptores como DOR y/o MOR (Dhaliwal & Gupta, 2023), uno transmembrana que atraviesa la membrana con 7 dominios diferentes de tipo $G_{i/o}$ (Han, et al., 2023) y otro intracelular que es el dominio de unión a proteína G responsable de la señalización de inhibición de la AC (Ferré, et al., 2019).

Existen diversos estudios de asociación genética que vinculan polimorfismos en este gen con trastornos cognitivos, abuso de drogas y sensibilidad al dolor (Di Santo, et al., 2022), sin embargo, no existen estudios que relacionen polimorfismos en el gen *OPRK1* con alteraciones en la señalización por la unión con DYN-A.

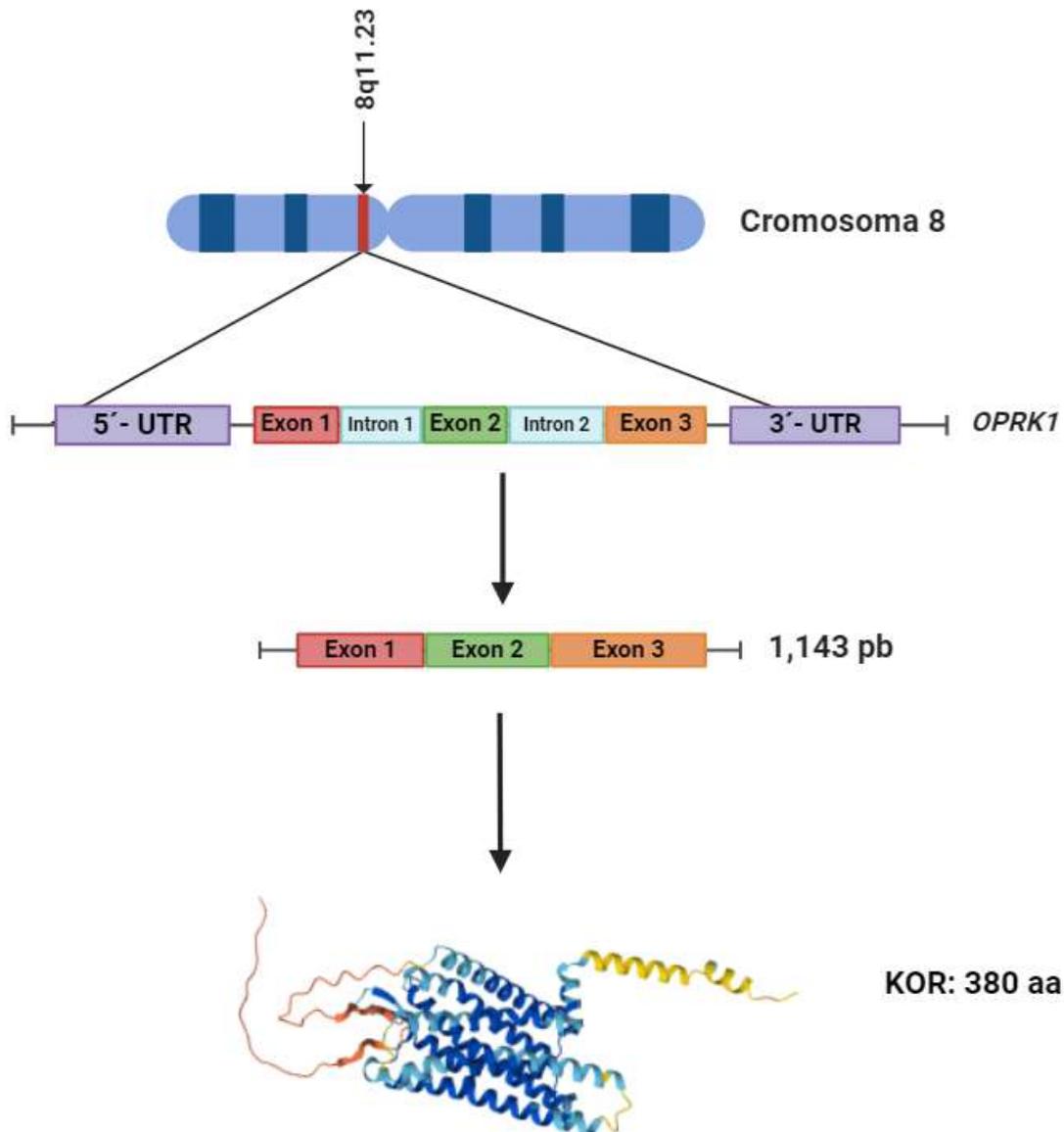


Figura 7. *OPRK1* y R-DYN. Ubicación genómica del gen *OPRK1*. Transcripción y traducción del gen para formar el receptor de dinorfina que es un receptor opioide tipo kappa (KOR). (Imagen elaborada en el Laboratorio de Bioquímica Hormonal, Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ; estructura de KOR extraída de la base de datos AlphaFold, P41145 el 17/07/2024).



3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La POI es un padecimiento que abarca un amplio espectro de anomalías clínicas que se caracterizan por la pérdida de la función ovárica adecuada, la padecen alrededor del 1-3% de la población de mujeres menores de 40 años con un cariotipo normal 46, XX, dentro de las que el 74-90% de las pacientes tienen una etiología molecular desconocida. Se relaciona con diversas complicaciones entre las que se destaca un incremento en el riesgo de padecer trastornos cardiovasculares, osteoporosis, deterioro cognitivo e infertilidad.

Estudios recientes han demostrado asociación de múltiples genes con POI, lo que ilustra la heterogeneidad genética de esta enfermedad. Estos hallazgos podrían sugerir una interacción dinámica entre los genes de las neuronas KNDy y la disfunción ovárica. Para comprobar la relación de uno de estos genes, el gen *OPRK1* con la POI utilizaremos el tamizaje molecular mediante PCR-SSCP, la secuenciación Sanger y pacientes con POI-no relacionadas, para las que el fenotipado clínico y los estudios moleculares no han arrojado previamente un diagnóstico molecular.



3.1 HIPÓTESIS

Las pacientes con hipogonadismo hipergonadotrópico asociadas a POI podrían presentar variantes patogénicas o mutaciones en la región codificante del gen *OPRK1*.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 GENERALES

Identificar y determinar variantes en el gen *OPRK1* en pacientes con POI con etiología molecular desconocida.

3.2.2 PARTICULARES

1. Analizar la región exónica del gen *OPRK1* en pacientes con POI y en población femenina sana con la finalidad de identificar posibles sustituciones/variantes de un solo nucleótido (SNV), inserciones (INS), deleciones (DEL), inserciones/deleciones (INDEL) o duplicaciones (DUP).
2. Determinar el tipo de variante del gen *OPRK1* en pacientes con POI y comprobar la alteración genética en individuos sanos control.
3. Genotipificar la variante genética del gen *OPRK1* en individuos libres de POI con el objetivo de establecer si existe una variante genética o es parte de la variabilidad genética natural en el genoma humano de una población.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Participantes

Se seleccionaron 14 pacientes femeninas menores de 40 años con diagnóstico de POI idiopática en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) quienes aceptaron su participación mediante un consentimiento informado, el cual se encuentra anexado al final del presente trabajo. Para ser seleccionadas las pacientes debían presentar amenorrea primaria o secundaria por al menos 4 meses, así como el diagnóstico de POI a través de una confirmación bioquímica basada en dos determinaciones con un mes de diferencia en el que los niveles de FSH en suero superen valores de 40 UI/L. Los criterios de exclusión fueron pacientes femeninas mayores de 40 años, que padezcan enfermedades genéticas, anomalías cromosómicas, enfermedades autoinmunes, que estén o hayan estado bajo tratamiento contra cáncer, con obesidad o que presenten adicción al tabaco. El grupo control fue conformado por 100 pacientes femeninas de origen mexicano menores de 40 años, que presentaran un buen funcionamiento gonadal y que no cumplieron con ninguno de los criterios de exclusión antes mencionados. El proyecto de Investigación fue autorizado por el Comité de ética en Investigación del INCMNSZ (BRE-3594-21-24-1). El estudio se adhirió estrictamente a las directrices de Helsinki y los principios éticos para la investigación médica en seres humanos, incorporando todas las modificaciones recientes.



4.2 Extracción de DNA genómico

A las 14 pacientes como a los 100 controles sanos se les tomaron 5 mL de sangre periférica, se colocaron en tubos cónicos de 50 mL con 200 μ L de EDTA 0.5 M/pH 8 y se mezclaron por inversión. Las muestras ya mezcladas se colocaron sobre hielo y se les añadieron 17.5 mL de solución fría de sacarosa tritón 2X (sacarosa 0.04 M, Tris-base 0.02 M, $MgCl_2$ 0.01 M, Tritón 100X 2%), se llevaron a 25 mL con agua estéril, desionizada y destilada (H_2O_{dd}) y se mezclaron por inversión. Se pusieron en hielo por 10 minutos mientras se mezclaban continuamente. Las muestras se centrifugaron (1000 xg/15 minutos/4 °C), se decantó el sobrenadante obteniéndose un precipitado celular que se lavó con 5 mL de solución sacarosa tritón 1X con una posterior centrifugación (1000 xg/15 min/4 °C). Se volvió a decantar para obtener un precipitado el cual se resuspendió con 3 mL de solución de lisis nuclear (Tris-base 10 mM, NaCl 400 mM, EDTA disódico 2 mM), 108 μ L de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20% y 100 μ L de proteína cinasa K (5 mg/mL), se mezcló y se colocó en una incubadora *BOEKEL Incubator Shaker II Modelo 136400* con agitación suave a 50 °C durante 2 horas. El contenido de los tubos se transfirió a tubos cónicos estériles de 15 mL y se les añadió 1 mL de NaCl saturado, se agitaron de forma vigorosa durante 15 segundos y posteriormente se centrifugaron (1000 xg, 15 minutos, 4 °C), el sobrenadante que se obtuvo se traspasó a tubos cónicos de 15 mL estériles y se les añadió dos volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión hasta observar que el DNA precipitó. El DNA precipitado se extrajo con una pipeta Pasteur sellada y se lavó el DNA con etanol al 70% durante 30 segundos y se dejó secar adherido a la pipeta Pasteur durante aproximadamente 30 segundos. En tubos de microcentrífuga de 0.5 mL se agregaron 400 μ L de Tris-EDTA (1 mL de Tris 1M y 0.02 mL de EDTA 0.5 M pH 8), se introdujo la punta de la pipeta Pasteur que tenía adherido el DNA y se agitó hasta que este se desprendiera. El DNA se dejó disolver a temperatura ambiente y finalmente se cuantificó el DNA en un espectrofotómetro *Beckman DU 650* verificando también su pureza. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su utilización.



