



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO O. D.

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MUTACIONES DEL  
GEN *CYP21A2* MEDIANTE EL ESTUDIO DE  
AMPLIFICACIÓN POR LIGACIÓN MÚLTIPLE  
DEPENDIENTE DE SONDA EN PACIENTES CON  
HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA CLÁSICA”**

**TESIS  
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**

**PRESENTA:  
DR. MAURICIO RENÉ MURILLO VILCHES**

**ASESOR:  
DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA**



CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO 2017



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.



## INDICE

ANTECEDENTES.....	4
• HISTORIA.....	4
• GLÁNDULA SUPRARRENAL.....	4
• HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA.....	5
• DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
JUSTIFICACIÓN.....	24
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
METODOLOGÍA.....	26
• DISEÑO DEL ESTUDIO.....	26
• POBLACIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	26
• CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	27
• MÉTODOS Y TÉCNICAS.....	29
• ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXOS.....	49

## ANTECEDENTES

### HISTORIA

En 1563 el anatomista italiano Bartolomeo Eustaccio identificó la glándula suprarrenal, lo que permitió el acumulo de conocimiento que constituyen la base actual para el diagnóstico y el manejo de la hiperplasia suprarrenal congénita. En el siglo XIX Adisson publicó la descripción de la insuficiencia suprarrenal. En 1865 el anatomista De Crecchio describió el aumento del tamaño de la glándula suprarrenal, asociado a hiperplasia suprarrenal congénita (HSC). Reichstein y Kendall ganaron el premio nobel en 1930 por su contribución en el conocimiento de los esteroides suprarrenales. La cortisona fue utilizada por primera vez en 1950, para tratar la hiperplasia suprarrenal congénita. En 1965 se estudió el rol del citocromo P450 en la 21-hidroxilación y en 1980 se clonaron la mayoría de los genes de las enzimas esteroideogénicas (1).

### GLÁNDULA SUPRARRENAL

La corteza suprarrenal se forma durante la cuarta semana de gestación del epitelio celómico. Hasta la sexta semana de gestación, se vuelve funcional (1).

La corteza suprarrenal es el lugar donde se producen los tres tipos de hormonas esteroideas: mineralocorticoides, glucocorticoides y andrógenos. La corteza se divide en tres zonas, las cuales se diferencian por el tipo celular y la función que realizan, ya que cada una es distinta debido a las enzimas requeridas para la producción de las hormonas. En zona glomerular (externa) se produce la aldosterona (el más potente mineralocorticoide), la cual está regulada por el sistema renina/angiotensina. En la zona fascicular (media) se produce el cortisol, bajo el efecto de ACTH. En la zona reticular (interna) se produce la dihidroepiandrosterona, precursora de los esteroides sexuales (2).

La proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) es esencial para el transporte del colesterol al interior de la mitocondria (1,2) (Figura 1).

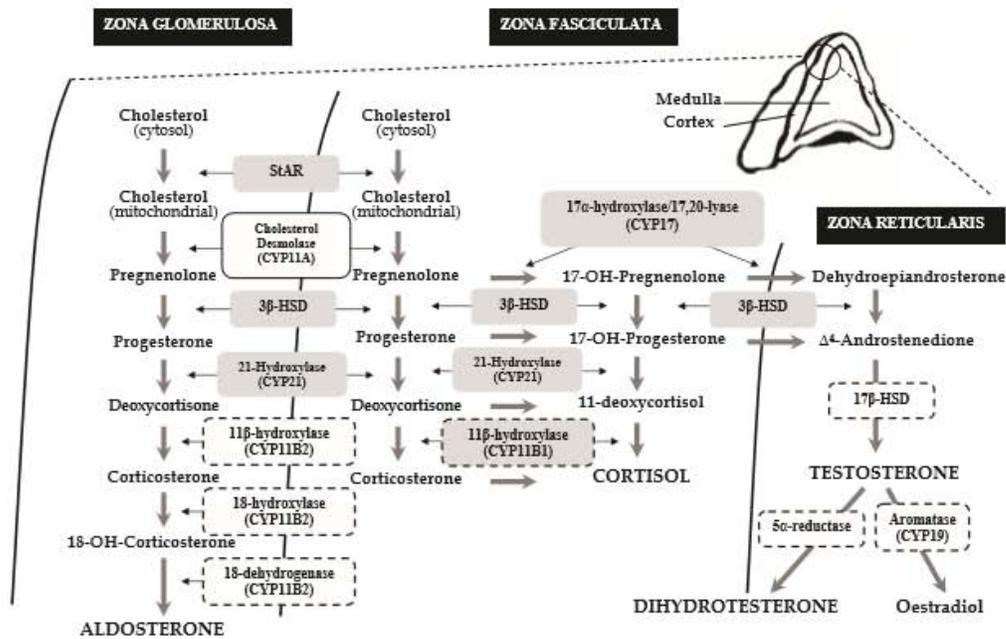


Figura 1. Corteza suprarrenal y esteroidogénesis.

El cortisol es una hormona esteroidea producida por la glándula suprarrenal, bajo el estímulo de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). La síntesis de los esteroides suprarrenales está regulada por una retroalimentación negativa, de todas las hormonas esteroideas producidas por las glándulas suprarrenales, el cortisol es la única que ejerce una retroalimentación significativa sobre la secreción de ACTH (3).

