



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**ESTUDIO MOLECULAR DE LAS FORMAS NO  
CLÁSICAS DE HIPERPLASIA SUPRARRENAL  
CONGÉNITA.**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TITULO DE  
**ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**

PRESENTA

**DRA. MÓNICA DENNISE MARTÍN DE SARO**



**Hospital General  
de México**

**“A la Vanguardia en el  
Cuidado de la Vida”**

MÉXICO D. F.

JULIO 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN**

**ESTUDIO MOLECULAR DE LAS FORMAS NO  
CLÁSICAS DE HIPERPLASIA SUPRARRENAL  
CONGÉNITA.**

**TESIS**

**QUE PRESENTA LA**

**DRA. MÓNICA DENNISE MARTÍN DE SARO**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**

---

**DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS**

JEFE DE SERVICIO DE GENÉTICA  
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

---

**D. en C. GLORIA QUEIPO GARCIA**

TUTOR DE TESIS  
MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE GENÉTICA  
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por cada día vivido.

A mi familia, por su incondicional apoyo y no dejar de creer en mí.

A ti Sis, un ejemplo a seguir.

A la Dra. Gloria Queipo por su apoyo y enseñanzas.

A Nayeli, Tere y Javier por su ayuda, paciencia y experiencia.

A Lau, porque has sido mi apoyo estos tres años y no me has dejado caer a pesar de todo.

A todos los residentes y médicos del hospital por aguantarme y enseñarme tantas cosas.

GRACIAS.

## **ÍNDICE**

RESUMEN.....	6
ANTECEDENTES.....	8
Glándula Suprarrenal.....	8
Embriología de la Glándula Suprarrenal.....	8
Fisiología de la Glándula Suprarrenal.....	9
Hiperplasia Suprarrenal Congénita.....	11
Generalidades.....	11
Deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa.....	12
Deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa.....	15
Deficiencia de 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.....	18
Diagnóstico Prenatal y Tratamiento.....	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
OBJETIVOS.....	24
Objetivo General.....	24
Objetivos Específicos.....	24
MATERIAL Y MÉTODO.....	25
Sujetos.....	25
Método.....	36
Extracción de DNA de Sangre Periférica.....	36
Extracción de DNA de Líquido Amniótico.....	37
PCR.....	38
Purificación de los productos de PCR.....	41

Secuenciación.....	42
Purificación.....	42
RESULTADOS.....	44
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES.....	57
REFERENCIAS.....	59
GLOSARIO.....	65

## **RESUMEN**

### **Planteamiento del problema**

La hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia de 21 hidroxilasa es una de las enfermedades autosómicas recesivas más frecuentes y su abordaje y manejo están bien establecidos. El resto de las formas no clásicas de HSC son más difíciles de diagnosticar y manejar. El estudio multidisciplinario de los pacientes con sospecha diagnóstica de HSC no clásica permitirá llegar a diagnosticar y manejar a estos pacientes de manera adecuada.

### **Objetivos**

Realizar el estudio molecular de las formas no clásicas de HSC en el servicio de Genética del Hospital General de México.

### **Metodología**

Se estudiaron 6 familias con un total de 9 afectados, todos con datos clínicos sugerentes de hiperplasia suprarrenal congénita. En todos los casos se realizó un abordaje multidisciplinario en donde participaron los servicios de Genética, Endocrinología y Medicina Interna. Se realizó una HC detallada, estudios básicos de laboratorio y gabinete, además de estudio molecular.

Se incluyeron además 31 pacientes púberos y prepúberes con datos de hiperandrogenismo y se realizó estudio molecular del gen *HSD3B2*.

## **Resultados**

Se estudiaron 4 pacientes con diagnóstico clínico de HSC por deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa, 5 pacientes por deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa y 31 pacientes con probable deficiencia de 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa; en todos los casos se realizó secuenciación del gen correspondiente.

## **Discusión**

En todos los casos con sospecha clínica de alguna de las formas no clásicas de HSC se realizó estudio molecular, el cual corroboró el diagnóstico y nos permitió implementar un adecuado esquema de abordaje, diagnóstico y tratamiento multidisciplinario, cumpliendo con los objetivos del presente trabajo.

**Palabras clave:** Hiperplasia suprarrenal congénita, formas no clásicas, estudio molecular, secuenciación.

## ANTECEDENTES

### Glándula Suprarrenal

#### Embriología de la Glándula Suprarrenal

La glándula suprarrenal se desarrolla a partir de dos componentes: una porción mesodérmica que forma la corteza y una porción ectodérmica que origina la médula. Durante la quinta semana de desarrollo, las células mesoteliales situadas entre la raíz del mesenterio y la gónada en desarrollo comienzan a proliferar y se introducen en el mesénquima subyacente. Allí se diferencian en órganos acidófilos voluminosos que forman la corteza fetal o primitiva de la glándula suprarrenal. Poco después, un segundo grupo celular del mesotelio penetra en el mesénquima y rodea a la masa celular acidófila original. Estas células formarán la corteza definitiva de la glándula. Después del nacimiento, la corteza fetal experimenta regresión rápida, excepto en su capa más externa, la cual se convierte en la zona reticular. La estructura característica adulta de la corteza sólo se alcanza al acercarse la pubertad.

Mientras se está formando la corteza fetal, las células originarias del sistema simpático (células de la cresta neural) invaden su cara medial, donde se disponen en cordones y acúmulos. Estas células dan origen a la médula de la glándula suprarrenal.

Durante la vida embrionaria las células cromafines se hallan muy dispersas por el embrión, pero en el adulto el único grupo que persiste

se encuentra en la médula de las glándulas suprarrenales (Sadler T. Langman, 2001).

### Fisiología de la Glándula Suprarrenal

Las dos glándulas suprarrenales, con un peso aproximado de 4g cada una, se sitúan en los polos superiores de los riñones. Cada glándula se compone de dos porciones diferentes, la médula suprarrenal y la corteza suprarrenal. La médula suprarrenal, que ocupa el 20% central de la glándula, se relaciona desde el punto de vista funcional con el sistema nervioso simpático; secreta adrenalina y noradrenalina en respuesta a la estimulación simpática. A su vez, estas hormonas provocan casi los mismos efectos que la estimulación directa de los nervios simpáticos en todas las regiones del cuerpo.

La corteza suprarrenal secreta un grupo completamente diferente de hormonas, llamadas corticoesteroides. Todas estas hormonas se sintetizan a partir de colesterol (Figura 1). Sin embargo, las pequeñas variaciones de su estructura molecular les proporcionan algunas diferencias funcionales muy importantes. Los dos tipos principales de hormonas corticosuprarrenales son los mineralocorticoides y los glucocorticoides. La corteza también secreta pequeñas cantidades de hormonas sexuales, en particular andrógenos, que muestran los mismos efectos que la testosterona.

La corteza suprarrenal tiene tres capas relativamente diferenciadas:

1. La zona glomerular, capa delgada de células por debajo de la cápsula, compone casi el 15% de la corteza. Estas células son capaces de secretar cantidades importantes de aldosterona.
2. La zona fascicular, la capa media y más ancha, representa casi el 75% de la corteza y secreta los glucocorticoides cortisol y corticosterona, así como pequeñas cantidades de andrógenos y estrógenos suprarrenales. Su secreción está controlada en gran parte por el eje hipotalámico-hipofisiario a través de la hormona adrenocorticotropa (ACTH).
3. La zona reticular, la capa más profunda, secreta los andrógenos suprarrenales dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona, así como pequeñas cantidades de estrógenos y algunos glucocorticoides.

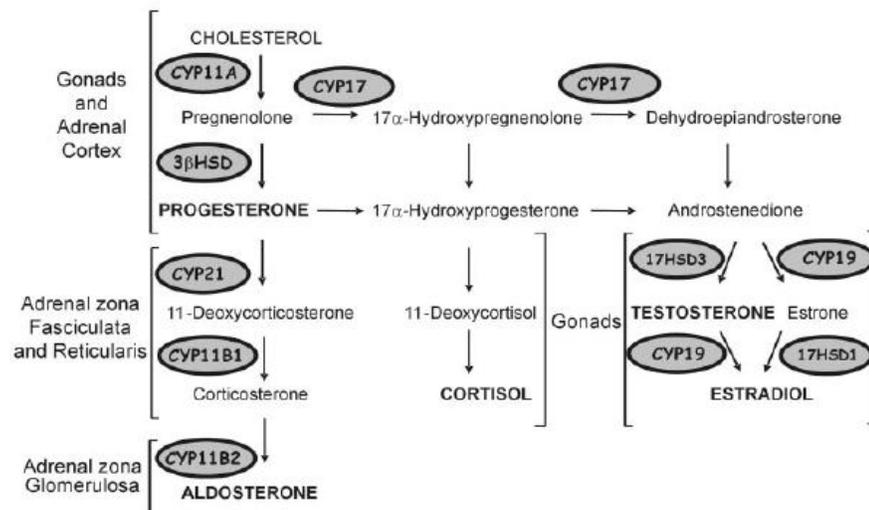


Figura 1. Biosíntesis de las hormonas esteroideas en la glándula suprarrenal y gónadas.

(Payne A y cols, 2004).

## Hiperplasia Suprarrenal Congénita

### Generalidades

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) hace referencia a las alteraciones histológicas características (Figura 2) secundarias a la elevación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y a la hiperactividad crónica de la glándula por incapacidad de la corteza adrenal de producir niveles plasmáticos de cortisol adecuados en respuesta a la estimulación normal de ACTH. Esta incapacidad es debida a un bloqueo enzimático en las diferentes etapas de la vía de esteroidogénesis.

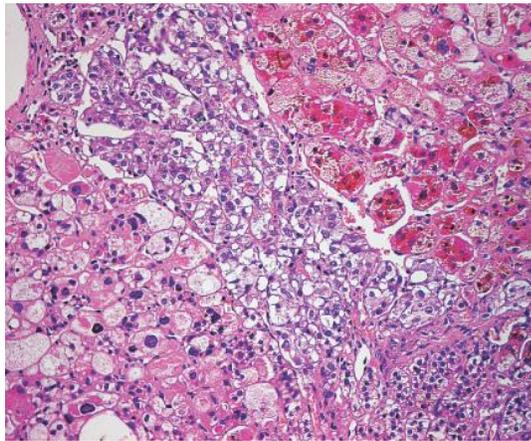


Figura 2. Se observa la corteza ensanchada; la zona hiperplásica está llena de células eosinófilas compactas y granulares (Robin E y cols. 2005)

Con excepción de la hiperplasia adrenal congénita lipoidea, la HSC se origina bioquímicamente por actividad enzimática reducida o ausente en la síntesis de esteroides.

Los defectos enzimáticos en la esteroidogénesis se han asociado a síndromes clínicos específicos:

1. Deficiencia de 21-hidroxilasa (clásica perdedora de sal, clásica virilizante simple, no clásica).
2. Deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa (clásica y no clásica).
3. Deficiencia de 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (clásica y no clásica).
4. Deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20- liasa.
5. Hiperplasia adrenal congénita lipoidea (Rimoin D y cols, 2007).

La HSC por deficiencia de 21-hidroxilasa corresponde al 90-95% de todas las HSC y se presenta en 1 de 15,000 recién nacidos vivos; mientras que la deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa ocupa el segundo lugar con el 5-8% (Li-Qiang y cols, 2008; Rimoin D y cols, 2007). En la mayoría de los casos, las deficiencias resultan de mutaciones recesivas en los genes que codifican para las enzimas de la vía de esteroides y producen un fenotipo diferente (Nimkarn S y cols, 2009).

#### Deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa

La secreción anormal de esteroides adrenales causada por la deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilación fue descrita por primera vez por Eberlein y Bongiovanni. El perfil hormonal de los pacientes con esta deficiencia, llevó a la identificación de 2 isoenzimas de la 11 $\beta$ -hidroxilasa codificadas por 2 genes, *CYP11B1* y *CYP11B2*. *CYP11B1*

codifica para la enzima que cataliza el último paso en la síntesis del cortisol y es regulada por la ACTH. El paso final en la síntesis de aldosterona es catalizado por la aldosterona sintetasa codificada por *CYP11B2* y regulada por la angiotensina II y el potasio.

El perfil característico de la deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa (P450c11) por mutación en *CYP11B1* muestra elevación en 11-deoxicortisol y desoxicorticosterona (DOCA) en sangre, con marcada elevación de los metabolitos urinarios.

La deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa corresponde al 5% de todos los casos de HSC con una incidencia de 1:100,000 nacimientos (Wilson J y cols, 1998).

La enzima 11 $\beta$ -hidroxilasa pertenece al sistema del citocromo P450, regula la biosíntesis de corticoesterona en la zona glomerular y cortisol en la zona fascicular de la glándula adrenal. La deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa resulta en disminución de la síntesis de cortisol y glucocorticoides, alterando la retroalimentación negativa de ACTH y aumentando su síntesis en la hipófisis, generando mayor producción de precursores del cortisol e hiperandrogenemia. El aumento de ACTH también lleva a un aumento en los niveles de DOCA y 11-deoxicortisol (Figura 2) (Li-Qiang y cols, 2008).

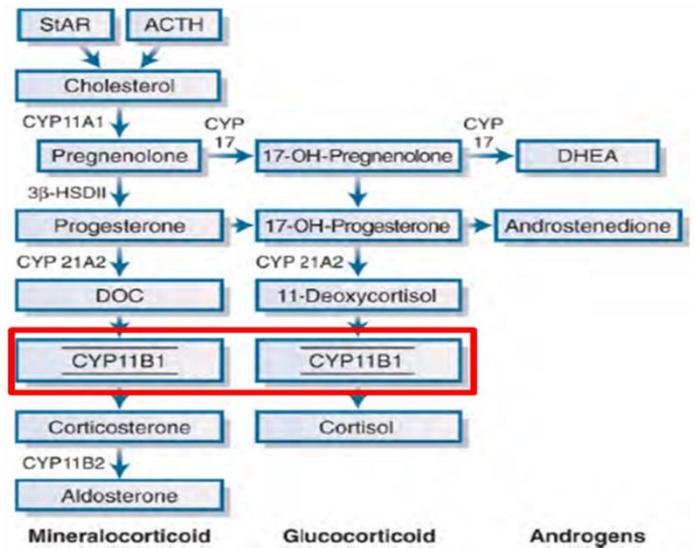


Figura 2. Bloqueo en la vía de esteroidogénesis secundario a defectos en *CYP11B1*  
(Wilson J y cols. 1998)

La deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa se divide en forma clásica y no clásica dependiendo de las manifestaciones clínicas. La deficiencia de la 11 $\beta$ -hidroxilación resulta en HSC virilizante, usualmente acompañada de hipertensión. La secreción anormal de esteroides adrenales tiene un efecto mineralocorticoide que lleva a retención de sodio y expansión de volumen.

La hipertensión y virilización son las características clínicas más importantes. El desarrollo de los genitales externos femeninos se afecta por el exceso de andrógenos causando genitales ambiguos en todos los casos, sin afectar los genitales internos. La persistencia en el aumento de andrógenos provoca aparición de caracteres sexuales secundarios de manera prematura tanto en hombres como mujeres. Las mujeres suelen tener conducta agresiva en la niñez.

La hipertensión es común pero no tan constante como la virilización. La sobreproducción de DOCA causa retención de sal e hipertensión, la cual se reconoce en la niñez o adolescencia (Li-Qiang y cols, 2008).

El diagnóstico clínico se puede realizar cuantificando 11-deoxicortisol plasmático postestimulación con ACTH, que suele encontrarse 3 veces arriba de la percentila 95 para la edad. El tratamiento consiste en reemplazo con glucocorticoides; con la supresión de DOCA, la actividad de renina plasmática aumenta hasta valores normales. En general, se necesitan mayores dosis de glucocorticoides para suprimir el hiperandrogenismo comparado con los pacientes con HSC por deficiencia de 21-hidroxilasa, así como añadir un antihipertensivo en los casos que sea necesario (Wilson J y cols, 1998).

*CYP11B1* se localiza en el cromosoma 8q21 y consiste de 9 exones, con una longitud total de 6.03kpb; codifica para 503 aminoácidos. Las mutaciones en este gen llevarán a una baja o nula expresión de la enzima 11 $\beta$ -hidroxilasa. Se han descrito más de 50 mutaciones (Li-Qiang y cols, 2008).

#### Deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa

La deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa es una enfermedad rara, autosómica recesiva con una incidencia aproximada de 1 en 50,000 individuos. Se describió inicialmente en 1966 por Biglieri et al, en un paciente genotípicamente femenino y con cuadro clínico caracterizado por hipertensión, hipokalemia y ausencia de pubertad. En 1970, New

reportó un paciente genóticamente masculino con pseudohermafroditismo masculino. La enfermedad afecta tanto a glándula adrenal como a las gónadas. Se han encontrado mutaciones en el gen que codifica para el citocromo P450c17 (CYP17) en el cromosoma 10q24-q25, causando la deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa (Siew-Lee W. y cols, 2006).

Las mutaciones en el gen *CYP17A1* llevan a falla en la síntesis de cortisol (actividad 17 $\alpha$ -hidroxilasa), andrógenos adrenales (17,20-liasa) y esteroides gonadales. En contraste con la deficiencia de 21-hidroxilasa y 11 $\beta$ -hidroxilasa, la deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa lleva a una insuficiencia adrenal y gonadal. La enzima se expresa tanto en adrenales como en gónadas y posee actividad de 17 $\alpha$ -hidroxilación y 17,20-liasa. La pérdida de la retroalimentación negativa lleva a un aumento en la secreción de esteroides previos al bloqueo, y se favorece la secreción de mineralocorticoides. Los niveles de aldosterona son variables, y el exceso de mineralocorticoides es resultado del exceso de DOCA en el 80% de los casos (Wilson J y cols, 1998).

El citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilasa (P450c17) es una de las enzimas clave en la síntesis de las hormonas esteroideas en la corteza adrenal y las gónadas. Pertenece a la familia de oxidasas con 2 funciones: 17 $\alpha$ -hidroxilasa y 17,20-liasa. P450c17 cataliza la conversión de pregnenolona y progesterona (P) en 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona y 17 $\alpha$ -hidroxiprogestero (17 $\alpha$ -OPH), que después se divide en el carbono

C17, 20 vía 17,20-liasa para generar los precursores de andrógenos y estrógenos, como dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona. En la glándula adrenal, P y 17 $\alpha$ -OHP se convierten en 11-deoxicorticoesterona (DOCA) y cortisol, por reacciones de hidroxilación vía 21-hidroxilasa y 11 $\beta$ -hidroxilasa (Figura 3) (Tian Q y cols, 2009).

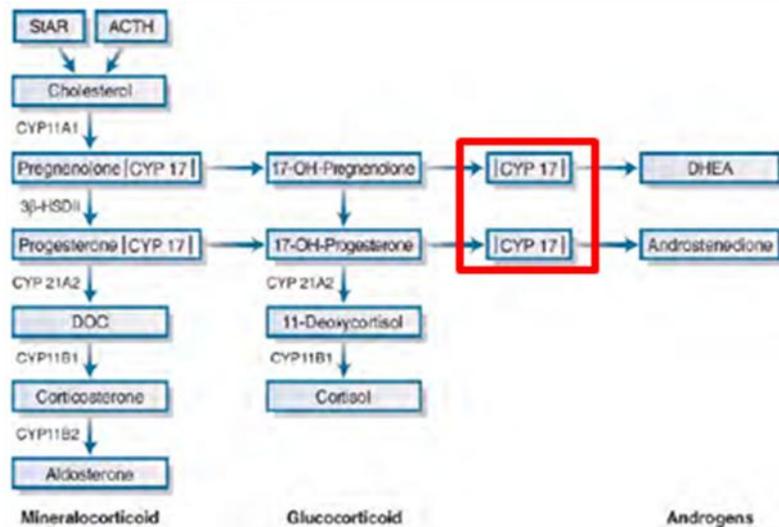


Figura 3. Bloqueo en la vía de esteroidogénesis secundario a defectos en *CYP17A1* (Wilson J y cols. 1998).

Consiste en 8 exones con 8673 pb y se expresa en la zona fascicular y reticular de la glándula adrenal, así como en las células de la teca y Leydig (Yang J y cols, 2006).

La deficiencia de P450c17 es un defecto genético autosómico recesivo causado por mutaciones en el gen *CYP17A1* (Tian Q y cols, 2009). Desde que la primera mutación fue descrita en 1988, aproximadamente 54 mutaciones de *CYP17A1* se han reportado. Se sabe que estas mutaciones pueden causar deficiencia completa,

parcial, combinada o aislada de  $17\alpha$ -hidroxilasa/ $17,20$ -liasa (Yang J y cols, 2006).

Pacientes 46, XX con este padecimiento, típicamente presentan hipertensión, hipokalemia, ausencia de caracteres sexuales secundarios y amenorrea primaria; mientras que los pacientes 46, XY presentan alteraciones en la virilización (pseudohermafroditismo) y ausencia de desarrollo puberal (Tonetto-Fernandes V y cols, 2006).

El diagnóstico se realiza usualmente en la pubertad cuando los pacientes presentan hipertensión, hipokalemia e hipogonadismo. Como resultado, los niveles de LH y FSH se encuentran elevados. El tratamiento incluye el reemplazo con glucocorticoides que revierte la supresión del sistema renina-angiotensina-aldosterona inducida por DOCA, mejorando la presión sanguínea. También se puede dar reemplazo de hormonas sexuales. En el caso de los pacientes 46, XY, se deben remover los testículos intrabdominales (Wilson J y cols, 1998).

### Deficiencia de $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

La enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD) es necesaria para la síntesis de todos los esteroides adrenales y gonadales. La deficiencia de esta enzima fue descrita por primera vez en 1962 por Bongiovanni y parece tener una herencia autosómica recesiva.

Debido a la deficiencia gonadal de  $3\beta$ -HSD, la producción de andrógenos gonadales se encuentra disminuida. En los varones, el desarrollo genital incompleto resulta en ambigüedad de genitales al nacimiento. En contraste, en las mujeres afectadas, los altos niveles circulantes de DHEA limitan el efecto androgénico que se manifiesta como clitoromegalia y en raras ocasiones, fusión de labios mayores.

La relación aumentada entre  $\Delta 5$  y  $\Delta 4$  esteroides, caracterizada específicamente por elevación en los niveles séricos de pregnenolona, 17-hidroxipregnenolona y DHEA y aumento en la secreción de pregnanetriol y 16-pregnenetriol en orina, llevan al diagnóstico de este desorden enzimático (Figura 4).

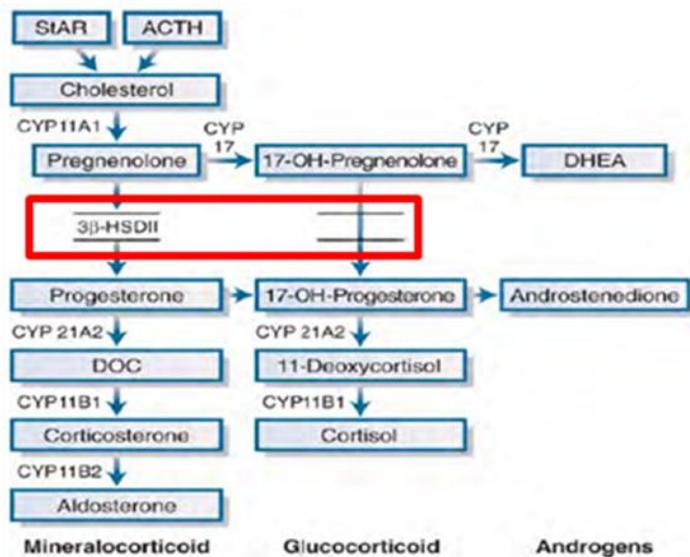


Figura 4. Bloqueo en la vía de esteroidogénesis secundario a defectos en *HSD3B2* (Wilson J y cols. 1998).

La deficiencia en la producción de aldosterona en los casos de bloqueo de la 3 $\beta$ -HSD genera una forma perdedora de sal; en otros casos, la habilidad para retener sodio se conserva. En la deficiencia de 3 $\beta$ -HSD, como en la deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa y 21-hidroxilasa, existe un amplio espectro fenotípico, y la pérdida de sal puede presentarse. Tampoco se puede determinar el grado de severidad basándose en la apariencia de los genitales externos al nacimiento.