4.3 Amplificación del gen *OPRK1* mediante PCR punto final

4.3.1 Diseño de oligonucleótidos

Para cada uno de los 3 exones que conforman el gen *OPRK1* se diseñaron oligonucleótidos específicos empleando el software de IDT PrimerQuest™ Tool en la página <https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index> (**Tabla 1**) de tal forma que se obtuvieran productos de alrededor de 200–300 nucleótidos, por lo que fue necesario dividirlos en distintas regiones del exón respectivo (**Figura 8**).

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para cada región exónica del gen *OPRK1*.

Exón	Oligonucleótidos	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)
1A	DR-11	5'-CCTGTCCTCGCCTTCCT-3'	233
	DR-12	5'-AGTAGACCGCCGTGATGAT-3'	
1B	DR-13	5'-CAGCAGCGCCTGGTTTC-3'	241
	DR-14	5'-CCTGACCCTCACTCCCT-3'	
2A	DR-21	5'-CATTACCTTATGGGTTGACTTG-3'	249
	DR-22	5'-AGGTGAAGATGCTGGTGAAC-3'	
2B	DR-23	5'-GGGATGTGCTGTGCAAGATA-3'	310
	DR-24	5'-GGCCTACTCACGCTCAAATTA-3'	
3A	DR-31	5'-ACTTTGCAGCCACGGTAATA-3'	266
	DR-32	5'-TACGCAGGTTGCGATCTT-3'	
3B	DR-33	5'-CTGATGATCCTGCGTCTCAAG-3'	239
	DR-34	5'-GGATTACAGCTACTGTTGGTATAG-3'	
3C	DR-35	5'-GCTGCTCTCCAGCTATTAC-3'	260
	DR-36	5'-CCCGAAGAACTGTACGAAGAC-3'	
3D	DR-37	5'-GGGACATCGATGGGATGAATAA-3'	250
	DR-38	5'-TAGAGAAGAGGTGCATGTGTTG-3'	

* pb. Pares de bases



Figura 8. Representación de alineamiento de los oligonucleótidos diseñados. Se muestra de manera gráfica el alineamiento de los oligonucleótidos diseñados con el software PrimerQuest™ Tool de IDT. **Verde.** Exón 1. **Anaranjado.** Exón 2. **Azul.** Exón 3. (Imagen elaborada en el Laboratorio de Bioquímica Hormonal, Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ).



4.3.2 Estandarización de condiciones de PCR

Se optimizaron las condiciones de temperatura de alineamiento y concentración de MgCl₂ para llevar a cabo la amplificación por PCR. Para esto se utilizaron muestras de DNA de control y se realizaron diversas reacciones de PCR (**Tablas 2 y 3**) en un termociclador *Veriti 96 Well Thermal Biosystems* con un gradiente de temperatura de 58 °C, 60 °C y 62 °C y con concentraciones de 2.0 y 2.5 mM de MgCl₂ para cada par de oligonucleótidos.

Tabla 2. Volúmenes (µL) para PCR a 2.0 mM de MgCl₂.

No.	H ₂ Odd	Buffer 5X	dNTPs	Oligo 5´	Oligo 3´	MgCl ₂	GoTaq	DMSO	gDNA
1									
2	10.3	4.0	0.5	0.5	0.5	1.6	0.1	1.0	1.5
3									
Mmix	30.9	12.0	1.5	1.5	1.5	4.8	0.3	3.0	4.5

*H₂Odd. Agua desionizada destilada. dNTPs. Nucleótidos trifosfato. GoTaq. Polimerasa. DMSO. Dimetil sulfóxido. gDNA. DNA genómico.

Tabla 3. Volúmenes (µL) para PCR a 2.5 mM de MgCl₂.

No.	H ₂ Odd	Buffer 5X	dNTPs	Oligo 5´	Oligo 3´	MgCl ₂	GoTaq	DMSO	gDNA
1									
2	9.9	4.0	0.5	0.5	0.5	2.0	0.1	1.0	1.5
3									
Mmix	29.7	12.0	1.5	1.5	1.5	6.0	0.3	3.0	4.5

*H₂Odd. Agua desionizada destilada. dNTPs. Nucleótidos trifosfato. GoTaq. Polimerasa. DMSO. Dimetil sulfóxido. gDNA. DNA genómico.



4.3.3 Amplificación del gen *OPRK1* en pacientes y controles sanos.

Se realizó la amplificación de las distintas regiones de los exones que codifican el gen *OPRK1* (1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 3C y 3D) de las 14 pacientes con POI y los 100 controles sanos. Para cada una de las reacciones se agregaron 4 μL de solución buffer 5X (Promega, Madison, WI, EUA), 0.5 μL de solución de dNTPs (10 mM), 0.5 μL de oligonucleótidos 5' (20 μM), 0.5 μL de oligonucleótidos 3' (20 μM), 1.6 ó 2.0 μL de MgCl_2 25 mM (Promega, Madison, WI, EUA), 0.1 μL de GoTaq (Promega, Madison, WI, USA), 1.0 μL de DMSO, 1.5 μL de DNA genómico y se llevaron a un volumen final de 20 μL por reacción con H_2O . Las reacciones se llevaron a cabo utilizando un termociclador *Veriti 96 Well Thermal Biosystems* siguiendo las condiciones ya estandarizadas para las PCR indicadas en las **Tablas 4 y 5**.

Tabla 4. Condiciones de PCR.

No. ciclos	Condición 1	Condición 2	Condición 3
1	94°C / 3 min		
30	94°C / 30 s	58, 60 y 62 °C / 30 segundos	72°C / 3 minutos
1			72°C / 3 minutos



Tabla 5. Valores estandarizados para las PCR.

Exón	Oligonucleótidos	Tamaño del amplicón (pb)	Temperatura (°C)	MgCl ₂ (mM)
1A	DR-11 DR-12	233	60	2.0
1B	DR-13 DR-14	241	60	2.5
2A	DR-21 DR-22	249	60	2.5
2B	DR-23 DR-24	310	60	2.5
3A	DR-31 DR-32	266	60	2.5
3B	DR-33 DR-34	239	60	2.5
3C	DR-35 DR-36	260	60	2.5
3D	DR-37 DR-38	250	60	2.5

* pb. Pares de bases. mM. milimolar

Los productos se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) en TBE 0.5X (TBE 5X: 27.5 g ácido bórico, 54.0 g Tris base y 20 mL EDTA 0.5 M). Se cargó el gel con las muestras adicionadas con una solución de carga para DNA y se compararon con un marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb. La electroforesis corrió por una hora a 100 V, al finalizar se observó el gel en un transiluminador *ChemiDoc XRS+ Moléculas Imager BioRad* con el programa *Image Lab*.



4.4 Análisis de mutaciones mediante SSCP

Las muestras se prepararon para su análisis por la técnica de SSCP mezclando 2 µL de los productos amplificados con 13 µL solución de carga de SSCP (azul de bromofenol 0.05%, formamida 95% y EDTA 20 mM) y 0.1 µL de solución de dCTP marcado en α con ³²P (3,000 Ci/mmol), se desnaturalizaron a 94 °C por 5 minutos y se incubaron inmediatamente a 4 °C por 10 minutos. Una vez tratadas, las muestras se cargaron en cuatro sistemas electroforéticos de 30x40 cm con geles de poliacrilamida de distintas características detalladas en la **Tabla 6**: 5.4% con glicerol, 5.4% sin glicerol, 8.0% con glicerol y 8.0% sin glicerol, permitiendo observar la migración electroforética en geles de diferentes densidades. Los geles se dejaron correr por 18–20 horas a 200–250 V empleando una solución de corrida TBE 0.5X. Por último, los geles se transfirieron a papel *Whatman 3MM* y se secaron en *Slab Gel Dryer Savant* a 70 °C por una hora. Durante 3 horas se expusieron en una pantalla *Molecular Imager FX Imaging Screen-K Bio-Rad* y se empleó un escáner *PMI Personal Molecular Imager™ FX BioRad* con el programa *Quantity One*.

Tabla 6. Preparación de geles de poliacrilamida.

Reactivo	Gel de poliacrilamida 5.4%		Gel de poliacrilamida 8.0 %	
	Con glicerol	Sin glicerol	Con glicerol	Sin glicerol
H₂O	35.91 mL	42.91 mL	29.85 mL	36.85 mL
Glicerol	7.0 mL	-----	7.0 mL	-----
TBE 5X	14.0 mL	14.0 mL	14.0 mL	14.0 mL
Acrilamida/ Bisacrilamida 29:1	12.6 mL	12.6 mL	18.66 mL	18.66 mL
Persulfato de amonio 10%	490 µL	490 µL	490 µL	490 µL
TEMED	24.5 µL	24.5 µL	25.0 µL	25.0 µL

*H₂O. Agua desionizada destilada. **TBE.** Tris-Borato-EDTA. **TEMED.** N-N'-N'-N'-tetrametiletildiamida



4.5 Purificación de productos por electroelución

Se seleccionaron las muestras que por la técnica de SSCP revelaron la presencia de cambios de conformación en las cadenas sencillas de DNA (ssDNA), así como una de las muestras control que no presentaron dichos cambios. Se realizó la amplificación por cuadruplicado de las muestras seleccionadas siguiendo las condiciones ya descritas en la sección ***Amplificación del gen OPRK1 en pacientes y controles sanos***, se mezclaron las alícuotas de reacciones iguales y se cargaron en un gel de agarosa al 1% con 20 μ L de solución de carga para DNA, se dejó correr la electroforesis por 1 hora a 100 V y se analizó en un transiluminador *UVP Chromato-vue Modelo TM-36*. Los fragmentos donde se observó la presencia del producto de interés fueron cortados y extraídos del gel. Cada uno de estos fragmentos se colocaron en una membrana de diálisis, previamente tratadas con H₂Odd y TBE 0.5X, y se les añadió 300 μ L de TBE 0.5X, se dejaron electroeluir por 15 minutos a 100 V. Una vez finalizada, se transfirió el volumen contenido en cada membrana a columnas *Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filters Merck Millipore* y se centrifugaron a 1200 xg por 10 minutos. Por último, el DNA purificado se colectó en tubos de microcentrífuga y se verificó su pureza empleando un gel de agarosa al 1% con las condiciones descritas anteriormente.



4.6 Secuenciación Sanger de muestras purificadas

Se utilizó el estuche de secuenciación *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* y las muestras de DNA purificado. Para cada muestra se realizaron dos reacciones constituidas por 0.5 μ L H₂Odd. 2.0 μ L de BigDye Terminator Reaction Mix, 1.0 μ L de BigDye Solution 5X, 1.0 μ L de solución de oligonucleótido y 1.0 μ L de muestra de DNA purificado, en una de las reacciones se añadió la solución de oligonucleótido 5' y en la segunda la solución de oligonucleótido 3'. Las reacciones se llevaron a cabo empleando un termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* por 1 ciclo a 95 °C por 1 minuto y 35 ciclos inicialmente a 96 °C por 10 segundos, después a 50 °C por 5 segundos y finalmente a 60 °C por 4 minutos.