Se requiere de cinco enzimas para la síntesis de cortisol a partir del colesterol (3).

### HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) es uno de los trastornos metabólicos hereditarios más comunes y se asocia con una morbilidad y mortalidad significativa en los niños afectados. Es un grupo de trastornos con herencia

autosómica recesiva causados por mutaciones en los genes que codifican para las enzimas responsables de la esteroidogénesis, lo que provoca la incapacidad de la corteza suprarrenal de producir cortisol, y como resultado hay una sobreproducción de los precursores (2,4).

Las manifestaciones clínicas no solo se deben a la falta de síntesis de cortisol u otras hormonas esteroideas, si no, al acumulo de sus precursores, los cuales pueden utilizar vías metabólicas alternas, principalmente la vía de los andrógenos (3).

Cada defecto enzimático produce un perfil hormonal y un cuadro clínico diferente (3).

Las formas más frecuentes de hiperplasia suprarrenal son la hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa, en el 95% de los casos, y la hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia de la enzima 11B-hidroxilasa, en el 3% de los casos. Estas enzimas se encuentran exclusivamente en las glándulas suprarrenales. En ambas formas, se produce un aumento en la cantidad de andrógenos. Las otras formas de hiperplasia suprarrenal congénita, se deben a deficiencia en las enzimas 3-B-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 17 a-hidroxilasa y StAR, las cuales se encuentran en las glándulas suprarrenales y en las gónadas, lo cual provoca una disminución en la síntesis de cortisol y testosterona (3,5).

### **Déficit de 21-hidroxilasa (P450c21)**

La hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa es la forma más común de las hiperplasias suprarrenales, se presenta en el 90-95% de los casos (6).

A nivel mundial, la incidencia se estima en 1 por cada 14,199 para recién nacidos homocigotos, 1 en 60 para heterocigotos, y una frecuencia génica de 0.0083. La

incidencia de las formas no clásicas es de 1 en 27 para Judios Ashkenazi, 1 en 53 para Hispanos, 1 en 333 para Italianos y 1 en 1000 para otros caucásicos. Estos datos sugieren que más del 1% de la población mundial es portadora heterocigota del alelo mutado de la forma no clásica (3).

#### Fisiopatología

La deficiencia de la enzima citocromo P450c21 (*CYP21A2*), limita la esteroidogénesis de las reacciones catalizadas por el citocromo P450c17 (*CYP17A1*) y por el citocromo P450c11b (*CYP11B1*). Niveles bajos de cortisol tienen como resultado una elevación de los niveles de ACTH y ninguno de los precursores 21-desoxiesteroides pueden sustituir al cortisol como glucocorticoide. Los mineralocorticoides endógenos son esteroides 21-hidroxilados, por lo que la producción de aldosterona también se ve afectada, debido a la ausencia de 11-desoxicorticosterona, a pesar de la presencia de la enzima aldosterona sintasa (P450c11AS, *CYP11B2*). Debido a la deficiencia de glucocorticoides y mineralocorticoides, los recién nacidos son propensos a depleción de volumen secundario a la pérdida de sodio. Como en otras formas de insuficiencia renal, pueden desarrollar hiperkalemia, hiponatremia, hipoglicemia e hipotensión, si no se diagnóstica, ni se trata de manera temprana (Figura 2) (7).

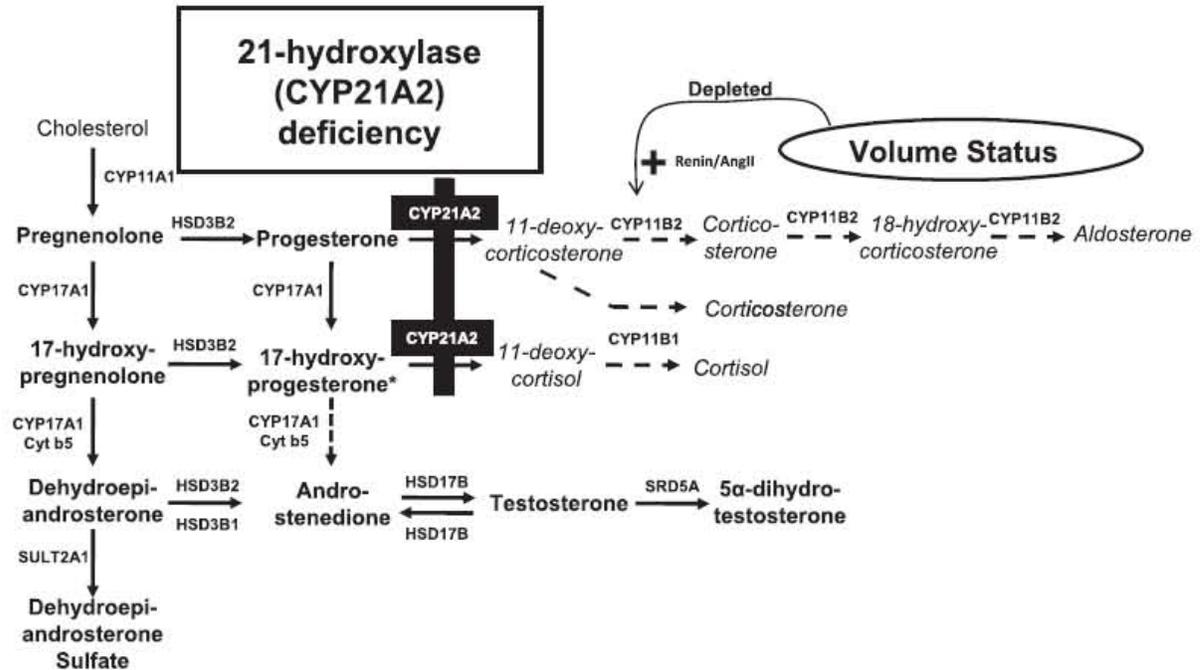


Figura 2. Deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa.

