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 hipofisiarias) (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).

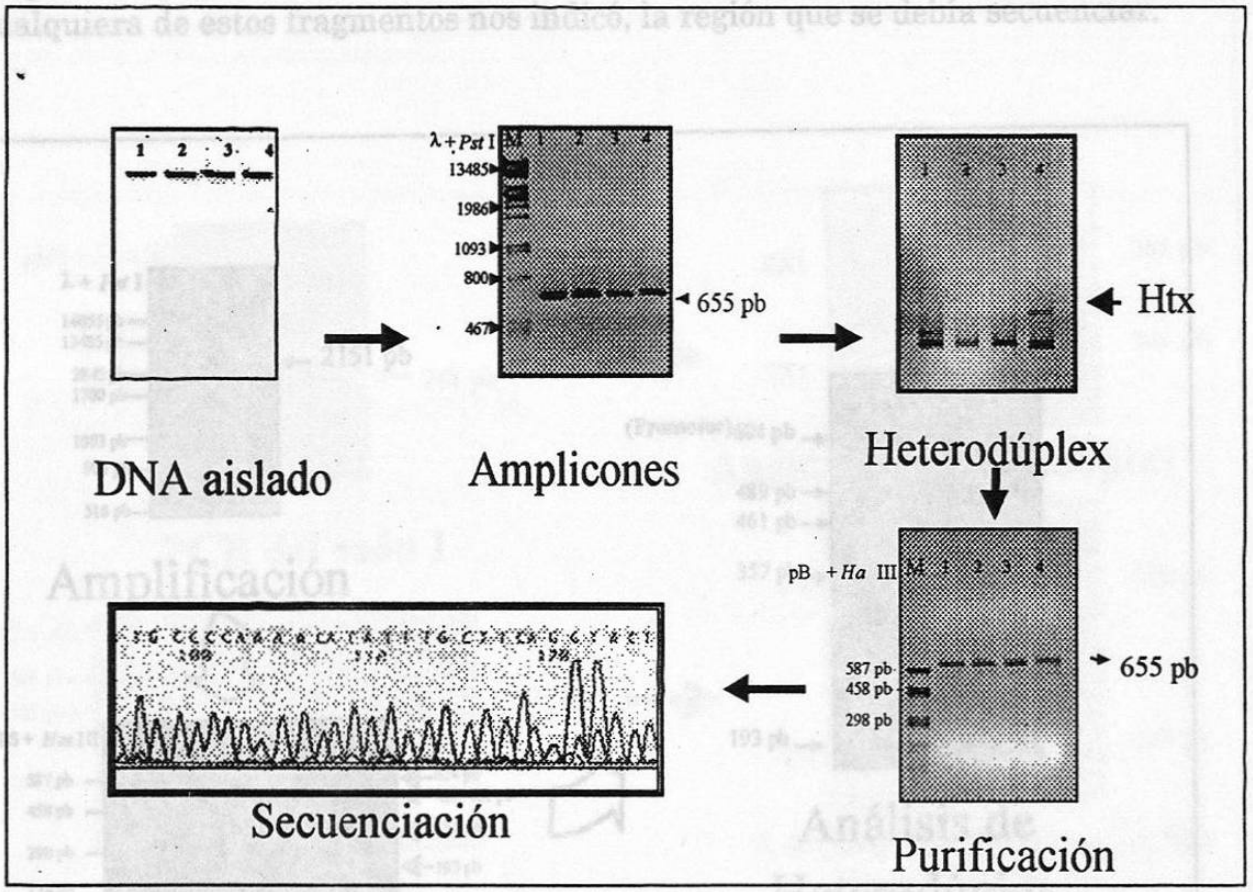

Figura 10. Análisis de heterodúplex de la región promotora del gen hGH-N. En el gel correspondiente a los heterodúplex, se observan homodúplex en los carriles 2 y 3, en tanto que la formación de heterodúplex en los carriles 1 y 4, de los cuales se rescataron y purificaron las bandas anómalas para precisar 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.