Al terminar, los productos se purificaron agregando 45 μ L de SAM Solution y 10 μ L de BigDye XTerminator Solution con agitación durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 1000 xg por 2 minutos en una microcentrífuga *Eppendorf 5415 C*. Para finalizar, se recuperaron los sobrenadantes y se transfirieron a nuevos tubos de microcentrífuga para ser analizados en un secuenciador automatizado *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer Modelo 310 AppliedBiosystems* y con el programa *Chromas Lite 2.6*.



4.7 Análisis del equilibrio Hardy-Weinberg y prueba estadística χ^2

Se realizó la determinación del equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) para corroborar que exista “equilibrio genético” en dos poblaciones (14 pacientes con POI y 100 controles sanos). Para esto se determinaron las frecuencias de los genotipos y alelos presentes en las poblaciones a partir de la ecuación de equilibrio H-W

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Frecuencia alélica

Frecuencia alelo G = p

Frecuencia alelo T = q

Frecuencia genotípica

Frecuencia genotipo GG = p^2

Frecuencia genotipo GT = $2pq$

Frecuencia genotipo TT = q^2

$$\frac{\text{Copias del alelo } x}{\text{Total de alelos en población}}$$

$$\frac{\text{Individuos que presentan el genotipo}}{\text{Total de individuos}}$$

$$\frac{\text{Copias del alelo } x}{2 * \text{Total de individuos}}$$

Tras obtenerse los valores observados (datos de la muestra) y esperados (calculados) de las frecuencias genotípicas se realizó la prueba estadística de χ^2 para compararlas y determinar si se encuentran o no en equilibrio H-W. Cada uno de los grupos se analizó empleando la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

O_i = Cada frecuencia observada

E_i = Cada frecuencia esperada

Para finalizar, se determinó el valor de P empleando la tabla de χ^2 considerando un nivel de significancia (α) de 0.05 y 2 grados de libertad (gl).



5. RESULTADOS

El tamizaje molecular de las regiones codificantes del gen *OPRK1* en pacientes con POI comenzó con la estandarización de las condiciones de PCR. Para ello se realizó la amplificación de las regiones exónicas con muestras de controles sanos con los oligonucleótidos diseñados con un gradiente de temperatura (58 °C, 60 °C, 62 °C) y distintas concentraciones de MgCl₂ (2.0 mM y 2.5 mM). Los exones se dividieron en productos de aproximadamente 200–300 pb (1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 3C y 3D), en la **Figura 9** se observa que todas las regiones amplificaron a 60 °C, sin embargo, la región 1A amplificó con una concentración de 2.0 mM de MgCl₂ (**Figura 10**), mientras que el resto requirió una concentración de 2.5 mM de MgCl₂ para una correcta amplificación.

Teniendo en cuenta las condiciones ya estandarizadas de temperatura y concentración de MgCl₂ para la amplificación de cada región, se llevaron a cabo las reacciones específicas de amplificación para cada región del gen *OPRK1* con las muestras de pacientes con POI (14) y controles sanos (100). Tras analizarse en un gel de agarosa al 1% se observó que todos los productos correspondían al tamaño esperado de alrededor de 200–300 pb, por lo que se descartó la presencia de inserciones, deleciones o duplicaciones de gran tamaño.

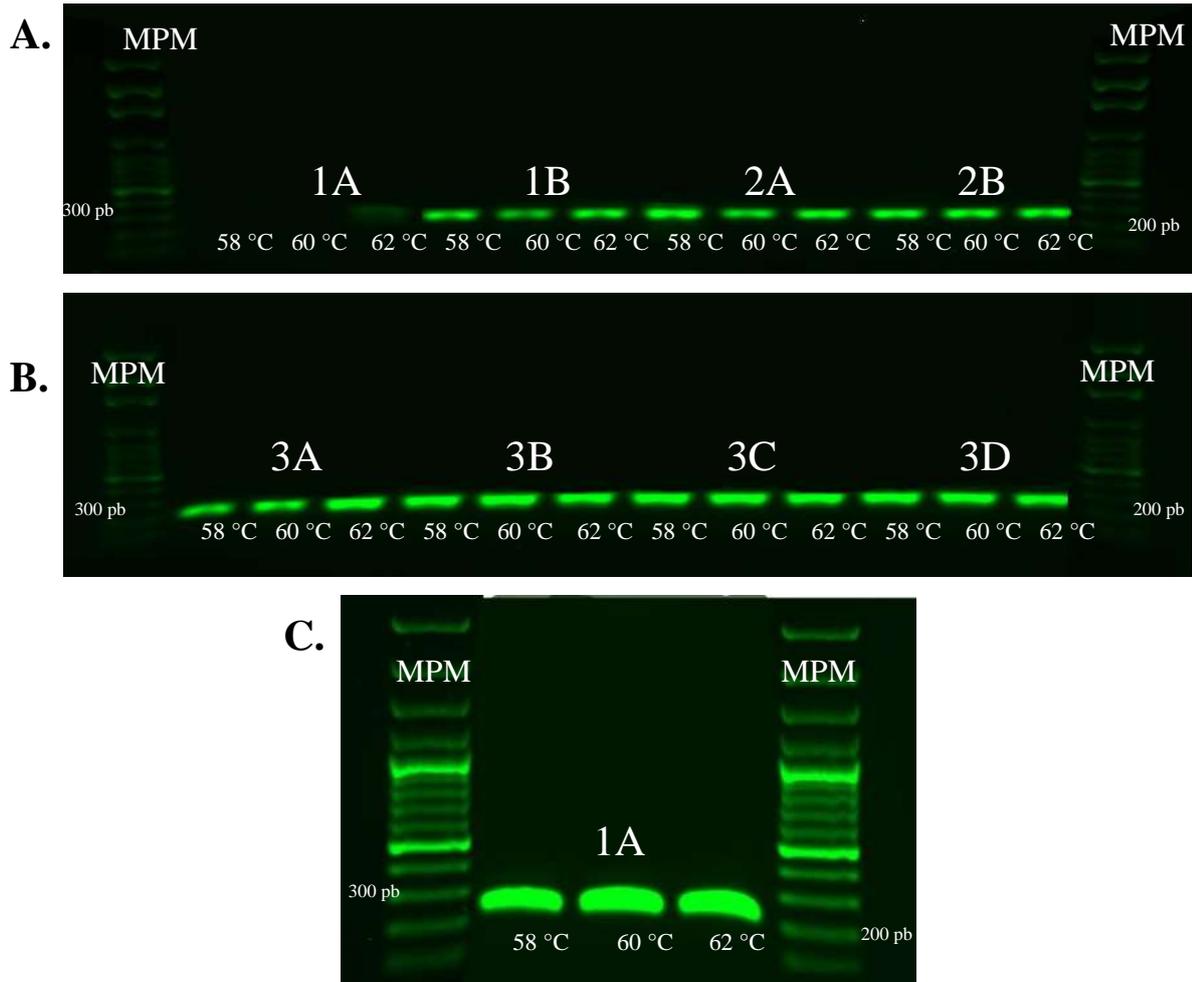


Figura 9. Estandarización de las condiciones de PCR. Amplificación de las regiones exónicas que conforman el gen *OPRK1*. **A.** Regiones de los exones 1 y 2 a 58 °C, 60 °C y 62 °C con 2.5 mM de MgCl₂. **B.** Regiones del exón 3 a 58 °C, 60 °C y 62 °C con 2.5 mM de MgCl₂. **C.** Región 1A a 58 °C, 60 °C y 62 °C con 2.0 mM de MgCl₂. **MPM.** Marcador de pesos moleculares escalera de 100 pb.

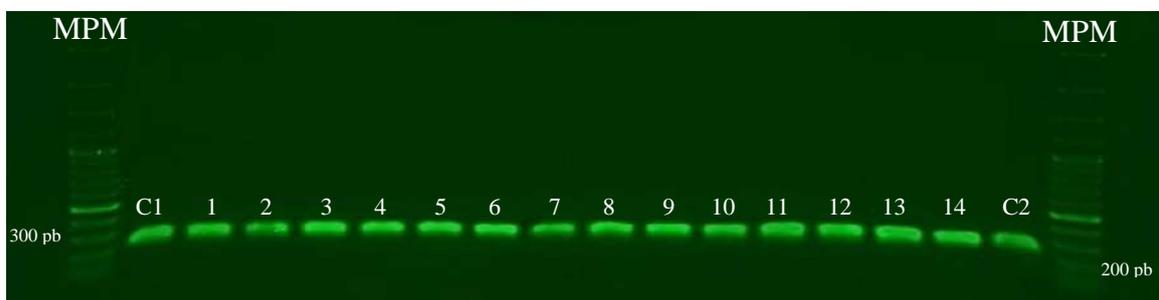


Figura 10. Imagen representativa de la amplificación del gen *OPRK1*. Amplificación de la región 1A en pacientes con POI (1–14) y controles (C1 y C2) a 60 °C y 2.0 mM MgCl₂.

MPM. Marcador de pesos moleculares, escalera de 100 pb.

Se realizó el análisis de las muestras de las pacientes con POI y los controles sanos mediante la técnica de SSCP empleando productos de PCR amplificados con dCTP marcado en α con ^{32}P . Para cada una de las regiones de los diferentes exones que conforman al gen *OPRK1* se emplearon 4 sistemas electroforéticos distintos: geles de poliacrilamida al 5.4% y 8.0% con y sin glicerol. Únicamente en la región 1A de una de las pacientes se observó una variación en la migración electroforética apreciable en 3 de los 4 sistemas, este cambio fue más visible en el gel al 8.0% sin glicerol (**Figura 11**). Esta variación representa un cambio en la conformación estructural del ssDNA en dicha región del gen, lo que indica una variante genética en una paciente. En el resto de las regiones la migración electroforética es idéntica en comparación con las demás muestras y los controles con los que se comparó, por lo que se descartó la presencia de alguna variación en alguna otra región del gen (**Figura 12**).

