

96

" DETECCION MOLECULAR DE MUTACIONES EN
GENES ASOCIADOS AL SINDROME DE DEFICI-
CIENCIA DE LA HORMONA DEL CRECIMIEN-
TO HUMANO".

AURELIO ALVAREZ VARGAS

TM
QP572
.G75
A4
2001
c.1

TM

QP572

.G75

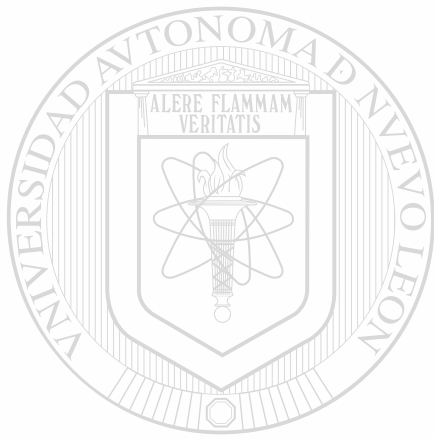
A4

2001

c.1



1080117234



UANL

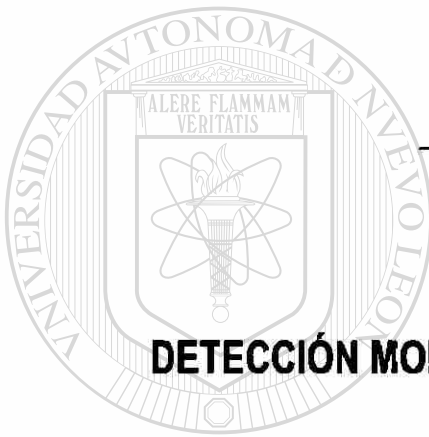
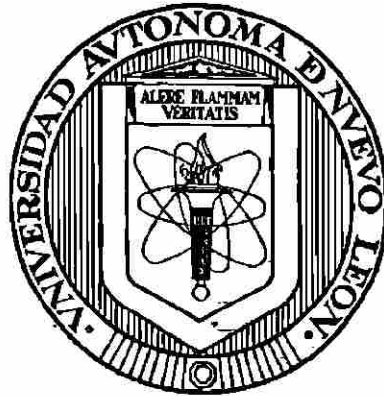
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**



TESIS

DETECCIÓN MOLECULAR DE MUTACIONES EN GENES

ASOCIADOS AL SÍNDROME DE DEFICIENCIA DE LA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por

BIOL. AURELIO ÁLVAREZ VARGAS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**

Monterrey N. L., Agosto de 2004

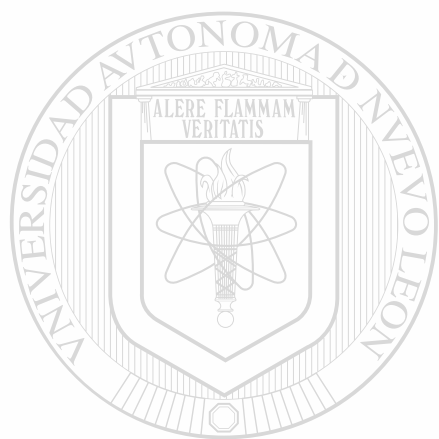
QP 572

.G75

A4

2001

c.1



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

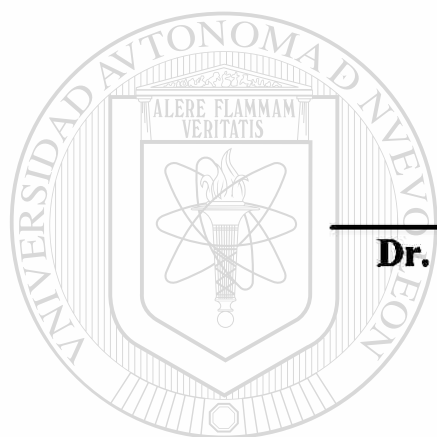
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



“Detección molecular de mutaciones en genes asociados al síndrome de deficiencia de la hormona del crecimiento humano”.

APROBACIÓN



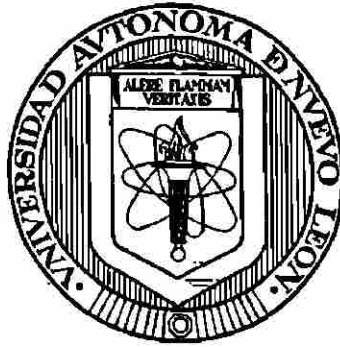
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Presidente

Dr. Augusto Rojas Martínez
Secretario

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
Vocal



EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

“DETECCIÓN MOLECULAR DE MUTACIONES EN GENES ASOCIADOS AL SÍNDROME DE DEFICIENCIA DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO”.

LO REALIZÓ:

BIOL. AURELIO ÁLVAREZ VARGAS

**EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.**

BAJO LA DIRECCIÓN DEL:

DR. HUGO A. BARRERA SALDAÑA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Y LA CO-DIRECCIÓN DEL:

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ

MONTERREY N. L., AGOSTO DEL 2001

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada.

Al Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña por la dirección del trabajo.

Al Dr. Augusto Rojas Martínez por sus valiosos consejos.

A la Dra. Juana Romero y al Dr. César Lozano por su apoyo en el reclutamiento de pacientes.

Al Dr. Fernando Lavalle por su colaboración con literatura científica.

A la M.C. Dolores Esquivel Escobedo por su apoyo en la secuenciación.

A la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez por su valiosa ayuda.

A los miembros de la comisión de tesis por la revisión y corrección de este trabajo.

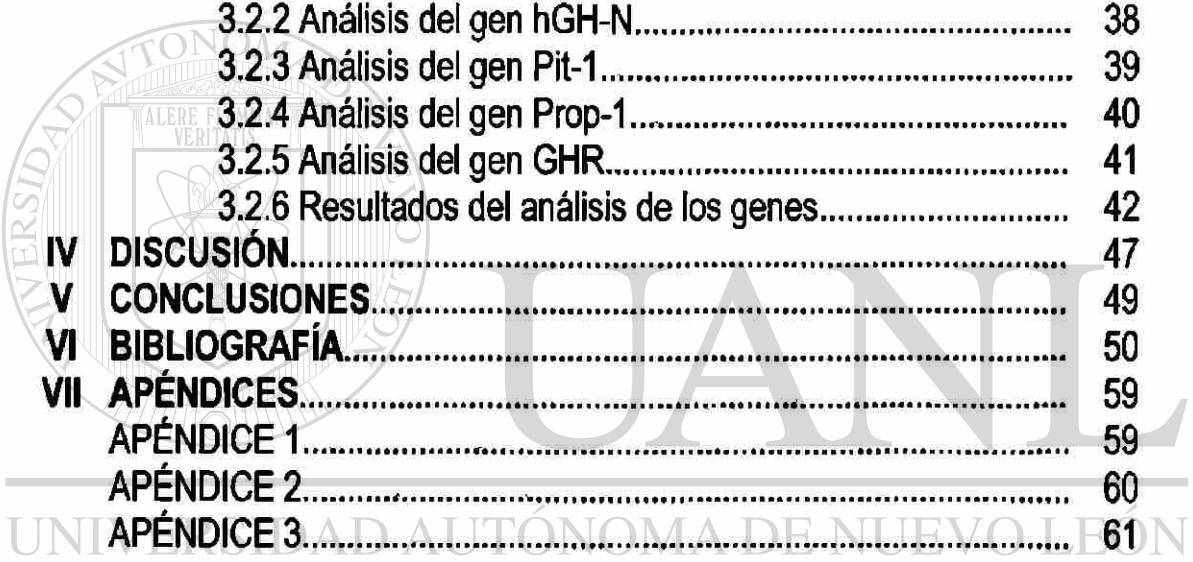
A todas aquellas personas que contribuyeron directa e indirectamente en la realización de esta tesis.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ÍNDICE

	página
Lista de tablas.....	vii
Lista de figuras.....	viii
Nomenclatura.....	ix
RESUMEN.....	xi
I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Trastornos del crecimiento.....	1
1.2 La glándula pituitaria.....	3
1.3 Características de deficiencia de hormonas hipofisarias...	4
1.3.1 Diagnóstico clínico de deficiencia de HGH.....	4
1.4. Secreción y acción de la HGH.....	5
1.5 Criterios de evaluación de un paciente con sospecha de GHD	7
1.6 Estructura y función de la HGH.....	8
1.6.1 Localización del gen hGH-N.....	9
1.7 Alteraciones genéticas de hGH-N.....	10
1.7.1 Déficiencias aisladas familiares de HGH.....	11
1.7.2 Panhipopituitarismo.....	12
1.7.3 Enanismo de Laron.....	15
1.8 Justificación.....	17
1.9 Objetivo general.....	17
1.9.1 Objetivos específicos.....	17
II MATERIAL y MÉTODOS.....	18
2.1 Material biológico.....	18
2.2 Reactivos y equipo.....	19
2.3 Metodología.....	20
2.3.1 Estrategia experimental.....	20
2.3.2 Criterios de inclusión.....	21
2.3.3 Descripción general de las técnicas claves.....	21
2.3.3.1 Extracción de DNA genómico.....	21
2.3.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa.....	22
2.3.3.3 Análisis de heterodúplex.....	23
2.3.3.4 Secuenciación.....	24
2.3.4 Protocolos.....	24

2.3.4.1 Extracción del DNA genómico.....	24
2.3.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa.....	25
2.3.4.2.1 PCR del gen hGH-N.....	25
2.3.4.2.2 PCR del promotor del gen hGH-N..	27
2.3.4.2.3 PCR del gen Prop-1.....	29
2.3.4.2.4 PCR del gen GHR.....	30
2.3.4.2.5 PCR del gen Pit-1.....	32
2.3.4.3 Purificación de fragmentos para secuenciación	34
2.3.4.4 Secuenciación automatizada.....	35
III RESULTADOS.....	37
3.1 Análisis Bioquímico.....	37
3.2 Análisis Molecular.....	37
3.2.1 Análisis del promotor del gen hGH-N.....	37
3.2.2 Análisis del gen hGH-N.....	38
3.2.3 Análisis del gen Pit-1.....	39
3.2.4 Análisis del gen Prop-1.....	40
3.2.5 Análisis del gen GHR.....	41
3.2.6 Resultados del análisis de los genes.....	42
IV DISCUSIÓN.....	47
V CONCLUSIONES.....	49
VI BIBLIOGRAFÍA.....	50
VII APÉNDICES.....	59
APÉNDICE 1.....	59
APÉNDICE 2.....	60
APÉNDICE 3.....	61



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Causas endocrinas de talla baja.	2
2	Determinaciones para la valoración de la secreción de HGH.	5
3	Defectos genéticos asociados a GHD.	10
4	Banco de DNAs de pacientes con deficiencia aislada y combinada de HGH.	18
5	Iniciadores utilizados en el presente estudio.	22
6-A	Reactivos utilizados en la amplificación del gen hGH-N.	25
6-B	Condiciones aplicadas en el PCR del gen hGH-N.	26
7-A	Reactivos utilizados en la amplificación del promotor del gen hGH-N.	27
7-B	Condiciones usadas en el PCR del promotor del gen hGH-N.	28
8-A	Reactivos utilizados en la amplificación del gen Prop-1.	29
8-B	Condiciones aplicadas en el PCR del gen Prop-1.	30
9-A	Reactivos utilizados en la amplificación del exón 6 del gen GHR.	31
9-B	Condiciones aplicadas en el PCR del exón 6 del gen GHR.	31
10	Fragmentos producidos en las amplificaciones del gen Pit-1.	32
11-A	Reactivos utilizados en las amplificaciones del gen Pit-1.	33
11-B	Condiciones aplicadas en los PCRs del gen Pit-1.	33
12-A	Reactivos de la mezcla maestra para secuenciación.	35
12-B	Condiciones aplicadas en el PCR de secuenciación.	35
13	Resultados del análisis de los genes de pacientes con diagnóstico de deficiencia combinada (CPHD).	43
14	Resultados del análisis de los genes de pacientes con diagnóstico de deficiencia aislada (IGHD).	43
15	Cambios nucleotídicos detectados en el promotor del gen hGH-N.	45

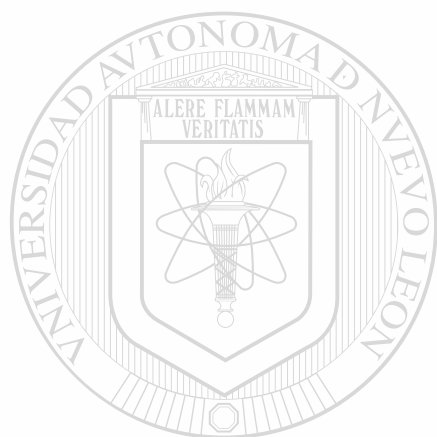
LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	La glándula pituitaria.	3
2	Mecanismo de secreción y acción de la HGH.	6
3	Enanismo hipofisiario.	8
4	Estructura del gen hGH-N.	9
5	Mutaciones descritas en el gen Pit-1.	13
6	Mutaciones descritas en el gen Prop-1.	14
7	Mutaciones descritas en el gen GHR.	16
8	Estrategia experimental.	21
9	Análisis de un heterodúplex.	23
10	Análisis de heterodúplex de la región promotora del gen hGH-N.	38
11	Análisis del gen hGH-N fragmentado para heterodúplex.	39
12	Análisis del gen Pit-1.	40
13	Análisis del gen Prop-1.	41
14	Análisis del exón 6 del gen GHR.	42
15	Variaciones nucleotídicas del promotor del gen hGH-N.	46

NOMENCLATURA

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
BAC	Cromosomas artificiales de bacteria
BAP	Fosfatasa alcalina específica del hueso
BMC	Contenido mineral de hueso
CPHD	Deficiencia combinada de hormonas de la pituitaria
CV	Coefficiente de variación
DGGE	Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DSBP	Proteína de unión al DNA de cadena doble
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
FM	Masa de grasa
FSH	Hormona folículo- estimulante
GH	Hormona de crecimiento
GHD	Deficiencia de hormona del crecimiento
GHIS	Síndrome de insensibilidad a la hormona del crecimiento
GHRF	Factor liberador de la hormona del crecimiento
HGH-N	Hormona normal del crecimiento humano
HGH-V	Hormona variante del crecimiento humano
HGH	Hormona del crecimiento humano
HPL	Lactógeno placentario del humano
Htx	Heterodúplex
IGHD	Deficiencia aislada de hormona del crecimiento.
IGHD IA	Deficiencia aislada de hormona del crecimiento tipo IA
IGHD IB	Deficiencia aislada de hormona del crecimiento tipo IB
IGHD II	Deficiencia aislada de hormona del crecimiento tipo II
IGHD III	Deficiencia aislada de hormona del crecimiento tipo III
IGF - 1	Factor de crecimiento similar a la insulina
IRMA	Ensayo Inmunoradiométrico
ISS	Estatuta corta idiopática
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LH	Hormona luteinizante
MRI	Imagen de resonancia magnética
MSH	Hormona estimulante de melanocitos
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM	Peso Molecular

PRL	Prolactina
RIA	Radioinmunoensayo
SD	Desviación estándar
Sevag	Cloroforno-alcohol-isoamílico
SNC	Sistema nervioso Central
SS	Somatostatina
SSBP	Proteína de unión al DNA de cadena sencilla
SSCP	Polimorfismo conformacional de cadena sencilla
TSH	Hormona estimulante de tiroides
U	Unidades
UTR	Región no traducida
UV	Ultravioleta
μl	Microlitros



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

La hormona del crecimiento humano (HGH) es un polipéptido de 191 aminoácidos y peso molecular de 22 kDa que posee ~~los puentes disulfuro intracatenarios~~ entre restos de cisteína localizados en las posiciones 53 y 165 y entre 182 y 189. La hipófisis produce varias isoformas de la HGH debido principalmente a procesamientos alternativos del transcrito primario ó a modificaciones post-traduccionales.

La deficiencia de HGH durante la infancia se manifiesta con velocidad de crecimiento menor al 10% del normal ó curva de talla corta con desviación estándar mayor de 2.5. Hasta el momento se han reconocido 2 clases de deficiencias de la hormona: aislada (IGHD IA, IGHD IB, IGHD II y IGHD III) y combinada (asociada con niveles disminuidos de las otras hormonas de la pituitaria).

En el presente proyecto se reclutó un grupo de pacientes con deficiencia aislada y combinada de HGH con el propósito de determinar las causas de su padecimiento. Se planteó como objetivo principal el localizar mutaciones puntuales ó deleciones, tanto en la región promotora como en la región codificante del gen hGH-N. Asimismo, se planteó determinar las mutaciones que pudieran encontrarse en el gen que codifica para el receptor de la hormona (GHR), así como en los genes de los factores de transcripción que regulan la expresión de su gen, como son el Pit-1 y el Prophet-1.

Para llevar a cabo la búsqueda de mutaciones en estos pacientes se aplicaron dos técnicas: el análisis de heterodúplex y/o el análisis de restricción según fuera el caso de la región del gen que se estuviera analizando. Luego, en caso necesario, cuando el fragmento amplificado fuera demasiado grande, se cortó con una enzima de restricción para producir fragmentos de tamaño adecuado. Finalmente, para analizar los sitios de cambios nucleotídicos se procedió a secuenciar dicha región.

De un total de 25 pacientes analizados, 11 resultaron positivos en la formación de heterodúplex. Cabe mencionar que la totalidad de ellos lo fueron para la región promotora del gen hGH-N. Se eligieron 4 de ellos (basándose en su migración electroforética) para secuenciación, resultando un total de 7 sitios distintos de cambios nucleotídicos en la secuencia del promotor; 6 de estos ya habían sido reportados como polimorfismos en esta región, en tanto que un cambio aún no ha sido reportado y se trata de una inserción de una adenina en la posición -64. Los 14 restantes resultaron negativos en la formación de heterodúplex. En conclusión todas las mutaciones detectadas en los pacientes analizados han sido reportadas como polimorfismos, pero no se puede excluir la posibilidad de que una combinación de ellas puedan en conjunto la expresión del gen hGH-N. Asimismo se estandarizaron las condiciones de amplificación de los exones de los genes: GHR, hGH-N, Pit-1 y Prop-1 pero en ninguno de estos genes se detectaron mutaciones.

*Los
casos
deficiencia*

?

RESUMEN

Aurelio Álvarez Vargas

Fecha de Graduación: Agosto, 2001

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN -

Facultad de Medicina

Título del Estudio:

DETECCIÓN MOLECULAR DE MUTACIONES EN GENES ASOCIADOS AL SÍNDROME DE DEFICIENCIA DE HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO

Número de páginas: 75

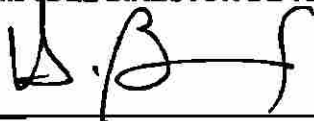
**Candidato para el grado de Maestría
en Ciencias con especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Área de Estudio: Ingeniería Genética

Propósito y Método del Estudio: La hormona del crecimiento humano (HGH) es un polipéptido de 191 aminoácidos y peso molecular de 22 kDa. La deficiencia de HGH durante la infancia se manifiesta con velocidad de crecimiento menor al 10% del normal ó curva de talla corta con desviación estándar > 2.5 . Hasta el momento se han reconocido 2 clases de deficiencias de la hormona: aislada y combinada. En el presente proyecto se reclutó un grupo de pacientes con ambas clases de deficiencia de HGH con el propósito de determinar las causas de su padecimiento. Se planteó como objetivo principal el localizar mutaciones puntuales ó deleciones, tanto en la región promotora como en la región codificante del gen hGH-N. Asimismo, se planteó determinar las mutaciones que pudieran encontrarse en el gen que codifica para el receptor de la hormona (GHR), así como en los genes de los factores de transcripción que regulan la expresión de su gen, como son el Pit-1 y el Prophet-1. Para llevar a cabo la búsqueda de mutaciones en estos pacientes se aplicaron dos técnicas: el análisis de heterodúplex y/o el análisis de restricción según fuera el caso de la región del gen que se estuviera analizando. Luego, en caso necesario, cuando el fragmento amplificado fuera demasiado grande, se cortó con una enzima de restricción para producir fragmentos de tamaño adecuado. Finalmente, para analizar los sitios de cambios nucleotídicos se procedió a secuenciar dicha región.

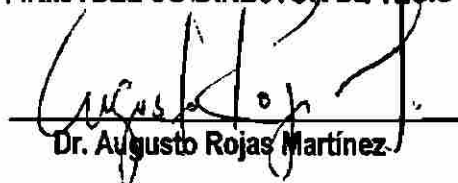
Contribuciones y Conclusiones: De un total de 25 pacientes analizados, 11 resultaron positivos en la formación de heterodúplex, la totalidad de ellos fueron positivos para la región promotora del gen hGH-N. Se eligieron 4 de ellos (basándose en su migración electroforética) para secuenciación, resultando un total de 7 sitios distintos de cambios nucleotídicos en la secuencia del promotor; 6 de estos ya habían sido reportados como polimorfismos en esta región, en tanto que un cambio aún no ha sido reportado y se trata de una inserción de una adenina en la posición -64. Los 14 restantes resultaron negativos en la formación de heterodúplex. En conclusión todas las mutaciones detectadas en los pacientes analizados han sido reportadas como polimorfismos, pero no se puede excluir la posibilidad de que una combinación de ellas puedan en conjunto la expresión del gen hGH-N. Asimismo se estandarizaron las condiciones de amplificación de los exones de los genes: GHR, hGH-N, Pit-1y Prop-1 pero en ninguno de estos genes se detectaron mutaciones.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

FIRMA DEL CO-DIRECTOR DE TESIS



Dr. Augusto Rojas Martínez

I. INTRODUCCIÓN

1.1 TRASTORNOS DEL CRECIMIENTO

Se denomina crecimiento al conjunto de cambios continuos que conducen a un ser viviente desde el nacimiento a la madurez. Este proceso es complejo y multifactorial e incluye fenómenos de hipertrofia e hiperplasia tisulares. Dentro de la especie humana hay condicionantes genéticos ó biológicos a los que se suman factores externos ó ambientales y variaciones del propio crecimiento a lo largo del tiempo que darán lugar a la talla adulta (Tanner, 1986). Los factores genéticos no determinan únicamente la talla definitiva, sino también el tiempo y la forma en que dicha talla se alcanza. En 1985 Tanner y Davies, construyeron curvas de estatura, ilustrando sus gráficas y los cambios dramáticos en la velocidad de crecimiento durante los años de la pubertad, tanto en niños como en niñas. En los niños el inicio de la pubertad varia de 9-14 años y en las niñas oscila entre los 8.6- 12 años (Jiménez-Hernández *et al.*, 1990).

El retraso constitucional del crecimiento y la pubertad (RCC) es la causa más común de talla baja y retardo puberal. Esto se debe a una variación del desarrollo normal en la que el desarrollo puberal se alcanza tardíamente, a causa de una maduración atrasada del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Por definición, se puede considerar que el retardo puberal en mujeres es cuando no hay desarrollo mamario ni vello pubiano a la edad de 13 años y en los varones cuando a los 14 años no han tenido aumento testicular con ausencia o presencia de vello pubiano (García *et al.*, 1993).

La frecuencia estimada de retrasos del crecimiento asociados a trastornos de la producción y/o la acción de la HGH, es de aproximadamente uno de cada 4000 a 10000 recién nacidos vivos (Vimpani *et al.*, 1977; Rona *et al.*, 1977; Lacey *et al.*, 1974; Lindsay *et al.*, 1993). En tanto que la mayor parte de los casos son esporádicos y se atribuyen a agresiones cerebrales y anomalías del desarrollo, un 5-30% de los pacientes tienen un familiar afectado de primer grado, lo que sugiere una causa genética (Lacey *et al.*, 1974; Lindsay *et al.*, 1993).

