

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



BUSQUEDA DE MUTACIONES EN EL GEN hGH-N  
EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE HORMONA  
DEL CRECIMIENTO HUMANO.

POR  
FERMIN MAR AGUILAR

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad  
en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Noviembre, 1998



EM

QH445

M37

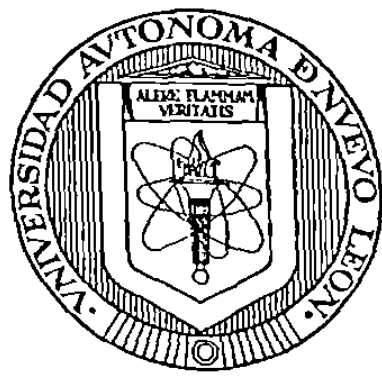
c.1



1080081940

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**BUSQUEDA DE MUTACIONES EN EL GEN hGH-N EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO.**

**Por**

**FERMIN MAR AGUILAR**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

**Noviembre, 1998**

TM  
9H44S  
M37

UNIVERSIDAD  
BURJUI RANGEL FERRAS  
UANL  
FONDO  
TESIS MAESTRIA  
Tesis  
(81940)

**"BUSQUEDA DE MUTACIONES EN EL GEN hGH-N EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO"**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ**  
Presidente



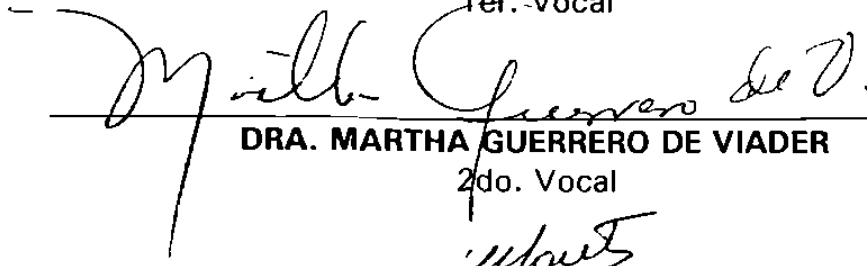
---

**DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA**  
Secretario



---

**DR. HUGO A. BARRERA SALDAÑA**  
1er.-Vocal



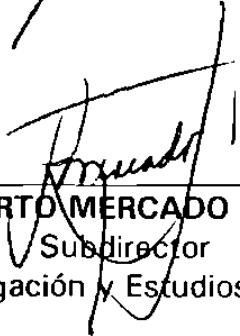
---

**DRA. MARTHA GUERRERO DE VIADER**  
2do. Vocal



---

**DR. JUAN MONTES VILLARREAL**  
3er. Vocal



---

**DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA**  
Subdirector  
De Investigación y Estudios de Posgrado

*El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Celular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña y la co-asesoría de la Dra Herminia G. Martínez Rodríguez y la Dra. Agnès Revol de Mendoza.*

## **DEDICATORIA**

**A todas las personas que me brindaron su ayuda en todo momento.**

**A Ella...Gracias por iluminar mi camino.**

¿Crees que si vamos al este, muy, muy al este , al lugar de donde viene el sol, la gente que encontremos allí sabrá más sobre el calor?  
¿Sobre como tener calor?

**Alejandro Magno**  
(Hace mas de 2000 años)



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi comisión de tesis, gracias por sus consejos.

Al CONACYT gracias por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de maestría.

A la ULIEG...

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
I INTRODUCCION.....	1
1.1 El gen de la hormona del crecimiento humano.....	1
1.2 Acción biológica de la HGH.....	2
1.3 Patologías relacionadas con la HGH.....	5
1.4 Deficiencia aislada de HGH.....	5
1.4.1 Deficiencia aislada de HGH tipo IA.....	6
1.4.2 Deficiencia aislada de HGH tipo IB.....	6
1.4.3 Deficiencia aislada de HGH tipo II.....	7
1.4.4 Deficiencia aislada de HGH tipo III.....	7
1.5 Métodos de detección de mutaciones.....	7
1.6 Hallazgos en el gen hGH-N.....	8
1.7 Objetivo general.....	10
1.7.1 Objetivos específicos.....	10
II MATERIALES Y METODOS.....	11
2.1 Materiales.....	11
2.1.1 Origen de los reactivos y materiales utilizados.....	11
2.2 Métodos.....	14
2.2.1 Estrategia general.....	14
2.2.2 Extracción de DNA genómico.....	16
2.2.3 Amplificación del gen hGH-N.....	17
2.2.3.1 Diseño de oligonucleótidos.....	17
2.2.3.2 Amplificación por PCR de la región promotora.....	18
2.2.3.3 Análisis de heteroduplex.....	19
2.2.3.3.1 Desnaturalización de lo productos amplificados.....	19
2.2.3.3.2 Incubación.....	19
2.2.3.3.3 Preparación del gel de alta resolución.....	19

2.2.3.3.4 Electroforesis. ....	19
2.2.3.4 Amplificación por PCR de la región codificante. ....	20
2.2.3.4.1 Digestión con la enzima <i>Ava</i> II. ....	21
2.2.3.4.2 Análisis de heteroduplex. ....	21
2.3 Clonación de la región promotora del gen hGH-N. ....	21
2.4 Secuenciación. ....	23
<b>III RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
3.1 Diseño del oligonucleótido específico para el gen hGH- N. ....	24
3.2 Búsqueda de deleciones en el gen hGH-N. ....	26
3.3 Estandarización de la PCR para el promotor. ....	26
3.4 Análisis de heteroduplex para el promotor. ....	27
3.5 Estandarización de la PCR para la región codificante y promotora. ....	28
3.6 Análisis de heteroduplex para la región codificante y promotora. ....	29
3.6.1 Análisis de la muestra 4. ....	30
3.7 Resultados de los pacientes analizados. ....	33
3.8 Secuencias de las muestras positivas. ....	33
<b>IV DISCUSION</b> .....	<b>37</b>
<b>V CONCLUSIONES</b> .....	<b>41</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>42</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Polimorfismos encontrados en el promotor del gen hGH-N.....	8
II	Reacción de PCR para la región promotora. ....	18
III	Condiciones de amplificación para la región promotora.....	18
IV	Preparación del gel MDE.....	19
V	PCR para la región promotora y codificante. ....	20
VI	Condiciones de amplificación para la región promotora y codificante.....	20
VII	Digestión con la enzima <i>Ava</i> II.....	21
VIII	Digestión preparativa para la clonación.....	22
IX	Reacción de ligación.....	23
X	Tamaños de los productos de digestión del amplicón de la región promotora y codificante.....	29
XI	Digestiones de la muestra 4 comparadas con hGH-N.....	31
XII	Digestiones de la muestra 4 comparadas con hPL-1.....	32
XIII	Resultados obtenidos en los pacientes analizados .....	23
XIV	Secuenciación de las muestras analizadas. . . . .	24



## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Anatomía de la familia multigénica hGH-hPL . . . . .	1
2 Secuencias reguladoras en el gen hGH-N. . . . .	2
3 Estrategia general. . . . .	15
4 Sitio de apareamiento de los oligonucleótidos en el gen hGH-N. . . . .	17
5 Diseño del oligonucleótido específico para el gen hGH-N. . . . .	25
6 Búsqueda de deleciones en el gen hGH-N. . . . .	26
7 PCR de la región promotora del gen hGH-N . . . . .	27
8 Análisis de heteroduplex para la región promotora. . . . .	28
9 PCR de la región promotora y la región codificante del gen hGH-N. . . . .	28
10 Análisis de heteroduplex del producto amplificado del gen hGH-N digerido con la enzima <i>Ava</i> II. . . . .	30
11 Patrones de digestión de la muestra 4. . . . .	31
12 Caracterización de las clonas obtenidas del promotor del gen hGH-N. . . . .	34
13 Secuencia de la región promotora. . . . .	36

## NOMENCLATURA

°C	Grados Centígrados
Cols.	Colaboradores
DAHGH	Deficiencia aislada de hormona del crecimiento humano
DAHGH IA	Deficiencia aislada de hormona del crecimiento humano tipo IA
DAHGH IB	Deficiencia aislada de hormona del crecimiento humano tipo IB
DAHGH II	Deficiencia aislada de hormona del crecimiento humano tipo II
DAHGH III	Deficiencia aislada de hormona del crecimiento humano tipo III
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxinucleósidos trifosfatados
DS	Desviación estandar
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
GHF-1	Factor de hormona de crecimiento 1
GHIF	Factor inhibidor de la hormona del crecimiento humano
GHRH	Factor liberador de la hormona del crecimiento humano
hGH-N	Gen normal de hormona del crecimiento humano
hGH-N5'	Oligonucleótido que se aparea específicamente en el promotor del gen hGH-N
hGH-V	Gen variante de hormona del crecimiento humano
HGH	Hormona del crecimiento humano (proteína)

hPL-1	Gen del lactógeno placentario 1
hPL-2	Gen del lactógeno placentario 2
hPL-3	Gen del lactógeno placentario 3
kb	kilobases
kDa	Kilodaltones
M	Concentración Molar
min	Minutos
mM	Concentración milimolar
μg	Microgramos
μl	Microlitro
μM	Concentración micromolar
ml	Mililitro
ng	Nanogramos
nuc.	Nucleótidos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	-Log [H <sup>+</sup> ]
PRL	Hormona prolactina
r	Recombinanté
RIA	Radioinmunoensayo
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
Seg	Segundos

Sevag	Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)
SS	Somatostatina
SSCP	Polimorfismo conformacional de cadena sencilla
Vol	Volumen
U	Unidades
UV	Ultravioleta
X	Veces la concentración



## Resumen

Fermín Mar Aguilar  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Noviembre de 1998

**Título del estudio: BUSQUEDA DE MUTACIONES EN EL GEN hGH-N EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO.**

Número de páginas: 45

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

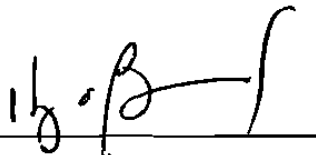
**Propósito y método del estudio:** En el ser humano el gen (hGH-N) de la hormona del crecimiento (HGH) forma parte de un complejo de genes en el cual también se encuentran tres genes del lactógeno placentario (hPL) y un quinto gen (hGH-V) que codifica para una variante placentaria de HGH. La HGH es una proteína globular de 191 aminoácidos y 22 kDa de masa, aunque existe otra isoforma de 20 kDa.

La deficiencia de HGH durante la niñez se manifiesta con una velocidad de crecimiento < 10% de lo normal o curva de talla corta con desviación mayor a 2.5 DS. Se han reconocido 4 formas de deficiencia aislada de hormona del crecimiento (DAHGH): la DAHGH IA y IB, la DAHGH II y la DAHGH III. Nosotros hemos reunido un grupo de pacientes diagnosticados con deficiencia aislada de HGH, en los cuales no se ha logrado identificar aún la causa de sus deficiencias. Para tratar de encontrar la causa de éstas, nos planteamos como objetivo localizar en dichos pacientes mutaciones puntuales y/o deleciones tanto en la región promotora, como en la región codificante del gen hGH-N.

Constituimos un banco de DNA de los pacientes con deficiencia de HGH y desarrollamos un nuevo método basado en la técnica de heteroduplex para la búsqueda de mutaciones, en las muestras del banco. Dicho método consiste en amplificar por PCR la porción del gen hGH-N que contiene tanto la unidad transcripcional como el promotor (2.1 kb) y luego el amplicón fue digerido con la enzima de restricción *Ava* II, la cual tiene 5 sitios de reconocimiento produciendo así 6 fragmentos de un tamaño adecuado. Esta técnica nos permite analizar en un producto amplificado grande el(los) sitio(s) de mutación(es) de manera aproximada, para luego proceder a su secuenciación.

**Contribuciones y Conclusiones:** De un total de 36 pacientes analizados, 11 fueron positivos. De éstos, 10 lo fueron para la región promotora y 2 simultáneamente para las regiones promotoras y codificantes. Se han secuenciado 4 zonas de heteroduplex de la región del promotor en 3 pacientes, obteniéndose polimorfismos previamente reportados para esta región. De igual manera en una de las muestras localizamos 2 cambios nucleotídicos que no han sido reportados en la literatura. Así mismo, encontramos una muestra en la que todo parece indicar que el gen hGH-N sufrió un evento de recombinación con el gen hPL-1, formándose un gen híbrido con la región promotora del primero y la región codificante del segundo. Concluimos que esta nueva metodología puede ser muy útil en la búsqueda de mutaciones y puede ser aplicada a otros casos en los cuales los productos amplificados son muy grandes para realizarles el análisis de heteroduplex de manera directa.

FIRMA DEL ASESOR: \_\_\_\_\_



## CAPITULO 1

## INTRODUCCION

## 1.1 El gen de la hormona del crecimiento humano

En el ser humano la hormona del crecimiento humano (HGH) esta codificada en el gen hGH-N, el cual forma parte de un complejo de genes entre los que también se encuentran los del lactógeno placentario (hPL) y un segundo gen (hGH-V) para una hormona parecida a la HGH, pero producida en la placenta. Este complejo multigénico hGH-hPL está compuesto por cinco genes muy similares en sus secuencias nucleotídicas y se localiza en la región q22-24 del cromosoma 17, donde ocupa una región aproximada de 66 500 pb, con el siguiente arreglo: 5'-hGH N- hPL1 - hPL2 - hGHV - hPL3-3' (figura 1) (2).