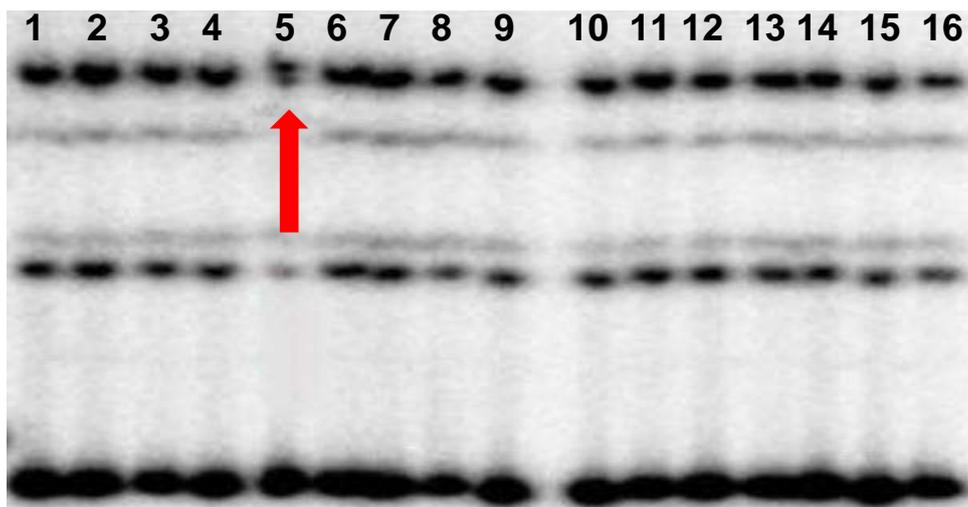


Figura 11. Imagen representativa del análisis por la técnica de SSCP. Migración electroforética de la región 1A del gen *OPRK1* en gel de poliacrilamida al 8.0% sin glicerol. Se muestran 2 controles sanos (carriles 1 y 16) y 14 pacientes con POI (carriles 2-15). Se señala un cambio en la migración electroforética de la muestra del paciente 4 (carril 5).

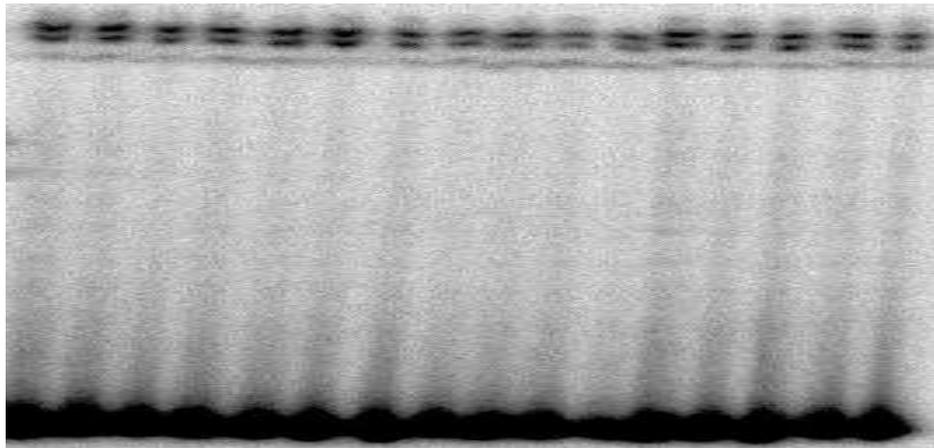


Figura 12. Imagen representativa del análisis por la técnica de SSCP. Migración electroforética del exón 2B del *OPRK1* en gel de poliacrilamida al 8.0% con glicerol. Se muestra una ausencia de variación nucleotídica en la migración electroforética. Se muestran 2 controles sanos (carriles 1 y 16) y 14 pacientes con POI (carriles 2–15).

Para confirmar e identificar el cambio de alguna base nucleotídica en la muestra de la paciente con POI que presentó la variación de migración electroforética, se purificó y secuenció la región 1A de la paciente, así como de uno de los controles sanos. Al compararse ambas secuencias se encontró un cambio de nucleótido (c.36G>T) en uno de los alelos, que codifica para una mutación silenciosa p.Pro12= (**Figura 13**).

Por último, se realizó la genotipificación de la variante empleando las 14 muestras de las pacientes con POI idiopático así como de los 100 controles sanos. Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas observadas y esperadas (**Tablas 7 y 8**) y por medio de la prueba estadística de χ^2 se comprobó si la población se encontraba en equilibrio H-W.

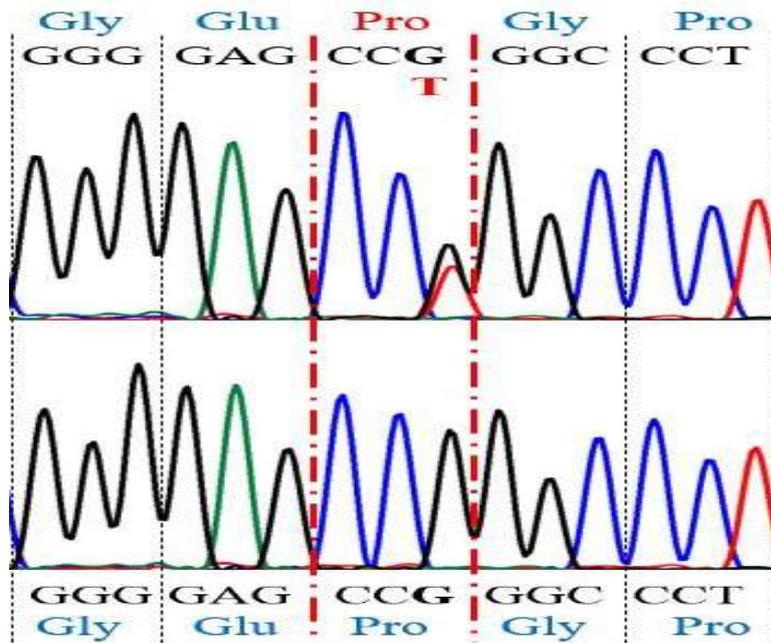


Figura 13. Parte de la secuencia de la región 1A del gen *OPRK1*. Se presenta un fragmento de la secuenciación de la región 1A del gen *OPRK1* para una de las pacientes con POI con variante en un alelo y un control sano sin cambios.

Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas en pacientes con POI y controles sanos.

Genotipos	Pacientes POI (n=14)		Controles sanos (n=100)	
	Frecuencias genotípicas	Frecuencias alélicas	Frecuencias genotípicas	Frecuencias alélicas
GG	0.93 (13)	p = 0.96 q = 0.04	100	p = 1.00 q = 0.00
GT	0.07 (1)		0.00 (0)	
TT	0.00 (0)		0.00 (0)	

*n. Tamaño de muestra. p. Alelo p. q. Alelo q.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas esperadas en pacientes con POI y controles sanos.

Genotipos	Frecuencias genotípicas (POI)	Frecuencias genotípicas (Controles)
GG	0.922	1.00
GT	0.076	0.00
TT	0.002	0.00



Tabla 9. Comprobación de equilibrio H-W por análisis estadístico con χ^2 . Se empleó un nivel de significancia (α) del 0.05.

Población	n	gl	X²_c	X²_t	Significativo
Pacientes POI	14	1	0.00254	3.84	NO
Control	100	1	0.00	3.84	NO

* **n.** Tamaño de muestra. **gl.** Grados de libertad. **X²_c.** Valor de chi cuadrada calculada. **X²_t.** Valor de chi cuadrada de tablas.



6. DISCUSIÓN

Una regulación adecuada del eje HHO permite mantener en condiciones óptimas la actividad ovárica que es necesaria para la diferenciación sexual y la salud reproductiva femenina, ya que en este se llevan a cabo procesos que permiten una posible fecundación; asimismo el mantenimiento de la homeóstasis fisiológica de una gran cantidad de órganos, entre ellos los huesos, el cerebro y el corazón (Kodaman, P.H., 2010). Como parte de esta regulación se encuentra un subconjunto de neuronas denominadas como neuronas KNDy que han sido localizadas en el núcleo arcuato hipotalámico de mamíferos (Moore, A.M., et al., 2018). La actividad interconectada de estas neuronas permite la modulación de la generación de pulsos de GnRH y con ello el control de la liberación de LH y FSH, glicoproteínas encargadas de promover la síntesis de las hormonas esteroideas sexuales en los folículos ováricos para el mantenimiento y el desarrollo de los ovocitos (Potau, N. & Carreño, A., 2007).

Se ha reportado que en mujeres existe un número finito de folículos ováricos que descienden de forma gradual a medida que avanzan sus años reproductivos hasta que son deficientes para conseguir reproducirse (Zhu, Q., et al., 2023), sin implicar un riesgo a su salud en la mayoría de los casos. Las investigaciones indican que alrededor de los 45–55 años, la población femenina comienza a presentar de forma natural una pérdida de la función folicular y una disminución en los niveles de estrógenos, comúnmente denominada como menopausia (OMS, 2022); en la que se dejan de producir y desarrollar ovocitos, lo cual provoca una dificultad para concebir o incluso la infertilidad cuando se abate su reserva ovárica. Aproximadamente el 1–3% de la población padece POI, presentando alteraciones en el ciclo menstrual y un decaimiento drástico de la reserva y función ovárica antes de los 40 años, en muchos casos deriva en infertilidad debido a la disminución en los niveles de estrógenos, además que puede implicar un riesgo grave a la salud a largo plazo debido a una mayor susceptibilidad con problemas cardiovasculares, osteoporosis y deterioro cognitivo (Tsiligiannis, S., et al., 2019).



En las neuronas KNDy se expresan tres principales péptidos KISS, NKB y DYN, el receptor de este último, R-DYN, se encuentra codificado por el gen *OPRK1* y podría ser considerado como un factor regulador en la síntesis de hormonas esteroides sexuales (Dai, M., et al., 2021), por lo que se propone que una variación en el gen *OPRK1* podría probablemente inducir una alteración en los niveles normales de estas hormonas causando POI.

Este proyecto tuvo como finalidad determinar e identificar variantes genéticas o mutaciones en el gen *OPRK1* en pacientes diagnosticados clínicamente con POI y con una etiología molecular desconocida, por lo que fue necesaria la participación de 14 pacientes femeninas con diagnóstico de POI idiopático menores de 40 años; sin padecimientos de enfermedades genéticas, anomalías cromosómicas, enfermedades autoinmunes, que estuviesen o hayan estado bajo tratamiento contra cáncer, con obesidad o que presentaran adicción al tabaco, así como de 100 controles sanos.

El método empleado de tamizaje genético por PCR-SSCP nos permitió observar de forma rápida, sencilla y específica las variantes genéticas (Inglés, et al., 2018) que se presentan en el gen *OPRK1* de pacientes con POI y permitiendo comparar entre más de dos muestras de forma simultánea si existía algún cambio en su secuencia de manera general; y así evitar en medida de lo posible la secuenciación masiva de las muestras y por consiguiente reducir costos y tiempos de análisis. Esta técnica al basarse en la migración electroforética en geles de agarosa y geles no desnaturizantes de poliacrilamida, nos permite analizar las hebras de DNA según la estructura secundaria que adopten y es dependiente únicamente de su secuencia nucleotídica. Por lo tanto, al existir una movilidad electroforética distinta en el DNA de las pacientes en comparación con una muestra de DNA sin padecimientos clínicos (control sano) es indicativo de la presencia de una diferencia puntual en las secuencias (Ramírez, A., et al. 2013).