Así mismo, también hay evidencia de factores ambientales y de anomalías anatómicas hipotálamo-hipofisiarias que producen déficit de HGH. Estos constituyen menos del 20% de los casos esporádicos (Cacciari *et al.*, 1990). Es conveniente tener en cuenta que muchos casos de familiares afectados pasan desapercibidos, ya que en los trastornos autosómicos recesivos la probabilidad de tener un hijo afectado es de $\frac{1}{4}$ y la probabilidad de tener 2 hijos con la enfermedad es de $\frac{1}{16}$, lo cual es difícil dado el tamaño actual de las familias.

El enanismo es un trastorno del crecimiento, producido en parte por desequilibrios glandulares endocrinos, para los cuales se han descrito algunas causas (tabla 1).

Tabla 1. Causas endocrinas de talla baja.

Secreción disminuida de HGH	Causas hipotalámicas
	Secreción disminuida de GRH (hormona liberadora de HGH)
	Lesiones orgánicas
	Causas hipofisarias
	Secreción disminuida de GH aislada ó asociada a otras hormonas hipofisarias
	Lesiones orgánicas
	Deficiencia funcional de HGH (Deprivación emocional)
Actividad defectuosa de la HGH	Receptores defectuosos de HGH (enanismo de Laron)
	Secreción de formas normales de HGH
	Alteración nutricional de la formación de somatomedina inducida por la HGH
Respuesta esquelética alterada a la somatomedina (o HGH)	Talla baja constitucional
	Disgenesia gonadal (Síndrome de Turner)
	Enfermedad renal crónica
	Enfermedad inflamatoria crónica
	Exceso de corticoides
	Enfermedades hipofisarias y suprarrenales
	Tratamiento con dosis farmacológicas de corticoides
Hipotiroidismo (primario o secundario)	
Pubertad precoz	Orgánica
	Central (SNC) ("pubertad precoz verdadera" con cierre precoz de las epífisis óseas)
	Pseudopubertad precoz
	Idiopática ("pubertad precoz verdadera")
Diabetes mellitus	
Insuficiencia corticosuprarrenal	

(Fuente: Catálogo Merck. Sharp y Dohme, 1994)

1.2 LA GLÁNDULA PITUITARIA PRODUCE LA HGH.

La glándula pituitaria (hipófisis) desempeña un papel importantísimo en el funcionamiento normal del cuerpo humano, por la diversidad de hormonas que produce. Entre ellas destacan las hormonas de acción directa como la del crecimiento (HGH), que determina dicho proceso, y la gonadotrófica, que estimula la diferenciación sexual de los individuos. Sin embargo, el más importante de los roles de esta glándula es el de dirigir, mediante hormonas de acción indirecta, el funcionamiento de las demás glándulas endocrinas, actuando como la directora de la «orquesta endocrina». No obstante la importancia de sus funciones, es la más pequeña de las glándulas endocrinas conocidas. Su peso es de alrededor de medio gramo en el ser humano adulto, y mide un centímetro de largo y 1.5 cm de ancho, con un espesor de 6 milímetros. Se encuentra situada en una depresión o cavidad del hueso esfenoidal, llamada la silla turca (figura 1).

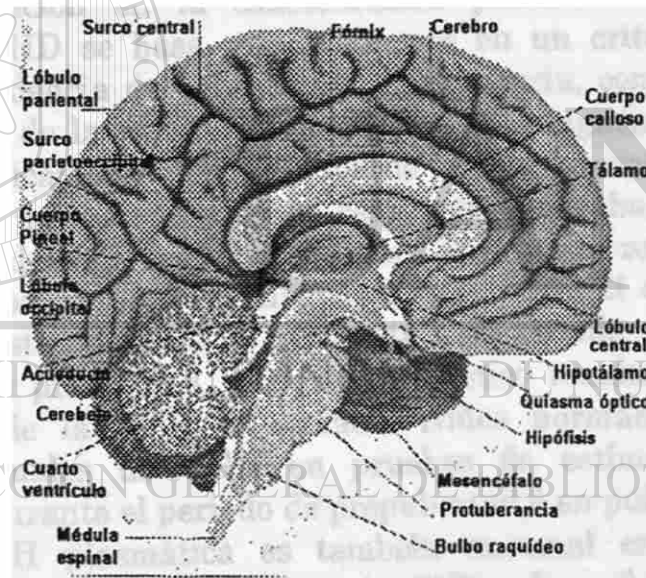


Figura 1. La glándula pituitaria. Esta glándula juega un papel muy importante en el sistema endocrino, pues su función es unir a éste con el sistema nervioso central. Esta pequeña glándula se localiza en la base del cerebro y cuenta con dos partes: pituitaria anterior (adenohipófisis) y pituitaria posterior (neurohipófisis).

La pituitaria anterior recibe señales del hipotálamo, las cuales pueden estimular ó inhibir la secreción de hormonas, que después son secretadas al flujo sanguíneo donde actúan sobre órganos blanco específicos. Las hormonas secretadas por la adenohipófisis son:

Estimulante del tiroides (TSH), folículo-estimulante (FSH), luteinizante (LH), prolactina (PRL), adrenocorticotrófica (ACTH) y la HGH.

1.3 CARACTERÍSTICAS DE LA DEFICIENCIA DE HORMONAS HIPOFISIARIAS

En niños la deficiencia de FSH y LH puede causar eunocoidismo y falta de desarrollo sexual. La FSH y LH tienen un efecto indirecto en el crecimiento de los huesos por obstrucción de la epífisis. La deficiencia de GH en niños se presenta como retardo del crecimiento y maduración sexual retrasada. Estos pacientes pueden presentar hipoglucemia debido a la pérdida del efecto gluconeogénico de la HGH, el cual contrarresta el efecto de la insulina. En los adultos la deficiencia HGH se presenta como debilidad, disminución de tolerancia al ejercicio y decremento del funcionamiento social.

1.3.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE DEFICIENCIA DE HGH (GHD)

La deficiencia de la hormona del crecimiento (GHD) se puede diagnosticar por una disminución en la concentración plasmática de la HGH. El diagnóstico de GHD se basa principalmente en un criterio auxológico en niños y en la evidencia de enfermedad de pituitaria, con otras deficiencias conjuntas del eje de la pituitaria, en adultos. El diagnóstico GHD luego se confirma bioquímicamente por medición de la HGH durante varias pruebas estimulantes. Se aceptan niveles de respuesta a pruebas provocativas por abajo de 10 ng/ml como pre-requisito para terapia de reemplazamiento en niños. Esta prueba confirma el diagnóstico de GHD. El diagnóstico es fácil cuando la respuesta pobre de la HGH está acompañada por hipoglucemia y otras deficiencias pituitarias, pero el diagnóstico resulta difícil cuando la respuesta baja de la HGH es aislada. Niños normales a veces tienen respuestas anormales de HGH en pruebas de estímulo, lo cual pasa principalmente durante el periodo de prepubertad ó en pubertad atrasada. El nivel de la HGH plasmática es también anormal en la obesidad. La concentración de la HGH que define la GHD y los valores de la HGH en suero, obtenidos con una sola muestra pueden variar considerablemente dependiendo del ensayo utilizado.

Las pruebas empleadas para valorar la secreción de HGH pueden ser del tipo farmacológico, fisiológico, por determinación de los valores plasmáticos de GRF, por determinación plasmática de somatomedina, por determinación de HGH en orina y finalmente por determinación de IGF-I en saliva y orina (Tabla 2).

Tabla 2. Determinaciones para valoración de la secreción de HGH

Nº	Pruebas
1	Fisiológicas (sueño, ejercicio).
2	Farmacológicas (Hipoglucemia/Insulínica, Clonidina, L-Dopa, Propranolol)
3	Determinación de los niveles plasmáticos de GRF
4	Concentraciones plasmáticas de Somatomedina C
5	Perfil secretorio de HGH de 24 h.
6	Determinación de niveles de la HGH en orina de 24 h.
7	Valoración de las concentraciones de IGF-I en orina
8	Estudio de las concentraciones de IGF-I e IGF-II

1.4 SECRECIÓN Y ACCIÓN DE LA HGH

La secreción de HGH está controlada por interacción de componentes neuronales y mecanismos de retrocontrol. Según el conocimiento reciente, se indica que el Sistema Nervioso Central (SNC) controla la secreción de HGH por medio de los factores hipotalámicos: GHRH (Hormona liberadora de la GH) que es estimulante y SS (Somatostatina), que inhibe la liberación de HGHs, los cuales una vez liberados desde sus somas neuronales correspondientes, alcanzan la eminencia media y son vertidos en el sistema portal hipofisiario desde donde son transportados a la hipófisis (Ceda *et al*, 1987) donde interactúan provocando la secreción de la HGH (Fig. 2).

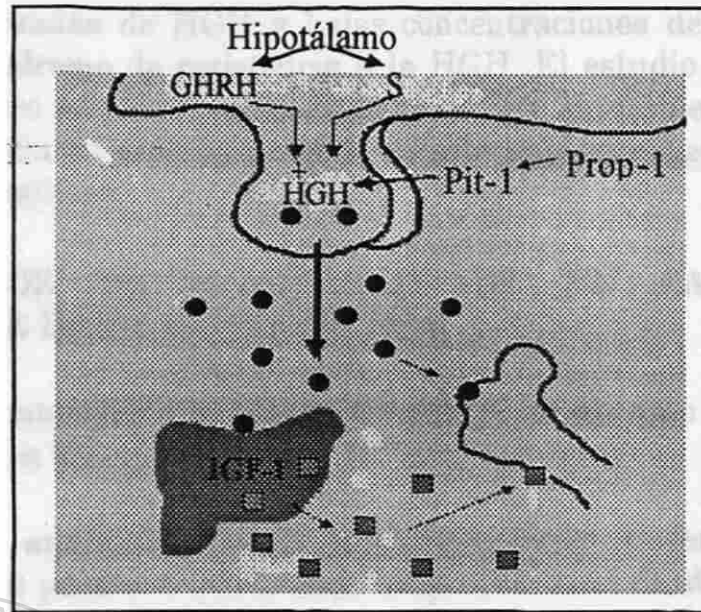


Figura 2. Mecanismo de secreción y acción de la HGH. Cascada de transactivación donde se muestran los genes y hormonas principales que intervienen en la secreción de HGH. Tomado de Ceda, *et al*, 1987.

En conclusión, la secreción de la HGH está controlada por GHRH y SS. Pero en adición a lo anterior, algunas hormonas periféricas modulan la expresión del gen hGH-N, estando entre ellas: las hormonas tiroideas (T3), la hidrocortisona, el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) y la insulina, que actúan de manera directa en la expresión del gen. La hormona T3 y la hidrocortisona estimulan la producción del RNAm del gen hGH-N, en cambio IGF-I y la insulina inhiben al gen.

El déficit de HGH puede resultar de una lesión intracraneal ó aparecer en ausencia de cualquier anomalía anatómica subyacente. Estas categorías del déficit se distinguen con los términos de orgánica e idiopática. Las estadísticas de distribución de las diferentes formas muestran que un 20-25% pertenecen a lesión hipotalámico-hipofisiaria, un 10% son hereditarias y el 70% son de origen idiopático (tabla 3).

Así mismo se debe considerar que puede haber resistencia hormonal por:

- 1) Sensibilidad anormalmente disminuida, cuando se requieren concentraciones hormonales mayores para obtener una respuesta considerada normal.
- 2) Disminución de la respuesta, cuando la respuesta máxima está disminuida sin ninguna alteración en la sensibilidad.

Las alteraciones de un síndrome de resistencia hormonal se localizan en tres áreas: pre-receptor, receptor y post-receptor. En 1966 se describió el primer caso de enanismo familiar distinto de los casos de GHD que tenía tasas

plasmáticas elevadas de HGH y bajas concentraciones de somatomedinas, debido a un síndrome de resistencia a la HGH. El estudio de receptores en hígado es el único método de demostración de este síndrome de resistencia a HGH por carencia de receptores GHR en este tejido (la cual probablemente ocurre en otros tejidos).

1.5 CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE UN PACIENTE CON SOSPECHA DE DEFICIENCIA DE HGH.

- 1.-Talla baja patológica (de más de 2.5-3 DS), en un niño con proporciones normales (Figura 3).
- 2.-Crecimiento anormal para la edad cronológica (inferior a 7 cm/año durante los tres primeros años e inferior a 4 cm /año desde la edad de tres años hasta el inicio de la pubertad.
- 3.-Retraso en la maduración esquelética (edad ósea mayor de 2 DS por debajo de la media para la edad cronológica).
- 4.- Consideraciones clínicas particulares: historia clínica de trauma craneal, tumor del SNC, hipoxemia, hemorragia intracraneal, displasia septo-óptica, antecedentes de radioterapia, hipoglucemia y presencia de micropene.

Se han tenido problemas para la elección del método más adecuado para definir GHD en adultos. Ya que la secreción de HGH disminuye con la senescencia y también está reducida en la obesidad, estos factores deben ser tomados en cuenta en una evaluación de este tipo de desorden. Se han investigado las cualidades diagnósticas de medición, siendo las siguientes pautas:

- a) El pico de GH responde a hipoglucemia inducida por insulina (ITT).
- b) Niveles de IGF-I en suero.
- c) Niveles de proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-3).

Al llevar a cabo esta serie de pruebas en 23 pacientes considerados deficientes de HGH y en 35 sujetos normales de edad similar se ha llegado a la conclusión de que la ITT, es la única prueba capaz de distinguir pacientes con GHD de sujetos normales (Ho KK *et al*, 1994). Por lo anterior se puede decir que la deficiencia de HGH en adultos puede diagnosticarse confiablemente por el ITT. Los tipos de trasmisión genética de la GHD se explicarán en la sección 1.7.



Figura 3. Enanismo hipofisiario. Se muestra una adolescente de 17 años con deficiencia de HGH comparada con una adolescente sana de la misma edad.

1.6 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA HGH.

La HGH tiene la función principal de estimular el crecimiento longitudinal de los huesos y de promover el crecimiento post-natal, el cual se encuentra asociado a una gran variedad de factores fisiológicos, anatómicos y metabólicos. Además, incrementa el uso de la glucosa en músculo y tejido adiposo, aumenta el transporte de aminoácidos y estimula la glucogénesis. Los efectos de esta hormona se ejercen por la acción directa mediada por receptores de membrana e indirectamente sobre los tejidos (Phillips, 1989), estos últimos efectos están mediados por proteínas como las somatomedinas o factores de crecimiento similares a insulina (IGFs). En cuanto a estructura, la HGH consiste de una cadena polipeptídica con un PM aproximado de 22 kDa y una longitud de 191 aminoácidos. Tiene dos puentes disulfuro intracatenarios entre restos de cisteína localizados en las posiciones 53 y 165 y entre la 182 y 189. Recién sintetizada, cuenta con un péptido señal de 26 aminoácidos para dirigir el transporte de la pre-hormona a través de la membrana del retículo endoplásmico hacia la cisterna, donde es secretada al torrente sanguíneo (Paladini, 1982).

Lewis y cols. en 1978 aislaron una variante a partir de la hipófisis, la cual tiene una delección de los residuos 32 a 46 de la isoforma 22 kDa y PM de 20kDa. Esta variante tiene actividad biológica alterada y se verifica por el hecho de que no tiene los efectos rápidos tipo insulina, por lo que se puede decir que esta propiedad depende de dichos residuos eliminados.

1.6.1 LOCALIZACIÓN DEL GEN hGH-N.

El gen hGH-N, que produce la HGH, forma parte de un grupo de genes emparentados denominado locus hGH-hPL que incluye también genes que codifican para el lactógeno placentario (HPL). Estos genes abarcan un área de aproximadamente 50 kb (Chen *et al.*, 1989), que se localiza entre las bandas q22-24 del brazo largo del cromosoma 17 (George *et al.*, 1981; Harper *et al.*, 1982). Se cuenta con la secuencia de cada uno de sus genes, así como de sus secuencias flanqueantes, dando en total 66.45 kb (Chen *et al.*, 1989).

El locus hGH-hPL está constituido por cinco genes orientados en la misma dirección transcripcional de 5' a 3', y tienen un alto grado de similitud (92 a 98%) en sus secuencias (Barsh *et al.*, 1983; Hirt *et al.*, 1987). Cada uno de dichos genes consta de cinco exones con cuatro intrones intercalados (figura 4). Dos de ellos codifican para HGHs, normal y variante, que se expresan en los somatotrófos de la pituitaria y en las células del sincitiotrofoblasto placentario, respectivamente (Frankenne *et al.*, 1987). Los otros tres genes restantes codifican para HPLs. Todos los genes del locus se originaron por duplicación a partir de un ancestro común (Barsh *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1989), (figura 4).

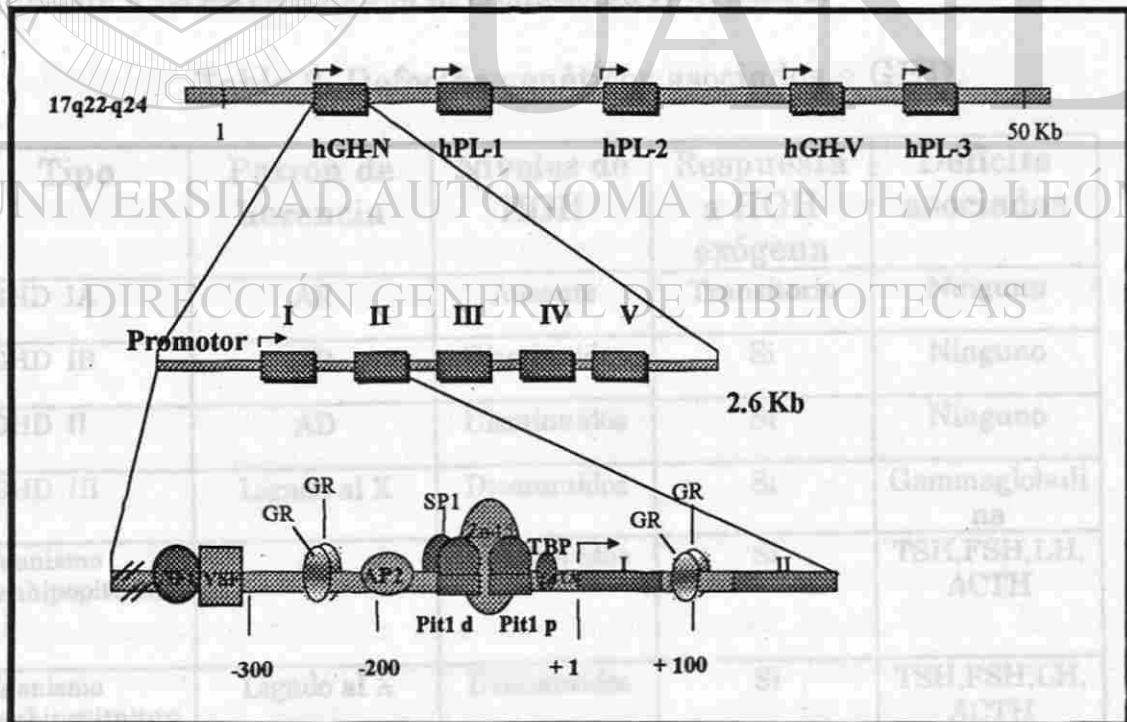


Figura 4. Estructura del gen hGH-N. Este se encuentra en el extremo 5' del locus y su organización es típica de todos los miembros de esta familia, destacándose entre sus peculiaridades su promotor que dicta su expresión en la hipófisis. Tomado de Castrillo *et al.*, 1998.

1.7 ALTERACIONES GENÉTICAS DE hGH-N.

En cuanto a los defectos genéticos que producen deficiencia de la HGH se encuentran los siguientes:

- a) Alteraciones del gen hGH-N.
- b) Alteraciones en loci distantes que causan deficiencias de GH por mecanismos epistáticos (Prop1, Pit1).
- c) Alteraciones de genes que controlan la respuesta a la GH (GHR).

En la actualidad se conocen cuatro tipos mendelianos de déficit aislado de la GH. Su clasificación se ha basado en el modo de herencia y en el grado de deficiencia de la GH (Phillips III, 1989). El tipo IA se hereda de modo autosómico recesivo, se caracteriza por la ausencia de GH endógena y reacción inmune a GH exógena, por lo que es difícil de tratar. El tipo IB también se hereda de forma autosómica recesiva, presenta niveles disminuidos de GH endógena y responde al tratamiento con GH exógena. El tipo II se hereda de forma autosómica dominante y cuenta con niveles bajos de GH endógena. Los tipos I y II son debidos a mutaciones en el locus hGH-N. El tipo III ligado al cromosoma X, cursa con niveles disminuidos de GH endógena. El panhipopituitarismo, una alteración que se caracteriza por deficiencia de varias hormonas hipofisarias, puede tener formas de herencia autosómica recesiva o ligada al cromosoma X. (Tabla 3)

Tabla 3. Defectos genéticos asociados a GHD.

Tipo	Patrón de herencia	Niveles de HGH	Respuesta a HGH exógena	Déficits asociados
IGHD IA	AR	Ausente	Transitorio	Ninguno
IGHD IB	AR	Disminuidos	Si	Ninguno
IGHD II	AD	Disminuidos	Si	Ninguno
IGHD III	Ligado al X	Disminuidos	Si	Gammaglobulina
Enanismo panhipopituitario I	AR	Disminuidos	Si	TSH, FSH, LH, ACTH
Enanismo panhipopituitario II	Ligado al X	Disminuidos	Si	TSH, FSH, LH, ACTH
Enanismo de Laron	AR	Normal ó disminuidos	No	Ninguno
HGH bioinactiva	¿?	Normal	Si	Ninguno

Fuente: Phillips III, 1989.

1.7.1 DEFICIENCIAS AISLADAS FAMILIARES DE HGH.

a) Deficiencia aislada de hormona del crecimiento tipo IA (IGHD IA).

~~Este tipo de defecto~~ es el más severo. Los niveles circulantes de HGH ~~no se~~ pueden detectar ni en condiciones basales, ni después de un estímulo provocativo (Illig, 1971). Si bien se desconoce su incidencia, se estima que han sido publicados 50 casos, no relacionados entre sí en todo el mundo (Phillips III, 1989; Hjelle, 1981; Goosens, 1986). Además, cuando un paciente recibe HGH exógena, la mayor parte de ellos desarrolla anticuerpos anti-HGH, los cuales bloquean la respuesta del tratamiento (Phillips, 1989). Por otro lado, además de la deleciones, se han descrito otras mutaciones en el gen hGH-N relacionadas con este fenotipo y niveles plasmáticos indetectables de HGH (Phillips III, 1982; Phillips III, 1992; Igarashi, 1993).

En cuanto a las bases moleculares, este defecto se debe a una deleción de ambos alelos del gen hGH-N (Phillips III, 1981). Las pruebas analíticas demuestran un déficit total selectivo de HGH, con normalidad en el resto de las hormonas hipofisarias. Los pacientes afectados presentan características físicas inconfundibles del enanismo hipofisario tales como las siguientes:

Cráneo grande, frente abombada, nariz chata, puente nasal hundido, expresión inteligente, rasgos faciales de muñeco, proporciones corporales respetadas y obesidad relativa. En este caso se trata de una ausencia completa de HGH y no de un déficit clásico.

b) Deficiencia aislada de hormona del crecimiento tipo IB (IGHD IB).

Este tipo de defecto presenta un fenotipo menos severo y está asociado con niveles plasmáticos bajos pero detectables de HGH, después de un estímulo farmacológico (Phillips, 1989) y además tras la administración de HGH exógena no desarrolla anticuerpos que neutralicen el tratamiento. Por lo tanto, en este caso se trata de un déficit y no de una ausencia como en el tipo IA.

c) Deficiencia aislada de hormona del crecimiento tipo II (IGHD II).