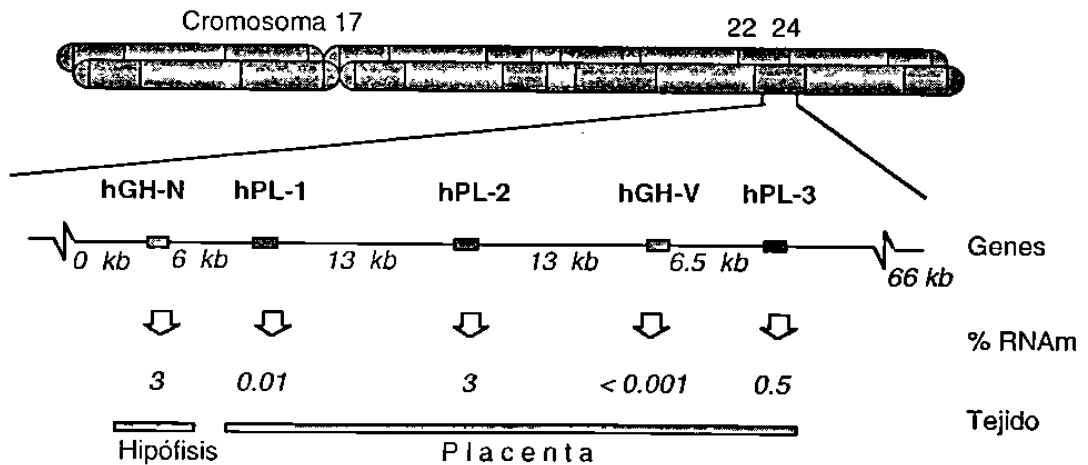


Figura 1. Anatomía de la familia multigénica hGH-hPL. Se muestra la disposición de cada gen, el tejido y nivel al que se expresan.

La HGH es una proteína globular de 191 aminoácidos y 22 kDa de masa. Aunque existen múltiples variantes de la hormona, las más abundantes son la HGH de 22 y la de 20 kDa. Mientras que la mayoría de las variantes resultan de las modificaciones post-traduccionales, las de 22 y 20 kDa representan isoformas, es decir productos directos del procesamiento alternativo de transcritos derivados del gen y no el resultado de dichas modificaciones (3, 4).

La HGH es sintetizada y almacenada por las células somatotropas de la hipófisis anterior que representan del 35% al 45% de la glándula hipofisiaria (15). La regulación neuroendócrina de la expresión de la HGH es ejercida por dos sistemas de control: uno positivo en el cual interviene el factor liberador de la hormona del crecimiento (GHRH), que es un péptido compuesto de 44 aminoácidos y cuya liberación pulsátil por el hipotálamo es la principal causa de la secreción de HGH por la pituitaria anterior; y un control negativo ejercido por el factor inhibidor de la HGH (GHIF) o somatostatina (SS), constituida por 14 aminoácidos y que igualmente es secretado por el hipotálamo (5). Recientemente se ha demostrado que la acción positiva de GHRH sobre la expresión del gen hGH-N, se ejerce induciendo la liberación de proteínas transactivadoras (factores transcripcionales) que se unen específicamente al promotor de dicho gen (6).

Los experimentos de interacción DNA-proteína con extractos de células hipofisiarias, han identificado algunas de estas proteínas transactivadoras como son: Sp1, USF, NF1 y AP-2, así como sus sitios de unión al DNA del promotor, tal y como se observa en la figura 2. También se ha purificado otro factor transcripcional, llamado Pit-1 (factor de transcripción específico de la pituitaria), que es el mayor potenciador no solo de la inducción de la expresión del gen hGH-N, sino también de los genes para la hormona prolactina (PRL) y para la hormona estimulante de la tiroides o TSH (7; 8. 9). Se ha establecido que el gen hGH-N posee dos secuencias en su promotor en donde se une Pit-1: una ubicada entre los nucleótidos -105 a -130 llamado Pit-1 distal y la otra entre los nucleótidos -65 a -92 pb llamada Pit-1 proximal (6, 10). Estudios recientes han demostrado alteraciones en la secuencia de este factor, que afectan su unión a los elementos promotores del gen hGH-N, eliminan su capacidad para inducir la transcripción y dan origen al desarrollo de patologías con las deficiencias combinadas de las hormonas PRL TSH y HGH (11, 12, 13, 14).

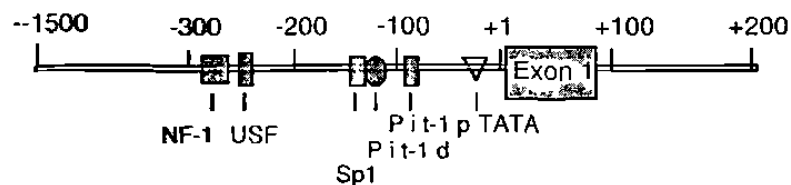


Figura 2. Secuencias reguladoras en el gen hGH-N. Se representan las principales regiones donde se unen los factores reguladores del promotor del gen hGH-N.

## 1.2 Acción biológica de la HGH

La función primaria de la HGH es la de promover el crecimiento y desarrollo postnatales, procesos que van acompañados de una gran variedad de efectos metabólicos, fisiológicos y anatómicos. Sin embargo, muchas de las funciones de HGH no son debidas a un efecto directo; trabajos en los que se añadió HGH a explantes de hígado demostraron efectos casi nulos de HGH. Sin embargo, la administración de HGH al animal produjo una marcada estimulación en la condrogénesis y un crecimiento acelerado (5, 15).

Con la identificación de algunas proteínas en el plasma, dependientes de la HGH, se observó la presencia de factores de crecimiento a los que se les llamó IGF-1 e IGF-II o también llamados somatomedinas, que son importantes mediadores de la acción de la HGH. Los niveles de estas proteínas son generados en respuesta a la misma HGH y altamente dependientes de los niveles que esta presenta en sangre. Los efectos de HGH se pueden clasificar en dos: indirectos y directos.

### Efectos indirectos de la HGH

Estimulación de crecimiento lineal.

### Efectos directos de la HGH

#### a) En el metabolismo de las proteínas.

- Estimula el transporte de aminoácidos a través de la membrana celular.
- Estimula la síntesis de proteínas por los ribosomas
- Estimula la transcripción de DNA para producir RNA
- Disminuye el catabolismo de las proteínas y de los aminoácidos

#### b) En el metabolismo de los carbohidratos

- Disminuye la obtención de glucosa
- Aumenta los depósitos celulares de glucógeno
- Disminuye la captación de glucosa por las células
- Aumenta la secreción de insulina y disminuye la sensibilidad a la misma

#### c) En el metabolismo de lípidos

- La HGH promueve la liberación de los ácidos grasos libres y del glicerol



Sin embargo, aunque la HGH estimula el crecimiento lineal en las etapas postnatales, no es un *estimulante primario en el crecimiento músculo-esquelético del feto*. Se ha observado que en las etapas fetales la HGH se empieza a sintetizar por la hipófisis fetal entre la séptima y novena semanas de gestación; aparece en el suero fetal hacia el final del tercer trimestre y sus niveles siguen incrementándose hasta alcanzar un máximo de 100 a 150 ng/ml en alrededor de la vigésima semana de gestación. A partir de entonces, los niveles promedio en el plasma fetal declinan hasta alcanzar cerca de 30 ng/ml al final del embarazo (16). Fetos anencefálicos o con aplasia de la glándula pituitaria, así como aquellos con ausencia del gen hGH-N, son de tamaños relativamente normales al momento del nacimiento, por lo que el inicio del retardo del crecimiento debido a deficiencias de HGH usualmente ocurre después del nacimiento.

Interesantemente, se ha observado que en las etapas fetales los niveles de IGF (I y II) se encuentran dentro de lo normal, lo que sugiere que la HGH no es obligatoria para la síntesis de IGF (17). También se ha establecido que en etapas fetales la HGH actúa como estimulante del crecimiento de los islotes pancreáticos y de la liberación de insulina. Además por técnicas inmunohistoquímicas, se ha observado en el feto la presencia de sus receptores en riñón, páncreas, hígado y cerebro fetal y la ausencia de los mismos en el sistema músculo-esquelético.

El entender la contribución de la HGH en la fisiología materna durante la gestación, resulta complicado por la presencia de por lo menos dos especies de HGH (productos de la expresión de los genes hGH-N pituitario y hGH-V placentario). Por técnicas de inmunoreactividad se ha observado un incremento constante en el suero materno de HGH total paralelo a la edad gestacional. Sin embargo con el uso de anticuerpos específicos, el componente representado por el producto del gen en la madre declina después de la vigésima primera o vigésima segunda semanas hasta volverse escasamente detectable al final del embarazo. Contrariamente, la cantidad de hGH-V secretada por la placenta al torrente sanguíneo de la madre se incrementa durante la gestación. El propósito fisiológico del reemplazo de la HGH hipofisiaria por la HGH placentaria en la circulación materna, aun no está claro (18).

### 1.3 Patologías relacionadas con la HGH

El sistema endócrino posee una amplia gama de acciones en el individuo y por ende las patologías que se desarrollan causan manifestaciones clínicas muy variadas. Sin embargo se pueden definir cuatro amplias categorías de trastornos endócrinos: la producción subnormal de hormonas, la sobreproducción hormonal, la resistencia a la acción hormonal y anomalías hormonales múltiples. Bajo esta clasificación se han establecido cuadros clínicos con sus causas bien definidas. Este trabajo se centra en la deficiencia aislada de HGH.

### 1.4 Deficiencia aislada de HGH (DAHGH)

Existe una gran variedad de factores que están asociados al desarrollo de corta estatura en individuos que presentan anomalías en la secreción de la HGH. Muchos de los casos son esporádicos y presumiblemente secundarios a una gran variedad de causas, como defectos o daños del sistema nervioso central (edema cerebral, infecciones congénitas, virosis, traumatismos, tumor etc.). Además, están también asociados con una gran variedad de defectos del desarrollo (anencefalia, hidrocefalia, etc) (19).

La deficiencia de HGH durante la niñez se manifiesta con curvas de crecimiento que se desvían progresivamente de lo normal con una velocidad de crecimiento  $< 10\%$  de lo normal o curva de talla con desviación mayor a 2.5 DS, con un rango de estatura corta. Muchos de ellos desarrollan una obesidad troncal y sus facies son más juveniles que las correspondientes a su edad cronológica. Además pueden desarrollar deficiencias de otras hormonas hipofisarias.

No existen pruebas que establezcan la presencia o ausencia de deficiencia de HGH con un 100% de efectividad. Generalmente, la medición de los niveles de esta hormona es efectuada por radioinmunoensayo (RIA). Las pruebas más frecuentemente usadas incluyen la estimulación de la secreción de HGH por medio de ejercicio o por la administración de arginina, L-dopa, clonidina o hipoglucemia inducida por insulina humana. Se puede establecer una deficiencia de esta hormona cuando los niveles de respuesta son menores de 7 ng/ml, esto después de haber aplicado dos o más pruebas estimuladoras. Niveles de 7-15 ng/ml son compatibles con una deficiencia parcial de HGH y niveles mayores de 15 ng/ml excluyen completamente la deficiencia de la hormona. Además de la concentración de hormona, los pacientes también son evaluados tomando en cuenta la edad ósea, la ausencia exclusiva de HGH y el retraso en la tasa de crecimiento correspondiente a la edad del individuo. (6)

Phillips y Cogan (20) identificaron 4 formas de deficiencia aislada de HGH (DAHGH), que se diferencian en base a su modo de herencia y severidad o a la respuesta de los individuos afectados al tratamiento por reemplazamiento hormonal con la versión recombinante de la HGH (HGHR).

#### **1.4.1 Deficiencia aislada de HGH tipo 1A (DAHGH Tipo 1-A)**

Illig (21) observó una posible forma distinta de DAHGH. Todas las características son más severas que en la mayoría de los casos y pueden tener una tendencia exagerada a formar anticuerpos contra la HGHR administrada, lo cual invalida la terapia. Los pacientes pueden ser algunas veces pequeños desde el nacimiento y puede presentarse un enanismo más acentuado en otros casos. Phillips y cols (22) demostraron que los pacientes con la DAHGH heredada de manera autosómica recesiva monta una respuesta inmune contra la HGHR (21, 23) y es causada por la delección del gen hGH-N (24, 25, 26).

La similitud y relativamente alta frecuencia de las delecciones del gen hGH-N, sugieren que en el DNA del complejo existen secuencias en los flancos de este gen que lo predisponen a eventos de recombinación que conducen a su delección. Estos eventos son facilitados tanto por el alto grado de secuencias homólogas entre los genes del complejo, como por la presencia de un gran número de secuencias repetidas de la familia *Alu* en el mismo (2, 27).