Los resultados obtenidos en este proyecto evidenciaron que en una de las pacientes se observaba una variante c.36G>T que codifica para un cambio sinónimo (p.Pro12=), por lo tanto no se generó un cambio en la cadena de



aminoácidos del receptor para DYN. Anteriormente, este tipo de variantes no habían recibido la debida atención debido a que estas variantes no afectan a la estructura o conformación de las proteínas (Sharma, Y., et al., 2019). Sin embargo, estudios recientes han descrito que las variantes sinónimas pueden influir en el estructura y estabilidad, plegamiento e incluso la traducción del RNA; por lo que son factores importantes en algunas enfermedades y tienen relevancia en la práctica clínica (Sauna, Z. E., & Kimchi-Sarfaty, C., 2011). En una revisión reciente se reportan tres casos en que variantes sinónimas pueden verse relacionadas a enfermedades, las cuales son: 1) variantes sinónimas en el gen *MECP2* crean sitios donadores de empalme prematuro, lo que altera su plegamiento causando el síndrome de Rett; 2) la variante $\Delta F508$ del gen *CFTR* provoca una alteración en su estructura secundaria lo cual ocasiona casos clínicos de fibrosis quística; 3) alteraciones en el sitio de unión de los microRNAs del gen *IRGM* aumentan la susceptibilidad a la enfermedad de Crohn (defensa frente a infecciones) por xenofagia desregulada (Hunt, R.C. & Kimchi-Sarfaty, C., 2022). De igual manera existen investigaciones que evidencian que no en todos los casos este tipo de variantes terminan en un cuadro patológico, cómo lo reportaron Martínez, G.A., Vásquez, J.A. y Cruz, C.S. en su artículo enfocado en la psiquiatría genética en la que revisaron distintos estudios de GWAS asociados a trastornos psiquiátricos como el trastorno bipolar, esquizofrenia, autismo, entre otros. En él concluyen que existe una gran variabilidad genética en la población como para extrapolar resultados al comparar distintos grupo étnicos, ya que se han descrito distintas variaciones que no en todos los grupos derivan en algún tipo de trastorno (Martínez, G.A., et al., 2010); tomando en cuenta ambas perspectivas se realizó el estudio de genotipificación para confirmar o descartar que la variante descrita no formara parte de la variabilidad genética normal del genoma humano en la población.

En este proyecto se requirió llevar a cabo un análisis comparativo entre 14 muestras de pacientes con POI y 100 controles sanos mediante el equilibrio Hardy-Weinberg y el método de χ^2 . Los datos indicaron que efectivamente la variante descrita forma parte de la variabilidad genética normal, por lo que no se le podría vincular como causante de la POI. Este tipo de variantes sinónimas o silenciosas sin consecuencias clínicas ha sido reportado previamente para



diferentes genes (Mares, L., et al., 2020, Ruiz, A. & Ramos, L., 2024). En la literatura, se han identificado variantes para el gen *OPRK1* asociadas con susceptibilidad a la dependencia hacia diferentes sustancias de abuso como el alcohol y los opioides (Albonaim, A., et al., 2017, Özkan, S., et al., 2023 & Edenberg, H.J., et al., 2008); así mismo, se ha reportado un aumento de la expresión del R-DYN en personas con trastorno depresivo mayor (Zhukovsky, P., et al., 2024) así como en pacientes que sufren pre-eclampsia (Wang, Y., et al., 2022), lo que lleva a sospechar que la vía de regulación por parte de las neuronas KNDy podría estar destinada a desempeñar tareas de mayor prioridad en un ámbito distinto a la regulación de la esteroidogénesis, cumpliendo un papel aún desconocido en la regulación hormonal.



7. CONCLUSIONES

A partir de los resultados presentados es posible apreciar que existe la presencia de una alteración en la secuencia nucleotídica del gen *OPRK1* en 1 de las 14 pacientes con diagnóstico de POI idiopático; sin embargo, a través del análisis de genotipificación por el método del equilibrio Hardy-Weinberg y el análisis estadístico por el método de χ^2 se concluye que estas variantes genéticas puntuales no son significativas; al no existir evidencia que vincule esta variante a la causalidad de la POI, se podría hipotetizar que representa únicamente una variante normal en el genoma del humano.

A pesar de estos hallazgos moleculares, no se descarta la idea de que este gen pueda tener alguna relación con la etiología de la POI aunque posiblemente de manera indirecta, ya que se ha demostrado que juega un papel importante en la regulación de la liberación de GnRH, con ello, se abre el campo de la investigación hacia otros puntos de la regulación ejercida por las neuronas KNDy y particularmente de la actividad del receptor de dinorfina en estas vías.



8. PERSPECTIVAS

Rediseñar el estudio con un mayor número de pacientes nos permitiría realizar conclusiones más acertadas, así mismo facilitaría el hecho de vincular algún factor genético a los pacientes diagnosticados con POI idiopático.

A partir de lo obtenido en este proyecto se propone estudiar otras vías de regulación por parte de las neuronas KNDy y trabajar distintos genes con posible asociación a la patología, esperando encontrar una posible relación para el diagnóstico de las pacientes.

Realizar investigaciones en genes tales como *GnRH*, *GnRHR*, *FSH*, *FSHR*, *LH*, y *LHR* relacionados a enfermedades nos permitirá avanzar para mejorar y conseguir el desarrollo de terapias génicas accesibles y poder combatir estas enfermedades que afectan a distintos grupos de la población.



9. REFERENCIAS

Albonaim, A., Fazel, H., Sharafshah, A., Omarmeli, V., Rezaei, S., Ajamian, F., & Keshavarz, P. (2017). Association of OPRK1 gene polymorphisms with opioid dependence in addicted men undergoing methadone treatment in an Iranian population. *Journal of addictive diseases*, 36 (4), 227–235. <https://doi.org/10.1080/10550887.2017.1361724>

Almaraz, A., Prieto, G.A. Valdez, H., Camacho, I., Villamar, O., Saqui, M., Neri, T., & Hernández, V.I. (2003) ¿Cómo actúan las hormonas esteroides? *Educación Química*, 14 (4). <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2003.4>

Araujo, M., Pascual, E., Ortíz, A.E., & Escobar, H.F. (2020). Eje hipotálamo hipofisiario. Fisiología y patología. *Medicine. Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13 (15), 846-855. <https://doi.org/10.1016/j.med.2020.09.003>

Aréchiga, C., Cortés, Z., Hernández, P., Flores, G., Rochín, F. & Ruiz, E. (2019). Revisión: Función y regresión del cuerpo lúteo durante el ciclo estral de la vaca. *Abanico veterinario*. 9. <https://doi.org/10.21929/abavet2019.924>

Ascona, M. (2013). Efectos de Administración de p-Cloroanfetamina en la Secreción de Estradiol y Estructura del ovario en la rata prepúber. Tesis de licenciatura. *Facultad de Estudios Superiores Zaragoza*.

Avila, A.V., Bussetti, J. A., Devalle, M. L., Murano, M. S., Sabatini, M. A., Wargon, V., Chuluyan, E. & Kozak, A. (2018). Linfocitos B, estrógenos y progesterona. *Bioquímica y Patología Clínica*, 83 (2), 36-43.

Barrios de Tomasi, J., Aguirre, F.J. & Aguirre, A. (2012). Desarrollo folicular en el ovario. *Revista Salud Quintana Roo*, 5 (19), 12-18.

Buitrón, F.R., Bailón, R., Santoyo, S. & Díaz, V. (2017). Evidencias en indicaciones de la progesterona. *Ginecología y obstetricia*, 85, (8).

Brugos, B., & Hochhaus, G. (2004). Metabolism of dynorphin A(1-13). *Die Pharmazie*, 59(5), 339–343.

Chelsom, E., Bhriain, H.N., Øksnes, M. & Lund, A. (2022). Prematur ovarialinsuffisiens. *Tidsskrift for Den norske legeforening/Revista de la Asociación Médica Noruega*, 142. DOI: 10.4045/timeskr.21.0675

Constantin, S. (2022). Targeting KNDy neurons to control GnRH pulses. *Current Opinion in Pharmacology*, 67, 1471-4892. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2022.102316>

Cordts, E. B., Christofolini, D. M., Dos Santos, A. A., Bianco, B., & Barbosa, C. P. (2011). Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. *Archives of gynecology and obstetrics*, 283 (3), 635–643. <https://doi.org/10.1007/s00404-010-1815-4>



Coutinho, E. A., Esparza, L. A., Hudson, A. D., Rizo, N., Steffen, P. & Kauffman A.S. (2022) Conditional Deletion of KOR (Oprk1) in Kisspeptin Cells Does Not Alter LH Pulses, Puberty, or Fertility in Mice. *Endocrinology*, 163 (12). doi: 10.1210/endo/bqac175.

Dai, M., Nakamura, S., Takahashi, C., Sato, M., Munetomo, A., Magata, F., Uenoyama, Y., Tsukamura, H. & Matsuda, F. (2021). Reduction of arcuate kappa-opioid receptor-expressing cells increased luteinizing hormone pulse frequency in female rats. *Endocrine Journal*, 68 (8), 933-941. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ20-0832>

Damdimpoulou, P., Chiang, C., & Flaws, J. A. (2019). Retinoic acid signaling in ovarian folliculogenesis and steroidogenesis. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 87, 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.04.007>

De Vos, M., Devroey, P. & Fauser, B.C. (2010). Primary ovarian insufficiency. *Lancet*, 376 (9744), 911-921. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60355-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60355-8)

Dhaliwal A, Gupta M. Fisiología del receptor opiode. [Actualizado el 24 de julio de 2023]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Ene-. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov.translate.google/books/NBK546642/?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=sge

Di Santo, G.P., Schiaffi, J., Rigalli, A., Esteban, M.E., Martina, P.F. & Catanesi, C.I. (2022). Variabilidad de los genes PDYN y OPRK1 en cuatro poblaciones argentinas y su asociación con variables clínicas relacionadas al dolor agudo post-quirúrgico. *BAG. Journal of basic and applied genetics*, 33 (2). <http://dx.doi.org/10.35407/bag.2022.33.02.01>

Edenberg, H. J., Wang, J., Tian, H., Pochareddy, S., Xuei, X., Wetherill, L., Goate, A., Hinrichs, T., Kuperman, S., Nurnberger, J. I., Jr, Schuckit, M., Tischfield, J. A., & Foroud, T. (2008). A regulatory variation in OPRK1, the gene encoding the kappa-opioid receptor, is associated with alcohol dependence. *Human molecular genetics*, 17 (12), 1783-1789. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn068>

Ensembl (2024). Gene OPRK1. Consultado el 16 de mayo de 2024 de la base de datos Ensembl.

Ferré, G., Czaplicki, G., Demange, P. & Milon, A. (2019). Structure and dynamics of dynorphin peptide and its receptor. *Vitamins and hormones*, 111, 17-47. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.05.006>

Filipiak, Y., Viqueira, M. & Bielli, A. (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *Veterinaria (Montevideo)*, 52 (202), 2.