Como en la deficiencia de 21-hidroxilasa, existe una deficiencia de 3 $\beta$ -HSD no clásica debido a un defecto enzimático atenuado que no produce alteraciones en el desarrollo. Los pacientes con la forma no clásica generalmente presentan adrenarca prematura, hirsutismo u oligomenorrea. Con un inicio peripuberal o postadrenarca, parece afectar las zonas fascicular y reticular.

La deficiencia de 3 $\beta$ -HSD no es frecuente, por lo que no se ha encontrado predominio étnico y no existe una prevalencia exacta.

Se han clonado 2 genes, *HSD3B1* y *HSD3B2*, que codifican para 2 tipos de 3 $\beta$ -HSD; la enzima tipo II se expresa específicamente en la corteza adrenal y las gónadas, y la enzima tipo I, que es la forma placentaria, se expresa en tejido extraglandular. Los 2 genes comparten más de 90% de homología en su secuencia y se localizan en el cromosoma 1p13.1. Todas las mutaciones que causan deficiencia de 3 $\beta$ -HSD se han

encontrado en el gen *HSD3B2* y se han descrito poco más de 30 mutaciones (Simard J y cols. 2005; Rimoin D y cols, 2007).

### Diagnóstico Prenatal y Tratamiento

Mientras que las manifestaciones postnatales de la HSC son controladas hormonalmente, la corrección mediante cirugía es el tratamiento efectivo para las alteraciones genitales presentes al nacimiento. El potente esteroide dexametasona, que atraviesa la barrera placentaria, se utiliza para suprimir la actividad adrenal fetal en los fetos femeninos afectados, y reduce de manera significativa el grado de virilización presente al nacimiento cuando se administra a la mujer embarazada (Rimoin D y cols, 2007).

En 1989, Bouchard reporta el primer caso de tratamiento prenatal de un feto femenino con HSC por deficiencia de  $11\beta$ -hidroxilasa. En esta ocasión, el tratamiento se inició de manera tardía, fue suspendido a la mitad del embarazo y eventualmente discontinuado basándose en niveles normales en la concentración de esteroides en líquido amniótico. El resultado fue el nacimiento de un bebé severamente virilizado (Cerame B y cols, 1999).

Para el diagnóstico y tratamiento prenatal de HSC se utiliza el mismo algoritmo. La fusión de labios ocurre antes de la octava semana de gestación; es por eso que una vez confirmado el embarazo en una

mujer con riesgo para tener un feto con HSC, se inicia el tratamiento con dexametasona ( $20\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  en 3 dosis), sin importar el estado del feto. La biopsia de vellosidades coriales a la décima semana de gestación o la amniocentesis a la semana 14, nos proporciona tejido para la extracción de DNA y cariotipo para determinar el sexo. La terapia con dexametasona se suspende si el feto es masculino o si en el análisis del DNA se encuentra que el feto femenino es heterocigoto u homocigoto sano. Sólo los fetos femeninos afectados son tratados hasta el término del embarazo. Al nacimiento el diagnóstico debe ser confirmado clínicamente, por medición hormonal y genéticamente (Cerame B y cols, 1999; Martin E y cols, 2001).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia de 21 hidroxilasa es una de las enfermedades autosómicas recesivas más frecuentes dentro de la práctica médica. Los lineamientos para el abordaje y manejo de esta patología se encuentran bien establecidos. Sin embargo, esta forma de patología suprarrenal es sólo una de 4 enfermedades que se observan por deficiencia de alguna de las enzimas que participan en la síntesis de hormonas esteroideas. La incidencia, el abordaje, el diagnóstico y el manejo en estas formas no clásicas no son homogéneos y en ocasiones es difícil llegar al diagnóstico.

El estudio multidisciplinario de los pacientes con sospecha diagnóstica de HSC no clásica que acudieron al Hospital General de México en los últimos tres años permitirá trabajar de forma conjunta con los Servicios de Endocrinología y Medicina Interna, conocer más a fondo estas patologías, desarrollar y aplicar la tecnología para realizar estudios moleculares que brinden un diagnóstico preciso, y establecer lineamientos de diagnóstico y manejo para que sean aplicados en los diferentes servicios.

## **OBJETIVOS**

### Objetivo General

Realizar el estudio molecular de las formas no clásicas de HSC en el servicio de Genética del Hospital General de México.

### Objetivos Secundarios

Conocer las características clínicas de las diferentes formas de HSC en nuestra población.

Estandarizar y contar con el diagnóstico molecular de las formas no clásicas de HSC.

Estandarizar y contar con el diagnóstico molecular prenatal de las formas no clásicas de HSC.

Caracterizar las mutaciones en nuestra población.

Estudiar el posible efecto funcional de las mutaciones identificadas.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Sujetos

Se estudiaron 6 familias con un total de 9 afectados, todos con datos clínicos sugerentes de hiperplasia suprarrenal congénita. En todos los casos se realizó un abordaje multidisciplinario en donde participaron los servicios de Genética, Endocrinología y Medicina Interna. Se realizó una historia clínica detallada, estudios básicos de laboratorio y gabinete, además de estudio molecular.

Se incluyeron además 31 pacientes púberos y prepúberes con datos de hiperandrogenismo y se realizó estudio molecular del gen *HSD3B2*.

### Familia 1

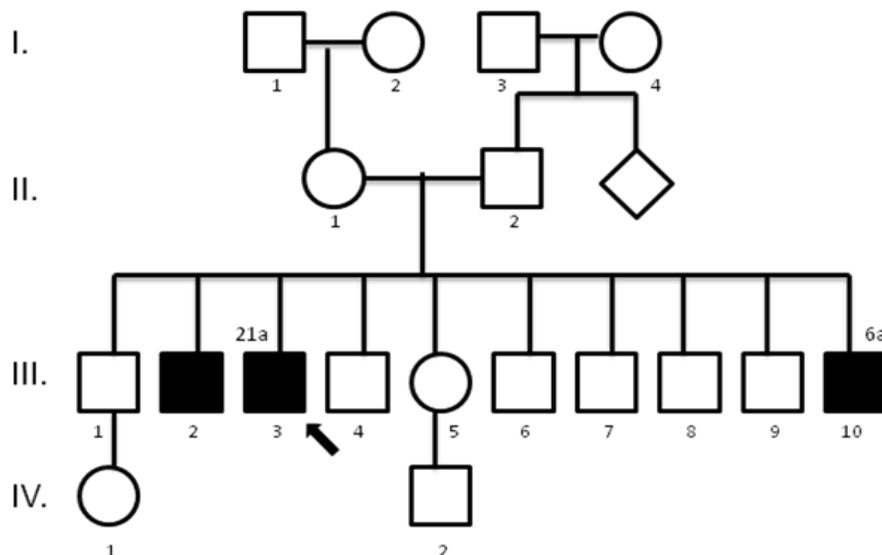


Figura 5. Árbol genealógico de la familia 1.

Familia procedente de la región de Xhenalho, Chiapas; el caso III.3 paciente con asignación masculina de 21 años de edad quien acude a consulta con diagnóstico de hipertensión arterial tratada con nifedipino y ambigüedad genital. Dentro los antecedentes heredofamiliares niega consanguinidad, sin embargo, se documenta que vive en una zona endogámica para el padecimiento actual; producto de la tercera gesta de matrimonio sano con dos hermanos más afectados y siete sanos (Figura 5). Dentro de los antecedentes patológicos de importancia refiere alteraciones de la diferenciación sexual desde el nacimiento, pubarca prematura a los 6 años de edad, talla baja e hipertensión arterial de difícil control. A la exploración física se observa paciente con ambigüedad genital, talla baja por debajo de la percentila 3. En los genitales se observa falo de 4 cm con cuerda tendinosa, piel escrotal hiperpigmentada y rugosa, no se palpan gónadas, hipospadias perineo-escrotal sin seno urogenital. Los estudios de laboratorio se muestran en la tabla 1. La TAC abdominopélvica mostró hiperplasia de glándulas adrenales así como la presencia de útero y gónadas con características de ovarios. El Cariotipo fue 46, XX con secuencias del cromosoma Y mediante PCR negativas. Con estos resultados se realiza diagnóstico de deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa. Los estudios psicológicos mostraron identidad masculina, se realizó histerectomía con ooforectomía bilateral, corrección de cuerda tendinosa y colocación de prótesis testiculares.

Tabla 1. Valores de laboratorio de los pacientes III. 3 y III. 10

LABORATORIO	III. 3	III. 10
17-hidroxiprogesterona	18.6ng/ml (0.5-2)	19.8ng/ml (0.5-2)
FSH	10.0mUI/ml (2-10)	11.4mUI/ml (2-10)
LH	5.0mUI/ml (2-25)	4.6mUI/ml (2-25)
Estrógenos	70pg/ml (20-150)	62pg/ml (20-150)
Testosterona	3.0ng/ml (0.2-0.7)	4.0ng/ml (0.2-0.7)
Progesterona	1.6pg/ml (0.2-1.0)	1.8pg/ml (0.2-1.0)
DHEAs	1500ng/ml (520-4200)	2160ng/ml (520-4200)
DOCA	1010ng/dL	1029ng/dL

El caso III.10, masculino de 6 años de edad hermano de III.3 acude a consulta con características clínicas y bioquímicas semejantes a su hermano. A la exploración se encuentra masculino con talla por arriba de la percentila 95, pezones hiperpigmentados, genitales masculinos Tanner III (Imagen 1). Los exámenes de laboratorio se muestran en la tabla 1.

Se realiza edad ósea que reportó una edad de 14 años. Se documentó hipertensión arterial sistólica de 140/90. Se realizó cariotipo con resultado 46, XX con identidad masculina. Con estos datos se diagnostica deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa y en ambos hermanos se realizó estudio molecular en DNA en linfocitos de sangre periférica.



Imagen 1. Paciente III. 10, se observa hiperpigmentación de pezones, genitales masculinos Tanner III.

Familia 2

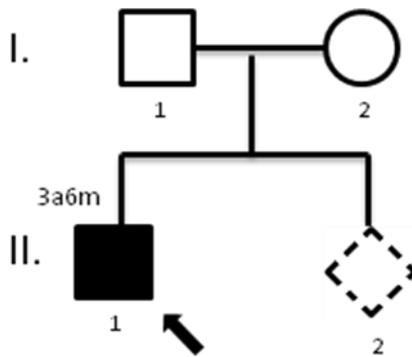


Figura 6. Árbol genealógico de la familia 2.

Matrimonio sano no consanguíneo procedente de Chicontepec, Veracruz, acuden a consulta con II.1 masculino de 3 años 6 meses de edad con datos de pseudo-pubertad precoz e hipertensión. Sin ningún antecedente de importancia para el padecimiento actual con inicio repentino de datos puberales. A la exploración física se observa paciente fenotípicamente masculino, con datos de acné en cara, genitales masculinos Tanner III, pene de 9 cm con volumen testicular de 1.7 cm<sup>3</sup>, hiperpigmentación generalizada (Imagen 2). Dentro del

abordaje inicial se descartó tumor suprarrenal como causa del padecimiento actual; los resultados relevantes de laboratorio incluyen desoxicorticosterona 403 ng/dL (4-49), 11-deoxicortisol >10,000 ng/dL (7-210). Con estos datos se integró diagnóstico clínico de deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa y se toma muestra de sangre periférica para extracción de DNA de linfocitos y estudio molecular. Se da asesoramiento genético a los padres, sin embargo I.2 acude a consulta con embarazo de 9.3 SDG por fecha de última regla. Con el antecedente familiar se realizó USG que reportó embarazo de 8.1 SDG. Endocrinología inició tratamiento prenatal con dexametasona a dosis de 20  $\mu$ g/kg/día. A las 17 SDG se realizó amniocentesis y estudio molecular de la mutación identificada previamente en el hermano. El producto tuvo un cariotipo 46, XY y fue homocigoto para la misma mutación por lo que se suspendió el tratamiento prenatal.



Imagen 2. Paciente I. 1, se observa paciente fenotípicamente masculino, hiperpigmentación generalizada y pene de 9 cm.