Estos pacientes presentan las mismas características que los pacientes IGHD IB (Phillips III, 1989) pero este defecto se hereda de forma dominante. El déficit de HGH de uno de los padres se transmite verticalmente a los hijos receptores del alelo afectado. La alteración molecular causante de este déficit se ha descrito en familias no relacionadas (Cogan, *et al.*, 1993). En todos los casos se trata de mutaciones en un alelo a nivel del intrón III del gen hGH-N que produce un efecto dominante negativo aún no caracterizado a nivel molecular, lo que origina una pérdida del exón 3 en el RNA maduro y afecta la actividad de la proteína generada.

Tani y cols. en 1987 describieron cinco casos de IGHD en tres generaciones sucesivas. Los tres pacientes que fueron estudiados no presentaron anormalidad en los genes de HGH en un análisis de Southern blot. La hormona fue detectada en el plasma por radioinmunoanálisis (RIA) pero los

niveles fueron claramente más bajos que en niños normales y no se obtuvo un aumento significativo con la prueba de tolerancia a insulina ó con la prueba triple Arginina-TRH-LHRH. Tampoco tuvieron efecto alguno las inyecciones repetidas del GHRF.

Phillips y Cogan en 1994 se refirieron a la forma autosómica dominante de la deficiencia como IGHD II, ellos indicaron que la severidad clínica variaba considerablemente entre parientes y que los pacientes afectados respondían bien al tratamiento sin desarrollar anticuerpos.

d) Deficiencia aislada de hormona del crecimiento tipo III (IGHD III).

Se han reportado tres familias con este tipo de deficiencia la cual muestra un patrón de herencia ligado al cromosoma X , en la que todos los varones afectados tenían también hipogammabulinemia (Fleisher, 1980; Conley, 1992) lo que ha sugerido que este desorden se debe a un síndrome de genes continuos.

El tratamiento de estos pacientes con GH se asoció con un incremento de los linfocitos B y niveles plasmáticos elevados de inmunoglobulinas (Rappaport, 1993). Actualmente existen evidencias que sugieren la presencia de varios loci en el cromosoma X capaces de intervenir en la regulación de la HGH (Ogata, 1992).

1.7.2 PANHIPOPITUITARISMO

Algunos casos autosómicos recesivos tienen anomalías anatómicas con silla turca pequeña o alargada. Los loci responsables aún no se han establecido, excepto para un subtipo autosómico recesivo que se asocia a déficits de GH, PRL y TSH, con normalidad del resto de la función hipofisiaria (Witt, 1989). Este fenotipo humano es parecido al fenotipo de lo ratones enanos Snell y Jackson, donde el fenotipo es causado por mutaciones en el locus Pit-1, con deficiencias de GH, PRL y TSH.

De este modo, se han podido describir algunas mutaciones en el gen Pit1 relacionadas con panhipopituitarismo en humanos. Sin embargo, muchos de los casos de enanismo panhipopituitario no están ligados a alteraciones del gen Pit-1, por ello ha sido necesaria la evaluación de otros genes entre los que se encuentra el factor transcripcional que activa al gen Pit-1, llamado gen Prophet 1 (Prop-1).

Alteraciones genéticas de los genes: Pit-1 y Prop-1

En la región promotora del gen hGH-N se encuentran los dos sitios de unión para el factor de transcripción específica de HGH, conocido como Pit-1 (Meyes y Habener, 1993) que es parte de una familia de péptidos fijadores a sitios específicos en el DNA. El gen Pit-1 contiene dos dominios (dominio específico POU y homeodominio POU), se localiza en el cromosoma 3p11(Ohta, *et al.* 1992), consta de seis exones y cinco intrones. Este factor participa en la

activación específica de los genes GH, PRL y TSH (Bodner, *et al.* 1988; Ingraham, *et al.* 1988) y se han reportado anomalías en el mismo causantes de patología en el crecimiento humano (Figura 5).

Es necesaria la presencia de Pit-1 para transducir el efecto de GHRH sobre la síntesis de la HGH y su falta de activación ocasiona deficiencia congénita en la síntesis de esta (Struthers, *et al.* 1991). Se ha sugerido que la expresión del gen del receptor de GHRH podría controlarse directa o indirectamente por Pit-1 (Casanueva, 1992).

La expresión de Pit-1 en el somatotropo en una determinada fase embrionaria, activa permanentemente al gen GH específicamente en este tipo celular. Entre otros factores, el AMPc y los glucocorticoides regulan la expresión del gen Pit-1.

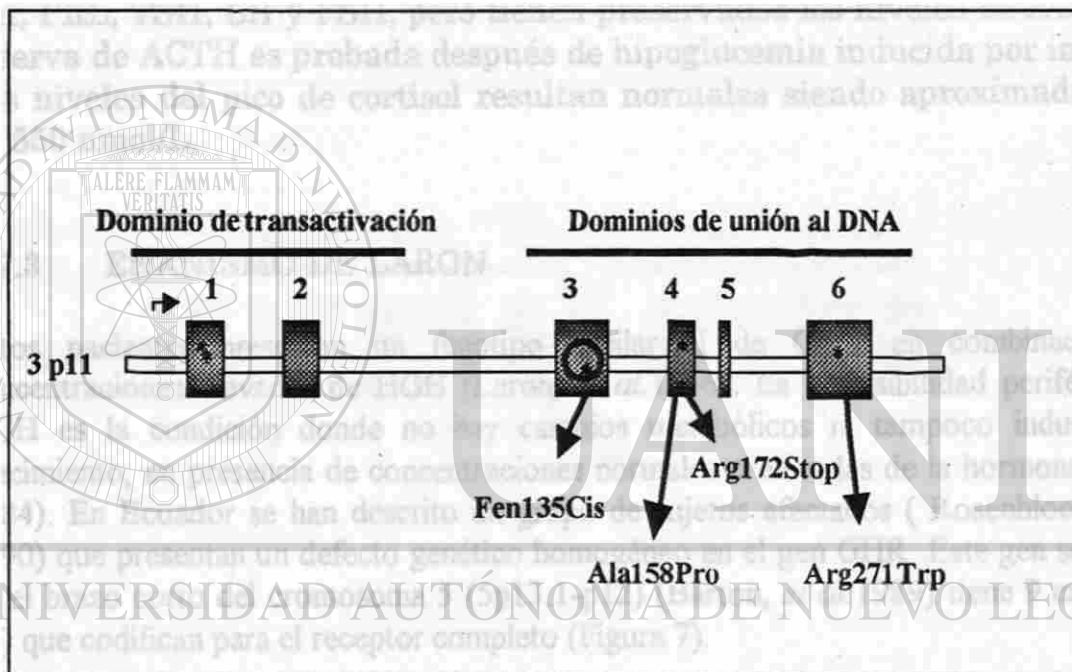


Figura 5. Mutaciones descritas en el gen Pit-1. Se han reportado mutaciones en los exones 1, 3, 4 y 6 del gen Pit-1, siendo la más frecuente la del exón 3, que se trata de una transición de fenilalanina a cisteína en la posición 135 (Fen135Cis). Tomado de Pellegrini *et al.*, 1996.

Recientemente se ha identificado un nuevo factor de transcripción, el Prop-1, que tiene un homeodominio pareado. Este factor es específico de la pituitaria y se expresa solo en la etapa embrionaria temprana en ratón, habiendo sido clonado recientemente por Duquesnoy y cols. en 1998. Con el fin de estudiar su participación en la deficiencia combinada de hormonas de la pituitaria (CPHD), estos autores aislaron el DNAC humano y determinaron la organización intrón/exón y la localización cromosómica de este gen en el humano, demostrando luego por procesamiento *in vitro* su importancia funcional en la producción de somatotropinas, lactotropinas, tiotropinas y gonadotropinas.

Se han buscado defectos genéticos en Prop-1 en pacientes con CPHD que presentan deficiencia múltiple de hormonas (GH, PRL, TSH, LH y FSH) y

En 1999 Deladoey y cols. analizaron 73 pacientes, encontrando que 35 de ellos tenían CPHD causada por un defecto genético de PROP1. Las alteraciones encontradas incluían: mutaciones sin sentido, mutaciones de cambio de marco de lectura y mutaciones de procesamiento. Además de lo anterior encontraron repeticiones en tandem GA, en el gen PROP 1 en la posición 296-302 que representan "hot spot" para CPHD.

Las consecuencias de la anomalía de Prop-1 incluyen deficiencia de gonadotropina, así como también deficiencias en somatotropinas, lactotropinas y tirotropinas dependientes de Pit-1. La severidad del fenotipo de deficiencia de hormona es compatible con la pérdida completa de actividad de PROP1.

En resumen los pacientes con defectos en Prop-1 tienen niveles alterados de GH, PRL, TSH, LH y FSH, pero tienen preservados los niveles de ACTH. La reserva de ACTH es probada después de hipoglucemia inducida por insulina. Los niveles del pico de cortisol resultan normales siendo aproximadamente de 550 nmol/L.

1.7.3 ENANISMO DE LARON

Estos pacientes presentan un fenotipo similar al de GHD en combinación con concentraciones elevadas de HGH (Laron, *et al.* 1966). La insensibilidad periférica a la HGH es la condición donde no hay cambios metabólicos ni tampoco inducción de crecimiento, en presencia de concentraciones normales o elevadas de la hormona (Laron, 1984). En Ecuador se han descrito un grupo de sujetos afectados (Rosenbloom, *et al.* 1990) que presentan un defecto genético homogéneo en el gen GHR. Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 5 (5p13.1-p12) (Barton, *et al.* 1989) tiene 9 exones (2-10) que codifican para el receptor completo (Figura 7).

Alteraciones en el gen GHR (receptor de HGH)

En principio, se debe considerar que hay dos tipos de resistencia hormonal:

- a) Por sensibilidad disminuida anormalmente, cuando se requieren concentraciones hormonales mayores para obtener una respuesta considerada normal
- b) Por disminución de la respuesta, cuando la respuesta máxima está disminuida sin ninguna alteración en la sensibilidad.

Las alteraciones de un síndrome de resistencia hormonal se localizan en tres áreas: Pre-receptor, receptor y post-receptor. En 1966 se describió el primer caso de enanismo familiar distinto de los casos de GHD que tenía tasas plasmáticas elevadas de HGH y bajas concentraciones de somatomedinas, debido a un síndrome de resistencia a la HGH. Anteriormente el estudio de receptores en hígado era el único método de demostración de este síndrome de resistencia a la hormona por carencia de receptores GHR en este y

probablemente en otros tejidos, ahora también se cuenta con metodologías moleculares como la PCR.

Hasta el momento en el gen del receptor se han reportado deleciones que incluyen a los exones 3, 4, 5 y 6, lo que causa la suspensión del paso de la señal al nivel de la región codificada por el exón 7, con la pérdida de los dominios transmembranal y citoplásmico del receptor. Aunadas a estas alteraciones se han descrito 18 mutaciones puntuales en distintas regiones del gen GHR (Figura 6) que comprometen la estructura de diferentes regiones del receptor (Amselem, *et al*, 1989). La mutación puntual más frecuente es la encontrada en el exón 6 (Figura 7) correspondiendo al cambio de una adenina por una guanina en el codon 180 (Berg, *et al*, 1993).

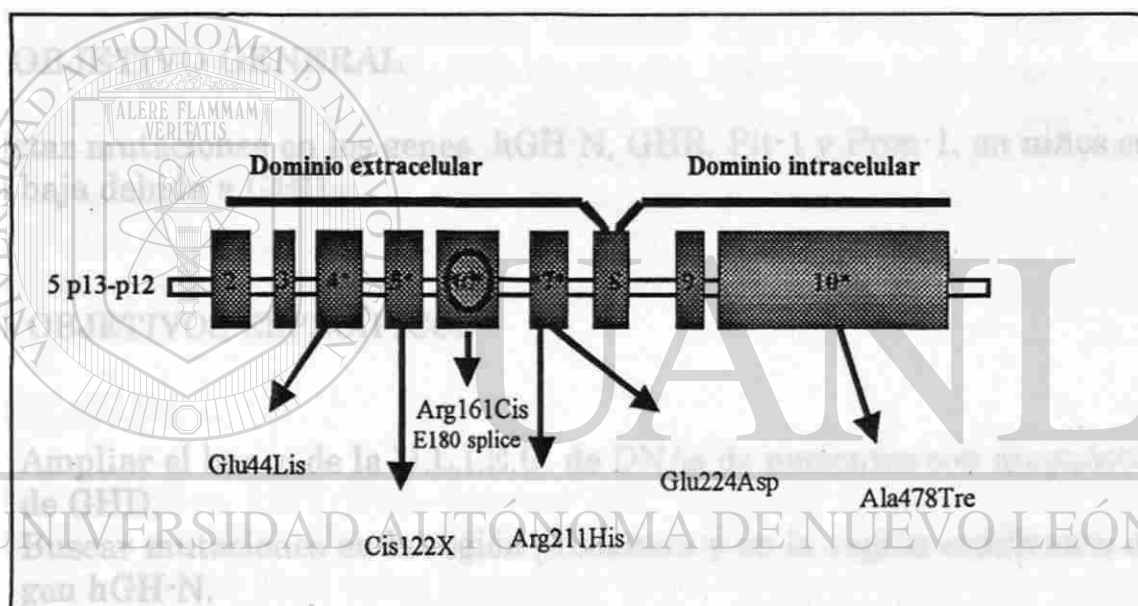


Figura 7. Mutaciones descritas en el gen GHR. En la figura se ilustran las mutaciones puntuales que se han reportado en los exones 4, 5, 6, 7 y 10, siendo las más frecuentes las detectadas en el exón 6. Una de ellas corresponde al cambio de arginina por cisteína en el codón 161, asimismo es importante la mutación E180 splice (empalme), generada por la transición de A por G que conduce a una deleción de 24 nucleótidos del exón 6. Tomado de Goddar *et al*, 1995.

1.8 JUSTIFICACIÓN

La deficiencia de HGH en humanos tanto aislada como asociada a otras anomalías, es hereditaria en el 10% de los casos. Aunque las alteraciones endocrinas constituyen una minoría entre las causas de retraso del crecimiento, resulta muy importante tratar de identificarlas debido a que pueden ser susceptibles a tratamiento. En la actualidad no es posible identificar mediante pruebas bioquímicas convencionales un trastorno hipofisiario específico en individuos con talla baja. Por lo tanto resulta imprescindible aplicar metodologías moleculares que permitan detectar con certeza las alteraciones genéticas que generan defectos en el crecimiento de los individuos con GHD.

1.9 OBJETIVO GENERAL

Detectar mutaciones en los genes hGH-N, GHR, Pit-1 y Prop-1, en niños con talla baja debida a GHD.

1.9.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Ampliar el banco de la U.L.I.E.G. de DNAs de pacientes con diagnóstico de GHD.
- b) Buscar mutaciones en la región promotora y en la región codificante del gen hGH-N.
- c) Detectar mutaciones en el gen Pit-1.
- d) Buscar mutaciones en el gen Prop-1.
- e) Rastrear mutaciones en el gen GHR.

II MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Las muestras de sangre de pacientes deficientes en HGH fueron recolectadas en el Hospital "José E. González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León, la Clínica-Hospital de especialidades N.25 del I.M.S.S. de Monterrey, la Clínica-Hospital del I.S.S.S.TE de Monterrey, la Clínica-Hospital del S.N.T.E sección 50 de Monterrey y en el Hospital del Centro Médico Nacional "La Raza" del I.M.S.S. de México, D.F. (tabla 4).

Tabla 4. Banco de DNAs de pacientes con deficiencia aislada y combinada de HGH (ver cuadros clínicos en apéndices 2 y 3).

ORIGEN DE PACIENTES	PACIENTES IGHD EXISTENTES EN LA ULIEG	PACIENTES IGHD ADICIONADOS AL BANCO	TOTAL PACIENTES IGHD EN EL BANCO	PACIENTES CPHD EXISTENTES EN LA ULIEG	PACIENTES CPHD ADICIONADOS AL BANCO	TOTAL PACIENTES CPHD EN EL BANCO
Clínica 25 IMSS, Monterrey	17	10	27	-	4	4
Hospital de Maestros SNTE Monterrey	-	9	9	-	-	-
Hospital Regional ISSSTE Monterrey	7	1	8	1	-	1
Centro Médico Nacional "La Raza" IMSS México, D.F.	13	-	13	-	-	-
Universidad de Chile. Facultad de Medicina Stgo de Chile	4	-	4	-	-	-
Totales	41	20	61	1	4	5

2.2 REACTIVOS Y EQUIPO

REACTIVOS

Trizma base T-8524 (Sigma), EDTA E5134 (Sigma), SDS lauril sulfato L4390 (Sigma), proteinasa K P2308 (Sigma), ácido bórico B-6768 (Sigma), fenol P4161 (Sigma), acetato de amonio A1542 (Sigma), agarosa A9539 (Sigma), bromuro de etidio E4391 (Sigma), azul de bromofenol B5525 (Sigma), cianol de xileno X4126 (Sigma), persulfato de amonio en polvo A9164 (Sigma), N, N' metilen bis-acrilamida A9099 (Sigma), acrilamida A9099 (Sigma), TEMED T7024 (Sigma), formamida F-7503 (Sigma), aceite mineral M5409 (Sigma), Tritón T-8532 (Sigma), etanol absoluto 100983.2500 (Merk), cloroformo CX1055-9 MCA Merk (Probiotek), glicerol Merk (Probiotek), ácido clorhídrico 01689 (Casa Rocas), deoxinucleótidos trifosfato (DATP U-1201, DGTP U-1211, DCTP U-1221, DTTP U-1231) (Promega), Taq DNA polimerasa que incluye buffer de reacción 10X sin MgCl y solución de MgCl (Promega), iniciadores (gen HGH, exón 6 de GHR, exones 1, 3 Y 4 de PIT-1 y gen PROP-1) (Promega), estuche QIAEX II 28304 (QIAGEN), enzimas de restricción *Bgl* I, *Acc* I, *Ava* II, *Sma* I, *Afl* III, *Hae* III, *Mnl* I, *Pst* I y *Ssp* I (New Engl Biolabs), estuche de secuenciación cíclica 78500 (USB), IR2 solución stop 830-04997(LI-COR).

DESECHABLES

Puntillas amarillas 110Y (CEL Associate Inc), puntillas azules 111B (CEL Associate Inc), puntillas blancas 100C (CEL Associate Inc), tubos Eppendorf 502C (CEL Associate Inc), tubos Eppendorf 508C (CEL Associate Inc), tubos Eppendorf 509C (CEL Associate Inc), tubos Falcon 3216 (CEL Associate Inc), tubos Falcon 3250 (CEL Associate Inc), guantes de látex medianos 804-10 (CEL Associate Inc), crioboxes de propileno R800 (CEL Associate Inc), cinta amarilla para sellar (GIBCO BRL), recipientes (Nalgene), cajas de tubos Vacutainer con EDTA de 7 ml, cajas de agujas Vacutainer 21g11/2, agujas mariposa Vacutainer 21g3/4, bolsas de algodón 50g (Protec).

EQUIPO DE LABORATORIO

Sistemas de electroforesis vertical modelo S2 (GIBCO BRL), fuente de poder Power PAC 3000 (Bio-Rad), equipo de electroforesis horizontal (Bio-Rad), fuente de poder modelo 250 (GIBCO), micropipetas de precisión de: 2ml, 10ml, 20ml, 200ml y 1000 ml (Gilson), horno de microondas 0.7FT (LG), mechero Bunsen 6 IN (VWR), centrifuga modelo 5415C (Brinkmann), termomixer (Brinkmann), vortex Maximix, plancha térmica (Thermolyne), equipo para análisis y documentación de geles Gel-Doc (Bio-Rad),

microcentrifuga (Eppendorf), baño de agua (Precision), potenciómetro 744 (MetroHM), congelador -70°C (REVCO), portapipetas, gradillas, termociclador Minicycler TM Modelo PTC 150 (MJ Research), termociclador (Hybaid Express), -transluminador -UV/W (Fotodyne), equipo de secuenciación automática sistema IR2 (LI-COR), computadoras Macintosh que incluyen los programas para análisis de secuencias: Amplify, 1.2B, DNA Strider 1.1 y Oligo 4.0 y computadoras IBM con Windows 98 incluyendo el Office 2000, Explorer 5.0 y Adobe Photoshop 2.0.

2.3 METODOLOGÍA

2.3.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

- a) La extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica de los pacientes seleccionados, se practicó utilizando la técnica de TSNT, clasificando las muestras de los pacientes en deficiencia aislada (GHD) y combinada (CPHD).
- b) En los pacientes con GHD se buscaron mutaciones en la unidad transcripcional del gen hGH-N, por medio de su amplificación y utilizando el análisis de heterodúplex.
- c) Cuando la prueba anterior resultó negativa se continuó con la detección de mutaciones en la región promotora de dicho gen, por medio de PCR y usando también la técnica del análisis de heterodúplex.
- d) Cuando el tamizaje anterior arrojó resultados negativos se procedió a buscar las mutaciones en el gen GHR (receptor de la hormona) con las mismas técnicas mencionadas.
- e) En cuanto a los pacientes con CPHD, primero se procedió a analizar el gen Pit-1 y si el análisis resultaba negativo, se analizaba finalmente el gen Prop -1.
- f) Por último se precisaron las mutaciones, rescatando y purificando las bandas de las regiones que resultaron positivas en el análisis de heterodúplex, con el fin de determinarles su secuencia por medio de la técnica de secuenciación automática. (Figura 8).

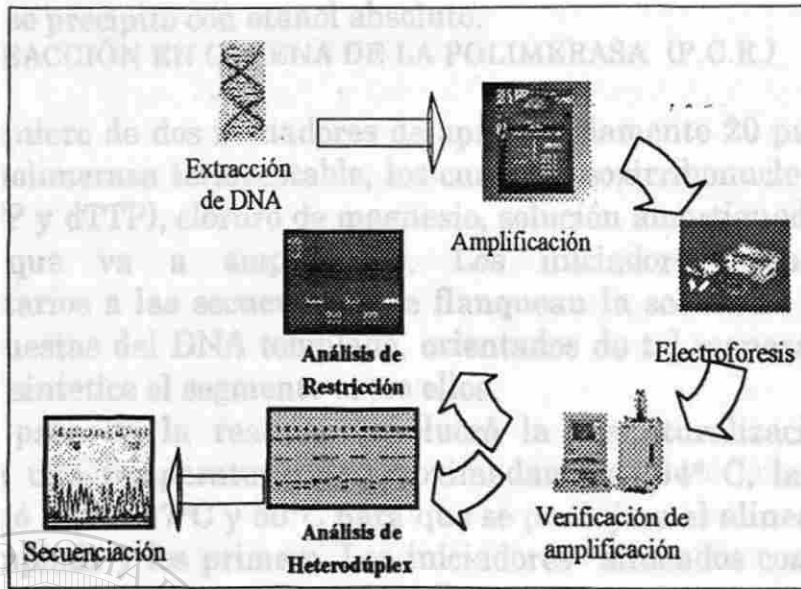


Figura 8. Estrategia experimental. Esta consistió en la extracción del DNA de muestras de pacientes, la amplificación de la región seleccionada por PCR, la verificación de la amplificación en gel de agarosa, el rastreo de mutaciones por restricción y/o heterodúplex y la secuenciación de las muestras que resultaron positivas.

2.3.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Los pacientes se seleccionaron basándose en los siguientes criterios:

- a) Retraso del crecimiento.
- b) Cara inmadura.
- c) Cariotipo normal.
- d) Proporciones corporales normales.
- e) Retraso en el desarrollo óseo.
- f) Niveles de HGH de menos de 7 ng/ml, después de la estimulación con un fármaco (clonidina, L-dopa ó propanolol).
- g) Valores de los niveles de las hormonas hipofisarias: FSH, PRL, TSH, ACTH y LH. (Ver Apéndices 2 y 3).