#### **1.4.2 Deficiencia aislada de HGH tipo 1B (DAHGH Tipo 1-B)**

La DAHGH tipo 1-B presenta un modo de herencia autosómico recesivo; se caracteriza por la producción deficiente de la HGH pero detectable al momento de provocar el estímulo. Además no se presentan anticuerpos anti-HGH después del tratamiento con HGHR, lo que contrasta con el tipo 1-A. Sin embargo, estudios por "Southern Blot" del DNA de individuos afectados con DAHGH tipo 1B, no muestran delección alguna en el gen hGH-N.

El criterio clínico para el diagnóstico de DAHGH-1B incluye la respuesta acelerada al tratamiento de HGH exógena, además la ausencia de formación de anticuerpos anti-HGH exógena. Esto sugiere que la secreción mínima de HGH endógena retenida por los individuos afectados previene la producción de anticuerpos (6). Este tipo de deficiencia es causada por mutaciones en sitios de splicing las cuales son responsables de los niveles bajos pero detectables de HGH (16).

### 1.4.3 Deficiencia aislada de HGH tipo II (DAHGH Tipo II)

La DAHGH II se hereda de manera autosómica dominante y es causada por una mutación en un sitio de splicing produciendo una mutación negativa dominante. La severidad clínica es variable entre familiares, los pacientes están propensos a desarrollar hipoglicemia y usualmente responden bien a la HGH exógena (28).

### 1.4.4 Deficiencia aislada de HGH tipo III (DAHGH Tipo III)

La DAHGH Tipo III presenta un modo de herencia recesivo ligada al cromosoma X. Los pacientes pueden presentar hipogammaglobulinemia (deficiencia de IgG, IgH, IgM y IgE), además de una respuesta deficiente a la HGHr. El tratamiento con HGHr está asociado con un incremento de linfocitos B y altos niveles de IgA, IgM e IgE en estos pacientes, mientras que en otras formas de deficiencia aislada de HGH, el tratamiento con HGH exógena está asociado con una disminución de los linfocitos B. Se ha descrito que mutaciones en el gen *btk* (el cual codifica para una proteína de 659 aminoácidos que tiene actividad de tirosin cinasa) alteran el splicing correcto de esta proteína, produciendo hipogammaglobulinemia y DAHGH. (29, 30, 31)

## 1.5 Métodos de detección de mutaciones.

Definitivamente el estándar de oro para detectar mutaciones es la secuenciación, que permite el análisis de toda la secuencia nucleotídica; sin embargo para fines de escrutinio de poblaciones es poco práctica ya que requiere de una gran infraestructura y es costosa. Existen métodos rápidos de rastreo de mutaciones como la prueba de la proteína truncada (PPT) que identifica mutaciones que resultan en una proteína más corta de lo normal. El análisis con oligonucleótidos alelo-específicos (ASO) y el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) son muy útiles pero tienen la desventaja de que sólo pueden hacerse con fragmentos pequeños de DNA, mientras que el análisis de heteroduplex detecta cadenas constituidas por una cadena sencilla proveniente de un alelo normal, apareada con una cadena opuesta del otro alelo, el mutado, por lo que su registro de puentes de hidrogeno es imperfecto, estas moléculas muestran una migración anormal en geles nativos cuando se comparan con los homoduplex. Técnicamente es un procedimiento sencillo en el cual los productos amplificados obtenidos por PCR se desnaturalizan a 95°C para separar las cadenas de DNA; esto va seguido de un paso de enfriamiento lento hasta alcanzar la temperatura ambiente, con lo que se induce la formación de heteroduplex. El fragmento del producto amplificado se resuelve por electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Finalmente la detección del DNA se puede realizar por tinción con bromuro de etidio o con plata. Nosotros decidimos implementar esta última técnica por su sencillez y su grado de sensibilidad para el análisis de mutaciones.



### 1.6 Hallazgos en el gen hGH-N.

En la búsqueda de mutaciones en la región promotora del gen hGH-N que pudieran afectar la expresión del este gen, se han realizado algunos trabajos en los cuales se ha secuenciado dicha región (32), pero solo se han localizado numerosos polimorfismos, los cuales se presentan en la tabla I.

Sitio	N	C	C	Sitio	N	C	C
-1078	c	c	g	-136	a	g	g*
-1076/7	gg	del	c	-118	g	t	t*
-1075	t	c*	c	-93/4	-	del g*	ins g
-537	g	del	del*	-68	a	g*	g
-425	g	t*		-63	a	t*	
-400	g	del*	del	-47	a	g*	
-369	t	g	g*	-40	c	c*	
-362	t	g	g*	-38	a	c*	
-339	g	t	t*	-4	g	t	
-333 a 337	ccag a	smrrr		+76	g	t*	
-229	t	c*		+219	t	c*	

N: Secuencia normal

C: Cambio en la secuencia

\*: Cambio heterocigoto

smrrr: s= g:c het, m= a:c het, r= g:a het.

Además del rastreo de mutaciones en la región promotora, también se han realizado trabajos buscando mutaciones en la región codificante, Cogan y cols. (33) reportaron el hallazgo de dos mutaciones en esta región, una transición G por A en el codón 20 del péptido señal que convierte una codón TGG (que codifica para el aminoácido triptofano) en TAG (que es un codón de terminación) produciendo una proteína truncada. También reportaron una transversión G por C que altera la primera base del sitio donador de splicing del intrón IV. Esta substitución podría perturbar el splicing correcto del RNAm produciéndose una proteína alterada, la cual podría ser inestable o bioinactiva.

Binder y cols. (34) describieron el hallazgo de transcritos producidos por un splicing alternativo, y que incluyen una deleción de 45 pb del exón 3, la deleción completa del exón 3 y un tercer evento que no había sido previamente descrito y que involucra la deleción de los exónes 3 y 4. Mediante secuenciación del DNA genómico encontraron que la causa de este splicing alternativo es una mutación que produce un cambio de G a C la primera base del sitio donador de splicing del intrón III. Los pacientes con esta mutación presentaron un retardo en el crecimiento muy severo y niveles muy bajos de HGH en suero, debido a esto se asume que este defecto genético produce un efecto negativo dominante.

En vista de lo anterior, al contar con un grupo de pacientes diagnosticados con DAHGH, que en estudios previos en nuestro laboratorio resultaron negativos para la deleción de la unidad transcripcional del gen hGH-N, así como otros más reclutados durante el desarrollo del presente trabajo y en los que tampoco se conoce la causa de su DAHGH, en el presente trabajo nos propusimos realizar una búsqueda de mutaciones tanto en la región promotora como en la codificante del gen hGH-N que pudieran estar involucradas en el origen de este padecimiento para ello nos planteamos el siguiente objetivo general.

## 1.7 Objetivo general

Desarrollar una estrategia experimental para localizar mutaciones puntuales y/o deleciones tanto en la región promotora como en la región codificante del gen hGH-N y aplicarla al estudio de pacientes con deficiencia de HGH.

### 1.7.1 Objetivos específicos

1. Diseñar un oligonucleótido específico para la amplificación del gen hGH-N
2. Ampliar el banco actual del laboratorio de Medicina Molecular de la ULIEG de DNA leucocitario de pacientes con deficiencia de HGH.
3. Amplificar por PCR el gen hGH-N a partir de los DNAs del banco.
4. Cuando el amplicón sea mayor del tamaño ideal para el análisis de heteroduplex, probar si enzimas de restricción permiten dividir el amplicón y detectar los heteroduplex posibles.
5. Con el producto amplificado, efectuar un rastreo de mutaciones tanto en el promotor como en la región codificante del gen, utilizando la técnica de análisis de heteroduplex.
6. Secuenciar los productos amplificados de los pacientes que presenten bandas anormales en el análisis por heteroduplex.

## CAPITULO 2

### MATERIALES

#### 2.1.1 Origen de los reactivos y materiales utilizados

##### Insumos biológicos.

En este estudio se utilizaron muestras de sangre de pacientes diagnosticados con deficiencia aislada de HGH. Para la recolección de las muestras se contó con la colaboración del Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario "Dr. José E. González" y del Departamento Clínico de Endocrinología Pediátrica, Centro Médico Nacional "La Raza" México D.F.

##### Criterios de inclusión.

Los criterios de inclusión para realizar los estudios en los pacientes fueron los siguientes:

- Retraso severo del crecimiento, tomando como parámetros la estatura y el peso.
- Retraso en la edad ósea.
- Cariotipo normal.
- Niveles de HGH por debajo de 7 ng/ml
- Valores de las otras hormonas hipofisiarias normales.

##### Reactivos químicos.

Los iniciadores de la PCR se sintetizaron en el laboratorio de Química Biomolecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas de la Facultad de Medicina y se tomaron de la oligoteca del mismo laboratorio.

##### Enzimas.

La DNA polimerasa Taq fue adquirida de Promega (Madison, WI, EUA) y las endonucleasas de restricción fueron compradas a New England Biolabs (NEB, Beverly, MA E.U.A.).

## Material.

Los tubos para microcentrífuga de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ml y las puntillas de las micropipetas fueron comprados a Cel Associates (Houston, TX, EUA), los tubos de 15 y 50 ml fueron comprados a Falcon y Becton Dickinson (New Jersey E.U.A.). También se utilizaron guantes de latex Première (Ormond Beach, FL, E.U.A.) y las pipetas de precisión de 2, 20, 200 y 1000 µl fueron de Rainin Instruments (Woburn, MA, E.U.A.).

## Equipo.

Fue utilizada la centrifuga Centra MP4R de IEC (Needham Heights, MA, E.U.A.), cámaras de electroforesis horizontales Fotodyne (Hartland, WI, E.U.A.) y una fuente de poder BRL modelo 250 (Gaithersburg, MD, E.U.A.). También se utilizó un termociclador automatizado minicycler™ de la compañía MJ Research (Watertown, MA, E.U.A.), una campana de flujo laminar marca Labconco Corporation (Missouri, KC, E.U.A.). Otros equipos utilizados fueron microcentrífuga Eppendorf modelo 5402 (Hamburg, Germany), placa agitadora con control de temperatura Thermolyne cimarec 2 (Dubuque, Iowa, USA), ultracongelador So-Low de Enviromental Equipment (Cincinnati, OH, E.U.A.), báscula digital Sartorius 1206 MP (Camibh, Göttingen, Germany), baño de temperatura Precision® modelo 181 de Precision Scientific inc. (Chicago, Illinois, USA), potenciómetro Orion modelo 520A de Orion Research inc. (Boston, USA), un agitador Maxi Mix II Thermolyne tipo 37600 (Dubuque, Iowa, USA), un transiluminador de luz ultravioleta marca Fotodyne modelo Photo//Phoresis I (New Berlin, WI, E.U.A.), un horno de microondas marca GoldStar Co. Ltd. (Seoul, Corea), equipo para digitalización de imagenes Gel Doc 1000 (Bio-Rad; Hercules CA) y un equipo para secuenciación GenomixLR™ (Genomix Co, Foster City CA)

El procesamiento de datos fue realizado en las computadoras modelo; Macintosh Power PC (Apple Computer, Inc.; Cupertino, California. EUA). Los periféricos compatibles utilizados: Modem Global Village Communication Inc. modelo Teleport/Silver A801 (East Middlefield Road Mountain View Ca. EUA); digitalizador de imágenes de cama plana UMAX data System Inc. modelo UC630 MaxColor (Industrial Park Hsinchu Taiwan, R.O.I.).

El procesador de textos utilizado fue; *Microsoft Word* versión 5.1a (© 1987-1992 Microsoft Corporation), procesadores de gráficos *Microsoft PowerPoint* Versión 3.0 (© 1987-1992 Microsoft Corporation), *Adobe Photoshop Limited Edition 2.5.1* (© 1989-1993 Adobe Systems Incorporated).