### Familia 3

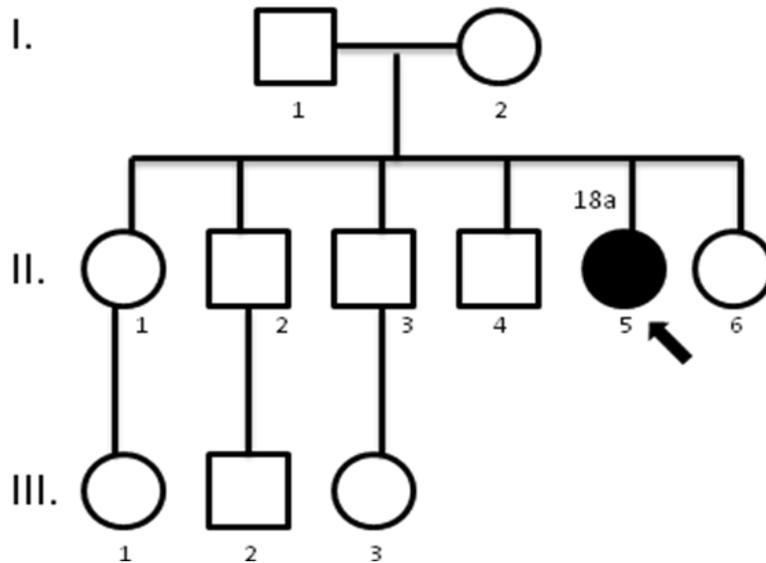


Figura 7. Árbol genealógico de la familia 3.

Familia proveniente de San Juan Otolotepec, Oaxaca, el caso II. 5 con asignación femenina de 18 años de edad, es hospitalizada por presentar parálisis de miembros inferiores secundaria a crisis hipokalémica. Sin antecedentes heredofamiliares de importancia, no consanguinidad, pero provienen de una comunidad endogámica del estado de Oaxaca; producto de la quinta gesta de una matrimonio sano con 5 hermanos aparentemente sanos (Figura 7). Dentro de los antecedentes personales patológicos presenta amenorrea primaria e infantilismo sexual, se documenta hipertensión arterial de 140/100. A la exploración física se observa fenotipo femenino con mamas Tanner I, sin vello axilar ni púbico, genitales externos femeninos Tanner I (Imagen 3). Se realizó USG abdominopélvico donde no se observan útero ni ovarios; TAC abdominal con hiperplasia de ambas glándulas adrenales; IRM con presencia de gónadas en ambos canales inguinales.

Se realizó cariotipo con resultado 46, XY y secuencias del cromosoma Y por PCR positivas. Los exámenes de laboratorio muestran FSH 67.9 mUI/ml, LH 41.4 mUI/ml, prolactina 29.4 ng/ml, E2 10 pg/ml, TSH 0.99 µg/ml, T4L 1.0 ng/ml, T3L 3.3 pg/ml, ACTH 535 pg/ml, aldosterona 171.2 pg/ml, progesterona 4.1 ng/ml, testosterona 10 ng/dL, Na 143, K 1.59, Mg 0.43.

Con los datos anteriores se integró el diagnóstico clínico de deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa por lo que se inició tratamiento antihipertensivo y hormonal. Se realizó laparotomía exploradora y se extirparon ambos testículos; se tomó muestra de sangre periférica para estudio molecular en DNA de linfocitos. Al año de tratamiento fue intervenida quirúrgicamente para colocación de implantes mamarios. Actualmente asintomática con buen control de la hipertensión.



Imagen 3. Paciente II. 5. Fenotípicamente femenino, mamas Tanner I, sin vello púbico, genitales femeninos Tanner I.

## Familia 4

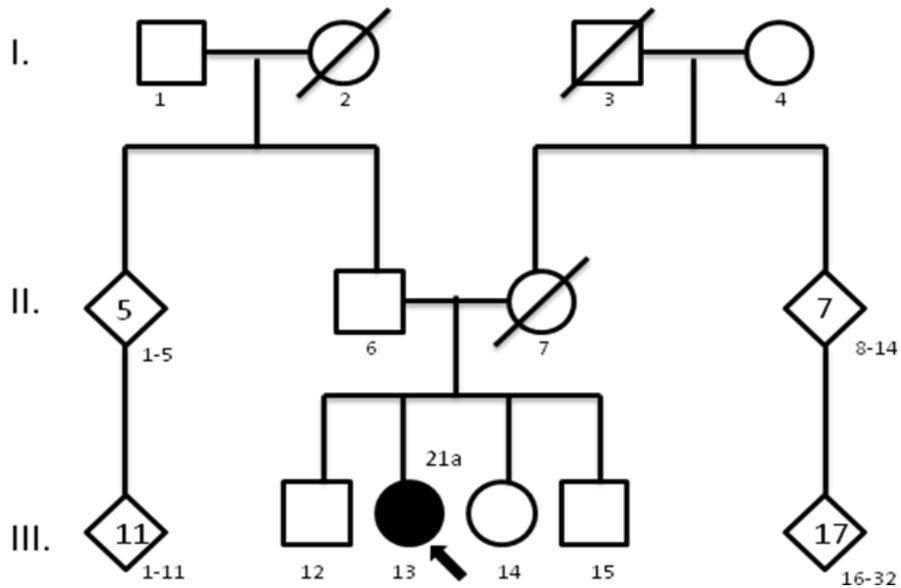


Figura 8. Árbol genealógico de la familia 4.

Familia procedente de San Juan Ootzolotepec, Oaxaca; el caso III. 13, con asignación femenina de 21 años de edad es referida del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por presentar amenorrea primaria e hipertensión ya tratada con captopril. Sin antecedentes heredofamiliares de importancia, no consanguinidad pero provenientes de una comunidad endogámica de Oaxaca; producto de la gesta 2 con padres y 3 hermanos aparentemente sanos (Figura 8). Cuenta con el antecedente de ependimoma removido quirúrgicamente un año antes de la consulta. A la exploración física se encuentra fenotipo femenino, mamas Tanner I, sin presencia de vello axilar ni púbico, genitales externos femeninos Tanner I, con TA 140/100. USG pélvico sin útero ni ovarios y cariotipo 46, XY. Los estudios de laboratorio muestran FSH 42.6 mUI/ml (3.5-12.5), LH 17.2 mUI/ml (2.4-12.6), E2 20.0 pg/ml (25-195), prolactina 6.3 ng/ml (3.3-26.7), cortisol

0.5 µg/ml (8.7-22.4), DHT<15, androstenediona <0.3 µg/ml, DHEAS <15, testosterona 0.1 ng/ml (0.06-0.82), progesterona 4.59 ng/ml, ACTH 298.5 pg/ml (4.7-48.8), Na 141 mmol/L (136-144), K 3.1 mmol/L (3.6-5.1), Cl 105 mmol/L (101-111), Ca 9.6 mg/dL (8.9-10.3), DHT<15, androstenediona <0.3 µg/ml, DHEAS <15.

Con los datos anteriores se realiza el diagnóstico clínico de deficiencia de 17α-hidroxilasa/17,20-liasa y se toma muestra de sangre periférica para estudio molecular.

Familia 5

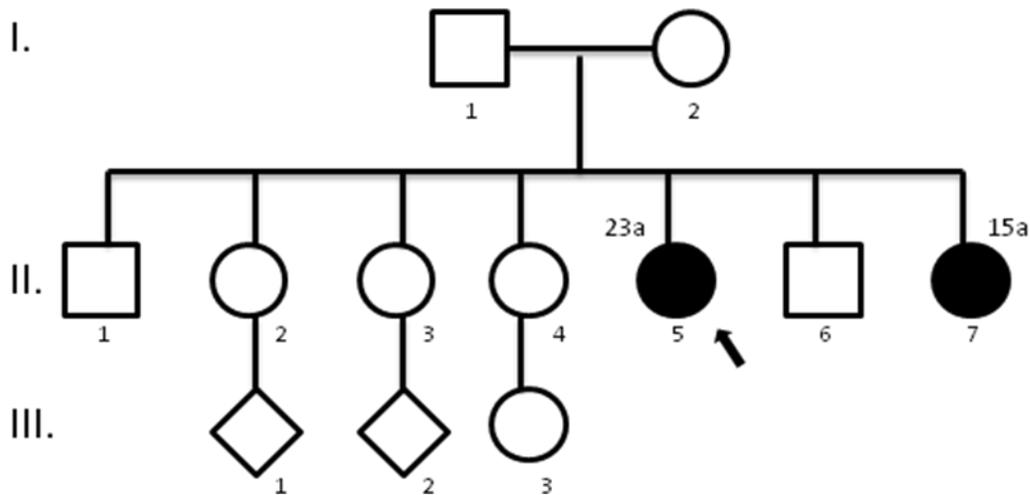


Figura 9. Árbol genealógico de la familia 5.

Familia residente del Distrito Federal pero procedente de San Juan Otolotepec, Oaxaca; el caso II. 5 con asignación femenina de 23 años de edad con antecedente de hipertensión arterial en tratamiento, acude a consulta por amenorrea primaria y falta de desarrollo de caracteres sexuales secundarios. Sin antecedentes heredofamiliares de importancia, probable consanguinidad, producto de la quinta gesta con

padres sanos, 5 hermanos sanos y una hermana afectada (Figura 9). A la exploración se observa fenotipo femenino, mamas Tanner I, sin vello axilar ni púbico, genitales externos femeninos Tanner I. Cuenta con USG que reporta útero infantil y ovarios pequeños con folículos atrésicos y cariotipo 46, XX. Los laboratorios reportan FSH 88.3 mUI/ml, LH 26.3 mUI/ml, prolactina 17.3 ng/ml, progesterona 8.2 ng/ml, testosterona 0.04 ng/ml, E2 36.7 pg/ml (160-246), TSH 4.79 mUI/ml, T3 4.79 pg/ml, T4 0.77 ng/dL, renina <0.15 ng/ml/hr, cortisol 6.05 mg/24hr, aldosterona 310.6 pg/ml. Con los datos obtenidos se integra el diagnóstico clínico de deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa y se toma muestra para estudio molecular y se da tratamiento hormonal.

El caso II. 7 con asignación femenina de 15 años de edad acude a la consulta con características clínicas semejantes a las de su hermana. A la exploración física se observa mamas Tanner I, ausencia de vello axilar y púbico, genitales externos femeninos Tanner I. Se inicia estudio para confirmar deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa por lo que se solicita cariotipo, USG pélvico, valores hormonales y estudio molecular.

## Familia 6

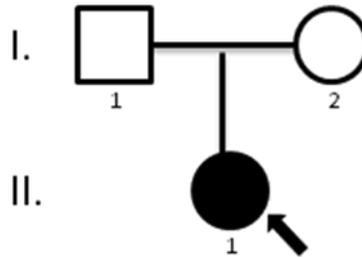


Figura 10. Árbol genealógico de la familia 6.

Familia procedente del estado de Morelos, con caso II.1 con asignación femenina de 15 años de edad que acude a consulta por amenorrea primaria sin desarrollo de caracteres sexuales secundarios. Sin antecedentes heredofamiliares de importancia para el padecimiento, producto de la primera gesta de padres aparentemente sanos (Figura 10). Cuenta con antecedente de mareos y cefaleas frecuentes. A la exploración física se observa acantosis nigricans en cuello y axilas, mamas Tanner I, ausencia de vello púbico, genitales externos Tanner I y TA 170/110. El USG pélvico sin estructuras Mülllerianas con cariotipo 46, XY. Se realizó prueba de estimulación con gonadotropina coriónica humana sin obtener respuesta. Los laboratorios reportan LH 36.4 UI/L (0.69-7.15), FSH 58.8 UI/L (0.81-8.18). Se realizó laparoscopia donde se encuentran testículos bilaterales en canal inguinal y una vagina de 7 cm con fondo ciego. Las gónadas fueron removidas y el análisis histológico reveló testículos bilaterales con escasas células de Leydig y atrofia tubular con ausencia de epidídimo y vasos deferentes. Posterior a la cirugía se documentó hipokalemia (2.9 mEq/L) e hipernatremia (148 mEq/L), cortisol basal 2.8 µg/dL (3-21), testosterona < 20 ng/dL

(220- 800), androstenediona 0.3 ng/mL (0.9-1.7), DHEA-s < 15 µg/dL (30-555), 11-deoxicorticoesterona 398 ng/dL (2-19), ACTH 75.3 pg/mL (10-60), aldosterona 240 pg/mL (10-160), actividad de renina plasmática 1 ng/ml/hr (3.2 ± 1), E2 <20 pg/mL (5-45), progesterona 10.4 ng/ml (0.3-1.5) y pregnenolona 300 ng/dL (10-150). Con los datos anteriores se integra el diagnóstico de deficiencia de 17α-hidroxi-lasa/17,20-liasa y se toma muestra de sangre periférica para estudio molecular a la paciente y ambos padres.