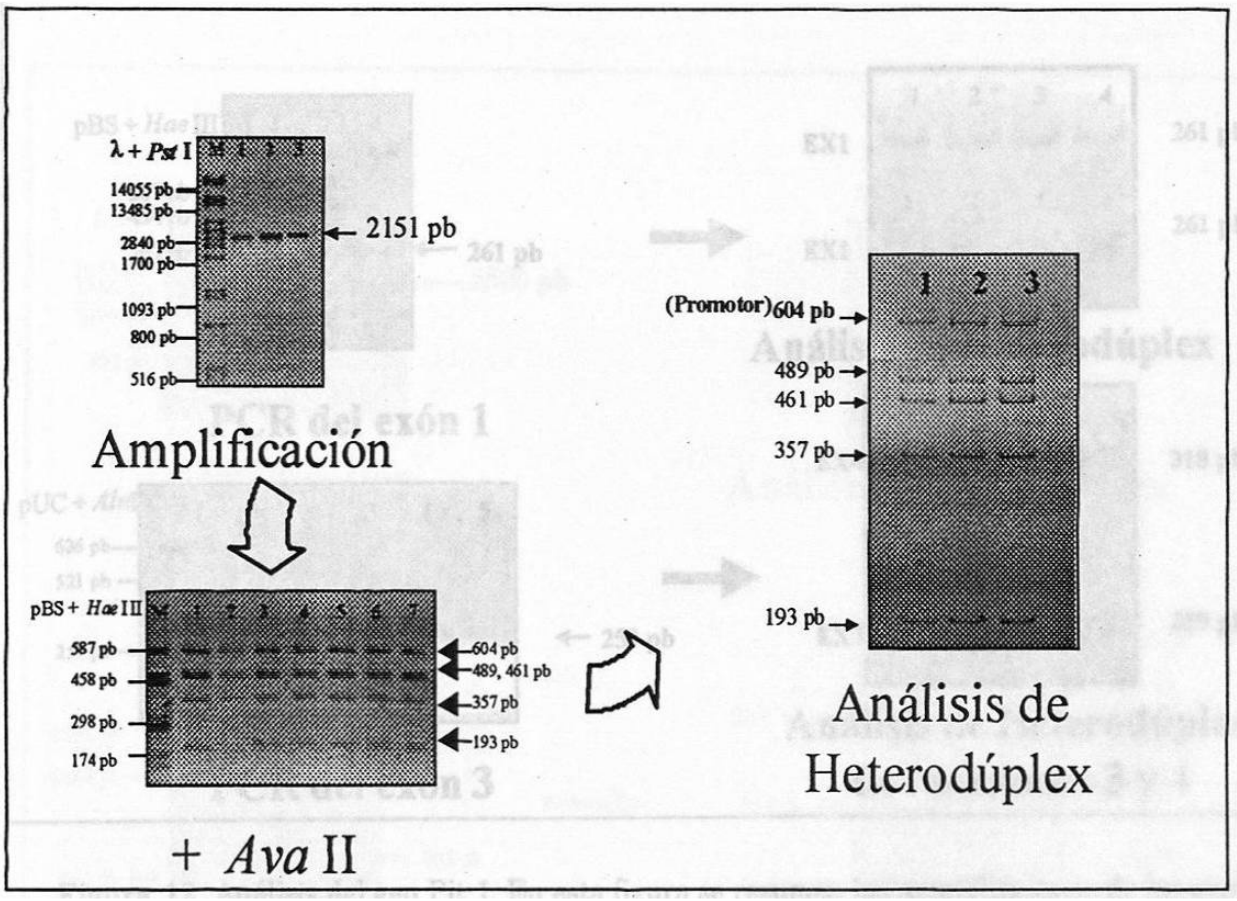

Figura 11. Análisis del gen hGH-N fragmentado para heterodúplex. En esta figura se observan los patrones obtenidos antes y después de la digestión del amplicón con *Ava* II. Para el análisis por heterodúplex, los productos de digestión se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10%.

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 hipofisiarias (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).