### Gen CYP21A2

La enzima 21-hidroxilasa es codificada por el gen *CYP21A2*, localizado en el cromosoma 6p21.3, en la región III del complejo mayor de histocompatibilidad. En este mismo locus se encuentra el pseudogen *CYP21A1P* el cual es idéntico al gen *CYP21A2* en el 98% de su secuencia (5,3,8).

A 30 kb del gen *CYP21A2* y del pseudogen, en tándem, se encuentran tres genes (serina/treonina cinasa RP, complemento C4 (C4A y C4B) y TNX tenascina), con los cuales forma un módulo denominado RCCX (RP-C4-CYP21-TNX), el cual muestra una alta homología entre los genes funcionales (*RP1*, *CYP21A2* y *TNXB*) y sus pseudogenes (*RP2*, *CYP21A1P* y *TNXA*) lo que ocasiona conversión génica, deleciones y duplicaciones, por recombinación homóloga, lo cual inactiva los genes funcionales (Figura 3) (9,10).

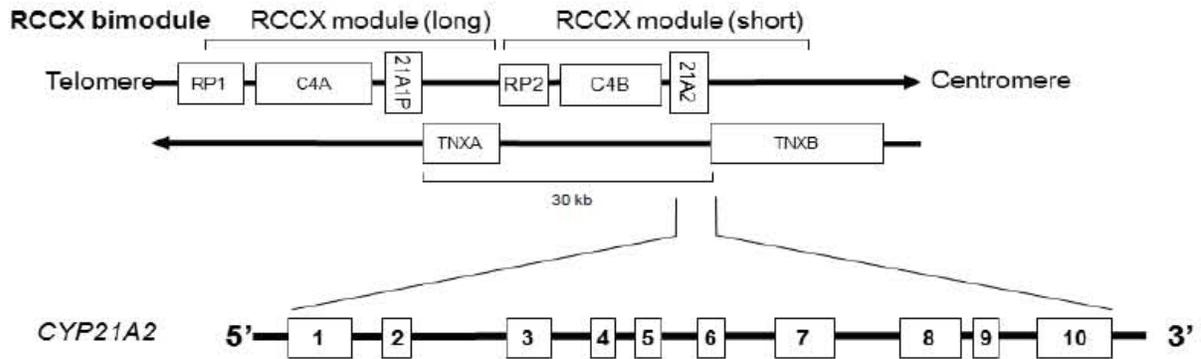


Figura 3. Representación del módulo RCCX.

Más de 200 mutaciones en el gen *CYP21A2*, se han reportado, y aproximadamente 10 mutaciones son comunes en el 90% de los pacientes. Más del 90% de las mutaciones son causadas por conversión génica, en la cual se transfieren segmentos del pseudogen al gen funcional (Figura 4), o por entrecruzamiento desigual (3,9)

Aproximadamente el 70-75% de los casos de hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa, se deben a microconversiones de las mutaciones de *CYP21A1P* a *CYP21A2*. El 20 % de los casos son secundarios a un entrecruzamiento desigual durante la meiosis, lo cual genera deleciones de 30kb, que abarcan el extremo 3' del pseudogen *CYP21A1P*, la totalidad del gen del complemento *C4B* adyacente y el extremo 5' del gen *CYP21A2*, lo que origina quimeras no funcionales de *CYP21A1P/CYP21A2* y *TNXA/TNXB*. El 1-2% restante son mutaciones de novo (8,10).

Aproximadamente el 95% de las mutaciones del gen *CYP21A2*, se encuentran dentro de tres categorías: 1) el 65-70% son mutaciones deletéreas (deleciones o mutaciones sin sentido), las cuales inhiben la actividad enzimática y están asociadas a la forma clásica perdedora de sal (In2G [IVS-13 A/C->G (28%)],

p.I172N (9%), p.V281L (9%), p.Q318X (4%), p.R356W (4%), clúster del exón 6 [p.I235N, p.V236E, p.M238K (4%)], p.G110fx21 (3%), p.P30L (2%), and p.L307fx15 (1%), 2) mutaciones que permiten el 1-2% de la actividad enzimática, las cuales están relacionadas con una producción adecuada de aldosterona y por lo tanto con la forma clásica, virilizante simple, 3) mutaciones que permiten el 20-50% de la actividad enzimática y están asociadas frecuentemente a las formas no clásicas (6,9).