## Metodología

### Extracción de DNA de linfocitos de sangre periférica

- Se obtuvo asépticamente 3 ml de sangre periférica.
- Se colocó la sangre en un tubo de ensaye con EDTA.
- Se realizó extracción de DNA con PerfectPure™ DNA Blood Kit.

En todas las muestras obtenidas se llevó a cabo un análisis espectrofotométrico con lecturas a una longitud de onda de 260 y 280 nm. La concentración de DNA fue calculada mediante la siguiente relación:

$$1 \text{ DO}_{260} = 50 \text{ mg de DNA/ml.}$$

La pureza del DNA se obtuvo mediante la relación de las densidades ópticas obtenidas con las lecturas 260/280 nm y se consideró como

óptima una relación 1.8-2.0. Para determinar la calidad de las muestras se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio al 0.0002%.

#### Extracción de DNA de líquido amniótico

Para la extracción de DNA de líquido amniótico se utilizó el kit QIAvac 24 Plus. Se colocaron 20 µl de proteasa QIAGEN en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se añadió 200µl de la muestra junto con 200 µl de Buffer AL y se mezclaron con vortex por 15 segundos. El tubo se incubó por 10 minutos a 56°C. Posteriormente se centrifugó brevemente y se añadió 200 µl de etanol (96-100%), se mezcló de nuevo con vortex por 15 segundos. Después de mezclar se centrifugó. Se utilizó una minicolumna QIAamp para colocar la muestra que obtuvimos en el paso anterior y se sometió a vacío con la tapa del tubo abierta. Después se añadió 750 µl de buffer AW1 y se colocó en la cámara de vacío. Una vez que el buffer se secó, sacamos el tubo de la cámara. Se añadió de nuevo 750 µl de buffer AW2 y se introdujo de nuevo en la cámara de vacío hasta que se secó por completo y se cerró la tapa de la minicolumna. Se colocó la minicolumna en un tubo limpio de 2 ml y se centrifugó a 20,000 x g (14,000rpm) por un minuto para secar la membrana por completo. Se colocó la minicolumna en un nuevo tubo de 1.5 ml y se desechó el tubo que contenía el filtrado. Se añadió 200 µl de buffer AE o agua destilada al nuevo tubo y se centrifugó a 6,000 x g (8,000rpm) por un minuto.

### Análisis de Reacción en cadena de la polimerasa

Se analizarán los 8 exones y las uniones exón-intrón del gen de la 17 $\alpha$ -hidroxilasa, los 9 exones del gen 11 $\beta$ -hidroxilasa y los 4 exones del gen *HSD3B2*. La amplificación del DNA se realizó a través de la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los reactivos necesarios para realizar esta reacción se observan en la tabla 2.

Tabla2. Parámetros de la reacción

REACTIVOS
Buffer con Mg 10X
MgCl <sub>2</sub> 25mM
dNTPs 10mM
Oligonucleótidos 100mM
Taq Polimerasa Gold 5U $\mu$ l
Agua 25ml

La mezcla de los reactivos anteriores forma la Master Mix a la cual se le agregó el DNA obtenido de cada paciente. Esta muestra se colocó en el termociclador GeneAmp PCR System 2700 de Applied Biosystems, para la amplificación se utilizaron las condiciones de las tablas 3 y 4 (tablas 3 y 4).

Tabla 3. Condiciones de PCR de los genes *CYP17A1* y *CYP11B1*

<i>CYP17A1</i>		<i>CYP11B1</i>	
94°C	2 minutos	94°C	5 minutos
94°C	30 segundos	94°C	1 minuto
58°C	45 segundos	65°C	1 minuto
72°C	15 segundos	72°C	1 minuto
72°C	2 minutos	72°C	2 minutos

Tabla 4. Condiciones de PCR para el gen *HSD3B2*

<i>HSD3B2</i>									
Exón 1 y 2		Exón 3		Exón 4 A y B		Exón 4 C		Exón 4 D	
94°C	10 minutos	94°C	8 minutos	94°C	8 minutos	94°C	8 minutos	94°C	8 minutos
94°C	1 minuto	94°C	30 segundos	94°C	1 minuto	94°C	1 minuto	94°C	1 minuto
55°C	1 minuto	50°C	30 segundos	55°C	1 minuto	64°C	1 minuto	54°C	1 minuto
72°C	1 minuto	72°C	30 segundos	72°C	1 minuto	72°C	1 minuto	72°C	1 minuto
72°C	7 minutos	72°C	7 minutos	72°C	7 minutos	72°C	7 minutos	72°C	7 minutos

Para el gen de 17 $\alpha$ -hidroxilasa se utilizaron 8 pares de oligos que se muestran en la tabla 5, junto con la temperatura de alineamiento de cada uno y el tamaño esperado del fragmento amplificado. Para el gen de 11 $\beta$ -hidroxilasa se utilizaron 6 pares y 7 oligos independientes que se muestran en la tabla 6. Para el gen de 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa se utilizaron 5 pares de oligos y un oligo independiente que se muestran en la tabla 7.

Tabla 5. Productos amplificados por PCR del gen *CYP17A1*

Exón	Oligonucleótido	Temp. de alineamiento	Fragmento amplificado
Exón 1	5'-CACTGCTGTCTATCTTGCC-3'	58	474
	5'-CCTTCACATCATCCCACTA-3'	56	
Exón 2	5'-AGGGACCAGAGGTGTAAG-3'	52	339
	5'-GCAGCAGTAGCCAAGAA-3'	48	
Exón 3	5'-AGGGTGCTGATTCATTC-3'	52	414
	5'-GCAGAGGAGGTAGAGGTG-3'	58	
Exón 4	5'-CGCTTGATGTTTGATTGA-3'	50	396
	5'-CACCTGCTCTTGTGATT-3'	54	
Exón 5	5'-ACAGAAGTATGGCAGGAGT-3'	56	593
	5'-CCAGAGTAGGTTGGAGGT-3'	56	
Exón 6	5'-ACTGGGAAGGGAACTGGA-3'	56	314
	5'-GGCTAGATGTCACTGGGAG-3'	60	
Exón 7	5'-AGTGGGAATGAGGGAGTA-3'	54	356
	5'-GTCAACAGGTCCGTATAGTT-3'	58	
Exón 8	5'-TCAACCAGGGCAGAACC-3'	54	446
	5'-GGAAGAATGGCGGAGAA-3'	52	

Tabla 6. Productos amplificados por PCR del gen *CYP11B1*

Exón	Oligonucleótido	Temp. de alineamiento	Fragmento amplificado
Exón 1-2	5'-TCGAAGGCAAGGCACCAG-3'	58	873
	3'-GCTCCCAGCTCTCAGCT-5'	56	
Exón 3-5	5'-AGAAAATCCCTCCCCCTA-3'	58	1409
	3'-GACACGTGGGCGCCGTGTGA-5'	68	
Exón 6-9	5'-TGACCGTGCAGCTGTGTCT-3'	60	1541
	3'-GAGACGTGATTAGTTGATGGC-5'	66	
Exón 2	5'-GAGACAGTTTGGATTGGGACTGC-3'	70	265
Exón 3	5'-GGACAAGGAGGATGGGATA-3'	60	1151
Exón 4	5'-GGACTGAAGGGAGTGTG-3'	54	811
Exón 5	5'-GGATGTTTCCAGCACCAAAGTC-3'	70	297
Exón 7	5'-GGTGCAGAGAGCACAGG-3'	56	1014
Exón 8	5'-CCTCGAGCTGAGAACCTCC-3'	62	852
Exón 9	5'-TGCAACTTTGAGGGTCTGAGAAG-3'	68	205

Tabla 7. Productos amplificados por PCR del gen *HSD3B2*

Exón	Oligonucleótido	Temp. de alineamiento	Fragmento amplificado
Exón 1-2	5'-AGAGCATAAAGCTCCAG -3'	50	502
	3'-CCACACCCATGCAGAGT -5'	54	
Exón 3	5'-CCAATGACCTGACCTGT -3'	50	227
	3'-CCAACTTGTTTTATCTC -5'	46	
Exón 4AB	5'-TGTGGTTGCAGCTCCTT -3'	52	
Exón 4A	3'-AGACTGGGTTGACTGTA-5'	48	422
Exón 4B	3'-ACCCATTAGCGGCCAGC-5'	56	263
Exón 4C	5'-GCCCATTCCTTTCTGCC -3'	54	561
	3'-GCACATCTCTGTCATCC-5'	52	
Exón 4D	5'-GTGTCCGAGGTCAATTC -3'	52	435
	3'-GAGTTTGATGACATTC-5'	46	

Se realizó una electroforesis con los productos amplificados en un gel de agarosa al 1.5%.

#### Purificación de los productos de PCR

La purificación de los productos de PCR a partir del gel de agarosa se realizó utilizando el Kit QIAEX II gel Extraction (Qiagen, Chatsworth, CA USA). Se cortó la banda del gel con el producto amplificado, se colocó en tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, se pesó y agregó buffer QX1 pH 7.5 y 6 µl de la resina QX2, se agitó la mezcla, se colocó a 55 °C durante 15 minutos (agitando cada 3 minutos). Una vez disuelta la agarosa, ésta se eliminó mediante centrifugación durante 1 minuto a 9,221 g; se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 500 µl de buffer QX 1, se agitó vigorosamente y se centrifugó en las mismas condiciones antes mencionadas. Una vez que se decantó el sobrenadante, el exceso de buffer se retiró con una pipeta hasta dejar

únicamente el botón que contenía el DNA, el cual fue resuspendido en 350  $\mu$ l de buffer PE (que contiene principalmente alcohol). Se centrifugó nuevamente y se lavó con Buffer PE; una vez que se decantó se colocó a 55°C durante 10 minutos hasta que se secó la muestra, la cual se resuspendió en un volumen de 27  $\mu$ l con agua destilada y deionizada. Se incubó durante toda la noche a 4°C, para centrifugarse en las mismas condiciones, el sobrenadante fue recuperado y se utilizó como templado.

#### Secuenciación automatizada directa por método Sanger

Se realizó una reacción de secuencia utilizando los productos purificados por medio de una reacción de PCR de una sola cadena y se incorporaron dNTPs marcados con fluorescencia usando el reactivo Big Dye (Applied Biosystems). El programa de amplificación que se utilizó es el siguiente (tabla 8):

Tabla 8. Condiciones de la reacción de secuencia

96 °C	1 minuto
96 °C	30 segundos
50 °C	15 segundos
60 °C	2 minutos

#### Purificación DNA

Se realizó mediante columnas con el kit Center-Sep (Spin Columns) de Princeton Separations. Se colocaron 2 tubos, cada uno con un oligo diluido (1mM). Para la hidratación de las columnas, éstas se lavaron con agua destilada y se agregó 0.06 gr de sephadex; una vez que

estuvieron secas y limpias. Se agregó 800  $\mu$ l de agua destilada y se hidrataron por 2 horas. Se colocaron en tubos de 2 ml y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 3 minutos para eliminar el exceso de agua. La columna se colocó en tubos de 500  $\mu$ l, se agregó el producto de PCR (obtenido del paso anterior) sin tocar el sephadex y se centrifugó a 3,000 rpm por 3 minutos. Se dejó secar el producto con desecador o ventilación y se resuspendió en 20  $\mu$ l de TSR (Template Supresión Reagent). Para la secuenciación del producto de DNA secuencia específica, éste se desnaturalizó incubándose a 95 °C por 5 minutos e inmediatamente después se colocó en hielo.

## RESULTADOS

En la Familia 1 se estudiaron dos casos con diagnóstico clínico de hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa, III. 3 y III. 10; se realizó el estudio molecular analizando los 9 exones del gen *CYP11B1* y se observaron alteraciones en dicho gen. Ambos casos presentaron una transición homocigota de una citocina (CCC) por una timina (CTC) en la posición 4791 del exón 8 (Figura 11), esta sustitución provoca un cambio de una prolina por una leucina en el aminoácido 442 (Figura 11 y 12).