2.3.3 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS TÉCNICAS CLAVES

2.3.3.1 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

El DNA se obtuvo a partir de las muestras de sangre obtenidas de los pacientes y de los controles, utilizando para ello el método TSNT el cual utiliza como solución amortiguadora de lisis al Tris-HCl, EDTA, SDS y a la proteinasa K. Después de la lisis celular se procedió a la extracción del DNA

genómico usando solventes orgánicos (fenol, cloroformo, alcohol isoamílico) y finalmente se precipitó con etanol absoluto.

2. 3. 3. 2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (P.C.R.)

La PCR requiere de dos iniciadores de aproximadamente 20 pares de bases, una DNA polimerasa termoestable, los cuatro desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), cloruro de magnesio, solución amortiguadora y el DNA templado que va a amplificarse. Los iniciadores tienen que ser complementarios a las secuencias que flanquean la secuencia blanco de las cadenas opuestas del DNA templado, orientados de tal manera que la DNA polimerasa sintetice el segmento entre ellos.

El primer paso de la reacción involucró la desnaturalización del DNA templado a una temperatura de aproximadamente 94° C, la temperatura luego se bajó entre 37°C y 60°C para que se produjera el alineamiento entre el DNA templado y los primers. Los iniciadores alineados con la secuencia blanco fueron extendidos con la DNA polimerasa a una temperatura de 72°C. El ciclo de desnaturalización, alineamiento y síntesis de DNA se repitió aproximadamente 30 veces (el primer ciclo generó un producto de tamaño indeterminado, pero ya para el segundo empezó a reemplazar exponencialmente al delimitado por los primers). Los productos de un ciclo de amplificación sirvieron como templados para el siguiente ciclo y así sucesivamente cada ciclo dobló la cantidad de producto, resultando en la acumulación exponencial del DNA blanco.

En la tabla 5 se enlistan los iniciadores que se utilizaron en cada una de las amplificaciones que se llevaron a cabo.

Tabla 5. Iniciadores utilizados en el presente estudio

CLAVE	SECUENCIA	AMPLIFICA
PITEX1A	5' GAATCGGCCCTTTGAGACAG 3'	EXÓN 1 DEL GEN PIT 1
PITEX1B	5' CCCGGTCATATGTAAACTGT 3'	EXÓN 1 DEL GEN PIT 1
PITEX3A	5' GTAGTTTAACCCCTGTCTTTA 3'	EXÓN 3 DEL GEN PIT 1
PITEX3B	5' TTCTTGAACCCAAAGGTTAGA 3'	EXÓN 3 DEL GEN PIT 1
PITEX4A	5' GATACACAGATTTGTGTGAC 3'	EXÓN 4 DEL GEN PIT 1
PITEX4B	5' TCCTACTTATTGAAGCATT 3'	EXÓN 4 DEL GEN PIT 1
463	5' CGAATTCAGGAGAGGCACTGGGGA 3'	GEN HGH-N
138	5' TTGGTTCTCTCTAGAGGTCAGTGTGGA 3'	GEN HGH-N y Promotor
145	5' TTTACGGCCGCTTACCTGTAGCCAT 3'	GEN HGH-N (Promotor)
PROP 3'	5' CGAACATTCAGAGACAGAGTCCCAGA 3'	GEN PROP-1
PROP 5'	5' GAATTCACCATGATGTCCCA 3'	GEN PROP-1
PROEX2A	5' TGGTCCAGCACCGAGCAG 3'	EXÓN 2 DE PROP-1
PROEX2B	5' TGCCCAACATTCATGATAGC 3'	EXÓN 2 DE PROP-1
GHREX6A	5' ATTGTGTCTGTCTGTGTACTAATG 3'	EXÓN 6 DEL GEN GHR
GHREX6B	5' ATAGAAAGAAAAGTCAAAGTGTAAAG 3'	EXÓN 6 DEL GEN GHR

2.3.3.3 ANÁLISIS DE HETERODÚPLEX

Se realizó de la siguiente manera:

- 1.- Se desnaturalizaron los productos amplificados (200ng en vol de 2 μ l) incubando a una temperatura de 95°C durante 10 min.
- 2.- El producto amplificado desnaturalizado se incubó durante 6 hrs a 37°C.
- 3.- Después de la incubación se realizó una centrifugación ligera y se cargó en un gel de poliacrilamida adicionándole buffer stop. Generalmente las condiciones de electroforesis fueron las siguientes:
Voltaje = 250 volts y tiempo=15 hrs.
- 4.- Finalmente, el gel de poliacrilamida se tiñó con bromuro de etidio (2 μ g/ml), para su posterior análisis en el aparato Gel Doc 1000 que cuenta con transiluminador (UV/Vis), computadora e impresora de inyección de tinta blanco y negro (Fig 9).

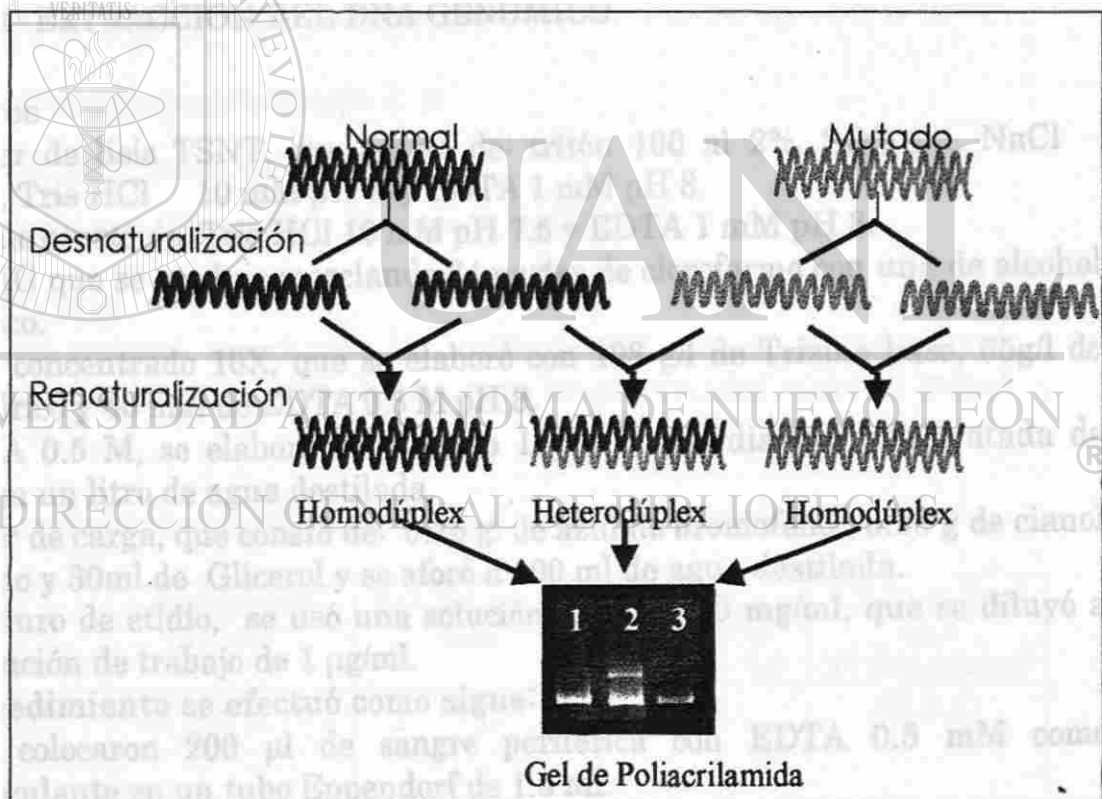


Figura 9. Análisis de un heterodúplex. En esta figura se muestra claramente la formación de un heterodúplex. Inicialmente se tiene un paciente con un alelo normal y el otro mutado. Al someter el amplicón a desnaturalización se generan cadenas sencillas de DNA en ambos alelos y después de permitir la renaturalización se pueden producir tres tipos de cadenas al azar: un homodúplex normal, un homodúplex mutado y el heterodúplex que resulta de la combinación de una cadena normal y una cadena mutada. Este proceso se puede visualizar en un gel de poliacrilamida por medio de una banda con corrimiento electroforético relativamente alterado.

2. 3. 3. 4 SECUENCIACIÓN

Las bandas que mostraron un patrón de movilidad electroforética alterado se extrajeron, se purificaron con el estuche comercial "QIAEX II", para finalmente secuenciarlas para precisar la mutación. En algunos casos, los productos de PCR se cortaron con enzimas para detectar con certeza la mutación. Por ejemplo, en el caso de los productos de la amplificación del exón 2 del gen Prop-1, éstos se cortaron con *Bcg I*, ya que cuando se presenta la mutación, se genera un sitio de restricción para esa enzima.

Para analizar las secuencias se utilizaron programas computacionales como: Amplify versión 1.2, DNA Strider versión 1.2 y OLIGO versión 4.0, además de los programas de Microsoft Office 2000.

2. 3. 4. PROTOCOLOS

2. 3. 4. 1 EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO

Reactivos

- a) Buffer de lisis TSNT, que constó de: tritón 100 al 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8.
- b) TE que constó de: Tris HCl 10 mM pH 7.5 y EDTA 1 mM pH 8.
- c) SEVAG que se produjo mezclando 24 partes de cloroformo con una de alcohol isoamílico.
- d) TBE concentrado 10X, que se elaboró con 108 g/l de Trizma base, 55g/l de ácido bórico y 40 ml/l de EDTA 0.5 M pH 8.
- e) EDTA 0.5 M, se elaboró disolviendo 186 g de sal disódica dihidratada de EDTA en un litro de agua destilada.
- f) Buffer de carga, que constó de: 0.25 g. de azul de bromofenol, 0.25 g de cianol de Xileno y 30ml de Glicerol y se aforó a 100 ml de agua destilada.
- g) Bromuro de etidio, se usó una solución stock de 10 mg/ml, que se diluyó a una solución de trabajo de 1 µg/ml.

El procedimiento se efectuó como sigue:

- 1.- Se colocaron 200 µl de sangre periférica con EDTA 0.5 mM como anticoagulante en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- 2.- Se centrifugó durante 5 min a 4500 rpm Se desechó el plasma y el paquete celular se resuspendió en 200 µl de solución amortiguadora de lisis TSNT.
- 3.- Se adicionaron 500 µl de fenol saturado, 100 µL de SEVAG y 200 µL de TE 1X.
- 4.- En cada adición de una nueva solución se mezclaron por inversión a excepción del SEVAG con el que se utilizó vortex por 5 min
- 5.- Después se centrifugó por 8 min a 14000 rpm, y el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf, al cual le fué agregado 1 ml de etanol al 100% y después se mezcló por inversión hasta que se observó la precipitación del DNA genómico.
- 6.- Se centrifugó a 14000 rpm durante 8 min, descartándose el sobrenadante.

7.- La pastilla se lavó con etanol al 70%, se mezcló y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones citadas en el paso 6.

8.- La pastilla se dejó secar por 10 min a 37°C.

9.- Finalmente el DNA se resuspendió en 50 µL de TE 1X y para la verificación de su integridad se corrió en un gel de agarosa al 2.0%, ya después de su tinción con bromuro de etidio, se estimó su concentración con el aparato de análisis de imágenes Gel-Doc 1000.

10.- La concentración del DNA se puede determinar espectrofotométricamente (Absorbancia a 260 nm), donde la calidad es detectada mediante la relación de absorbancia 260nm/280nm.

2.3.4.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

2.3.4.2.1 PCR DEL GEN hGH-N

A) LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Para realizar la amplificación del gen hGH-N, se utilizaron los primers consenso:

403 = 5' ccgaattccaggagaggcactgggga 3' y

138 = 5' ttggttctctctagagggtcagtgttga 3'

Estos iniciadores amplificaron un fragmento de 2155 pb.

B) LA REACCIÓN.

1.-La PCR se preparó mezclando los componentes que se mencionan a continuación, excepto el DNA genómico, para luego proceder como se indica en la tabla 6-A.

Tabla 6-A Reactivos utilizados en la amplificación del gen hGH-N.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final 50µl (1 Reacción)	Volumen final 50µl (10 Reacciones)
Amortiguador Taq (libre de Mg)	10 X	1 X	5.0 µl	50.0 µl
Iniciador 403	25 µM	0.5 µM	1.0 µl	10.0 µl
Iniciador 138	5 µM	0.3 µM	3.0 µl	30.0 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1.0 µl	10.0 µl
MgCl ₂	25 mM	2.0 mM	4.0 µl	40.0 µl
Enzima: Taq DNA polimerasa	5 U/µl	1.0 U	0.2 µl	2.0 µl
H ₂ O MiliQ estéril	-----	-----	34.8 µl	348.0 µl
DNA	200 ng/µl	200 ng/µl	1.0 µl	-----

- 2.- Se trasladó con una pipeta la cantidad correspondiente de mezcla de reacción a cada tubo.
- 3.- Se agregó 1.0 μ l de DNA genómico a cada tubo, se mezcló brevemente y se centrifugó.
- 4.- Se adicionaron 25 μ l de aceite mineral, para evitar evaporación de la muestra a amplificar y se centrifugó nuevamente.
- 5.- Se colocaron los tubos en el termociclador (MiniCycler Programmable Thermal Controller Model PTC-150), utilizando el programa MCPHGH-AAV que contiene las condiciones detalladas en la tabla 6-B:

Tabla 6-B. Condiciones aplicadas en el PCR del gen hGH-N.

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo
MCPHGH-AAV	1	94°C	0:05:00
	2	94°C	0:00:30
	3	62°C	0:01:00
	4	72°C	0:01:00
	5	Ir al segundo paso 30 veces	
	6	72°C	0:05:00
	7	Terminación	

- 6.- Se retiró el aceite mineral con TE y cloroformo, mezclando y centrifugando y enseguida se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo, rotulado previamente.
- 7.- Se verificó la amplificación del fragmento, cargando 5 μ l de cada muestra en un gel de agarosa al 2.0%, junto con un marcador de peso molecular (λ -Pst I) y se sometió a electroforesis a 100 volts por aproximadamente 60 min para finalmente visualizar las bandas tiñendo el gel en una solución de bromuro de etidio (2 μ g/ml), para poder observar en un transluminador UV o en el aparato analizador de imágenes Gel-Doc 1000.
- 8.- Después de verificar la amplificación se continuó con la digestión del producto amplificado con la endonucleasa de restricción *Ava* II que cuenta con 5 sitios de reconocimiento en el producto amplificado.
- 9.- Después de la restricción se procedió a efectuar la técnica del análisis por heterodúplex iniciando con la desnaturalización del producto, colocándolo a una temperatura de 95°C durante 10 min.
- 10.- Después de la desnaturalización, se incubaron los amplicones a temperatura ambiente durante 2 hrs, para permitir la renaturalización de las cadenas de DNA y la posible formación de heterodúplex.
- 11.- Finalmente para analizar estos productos digeridos, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10 % y se realizó la electroforesis a 12 miliamperes durante 15 hrs. Al término de este periodo, se sacó el gel y se tiñó con bromuro de etidio (2 μ g/ml) durante 10 min, para después

visualizarlo en el Gel-Doc, donde se analizaron las seis bandas producidas con la digestión enzimática.

12.- Finalmente, para precisar las mutaciones, se secuenciaron las bandas que tenían un patrón de corrimiento electroforético diferente a las demás, utilizando el equipo de secuenciación automática.

2.3.4.2.2 PCR DEL PROMOTOR DEL GEN hGH-N.

A) LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Para amplificar la región promotora de este gen se usó el juego de oligos :

138= 5' ttggttctctctagaggctcagtgttgga 3' y

145= 5' tttagggccgcttacctgtagccat 3'

Estos iniciadores generaron un producto de amplificación de 655 pb.

B) LA REACCIÓN.

1.-La PCR se preparó mezclando los componentes que se mencionan a continuación, excepto el DNA genómico, para luego proceder como se indica en la tabla 7-A.

Tabla 7-A. Reactivos utilizados en la amplificación del promotor del gen hGH-N.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final 25µl (1 Reacción)	Volumen final 25µl (10 Reacciones)
Amortiguador Taq (libre de Mg)	10 X	1 X	2.5 µl	25 µl
Iniciador 145	5 µM	0.5 µM	2.5 µl	25 µl
Iniciador 138	5 µM	0.5 µM	2.5 µl	25 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 µl	5.0 µl
MgCl ₂	25 mM	2.0 mM	2.0 µl	20.0 µl
Enzima Taq DNA Polimerasa	5 U/µl	1.0 U	0.2 µl	2.0 µl
H ₂ O MiliQ estéril	-----	-----	13.8 µl	138.0 µl
DNA	200 ng/µl	200 ng/µl	1.0 µl	-----

2.- Se trasladó con una pipeta la cantidad correspondiente de mezcla de reacción a cada tubo.

- 3.- Se agregó 1.0µl de DNA genómico a cada tubo, se mezcló brevemente y se centrifugó.
- 4.- Se adicionaron 25 µl de aceite mineral, para evitar evaporación de la muestra a amplificar y se centrifugó nuevamente.
- 5.- Se colocaron los tubos en el termociclador (MiniCycler Programmable Thermal Controller Model PTC-150), utilizando el programa MPHGH-AAV que contiene las condiciones que se detallan en la tabla 7-B.

Tabla 7-B. Condiciones usadas en el PCR del promotor del gen hGH-N.

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo
MPHGH-AAV	1	94°C	0:05:00
	2	94°C	0:00:30
	3	55°C	0:01:00
	4	72°C	0:01:00
	5	Ir al segundo paso 30 veces	
	6	72°C	0:05:00
	7	Terminación	

- 6.- Se retiró el aceite mineral con TE y cloroformo, mezclando y centrifugando y enseguida se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo, rotulado previamente.
- 7.- Se verificó la amplificación del fragmento, cargando 5 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 2.0%, junto con un marcador de peso molecular (pBS + *Hae* III) y se sometió a electroforesis a 100 volts por aproximadamente 60 min para finalmente visualizar las bandas tiñendo el gel en una solución de bromuro de etidio (2 µg/ml), para poder observar en un transluminador UV o en el aparato analizador de imágenes Gel-Doc 1000.
- 8.- Después de verificar la amplificación se procedió al análisis de heterodúplex (2.3.4.2.1).
- 9.- Para analizar los productos amplificados, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 7 %, y se realizó la electroforesis a 12 miliamperes durante 18 hrs, este gel se tiñó también con bromuro de etidio (2 µg/ml), para poder analizar las bandas en el Gel-Doc 1000.
- 10.- Finalmente se secuenciaron las bandas que resultaron positivas en el análisis de heterodúplex, usando el equipo de secuenciación automática.

2.3.4.2.3 PCR DEL GEN PROP-1

A) LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Para realizar la amplificación del gen PROP-1 se utilizaron los primers:

Prop5 = 5' cgaacattcagagacagagctccaga 3' y

Prop3 = 5' gaattcaccatgatctcca 3'

Estos iniciadores produjeron un fragmento de 3513 pb (Mullis y Rosenfeld, 1998).

B) LA REACCIÓN.

1.- La PCR se preparó mezclando los componentes que se mencionan a continuación, excepto el DNA genómico, para luego proceder como se indica en la tabla 8-A.

Tabla 8-A. Reactivos utilizados en la amplificación del gen Prop-1.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final 25µl (1 Reacción)	Volumen final 25µl (10 Reacciones)
Amortiguador Taq (libre de Mg)	10 X	1 X	2.5 µl	25.0 µl
Iniciador Prop 3	25 µM	0.6 µM	0.6 µl	6.0 µl
Iniciador Prop 5	25 µM	0.6 µM	0.6 µl	6.0 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 µl	5.0 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5 µl	15.0 µl
Enzima Taq DNA Polimerasa	5 U/µl	1.25 U	0.3 µl	3 µl
H ₂ O MiliQ estéril	-----	-----	18 µl	180.0 µl
DNA	100 ng/µl	100 ng/µl	1 µl	-----

2.- Se trasladó con una pipeta la cantidad correspondiente de mezcla de reacción a cada tubo.

3.- Se agregó 1.0µl de DNA genómico a cada tubo, se mezcló brevemente y se centrifugó.

4.- Se adicionaron 25 µl de aceite mineral, para evitar evaporación de la muestra a amplificar y se centrifugó nuevamente.

5.- Se colocaron los tubos en el termociclador (MiniCycler Programmable Thermal Controller Model PTC-150), utilizando el programa PROP1-AAV que contiene las condiciones detalladas en la tabla 8-B.

Tabla 8-B. Condiciones aplicadas en el PCR del gen Prop-1.

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo
PROPI-AAV	1	94°C	0:01:00
	2	94°C	0:00:30
	3	55°C	0:00:30
	4	68°C	0:06:00
	5	Ir al segundo paso 30 veces	
	6	72°C	0:05:00
	7	Terminación	

6.- Se retiró el aceite mineral con TE y cloroformo, mezclando y centrifugando y enseguida se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo, rotulado previamente.

7.- Se verificó la amplificación del fragmento, cargando 5 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1.4 %, junto con un marcador de peso molecular (λ -*Pst* I) y se sometió a electroforesis a 100 volts por aproximadamente 60 min para finalmente visualizar las bandas tiñendo el gel en una solución de bromuro de etidio (2 µg/ml), para poder observar en un transluminador UV o en el aparato analizador de imágenes Gel-Doc 1000.

8.- Después de verificar la amplificación se procedió a la digestión del amplicón con las enzimas: *Sma* I, *Afl* III y *Ssp* I para obtener fragmentos que se pudieran analizar por heterodúplex (2.3.4.2.1).

10.- Para analizar los productos amplificados, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10 %, y se realizó la electroforesis a 12 miliamperes durante 15 hrs, este gel se tiñó también con bromuro de etidio (2 µg/ml), para poder analizar las bandas en el Gel-Doc.

11.- Finalmente se secuenciaron las bandas que resultaron positivas en el análisis de heterodúplex, usando el equipo de secuenciación automática.

2.3.4.2.4 PCR DEL GEN GHR

A) LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Para realizar la amplificación del exón 6 del gen GHR se utilizaron los primers: GHREX6A = 5' attgtgtctgtctgtactaatg 3' y

GHREX 6B = 5' atagaaagaaaagtcaaagtgtgaag 3'

Estos iniciadores produjeron un fragmento de 263 pb (Berg., 1994).

B) LA REACCIÓN.

1.- La PCR se preparó mezclando los componentes que se mencionan a continuación, excepto el DNA genómico, para luego proceder como se indica en la tabla 9-A.

Tabla 9-A. Reactivos utilizados en la amplificación del exón 6 del gen GHR.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final 25µl (1 Reacción)	Volumen final 25µl (10 Reacciones)
Amortiguador Taq (libre de Mg)	10 X	1 X	2.5 µl	25.0 µl
Iniciador GHREX6A	25 µM	1.5 µM	1.5 µl	15.0 µl
Iniciador GHREX6B	25 µM	1.5 µM	1.5 µl	15.0 µl
dNTPs	10 mM	0.4 mM	1.0 µl	10.0 µl
MgCl ₂	25 mM	2.0 mM	2.0 µl	20.0 µl
Enzima Taq DNA Polimerasa	5 U/µl	1.25 U	0.3 µl	3 µl
H ₂ O MiliQ estéril	-----	-----	15.2 µl	-----
DNA	100 ng/µl	100 ng/µl	1.0 µl	-----

2.- Se trasladó con una pipeta la cantidad correspondiente de mezcla de reacción a cada tubo.

3.- Se agregó 1.0µl de DNA genómico a cada tubo, se mezcló brevemente y se centrifugó.