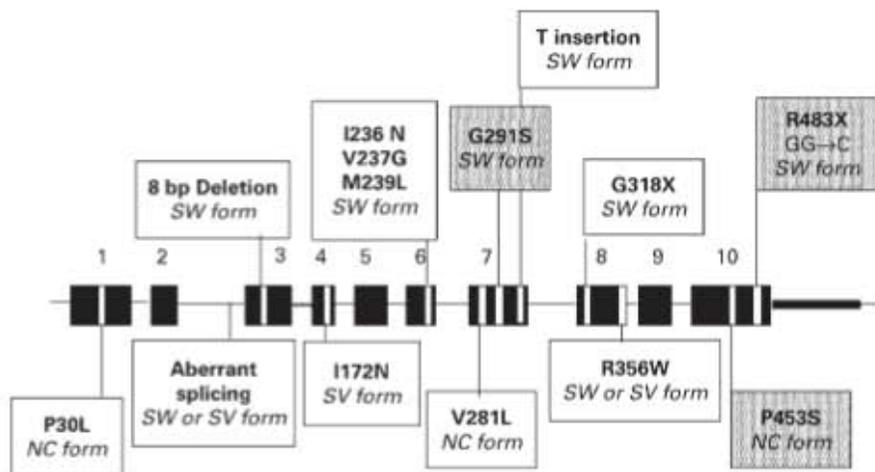


Figura 4. Mutaciones en el gen CYP21A2. Las mutaciones que se encuentran dentro de los cuadros blanco, se encuentran en el pseudogen CYP21A1P.

Otros rearrreglos cromosómicos como duplicaciones de *CYP21A2* + *C4B* o *CYP21A1P* + *C4B* y deleciones de *CYP21A2P* + *C4B*, pueden originarse del entrecruzamiento desigual, aunque estas alteraciones no causan hiperplasia suprarrenal congénita (11).

La enzima 21-hidroxilasa es un enzima microsomal del citocromo P450, la cual convierte la progesterona a deoxicorticosterona (DOC) y la 17a hidroxiprogesterona (17-OHP) a 11-deoxicortisol, en la zona glomerular y fascicular, de la corteza suprarrenal, respectivamente. La zona glomerular y fascicular, son los sitios primarios de expresión del gen *CYP21* (3).

## Heterocigotos

Los pacientes heterocigotos para cualquier mutación de los genes relacionados con la vía esteroidogénica, son clínicamente normales, sin embargo, presentan deficiencia parcial de las enzimas involucradas (3).

## Manifestaciones clínicas

Se divide en dos grupos: Clásica y no clásica (3).

- Forma clásica

El exceso de andrógenos provoca ambigüedad genital en las mujeres afectadas. El grado de virilización es variable y se clasifica de acuerdo a la escala de Prader (Tabla 1 y Figura 5) (3,12).

<b>Tabla 1. Escala de Prader.</b>	
Prader 1	Hipertrofia de clítoris
Prader 2	Hipertrofia de clítoris, fusión parcial de labios menores
Prader 3	Hipertrofia de clítoris, fusión total de labios menores, seno urogenital.
Prader 4	Hipertrofia de clítoris con apariencia de micropene, fusión total de labios mayores e hipospadias.
Prader 5	Hipertrofia de clítoris con meato uretral en punta de clítoris. Apariencia completa de genitales masculinos.

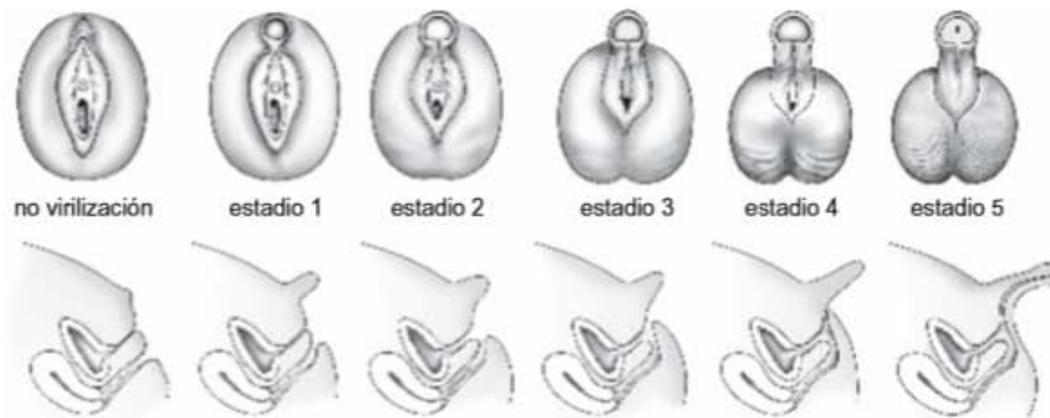


Figura 5. Escala de Prader.

Los recién nacidos femeninos pueden ser confundidos como masculinos, sin embargo, a la exploración no se palpan gónadas. Los genitales internos son normales (ovarios, trompas de Falopio y útero) y tienen un cariotipo 46,XX. Los recién nacido masculinos generalmente no tienen compromiso a nivel genital, solo hiperpigmentación (3).

La forma clásica de la Hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa se caracteriza por disminución en la secreción de cortisol y aldosterona, y un aumento en la secreción de andrógenos (3).

Esta forma, se divide en: perdedora de sal y virilizante simple.