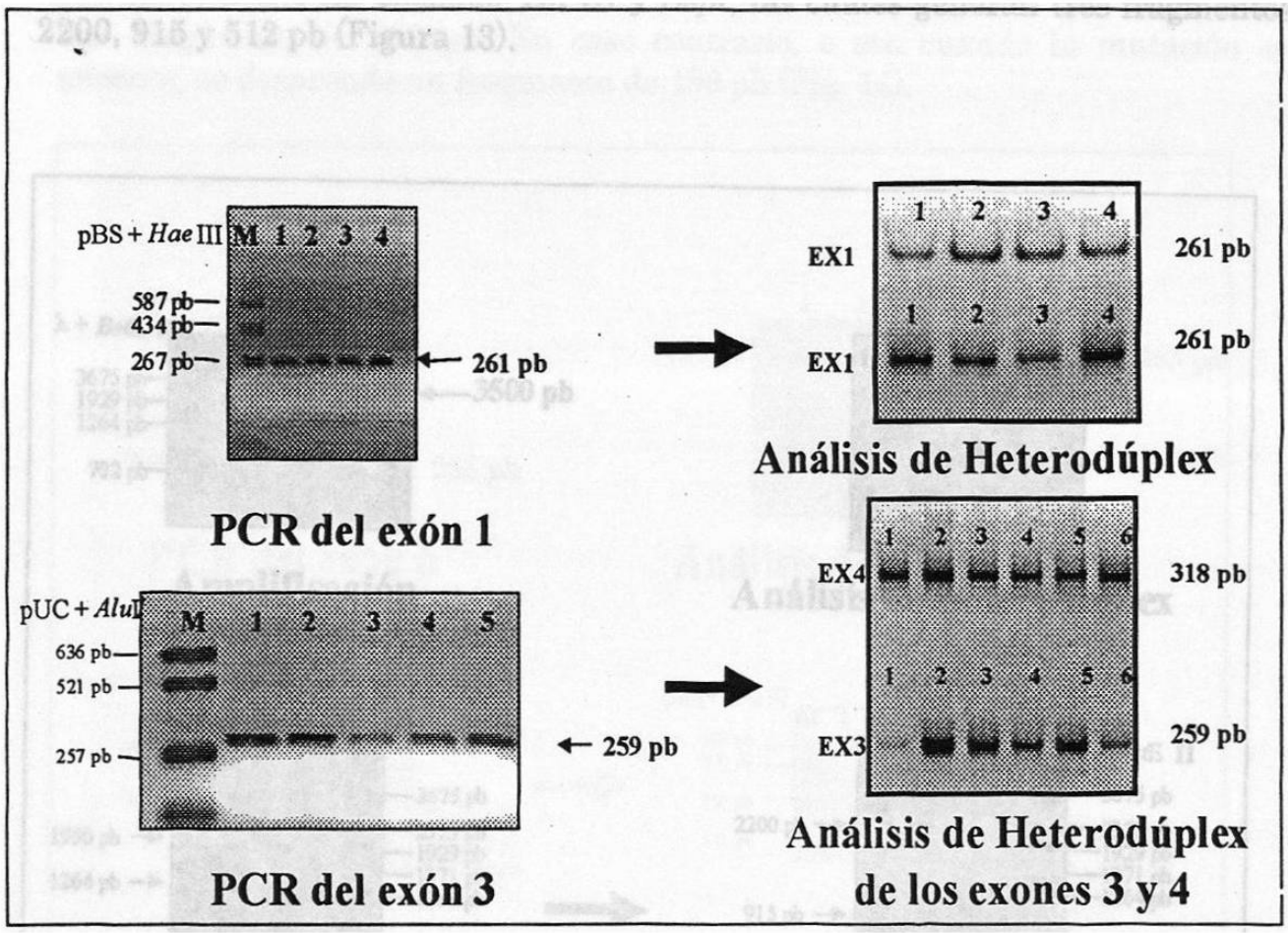

Figura 12. Análisis del gen Pit-1. En esta figura se resumen las amplificaciones de los exones del gen Pit-1 de muestras CPHD, así como el análisis de heterodúplex de cada una de ellas. Cabe hacer notar que en los geles que corresponden al análisis de heterodúplex, se depositaron dos filas de muestras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