4.- Se adicionaron 25 µl de aceite mineral, para evitar evaporación de la muestra a amplificar y se centrifugó nuevamente.

5.- Se colocaron los tubos en el termociclador (Hybaid Express) utilizando el programa A32 que contiene las siguientes condiciones:

Tabla 9-B. Condiciones aplicadas en el PCR del exón 6 del gen GHR.

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo
A32	1	94°C	0:03:00
	2	94°C	0:00:45
	3	55°C	0:01:00
	4	72°C	0:01:00
	5	Ir al segundo paso 30 veces	
	6	72°C	0:05:00
	7	Terminación	

6.- Se retiró el aceite mineral con TE y cloroformo, mezclando y centrifugando y enseguida se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo, rotulado previamente.

7.- Se verificó la amplificación del fragmento, cargando 5 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1.4 %, junto con un marcador de peso molecular (pBS + Hae III) y se sometió a electroforesis a 100 volts por aproximadamente 60 min para finalmente visualizar las bandas tiñendo el gel en una solución de bromuro de etidio (2 µg/ml), para poder observar en un transluminador UV o en el aparato analizador de imágenes Gel-Doc 1000.

8.- Después de verificar la amplificación se continuó con la detección de la mutación de Adenina a Guanina que genera un nuevo sitio de corte para la restricción con la enzima

Mnl I, en el codón 180 del fragmento amplificado y la presencia de esta mutación genera un fragmento de 113 pb, en caso contrario se obtiene un fragmento de 194 pb.

9.- Posteriormente esta digestión, se cargó en un gel de poliacrilamida al 10%, tiñendo el gel con Bromuro de Etidio (2 µg/ml), para analizar las bandas en el Gel-Doc.

10.- Finalmente se secuenciaron las bandas que resultaron positivas en el análisis de heterodúplex, usando el equipo de secuenciación automática.

2. 3. 4. 2. 5 PCR DEL GEN Pit-1

A) LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Para realizar las amplificaciones se utilizaron los iniciadores siguientes, para el exón 1: PITEX1A y PITEX1B; para el exón 3: PITEX3A y PITEX3B y para el exón 4: PITEX4A y PITEX4B, que produjeron los fragmentos que se detallan en la tabla 10 (Pellegrini, 1996).

Tabla 10. Fragmentos producidos en las amplificaciones del gen Pit-1.

Claves	Oligonucleótidos	Fragmentos
PITEX1A	5' gaatcggcccttgagacag 3'	261 pb
PITEX 1B	5' cccggtcatatgtaaactgt 3'	
PITEX3A	5' gtagttaacccttgtcttta 3'	259 pb
PITEX 3	5' agattgcaaaccaagttctt 3'	
PITEX4A	5' gatacacagatttgtgtgac 3'	318 pb
PITEX 4B	5' tcctactattgaagccatta 3'	

B) LA REACCIÓN.

1.- La PCR se preparó mezclando los componentes que se mencionan a continuación, excepto el DNA genómico, para luego proceder como se indica en la tabla 11-A.

Tabla 11-A. Reactivos utilizados en las amplificaciones del gen Pit-1.

Reactivos	Concentraci ^ó n inicial	Concentraci ^ó n final	Volumen final 25µl (1 Reacci ^ó n)	Volumen final 25µl (10 Reacci ^o nes)
Amortiguador Taq (libre de Mg)	10 X	1 X	2.5 µl	25.0 µl
Iniciador PITEX1A o PITEX3A o PITEX4A	25 µM	1.5 µM	1.5 µl	15.0 µl
Iniciador PITEX1B o PITEX3B o PITEX4B	25 µM	1.5 µM	1.5 µl	15.0 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5 µl	5.0 µl
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	2.5 µl	25.0 µl
Enzima Taq DNA Polimerasa	5 U/µl	1.25 U	0.3 µl	3 µl
H ₂ O MiliQ estéril	-----	-----	15.2 µl	-----
DNA	100 ng/µl	100 ng/µl	1.0 µl	-----

- 2.- Se trasladó con una pipeta la cantidad correspondiente de mezcla de reacción a cada tubo.
- 3.- Se agregó 1.0µl de DNA genómico a cada tubo, se mezcló brevemente y se centrifugó.
- 4.- Se adicionaron 25 µl de aceite mineral, para evitar evaporación de la muestra a amplificar y se centrifugó nuevamente.
- 5.- Se colocaron los tubos en el termociclador (Hybaid Express) utilizando el programa A22 que contiene las condiciones detalladas en la tabla 11-B.

Tabla 11-B. Condiciones aplicadas en los PCRs del gen Pit-1.

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo
A22	1	94°C	0:05:00
	2	94°C	0:01:00
	3	50°C	0:01:30
	4	72°C	0:02:00
	5	Ir al segundo paso 30 veces	
	6	72°C	0:05:00
	7	Terminación	

- 6.- Se retiró el aceite mineral con TE y cloroformo, mezclando y centrifugando y enseguida se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo, rotulado previamente.
- 7.- Se verificó la amplificación del fragmento, cargando 5 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1.5 %, junto con un marcador de peso molecular (pBS + Hae III) y se sometió a electroforesis a 100 volts por aproximadamente 60 min para finalmente visualizar las bandas tiñendo el gel en una solución de bromuro de etidio (2 µg/ml), para poder observar en el transluminador UV.
- 8.- Después de verificar la amplificación, se continuó con la detección de la mutación por medio del análisis de heterodúplex (descrito anteriormente), para lo cual se realizó una electroforesis del producto amplificado en un gel de poliacrilamida al 10%.
- 9.- Finalmente, para visualizar las bandas del gel de heterodúplex, este se tiñó con bromuro de etidio (2 µg/ml) y se analizó en el gel-doc.
- 10.- Las muestras que resultaron positivas al análisis de heterodúplex se purificaron por Qiaex II para secuenciarlas y precisar las mutaciones.

2.3. 4. 3 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS PARA SECUENCIACIÓN

- 1.- Se extrajo la banda de interés del gel de poliacrilamida, se trituró y se colocó en un tubo de 1.5 ml. Enseguida se adicionaron 50-100 µl de agua destilada de manera que cubriera la totalidad del fragmento.
- 2.- Se incubó el frag. a 85 °C, durante 5 min y enseguida a 65°C por 25 min.
- 3.- Se rescató el sobrenadante con una micropipeta, cuidadosamente sin tocar la poliacrilamida y se colocó en tubo nuevo rotulado.
- 4.- Se hicieron varias diluciones con la solución anterior, para reamplificar el fragmento.
- 5.- Se corrió en gel de agarosa el total de la reamplificación, para extraer dicha banda y purificarla con el éstuche de Qiagen (QIAEXII).
- 6.- Se extrajo la banda y se añadieron 300 µl de buffer QX 1 por cada 100 mg de gel.
- 7.- Se adicionaron 20 µl de solución de QIAEX II y se mezclaron cuidadosamente con el vortex durante 25 seg.
- 8.- Se incubó a 53 °C por 10 min para solubilizar la agarosa y unir el DNA. (se checó que el color de la mezcla fuera amarilla, pero si era naranja se adicionaban 10 µl de acetato de sodio 3M, pH 5.0 y se mezclaba e incubaba 5 min adicionales).
- 9.- Se centrifugó por 25 seg y se removió cuidadosamente el sobrenadante.
- 10.- Se lavó la pastilla con 500 µl de buffer QX1, se mezcló con el vortex y se centrifugó por 25 seg (este paso removió restos de agarosa).
- 11.- Se lavó la pastilla 2 veces con 500 µl de buffer PE. Se resuspendió la pastilla, se mezcló con el vortex y se centrifugó durante 25 seg (este paso removió trazas de sales contaminantes).
- 12.- Se puso a secar la pastilla a 37 °C durante 10-15 min (evitando que se secara demasiado porque ello dificultaba la disolución de la pastilla).

- 13.- Se eluyó con 20 μ l de agua (PH 7.0-8.5) y se incubó a 53 °C por 5 min.
- 14.- Se centrifugó por 25 seg y se rescató cuidadosamente el sobrenadante en un tubo de 0.2 ml rotulado previamente.
- 15.- Generalmente se repitieron los pasos 13 y 14 y se combinaron los eluidos.

2. 3. 4. 4 SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA.

A) REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN CÍCLICA.

- 1.- Se preparó la mezcla maestra de la tabla 12-A.

Tabla 12-A. Reactivos de la mezcla maestra para secuenciación.

Reactivos	Volumen
Templado de DNA*	variable
Primer no-marcado (1 pmol/ μ l)	3.0 μ l
Buffer de reacción (concentrado)	1.5 μ l
Termo-secuencias (4U/ μ l)	2.0 μ l
H ₂ O	variable
Total	completar 27 μ l

* Templados: Plásmido 350-500 fmol
 Producto PCR 20-50 fmol
 DNA ss 100-250 fmol

- 2.- Se etiquetaron cuatro tubos de PCR de 0.2 ml con: A, C, T, G, enseguida se agregaron a cada uno 2 μ l de la mezcla de terminación específica.

- 3.- Se mezcló perfectamente la mezcla maestra y se centrifugó brevemente.

Se adicionaron 6.5 μ l de esta mezcla a cada tubo del p. anterior y se mezclaron.

- 4.- Se adicionó una gota de aceite mineral a cada tubo

- 5.- Se centrifugó brevemente a 12000 rpm

- 6.- Se colocaron los tubos en el termociclador (Hybaid express) y se eligió el programa Sequenase que contiene las condiciones de la tabla 12-B.

Tabla 12-B. Condiciones aplicadas en el PCR de secuenciación.

Programa	Paso	Temperatura	Tiempo
Sequenase	1	95°C	0:02:00
	2	95°C	0:00:30
	3	50°C	0:00:30
	4	72°C	0:00:45
	5	Ir al segundo paso 30 veces	
	6	72°C	0:05:00
	7	4°C	Humedecer

7.- Se purificaron las muestras (para remover terminadores marcados que no estaban incorporados) con la técnica de precipitación que se describe a continuación.

B) PURIFICACIÓN DE MUESTRAS (Precipitación con violeta intenso)

1.- En un tubo de 0.5 ml se colocaron los siguientes reactivos: 1.0 μ l de acetato de sodio 3M, 8.5 μ l de reacción de secuenciación cíclica, 1.0 μ l de co-precipitante violeta intenso y 20 μ l de etanol al 100%.

2.- Se mezclaron en vortex aproximadamente 10 seg, luego se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 5 min, después se mezclaron para aumentar la consistencia de la pastilla (esto hizo que el proceso de aspiración fuera más eficiente y efectivo).

3.- Se centrifugó a 12000 rpm por 20 min.

4.- El sobrenadante se aspiró evitando perturbar la pastilla.

5.- Se adicionaron 200 μ l de etanol al 70 %.

6.- Se mezclaron en vortex aproximadamente 10 seg.

7.- Se repitieron los pasos 3 y 4.

8.- Se dejaron secar al aire. Alternativamente se secaron con vacío, o se incubaron a 90 °C.

9.- Se resuspendieron con 5.0 μ l de solución Stop IR² (LI-COR).

10.- En vortex se mezclaron por aproximadamente 20 seg, se centrifugaron brevemente y se transfirieron las muestras tubos de 0.2 ml.

11.- Las muestras se desnaturalizaron a 95 °C, durante 3 min, se almacenaron a 4 °C y se cargaron entre 1.0 y 1.5 μ l en el gel de secuenciación.

III RESULTADOS

3.1 ANÁLISIS BIOQUÍMICO

Se eligieron para este estudio un total de 5 pacientes diagnosticados presuntamente como CPHD, cuyas características físicas y bioquímicas se detallan a continuación: Todos los niños analizados fueron del sexo masculino, la edades de los pacientes variaron de 4 a 14 años y el rango de altura en promedio fue de 1.30 m. Las edades óseas variaron en promedio 5 años, las concentraciones de GH en suero en respuesta a la ingestión de clonidina fueron en todos los casos indetectables, así mismo las concentraciones de IGF-1 también fueron indetectables en dos de los sujetos analizados (R1 y R2). Las concentraciones de LH y FSH en suero resultaron anormales para la edad. Las concentraciones de PRL en suero estuvieron dentro de los límites normales. Las concentraciones de testosterona fueron uniformemente indetectables. Finalmente todas las concentraciones de TSH en suero fueron sensiblemente bajas en algunos casos (0.01mU/ml), pero en otros casos los niveles de esta hormona no se detectaron. Desafortunadamente los miembros de las familias de estos sujetos fueron inaccesibles para el estudio, pero de acuerdo al reporte médico varios de ellos tienen estatura baja, lo cual sugiere que estos pacientes pueden representar casos genéticos de deficiencia combinada de hormonas (CPHD). En cuanto a los pacientes diagnosticados presuntamente con IGHD, se eligieron un total de 20, cuyos datos antropométricos y bioquímicos se destacan en seguida: Los niños analizados fueron del sexo masculino y femenino, las edades variaron de 2 a 16 años y el rango de altura fue en promedio 1.42 m. Las edades óseas variaron en promedio 2.5 años. Las concentraciones de GH en suero en respuesta a clonidina variaron de ND a 14.28 ng/ml. Las características restantes de estos pacientes se detallan en los cuadros clínicos de los apéndices 2 y 3.

3.2 ANÁLISIS MOLECULAR

Una vez que se obtuvo el DNA de las muestras de cada uno de los pacientes con IGHD y CPHD (diagnosticados principalmente sobre la base de los niveles de las hormonas hipofisarias) (Tabla 4), se procedió a estandarizar las reacciones de PCR para la amplificación de las regiones de interés de los genes: hGH-N, GHR, Pit-1 y Prop-1 después de lo cual se continuó con el análisis de heterodúplex y finalmente con la determinación de la secuencia de las muestras que resultaron positivas para este análisis.

3.2.1 ANÁLISIS DEL PROMOTOR DEL GEN hGH-N.

Para este análisis se eligieron 20 pacientes diagnosticados clínicamente con deficiencia aislada (IGHD). Una vez estandarizada la amplificación de la región promotora del gen hGH-N, se continuó con la detección de cambios nucleotídicos en dicha región, por medio del análisis de heterodúplex (Figura 10).

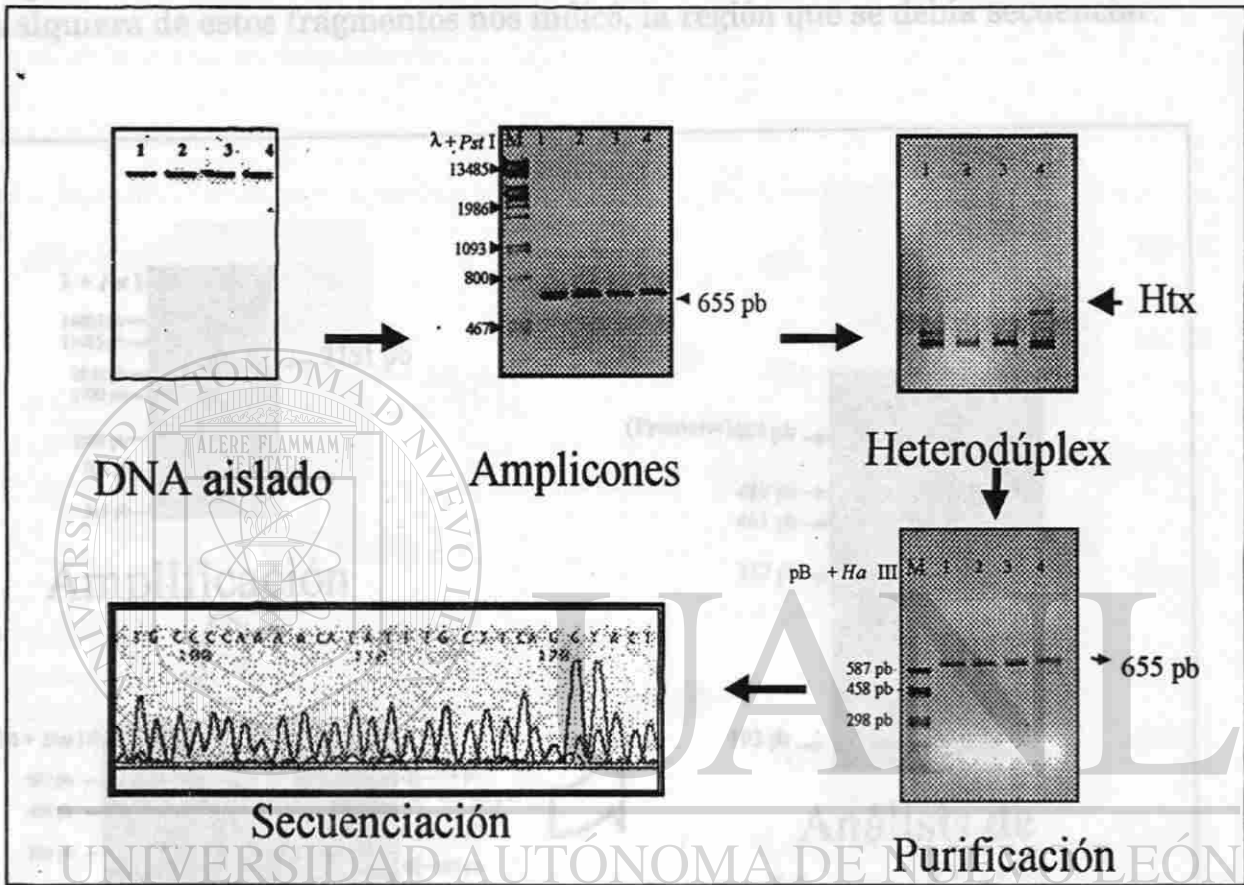


Figura 10. Análisis de heterodúplex de la región promotora del gen hGH-N. En el gel correspondiente a los heterodúplex, se observan homodúplex en los carriles 2 y 3, en tanto que la formación de heterodúplex en los carriles 1 y 4, de los cuales se rescataron y purificaron las bandas anómalas para precisar sus cambios nucleotídicos por secuenciación. M= Marcador de peso molecular; λ + Pst I= DNA del bacteriófago λ digerido con Pst I; pBS + Hae III= DNA del plásmido pBS cortado con Hae III.

En este ensayo se observó la formación de heterodúplex en 11 muestras de pacientes con deficiencia aislada (IGHD) de 20 que se eligieron para el análisis de la región promotora del gen hGH-N.

3.2.2 ANÁLISIS DEL GEN hGH-N.

Para este análisis se eligieron 20 pacientes con deficiencia aislada (IGHD). Una vez que se estandarizó la amplificación de este gen, no se pudo continuar con el análisis de heterodúplex directamente, debido a su gran tamaño: 2155 pb (Fig. 11). Por esa razón se optó por cortar el amplicón con la enzima *Ava* II, la cual generó 6 fragmentos: 604, 489, 461, 357, 193 y 51. La formación del heterodúplex en cualquiera de estos fragmentos nos indicó, la región que se debía secuenciar.

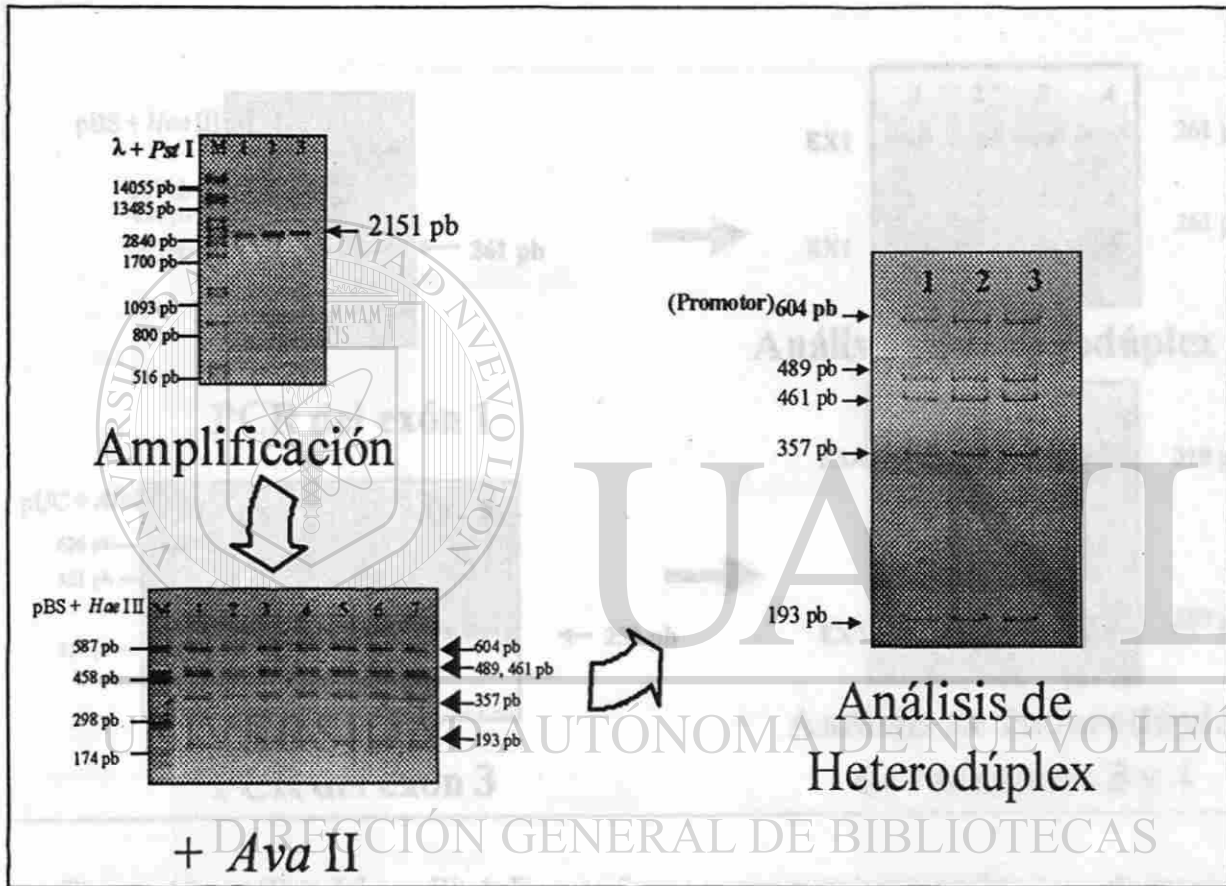


Figura 11. Análisis del gen hGH-N fragmentado para heterodúplex. En esta figura se observan los patrones obtenidos antes y después de la digestión del amplicón con *Ava* II. Para el análisis por heterodúplex, los productos de digestión se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10%.

En este ensayo, 11 pacientes resultaron positivos. Cabe destacar el hecho de que son los mismos 11 pacientes positivos del análisis anterior (promotor del gen hGH-N) ya que esta amplificación también incluyó la región promotora del gen, misma que contribuyó a los cambios nucleotídicos.

3.2.3 ANÁLISIS DEL GEN Pit-1

Este análisis fué aplicado a 5 pacientes que presentaban deficiencia combinada de hormonas hipofisarias (CPHD). Una vez estandarizada la amplificación de los exones 1, 3 y 4 del gen Pit-1, se continuó con la detección de cambios nucleotídicos en dichos exones por medio del análisis de heterodúplex (Figura 12).