La forma perdedora de sal, es la expresión más severa de la enfermedad, se presenta en el 75% de los pacientes y se caracteriza por crisis de pérdida salina, en las primeras semanas de vida, asociada a una virilización prenatal. La pérdida salina es secundaria a una producción insuficiente de aldosterona. Los síntomas incluyen: pérdida de peso, de apetito, deshidratación, vómito, diarrea y retraso en el desarrollo (3,5).

La forma virilizante simple corresponde al 25% restante, de los pacientes afectados, estos pacientes producen niveles residuales de aldosterona, por lo que

las crisis hiponátrelicas no forman parte de sus cuadro clínico, sólo presentan datos de virilización (3).

La progresión de la enfermedad provoca una mayor virilización (pesudo-pubertad precoz y edad ósea mayor a la edad cronológica) (3).

- Forma no-clásica

La forma no-clásica se debe a una deficiencia parcial de la enzima 21-hidroxilasa, lo cual ocasiona cuadros clínicos de presentación tardía, hiperandrogenismo leves y algunos pacientes pueden ser asintomáticos. Los signos clínicos (pubarca prematura, talla alta, edad ósea mayor a la edad cronológica, menstruación irregular, infertilidad, hirsutismo, alopecia, ovario poliquístico y acné) se presentan en la infancia tardía, adolescencia o posterior a la pubertad (3).

Las formas asintomáticas, también conocidas como formas cripticas, usualmente se diagnostican al estudiar familias con deficiencia de 21-hidroxilasa, clásica. Los pacientes presentan el mismo perfil hormonal que los pacientes con la forma no-clásica, que presentan síntomas (5).

## Diagnóstico

El tamiz neonatal es una herramienta que ayuda a identificar a la mayoría de los casos de hiperplasia suprarrenal congénita. Consiste en obtener una muestra de sangre, en papel filtro, entre los días 3 y 4 posteriores al nacimiento, esto con la intención de disminuir los falsos positivos, por la elevación fisiológica de los niveles de 17-OHP. Se miden los niveles de 17-OHP mediante técnicas de inmunoensayo y los niveles por arriba de la percentil 97 son considerados anormales. Existe una alta tasa de falsos positivos. El valor predictivo positivo del

tamiz neonatal es menor al 1%, lo cual significa que por cada 100 muestras positivas, solo 1 será una hiperplasia suprarrenal congénita (13, 14,15).

El diagnóstico se confirma mediante la medición de 17-hidroxiprogesterona sérica, por cromatografía líquida con espectrometría de masas, y/o el test mediante estimulación con hormona adrenocorticotropica (ACTH) Los niveles normales, en neonatos, de 17-OHP son de 3 a 6 nmol/l (10-20 ng/ml). Niveles mayores de 100 ng/ml están relacionados con la forma clásica perdedora de sal y mayores de 1,000 ng/ml, con la forma virilizante simple. Los niveles de 17-OHP en la forma no clásica, pueden ser normales. Posterior a la infancia, valores basales a las 8 a.m. entre 2 y 100 ng/ml o valores entre 10-100 ng/ml después de la estimulación con ACTH, sugieren el diagnóstico de hiperplasia suprarrenal congénita no clásica (3,14).

La prueba de estimulación con ACTH consiste en determinar la basal de 17-OHP. Se administra 250 g/m<sup>2</sup> de ACTH y miden los niveles de 17-hidroxiprogesterona a los 60 minutos. La prueba es positiva cuando los valores superan los 15 ng/ml posterior al estímulo. En caso de que los valores estén entre 10-15 ng/ml se debe repetir la prueba o realizar estudio molecular (15).

Los niveles de aldosterona y renina en plasma, no son de ayuda en la etapa neonatal, debido a que normalmente se encuentran elevados durante este periodo. Posteriormente pueden ser de ayuda para diferenciar las formas perdedoras de sal, de las virilizantes simples (14).

La 17-OHP puede estar elevada en otros tipos de hiperplasias suprarrenales congénitas, como aquellas por déficit de 11 $\beta$ -hidroxilasa y 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. El cuadro clínico junto con la medición de los precursores esteroideos (17-OHP, cortisol, deoxicorticosterona, 11-desoxicortisol, 17OH-

pregnenolona, y androstenediona), previa a la estimulación con ACTH, pueden ayudar a distinguir entre estas formas de HSC (13).

La testosterona se encuentra elevada en los hombres pre-puberes, hay que considerar que la mini pubertad fisiológica se presenta entre los 2 y 6 meses de vida y en el varón normal puede acompañarse transitoriamente de niveles elevados de testosterona, sin traducción clínica. En las mujeres la testosterona se encuentra elevada durante todas las etapas de la vida. Los niveles de cortisol, son bajos (3,15).