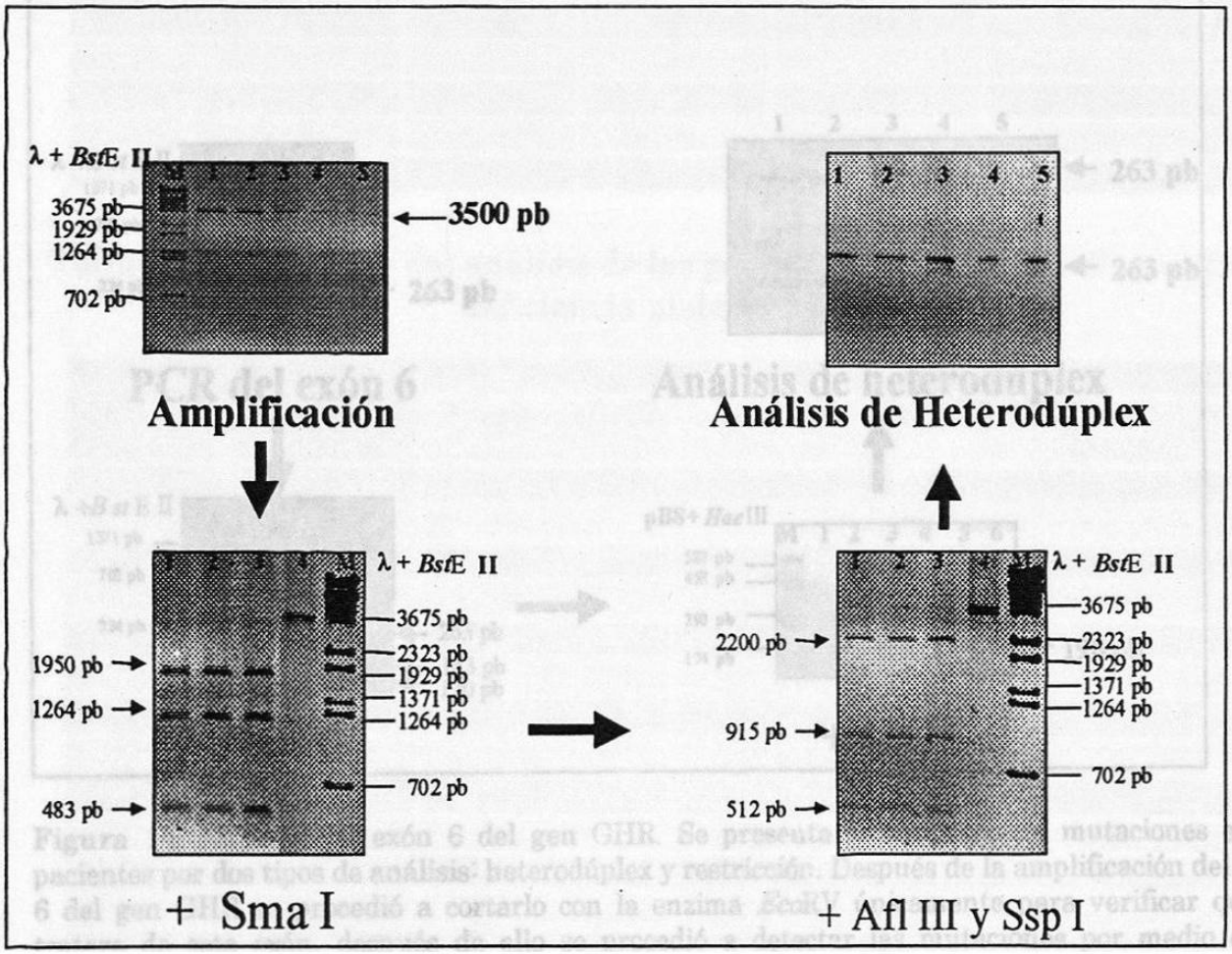

Figura 13. Análisis del gen Prop-1. En esta figura se ilustran los ensayos realizados para el gen Prop-1 en el que la digestión con *Sma* I produce un fragmento de 483 pb que incluye al exón 2, en el que se han reportado mutaciones. En la digestión con *Afl* III y *Ssp* I el fragmento de 512 pb es el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