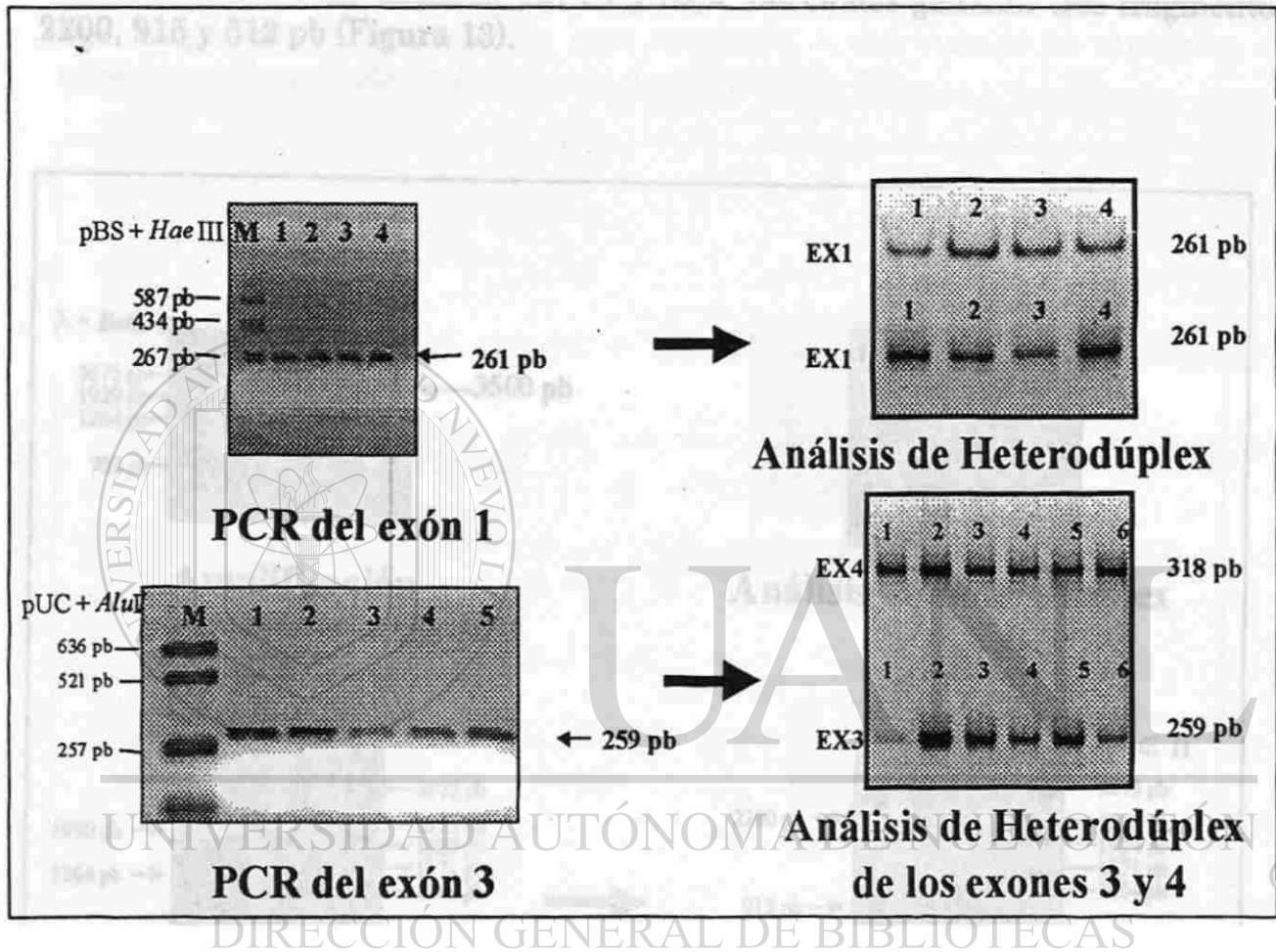


Figura 12. Análisis del gen Pit-1. En esta figura se resumen las amplificaciones de los exones del gen Pit-1 de muestras CPHD, así como el análisis de heterodúplex de cada una de ellas. Cabe hacer notar que en los geles que corresponden al análisis de heterodúplex, se depositaron dos filas de muestras diferentes, con una separación de dos horas de corrimiento electroforético entre ellas.

Así mismo cabe mencionar que el análisis del gen Pit-1 generó resultados negativos, por lo que se podría afirmar que en ninguno de estos exones se encuentran las mutaciones que están afectando o trastornando el crecimiento de estos individuos.

3.2.4 ANÁLISIS DEL GEN Prop-1

Este análisis fué aplicado a 5 pacientes que presentaban CPHD. Una vez estandarizada la amplificación del gen Prop-1, no se pudo continuar con el análisis de heterodúplex directamente, debido también a su gran tamaño: 3515 pb (Figura 13). Por esta razón se optó por cortar el amplicón con la enzima *Sma* I, la cual genera fragmentos: 1950, 1264 y 483 pb. Así mismo, se utilizaron simultáneamente las enzimas: *Afl* III y *Ssp* I, las cuales generan tres fragmentos: 2200, 915 y 512 pb (Figura 13).

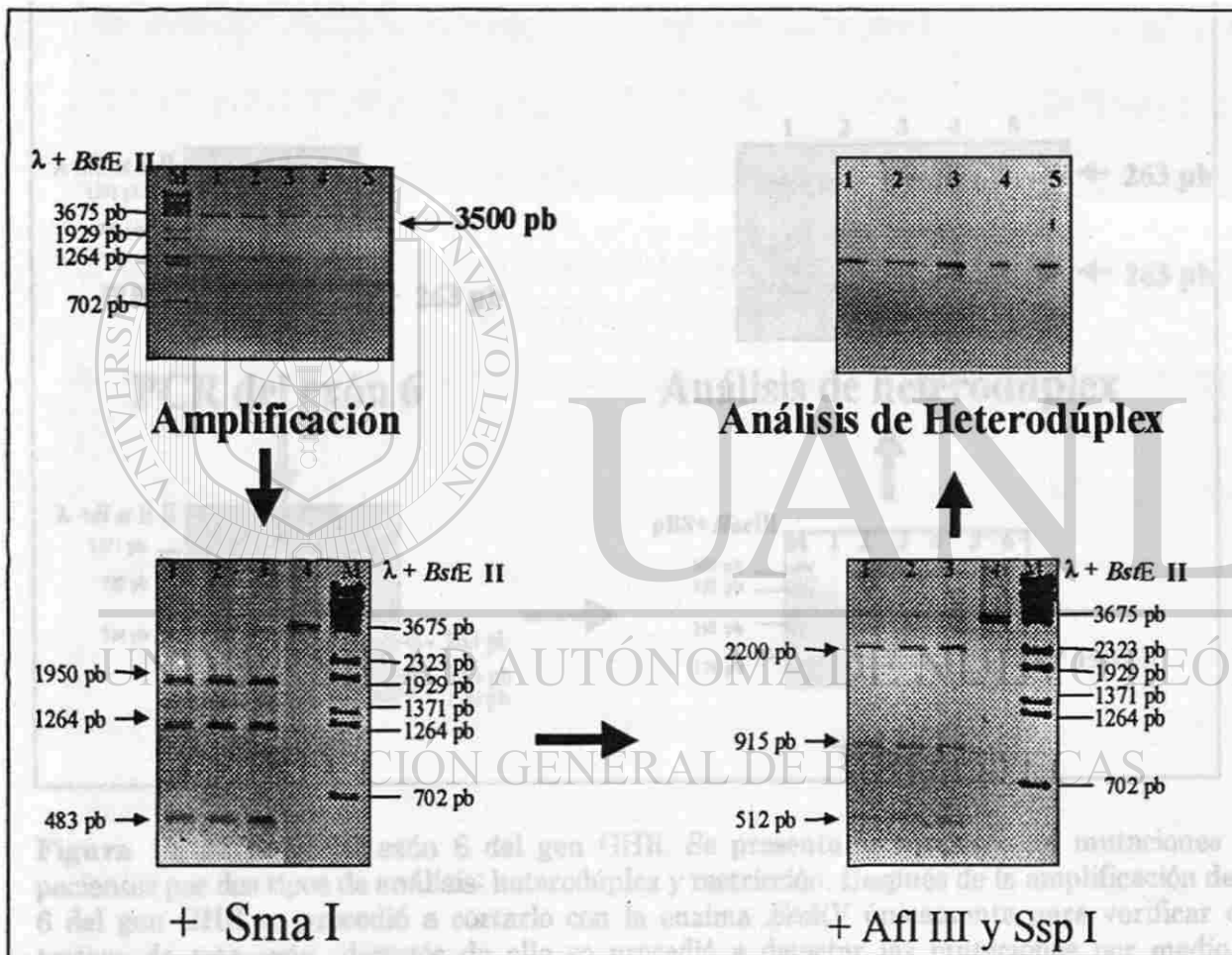


Figura 13. Análisis del gen Prop-1. En esta figura se ilustran los ensayos realizados para el gen Prop-1 en el que la digestión con *Sma* I produce un fragmento de 483 pb que incluye al exón 2, en el que se han reportado mutaciones. En la digestión con *Afl* III y *Ssp* I el fragmento de 512 pb es el que incluye al exón 2.

En el análisis de heterodúplex del gen Prop-1 también se obtuvieron resultados negativos al analizar los fragmentos correspondientes al exón 2 donde se han reportado mutaciones en este tipo de pacientes, por lo que se puede afirmar que en las muestras analizadas, el exón 2 del gen Prop-1 está exento de mutaciones.

3.2.5 ANÁLISIS DEL GEN GHR

Este análisis fué aplicado a 20 pacientes. Una vez estandarizada la amplificación del exón 6, donde se ha reportado la mutación más frecuente de este gen, se continuó con la digestión de este exón con la enzima *EcoRV*, para confirmar que se trataba de este exón. Posteriormente se prosiguió con la detección de las posibles mutaciones, por medio de un análisis de restricción, para lo cual se utilizó la enzima *MnlI*, ya que en caso de que un paciente tuviera la mutación, se generaría otro sitio de reconocimiento para dicha enzima por lo que se produciría un fragmento de 113 pb. En caso contrario, o sea cuando la mutación está ausente, se desprende un fragmento de 190 pb (Fig. 14).

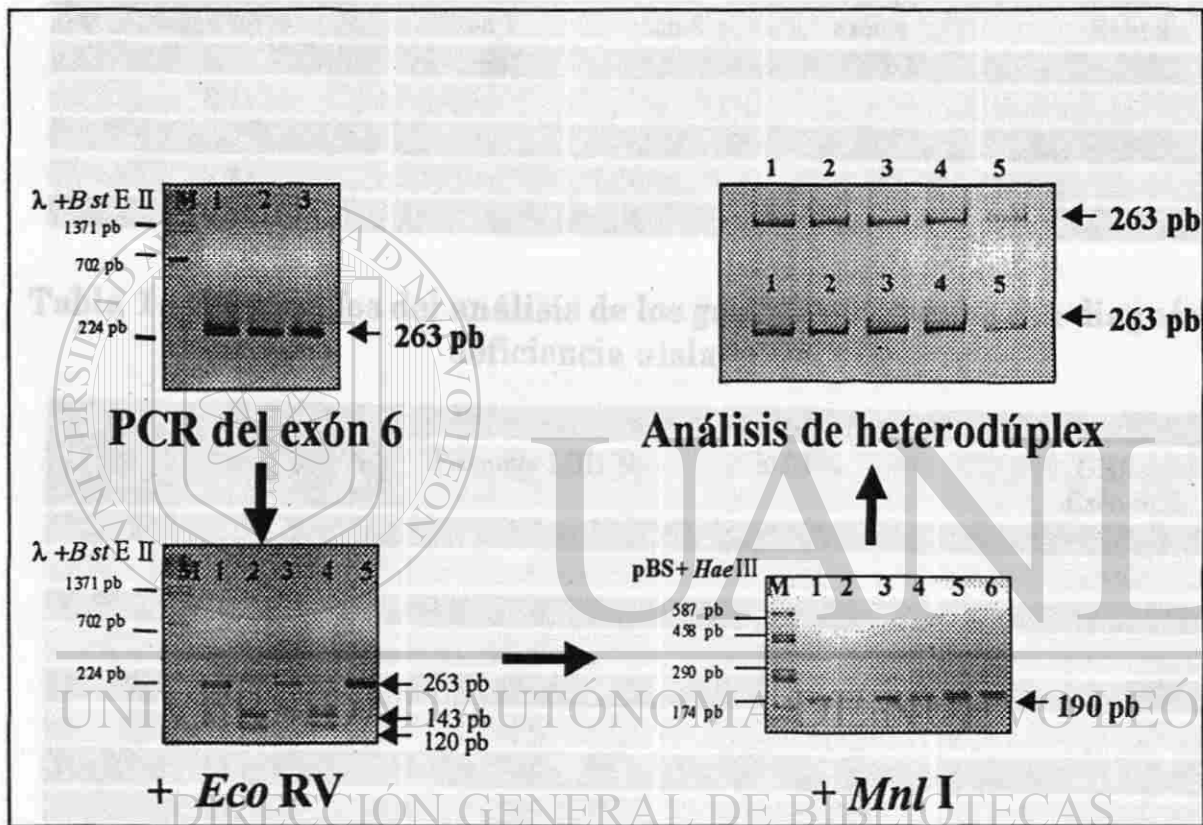


Figura 14. Análisis del exón 6 del gen GHR. Se presenta la detección de mutaciones en 20 pacientes por dos tipos de análisis: heterodúplex y restricción. Después de la amplificación del exón 6 del gen GHR se procedió a cortarlo con la enzima *EcoRV* únicamente para verificar que se tratara de este exón, después de ello se procedió a detectar las mutaciones por medio de la restricción con la enzima *MnlI*, ya que en caso de que un paciente tuviera la mutación se generaría otro sitio de reconocimiento para dicha enzima por lo que se produciría un fragmento de 113 pb. En caso contrario o sea cuando haya ausencia de la mutación se desprende un fragmento de 190 pb. A la par y para verificar el resultado anterior, también se llevó a cabo el análisis de heterodúplex del fragmento amplificado de 263 pb. Cabe hacer notar que en los gels que corresponden al análisis de heterodúplex, se depositaron dos filas de muestras diferentes, con una separación de dos horas de corrimiento electroforético entre ellas.

3.2.6 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LOS GENES.

Los resultados que se generaron después del análisis de los genes se presentan en las tablas 13 y 14. También se muestran los análisis anteriores de dichos pacientes, realizados por González y Mar-Aguilar en 1998 (ver apéndices 2 y 3).

Tabla 13. Resultados del análisis de los genes de pacientes con diagnóstico de deficiencia combinada (CPHD)

Paciente	Genes analizados			
	Pit-1 exón 1	Pit-1 exón 3	Pit-1 exón 4	Prop-1 Exón 2
L 7	-	-	-	-
R 1	-	-	-	-
R 2	-	-	-	-
R 7	-	-	-	-
R 15	-	-	-	-

Tabla 14. Resultados del análisis de los genes de pacientes con diagnóstico de deficiencia aislada (IGHD)

Paciente	Genes analizados		
	Promotor hGH-N	hGH-N	GHR Exón 6
L1	-	-	-
L2	+	-	-
L4	+	-	-
L6	-	-	-
L8	-	-	-
L9	-	-	-
L10	-	-	-
L11	-	-	-
Mo 1	-	-	-
Mo 2	-	-	-
Mo 3	-	-	-
Mo 4	-	-	-
Mo 5	-	-	-
Mo 6	-	-	-
Mo 7	-	-	-
Mo 8	-	-	-
Mo 9	-	-	-
Mo 10	-	-	-
Mo 11	-	-	-
Mo 12	-	-	-
Mo 13	-	-	-
E 1	+	+	ENR
E 2	+	-	-
E 3	+	-	-

Paciente	Genes analizados		
	Promotor hGH-N	hGH-N	GHR Exón 6
E 4	-	-	-
E 5	+	+	ENR
E 6	-	-	-
E 7	-	-	-
E 8	-	-	-
E 9	+	-	-
E 10	-	-	-
E 11	+	-	-
E 12	-	-	-
E 13	-	-	-
E 14	-	-	-
E 15	-	-	-
E 16	-	-	-
E 17	-	-	-
3*	-	-	-
13*	+	-	-
42*	+	-	-
50*	+	-	-
R 3	+	-	-
R 5	+	-	-
R 6	+	-	-
R 9	+	-	-
R 10	+	-	-
R 11	-	-	-
R 14	-	-	-
C 3	-	-	-
C 4	+	-	-
C 5	+	-	-
C 6	-	-	-
C 7	-	-	-
C 8	+	-	-
C 9	+	-	-
C 10	+	-	-
C 11	-	-	-
C 12	+	-	-
C 13	+	-	-

ENR: ensayo no realizado.

Signo positivo: presencia de cambio nucleotídico o mutación.

Signo negativo: carencia de mutación.

El escrutinio de análisis de mutaciones en los exones de los genes analizados en este proyecto generó resultados negativos, sin embargo se detectaron siete cambios nucleotídicos en distintas posiciones de la secuencia de la región promotora del gen hGH-N (tabla 15).

Tabla 15. Cambios nucleotídicos detectados en el promotor del gen hGH-N.

Paciente	Cambio nucleotídico	Símbolo	Caja del promotor afectada.
R 10	Inserción A (-64)	ava*	ninguna
R 2, R 3, R 10	Cambio T (-63) A	p**	ninguna
C 11, R 2, R 3, R 10	Inserción G (-93)	n**	ninguna
C 11, R 2, R 3, R 10	Cambio T (-4) G	t**	ninguna
R 10	Cambio G (-362) T	h**	ninguna
R 10	Cambio G (-369) T	g**	ninguna
C 11, R 2, R 3, R 10	Cambio T (-339) G	i**	Caja NF-1

* No reportado previamente.

** Reportado por Wagner y colaboradores en 1997.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Todas las muestras secuenciadas en este trabajo presentan bastantes cambios nucleotídicos que van desde tres cambios como es el caso del paciente C11, hasta siete cambios como es el caso de la muestra R10 (Figura 20), lo cuál muestra la heterogeneidad de la región promotora del gen hGH-N.

La figura 20 muestra en detalle los cambios nucleotídicos encontrados, así como la localización de cada uno de ellos. Cabe hacer notar que el paciente R10 presentó todos estos cambios, incluyendo uno no reportado previamente en la literatura.

INICIADOR 138

R10145 ----TTGGTTCTCTCTAGTGGTCAGTGTGGAACTGCATCCAGCTGACTCAGGCTGACCC
 NORMAL ----TTGGTTCTCTCTAGTGGTCAGTGTGGAACTGCATCCAGCTGACTCAGGCTGACCC

R10145 AGGAGTCCTCAGCAGAAGTGGAAATTCAGGTCTGAATCGTGCTCACAACCCCCACAATCTA
 NORMAL AGGAGTCCTCAGCAGAAGTGGAAATTCAGGACTGAATCGTGCTCACAACCCCCACAATCTA

R10145 TTGGCTGTGCTTGGCCCCCTTTTCCCAACACACACATTCTGTCTGGTGGGTGGAGGTTAAA
 NORMAL TTGGCTGTGCTTGGCCCCCTTTTCCCAACACACACATTCTGTCTGGTGGGTGGAGGTTAAA

R10145 CATGCGGGGAGGAGGAAAGGGATAGGATAGAGAATGGGATGTGGTCGGTAGGGGGTCTCA
 NORMAL CATGCGGGGAGGAGGAAAGGGATAGGATAGAGAATGGGATGTGGTCGGTAGGGGGTCTCA

R10145 AGGACTGGCTATCCTGACATCCTTCGCCGCGTGCAGGTTGGCCACCATGGCCTGCTGCCA
 NORMAL AGGACTGGCTATCCTGACATCCTTCGCCGCGTGCAGGTTGGCCACCATGGCCTGCGGCCA

 -369 (g) -362 (h) -339 (i)

CAJA NF-1

CAJA USP-1

R10145 GAGGGCACCACGTGACCCTTAAAGAGAGGACAAGTGGGTGGTATCTCTGGCTGACACT
 NORMAL GAGGGCACCACGTGACCCTTAAAGAGAGGACAAGTGGGTGGTATCTCTGGCTGACACT

R10145 CTGTGCACAACCTCACAACACTGGTGACGGTGGGAAGGAAAGATGACAAGCCAGGGGG
 NORMAL CTGTGCACAACCTCACAACACTGGTGACGGTGGGAAGGAAAGATGACAAGCCAGGGGG

CAJA SP-1 CAJA Pit-1 distal

R10145 CATGATCCCAGCATGTGTGGGAGGAGCTTCTAAATTATCCATTAGCACAGCCCGTCAGT
 NORMAL CATGATCCCAGCATGTGTGGGAGGAGCTTCTAAATTATCCATTAGCACAGCCCGTCAGT

CAJA Pit-1 proximal

R10145 GGCCCCATGCATAAATGTACACAGAAACAGGTGGGGCAACAGTGGGAGAGAAGGGGCCA
 NORMAL GGCCCCATGCATAAATGTACACAGAAACAGGTGGGGCAACAGTGGGAGAGAAGGGGCCA

CAJA TATA

-64 (ava)

R10145 GGGTATAAAAAGGGCCCACAAGAGACCAGCTCATAGGATCCCAAGGCCCACTCCCCGAA
 NORMAL GG-TATAAAAAGGGCCCACAAGAGACCAGCTC-AAGGATCCCAAGGCCCACTCCCCGAA
 ** *****
 (n) -93 -63 (p)

INICIADOR 145

R10145 CCACTCAGGGTCTGTGGACAGCTCACCTAGCTGCAATGGCTACAGGTAAGCGCCCTAA
 NORMAL CCACTCAGGGTCTGTGGACAGCTCACCTAGCTGCAATGGCTACAGGTAAGCGCCCTAA

-4 (t)

Figura 15. Variaciones nucleotídicas del promotor del gen hGH-N. En la figura se muestran los distintos cambios nucleotídicos encontrados en la secuencia del promotor del gen hGH-N. La clave R10145 indica la secuencia del promotor del gen hGH-N del paciente R10; La clave NORMAL indica la secuencia del promotor del gen hGH-N de un sujeto sano. Cabe hacer notar que la mutación -339 (i), aparentemente afecta a la caja NF-1 del paciente R10.

IV DISCUSIÓN

La regulación de la síntesis y liberación de GH, está modulada por una familia de genes que incluyen los factores de transcripción Prop-1 y Pit-1. Estos regulan la diferenciación de células de la pituitaria en somatotrofos los cuales sintetizan y liberan GH. Otros genes que también son importantes en la síntesis de GH son GHR y las proteínas de unión a la GH (GHBP), los genes de IGF-1 y su receptor IGF-1R, cuyos productos estimulan el crecimiento en varios tejidos incluyendo huesos y músculo (Phillips et al, 1997). Como consecuencia de la complejidad de la regulación de la HGH, existen múltiples sitios en los que una alteración genética puede resultar en la producción de déficit de HGH y por consiguiente el enanismo. Además muchos de los casos de enanismo panhipopituitario no están ligados a alteraciones del gen Pit-1.

Por consiguiente será necesaria la evaluación de otros genes involucrados en la regulación de la HGH, como el gen de Prop-1. Otros genes candidatos de alteración genética son: IGF-1, GHR, IGF-1R, GHBP, GHRH.

En el presente trabajo se eligieron sujetos con retraso de crecimiento diagnosticados presuntamente con deficiencia de hormona de crecimiento aislada o combinada. La mayoría de los pacientes estudiados presentaron en común varias de las siguientes características: retraso severo del crecimiento, edad de inicio del tratamiento entre 1-15 años, piel y cabello delgados con crecimiento más lento de lo normal, dientes permanentes apiñonados, voz de tono muy agudo, hipoglucemia, presencia de micropene, pubertad retrasada, frente prominente y nariz pequeña, retraso de la edad ósea, cariotipo normal y niveles pico de GH por debajo o por arriba de 7 ng/ml, después de varios estímulos provocativos con clonidina, levodopa-propranolol o ejercicio.