Los programas de análisis en biología molecular fueron; *Amplify* Versión 1.2b (Bill Engels ©1992 University of Wisconsin Genetics M. Madison, Wi. EUA), *DNA Strider*™ 1.1 (© Ch. Marck and C.E.A 1989 Service de Biochimie-Départemet de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), *OLIGO*. Ver 4.0 (© 1992, Plymouth, Mn, EUA) y *Molecular Analyst*® (Bio-Rad, Hercules CA)

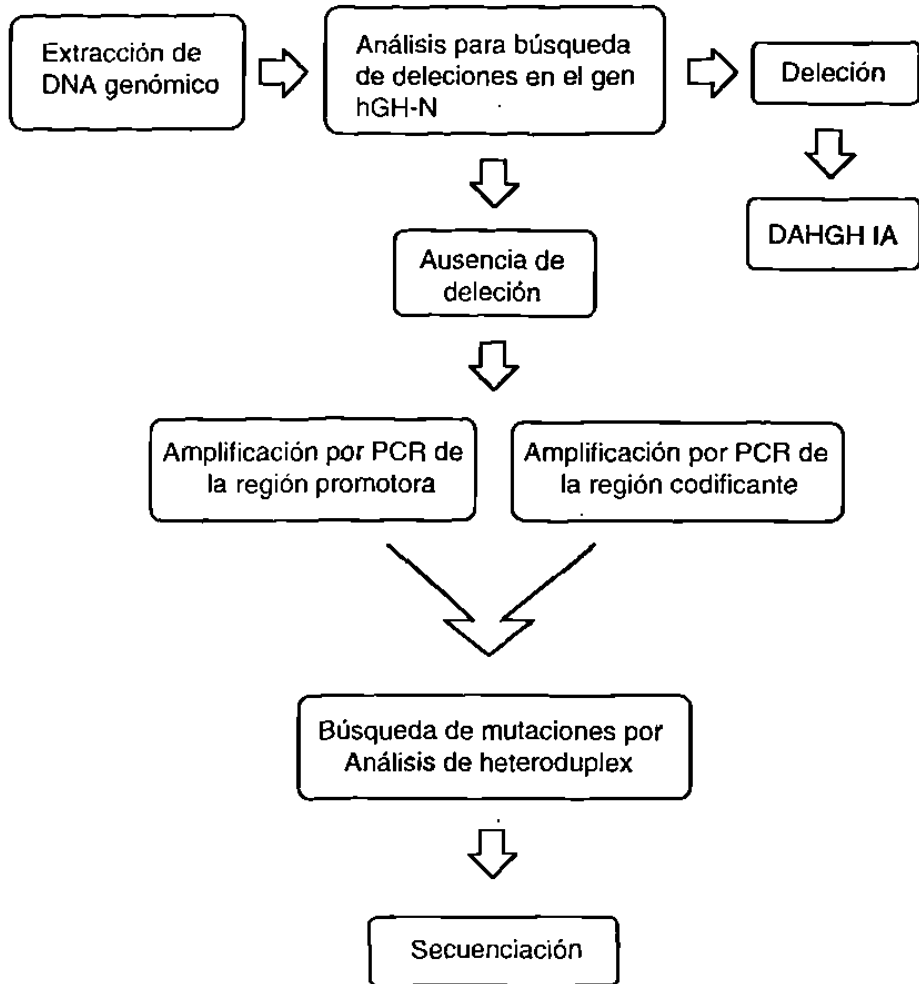
## METODOS

### 2.2.1 Estrategia general.

Para cumplir con los objetivos planteados se diseñó y se realizó la estrategia general esquematizada en la figura 3.

1. A partir de sangre periférica de pacientes con DAHGH se realizó la extracción de DNA genómico mediante la técnica de TSNT.
2. Una vez realizada la extracción de DNA se realizó la búsqueda de deleciones en el gen hGH-N, si resultaba positiva el paciente se diagnosticaba como DAHGH tipo IA, si resultaba negativa para este análisis se procedió a la búsqueda de mutaciones tanto en la región promotora como en la codificante.
3. Utilizando un oligonucleótido específico para el gen hGH-N se amplificó tanto la región promotora como la codificante para realizar la búsqueda de mutaciones por la técnica de análisis de heteroduplex.
4. Finalmente se secuenció la región que resultó positiva para el análisis de heteroduplex.





**Figura 3. Estrategia general.** El esquema ilustra la estrategia para cumplir los objetivos planteados en este trabajo.

### 2.2.2 Extracción del DNA genómico

Para la extracción del DNA genómico se utilizó la técnica de TSNT, la cual se describe a continuación:

1. Colocar 2 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA en un tubo Falcon de 15 ml y centrifugar 1 minuto a 3000 rpm para separar el plasma y descartarlo.
2. Añadir al paquete celular 800  $\mu$ l de buffer de lisis TSNT y mezclar en vortex.
3. Agregar 2 ml de fenol saturado, mezclar en vortex.
4. Agregar 400  $\mu$ l de SEVAG, agitar en el vortex 5 minutos.
5. Añadir 800  $\mu$ l de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH= 8.0) mezclar.
6. Centrifugar 20 minutos a 10 000 rpm y transferir la fase acuosa a otro tubo Falcon de 15 ml.
7. Precipitar el DNA agregando 2.5 vol de etanol absoluto. Mezclar lentamente por inversión hasta observar la precipitación del DNA en forma de una hebra blanca.
8. Centrifugar 20 minutos a 10 000 rpm, decantar el sobrenadante teniendo cuidado de que no se desprenda la pastilla de DNA.
9. Lavar con 1 ml de etanol al 70%, centrifugar, descartar el etanol y dejar secar.
10. Resuspender el DNA en un volumen de TE dependiente del tamaño de la pastilla, pero de aproximadamente 500  $\mu$ l.

Para verificar la integridad y estimar la cantidad de DNA extraído se colocó 1  $\mu$ l del volumen en un gel de agarosa al 0.8 %. El DNA se sometió a electroforesis a 100 V durante 1 hora, sumergiendo después el gel en una solución con bromuro de etidio 2  $\mu$ g/ml para su análisis posterior bajo luz ultravioleta.

#### Diagnóstico de DAHGH tipo IA

El primer paso en el tamizaje de las muestras era la búsqueda de deleciones del gen hGH-N, lo cual resultaría en el diagnóstico de una deficiencia de tipo IA. Para la búsqueda de mutaciones en el gen hGH-N se siguió la metodología descrita por González-Rodríguez y cols (35).

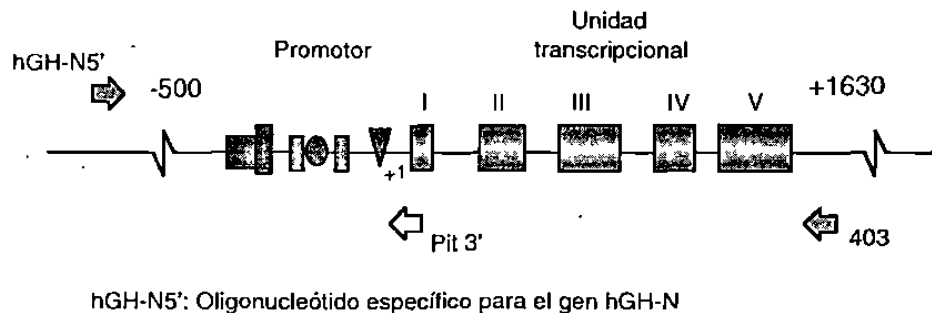
### 2.2.3 Amplificación del gen hGH-N

Para realizar la amplificación por PCR de la región promotora y la región codificante del gen hGH-N en el laboratorio solo se contaba con oligonucleótidos consenso que permitían la amplificación de todos los genes del locus hGH-hPL, estos oligonucleótidos cuya secuencia se muestra a continuación:

403 5'-ccgaattccaggagagcactgggga-3'

Pit3' 5'-tttacggccgcttacctgtagccat-3'

Se aparean al final del quinto exón (403) y en el sitio de inicio de la transcripción (Pit3'), ambos iniciadores se aparean en el extremo 3' de la doble cadena de DNA (figura 4). Debido a esto se necesitaba un oligonucleótido específico para el gen hGH-N que se apareara al extremo 5', por tal motivo se diseñó un oligonucleótido que se apareara específicamente en la región promotora del gen hGH-N como se observa en la figura 4, lo cual se realizó como se describe a continuación.



**Figura 4. Sitio de apareamiento de los oligonucleótidos.** El esquema muestra los sitios de apareamiento para los oligonucleótidos consenso (Pit 3' y 403) y el sitio aproximado donde debería de aparearse el oligo específico para el gen hGH-N diseñado y denominado en este trabajo como hGH-N5'.

#### 2.2.3.1 Diseño de oligonucleótidos.

Con base en la secuencia reportada por Chen y cols. (2) se realizó un alineamiento de los promotores de los 5 genes del locus hGH-hPL y se localizó una región en la cual las diferencias entre las secuencias permitieran la amplificación específica del gen hGH-N. Una vez localizada la región se utilizaron los programas computacionales Oligo 4.0 (cálculo de Tm, formación de estructuras secundarias y dímeros de oligonucleótidos) y Amplify 1.0 (simulación de la PCR) para diseñar el oligonucleótido específico.

### 2.2.3.2 Amplificación por PCR de la región promotora

La PCR fue estandarizada utilizando DNA plasmídico, el cual contiene la región de interés, la estandarización se realizó ajustando los parametros más importantes de la reacción como la concentración de  $Mg^{+2}$  y la temperatura de apareamiento. Las condiciones finales se muestran en la tabla II.

Reactivo:	Volumen ( $\mu$ l):	Conc. final:
H <sub>2</sub> O milliQ	15.8	
DNA	1 $\mu$ l	200 ng
Iniciador pit 3'	2.5	0.5 $\mu$ M
Iniciador hGH-N 5'	2.5	0.5 $\mu$ M
dNTP's (10 mM)	0.5	200 $\mu$ M
Buffer DNA pol Taq (10X)	2.5	1X *
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2	2 mM
DNA pol Taq (5 U/ $\mu$ l)	0.2	0.04 U/ $\mu$ l
Volumen final=	25 $\mu$ l	

\* 50 mM KCl, 10 Mm Tris-HCl pH=9 y 0.1 % Triton X-100.

Las condiciones de tiempo y temperatura para llevar a cabo la reacción de PCR se muestran en la tabla III.

Paso	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo
1 ciclo	94	5 min
30 ciclos	94	30 seg
	55	1 min
	72	1 min
1 ciclo	72	5 min

Para verificar la amplificación se colocaron 5  $\mu$ l del producto amplificado en un gel de agarosa al 1.5%, en el cual también se colocó el marcador de peso molecular pUC 18 digerido con *A*lu I y se sometieron a electroforesis a 100 V durante 1 hora, sumergiendo después el gel en una solución con bromuro de etidio 2  $\mu$ g/ml para su análisis bajo luz ultravioleta.

### 2.2.3.3 Análisis de heteroduplex.

#### 2.2.3.3.1 Desnaturalización de los productos amplificados

En un tubo eppendorf de 500  $\mu$ l se desnaturalizó el volumen correspondiente a 200 ng de producto amplificado (2  $\mu$ l) incubándolo a 95°C por 10 minutos en el termociclador.

#### 2.2.3.3.2 Incubación

Inmediatamente después de la desnaturalización, el producto amplificado se incubó a 37°C durante 6 horas.

#### 2.2.3.3.3 Preparación del gel de poliacrilamida de alta resolución (MDE).

La preparación del gel de poliacrilamida se muestra en la tabla IV.

Tabla IV. Preparación del gel MDE	
Reactivos	Volumen
Sol. MDE 2 X	15 ml
TBE 10 X	15 ml
Persulfato de amonio 10%	600 $\mu$ l
TEMED	60 $\mu$ l

La mezcla se vació sobre vidrios de 20 x 20 cm con separadores de 1 mm de espesor y se dejó polimerizar por un lapso de 1 hora.

#### 2.2.3.3.4 Electroforesis

Una vez terminado el periodo de incubación se centrifugaron los tubos ligeramente y se colocó todo el volumen para su corrimiento más 1  $\mu$ l de jugo azul 6X junto con el marcador de peso molecular pUC18 + *Hae* III. Las muestras se sometieron a electroforesis a 250 V durante 12 horas a una temperatura de 12°C. Para detectar la formación de las bandas de heteroduplex el gel se sumergió en una solución con bromuro de etidio 2  $\mu$ g/ml para su análisis bajo luz ultravioleta con el equipo Gel Doc 1000 de BioRad.

### 2.2.3.4 Amplificación por PCR de la región codificante

Para la amplificación específica de la región codificante del gen hGH-N utilizamos el oligonucleótido hGH-N5', el cual se aparee de manera específica a la región promotora del gen hGH-N y el oligonucleótido 403 el cual se aparee más allá del quinto exón de este gen, amplificando un total de 2155 pb (ver figura 4). Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla V.

Tabla V. Reacción de PCR para las regiones promotora y codificante

Reactivo:	Volumen ( $\mu$ l):	Conc. final:
H <sub>2</sub> O milliQ	33.6	
DNA	1 $\mu$ l	200 ng
Iniciador 403	1	0.5 $\mu$ M
Iniciador hGH-N 5'	3	0.3 $\mu$ M
dNTP's (10 mM)	1	200 $\mu$ M
Buffer DNA pol Taq (10X)	5	1X *
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4	2 mM
DNA pol Taq (5 U/ $\mu$ l)	0.2	0.04 U/ $\mu$ l
Volumen final=		25 $\mu$ l

\* 50 mM KCl, 10 Mm Tris-HCl pH=9 y 0.1 % Triton X-100

Las condiciones de tiempo y temperatura para llevar a cabo la PCR se muestran en la tabla VI.

Tabla VI. Condiciones de amplificación

Paso	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo
1 ciclo	94	5 min
30 ciclos	94	30 seg
	65	1 min
	72	1 min
1 ciclo	72	5 min

Para verificar la amplificación se colocaron 5  $\mu$ l del producto amplificado en un gel de agarosa al 1.5%, en el cual también se colocó el marcador de peso molecular DNA lambda + *Pst* I y se sometieron a electroforesis a 100 V durante 1 hora, sumergiendo después el gel en una solución con bromuro de etidio 2  $\mu$ g/ml para su análisis bajo luz ultravioleta.