#### Diagnóstico molecular

Existen varias técnicas para el análisis molecular del gen *CYP21A2*, basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como la PCR con sondas alelo específicas y la secuenciación directa. La secuenciación Sanger es el estándar de oro para la detección de mutaciones puntuales y variantes pequeñas, en la secuencia (indels), sin embargo, rearrreglos grandes del gene, no pueden ser detectados. La técnica Southern blot ha sido utilizada para la detección de grandes deleciones y conversiones del módulo genético RCCX, el inconveniente de esta técnica es el tiempo que tarda en realizarse, que utiliza sondas radioactivas y una gran cantidad de ADN, además tiene limitaciones para detectar los genes quiméricos incluyendo *CYP21A1P/CYP21A2* y *TNXA/TNXB*. Recientemente se ha utilizado la ligación múltiple dependiente de sonda (MLPA) para el análisis molecular del gen *CYP21A2*, debido a que es una técnica que permite fácil y rápidamente detectar variantes en el número de copias y la identificación de genes quiméricos, y a su alta sensibilidad para detectar deleciones, duplicaciones y conversiones, aunque puede tener falsos positivos

debido a la presencia de mutaciones y polimorfismos en el sitio de ligación de la sonda, lo que evita la hibridación (10).

El kit comercial SALSA MLPA que se utiliza, es el P050-B3 CAH (MRC-Holland), está diseñado para detectar deleciones, duplicaciones y conversiones en los genes *CYP21A2*, *C4*, y *TNXB*, del locus 6p21.3. Este kit contiene 5 sondas para el gen *CYP21A2* (exones 1, 3, 4, 6 y 8), sondas para la deleción de 8 pb, I172N, cluster del exon 6, y la mutación Q318X. También contiene sondas específicas para el pseudogene *CYP21A1P*, tres para el gen *TNXB*, una para el gen *C4A* y una para *C4B*, una sonda para el gen *ATF6B* localizado en la region q-telómerica de *TNXB*, otras dos sondas localizadas en el cromosoma 6p21.3, una sonda específica para el cromosoma Y, y otras 16 sondas de referencia (Tabla 2) (16,17).

#### Tratamiento

Todos los pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita clásica, por déficit de 21-hidroxilasa, así como los sintomáticos de las formas no clásicas, deben ser tratados con glucocorticoides con la finalidad de suprimir el exceso de secreción de la hormona liberadora de corticotropina, ACTH y reducir el exceso de esteroides sexuales de origen adrenal. La hidrocortisona es el tratamiento más fisiológico al tener una potencia superponible a la del cortisol endógeno; además, por su corta vida biológica, minimiza la afectación sobre el crecimiento y sobre otros efectos adversos. Ninguna pauta consigue un tratamiento sustitutivo ideal, ya que no se consigue reproducir la relación entre los pulsos de cortisol y ACTH, que en condiciones normales inhibirían la secreción de ACTH. La dosis diaria total ha ido variando; actualmente se proponen dosis de 15 mg/m<sup>2</sup>/día, de hidrocortisona, pero puede variar en función de la edad y estadio puberal del paciente; durante la pubertad puede ser necesario subir la dosis hasta 20 mg/m<sup>2</sup>/día (5,18).

Tabla 2. SALSA MLPA P050-B2 CAH

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position		
		Reference	Other	CAH
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
130	Reference probe 0797-L0463	5q31		
136	<b>LTA probe 0662-L0158</b>		6p21.3	
142	Reference probe 4199-L3535	20q13		
148	Reference probe 0594-L0011	11q13		
154 ±	<b>C4B probe 2357-L2586</b>			<b>C4B Exon 19</b>
160 ±	Reference probe 5266-L4649	2p22		
166	Reference probe 1565-L1137	22q26		
172 *	<b>CYP21A2, probe 1974-L1507</b>			<b>Exon 3</b>
178 °	<b>C4A probe 4802-L4177</b>			<b>C4A Exon 17</b>
184	Reference probe 2516-L1947	17q11.2		
193	Reference probe 0486-L0083	11p13		
202	<b>CYP21A2, probe 4804-L4179</b>			<b>Exon 1</b>
211 †	<b>CYP21A2, probe 1975-L1508</b>			<b>Exon 4</b>
220	Reference probe 5038-L4424	9p13		
229	<b>CYP21A2, probe 1976-L1509</b>			<b>Exon 6</b>
238	<b>UTY probe 1071-L0464</b>		Chr. Y	
247	Reference probe 1604-L1186	13p		
256	Reference probe 2469-L1913	15q21		
265	<b>CYP21A1P (=CYP21P), probe 4805-L4180</b>			<b>5' exon 1</b>
274	Reference probe 2319-L1810	19p13		
283 ‡	<b>CYP21A2, probe 5477-L4895</b>			<b>Exon 8</b>
292	<b>TNXB probe 1982-L1515</b>			<b>Exon 32</b>
301	Reference probe 1575-L1147	22q12		
310	<b>TNXB probe 3033-L2588</b>			<b>Exon 15</b>
319	<b>TNXB probe 1980-L1513</b>			<b>Exon 1</b>
328	Reference probe 1918-L1462	1q21		
337	<b>ATF6B probe (CREBL1) 1979-L1512</b>			<b>ATF6B</b>
346	<b>BAK probe 1994-L0363</b>		6p21.3	
355	<b>CYP21A1P (=CYP21P), probe 4807-L4182</b>			<b>Exon 10</b>
364 ±	Reference probe 1252-L0902	2p16		
373	Reference probe 4362-L3782	7p		
382 ±	<b>CYP21A1P (=CYP21P), probe 4806-L4181</b>			<b>Intron 2</b>
391	Reference probe 2184-L1682	6q26		