En 1996 Sornson y colaboradores clonaron y describieron al gen Prop-1 y demostraron que era importante para la determinación de los linajes de Pit-1 tanto como para la diferenciación de gonadotropinas en la glándula pituitaria. Por lo tanto los pacientes con un defecto en el gen de Prop-1 no sólo son deficientes en GH, PRL y TSH, sino también en los niveles de LH y FSH. Por ello se buscaron defectos en el gen Prop-1 (exón 2) en pacientes con CPHD los cuales presentaban niveles bajos o indetectables de GH, TSH, PRL, LH y FSH. Desafortunadamente en ninguno de los 5 pacientes analizados en este trabajo se encontraron mutaciones en el exón 2 del gen Prop-1, pero estas mutaciones se pudieran encontrar en los exones restantes que se analizarán posiblemente en trabajos posteriores.

Del total de las muestras analizadas, únicamente se observó formación de heterodúplex en once. De ellas se eligieron cuatro para secuenciar, basándose en su patrón de migración diferencial, con el fin de precisar las variaciones nucleotídicas de cada una. Se encontraron siete sitios distintos de cambios nucleotídicos, en distintas localizaciones de la secuencia de la región promotora del gen hGH-N. Las localizaciones de estos sitios son muy interesantes, pues la mayoría se encontraron entre la posición -550 pb y el sitio de inicio de la

traducción (+1pb). Esta región es importante para la regulación transcripcional y contiene los elementos cis para una variedad de factores como NF-1, USF, SP1, Pit-1 y TBP. Algunos de estos sitios de variación de secuencia (g, h, i, m, n, o y p) caen cerca de estos elementos cis. Se ha reportado que las variaciones de secuencia en estos sitios, ocurren normalmente tanto en pacientes con GHD, como en individuos sanos. Cabe hacer notar que las variaciones marcadas como i, n y t se encontraron en todas las muestras de los pacientes analizados en este trabajo. Aunque la variación de secuencia t está a 83 pb de distancia de un sitio de unión consenso, no se puede excluir que este cambio en uno o ambos alelos del promotor del gen hGH-N de pacientes con GHD pueda perturbar la expresión por algún cambio estructural secundario. Durante la realización de esta tesis se detectó una nueva mutación en la posición -64 (-64 inserción A), la cuál probablemente no tenga un efecto severo, al no afectar ninguna caja promotora.

En resumen todas las variaciones de secuencia encontrados en el promotor del gen hGH-N de pacientes GHD también se han encontrado en personas normales (Wagner *et al*, 1997), excepto para la nueva mutación mencionada líneas arriba. Ya que la mayoría de estos datos indican que ninguna variación nucleotídica sencilla está relacionada con deficiencia de HGH, no se puede descartar la posibilidad de que alguna combinación de estas variaciones puedan en conjunto perturbar su síntesis o función. No obstante las bases moleculares para IGHD, probablemente pueden no ser atribuidas a las variaciones en la región promotora del gen hGH-N y las localizaciones precisas de los defectos moleculares de esta enfermedad, aún son desconocidas.

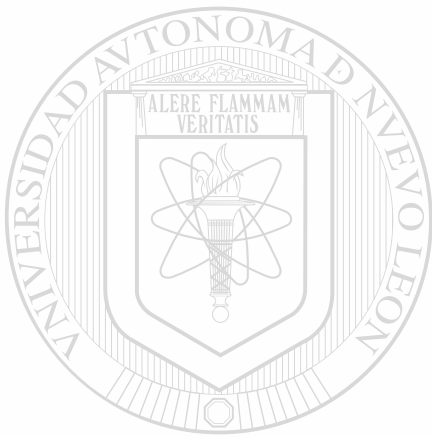
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

V CONCLUSIONES

1.- Se estandarizaron las condiciones de amplificación de los exones de los genes analizados: GHR, hGH-N, Pit-1 y Prop-1 pero en ninguno de ellos se detectaron mutaciones.

2.- En el promotor de hGH-N, se encontró una inserción de A en la posición -64 que no se había reportado. Así mismo, se localizaron seis variaciones nucleotídicas distintas ya reportadas en esta región promotora, por último cabe denotar que no se puede excluir la posibilidad de que una combinación de estos cambios nucleotídicos, puedan en conjunto afectar la expresión del gen hGH-N.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIBLIOGRAFÍA

- Adan L, Souberbielle JC, Brauner R. Diagnostic markers of permanent idiopathic growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* (1994) 78: 353-8.
- Aguirre E, Benitez R, Youlton R, Carvallo P. Molecular genetic study of a severe growth hormone deficiency in a Chilean family. *Rev Med Chil* (1993) 121: 982-6.
- Aimaretti G, Corneli G, Razzore P, Bellone S, Baffoni C, Arvat E, Camanni F y Ghigo E. Comparison between insulin-induced hypoglycemia and growth hormone (GH)-releasing hormone + arginine as provocative tests for the diagnosis of GH deficiency in adults. *J Clin Endocrinol Metab* (1998) 83:1615-8.
- Akinci, A.; Kanaka, C.; Eble, A.; Akar, N.; Vidinlisan, S.; Mullis, P. E. : Isolated growth hormone (GH) deficiency type IA associated with a 45-kilobase gene deletion within the human GH genecluster. *J.Clin.Endocr.Metab* (1992) 75:437-441.
- Amselem S, Duquesnoy P, Attree O, Novelli G, Bousnina S, Postel-Vinay MC, Goosens M. Laron dwarfism and mutations of the growth hormone receptor gene. *N E. J Med* (1989) 321: 989-995.
- Archer, J. S.; Kennan, W. S.; Gould, M. N.; Bremel, R. D. Human growth hormone (hGH) secretion in milk of goats after direct transfer of the hGH gene into the mammary gland by using replication-defective retrovirus vectors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1994) 91: 6840-6844.
- Arnhold IJ, Nery M, Brown MR, Voss TC, VanderHeyden TC, Adess ME, Hurley DL, Wajchenberg BL y Parks JS. Clinical and molecular characterization of a Brazilian patient with Pit-1 deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab* (1998) 11: 623-30.
- Ayling RM, Ross RJ, Towner P, Von Laue S, Finidori J, Moutoussamy S, Buchanan CR, Clayton PE, Norman MR. Discussion 173 New growth hormone receptor exon 9 mutation causes genetic short stature. *Acta Paediatr Suppl* (1999) 88:168-72.
- Balsamo A, Cicognani A, et al. Cacciari E, Pirazzoli P, Gualandi S, Baroncini C, Baldazzi L, Trevisani B, Capelli M, Zucchini S, Molecular study of human growth hormone gene cluster in three families with isolated growth hormone deficiency and similar phenotype. *E. J Pediatr* (1994) 153: 635-41.
- Barton DE, Foellmer BE, et al. Chromosome mapping of the growth hormone receptor gene in man and mouse. *Cytogenet Cell Genet* (1989) 50:137-141.
- Baum, H. B. A.; Katznelson, L.; Sherman, J. C.; Biller, B. M. K.; Hayden, D. L.; Schoenfeld, D. A.; Cannistraro, K. E.; Klibanski, A. Effects of physiological growth hormone (GH) therapy on cognition and quality of life in patients with adult-onset GH deficiency. *J. Clin. Endocr. Metab.* 1998-83:3184-3189.
- Baumann G, Maheshwari H. The Dwarfs of Sindh: severe growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene. *Acta Paediatr Suppl* (1997) 423:33-8.
- Baxter, J. D.; Seeburg, P. H.; Shine, J.; Martial, J. A.; Goodman, H. M. : The gene for growth hormone (GH): DNA sequence, expression, regulation. (Abstract) *Clin. Res.* (1977) 25: 461.

- Behncken, S. N.; Rowlinson, S. W.; Rowland, J. E.; Conway-Campbell, B. L.; Monks, T. A.; Waters, M. J. : Aspartate 171 is the major primate-specific determinant of human growth hormone. *J. Biol. Chem.* (1997) 272:27077-27083.
- Berg MA, Argente J, Chernausek S, Gracia R, Guevara-Aguirre J, Hopp M, Pérez-Jurado L, Rosenbloom A, Toledo SP, Francke. Diverse growth hormone receptor gene mutations in Laron syndrome. *Am J Hum Genet* (1993) 52: 998-1005.
- Berg MA, Guevara-Aguirre J, Rosenbloom AL, Rosenfeld RG, and Francke U. Laron Syndrome in Ecuador. Point mutation in the growth hormone receptor gene causes deletion of 8 aminoacids from the extracelular domain. *Pediatric Adolesc Endocrinology* (1993) 24: 140-152.
- Berg MA, Peoples R, Pérez-Jurado L, Guevara-Aguirre J, Rosenbloom AL, Laron Z, and Francke U. 1994. Receptor mutations and haplotypes in growth hormone receptor deficiency: A global survey and identification of the ecuadorean E180splice mutation in an oriental Jewish patient. *Acta Paediatric Suppl* (1994) 399:112-4.
- Bianda, T.; Glatz, Y.; Bouillon, R.; Froesch, E. R.; Schmid, C. : Effects of short-term insulin-like growth factor-I (IGF-I) or growth hormone (GH) treatment on bone metabolism and on production of 1,25-dihydroxycholecalciferol in GH-deficient adults. *J. Clin. Endocr. Metab.* (1998) 98: 81-87.
- Binder G, Ranke MB. Screening for growth hormone (GH) gene splice-site mutations in sporadic cases with severe isolated GH deficiency using ectopic transcript analysis. *J Clin Endocrinol Metab* (1995) 80:1247-1252.
- Binder, G.; Brown, M.; Parks, J. S. Mechanisms responsible for dominant expression of human growth hormone gene mutations. *J. Clin. Endocr. Metab.* (1996) 81: 4047-4050.
- Blethen, S. L.; Baptista, J.; Kuntze, J.; Foley, T.; LaFranchi, S.; Johanson, A. : Adult height in growth hormone (GH)-deficient children treated with biosynthetic GH. *J. Clin. Endocr. Metab.* (1997) 82:418-420.
- Bodner M, Castrillo JL, Theill L, Deernick T, Ellisman M, Karin M. The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* (1988) 55:508-518.
- Cacciari E, Menegatti M, Salardi S, Ali A, Stella FA, Figura N, Landi F, Holton J, Farinelli S, Cuccaro V, Miglioli M, Vaira D. Helicobacter pylori infection and cytotoxic antigen associated gene "A" status in short children. *J Pediatr Endocrinol Metab* (1999) 12:197-201.
- Cacciari E, Pirazzoli P, Gualandi S, Baroncini C, Baldazzi L, Trevisani B, Capelli M, Zucchini S, Balsamo A, Cicognani A, et al. Molecular study of human growth hormone gene cluster in three families with isolated growth hormone deficiency and similar phenotype. *Eur J Pediatr* (1994) 153: 635-41.
- Casanueva F. Physiology of growth hormone secretion and action. *Endocrinology and metabolism Clin* (1992) 21: 483-517.
- Castrillo Diez JL, Barrera Saldaña HA. El gen hGH-N y su regulación hipofisiaria. *Ciencia UANL* (1998) 1:333-338.
- Cavallo L, Gurrado R, Gallo F, Zacchino C, De Mattia D, Tatò L. Growth deficiency in polytransfused beta-thalassaemia patients is not growth hormone dependent. *Clin Endocrinol (Oxf)* (1997) 46: 701-6.

Chen E.Y. , Lien Y.C. , Smith D.H. , Barrera-Saldaña H.A. , Gelinas R.E. y Seeburg P.H. The Human Growth Hormone locus: Nucleotide Sequence, Biology and Evolution. *Genomics*. (1989) 4:479-497.

Christ ER, Carroll PV, Russell-Jones DL, Sönksen PH. The consequences of growth hormone deficiency in adulthood, and the effects of growth hormone replacement *Schweiz Med Wochenschr* (1997) 127: 1440-9.

Cogan JD, Phillips III JA, Sakati NA, Frisch H, Schoeber E, Milner D. Heterogeneous growth hormone (GH) gene mutations in familial GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* (1999) 76: 1224-1228.

Cogan, J. D.; Prince, M. A.; Lekhakula, S.; Bundey, S.; Futrakul, A.; McCarthy, E. M. S.; Phillips, J. A., III : A novel mechanism of aberrant pre-mRNA splicing in humans. *Hum. Molec. Genet.* (1997) 6:909-912.

Cogan, J. D.; Ramel, B.; Lehto, M.; Phillips, J., III; Prince, M.; Blizzard, R. M.; de Ravel, T. J. L.; Brammert, M.; Groop, L.: A recurring dominant negative mutation causes autosomal dominant GHD: A clin research center study. *J. Clin. Endocr. Metab.* (1995) 80: 3591-3595.

Conley ME, Burks AW, Herrog HG, Puck JM. Molecular analysis of X-linked agammaglobulinemia with growth hormone deficiency. *J Pediatr* (1992) 119: 392-397.

Cooke, N. E.; Szpirer, C.; Levan, G. The related genes encoding growth hormone and prolactin have been dispersed to chromosomes 10 and 17 in the rat. *Endocrinology* (1986) 119:2451-2454.

Deladoey J, Fluck C, Buyukgebiz A, Kuhlmann BV, Eble A, Hindmarsh PC, Wu W y Mullis PE. "Hot spot" in the PROP1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* (1999) 84: 1645-50.

Duquesnoy P, Roy A, Dastot F, Ghali I, Teinturier C, Netchine I, Cacheux V, Hafez M, Salah N, Chaussain JL, Goossens M, Bougneres P y Amselem S. Human Prop-1: cloning, mapping, genomic structure. Mutations in familial combined pituitary hormone deficiency. *FEBS Lett* (1998) 437: 216-20.

Duquesnoy, P.; Amselem, S.; Gormelen, M.; LeBouc, Y.; Goossens, M. : A frameshift mutation causing isolated growth hormone deficiency type 1A. (Abstract) *Am. J. H. Genet.* (1990) 47: 110.

Feng XP, Kuhnlein U, Aggrey SE, Gavora JS, Zadworny D. Trait association of genetic markers in the growth hormone and the growth hormone receptor gene in a White Leghorn strain. *Poult Sci* (1997) 76: 1770-5.

Fleisher TA, White RM, Broder S, Nissley SP, Blaese RM, et al. X-linked hypogammaglobulinemia and isolated growth hormone deficiency. *N. Engl J Med* (1980) 302: 1429-1434.

Fofanova O, Takamura N, Kinoshita E, Parks JS, Brown MR, Peterkova VA, Evgrafov OV, Goncharov NP, Bulatov AA, Dedov II y Yamashita S. Compound heterozygous deletion of the PROP-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* (1998) 88: 2601-4.

Fofanova OV, Takamura N, Kinoshita E, Yoshimoto M, Tsuji Y, Peterkova VA, Evgrafov OV, Dedov II, Goncharov NP y Yamashita S. Rarity of PIT1 involvement in children from Russia with combined pituitary hormone deficiency. *Am J Med Genet* (1998) 77: 360-5.

G.L. Marseglia, M. Bozzola, A. Marchi, A. Ricci, J.L. Touraine. Response to Long-Term hGH Therapy in Two Children with Schwachman-Diamond Syndrome Associated with GH Deficiency. *Hormone Research* (1998) 1:42-45.

Ghigo E, Aimaretti G, Gianotti L, Bellone J, Arvat E, Camanni F. New approach to the diagnosis of growth hormone deficiency in adults. *Eur J Endocrinol* (1996) 134:352-6.

Ghigo E, Imperiale E, Boffano GM, Mazza E, Bellone J, Arvat E, Procopio M, Goffi S, Barreca A, Chiabotto P, et al. A new test for the diagnosis of growth hormone deficiency due to primary pituitary impairment: combined administration of pyridostigmine and growth hormone-releasing hormone. *J Endocrinol Invest* 1 (1990) 13: 307-16.

Goddard AD, Covello R, Luch SM, Clackson T, Attie KM, Gesundheit N, Rundle AC, Wells JA, Carlsson LM. Mutations of the growth hormone receptor in children with idiopathic short stature. The Growth Hormone Insensitivity Study Group. *N Engl J Med* (1995) 233: 1093-8.

González-Rodríguez E. , Jaramillo-Rangel G. y Barrera-Saldaña H.A. Molecular Diagnosis of deletions in the human multigene complex of growth and placental lactogen hormones. *Am.J.Med.Genet.* (1997) 72:399-402.

Goosens M, Brauner R, Czernichov P, Duquesnoy P, Rappaport R. Isolated growth hormone deficiency type IA associated with a double deletion in the human GH gene cluster. *J Clin Endocrinol Metab* (1986) 62:712-716.

Hanew K, Utsumi A, Sugawara A, Shimizu Y, Tazawa S y Yoshinaga K. The relation between pituitary magnetic resonance imaging findings and GH, TSH, PRL dynamics in patients with idiopathic GH deficiency. *Acta Endocrinol (Copenh)* (1991) 125: 342-7.

Hayashi Y, Yamamoto M, Ohmori S, Kamijo T, Ogawa M, Seo H. Inhibition of growth hormone (GH) secretion by a mutant GH-I gene product in neuroendocrine cells containing secretory granules: an implication for isolated GH deficiency inherited in an autosomal dominant manner. *J Clin Endocrinol Metab* (1999) 84:2134-9.

He, Y. A.; Chen, S. S.; Wang, Y. X.; Lin, X. Y.; Wang, D. F. : A Chinese familial growth hormone[®] deficiency with a deletion of 7.1 kb of DNA. *J. Med. Genet.* (1990) 27: 151-154.

Ho KK y Hoffman DM. Defining growth hormone deficiency in adults. *Metab* (1995) 44: 91-6.

Hoffman DM, O'Sullivan AJ, Baxter RC, Ho KK. Diagnosis of growth-hormone deficiency in adults. *Lancet* 1994 Apr 30;343(8905):1064-8 (Pub erratum appears in *Lancet* (1994) 344: 206).

Holl RW, Pfaffle R, Kim C, Sorgo W, Teller WM y Heimann G. Combined pituitary deficiencies of growth hormone, thyroid stimulating hormone and prolactin due to Pit-1 gene mutation: a case report, *Eur J Pediatr* (1997) 156: 835-7.

Igarashi Y, Ogawa M, Kamijo T, et al. A new mutation causing inherited growth hormone deficiency: a compound heterozygote of a 6.7 kb deletion and a two base deletion in the third exon of the GH-I gene. *Hum Mol Genet* (1993) 2: 1073-1074.

Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Takahashi MO, Okimura Y, Nose O, Abe H, Chihara K. Functional characterization of truncated growth hormone (GH) receptor-(1-277) causing partial GH insensitivity syndrome with high GH-binding protein. *J C. Endocrinol Metab* (1999) 84: 1011-6.

Illig R, Prader A, Fernández A, Zachmann M. Hereditary prenatal growth hormone deficiency with increased tendency to growth hormone antibody formation (3A type isolated growth hormone deficiency). *Acta Paediatr Scand (Suppl)*. (1971) 60:607-612.

Ingraham HA, Chen R, Mangalam HJ, Lin CR et al. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* (1988) 55:519-529.

Irie Y, Tatsumi K, Kusuda S, Kawawaki H, Boyages SC, Nose O, Ichiba Y y Katsumata N, Amino N. Screening for PIT1 abnormality by PCR sequencing method. *Thyroid* (1995) 5:207.

Kadrnka-Lovrencic M y Verona E. Diagnostic value of growth hormone-releasing hormone tests in short children. *Ac. Med Croatica* (1994) 48: 189-92.

Kawai N, Kanzaki S, Takano-Watou S, Tada C, Yamanaka Y, Miyata T, Oka M y Seino Y. Serum free insulin-like growth factor I (IGF-I), total IGF-I, and IGF-binding protein-3 concentrations in normal children and children with growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* (1999) 84: 82-9.

Lanes R, Gunczler P, Weisinger JR. Decreased trabecular bone mineral density in children with idiopathic short stature: normalization of bone density and increased bone turnover after 1 year of growth hormone treatment. *J Pediatr* (1999) 135: 177-81.

Laron Z, Pertzalan A y Mannheimer S. Genetic pituitary dwarfism with high serum concentrations of GH: A new inborn error of metab 7. *Isr J Med Sci* (1966) 2: 152-155.

Laron Z. Laron-type dwarfism: A review in Frick P, Von Harnach G.A. *Advances in internal Medicine and Paediatrics* Springer Verlag, Berlin. (1984) 117-150.

Lekhakula S, Lertrit P, Tuchinda C, Angsusingha K, Kangsadalampai S, Wacharasindhu S, Futrakul A, Sritawil K. Southeast Molecular examination of GH gene deletion in familial growth hormone deficiency. *Asian J Trop Med Public Health* (1995) 26 Suppl 1: 207-11.

Liang J, Moye-Rowley S y Maurer RA. In vivo mutational analysis of the DNA binding domain of the tissue-specific transcription factor, Pit-1. *J Biol Chem* (1995) 270: 25520-5

Lloyd RV y Osamura RY. Transcription factors in normal and neoplastic pituitary tissues. *Microsc Res Tech* (1997) 39: 168-81.

Longobardi S, Merola B, Pivonello R, Di Rella F, Di Somma C, Colao A, Ghigo E, Camanni F y Lombardi G. Reevaluation of growth hormone (GH) secretion in 69 adults diagnosed as GH-deficient patients during childhood. *J Clin Endocrinol Metab* (1996) 81: 1244-7.

Mann WR, Venkatrai DA, Allen RG, et al. Fanconi anemia: evidence for linkage heterogeneity on chromosome 20q. *Genomics* (1991) 9:329-337.

Manual Merck. *Pediatría y Genética. Enfermedades endocrinas y metabólicas*. Merck Sharp and Dohme de España, S. A. (1998). Madrid, España.

Martial, J. A.; Hallewell, R. A.; Baxter, J. D.; Goodman, H. M. : Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science* (1979) 205: 602-607.

Massa GG, Binder G, Oostdijk W, Ranke MB. De novo mutations of the growth hormone gene: an important cause of congenital IGHD? *Eur J Pediatr* (1998) 157: 272-5.

Meyers TE, Habener JF. Cyclic AMP response element binding protein (CREB) and related transcription-activating DNA-binding proteins. *Endoc Rev* (1993) 14: 269.

Miyata I, Cogan JD, Prince MA, Kamijo T, Ogawa M, Phillips JA. Detection of growth hormone gene defects by dideoxy fingerprinting (ddF). *Endocr J* (1997) 44: 149-54.

Mullis P, Patel M, Brickell PM, Brook CG. Isolated growth hormone deficiency: analysis of the growth hormone (GH)-releasing hormone gene and the GH gene cluster. *J Clin Endocrinol Metab* (1990) 70: 187-91.

Mullis PE, Akinci A, Kanaka C, Eble A, Brook CG. Prevalence of human growth hormone-1 gene deletions among patients with isolated growth hormone deficiency from different populations. *Pediatr Res* (1992) 31: 532-534.

Nakamura S, Ohtsuru A, Takamura N, Kitange G, Tokunaga Y, Yasunaga A, Shibata S y Yamashita S. Prop-1 gene expression in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* (1999) 84: 2581-4.

Nakamura Y, Usui T, Mizuta H, Murabe H, Muro S, Suda M, Tanaka K, Tanaka I y Shimtsu A. Characterization of Prop-1 gene expression in normal pituitary and pituitary adenomas in humans. *J Clin Endocrinol Metab* (1999) 84: 1414-9.

Nishi Y, Masuda H, Nishimura S, Kihara M, Suwa S, Tachibana K, Takeda M, Okada Y, Matsuda I. Isolated human growth hormone deficiency due to the hGH-I gene deletion with (type IA) and without (the Israeli-type) hGH antibody formation during hGH therapy. *Acta Endocrinol (Copenh)* (1990) 122:267-71.