#### 2.2.3.4.1 Digestión con la enzima *Ava* II

Debido a que el tamaño del producto amplificado es de 2 155 pb y es demasiado grande para someterlo a un análisis de heteroduplex, se procedió a digerir con la enzima *Ava* II, la cual tiene 5 sitios de reconocimiento en el producto amplificado produciendo 6 bandas a las que se les realizó el análisis de heteroduplex. Las condiciones de la reacción de digestión se muestran en la tabla VII.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
Producto amplificado	15
H <sub>2</sub> O milliQ	-
Buffer (10X)	1.7
<i>Ava</i> II (10 U/ $\mu$ l)	0.3
Volumen final	17

Las muestras se incubaron a 37° C durante 3 horas.

#### 2.2.3.4.2 Análisis de heteroduplex.

El análisis de heteroduplex se realizó sometiéndolo al volumen total de la digestión al mismo procedimiento descrito en el punto 3.2.3.3

### 2.3 Clonación de la región promotora del gen hGH-N

Para realizar la secuenciación de las muestras positivas por heteroduplex fue necesario clonar la región promotora de las muestras que resultaron positivas para la formación de heteroduplex. Esto se realizó de la siguiente manera: se utilizó el vector pBShGH-N previamente construido en la ULIEG, portador de la región codificante del gen hGH-N. Como primer paso se realizó una digestión preparativa tanto del vector como del inserto (producto amplificado de la región promotora) con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I tal y como se indica en la tabla VIII.



Tabla VIII. Digestión preparativa para la clonación

Reactivo	Producto amplificado	Vector
	Volumen ( $\mu$ l)	Volumen ( $\mu$ l)
DNA	10 $\mu$ l	1
Buffer 10X	1.5 $\mu$ l	1
Agua MQ	2.5	7
Enzimas	1.0*	1.0*
Vol. final	15	10

\* Se añadieron 0.5  $\mu$ l de *Bam*H I y 0.5  $\mu$ l de *Xba* I.

Una vez realizada la mezcla de reacción se incubaron a 37°C durante 2 horas, se colocó el volumen total de la reacción en un gel de agarosa al 1.0% y se sometieron a electroforesis a 100 V durante una hora. Posteriormente se sumergió en una solución de bromuro de etidio 2  $\mu$ g/ml y se dejó 5 minutos. Las bandas de interés fueron cortadas y se purificaron mediante el kit comercial Gene Clean (BioRad) y el procedimiento es el siguiente:

1. En un tubo eppendorf de 1.5 ml se colocó un trozo de gel de agarosa que contenía el fragmento de interés y se agregaron 450  $\mu$ l de solución de NaI y 50  $\mu$ l de "TBE modifier" (según las instrucciones del proveedor).
2. Se incubó a 50°C durante 5 minutos o hasta que la agarosa se hubiera fundido completamente.
3. Una vez fundida la agarosa se añadieron 10  $\mu$ l de "Glassmilk" (según las instrucciones del proveedor), se mezcló cuidadosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 5 segundos para formar una pastilla.
5. La pastilla se lavó tres veces con solución "New wash" centrifugando 5 segundos entre cada lavado.
6. Finalmente el DNA unido a la sílica se eluyó con 10  $\mu$ l de TE IX y se almacenó a -20°C.

Una vez realizada la purificación tanto del vector como del inserto, se procedió a la reacción de ligación, la cual se realizó como se indica en la tabla IX.

Tabla IX. Reacción de ligación	
Reactivo	Volumen
Vector	1.5 $\mu$ l
Inserto	5 $\mu$ l
Buffer 5X	1 $\mu$ l
Agua MQ	1.5
Ligasa	1.0
Vol. final	10 $\mu$ l

La reacción de ligación se llevó a cabo a 16°C toda la noche , posteriormente se procedió a la transformación en células calcio competentes y caracterización de las clonas obtenidas.

#### 2.4 Secuenciación

Para la secuenciación se utilizó el kit comercial "Amplicycle™" de la compañía Perkin Elmer utilizando las condiciones especificadas por el proveedor. Los productos marcados con  $^{32}\text{P}$  fueron resueltos en un gel de poliacrilamida al 6% en el equipo para secuenciación "GenomixLR™" y después de exponer el gel en película sensible se determinó la secuencia de la muestra.

## CAPITULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Diseño del oligonucleótido específico para el gen hGH-N

Para el diseño de un oligonucleótido específico para la región promotora del gen hGH-N se utilizaron los programas computacionales antes mencionados, mediante los cuales es posible seleccionar el área más idónea para que el oligonucleótido se una solo a la secuencia blanco. Debido a que los 5 genes del locus hGH-hPL son muy similares entre sí, fué necesario encontrar una zona donde las diferencias entre ellos hicieran posible la amplificación específica del gen hGH-N. Esto se logró alineando las secuencias nucleotídicas de estos genes utilizando el programa Clustalw 1.5 y localizando una zona (fig 5a) donde existen diferencias. El iniciador se diseñó sobre esta zona, de tal manera que su extremo 3' corresponda a una base presente unicamente en la secuencia del gen hGH-N. El último nucleótido (3') del iniciador es de suma importancia debido a que se debe de aparear para que la DNA polimerasa empiece a extenderlo copiando la cadena molde. En un alineamiento de la secuencia del oligonucleótido a la secuencia blanco (fig 5b), destaca un cambio de una base en el oligonucleótido, mismo que permitió introducir un sitio de reconocimiento (tctaga) para la enzima de restricción *Xba* I, lo cual permitiría clonar con mayor facilidad el producto amplificado en caso de que fuera necesario. Finalmente se probó este oligonucleótido en el programa Amplify 1.1, el cual simula una reacción de PCR. Este programa fue alimentado con las secuencias de los 5 genes de locus produciendo amplificación solamente en la secuencia correspondiente al gen hGH-N, comprobando su especificidad teórica, de igual manera no se observó la formación de bandas inespecíficas o dímeros de oligonucleótidos. En la figura 5c se puede observar el tamaño del fragmento que se amplifica mediante el programa Amplify 1.1. La secuencia del oligonucleótido diseñado es la siguiente:

hGH-N5' = 5'-ttggttctctctagaggtcagtgttgga-3'

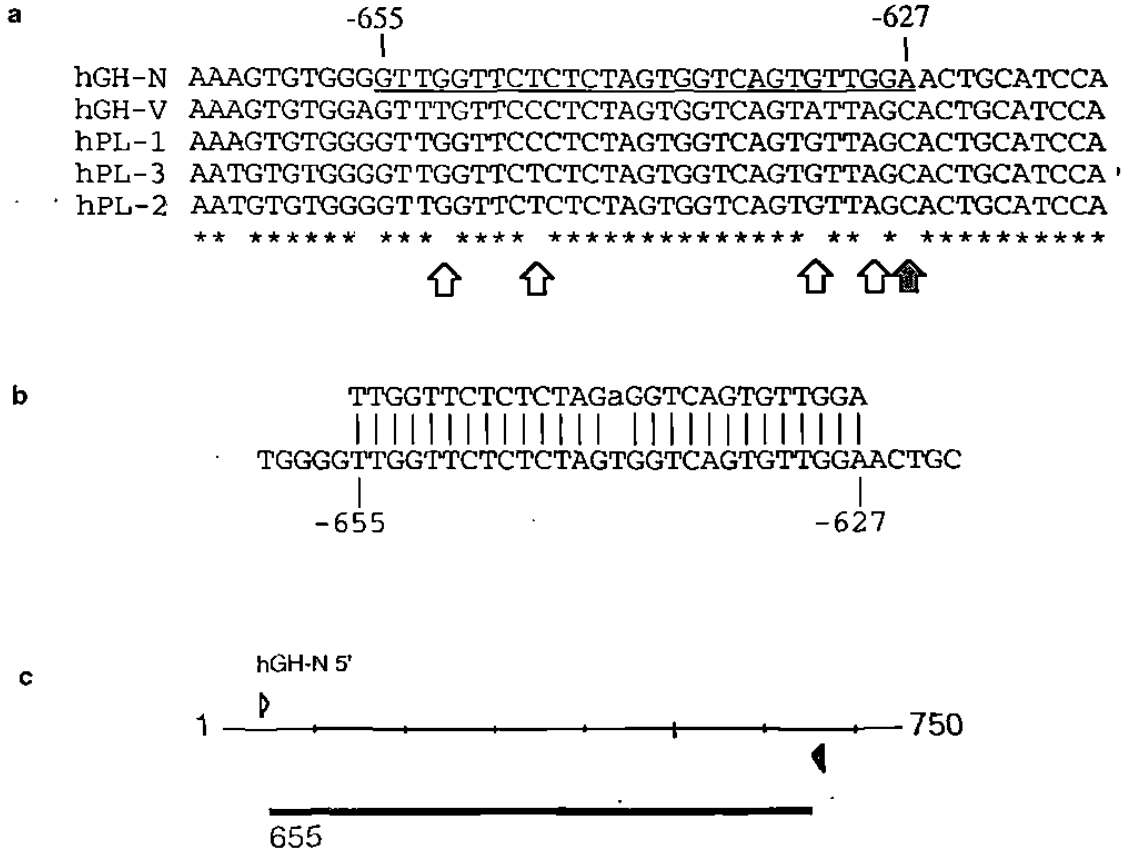
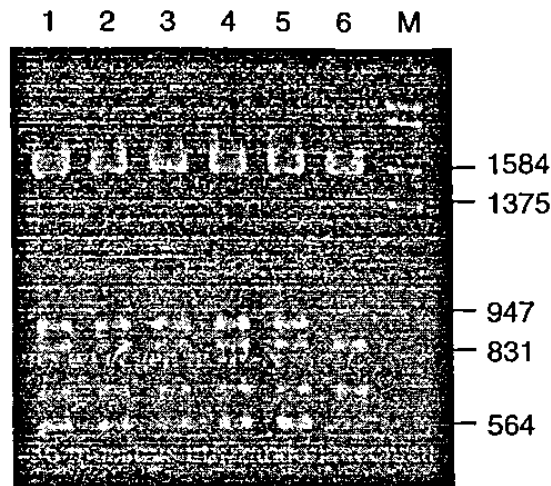


Figura 5: Datos obtenidos durante el diseño del oligonucleótido específico para el gen hGH-N. En (a) se observa el alineamiento de los 5 genes de locus hGH-hPL y se muestran las diferencias que dan la especificidad al oligonucleótido. En (b) se ejemplifica el alineamiento del oligonucleótido a la secuencia específica, nótese el cambio de una base en la secuencia que introduce un sitio de restricción para la enzima *Xba* I. En (c) se muestra un esquema del programa Amplify 1.1 que muestra el tamaño del producto amplificado y no reporta la presencia de inespecificidades o formación de dímeros de oligonucleótidos.

### 3.2 Búsqueda de deleciones en el gen hGH-N

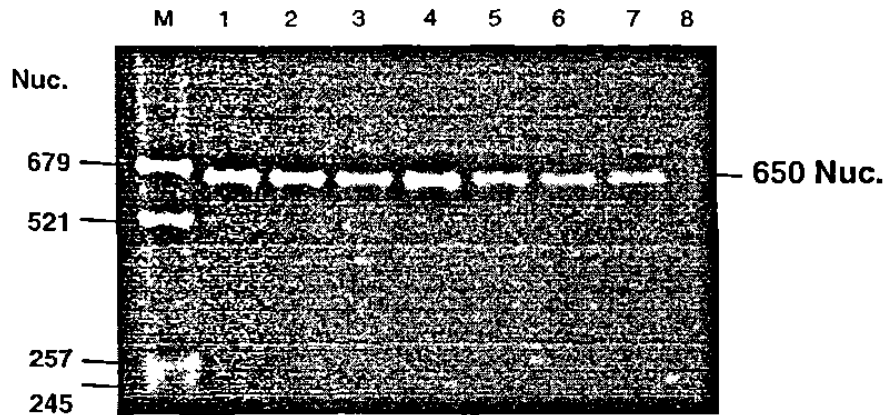
Se analizaron un total de 36 muestras utilizando la técnica reportada por González-Rodríguez y cols. (35) para la búsqueda de deleciones y solo una de ellas presentó la deleción del gen hGH-N como se muestra en la figura 6. Para estar seguros de la presencia de la deleción en el gen esta muestra fué considerada para seguir en con los estudios posteriores a la búsqueda de la deleción.



**Figura 6.** Diagnóstico de deleciones en el gen hGH-N. En esta figura se muestra la digestión del producto amplificado de los genes del complejo hGH-hPL con la enzima *Acc I*. En los carriles 1 a 5 se ejemplifican muestras que no tienen deleción (presentan las bandas de 900 y 600 pb correspondientes al gen hGH-N), mientras que en el carril 6 se muestra un paciente con deleción en el gen hGH-N (se observa la ausencia de las bandas de 900 y 600 pb). La banda de 1.5 kb corresponde al producto amplificado de los lactogenos placentarios y hGH-V que no son digeridos por ésta enzima.