Los neonatos son tratados habitualmente con una dosis de 5 mg/día dividido en tres dosis, que supone aproximadamente una dosis de 25 mg/m<sup>2</sup>/día; las dosis suprafisiológicas administradas en el neonato son necesarias para suprimir adecuadamente los andrógenos suprarrenales y minimizar la posibilidad de desarrollar una insuficiencia suprarrenal. Adolescentes mayores y adultos pueden

ser tratados con dosis moderadas de prednisona (5-7,5 mg/día o 6 mg/m<sup>2</sup>/día) o dexametasona (0,25-0,5 mg/día o 0,3 mg/m<sup>2</sup>/día) que no excedan el equivalente de 20 mg/m<sup>2</sup>/día de hidrocortisona. Un tratamiento excesivo y precoz con GC (dosis de hidrocortisona > 20-25 mg/m<sup>2</sup>/día) es potencialmente nocivo para el crecimiento. En los pacientes con HSC no clásica sintomática está indicado iniciar tratamiento en dosis bajas, generalmente a la mitad de dosis que en las formas clásicas (5).

Los pacientes con pérdida salina requieren la administración de un mineralocorticoide. El más utilizado es la 9-a-fluorhidrocortisona, habitualmente a una dosis de 0,05-0,2 mg/día dividido en dos o tres dosis. Se requieren suplementos de cloruro de sodio (1-2 g por día) durante el primer año de vida. La dosis de mantenimiento es de 70-90 µg/m<sup>2</sup>/día. Aunque los pacientes con la forma virilizante simple secretan una cantidad adecuada de aldosterona y no tienen crisis de pérdida salina necesitan tratamiento, ya que presentan cifras elevadas de renina. El control adecuado de los niveles de renina ayuda a la supresión adrenocortical y a reducir la dosis necesaria de glucocorticoides (18).

#### Tratamiento prenatal

En madres gestantes de un feto con riesgo de tener HSC se debe iniciar el tratamiento con el fin de reducir la virilización femenina y por tanto la necesidad de cirugía reconstructiva. Debido a que los genitales externos son virilizables desde la octava semana de gestación y el diagnóstico por biopsia de vellosidades coriónicas se puede realizar a partir de la semana 12 de gestación y por amniocentesis hasta la semana 15, el tratamiento debe iniciarse en forma empírica tan pronto como se confirme el embarazo. Una vez se realice la biopsia o amniocentesis y se confirme o descarte la enfermedad, se decide si continuar o no

con el tratamiento. Cerca de 85% de los fetos de sexo femenino que reciben terapia nacen con genitales normales o con una leve virilización según la escala de Prader. El medicamento de elección es la dexametasona ya que esta escapa de la inactivación por la 11-hidroxiesteroide deshidrogenasa placentaria tipo II, permitiendo su paso transplacentario y por tanto, concentraciones terapéuticas efectivas en el feto. La dosis usada es de 20  $\mu\text{g}/\text{k}/\text{día}$  dividido en tres tomas, ya que una sola dosis al día no es efectiva para mantener niveles plasmáticos eficaces durante el día (8).

### **Déficit de 11 $\beta$ -hidroxilasa (P450c11)**

El déficit de 11 $\beta$ -hidroxilasa es la segunda forma más frecuente de HSC y supone el 3-5% de éstas. La enzima 11  $\beta$ -hidroxilasa cataliza la conversión de 11-desoxicortisol y 11-desoxicorticosterona (DOC) en cortisol y corticosterona, respectivamente; el déficit de 11  $\beta$ -hidroxilasa provoca disminución del cortisol y un aumento de los valores de 11-desoxicortisol y 11-desoxicorticosterona (DOC) (5,18).

El gen que codifica para la enzima 11  $\beta$ -hidroxilasa es el *CYP11B1*, el cual se encuentra localizado en el cromosoma 8q24.3. Se han descrito más de 50 mutaciones en este gen, la mayoría son sin sentido o de sentido erróneo. La mayoría de las mutaciones están asociadas con la forma clásica (2).

La forma clásica es similar al déficit de 21-hidroxilasa, ya que los precursores acumulados se dirigen hacia la vía de los andrógenos, generando un hiperandrogenismo, difiere en que existe una acumulación de 11-desoxicorticosterona y de sus metabolitos con actividad mineralocorticoide, por lo que los pacientes no presentan pérdidas de sodio, pero desarrollan hipertensión. La forma no clásica es muy rara y comprende la misma sintomatología que en el déficit de 21-hidroxilasa (2).

## Diagnóstico

El diagnóstico hormonal se confirma por un aumento de los valores plasmáticos de 11-desoxicortisol y de 11-desoxicorticosterona, bien basales o tras estímulo con ACTH. Una fuente de error en el diagnóstico del déficit de 11 $\beta$ -hidroxilasa es la moderada elevación concomitante de 17OHP, aunque siempre menor que la elevación de 11-desoxicortisol, que en ocasiones ha llevado a la realización de un diagnóstico erróneo de déficit de 21 OH (5,18).