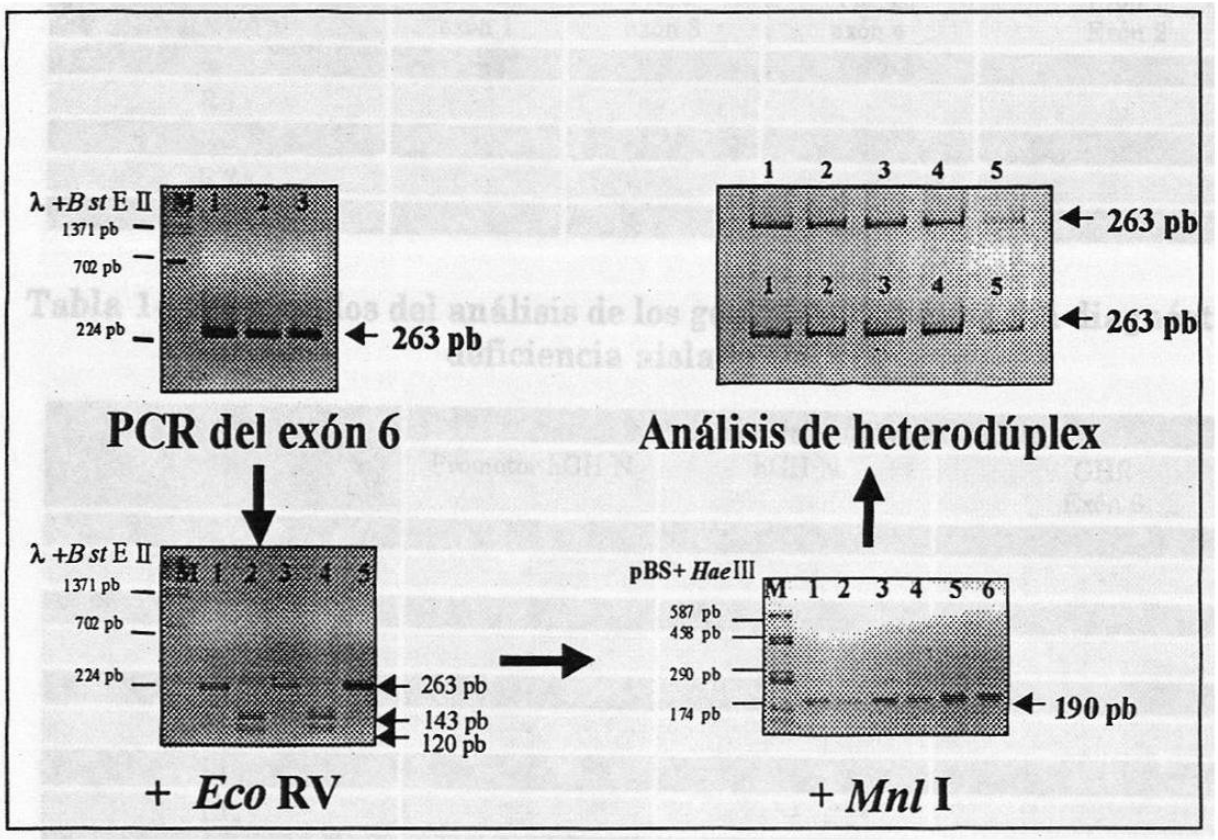

Figura 14. Análisis del exón 6 del gen GHR. Se presenta la detección de mutaciones en 20 pacientes por dos tipos de análisis: heterodúplex y restricción. Después de la amplificación del exón 6 del gen GHR se procedió a cortarlo con la enzima *Eco*RV únicamente para verificar que se tratara de este exón, después de ello se procedió a detectar las mutaciones por medio de la restricción con la enzima *Mnl* I, 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 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.