### 3.3 Estandarización de la PCR para el promotor.

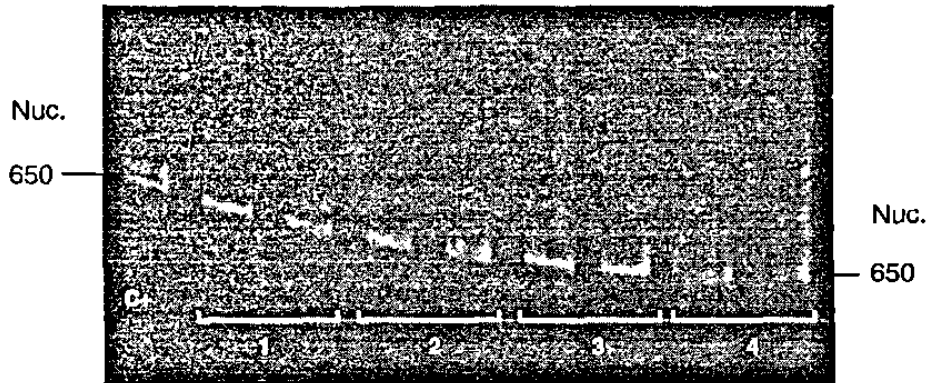
La reacción de PCR fue estandarizada utilizando DNA plásmidico portador de las regiones codificante y promotora del gen hGH-N; así como DNA genómico de individuos normales. En la figura 7 se muestra un ejemplo de los productos amplificados obtenidos.



**Figura 7. Amplificación por PCR.** Ejemplo del producto amplificado por PCR de la región promotora del gen hGH-N de las muestras analizadas. En el carril 1 se observa el amplicón a partir de DNA plasmídico, en los carriles 2 a 7 se observan los amplicones a partir de DNA genómico de las muestras, en el carril 8 se encuentra el testigo negativo. M: Marcador: pUC18 + *Alu* I.

### 3.4 Análisis de heteroduplex para el promotor.

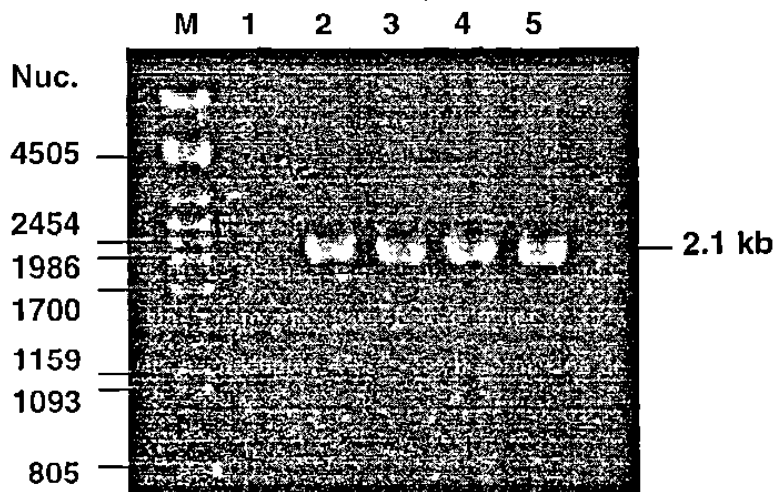
Una vez realizada la estandarización de la reacción, se llevó a cabo la amplificación de las muestras de los pacientes y posteriormente se les realizó el análisis de heteroduplex. En la figura 8 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos con este método. Como se observa en este ejemplo, las muestras de los pacientes para la búsqueda de mutaciones por ésta técnica fueron siempre colocadas en parejas. Esto se realizó con el propósito de evitar positivos falsos durante el ensayo, ya que de observarse la formación de heteroduplex solo en la muestra que había recibido el tratamiento de desnaturalización y de incubación a 37°C, nos confirmaría la validez del método. Durante estos ensayos se observó la formación de heteroduplex en 11 muestras de un total de 36 analizadas.



**Figura 8. Ensayo de análisis de heteroduplex.** C+ es el control positivo. Las parejas de fragmentos marcados como 1 a 4 son muestras de los pacientes analizados, en donde la primera banda de cada pareja es el producto amplificado sin tratamiento para heteroduplex y la segunda banda es el producto amplificado con tratamiento para heteroduplex. Observese la formación de los heteroduplex en los carriles marcados como 1 y 4.

### 3.5 Estandarización de la PCR para la región codificante y promotora.

Para la estandarización de esta reacción se utilizó el mismo DNA plasmídico utilizado en el punto 4.1. En la figura 9 se muestra un ejemplo de los productos amplificados una vez que la PCR fue estandarizada.



**Figura 9. Amplificación por PCR.** Producto amplificado por PCR de la región promotora y codificante (2.1 kb) del gen hGH-N. En el carril 1 se observa el testigo negativo, en los carriles 2 al 5 se observan amplicones de las muestras analizadas. M: Marcador: DNA lambda + *Pst* I.

### 3.6 Análisis de heteroduplex para la región codificante y promotora.

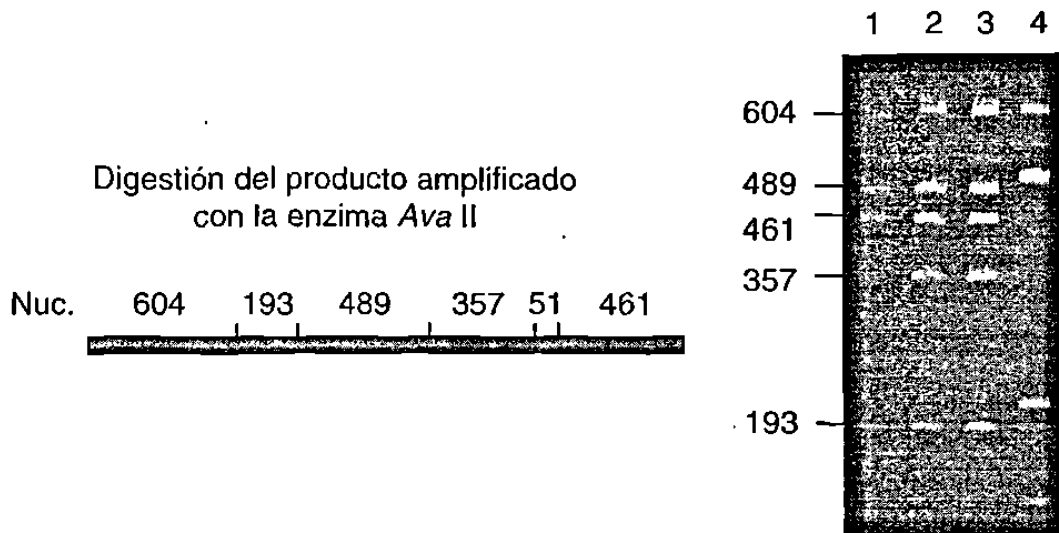
Una vez amplificada la región deseada debido a su tamaño no podía ser analizada por la técnica de heteroduplex de manera directa, por tal motivo se realizó un análisis del mapa de restricción del producto amplificado para localizar una enzima o enzimas que produjeran fragmentos que pudieran ser analizados por la técnica antes mencionada. De esta manera después de realizado el análisis de los mapas se encontró que la enzima *Ava II* podía ser utilizada para este fin ya que la digestión del producto amplificado con esta enzima produce 6 fragmentos que pueden ser fácilmente analizados por la técnica de heteroduplex, el tamaño de dichos fragmentos se presenta en la tabla X.

Orden	Tamaño	De:	A:
1	604	1	605
2	489	1667	2156
3	461	798	1259
4	357	1259	1616
5	193	605	798
6	51	1616	1667

La formación de heteroduplex en alguna de las bandas nos daría información acerca de la localización aproximada del cambio nucleotídico, ya que en base al tamaño de la banda podemos inferir la localización de dicho cambio y por lo tanto la zona que debe secuenciarse.

En la figura 10 se observa el patrón obtenido después de realizar uno de estos ensayos, así como un mapa de restricción para la enzima *Ava II*, el cual nos ayuda a ubicar la zona del gen que esté involucrada en la formación de heteroduplex. La formación de heteroduplex en la banda de 604 pb que corresponde a la región promotora nos dió una indicación de la zona donde encontraríamos al menos un cambio nucleotídico, de igual manera la ausencia de heteroduplex en el resto de las bandas nos indicó la ausencia de cambios nucleotídicos en el resto de la región analizada. Se observó la formación de heteroduplex en la banda que corresponde a la región promotora en 11 muestras de un total de 36 muestras analizadas, así como la presencia en una de las muestras de un patrón diferente, mismo que se describe más adelante. Cabe mencionar que cuando se realizó el análisis de heteroduplex al producto amplificado de la región promotora, las muestras que resultaron positivas también lo fueron cuando se analizó el producto amplificado conjunto de las regiones promotora y codificante digerido, con la enzima *Ava II*.

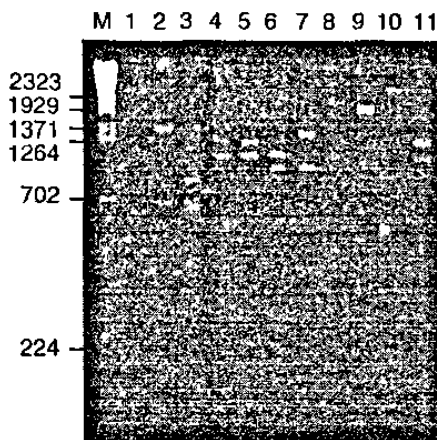




**Figura 10.** Análisis de heteroduplex del producto amplificado del gen hGH-N digerido con la enzima *Ava* II. En la fotografía se observa el patrón obtenido después de la digestión con la enzima *Ava* II, en donde se puede observar la formación de heteroduplex en los carriles 1, 2 y 3 en la banda de 604 pb, la cual corresponde a la región promotora del gen hGH-N. El carril 4 se observa una muestra con un patrón diferente, el cual fué caracterizado más ampliamente (ver más adelante) para conocer la causa de este problema. También se presenta un mapa con los sitios de restricción para la enzima utilizada.

### 3.6.1 Análisis de la muestra No. 4

Como se observó en la figura 10, la muestra número 4 (muestra que presentó delección del gen hGH-N) tuvo un patrón electroforético diferente al resto de las muestras analizadas. Para determinar la naturaleza de esta característica, se realizó una serie de digestiones enzimáticas para elucidar el origen de este producto amplificado. Las enzimas utilizadas en esta caracterización fueron las siguientes: *Pst* I, *Bam*HI, *Sac* I, *Aat* II, *Bgl* II, *Apa*L I y *Dra* I (figura 11).



**Figura 11.** Patrones de digestión de la muestra 4. En el carril 1 se observa el producto amplificado de la muestra 4 sin digerir, en los carriles 2, 4, 6, y 10 se colocó producto amplificado del gen hGH-N de un individuo normal digerido con las enzimas *Pst* I, *Bam*H I-*Sac* I, *Aat* II-*Bgl* II, *Apa*L I y *Dra* I respectivamente. En los carriles 3, 5, 7, 9 y 11 se colocó producto amplificado de la muestra 4 digerido con las mismas enzimas.

Los resultados obtenidos de esta serie de digestiones indicaban que el producto amplificado probablemente tenía la región codificante del gen hPL-I y la región promotora del gen hGH-N, ya que hPL-I no tiene sitio de reconocimiento para la enzima *Bgl* II, tal y como se observa en la figura 11. En la tabla XI se muestran los pesos moleculares calculados con el programa "Molecular Analyst" del sistema "Gel Doc 1000" para la muestra 4, comparados con los fragmentos resultantes de la digestión teórica del producto amplificado normal del gen hGH-N realizada con el programa DNA Strider 1.1.

<i>Pst</i> I		<i>Bam</i> H I- <i>Sac</i> I		<i>Aat</i> II- <i>Bgl</i> II		<i>Apa</i> L I		<i>Dra</i> I	
N	M4	N	M4	N	M4	N	M4	N	M4
1311	809	1007	1157	1024	1248	1795	1888	No	1125
677	698	577	991	909	905	360	388		968
167	668	571		222			115		

N: Digestión teórica del producto amplificado del gen hGH-N.

M4: Muestra 4.

Como se observa en la tabla anterior, los pesos moleculares son diferentes a los que resultarían de la digestión de un producto amplificado del gen hGH-N, a continuación se compararon los pesos moleculares obtenidos con la digestión teórica del producto amplificado del gen hPL-1 de la misma región (tabla XII).

<i>Pst</i> I		<i>Bam</i> H I- <i>Sac</i> I		<i>Aat</i> II- <i>Bgl</i> II		<i>Apa</i> L I		<i>Dra</i> I	
hPL-1	M4	hPL-1	M4	hPL-1	M4	hPL-1	M4	hPL-1	M4
795	809	1150	1157	1256	1248	1674	1888	1168	1125
673	698	1016	991	910	905	358	388	998	968
635	668					134	115		

hPL-1: Digestión teórica del producto amplificado del gen hPL-1.

M4: Muestra 4.