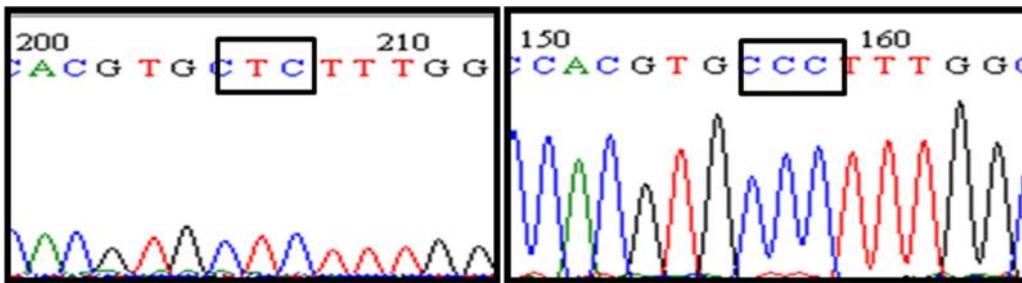


Figura 11. Electroferograma parcial de la secuencia del gen *CYP11B1* del paciente III. 3. El electroferograma muestra la mutación C>T.g.4791 en la secuencia del gen *CYP11B1*, lo que condiciona la sustitución de prolina por leucina.

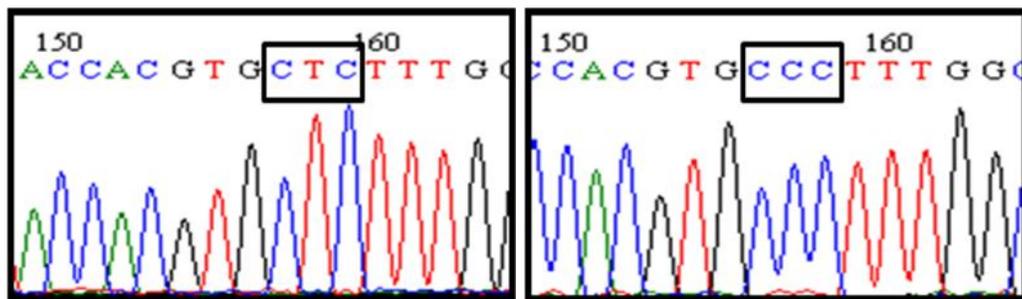


Figura 12. Electroferograma parcial de la secuencia del gen *CYP11B1* del paciente III. 10. El electroferograma muestra la mutación C>T.g.4791 en la secuencia del gen *CYP11B1*, lo que condiciona la sustitución de prolina por leucina.

En la Familia 2 se estudió al paciente II. 1 con datos compatibles de hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa y se analizó el líquido amniótico de II. 2 para los 9 exones del gen *CYP11B1*. En ambos se encontró una inserción homocigota de 11 nucleótidos ACAGTACACCA en la posición 3467 del exón 5 (Figura 13 y 14).

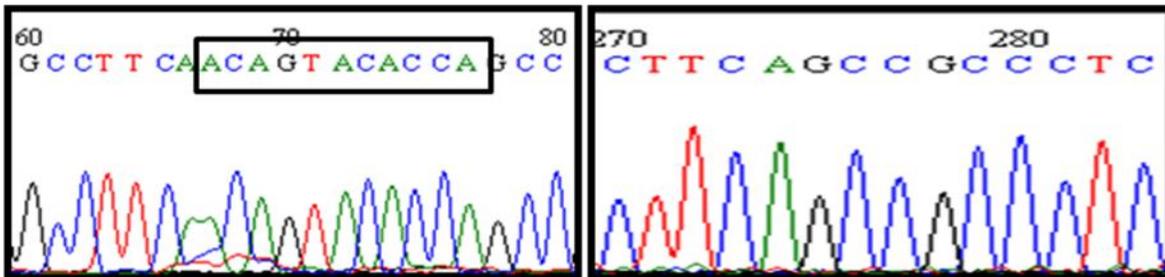


Figura 13. Electroferograma parcial de la secuencia del gen *CYP11B1* del paciente II. 1. El electroferograma muestra la inserción de 11 bases en el exón 5, lo que ocasiona cambio en el marco de lectura de la proteína.

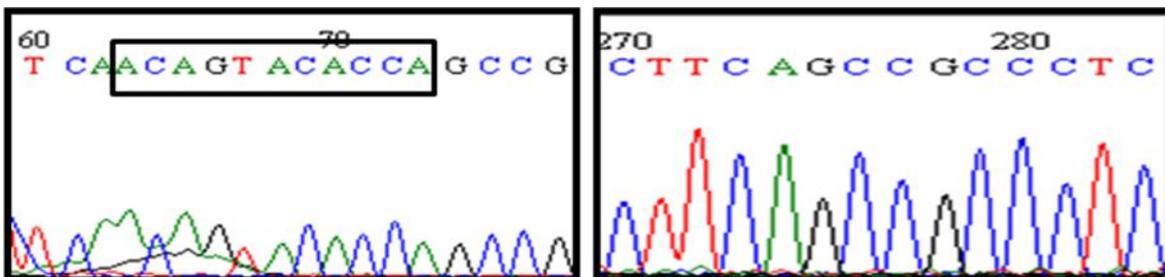


Figura 14. Electroferograma parcial de la secuencia del gen *CYP11B1* del paciente II.21. El electroferograma muestra la inserción de 11 bases en el exón 5, lo que ocasiona cambio en el marco de lectura de la proteína.

En la familia 3 sólo se estudió a un individuo, el caso II. 5 con datos clínicos de hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa; se secuenciaron los 8 exones del gen *CYP17A1* encontrando una transversión homocigota de una citocina (TCA) por una adenina (TAA) en el exón 5, esta sustitución provoca un cambio de

una serina por un codón de paro en el aminoácido 288 (S246X) (Figura 15).

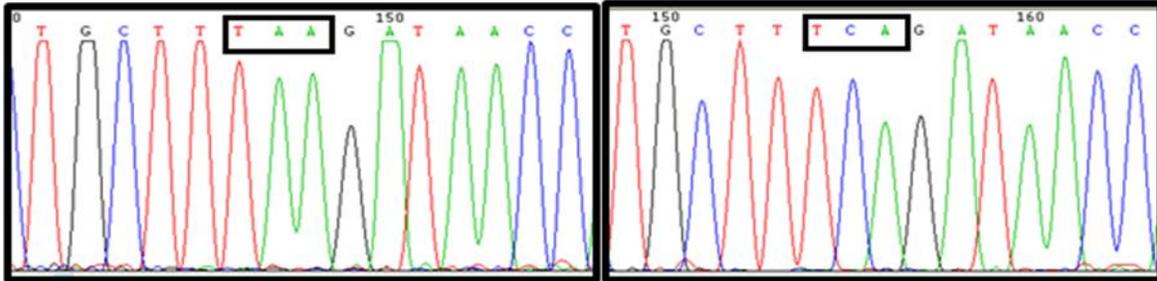


Figura 15. Electroferograma parcial de la secuencia del gen *CYP17A1* en el paciente II. 5. El electroferograma muestra el triplete 246 que codifica para serina. Se muestra una sustitución de C>A en la segunda base del triplete que origina un codón de paro.

En la familia 4 se estudió el caso III. 13 con datos compatibles con hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia de  $17\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa; se secuenciaron los 8 exones del gen *CYP17A1* encontrando una transversión homocigota de una citocina (TCA) por una adenina (TAA) en el exón 5, esta sustitución provoca un cambio de una serina por un codón de paro en el aminoácido 288 (S246X).

En la familia 5 se estudiaron 2 casos, el II. 5 y II. 7 compatibles con hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia de  $17\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa. El resultado del cariotipo de la paciente II.7 fue 46, XY. Se encuentra pendiente el resultado de la secuenciación de los 8 exones del gen.

En la familia 6 se estudió a la familia nuclear: se identificó que la madre era heterocigota para la mutación K110X y el padre heterocigoto para la mutación R362H y el caso índice fue un

heterocigoto compuesto. Ambas mutaciones no han sido reportadas en la literatura. La primera es una mutación sin sentido que consiste en la inserción de una timina en la posición 2758 del exón 2 que cambia una lisina (AAG) por un codón de paro (TAA) designada como K110X (Figura 16). El segundo alelo contenía una mutación de sentido equivocado que consistía en la transición de una guanina por una adenina en la posición 5555 en el exón 6 que cambia una arginina (CGC) por histidina (CAC) designada como R362H (Figura 16). También se encontró que la paciente era heterocigota para 4 polimorfismos previamente descritos, 2 en el exón 1 (rs6162 [T/C]), rs6163 [G/T]), otro en el intrón 3 (rs1004467 [T/C]), y uno en el intrón 6 (rs17115100 [C/A]).

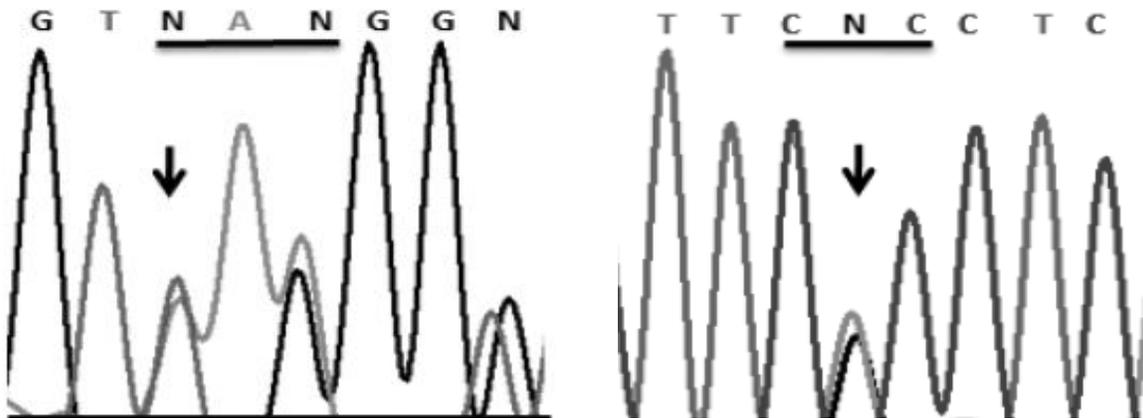


Figura 18. Electroferograma parcial de la secuencia del gen *CYP17A1* del paciente II. 1. Se observa el triplete 110 del gen *CYP17A1* que codifica para lisina, muestra la inserción de una T en la posición 2758 que genera un codón de paro. También muestra la sustitución de G>A en la posición 5555 del exón 6 que cambia una arginina por una histidina.

El estudio de las mutaciones en ambos padres mostró que la madre era heterocigota para la mutación K110X y el padre heterocigoto para la mutación R362H. El estudio de los polimorfismos reveló que el padre era homocigoto para los 4 polimorfismos, mientras que la madre fue homocigota sólo para algunos de los alelos.

Para investigar la expresión y localización de la proteína mutada en el tejido gonadal de la paciente, se realizaron estudios de inmunofluorescencia. No se encontró proteína inmunorreactiva en el tejido testicular de la paciente en comparación de un testículo control normal (Imagen 4 y 5). Para corroborar que la ausencia de proteína fuera debido a la mutación y no al daño testicular se realizó inmunohistoquímica de la enzima esteroidogénica  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la cual se identificó tanto en la paciente como en el control.

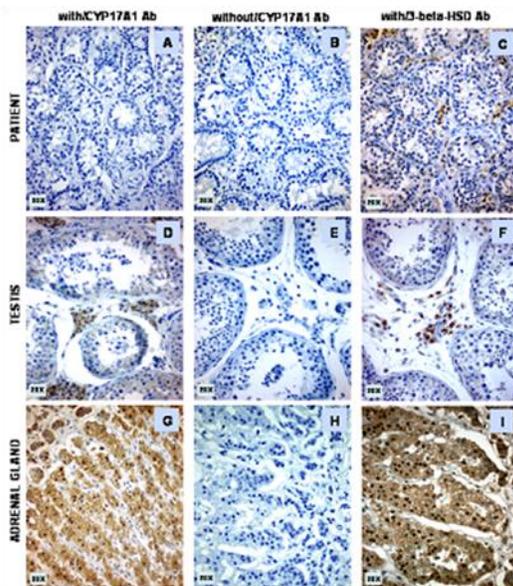


Imagen 4. Inmunohistoquímica de CYP17A1. (A) Señales negativas en tejido testicular del paciente para CYP17A1. (B, E, H) Control negativo de tejido testicular del paciente, testículo normal y glándula suprarrenal con anticuerpos secundarios. (D) Testículo normal positivo en células de Leydig. (G) Glándula adrenal positiva en células corticales. (C, F, I) Inmunohistoquímica para  $3\beta$ -HSD en tejido del paciente y normal positivos.