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, R3, 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.

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      ----TTGGTTCTCTCTAGTGGTCAGTGTTGGAACTGCATCCAGCTGACTCAGGCTGACCC
NORMAL      ----TTGGTTCTCTCTAGTGGTCAGTGTTGGAACTGCATCCAGCTGACTCAGGCTGACCC
            ***********************************************************

R10145      AGGAGTCCTCAGCAGAAGTGGAATTCAGGTCTGAATCGTGCTCACAACCCCCACAATCTA
NORMAL      AGGAGTCCTCAGCAGAAGTGGAATTCAGGACTGAATCGTGCTCACAACCCCCACAATCTA
            ************************************************************

R10145      TTGGCTGTGCTTGGCCCCTTTTCCCAACACACACATTCTGTCTGGTGGGTGGAGGTTAAA
NORMAL      TTGGCTGTGCTTGGCCCCTTTTCCCAACACACACATTCTGTCTGGTGGGTGGAGGTTAAA
            ************************************************************

R10145      CATGCGGGGAGGAGGAAAGGGATAGGATAGAGAATGGGATGTGGTCGGTAGGGGGTCTCA
NORMAL      CATGCGGGGAGGAGGAAAGGGATAGGATAGAGAATGGGATGTGGTCGGTAGGGGGTCTCA
            ************************************************************

                                                          CAJA NF-1
R10145      AGGACTGGCTATCCTGACATCCTTCGCCGCGTGCAGGTTGGCCACCATGGCCTGCTGCCA
NORMAL      AGGACTGGCTATCCTGACATCCTTCTCCGCGTTCAGGTTGGCCACCATGGCCTGCGGCCA
            ************************* ****** ********************** ****
                          -369(g) -362(h)                  -339(i)
            CAJA USF-1
R10145      GAGGGCACCCACGTGACCCTTAAAGAGAGGACAAGTTGGGTGGTATCTCTGGCTGACACT
NORMAL      GAGGGCACCCACGTGACCCTTAAAGAGAGGACAAGTTGGGTGGTATCTCTGGCTGACACT
            ************************************************************

R10145      CTGTGCACAACCCTCACAACACTGGTGACGGTGGGAAGGGAAAGATGACAAGCCAGGGGG
NORMAL      CTGTGCACAACCCTCACAACACTGGTGACGGTGGGAAGGGAAAGATGACAAGCCAGGGGG
            ************************************************************

                          CAJA SP-1     CAJA Pit-1 distal
R10145      CATGATCCCAGCATGTGTGGGAGGAGCTTCTAAATTATCCATTAGCACAAGCCCGTCAGT
NORMAL      CATGATCCCAGCATGTGTGGGAGGAGCTTCTAAATTATCCATTAGCACAAGCCCGTCAGT
            ************************************************************

            CAJA Pit-1 proximal
R10145      GGCCCCATGCATAAATGTACACAGAAACAGGTGGGGGCAACAGTGGGAGAGAAGGGGCCA
NORMAL      GGCCCCATGCATAAATGTACACAGAAACAGGTGGGGGCAACAGTGGGAGAGAAGGGGCCA
            ************************************************************

            CAJA TATA                -64(ava)
R10145      GGGTATAAAAAGGGCCCACAAGAGACCAGCTCATAGGATCCCAAGGCCCAACTCCCCGAA
NORMAL      GG-TATAAAAAGGGCCCACAAGAGACCAGCTC-AAGGATCCCAAGGCCCAACTCCCCGAA
            ** ****************************  *************************
             (n)-93                     -63 (p)
                                                      INICIADOR 145
R10145      CCACTCAGGGTCCTGTGGACAGCTCACCTAGCTGCAATGGCTACAGGTAAGCGCCCCTAA
NORMAL      CCACTCAGGGTCCTGTGGACAGCTCACCTAGCGGCAATGGCTACAGGTAAGCGCCCCTAA
            ******************************** *************************
                                      -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 trascripción 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-propanolol 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.

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.