

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 hipofisiarias...	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

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	Coeficiente 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	Estatura 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	Cloroformo-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