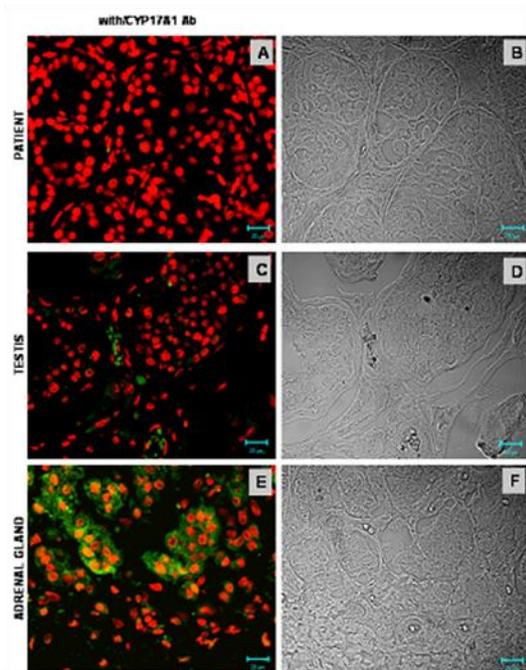


Imagen 5. Análisis confocal. (A) Ausencia de inmunofluorescencia de CYP17A1 en tejido testicular de la paciente. (C) Testículo normal con inmunofluorescencia positiva en células de Leydig. (E) Glándula adrenal con inmunofluorescencia positiva en células corticales. (B, D, E) Microscopía óptica del tejido afectado.

De las 31 pacientes estudiadas con datos clínicos de hiperandrogenismo y sospecha de deficiencia de  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, se secuenciaron los 4 exones del gen sin encontrar alguna mutación.

## DISCUSIÓN

La hiperplasia suprarrenal congénita es un grupo de enfermedades autosómico recesivas, resultado de la deficiencia de una de las cinco enzimas implicadas en la síntesis del cortisol en la corteza suprarrenal. La más común es la deficiencia de 21-hidroxilasa, que causa más del 90% de los casos (Speiser W y cols, 2003). La HSC hace referencia a las alteraciones histológicas características secundarias a la elevación de la hormona ACTH y a la hiperactividad crónica de la glándula por incapacidad de la corteza adrenal de producir niveles plasmáticos de cortisol adecuados en respuesta a la estimulación normal de ACTH. Esta incapacidad es debida a un bloqueo enzimático en las diferentes etapas de la vía de esteroidogénesis (Rimoin D y cols, 2007). Es importante enfatizar que existen formas menos frecuentes de HSC, en este trabajo de tesis realizamos un estudio clínico y molecular del abordaje en 9 casos con manifestaciones clínicas de formas no clásicas de HSC por deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa, 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa y 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa que llegaron en los últimos 3 años al Hospital General de México.

Se trabajó en 6 casos familiares con un total de 9 afectados, además de 31 pacientes femeninas pediátricas con datos de hiperandrogenismo idiopático. En dos de los casos familiares se llegó al diagnóstico clínico y molecular de HSC por deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa; clínicamente esta patología se caracteriza por presentar elevación en la tensión arterial en edad temprana por sobreproducción de DOCA. En los casos 46, XX se observa ambigüedad

genital secundaria a virilización de los genitales externos, por lo que se considera un TDS 46, XX y en los casos 46, XY se observa pseudopubertad precoz con aparición temprana de caracteres sexuales secundarios como resultado de un exceso de andrógenos (Li-Qiang y cols, 2008).

La HSC por deficiencia de  $11\beta$ -hidroxilasa es la segunda causa de HSC abarcando el 5% de los casos (John M y cols, 2009), con una incidencia de 1 en 100,000 nacimientos (Wilson J y cols, 1998). En los judíos Moroccan esta deficiencia tiene una incidencia de 1 en 5,000 nacimientos y se ha reportado que la mutación R448H es la más frecuente en esta población (Li-Qiang y cols, 2008, Paperna T y cols, 2005). Hasta la fecha no existe una estadística o mutaciones específicas reportadas en la población mexicana.

En las dos familias presentadas en este trabajo, los pacientes afectados (familia 1, pacientes III.3 y III.10 y familia 2, paciente II.1) presentaron hipertensión arterial; en los pacientes con cariotipo 46, XX se presentó ambigüedad genital con datos de virilización, mientras que en el caso II.1 con cariotipo 46, XY, se observó pseudopubertad precoz. Con respecto a la talla, es importante mencionar que los pacientes en etapa infantil (III.10 de la familia 1 y II.1 de la familia 2) se presentaron con talla mayor a la percentila 97, y que el paciente que llegó en edad adulta (III.3 de la familia 1) presentó talla por debajo de la percentila 3, lo que nos habla del aumento importante en la talla durante la infancia por el exceso de andrógenos y el subsecuente cierre prematuro de las epífisis que limita el crecimiento normal.

El caso II.1 de la familia 2 se presentó en la consulta con datos de virilización e hipertensión arterial por lo que fue prioridad descartar la presencia de un

tumor adrenal (Riveiro R y col, 2000). Una vez desechada esta posibilidad se pensó en la deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa.

En ambas familias la genealogía confirmó el patrón hereditario autosómico recesivo.

Los datos de laboratorio fueron compatibles con lo esperado para el bloqueo enzimático y en estos casos el diagnóstico clínico inicial en el departamento de Genética y Endocrinología fue el de hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa. En todos los casos el diagnóstico clínico fue corroborado con estudio molecular del gen *CYP11B1*. En el caso II.2 de la familia 2, se realizó diagnóstico prenatal y se inició oportunamente el tratamiento, actualmente el paciente no presenta datos de virilización ni elevación de la presión arterial.

Existen alrededor de 68 mutaciones reportadas en la literatura; las dos mutaciones encontradas en las familias 1 y 2 no han sido previamente reportadas.

La porción sulfhidrilo de Cys450 en P450c11 compone el quinto sitio de coordinación de la zona de unión al hierro. Este residuo se encuentra altamente conservado en el sistema del citocromo P450, y los péptidos cercanos también se encuentran conservados. Se ha visto que mutaciones de sentido equivocado cerca de esta región llevarían a pérdida de la actividad enzimática de 11 $\beta$ -hidroxilasa (Li-Qiang y cols, 2008). Por lo tanto, podemos suponer que la mutación P442L, tiene el mismo efecto antes mencionado.

Las inserciones pueden causar alteraciones en la transcripción del DNA (cambio en el marco de lectura) y afectar la producción de RNAm y de la

proteína (Li-Qiang y cols, 2008). También se puede suponer que la mutación encontrada en la familia 2 tiene este mismo efecto.

La HSC por deficiencia de  $17\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa es una causa poco frecuente de hiperplasia suprarrenal y las mutaciones descritas causan deficiencia aislada o combinada de P450c17. Clínicamente se caracteriza por presentar hipertensión, hipokalemia, ausencia de caracteres sexuales secundarios y amenorrea primaria en los individuos 46, XX, mientras que los individuos con cariotipo 46, XY son considerados dentro del grupo de TDS 46,XY antes denominados pseudohermafroditas masculino, ya que de acuerdo a la actividad enzimática residual presentan diversas alteraciones en la virilización y ausencia de desarrollo puberal (Brooke A y cols, 2006). En los pacientes estudiados, 4 tuvieron cariotipo 46, XY y sólo uno tuvo cariotipo 46, XX. Todos los casos presentan amenorrea primaria y falta de desarrollo de caracteres sexuales secundarios.

El caso II.5 de la familia 3 fue ingresado al servicio de Medicina Interna por presentar una crisis de hipokalemia que llevó a parálisis en los miembros inferiores; durante su estancia hospitalaria se integró el diagnóstico inicial de Hipertensión arterial sistémica con probable Síndrome de Bartter por las alteraciones electrolíticas encontradas. Se interconsultó al servicio de Genética para realizar un diagnóstico integral y sumando el antecedente de amenorrea primaria con la exploración física donde observamos infantilismo sexual e hipertensión, se sospechó una alteración de la glándula suprarrenal por lo que se solicitó cariotipo y estudio molecular para secuencias del cromosoma Y, las cuales fueron positivas. Con estos datos se llegó al

diagnóstico de hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa y fue corroborado por medio del estudio molecular.

Los casos III.13 de la familia 4 y II.5 de la familia 5 se presentan a la consulta por amenorrea primaria, infantilismo sexual e hipertensión; el caso II.7 de la familia 5 no ha presentado elevación de la presión arterial pero tiene el antecedente de la hermana afectada por lo que en los casos se sospecha el diagnóstico de HSC por deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa.

En la familia 6 el diagnóstico inicial fue de DGP 46, XY sin embargo después de la laparoscopia se presentó HTAS por lo que se sugirió el diagnóstico de hiperplasia suprarrenal por deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa. En todos los casos el diagnóstico fue corroborado mediante estudio molecular.

Hasta el momento se han reportado cerca de 72 mutaciones en la literatura y las encontradas en nuestras familias nunca han sido reportadas.

La mutación S246X encontrada en las familias 3 y 4 es una transversión que genera un codón de alto prematuro, truncando la proteína y de esta manera disminuyendo su función. Debido a que sólo una de las pacientes presentó crisis hipokalémica en la edad adulta, podemos suponer que existe cierta actividad residual de la enzima.

En la familia 6 el estudio molecular demostró una mutación heterocigoto compuesto, K110X/R362, que no ha sido reportada. EL codón de alto prematuro en K110X generó una pérdida de 399 aminoácidos, dejando posiblemente, una proteína truncada de 109 aminoácidos sin actividad enzimática. La sustitución de arginina por histidina en la posición 362 en la mutación R362H está localizada en un espacio tridimensional contiguo al extremo carboxilo terminal de la proteína. Este sitio tiene 2 importantes

funciones: es crítico para la unión del grupo hemo y juega un papel estructural en el mantenimiento del dominio de plegamiento. R362 es parte del motivo ExxR en el extremo C-terminal de la hélice K, un motivo conservado en todas las enzimas del citocromo P450 conocidos (Costa-Santos M y cols, 2004; Wong GS y cols, 2007). El análisis de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia orientan a pensar que el alelo con el codón de alto genera una proteína pequeña e inestable que no se traduce, y también sugieren que la sustitución de sentido equivocado no sólo tiene un impacto negativo en la función de la proteína, sino que también afecta la estructura de la proteína, al alterar el dominio de plegamiento y favoreciendo la degradación de la proteína.

Es importante destacar que las familias 1, 3, 4 y 5 provienen de comunidades endogámicas para las enfermedades diagnosticadas. Es por esto que podemos suponer que existe un efecto fundador.

En la literatura se encuentran reportadas mutaciones específicas para diferentes poblaciones étnicas alrededor del mundo, y en todas se sospecha la presencia de un efecto fundador (Yang J y cols, 2006).

La deficiencia de  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tiene un espectro clínico muy variable, que va desde la forma perdedora de sal con o sin ambigüedad de genitales, la variedad no perdedora de sal con ambigüedad de genitales y/o pubarca prematura en jóvenes, hasta hirsutismo y alteraciones menstruales en mujeres adultas (Mermejo L y cols, 2005). Dentro del abordaje de las pacientes con hiperandrogenismo idiopático está

indicada la búsqueda de formas no clásicas de HSC. En la literatura se menciona que del 2-5%, según la población, presentan una forma tardía no clásica de HSC caracterizada por hiperandrogenismo y Síndrome de ovarios poliquísticos (Willenberg H y cols, 2008). Dado el espectro clínico tan variable de la deficiencia de 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, decidimos estudiar la frecuencia de esta deficiencia en nuestra población de pacientes hiperandrogénicas con SOP.

Todas las pacientes estudiadas presentaban datos de hiperandrogenismo como hirsutismo, irregularidades menstruales, dismenorrea y acné.

Después de secuenciar los 4 exones del gen *HSD3B2* no se encontró ninguna alteración. Por lo tanto, podemos deducir que la deficiencia de 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa no parecería ser una causa de hiperandrogenismo y SOP en niñas mexicanas.

## CONCLUSIONES

Se realizó estudio molecular de las formas no clásicas de HSC en 9 pacientes provenientes de 6 familias distintas.

En los casos con deficiencia de  $11\beta$ -hidroxilasa, las características clínicas y los valores de laboratorios corresponden con los datos reportados en la literatura, lo que facilitó el diagnóstico clínico. En todos los pacientes el estudio molecular corroboró el diagnóstico y las mutaciones identificadas específicas no han sido previamente reportadas.