Florentino, G., Cimadomo, D., Innocenti, F., Soscia, D., Vaiarelli, A., Ubaldi, F.M., Gennarelli, G., Rendimiento, L. & Zuccotti, M. (2022). Biomechanical forces and signals operating in the



ovary during folliculogenesis and their dysregulation: implications for fertility. *Human Reproduction Update*. 29 (1), 1-23. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac031>

Ge, W., Li, L., Dyce, P.W., De Felici, M. & Shen, W. (2019). Establishment and depletion of the ovarian reserve: physiology and impact of environmental chemicals. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76, 1729-1746. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03028-1>

Gómez, E., Larrea, F. & Martínez, F. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. 15 (1), 24-36.

Graff, A. & Christin-Maitre, S. (2019). Insuficiencia ovárica prematura. *Ginecología endocrina*, 55 (1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/S1283-081X\(19\)41709-8](https://doi.org/10.1016/S1283-081X(19)41709-8)

Hamoda, H. & Sharma, A. (2024). Premature ovarian insufficiency, early menopause, and induced menopause. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 38 (1). <https://doi.org/10.1016/j.beem.2023.101823>.

Han, J., Zhang, J., Nazarova, A.L., Bernhard, S.M., Krumm, B.E., Zhao, L., Lam, J.H., Rangari, V.A., Majumdar, S., Nichols, D.E., Katritch, V., Yuan, P., Fay, J.F. & Che, T. (2023). Ligand and G-protein selectivity in the κ -opioid receptor. *Nature*, 617 (7960), 417-425. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06030-7>

Harter, C. J. L., Kavanagh, G. S., & Smith, J. T. (2018). The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. *The Journal of endocrinology*, 238(3), R173–R183. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0108>

HGNC (2024) Symbol report of OPRK1. Consultado el 16 de mayo de 2024 de la base de datos HGNC.

Hsueh, A.J.W., Kawamura, K., Cheng, Y. & Fauser, B.C.J.M. (2015). Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews*, 36 (1), 1-24. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1020>

Hu, J., Zhang, Z., Shen, W.J. & Azhar, S. (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism*, 7 (47). <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-47>

Hunt, R.C. & Kimchi-Safarty, C. (2022). When Silence Disrupts. *New England Journal of Medicine*, 387 (8), 753-756.

Huntriss, J., Hinkins, M. & Picton, H.M. (2006). Clonación de ADNc y expresión del gen NOBOX humano en ovocitos y folículos ováricos. *Molecular Human Reproduction*, 12, 283-289.

Inglés, M., Gimeno, L., Mas, C., Dromant, M., Cruz, R., García, F. J., Rodríguez, L., Gambini, J., Borrás, C. & Viña, J. (2018). Identificación de polimorfismos de un solo nucleótido relacionados



con la fragilidad. *Revista Española de Geriátría y Gerontología*, 53 (4), 202-207. DOI: 10.1016/j.regg.2017.11.003

Ishizuka, B. (2021). Current Understanding of the Etiology, Symptomatology, and Treatment Options in Premature Ovarian Insufficiency (POI). *Frontiers in Endocrinology*, 12.

Kodaman, P.H. (2010). Early menopause: primary ovarian insufficiency and surgical menopause. *Seminars in reproductive medicine*, 28 (5), 360-369. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1262895>

Kolatorova, L., Vitku, J., Suchopar, J., Hill, M. & Parizek, A. (2022). Progesterone: A Steroid with Wide Range of Effects in Physiology as Well as Human Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (14), 7989; <https://doi.org/10.3390/ijms23147989>

Labarta, J.I., De Arriba, A., Ferrer, M. & Vara, M. (2021). Retraso constitucional del crecimiento y la pubertad. Actualización genética y clínica. *Revista Española de Endocrinología Pediátrica*, 12 (2).

Lehman, M. N., Coolen, L. M. & Goodman, R. L. (2010). Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 151 (8), 3479-3489. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0022>

León, S.C. (2022). Características, clasificación y biosíntesis de las hormonas. *Unidades de Apoyo para el Aprendizaje*. CUAIEED/FES Iztacala-UNAM. Consultado el 25 de junio del 2024 de <https://enlinea.iztacala.unam.mx/resources/modules/UAPAS/CaracteristicasCBdeHormonas>

Leung, K.C., Johannsson, G., Leong, G.M. & Ho, K.K.Y. (2004). Estrogen Regulation of Growth Hormone Action. *Endocrine Reviews*, 25 (1), 693-721. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0035>

Liu, M., Zhang, K. & Xu, T. (2021). The role of BMP15 and GDF9 in the pathogenesis of primary ovarian insufficiency. *Human Fertility*, 24 (5), 325-332. <https://doi.org/10.1080/14647273.2019.1672107>

Llano, E., Todeschini, A. L., Felipe, N., Corte, M. D., Condezo, Y. B., Sanchez M., López, S., Astudillo, A., Puente, X. S., Pendas, A. M. & Veitia, R. A. (2022). The oncogenic FOXL2 C134W Mutation Is a Key Driver of Granulosa Cell Tumors. *Cancer Research*, 83 (2), 239-250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-1880>

Lourenço, D., Brauner, R., Lin, L., De Perdigo, A., Weryha, G., Muresan, M., Boudjenah, R., Guerra-Junior, G., Maciel-Guerra, A. T., Achermann, J. C., McElreavey, K., & Bashamboo, A. (2009). Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *The New England journal of medicine*, 360 (12), 1200-1210. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0806228>



Mares, L., Vilchis, F., Chavez, B., & Ramos, L. (2020). Molecular genetic analysis of AKR1C2-4 and HSD17B6 genes in subjects 46,XY with hypospadias. *J Pediatr Urol*, *16* (5), 689 e681-689 e612. doi:10.1016/j.jpuro.2020.07.001

Martínez, G.A., Vásquez, J.A. & Cruz, C.S. (2010). La variabilidad del genoma del mexicano. Implicaciones y perspectivas para la investigación en psiquiatría genética en México. *Salud Mental*, *33* (3), 273-280.

Messinis, I.E., Messini, C.I. & Dafopoulos, K. (2014). Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle. *Reproductive BioMedicine Online*, *28* (6), 714-722. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.02.003>

Miller, W.L. & Bose, H.S. (2011). Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. Thematic Review Series: Genetics of Human Lipids Diseases. *Journal of Lipid Research*, *52* (12). <https://doi.org/10.1194/jlr.R016675>

Moore, A. M., Novak, A. G., & Lehman, M. N. (2023). KNDy Neurons of the Hypothalamus and Their Role in GnRH Pulse Generation: an Update. *Endocrinology*, *165* (2), bqad194. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqad194>

Moore, A.M., Coolen, L.Q., Porter, D.T., Goodman, R.L. & Lehman, M.N. (2018). KNDy Cells Revisited. *Endocrinology*, *159* (9), 3219-3234. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00389>

Nelson, L.M. (2009). Primary Ovarian Insufficiency. *The New England Journal of Medicine*, *360*, 606-614.

Neves, S.R., Ram, P.T. & Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science*, *296* (5573), 1636-1639. <https://doi.org/10.1126/science.1071550>

Nieto, M.T., Rodríguez, J.A. & Góngora, A. (2020). ¿Qué sabemos de los esteroides sexuales y las gonadotropinas en la reproducción de teleósteos neotropicales? *ORINOQUIA*, *24* (1), 52-63. <https://doi.org/10.22579/20112629.601>

Organización Mundial de la Salud (17 de octubre 2022). Menopausia. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/menopause>. Recuperado el 5 de agosto de 2024.

Özkan-Kotiloğlu, S., Kaya-Akyüzlü, D., Yurdakul, R., Yıldırım, M. A., & Özgür-İlhan, İ. (2023). Effect of PDYN and OPRK1 polymorphisms on the risk of alcohol use disorder and the intensity of depressive symptoms. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, *58*(4), 404–414. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agad036>

Pacheco, J. (2010). Falla ovárica precoz. *Anales de la Facultad de Medicina*, *71* (3), 191-200.

Peralta, I. & Nicolás, P. (2013). Foliculogénesis: Camino hacia la sobrevivencia o la muerte celular. *Revista de Educación Bioquímica*, *32* (4), 128-136.



Pineda, R., Sabatier, N., Ludwig, M., Millar, R. P., & Leng, G. (2016). A Direct Neurokinin B Projection from the Arcuate Nucleus Regulates Magnocellular Vasopressin Cells of the Supraoptic Nucleus. *Journal of neuroendocrinology*, 28(4), 10.1111/jne.12342. <https://doi.org/10.1111/jne.12342>

Plain, Z., Voliotis, M., McArdle, C. A. & Tsaneva-Atanasova, K. (2022). Modelling KNDy neurons and gonadotropin-releasing hormone pulse generation. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2022.100407>.

Potau, N. & Carreño, A. (2007). Gonadotropinas (LH y FSH) y corticotropina (ACTH). *Endocrinología y Nutrición*, 54 (2), 109-117

Ramírez, A., Moreno, S.S. & Medina, A. (2013). Herramientas moleculares y su utilidad en el cáncer pediátrico. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 12 (3), 162-173.

Rebar, R.W. (2008). Premature Ovarian "Failure" in the Adolescent. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1135 (1), 138-145.

Romeu, A., López, V., Monzó, A., Carmona, I. O. & Romeu, M. (2016). Regulación de la actividad GnRH. Los sistemas Kisspeptina/GPR54 y GnIH/GPR147. *Revista Iberoamericana de fertilidad y Reproducción humana*, 33, 33-41.

Ruiz, A. (2022). Análisis molecular de los genes *INSL3* y *NRIP1* en pacientes con insuficiencia ovárica prematura. Tesis de licenciatura. *Universidad Nacional Autónoma de México*.

Ruiz, A., & Ramos, L. (2024). Genetic Variants in KNDy Pathway Lack Association with Premature Ovarian Insufficiency in Mexican Women: A Sequencing-Based Cohort Study. *Genes*, 15 (6), 788.

Ruiz, F., García, D., Manfredi, M., León, S., Sánchez, M. A., Roa, J., Pinilla, L., Navarro, V. M. & Tena, M. (2015) Effects and Interactions of Tachykinins and Dynorphin on FSH and LH Secretion in Developing and Adult Rats, *Endocrinology*, 156 (2), 576–588, <https://doi.org/10.1210/en.2014-1026>

Sauna, Z. E., & Kimchi-Sarfaty, C. (2011). Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nature reviews. Genetics*, 12 (10), 683–691. <https://doi.org/10.1038/nrg3051>

Sharma, Y., Miladi, M., Dukare, S., Boulay, K., Caudron-Herger, M., Groß, M., Backofen, R. & Diederics, S. (2019). A pan-cancer analysis of synonymous mutations. *Nature Communications*, 10 (2569). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10489-2>

Sherman, S.L., Nelson, L.M., Usdin, K., Hipp, H., Fink, D. & Welt, C.K. (2018). Insuficiencia Ovárica Primaria asociada al cromosoma X frágil. *Consorcio Clínico y de Investigación del Cromosoma X Frágil*.