Esta última comparación con la digestión teórica del gen hPL-1 mostró una gran similitud entre los pesos moleculares de la muestra 4 y de éste gen, ésto parece indicar que probablemente el producto amplificado de la muestra 4 probablemente proceda de un gen híbrido. La posibilidad de que el producto amplificado pudiera proceder del gen hPL-1 quedó descartada, ya que al tratar de amplificar DNA plasmídico que contiene este gen bajo las condiciones ya mencionadas no se observó amplificación.

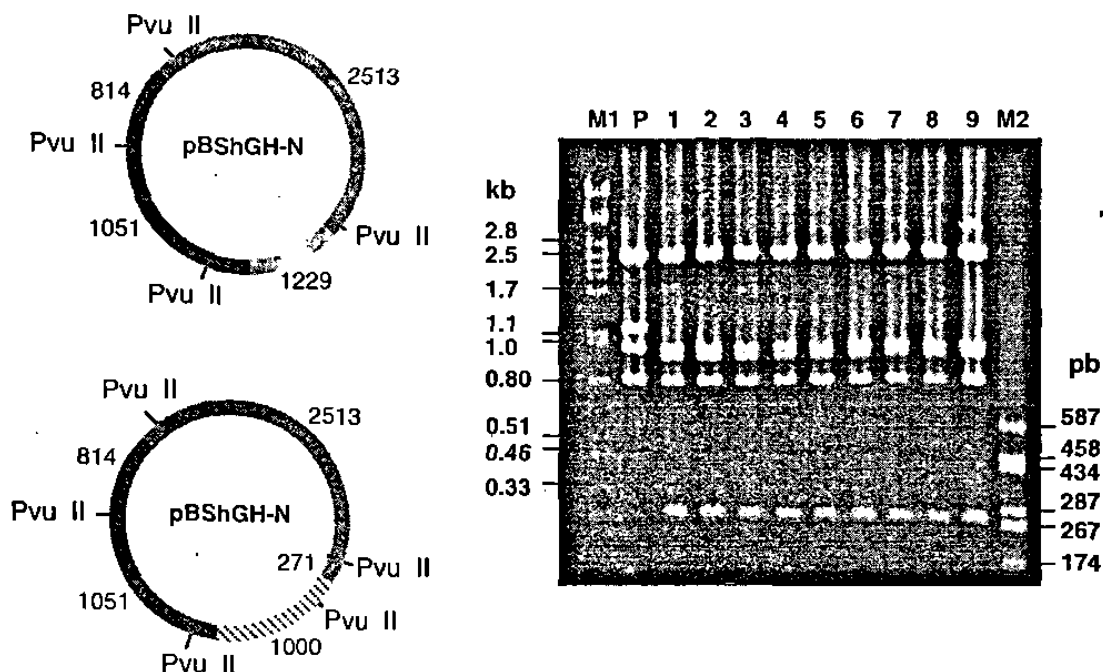
### 3.7 Resultados de los pacientes analizados.

Los resultados obtenidos en los pacientes analizados después del análisis de heteroduplex se resumen en la tabla XIII.

Tabla XIII. Resultados obtenidos en los pacientes analizados					
Clave	Promotor	Gen	Clave	Promotor	Gen
MO1	NEG	NEG	E1	POSITIVO	POSITIVO
MO2	NEG	NEG	E2	POSITIVO	NEG
MO3	NEG	NEG	E3	POSITIVO	NEG
MO4	NEG	NEG	E4	NEG	NEG
MO5	NEG	NEG	E5	POSITIVO	POSITIVO
MO6	NEG	NEG	E6	NEG	NEG
MO7	NEG	NEG	E7	NEG	NEG
MO8	NEG	NEG	E8	NEG	NEG
MO9	NEG	NEG	E9	POSITIVO	NEG
MO10	NEG	NEG	E10	NEG	NEG
MO11	NEG	NEG	E11	POSITIVO	NEG
MO12	NEG	NEG	E12	NEG	NEG
MO13	NEG	NEG	E13	NEG	NEG
L1	NEG	NEG	E14	NEG	NEG
L2	POSITIVO	NEG	E15	NEG	NEG
L3	NEG	NEG	3	NEG	NEG
L4	POSITIVO	NEG	13	POSITIVO	NEG
L5	NEG	NEG	42	POSITIVO	NEG
L6	NEG	NEG	50	POSITIVO	NEG
L7	NEG	NEG			

### 3.8 Secuencias de las muestras positivas.

Las muestras inicialmente fueron secuenciadas directamente a partir de productos de PCR, pero este método presentó inconvenientes al momento de realizar la lectura de la secuencia ya que se observaba la presencia de secuencias superpuestas, esto se debe a que los productos amplificados proceden de una muestra que es heterocigota para un cambio nucleotídico por ello en las regiones donde se encuentran los cambios se observan dos secuencias empalmadas que corresponden a la secuencia normal y a la secuencia que contiene el cambio, estas zonas de empalme desaparecen al avanzar la secuencia donde vuelven a ser iguales. Todo lo anterior representaba una gran dificultad para discernir la secuencia correcta, por ello se requirió clonar los productos amplificados para realizar la secuenciación. A continuación se presenta la caracterización de las clonas obtenidas; como se observa en la figura 12, el inserto introduce un nuevo sitio de reconocimiento para la enzima *Pvu II*, de esta manera la banda de 1229 pb desaparece, formándose una de 1000 pb y otra de 271 pb, lo cual confirma que es el vector recombinante esperado.



**Figura 12.** Caracterización de la clonas obtenidas del promotor del gen hGH-N. En la figura de la izquierda se muestran los mapas de restricción tanto del vector como del recombinante obtenido; la imagen de la derecha, corresponde a la caracterización electroforética después de la digestión con *Pvu* II de las clonas obtenidas. M1: DNA lambda + *Pst* I; M2: pUC18 + *Hae* III.

Una vez determinadas las secuencias de las muestras analizadas, se localizó la presencia de cambios nucleotídicos en las regiones mostradas en la tabla XIV.

Clave: 3		Clave: 13		Clave: 50		Clave: E1	
Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio	Posición	Cambio
-93	ins g	-68	g x a	-4	t x g	-93	ins g
-118	t x g	-93	ins g	-93	ins g	-99	t x g
-362	g x t	-339	t x g	-118	t x g	-100	c x g
-369	g x t	-362	g x t	-339	t x g		
		-369	g x t				

Los cambios nucleotídicos encontrados en esta región (figura 13) ya han sido descritos como polimorfismos por Wagner y cols (28), excepto por los cambios descritos en este trabajo para la muestra E1 y 4. Los resultados que se encontraron en este trabajo concuerdan con lo encontrado por Wagner y cols, ya que ellos reportan que el cambio en la posición -93 se encuentran en el 80% de lo pacientes analizados, mientras que en el presente trabajo se demostró la presencia de este cambio en todas las muestras secuenciadas. De las muestras secuenciadas, todas muestran varios cambios en su secuencia, desde 3 cambios en la muestra E1, hasta 5 en la muestra 13. También se demostró la presencia de cambios nucleotídicos no reportados previamente en la literatura (en las posiciones -99 y -100 pb) que están muy cerca de la caja TATA y que tal vez podrían influir en la expresión de este gen.

TTGGTTCTCTAGTGGTCAGTGTGGAACTGCCATCCAGCTCAGGCTGACCCAGGAGTCTCAGCAGAA  
 GTGGAATTCAGGACTGAATCGTGCTCAACAACCCACAATCTATTGGCTGTGCTTGGCCCTTTTCCCAACAC  
 ACACATTCTGTCTGTGGTGGAGGTTAAACAATGCCGGGAGGAAAGGGATAGGATAGAGAATGGGATGTG ↓  
 GTCCGTAGGGGTCTCAAGGACTGGCTATCCTGACATCCTTCTCCGGTtCAGGTTGGCCACCAtGGCCCTGCCg NF-1  
 GCGAGGGCACCCACGTGACCCCTTAAAGAGAGAGACAAGTTGGTGGTATCTCTGGCTGACACTCTGTGCACA  
 USF  
 ACCCTCAACAACACTGGTGACGGTGGGAAGGAAAGATGACAAGCCAGGGGCATGATCCAGCATGTGTGGGA SP1  
 GGAGCTTCTAAATTATCCATTAGCACAAAGCCCGTCAGTGGCCCCATGCATAAAATGTACACAGAAACAGGTGGG  
 ↓ PIT-1 Dist ↓ G PIT-1 Prox  
 GgCAACAGTGGAGAGAAAtcGGCCAGG TATAAAAGGGCCCAAGAGACCaGCTCAAGGATCCCAAGGCC  
 ↑↑ Caja TATA ↓↑  
 AACTCCCCGAACCACCTCAGGGTCTGTGGACAGCTCACCTAGCGCAATGGCTACAGGTAAGCCCCCTAA  
 +1

Figura 13. Secuencia de la región promotora. Se muestra la secuencia de la región promotora del gen hGH-N, los sitios de unión de los principales factores de transcripción para este gen, la posición de la caja TATA así como el sitio de inicio de la transcripción. Las flechas grises indican la posición de los cambios nucleotídicos encontrados que han sido reportados como polimorfismos, las flechas negras indican los cambios que no han sido reportados previamente en la literatura.

## CAPITULO 4

### DISCUSION

Los estudios sobre la biología molecular de muchas enfermedades han hecho posible el diagnóstico de éstas por métodos moleculares. Varios autores han descrito la presencia de deleciones en el gen hGH-N, las cuales son la principal causa de la DAHGH tipo IA. También se han descrito mutaciones en este gen que son causantes de las DAHGH tipos IB y II. El desarrollo de nuevas metodologías que hagan posible el diagnóstico de estos padecimientos repercute directamente en el asesoramiento genético de la familia de los pacientes.

En el presente trabajo se analizaron muestras de pacientes con diagnóstico de DAHGH para averiguar la integridad del gen hGH-N. La estrategia que se siguió fue el análisis por heteroduplex de amplicones derivados del gen hGH-N, para lo cual se siguieron dos estrategias: análisis de la región promotora y análisis del gen completo (unidad transcripcional más región promotora). Este gen pertenece a una familia multigénica de cinco genes que presentan entre sí una alta similitud en sus secuencias nucleotídicas. El estudio del gen hGH-N requiere del diseño de un oligonucleótido específico que permite amplificar únicamente este gen y no a los otros miembros de la familia.

En este trabajo, el oligonucleótido que confiere la especificidad para la amplificación del gen hGH-N, se derivó de las secuencias de la región -650 (650 nucleótidos antes del sitio de iniciación de la transcripción) lo que permitió tanto analizar la región promotora como la unidad transcripcional del gen. Los oligonucleótidos 3' se escogieron de la oligoteca y se aparean solo en secuencias consenso de los 5 genes; uno al inicio de la unidad transcripcional y el segundo antes de la señal de poliadenilación.

La especificidad del oligonucleótido diseñado en este trabajo fue probada por análisis del patrón de restricción del amplicón, con el cual se demostró que este pertenecía al gen de hGH-N, además de no obtenerse amplificación con DNAs plasmídicos portadores de los otros genes del locus. De manera que tal y como se predecía en los programas



computacionales, las diferencias entre el oligonucleótido y el resto de los genes del complejo fueron suficientes para garantizar la especificidad de este en la PCR.

Las muestras amplificadas por PCR para la región promotora (650 pb) utilizando el oligonucleótido específico diseñado en el presente trabajo fueron sometidas al análisis de heteroduplex para realizar la búsqueda de mutaciones. Un total de 11 muestras resultaron positivas de 36 analizadas para la formación de heteroduplex, lo cual nos indicaba la presencia de por lo menos un cambio nucleotídico en esta región. Las bandas de heteroduplex fueron visualizadas por tinción con bromuro de etidio y digitalizadas con el equipo "Gel Doc 1000". La sensibilidad de este equipo resultó fundamental para la visualización de las bandas y evitó la utilización de la técnica de tinción con plata que ha sido reportada como más sensible que la técnica de tinción con bromuro de etidio. Cabe mencionar también que la cantidad de producto amplificado a colocar en el gel de alta resolución debió ser estandarizada, ya que una cantidad muy elevada impedía la separación de los heteroduplex.