Se estandarizó la técnica de extracción de DNA de amniocitos con el fin de poder realizar diagnóstico prenatal molecular en el Servicio de Genética.

En las pacientes con deficiencia de  $17\alpha$ -hidroxilasa/ $17,20$ -liasa el abordaje y diagnóstico presentó complicaciones, independientemente de los datos clínicos, el primer diagnóstico fue otro. En la familia 3 se sospechó en Síndrome de Bartter y en la familia 6 se diagnosticó DGP. El abordaje multidisciplinario y el estudio molecular corroboraron el diagnóstico de manera definitiva.

La experiencia adquirida permitió integrar un diagnóstico rápido en la familia 4 y 5.

Las mutaciones encontradas tampoco han sido reportadas en la literatura.

Las mutaciones identificadas en este trabajo y el antecedente de la procedencia de las familias, sugiere un efecto fundador en los estados de Oaxaca y Chiapas para la deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa y 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa.

La deficiencia de 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa no es una causa de hiperandrogenismo en las mujeres de nuestra población.

El trabajo conjunto con los servicios de Medicina Interna y Endocrinología permitió un mejor conocimiento de estas patologías.

El presente trabajo permitió implementar y unificar el abordaje, se establecieron lineamientos diagnósticos y de manejo que serán aplicados en el futuro a los pacientes que lleguen al Hospital General de México con la sospecha de las formas no clásicas de hiperplasia suprarrenal congénita.

## REFERENCIAS

**Antal Z**, Zhou P. Congenital Adrenal Hyperplasia: Diagnosis, Evaluation, and Management, *Pediatrics in Review* Vol.30 No.7 July 2009.

**Biason- Lauber A**, Kempken B, et al. 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase Deficiency as a Model to Study Enzymatic Activity Regulation: Role of Phosphorylation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85: 1226–1231, 2000.

**Brooke A**, Taylor N et al. A Novel Point Mutation in P450c17 (CYP17) Causing Combined 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17, 20-Lyase Deficiency, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91(6):2428–2431, 2006.

**Carbunaru G**, Prasad P, et al. The Hormonal Phenotype of Nonclassic 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase (HSD3B) Deficiency in Hyperandrogenic Females Is Associated with Insulin-Resistant Polycystic Ovary Syndrome and Is Not a Variant of Inherited HSD3B2 Deficiency, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89(2):783–794, 2004.

**Cerame B**, Newfield R, et al. Prenatal Diagnosis and Treatment of 11 $\beta$ -Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia Resulting in Normal Female Genitalia, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84: 3129-3134, 1999.

**Charmandari E**, Brook C, Hindmarsh P. Classic congenital adrenal hyperplasia and puberty. *European Journal of Endocrinology*, 151 U77–U82 ISSN 0804-4643, 2004.

**Codner E**, Okuma C, et al. Molecular Study of the 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Gene Type II in Patients with Hypospadias. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(2):957–964, 2004.

**Costa –Santos M**, Kater C, et al. Two Prevalent *CYP17* Mutations and Genotype-Phenotype Correlations in 24 Brazilian Patients with 17-Hydroxylase Deficiency, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89(1):49–60, 2004.

**Di Cerbo A**, Biason-Lauber A, et al. Combined 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17, 20-Lyase Deficiency Caused by Phe93Cys Mutation in the *CYP17* Gene, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87(2):898–905, 2002.

**Draper N**, Stewart P. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *Journal of Endocrinology* 186, 251–271pp, 2005.

**Grigorescu A**, Weber M, et al. 21-Hydroxylase and 11 $\beta$ -Hydroxylase Mutations in Romanian Patients with Classic Congenital Adrenal Hyperplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(10):5769–5773, 2005.

**John M**, Menon S K, et al. Congenital adrenal hyperplasia 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency: two cases managed with bilateral adrenalectomy, *Singapore Med J* 50(2): e68 ,2009.

**Krone N**, Dhir V, et al. Congenital adrenal hyperplasia and P450 oxidoreductase deficiency, *Clinical Endocrinology* 66, 162–172, 2007.

**Lajic S**, Nordenström A, et al. Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia, *European Journal of Endocrinology* 151 U63–U69, 2004.

**Li-Qiang Z**, Su Han, Hao-Ming T. Progress in molecular-genetic studies on congenital adrenal hyperplasia due to 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency, *World J Pediatr*, Vol 4 No 2 May 15, 2008.

**Martin E.** Prenatal dexamethasone treatment of fetuses at risk for congenital adrenal hyperplasia: benefits and concerns. *Semin Neonatol* 2001; 6: 357–362

**Martin R,** Lin C, et al. P450c17 Deficiency in Brazilian Patients: Biochemical Diagnosis through Progesterone Levels Confirmed by *CYP17* Genotyping, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88(12):5739–5746, 2003.

**Martin R,** Oliveira P, et al. Combined 17 Alpha-Hydroxylase/17,20-Lyase Deficiency due to a Homozygous 25 BP Duplication (NT 4157-4181) at Exon 5 in the *CYP17* Resulting in a Premature Stop Codon Predicted by Molecular Modeling, *Arq Bras Endocrinol Metab* 52/8 1317, 2008.

**Mermejo L,** Elias L, et al. Refining Hormonal Diagnosis of Type II 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Deficiency in Patients with Premature Pubarche and Hirsutism Based on *HSD3B2* Genotyping, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90(3):1287–1293, 2005.

**Müssig K,** Kaltenbach S, et al. 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase Deficiency Caused by a Novel Homozygous Mutation (Y27Stop) in the Cytochrome *CYP17* Gene. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(7):4362–4365, 2005.

**New M.** Nonclassical 21-Hydroxylase Deficiency, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91(11):4205–4214, 2006.

**Nimkarn S,** Lin-Su K, New M. Steroid 21Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin N Am* 38, 2009, pp. 699–718.

**Paperna T**, Gershoni-Baruch R. Mutations in *CYP11B1* and Congenital Adrenal Hyperplasia in Moroccan Jews, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90(9):5463–5465, 2005.

**Payne A**, Hales D. Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones, *Endocrine Reviews*, December 2004, 25(6):947–970.

**Rimoin D**, Connor J, et al. Emery and Rimoin's. Principles and Practice of Medical Genetics, Ed. Elsevier, 5<sup>a</sup> ed, 2007.

**Riveiro R**, Michalkiewicz E, et al. Adrenocortical tumors in children, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2000) 33: 1225-1234.

**Rivkees S**, Stephenson K. Low-Dose Dexamethasone Therapy from Infancy of Virilizing Congenital Adrenal Hyperplasia, *International Journal of Pediatric Endocrinology*, Volume 2009.

**Robin E**, Gorstein F, et al. Patología estructural. Fundamentos clinicopatológicos en Medicina, Ed. McGrawHill Interamericana, 4<sup>a</sup> ed, 2005, 1440pp.

**Rosa S**, Duff C. et al. P450c17 Deficiency: Clinical and Molecular Characterization of Six Patients, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92(3):1000–1007, 2007.

**Sadler T. Langman**. Embriología Médico con Orientación Clínica. Ed. Panamericana, 8<sup>a</sup> ed., Argentina, 2001, 482pp.

**Siew-Lee W**, San-Ging S, Chi-Ren T. Seventeen Alpha-hydroxylase Deficiency. *J Formos Med Assoc* 2006;105(2):177-18.

**Simard J**, Ricketts M. Molecular Biology of the 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/D5-D4 Isomerase Gene Family, *Endocrine Reviews* 26(4):525–582, 2005.

**Speiser N**, White P. Congenital Adrenal Hyperplasia, *The New England Journal of Medicine*, 2003; 349:776-88.

**Speiser S**. Nonclassic adrenal hyperplasia, *Rev Endocr Metab Disord* 10:77–82, 2009.

**Tian Q**, Yao F, et al. Genotyping of a Chinese family with 46, XX and 46, XY 17-hydroxylase deficiency, *Gynecological Endocrinology*, August; 25(8): 485-490, 2009.

**Tomlinson J**, Walker E, et al. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1: A Tissue-Specific Regulator of Glucocorticoid Response. *Endocrine Reviews* 25(5):831–866, 2004.

**Tonetto-Fernandes V**, Lemos-Marini S. Serum 21-Deoxycortisol, 17-Hydroxyprogesterone, and 11-Deoxycortisol in Classic Congenital Adrenal Hyperplasia: Clinical and Hormonal Correlations and Identification of Patients with 11 $\beta$ -Hydroxylase Deficiency among a Large Group with Alleged 21-Hydroxylase Deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91(6):2179–2184, 2006.

**Van den Akker E**, Koper J, et al. Differential Inhibition of 17 $\alpha$ -Hydroxylase and 17, 20-Lyase Activities by Three Novel Missense CYP17 Mutations Identified in Patients with P450c17 Deficiency, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87(12):5714–5721, 2002.

**Willenberg H**, Bahlo M. Helpful diagnostic markers of steroidogenesis for defining hyperandrogenemia in hirsute women, *Steroids* 73; 41–46, 2008.

**Wilson J**, Foster D, et al. *Williams Textbook of Endocrinology*, Ed. Saunders, 9<sup>th</sup> ed, 1819pp.

**Won GS**, Chiu CY, Tso YC, et al. A compound heterozygous mutation in the CYP17 (17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20- lyase) gene in a Chinese subject with congenital adrenal hyperplasia. *Metabolism* 56:504-507, 2007.

**Yamaguchi H**, Nakazato M, et al. A 5'-Splice Site Mutation in the Cytochrome P450 Steroid 17 $\alpha$ -Hydroxylase Gene in 17 $\alpha$ -Hydroxylase Deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82: 1934–1938, 1997.

**Yang J**, Cui B, et al. Phenotype-Genotype Correlation in Eight Chinese 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17, 20 Lyase-Deficiency Patients with Five Novel Mutations of CYP17A1 Gene, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91(9):3619–3625, 2006.

## **GLOSARIO**

Alelo: forma alterna de un gen.

Amniocentesis: procedimiento usado en diagnóstico prenatal en el que se obtiene líquido amniótico que contiene células de origen fetal para cultivarlas y analizarlas. Se obtiene introduciendo una aguja a través de la pared abdominal y el útero hasta llegar al amnios.

Biopsia de vellosidades coriónicas: procedimiento usado en diagnóstico prenatal entre las 8 y 10 semanas de gestación para análisis de tejido fetal obtenido de vellosidades del corion, ya sea transcervical o transabdominal, por guía ultrasonográfica.

Cariotipo: constitución cromosómica de un individuo.

Codón: triplete de bases en la molécula de DNA o RNA, que codifica para un aminoácido.

Consanguinidad: relacionados por un ancestro común. Relación de sangre entre dos personas.

DGP: disgenesia gonadal pura.

Dominio: región en la secuencia de aminoácidos de una proteína que puede ser designada con cierta función.

Efecto fundador: elevación de la frecuencia de un alelo mutado en una población fundada por un grupo pequeño en el que alguno de ellos era portador del alelo mutado.

Exón: fracción del RNA nuclear heterogéneo que forma el RNAm.

Gen: secuencia de nucleótidos necesaria para general al menos un producto funcional.

Genotipo: constitución genética de un individuo; alelos presentes en un locus.

Heterocigoto compuesto: individuo o genotipo con 2 alelos diferentes mutados en el mismo locus.

HSC: Hiperplasia suprarrenal congénita.

Homocigoto: individuo o genotipo con alelos idénticos en un determinado locus en un par de cromosomas homólogos.

Intrón: fracción del RNA nuclear heterogéneo que no forma parte del transcrito maduro.

Locus: lugar que ocupa un gen en un cromosoma.

Mutación: cualquier cambio heredable en la secuencia de DNA.

Oligonucleótido: molécula pequeña de DNA (usualmente de 8-50 pares de bases) que se sintetiza para usar en la PCR.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Técnica en la que una secuencia pequeña de DNA o RNA es amplificada usando 2 oligonucleótidos que

flanquean la región en ciclos repetidos con síntesis de DNA por una polimerasa.

SOP: Síndrome de ovario poliquístico. Desorden endocrino causado por desbalance hormonal. Debe cumplir dos de estos tres criterios: oligoovulación o anovulación, exceso de actividad androgénica, ovarios poliquísticos (visualizados por ultrasonido ginecológico).

TDS: trastorno de la diferenciación sexual.