Silva, E.G., & Kim, G., & Bakkar, R., & Bozdog, Z., & Shaye-Brown, A., & Loghavi, S., & Stolnicu, S., & Hadareanu, V., & Bulgaru, D., & Cayax, L.I., & Tuñon, M.C. & Pinto, K. (2020). Histology of the normal ovary in premenopausal patients. *Annals of Diagnostic Pathology*, 46 <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2020.151475>

Smith, A. P., & Lee, N. M. (1988). Pharmacology of dynorphin. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 28, 123–140. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.28.040188.001011>

Sullivan, S.D., Sarrel, P.M. & Nelson, L.M. (2016). Hormone replacement therapy in Young women with primary ovarian insufficiency and early menopause. *Fertility and Sterility*, 106 (7), 1588-1599. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.046>

Taraborrelli, S. (2015). Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 94 (161), 8-16 <https://doi.org/10.1111/aogs.12771>

Tresguerres, J. F. (2016). Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. Fernández-Tresguerres J.A., & Ruiz C, & Cachofeiro V, & Cardinali D.P., & Escriche E, & Gil-Loyzaga P.E. & Juliá V, & Teruel F, & Pardo M, & Menéndez J. (Eds.), Fisiología humana, 4e. McGrawHill Education. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1858§ionid=134370755>

Tsiligiannis, S., Panay, N. & Stevenson, J.C. (2019). Premature ovarian insufficiency and long-term health consequences. *Current vascular pharmacology*, 17 (6), 604-609. <http://dx.doi.org/10.2174/1570161117666190122101611>

Uenoyama, Y., Nagae, M., Tsuchida, H., Inoue, N., & Tsukamura, H. (2021). Role of KNDy Neurons Expressing Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin A as a GnRH Pulse Generator Controlling Mammalian Reproduction. *Frontiers In Endocrinology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.724632>

Uniprot (2024) P01213 · PDYN_HUMAN. Consultado el 4 de octubre de 2024 de la base de datos Uniprot. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P01213/entry>

Uniprot (2024) P41145-OPRK_HUMAN. Consultado el 17 de marzo de 2024 de la base de datos Uniprot. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P41145/entry>

Uniprot (2024) Q15726 · KISS1_HUMAN. Consultado el 4 de octubre de 2024 de la base de datos Uniprot. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q15726/entry>

Uniprot (2024) Q2UVB8 · Q2UVB8_HUMAN. Consultado el 4 de octubre de 2024 de la base de datos Uniprot. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q2UVB8/entry>

Valdez, N. & García, N. (2017). Aparato reproductor femenino. Fortoul van der Goes D.I. (Ed.), *Histología y biología celular*, 3e. McGraw-Hill Education. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1995§ionid=150302193>



Ventura, E. & Hernández, M. (2019). La esteroidogénesis en el síndrome de ovarios poliústicos. *Gaceta médica de México*, 155 (2). <https://doi.org/10.24875/gmm.18003955>

Vujović, S. (2009). Aetiology of premature ovarian failure. *Menopause International*, 15 (2), 72-75. <https://doi.org/10.1258/mi.2009.009020>

Vujović, S., Ivović, M., Tancić-Gajić, M., Marina, L., Barać, M., Arizanović, Z., Nenezić, A., Ivanisević, M., Micić, J., Sajić, S., & Micić, D. (2012). Premature ovarian failure. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo/Serbian Archives of Medicine*, 140 (11-12), 806–811.

Wang, Y., Li, B., & Zhao, Y. (2022). Inflammation in Preeclampsia: Genetic Biomarkers, Mechanisms, and Therapeutic Strategies. *Frontiers in immunology*, 13, 883404. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.883404>

Welt, C.K. (2008). Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. *Clinical endocrinology*, 68 (4), 499–509. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.03073.x>

Xie, Q., Kang, Y., Zhang, C., Xie, Y., Wang, C., Liu, J., Yu, C., Zhao, H. & Huang, D. (2022). The Role of Kisspeptin in the Control of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis and Reproduction. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 13 doi: 10.3389/fendo.2022.925206.

Yang, Q., Mumusoglu, S., Qin, Y., Sun, Y., & Hsueh, A. J. (2021). A kaleidoscopic view of ovarian genes associated with premature ovarian insufficiency and senescence. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35 (8), e21753. <https://doi.org/10.1096/fj.202100756R>

Zhao, H., Chen, Z.J., Qin, Y., Shi, Y., Wang, S., Choi, Y., Simpson, J.L. & Rajkovic, A. (2008). Transcription Factor *FIGLA* is mutated in patients with Premature Ovarian Failure. *The American Journal of Human Genetics*, 82 (6), 1342-1348. <https://doi.org/10.1016%2Fj.ajhg.2008.04.018>

Zhu, Q., Li, Y., Ma, J., Ma, H. & Liang, X. (2023). Potential factors result in diminished ovarian reserve: a comprehensive review. *Journal of Ovarian Research*, 16 (1), 208. <https://doi.org/10.1186/s13048-023-01296-x>

Zhukovsky, P., Ironside, M., Duda, J. M., Moser, A. D., Null, K. E., Dhaynaut, M., Normandin, M., Guehl, N. J., El Fakhri, G., Alexander, M., Holsen, L. M., Misra, M., Narendran, R., Hoye, J. M., Morris, E. D., Esfand, S. M., Goldstein, J. M., & Pizzagalli, D. A. (2024). Acute Stress Increases Striatal Connectivity With Cortical Regions Enriched for μ and κ Opioid Receptors. *Biological psychiatry*, S0006-3223(24)00106-9. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2024.02.005>



ANEXO I. Carta de consentimiento informado.



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL
PROYECTO:
ETIOLOGÍA MOLECULAR EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA OVÁRICA
PRIMARIA (POI)

30-ENERO-2020 VERSIÓN 1

Investigador principal: Dr. Luis Ramos Tavera.
Dirección del investigador: Departamento de Biología de la Reproducción.
Teléfono de contacto del investigador (incluyendo uno para emergencias 24 horas): 54870900 (ext. 2423); 55-39-12-56-55.
Versión del consentimiento informado y fecha de su preparación: Versión 1; 04/05/2018.
(Número de referencia: BRE-3594-21-24-1)

INTRODUCCIÓN:

Este documento es una invitación a participar en un estudio de investigación del Instituto. Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento; pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga.

Procedimiento para dar su consentimiento. Usted tiene el derecho a decidir si quiere participar o no como sujeto de investigación en este proyecto. El investigador le debe explicar ampliamente los beneficios y riesgos del proyecto sin ningún tipo de presión y **usted tendrá todo el tiempo que requiera para pensar, solo o con quien usted decida consultarlo, antes de decidir si acepta participar.** Cualquiera que sea su decisión no tendrá efecto alguno sobre su atención médica en el Instituto.

Con el fin de tomar una decisión verdaderamente informada sobre si acepta participar o no en este estudio, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los posibles riesgos y beneficios a su salud al participar. Este documento le dará información detallada acerca del estudio de investigación, la cual podrá comentar quien usted quiera, por ejemplo, un familiar, su médico tratante, el investigador principal de este estudio o con algún miembro del equipo de investigadores. Al final, una vez leída y entendida esta información, se le invitará a que forme parte del proyecto y si usted acepta, sin ninguna presión o intimidación, se le invitará a firmar este consentimiento informado.

Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la Declaración de Helsinki, y a las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética.

Al final de la explicación, usted debe entender los puntos siguientes:

- I. La justificación y los objetivos de la investigación.
- II. Los procedimientos que se utilizarán y su propósito, incluyendo la identificación de qué son procedimientos experimentales.
- III. Los riesgos o molestias previstos.
- IV. Los beneficios que se pueden observar.



- V. Los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para usted
- VI. Garantía para recibir respuestas a las preguntas y aclarar cualquier duda sobre los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento de la materia.
- VII. La libertad que tiene de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se afecte su atención y el tratamiento en el Instituto.
- VIII. La seguridad de que no se le va a identificar de forma particular y que se mantendrá la confidencialidad de la información relativa a su privacidad.
- IX. El compromiso del investigador de proporcionarle la información actualizada que pueda ser obtenida durante el estudio, aunque esto pudiera afectar a su disposición para continuar con su participación.
- X. La disponibilidad del tratamiento médico y compensación a que legalmente tiene derecho, en el caso de que ocurran daños causados directamente por la investigación.

Puede solicitar más tiempo o llevar a casa este formulario antes de tomar una decisión final en los días futuros.

INVITACION A PARTICIPAR COMO SUJETO DE INVESTIGACION Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

Estimado(a) Sr(a).

El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), a través del grupo de investigación, le invitan a participar como sujeto de investigación en este estudio que tiene como objetivo: caracterizar la contribución de genes asociados a POI e identificar las etiologías moleculares y bases biológicas de POI.

Su participación en el estudio tendrá una duración de 10 minutos.

El número aproximado de participantes será: 20.

Usted fue invitado al estudio debido a que tiene las siguientes características: Ser un individuo sano.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Su participación en el estudio consiste en tomarle una muestra sanguínea de 10 mililitros en una sola ocasión.

Las intervenciones experimentales propuestas incluyen la obtención de DNA a partir de sangre periférica para determinar la presencia de variantes genéticas mencionada.

RIESGOS E INCONVENIENTES

El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, señala que la obtención de muestras biológicas representa un riesgo mínimo dentro de la investigación. Los riesgos de la toma de muestra sanguínea son: posibilidad de sangrado ligero o moretón en el sitio de la punción, mareo o sensación de desmayo y raramente puede producirse punción arterial. El personal que extraerá la muestra sanguínea está entrenado para ello, lo que minimizará los riesgos de complicaciones.

Los datos acerca de su identidad y su información médica no serán revelados en ningún momento como lo estipula la ley, por tanto, en la recolección de datos clínicos usted no enfrenta riesgos mayores a los relativos a la protección de la confidencialidad la cual será protegida mediante la codificación de las muestras y de su información.



BENEFICIOS POTENCIALES

Este estudio no está diseñado para beneficiarle directamente. Sin embargo, la búsqueda de alteraciones en genes asociados a POI, podría permitir el diagnóstico molecular, asesoramiento genético e información sobre la salud reproductiva a las pacientes y familiares. Además, gracias a su participación altruista, su comunidad se puede beneficiar significativamente al encontrar nuevas formas de atender esta complicación médica.

CONSIDERACIONES ECONÓMICAS

No se cobrará ninguna tarifa por participar en el estudio ni se le hará pago alguno.

COMPENSACION

Si llegara a presentarse alguna complicación como resultado directo de su participación en este estudio, por parte del protocolo le proporcionaremos el tratamiento inmediato y lo referiremos, si lo amerita, al especialista médico que requiera.

ALTERNATIVAS A SU PARTICIPACIÓN:

Su participación es voluntaria. Por lo que usted puede elegir no participar en el estudio.