Nogueira CR, Leite CC, Chedid EP, Liberman B, Pimentel-Filho FR, Kopp P y Medeiros-Neto GA. Autosomal recessive deficiency of combined pituitary hormones (except ACTH) in a consanguineous Brazilian kindred. *J Endocrinol Invest* (1997) 20: 629-33.

Nogueira CR, Sabacan L, Jameson JL, Medeiros-Neto G, y Kopp P. Combined pituitary hormone deficiency in an inbred Brazilian kindred associated with a mutation in the PROP-1 gene. *Mol Genet Metab* (1999) 67: 58-61.

Nowaczyk MJ, Hughes HE, Costa T, Clarke JT. Severe prenatal growth retardation, dysmorphic features, pigmentary retinopathy, and generalized absence of subcutaneous tissues: a new entity? *Clin Dysmorphol* (1998) 7:263-8.

Ogata T, Petit C, Rappold G, Matsuo N, *et al.* Chromosomal localization of (a) pseudoautosomal growth gene (s). *J Med Genetic* (1992) 29: 624-628.

Ohta K, Nobukuni Y, Mitsubuchi H, *et al.* Characterization of the gene encoding h. pituitary-specific transcription factor, Pit1. *Gene* (1992) 122:387-388.

Park MS y Kim DH. Diagnostic value of insulin-like growth factor-I in short stature *Yonsei Med J.* (1989) 30:367-75.

Parks JS, Adess ME y Brown MR. Genes regulating hypothalamic and pituitary development. *Acta Paediatr Suppl* (1997) 423: 28-32.

- Pellegrini-Bouiller I, Belicar P, Barlier A, Gunz G, Charvet JP, Jaquet P, Brue T, Vialettes B, Enjalbert A. A new mutation of the gene encoding the transcription factor Pit-1 is responsible for combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol and Metab* (1996) 81: 2790-6.
- Perez Jurado LA y Argente J. Molecular basis of familial growth hormone deficiency. *Horm Res* (1994) 42: 189-97.
- Perez-Jurado LA, Argente J, Raskin S, García F, Phillips III JA: Genetic Analysis of familial isolated growth hormone deficiency type II. *Horm Res* (1992) 37 (Suppl 4): A 198.
- Pfaffle RW, Martinez R, Kim C, Frisch H, Lebl J, Otten B y Heimann G. GH and TSH deficiency. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* (1997) 105 Suppl 4: 1-5.
- Phadke SR, Pahi J, Pandey A, Agarwal. Oral-facial-digital syndrome with acromelic short stature: a new variant overlap with Ellis Van Creveld syndrome. *SS Clin Dysmorphol* (1999) 8: 185-8.
- Phillips III JA, Cogan JD, Raskin S, Parker SA. Pedigree analysis of familial growth hormone deficiency. *Am J Hum Genet* (1992) 51(suppl): A 1459.
- Phillips III JA, Hjelle BL, Seeburg PH, Zachmann M. Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) 78:6372-6375.
- Phillips III JA, Parks BL, Hiele JE, Plotnick LP. Genetic analysis of familial isolated growth hormone deficiency type I. *J C Invest* (1982) 70: 489-495.
- Phillips III JA: Inherited defects in growth hormone synthesis and action. The metabolic basis of inherited disease. de. New York : Mc Graw-Hill (1989).
- Phillips JA 3d, Hjelle BL, Seeburg PH, Zachmann M. Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency. *M Proc Natl Acad Sci U S A* (1981) 78: 6372-5.
- Phillips, J. A., III; Cogan, J. D. : Genetic basis of endocrine disease 6: molecular basis of familial human growth hormone deficiency. *J. Clin. Endocr. Metab* (1994) 78:11-16.
- Phillips, J. A., III; Hjelle, B. L.; Seeburg, P. H.; Plotnick, L. P.; Migeon, C. J.; Zachmann, M. : Heterogeneity in the molecular basis of familial growth hormone deficiency (IGHD). (Abstract) *Am. J. Hum. Genet* (1981) 33: 52.
- Procter AM, Phillips JA 3rd, Cooper DN. The molecular genetics of growth hormone deficiency. *Hum Genet* (1998) 103: 255-72.
- Radetti G, Bozzola M, Pasquino B, Paganini C, Agliandolo A, Livieri C, Barreca A. Growth hormone bioactivity, insulin-like growth factors (IGFs), and IGF binding proteins in obese children. *Metabolism* (1998) 47: 1490-3.
- Radovick S, Nations M, Du Y, Berg LA, Weintraub BD y Wondisford FE. A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science* (1992) 257:1115-8.
- Rappaport R, Oleske J, Ahdieh H, Solomon S, Delfaus S. Suppression of immune function in growth hormone deficient children during treatment with human growth hormone. *J Pediatr* (1993) 109: 434-439.

- Rappaport, R.; Mugnier, E.; Limoni, C.; Crosnier, H.; Czernichow, P.; Leger, J.; Limal, J.-M.; Rochiccioli, P.; Soskin, S.; Brauner, R.; Pinto, G.; Pawels, C.; and 27 others : A 5-year prospective study of growth hormone (GH)-deficient children treated with GH before the age of 3 years. *J. Clin. Endocr. Metab* (1997) ~~29:452-456~~
- Raskin S, Cogan JD, Summar ML, Moreno A, Krishnamani MR y Phillips JA 3rd. Genetic mapping of the human pituitary-specific transcriptional factor gene and its analysis in familial panhypopituitary dwarfism. *Hum Genet* (1996) 98: 703-5.
- Reiter E, Morris A, MacGillivray M, Wever D. Variable estimates of serum growth hormone concentrations by different RIA systems. *J Clin Endocrinol Metab* (1988) 66: 68-71.
- Rosenbloom AL, Almonte AS, Brown MR, Fisher DA, Baumbach L y Parks JS. Clinical and biochemical phenotype of familial anterior hypopituitarism from mutation of the PROP1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* (1999) 84: 50-7.
- Rosenbloom AL, Guevara-Aguirre J, Rosenfeld RG, Fielder PJ. The little woman of Loja: Growth hormone receptor deficiency in an inbred population of southern Ecuador. *N Engl J Med* (1990) 323: 1367-1374.
- Rosenfeld, R. G : Editorial: is growth hormone deficiency a viable diagnosis? *J. Clin. Endocr. Metab* (1997) 82:349-351.
- Ross RJ. Truncated growth hormone receptor isoforms. Division of Clinical Sciences. *Acta Paediatr Suppl* (1999) 88: 164-6.
- Ruiz-Pacheco R, Chatelain P, Sizonenko PC, Bost M, Garandau P, Sultan C. Genetic and molecular analysis of familial isolated growth hormone deficiency. *Hum Genet* (1993) 92: 273-81.
- Ruiz-Pacheco R, Lobaccaro JM, Roizes G, Sultan C. Study of growth hormone gene in non-familial complete somatotropin deficiency. *C R Seances Soc Biol Fil* (1990) 184:168-74.
- Saenger P Head. Growth Hormone Treatment for Children without Growth Hormone Deficiency: Does It Work and Will It Produce Adolescents Who Are Better Adjusted? *Adolesc Med* (1997) 8: 527-536
- Saenger P.N Partial growth hormone insensitivity--idiopathic short stature is not always idiopathic. *Acta Paediatr Suppl* (1999) 88: 194-8.
- Sanchez JE, Perera E, Baumbach L, Cleveland WW. Growth hormone receptor mutations in children with idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab* (1998) 83: 4079-83.
- Sanchez O, Guerra D, Nastasi J, Escalona. Achondroplasia and Down syndrome in the same patient. Report of a case. *J Invest Clin* (1999) 40: 143-54.
- Schaff-Blass E, Burstein S, Rosenfeld RL. Advances in diagnosis and treatment of short stature, with special reference to the role of growth hormone. *J Pediatr* (1984) 104:801-813.
- Seino Y, Moriwake T, Tanaka H, Inoue M, Kanzaki S, Tanaka T, Matsuo N, Niimi H. Molecular defects in achondroplasia and the effects of growth hormone treatment. *Acta Paediatr Suppl* (1999) 88:118-20.

Struthers RS, Vale WW, Arias C, et al. Somatotroph hypoplasia and dwarfism in transgenic mice expressing a non-phosphorylatable CREB mutant. *Nature* (1991) 350: 622-5.

Takahashi, Y.; Kaji, H.; Okimura, Y.; Goji, K.; Abe, H.; Chihara, K. : Short stature caused by a mutant growth hormone. *New Eng. J. Med.* 334: 432-436, 1996. Note: Erratum: *New Eng: J: Med:* (1996) 334:1207.

Takahashi, Y.; Shirono, H.; Arisaka, O.; Takahashi, K.; Yagi, T.; Koga, J.; Kaji, H.; Okimura, Y.; Abe, H.; Tanaka, T.; Chihara, K. : Biologically inactive growth hormone caused by an amino acid substitution. *J. Clin. Invest.* (1997) 100:1159-1165.

Tatsumi K, Amino N y Miyai K. Molecular pathology of congenital pituitary hypothyroidism-- discovery of new clinical entities. *Rinsho Byori* (1993) 41: 533-40 .

Tillmann, V.; Buckler, J. M. H.; Kibirige, M. S.; Price, D. A.; Shalet, S. M.; Wales, J. K. H.; Addison, M. G.; Gill, M. S.; Whatmore, A. J.; Clayton, P. E. : Biochemical tests in the diagnosis of childhood growth hormone deficiency. *J. Clin. Endocr. Metab.* (1997) 82:531-535.

Tuggle CK y Trenkle A. Control of growth hormone synthesis. *Dom. Anim Endocrinol* (1996) 13: 1-33.

Vnencak-Jones CL, Phillips III JA. Use of polymerase chain reaction in detection of growth hormone gene deletions. *J Clin Endocrinol Metab* (1990) 70:1550-1553.

Vnencak-Jones, C. L.; Phillips, J. A., III; Chen, E. Y.; Seeburg, P. H. : Molecular basis of human growth hormone gene deletions. *Proc. Nat. Acad. Sci* (1988) 85:5615-5619.

Wang Y, Yu LL, Sheng Q, Meng C, Sun J, Chen SS. Analysis of human growth hormone gene 5' sequences in isolated growth hormone deficiency patients. *J Med Genet* (1994) 31: 81-2

Witt JM, Drayer NM, Jansen M, Van Den Brande JL, et al. Total deficiency of growth hormone, prolactin and partial deficiency of thyroid stimulating hormone in two Dutch families: a new variant of hereditary pituitary deficiency. *Hormon Res* (1989) 32:170-177.

Woods KA, Weber A y Clark AJ. The molecular pathology of pituitary hormone deficiency and resistance. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* (1995) 9:453-87 .

Wu W, Cogan JD, Pfaffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, Flynn SE, Brown MR, Mullis PE, Parks JS, Phillips JA 3rd y Rosenfeld MG. Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet* (1998) 18:147-9.

Zucchini S, Ambrosetto P, Baroncini C y Cacciari E. Normal pituitary size in two patients with growth hormone gene deletion. *J Pediatr Endocrinol Metab* (1996) 9: 545-8.

APÉNDICE 1 Carta de consentimiento informado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE MEDICINA DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de la presente hago constar que he sido informado (a) a mi satisfacción de la naturaleza, propósito y alcances del proyecto: "Detección molecular de mutaciones genéticas que causan el síndrome de deficiencia de la hormona del crecimiento humano (HGH)", y deseando colaborar en el mismo accedo de manera voluntaria a contestar las preguntas del cuestionario y a donar 5 ml de sangre.

Así mismo, doy autorización para que las personas que efectúan este proyecto, utilicen tanto los datos que proporciono, como la muestra biológica que se obtenga de mí, con fines únicamente de investigación, en el entendido de que tanto los resultados como mi identidad se mantendrán confidenciales.

Nombre del participante: _____ Firma _____
Dirección _____

Nombre del testigo: _____ Firma _____
Dirección _____

Nombre del investigador: _____ Firma _____
Dirección _____

APÉNDICE 2 Datos clínicos de pacientes con deficiencia combinada (CPHD).

A.- Datos Antropométricos

Paciente	Origen	Sexo	Fecha de Toma	Edad (años)	Edad Ósea (años)	Edad actual (años)	Peso actual (Kg)	Talla actual (m)	Vel. crecimiento	Datos adicionales
R1	Monterrey N.L.	M	7/11/94	4	3	10	22.7	1.17	< P 3	Retraso psicomotor, retraso en lenguaje y abuela con diabetes
R2	Mazquíz, Coah.	M	5/08/98	14	5	15	32.0	1.35	< P 3	Pubertad retrasada, retraso en lenguaje, hipotiroidismo y tía con diabetes.
R7	Monclova Coah.	M	16/08/95	10	4	14	34.5	1.38	< P 3	Hipotiroidismo y abuela con diabetes.
R15	Piedras Negras Coah.	M	23/10/96	12	3	15	26.7	1.34	< P 3	Pubertad retrasada y padre con diabetes
L7	Monterrey N.L.	M	12/07/93	10	ENR	16	41.8	1.46	< P 3	Pubertad retrasada e hipotiroidismo.

B.- Datos de Laboratorio

Paciente	GH ng/ml	LH mIU/ml	PRL ng/ml	TSH mIU/ml	FSH mIU/ml	IGF-I ng/ml	Tetosterona ng/ml	Fosfatasa alcalina. U/L	Fósforo mg/100ml	TAC
R1	ND	ENR	ENR	0.01	ENR	ND	ENR	327	4.8	Disminución de tejido hipofisario
R2	ND	ND	19.88	ND	0.19	ND	ND	220	ENR	Silla Turca "vacía"
R7	ND	ND	10.3	ND	0.16	37.0	ND	192	5.3	Silla Turca "vacía"
R15	ND	0.75	35.18	ND	0.71	4.03	ENR	180	7.5	Silla Turca "vacía"
L7	ND	0.61	ENR	1.52	1.77	ENR	ND	ENR	ENR	Silla Turca "vacía"

ND: No detectable; ENR: Exámen no realizado

APÉNDICE 3 Datos clínicos de pacientes con deficiencia aislada (IGHD).

A.- Datos Antropométricos

Paciente	Origen	Sexo	Fecha de Toma	Edad (años)	Edad Ósea (años)	Edad actual (años)	Velocidad de crecimiento
Mo 1	México DF	M	06/04/87	7 11/12	3	20 9/12	0.25 cm/mes
Mo 2	México DF	M	20/05/97	14 10/12	9 9/12	17 5/12	0.28 cm/mes
Mo 3	México DF	M	02/02/98	11 2/12	7 11/12	13 2/12	0.30 cm/mes
Mo 4	México DF	M	09/03/98	14	7 10/12	16 9/12	0.20 cm/mes
Mo 5	México DF	M	21/07/97	12 4/12	7 5/12	14 11/12	0.35 cm/mes
Mo 6	México DF	F	EEx	EEx	EEx	16 5/12	EEx
Mo 7	México DF	F	02/02/98	13 4/12	9 9/12	15 4/12	0.30 cm/mes
Mo 8	México DF	F	27/06/94	5 6/12	4 4/12	11 2/12	0.40 cm/mes
Mo 9	México DF	F	07/03/94	5 8/12	2 5/12	11 7/12	0.30 cm/mes
Mo 10	México DF	M	10/03/92	8 6/12	6	16 5/12	0.16 cm/mes
Mo 11	México DF	M	11/05/92	8 8/12	4 3/12	16 5/12	0.38 cm/mes
Mo 12	México DF	M	13 6/12	4 4/12	1 4/12	13 6/12	0.21 cm/mes
Mo 13	México DF	F	21/10/91	1 8/12	< 1	10	0.07 cm/mes

B.- Datos de Laboratorio

Paciente	Respuesta de HGH			FSH mU/ml	LH mU/ml	TAC de Craneo y silla turca	Fosfatasa alcalina (U/L)	
	Ejercicio	clonidina (ng/ml)	piridostigmina (ng/ml)				Antes del tratamiento	Después de tratamiento
Mo 1	ENR	ENR	ENR	1.0	0.9	aracnoidocele selar	148	504
Mo 2	0.61	0.54	0.77	1.41	1.1	aracnoidocele	ENR	ENR
Mo 3	2.3	13.0	6.2	ENR	ENR	Normal	ENR	ENR
Mo 4	ENR	ENR	ENR	ENR	ENR	Hipófisis hipotrófica	272	369
Mo 5	ENR	11.4	8.7	ENR	ENR	Normal	318	261
Mo 6	EEx	EEx	EEx	EEx	EEx	EEx	205	175
Mo 7	8.57	4.1	2.0	ENR	ENR	Normal	ENR	ENR
Mo 8	EEx	EEx	EEx	ENR	ENR	ENR	178	408
Mo 9	9.2	ENR	2.3	ENR	ENR	Normal	ENR	351
Mo 10	3.9	2.6	8.8	ENR	ENR	Normal	ENR	244
Mo 11	2.8	ENR	10.0	ENR	ENR	Normal	192	235
Mo 12	1.0	1.9	ENR	ENR	ENR	Normal	180	307
Mo 13	ENR	ENR	ENR	ENR	ENR	Normal	ENR	189

EEx: Expediente extraviado; ENR: Exámen no realizado

APÉNDICE 3 Datos clínicos de pacientes con deficiencia aislada (IGHD).

A.- Datos Antropométricos

Paciente	Origen	Sexo	Fecha de toma	Edad (años)	Edad Ósea (años)	Edad Actual (años)	Peso Actual (Kg)	Talla Actual (m)	Datos Adicionales
R3	Guadalupe, N.L.	M	25/01/99	11	7	12	34.0	1.35	Pubertad retrasada y Disartria
R5	Monterrey N.L.	M	30/12/97	9 2/12	6	13	27.0	1.35	Pubertad retrasada
R6	Reynosa Tamps.	M	20/10/92	8	5	15	50.5	1.57	GHD
R9	N. Rosita Coah.	M	07/11/94	8 3/12	5	13 5/12	38.5	1.39	Vel. de crecimiento < Percentil 3
R10	Allende N. L.	M	04/08/88	2 6/12	1	15	47.9	1.59	Retraso psicomotor, Hipoglucemia, Hipotiroidismo e Hipercolesterolemia.
R11	Cd. Madero, Tamps.	F	01/01/97	6 9/12	2 6/12	11	17.5	1.09	hermano con GHG
R14	San Nicolás de los Garza N.L.	M	12/06/95	9	7	14	32.5	1.36	Pubertad retrasada
C3	Monterrey N.L.	F	15/07/99	7	5	8	19.3	1.12	
C5	Monterrey N.L.	M	EEx	EEx	EEx	EEx	EEx	EEx	Prima de talla baja
C6	Monterrey N.L.	M	20/02/99	15	ENR	15	61.0	1.48	Pubertad retrasada
C8	Monterrey N.L.	M	02/08/95	11	ENR	16	34.6	1.48	Pubertad retrasada
C9	Monterrey N.L.	F	05/01/93	5 1/12	1 6/12	8	20.0	1.16	Asma, Bronconeumonía y Faringoamigdalitis
C10	Miguel Aleman Tamps.	M	28/09/98	15	11	16	49.3	1.54	Pubertad retrasada
C11	Monterrey N.L.	M	31/05/95	1 6/12	ENR	6	15.1	1.07	Retraso de desarrollo, hermana con GHG
C12	Monterrey N.L.	F	31/05/95	1 6/12	ENR	6	11.2	0.97	Retraso psicomotor, desarrollo retrasado y hermano con GHG
C13	Monterrey N.L.	F	01/03/00	12 5/12	ENR	12 5/12	38.0	1.42	Tío diabético
L2	Guadalupe N.L.	F	23/01/97	15 10/12	15	16	45.2	1.50	
L9	Saltillo Coah.	F	25/10/93	9 8/12	9	13	36.0	1.32	GHD e Hipotiroidismo
L10	Monterrey N.L.	M	17/05/96	6	4	9	26.2	1.23	Padre con talla baja.
L11	Sabinas Hidalgo N.L.	M	03/12/98	10 6/12	6	11 10/12	36.0	1.42	Pubertad retrasada y retraso psicomotor.
E5	Monterrey N.L.	M	09/01/97	9 10/12	7	12	54.8	1.44	GHD y Potifagia

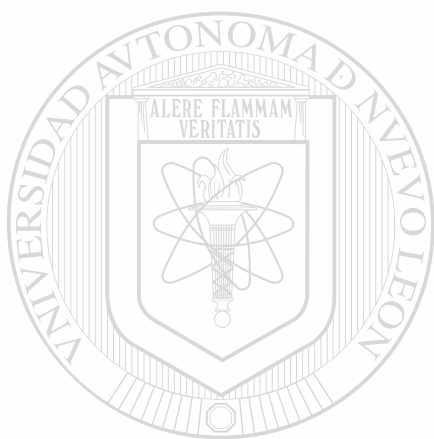
EEx: Expediente extraviado; ENR: Exámen no realizado

APÉNDICE 3 Datos clínicos de pacientes con deficiencia aislada (IGHD).

B.- Datos de Laboratorio

Paciente	Respuesta de HGH a: +Ejercicio ++L-Dopa Propranolol (ng/ml)	Respuesta de HGH Clonidina ng/ml	FSH mU/ml	LH mU/ml	TSH mU/ml	T 4 libre * mcg/dl ** ng/ml	IGF - I (ng/ml)	TAC de cráneo y silla turca	Fosfatasa Alcalina (U/L)	Fósforo mg/100ml
R3	ENR	ND	ENR	ENR	1.13	1.44**	99.48	Normal	295	4.2
R5	ENR	ENR	ENR	ENR	ND	2.1**	24.37	ENR	ENR	5.6
R6	ND ++	14.28	3.25	1.5	1.57	1.38**	167.11	Normal	274	4.2
R9	1.0 ++	9.62	ENR	ENR	5.20	1.57**	197.02	Normal	ENR	5.1
R10	ENR	ENR	1.98	2.07	ND	1.58**	89.9	ENR	ENR	ENR
R11	ENR	2.0	ENR	ENR	2.03	1.26**	0.53	Silla turca vacía	132	5.3
R14	11.31 ++	8.39	ENR	ENR	0.41	1.09**	147.71	ENR	238	5.1
C3	0.98 +	4.21	ENR	ENR	2.05	9.86*	111	ENR	224.0	ENR
C5	EEx	EEx	EEx	EEx	EEx	EEx	EEx	EEx	EEx	EEx
C6	1.17 +	0.92	1.80	0.55	1.82	8.23*	ENR	Normal	346.0	5.29
C7	3.4 +	ENR	ENR	ENR	ENR	ENR	52	ENR	ENR	ENR
C8	ENR	4.30	1.38	1.72	1.73	8.38*	ENR	Normal	204	4.14
C9	ENR	1.02	ENR	ENR	3.19	10.35*	ENR	Normal	326	4.9
C10	ENR	3.8	ENR	ENR	ENR	ENR	170.34	Normal	ENR	ENR
C11	ENR	ENR	ENR	ENR	5.73	10.46*	ENR	ENR	218	ENR
C12	ENR	ENR	ENR	ENR	ENR	ENR	ENR	ENR	ENR	ENR
C13	ENR	2.63	6.29	2.69	0.33	1.25**	419.6	ENR	ENR	ENR
L2	ENR	ND	ENR	ENR	0.78	6.3*	ENR	ENR	58	ENR
L9	2.0 +	ND	ENR	ENR	1.18	12.88*	ENR	ENR	ENR	ENR
L10	ENR	4.5	ENR	ENR	2.45	8.44*	ENR	Normal	ENR	4.0
L11	4.19 +	4.40	ENR	ENR	3.22	7.7*	ENR	ENR	274	ENR
E5	ENR	ND	2.94	0.76	1.71	1.51**	234.55	Silla turca vacía	432	6.3

ND: No detectable; EEx: Expediente extraviado; ENR: Examen no realizado



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