Una vez analizados los promotores en las muestras se procedió a analizar la región génica (2.1 kb), que comprende tanto al promotor como a la región codificante. Este producto amplificado es demasiado grande para ser analizado por la técnica de heteroduplex de manera directa, por lo que para hacer posible el rastreo de mutaciones por esta técnica fue necesario realizar una innovación. Esta consistió en la digestión enzimática del amplicón seguida del tratamiento de desnaturalización e incubación para la formación de heteroduplex. Esta modificación a la técnica presenta la ventaja de realizar una búsqueda de mutaciones de manera rápida y sencilla, además de aportar información acerca de la localización aproximada del cambio nucleotídico solo con observar la banda involucrada. De hecho también nos brinda la posibilidad de acercarnos más al sitio del cambio nucleotídico al digerir con otras enzimas de restricción presentes en la región involucrada y conocer con mayor certeza el sitio del cambio. Debido a que no se tenía la seguridad del éxito de este ensayo, primero se realizó la búsqueda de mutaciones solo en la región promotora y una vez seleccionadas las muestras que presentaran cambios, éstas fueron utilizadas para validar esta metodología. Las muestras que presentaron cambios cuando fueron analizadas solo para la región promotora, resultaron también positivas en el análisis de todo el gen (con todo y su promotor), específicamente en la banda de 604 pb correspondiente al promotor. Además se observó la formación de heteroduplex en la región génica para una de las muestras, en la banda de 357 pb correspondiente a una región que abarca desde el inicio del tercer exón hasta casi el final del cuarto exón incluyendo la región intergénica. Una muestra (No. 4) presentó un patrón de restricción diferente con *Ava II*. En un primer paso, ésta no había dado un

resultado positivo al buscar deleciones del gen hGH-N, pero como ya se mencionó a pesar de esto fue considerada para los siguientes análisis.

La metodología descrita por González-Rodríguez y cols. (35) para evidenciar ausencia de la unidad transcripcional se basa en la amplificación con iniciadores consenso de las unidades transcripcionales de los cinco genes del complejo hGH-hPL, seguido de la diferenciación de los amplicones por enzimas de restricción. *Acc I* permite rastrear la presencia de los genes hGH-N y hGH-V. Este análisis indicó claramente la ausencia de la unidad transcripcional de hGH-N, lo que concuerda con el resultado que obtuvimos al cortar el amplicón obtenido con los iniciadores específicos de hGH-N con *Ava II*. Las digestiones enzimáticas corresponden a las que se obtendrían en el caso de una amplificación de hPL-1. Sin embargo, todos los ensayos preliminares demostraron la especificidad del iniciador para hGH-N. Los resultados sugieren que el amplicón proviene de un gen híbrido que está constituido por la parte distal del promotor de hGH-N (incluyendo así el sitio de unión del iniciador) y de la unidad transcripcional de hPL-1. La determinación la secuencia completa del promotor permitirá corroborar ésta hipótesis. La alta similitud que presentan los genes hGH-N y hPL-1, tanto al nivel del promotor como de la unidad transcripcional, facilita la eventualidad de recombinación entre éstos dos genes. Estos resultados preliminares parecen indicar que si hubo recombinación, ésta se produjo en la parte distal del promotor, antes del sitio *Apal* 1, específico para hPL-1 y que se encuentra en el amplicón.

En resumen del total de las muestras analizadas (36), 11 presentaron heteroduplex para la región promotora y una para la región codificante. Algunas de las muestras que fueron positivas por heteroduplex fueron secuenciadas para determinar la posición de las bases involucradas en los cambios encontrados. La primera opción era la secuenciación directa del producto de PCR; ésto presentó una gran dificultad al momento de leer la secuencia, ya que los amplicones procedían de muestras de pacientes heterocigotos para estos cambios y al momento de leer se observaban dos secuencias empalmadas. Por ello, se decidió clonar las regiones positivas por heteroduplex (promotores) de las muestras. La diferencia entre una muestra secuenciada directamente y otra secuenciada después de la clonación y purificación del DNA plasmídico fue muy grande, ya que mientras la primera presentaba los problemas antes mencionados, la segunda podía ser leída claramente. La mayoría de los cambios nucleotídicos encontrados en las muestras secuenciadas fueron polimorfismos reportados por Wagner y cols. (32) Ellos reportan que la inserción de una *g* adelante la caja TATA se

encuentra en el 80% de las muestras analizadas por ellos; en las muestras analizadas en el presente trabajo se encontró esta inserción en todas las muestras secuenciadas, lo que nos da una incidencia del 100%. Este valor tal vez se deba al número reducido de muestras secuenciadas en este trabajo y podría variar en función del origen de los pacientes.

Además de los polimorfismos encontrados, también se encontraron cambios nucleotídicos que no han sido reportados en la literatura. Estos cambios de T x G y C x G en las posiciones -99 y -100, respectivamente y que están muy cerca de la caja TATA tal vez podrían estar involucrados en la expresión del gen hGH-N. La clonación de este promotor frente a un gen reportero para realizar ensayos de expresión en cultivo celular, nos daría información más precisa sobre los efectos de estos cambios en la expresión del gen. Además, estos mismos ensayos en el resto de las muestras secuenciadas también aportarían información acerca de la influencia de estos cambios reportados como polimorfismos pero que no han sido ensayados para saber si afectan la expresión del gen hGH-N.

## CAPITULO 5

### CONCLUSIONES

1. Se diseñó un oligonucleótido específico que permite amplificar el gen hGH-N, y no los otros miembros de la familia.
2. Se logró la detección rápida de cambios nucleotídicos en el gen hGH-N, los cuales fueron comprobados por secuenciación.
3. La mayoría de los cambios nucleotídicos se encontraron en la región promotora y fueron polimorfismos reportados por Wagner y cols en 1997.
4. Se detectó una sustitución de t por g y c por g en la región de -99 y -100 pb respectivamente que no ha sido reportada previamente en la literatura.
5. Se desarrolló una nueva metodología para la detección de mutaciones en el gen hGH-N, tanto en su región promotora como codificante por heteroduplex.
6. La nueva metodología puede ser aplicada en otros métodos en los cuales el producto amplificado es demasiado grande para ser analizado por la técnica de heteroduplex de manera directa.

## REFERENCIAS

1. De Boer H, Blok G-J, Van der Veen E. Clinical aspects of growth hormone deficiency in Adults. *Endocrine Reviews*. Vol. 16, No 1, 1995: 63-86
2. Chen EY, Lien YC, Smith DH, Barrera-Saldaña HA, Gelinas RE & Seeburg PH (1989). The human Growth hormone locus: Nucleotide Sequence, Biology and Evolution. *Genomics*. 4: 479-497.
3. Rajender K, Chawla D, Parks JS, Rudman D. (1983). Structural variants of human growth hormone: Biochemical, genetic and clinical aspect. *Am. Rev. Med* 34: 519-547.
4. Lewis VJ, Dunn JI, Bonewald LF, Seavey BK, Vanderlaan WP (1978). A naturally occurring structural variant of human growth hormone. *J. Biol Chem*. 253: 2679-2689.
5. Press M. (1988). Growth hormone and metabolims. *Diabetes/metabolims reviews* 4: 391-414.
6. Phillips III JA, Vnencak CL (1989). Genetics of the growth hormone and its disorders. *Advances in human genetics* 8: 305-336.
7. Sthepane J, Courtois DAL, Rousseau GG (1992). Characterization of an alternative promoter in the human hormone gen. *J Biol Chem*. 267: 9736-9743.
8. Lefeure D. Imagawa M, Dona S, Grindlay J, Bodner M, Karin M (1987). Tissue-specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor. *EMBO*. 6: 971-981.
9. Ingraham HA, Chen R, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG (1988). A tissue-Specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell*. 55: 519-529

10. Ingraham HA, Flynn SE, Jeffrey WV, Vivian RA, Kapiloff MS, Wilson L, Rosenfeld MG (1990). The POU-Specific domain of Pit-1 is essential for sequence-specific, high affinity DNA binding and DNA-dependent Pit-1 Interactions. *Cell*. 61: 1021-1033.
11. Ohta K, Nobukuni Y, Mitsubuchi H, Fujimoto S, Matsua N, Inagaki H, Endo F, Matsuda I (1992). Mutations in the Pit-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency caused by a mutation in the Pit-1 gene. *Nature Genetics*. 1: 56-58.
12. Tatsumi K, Miyai K, Notomi T, Kaibe K, Amino N, Mizuno Y, Kohno H. (1992). Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the Pituitary. *Nature Genetics*. 1: 56-58.
13. Radovick S, Nations M, Du Y, Berg LA, Bruce LAB (1992). A mutation in the POU-Homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science*. 257: 1115-1118.
14. Pfaffle RW, DiMattia GE, Parks JS, Brown RM, Wit JM, Jansen M, Van der Nat H, Van der Brande JL, Rosenfeld MG, Ingraham HA. (1992). Mutation of the POU-Specific domain of Pit-1 and hypopituitarism without pituitary hypoplasia. *Science*. 257: 1118-1120
15. Paladini AC, Peña C, Poskus E. (1993), Molecular biology of growth hormone. *Critical Reviews in Biochemistry*. 15:25-56
16. Hill DJ (1992). What is the role of growth hormone and related peptides in implantation and the development of the embryo and fetus. *Hormone Research*. 38:28-34
17. Ashton IK, Zapf J, Einsshank I, McKenzie IZ. (1985). Insulin like growth factors (IGF) I and II in human fetal plasma and relation to gestational age and fetal size during mid pregnancy. *Acta Endocrinol*. 110:558-563
18. Frankenne F, Closset J, Gomez F, Scippo ML, Hennen G .(1988). The physiology of growth hormones (GHs) in the pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. *J Clin Endocrinol Metab*. 66:1171-1180

19. Underwood EL, Van Wyk JJ. (1989). Crecimiento normal y patológico en: *Endocrinología*. 7a. Edición. Editorial Médica Panamericana. pp: 243-314.
20. Phillips, J. A., III; Cogan, JD Genetic basis of endocrine disease 6: molecular basis of familial human growth hormone deficiency. *J. Clin. Endocr. Metab.* 78: 11-16, 1994.
21. Illig, R. Growth hormone antibodies in patients treated with different preparations of human growth hormone (HGH). *J. Clin. Endocr. Metab.* 31: 679-688, 1970.
22. Phillips, J. A., III; Hjelle, B. L.; Seeburg, P. H.; Zachmann, M. Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78: 6372-6375, 1981.
23. Zachmann, M.; Fernandez, F.; Tassinari, D.; Thakker, R.; Prader, A. Anthropometric measurements in patients with growth hormone deficiency before treatment with human growth hormone. *Europ. J. Pediat.* 133: 277-282, 1980.
24. Goossens, M.; Brauner, R.; Czernichow, P.; Duquesnoy, P.; Rappaport, R. Isolated growth hormone (GH) deficiency type 1A associated with a double deletion in the human GH gene cluster. *J. Clin. Endocr. Metab.* 62: 712-716, 1986.
25. Braga, S.; Phillips, J. A., III; Joss, E.; Schwarz, H.; Zuppinger, K. Familial growth hormone deficiency resulting from a 7.6 kb deletion within the growth hormone gene cluster. *Am. J. Med. Genet.* 25: 443-452, 1986.
26. Mullis, P. E.; Akinci, A.; Kanaka, C.; Eble, A.; Brook, C. G. D. Prevalence of human growth hormone-1 gene deletions among patients with isolated growth hormone deficiency from different populations. *Pediat. Res.* 31: 532-534, 1992.
27. Cindy L, Vnencak-Jones, Phillips III JA, Chen EY, Seeburg PH (1988). Molecular basis of the human growth hormone gene deletions. *Proc Natl. Sci. USA.* 58: 5615-5619.
28. Phillips III JA. (1989) Inherited defects in growth hormone synthesis and action. "The metabolic bases of inherited diseases". Mc Graw Hill Co. New York. M.Y. pp: 1965-1983.

29. Fleisher TA, White RM, Broder S, Nissley SP, Blaese RM, Mulvihull JJ, Olive G, Waldmann TA. (1980). X-linked hipogammoglobulinemia and isolated growth hormone deficient. *N. Engl. J. Med.* 302: 1429-1434.
30. Rapaport R, Oleske J, Ahdieh H, Solomon S, Delfaus C, Denny T. (1986). Suppresion of inmune function in growth hormone. *J Pediat.* 109: 434-439.
31. Duriez B, Duquesnoy P, Dastot F, Bougneres P, Amselem S, Goossens M (1994). An exon-skipping mutation in the btk gene of a patient with X-linked agammaglobulinemia and isolated growth hormone deficiency. *FEBS.* 346(2-3):165-170
32. Wagner JK, Eblé A, Cogan JD, Prince MA, Phillips III JA, Mullis PE. (1997). Allelic variations in the human growth hormone-1 gene promoter of growth hormone-deficient patients and normal controls. *Eur J Endocrinol.* 137:474-481.
33. Cogan JD, Phillips III JA, Sakati N, Frisch H, Schober E, Milner RDG. (1993) Heterogeneous growth hormone (GH) gene mutations in familial GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 76:1224-1228
34. Binder G, Ranke MB. (1995) 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.* 80(4):1247-1252
35. González-Rodríguez E, Jaramillo-Rangel G. y Barrera-Saldana HA. (1997). Molecular diagnosis of deletions in the human multigene complex of growth and placental lactogen hormones. *Am.J.Med.Genet.* 72:399-402.



## RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Fermín Mar Aguilar

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular  
e Ingeniería Genética

Tesis: BUSQUEDA DE MUTACIONES EN EL GEN hGH-N EN PACIENTES CON  
DEFICIENCIA DE HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

### Biografía:

Datos personales: Nacido en Poza Rica, Veracruz el 26 de Enero de 1973,  
hijo de Fermín Mar Cruz y Lucía Aguilar Ortiz.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado  
obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 1995.