POSIBLES PRODUCTOS COMERCIALES DERIVABLES DEL ESTUDIO:

Los resultados o materiales obtenidos en el estudio serán propiedad del INCMNSZ. Si un producto comercial es desarrollado como resultado del estudio, tal insumo será propiedad del Instituto o quienes ellos designen. En tal caso, usted no recibirá un beneficio financiero por el mismo.

ACCIONES A SEGUIR DESPUÉS DEL TÉRMINO DEL ESTUDIO:

Usted puede solicitar los resultados de sus exámenes clínicos y de las conclusiones del estudio a la Dr. Luis Ramos Tavera INCMNSZ (tel. 54870900 ext. 2423). La investigación es un proceso largo y complejo. El obtener los resultados finales del proyecto puede tomar varios meses.

PARTICIPACIÓN Y RETIRO DEL ESTUDIO:

Recuerde que su participación es VOLUNTARIA. Si usted decide no participar, tanto su relación habitual con el INCMNSZ como su derecho para recibir atención médica o cualquier servicio al que tenga derecho no se verán afectados. Si decide participar, tiene la libertad para retirar su consentimiento e interrumpir su participación en cualquier momento sin perjudicar su atención en el INCMNSZ. Se le informará a tiempo si se obtiene nueva información que pueda afectar su decisión para continuar en el estudio. El estudio puede darse por terminado en forma prematura si usted lo decide.

CONFIDENCIALIDAD Y MANEJO DE SU INFORMACIÓN

Su nombre no será usado en ninguno de los reportes públicos del estudio. Las muestras biológicas obtenidas no contendrán ninguna información personal y serán codificadas con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación. Por disposición legal, las muestras biológicas, incluyendo la sangre, son catalogadas como residuos peligrosos biológico-infecciosos y por esta razón durante el curso de la investigación su muestra no podrá serle devuelta. Es posible que sus muestras biológicas, así como su información médica y/o genética, puedan ser usadas para otros proyectos de investigación análogos relacionados con la enfermedad en estudio. No podrán ser usados para estudios de investigación que estén relacionados con condiciones distintas a las estudiadas en este proyecto, y estos estudios deberán ser sometidos a aprobación por un Comité de Ética. Sus muestras podrán ser almacenadas



por los investigadores hasta por 20 años.

Los códigos que identifican su muestra estarán sólo disponibles a los investigadores titulares, quienes están obligados por Ley a no divulgar su identidad. Estos códigos serán guardados en un archivero con llave. Sólo los investigadores tendrán acceso a ellos. El personal del estudio (monitores o auditores) podrá tener acceso a la información de los participantes.

Si bien existe la posibilidad de que su privacidad sea afectada como resultado de su participación en el estudio, su confidencialidad será protegida como lo marca la ley, asignando códigos a su información. El código es un número de identificación que no incluye datos personales. Ninguna información sobre su persona será compartida con otros sin su autorización, excepto:

-Si es necesario para proteger sus derechos y bienestar (por ejemplo, si ha sufrido una lesión y requiere tratamiento de emergencia); o

-Es solicitado por la ley.

Si usted decide retirarse del estudio, podrá solicitar el retiro y destrucción de su material biológico y de su información. Todas las hojas de recolección de datos serán guardadas con las mismas medidas de confidencialidad, y solo los investigadores titulares tendrán acceso a los datos que tienen su nombre. Si así lo desea, usted deberá contactar al Dr. Luis Ramos Tavera y expresar su decisión por escrito.

El Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ aprobó la realización de este estudio. Dicho comité es quien revisa, aprueba y supervisa los estudios de investigación en humanos en el Instituto. En el futuro, si identificamos información que consideremos importante para su salud, consultaremos con el Comité de Ética en Investigación para decidir la mejor forma de darle esta información a usted y a su médico. Además, le solicitamos que nos autorice contactarlo, en caso de ser necesario, para solicitarle información que podría ser relevante para el desarrollo de este proyecto.

Los datos científicos obtenidos como parte de este estudio podrían ser utilizados en publicaciones o presentaciones médicas. Su nombre y otra información personal serán eliminados antes de usar los datos.

Si usted lo solicita su médico de cabecera será informado sobre su participación en el estudio.

Para estudios genéticos:

Por su participación en el estudio, podría ser necesario contactar a los miembros de su familia. Sus familiares no serán contactados sin su permiso.

Su material genético no será usado con fines distintos a los mencionados en este documento. Si se tienen células, éstas no se utilizarán para la creación de líneas celulares inmortales. Si el investigador desea usarlos con fines distintos, deberá notificárselo y solicitarle su firma en un documento similar al que usted está leyendo, además de contar con la aprobación del Comité de Ética en Investigación.

Los resultados de estudios genéticos podrían ser causa de discriminación para las personas que tengan alguna anomalía que los predisponga a una enfermedad. Tomaremos las precauciones y acciones necesarias para evitar que su información sea conocida por terceros que pudieran tomar acciones discriminatorias contra usted.

Los resultados de los estudios genéticos no serán incluidos en su expediente del Instituto, a menos que tengan implicaciones para su tratamiento.



IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES:

En caso de que usted sufra un daño relacionado al estudio, por favor póngase en contacto con la Q.F.B. Lizette Mares Gómez en el INCMNSZ (teléfono: 54870900 ext. 2423).

Si usted tiene preguntas sobre el estudio, puede ponerse en contacto con el Dr. Luis Ramos Tavera en el INCMNSZ (teléfono: 54870900 ext. 2423).

Si usted tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en el estudio, puede hablar con el Presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Dr. Arturo Galindo Fraga, teléfono: 54870900 ext. 6101).

DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que he tenido y todas han sido respondidas satisfactoriamente. Para poder participar en el estudio, estoy de acuerdo con todos los siguientes puntos:

Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente. Los objetivos generales, particulares del reclutamiento y los posibles daños e inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.

Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mi muestra sanguínea y DNA para ser utilizadas en este estudio. Así mismo, mi información médica y biológica podrá ser utilizada con los mismos fines.

Estoy de acuerdo, en caso de ser necesario, que se me contacte en el futuro si el proyecto requiere coleccionar información adicional o si encuentran información relevante para mi salud.

Mi firma también indica que he recibido un duplicado de este consentimiento informado.

Por favor responda las siguientes preguntas:

	SÍ (marque por favor)	NO (marque por favor)
a. ¿Ha leído y entendido el formato de consentimiento informado, en su lengua materna?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. ¿Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y de discutir este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. ¿Ha recibido usted respuestas satisfactorias a todas sus preguntas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. ¿Ha recibido suficiente información acerca del estudio y ha tenido el tiempo suficiente para tomar la decisión?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. ¿Entiende usted que su participación es voluntaria y que es libre de suspender su participación en este estudio en cualquier momento sin tener que justificar su decisión y sin que esto afecte su atención médica o sin la pérdida de los beneficios a los que de otra forma tenga derecho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. ¿Entiende que puede no recibir algún beneficio directo de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
g. ¿Entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales a los que es acreedor de otra forma como sujeto en un	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>



	SÍ (marque por favor)	NO (marque por favor)
estudio de investigación?		
h. ¿Entiende que el médico participante en el estudio puede retirarlo del mismo sin su consentimiento, ya sea debido a que usted no siguió los requerimientos del estudio o si el médico participante en el estudio considera que médicamente su retiro es en su mejor interés?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
i. ¿Entiende que usted recibirá un original firmado y fechado de esta Forma de Consentimiento para sus registros personales?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Declaración de la paciente: Yo, _____
declaro que es mi decisión participar como sujeto de investigación clínica en el estudio. Mi participación es voluntaria.

Se me ha informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios. Si suspendo mi participación, recibiré el tratamiento médico habitual al que tengo derecho en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y no sufriré perjuicio en mi atención médica ni en futuros estudios de investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en este estudio. También puedo obtener los resultados de mis exámenes clínicos si así los solicito.

Si tengo preguntas sobre el estudio, puedo ponerme en contacto con la Q.F.B. Lizette Mares Gómez, tel. 54870900. Ext. 2423.

Debo informar a los investigadores de cualquier cambio en mi estado de salud (por ejemplo, uso de nuevos medicamentos, cambios en el consumo de tabaco) o en la ciudad donde resido, tan pronto como sea posible.

He leído y entendido toda la información que me han dado sobre mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad para discutirlo y hacer preguntas. Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.

Tengo claro que en caso de tener preguntas sobre mis derechos como sujeto de investigación clínica en este estudio, problemas, preocupaciones o dudas, y deseo obtener información adicional, o bien, hacer comentarios sobre el desarrollo del estudio, tengo la libertad de hablar con el presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Dr. Arturo Galindo Fraga, tel: 54870900. ext. 6101).

Nombre del / de la Participante

Firma del / de la Participante

Fecha

Coloque la huella digital del participante sobre esta línea si no sabe escribir



_____	_____
Nombre del representante legal (si aplica)	Firma del representante legal

Fecha	
_____	_____
Nombre del Investigador que explicó el documento	Firma del Investigador

Fecha	
_____	_____
Nombre del Testigo 1	Firma del Testigo 1
_____	_____
Fecha	Relación con el participante:
Dirección:	

_____	_____
Nombre del Testigo 2	Firma del Testigo 2
_____	_____
Fecha	Relación con el participante:
Dirección:	

Lugar y Fecha:	

(El presente documento es original y consta de 7 páginas)



ANEXO II. Aprobación del Proyecto BRE-3594-21-24-1.



CIUDAD DE MÉXICO A 09 DE MAYO DE 2024
REG. CONBIOÉTICA-09-CEI-011-20160627
OFICIO No. MCONTROL-665/2024

DR. LUIS RAMOS TAVERA
INVESTIGADOR PRINCIPAL
DEPTO. DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN
VASCO DE QUIROGA NO. 15
COL. BELISARIO DOMÍNGUEZ SECCIÓN XVI, ALC. TLALPAN
CIUDAD DE MÉXICO, C.P. 14080
PRESENTE

En respuesta a su atenta del pasado 06 de mayo, con relación al Protocolo de Investigación Clínica, titulado:

"Insuficiencia Ovárica Primaria (POI): Variantes patogénicas asociadas a genes determinantes del sexo"
REF. 3594

BRE-3594-21-24-1

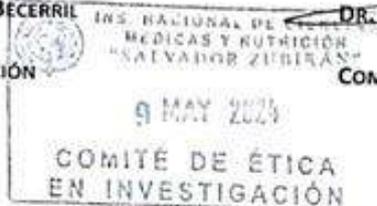
Le informamos que se toma conocimiento del estado actual del estudio, así mismo se autoriza la re-aprobación anual con vigencia hasta el 09 de mayo de 2025.

Sin más por el momento quedamos de Usted.

ATENTAMENTE,

DR. CARLOS A. HINOJOSA BECERRIL
PRESIDENTE
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

DR. SERGIO C. HERNÁNDEZ JIMÉNEZ
PRESIDENTE
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



CAHB/SCHJ/MARV