### **Déficit de 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ HSD)**

La 3 $\beta$ HSD o  $\Delta 5 \rightarrow \Delta 4$ -isomerasa es una enzima microsomal que cataliza reacciones de la esteroidogénesis. Existen dos genes que codifican dos isoformas de 3 $\beta$ HSD, *HSD3B1* y *HSD3B2*, localizados en el cromosoma 1p12. La enzima 3 $\beta$ HSD1, codificada por *HSD3B1* se expresa en la placenta, glándula mamaria, hígado y piel. 3 $\beta$ HSD1 se requiere para la producción de progesterona, por la placenta, durante el embarazo. Mutaciones en el gen *HSD3B1* no se han reportado, ya que estas causarían abortos espontáneos debido a la falta de síntesis de progesterona. La enzima 3 $\beta$ HSD2 codificada por el gen *HSD3B2* se expresa en las glándulas suprarrenales y en las gónadas; mutaciones en este gen pueden ser fatales, si no se diagnostica a tiempo (2).

La hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 3 $\beta$ HSD es una de las formas poco frecuentes, afecta a la síntesis de todos los esteroides (corticoides, mineralocorticoides y andrógenos), tanto a nivel suprarrenal como gonadal; existe un defecto en la transformación de los 3  $\beta$ - $\Delta 5$  esteroides (pregnenolona, 17 OH pregnenolona, dihidroepiandrosterona [DHEA] y  $\Delta 5$  androstenediol) en  $\Delta 4$ -3-cetoesteroides (progesterona, 17 hidroxiprogesterona, androstenediona y testosterona respectivamente). La forma clásica se presenta de una manera muy grave con insuficiencia suprarrenal y pérdida salina. Los recién nacidos

masculinos presentan subvirilización, por defecto de la síntesis de testosterona en el testículo fetal. En las mujeres se describe clásicamente la presencia de una moderada virilización intraútero por acumulación de DHEA. Se conoce una variabilidad en su presentación clínica, tanto en lo que se refiere a la ambigüedad genital como a la pérdida salina, que se correlaciona con una diferente afectación enzimática. La forma no clásica es muy poco frecuente (5,18).

#### Diagnóstico

El diagnóstico hormonal se realizará según el perfil hormonal en el que se observa una acumulación significativa de los  $\Delta$ 5-esteroides, especialmente de 17 OH pregnenolona y DHEA (5).

#### **Déficit de 17 $\alpha$ -hidroxilasa (P450c17)**

El déficit de 17 $\alpha$ -hidroxilasa es una forma muy poco frecuente de hiperplasia suprarrenal congénita. La enzima 17 $\alpha$ -hidroxilasa es una enzima microsomal del citocromo P450, la cual tiene un papel clave en la orientación de la pregnenolona y progesterona hacia las diferentes clases de esteroides tanto a nivel suprarrenal como gonadal; presenta 2 isoenzimas, la 17 $\alpha$ -hidroxilasa y la 17-20 desmolasa (5). El gen *CYP17A1* es el que codifica para la enzima 17 $\alpha$ -hidroxilasa, localizado en el cromosoma 10q24.3. Se han identificado más de 70 mutaciones (2).

La elevación de desoxicorticosterona con acción mineralocorticoide produce hipertensión e hipokalemia. El recién nacido masculino se presenta con ambigüedad genital de grado variable; cuando la afección es completa se produce una ausencia de virilización, por lo que presentan fenotipo femenino. El recién nacido femenino presenta hipertensión y ausencia de pubertad (2, 5).

#### Diagnóstico

El diagnóstico se realiza por los valores descendidos de todos los esteroides posteriores a la 17 $\alpha$ -hidroxilasa y la elevación de pregnenolona, progesterona, desoxicorticosterona y corticosterona (5,18).

### **Hiperplasia suprarrenal congénita lipoidea**

Es la forma más rara y grave de las hiperplasias suprarrenales congénitas. Por deficiencia de la proteína StAR o P450cc (proteína reguladora aguda esteroideogénica), la cual es esencial para el transporte del colesterol al interior de la mitocondria, provocando un acúmulo de colesterol. La proteína StAR es codificada por el gen *STAR*, el cual se encuentra localizado en el cromosoma 8p11.2. la proteína se expresa en las glándulas suprarrenales y en las gónadas (2,5).

En los pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita lipoidea existe un déficit grave de todos los esteroides tanto a nivel suprarrenal como gonadal. Los recién nacidos afectados presentan genitales externos femeninos por ausencia de testosterona. En el período neonatal inmediato presentan un cuadro grave y agudo de pérdida salina e insuficiencia suprarrenal (5).

### **Diagnóstico**

Los valores de ACTH y renina están muy elevados mientras que todos los esteroides suprarrenales están disminuidos y no se incrementan con la administración exógena de ACTH (18).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La Hiperplasia Suprarrenal Congénita es un error innato del metabolismo frecuente en nuestra población, que cuando se presenta en pacientes con cariotipo XX resulta en un fenotipo virilizado el cual se puede manifestar con ambigüedad genital, y en su forma perdedora de sal, además con crisis hiponatémicas.

La necesidad de un abordaje clínico molecular en este tipo de padecimientos es necesario ya que se requieren herramientas de fácil diagnóstico y bajo coste para su aplicación en la práctica clínica

Muchos de los pacientes con diagnóstico clínico de Hiperplasia Suprarrenal Congénita no cuentan con el diagnóstico molecular, lo que limita el asesoramiento genético, por lo tanto el pronóstico de los pacientes.

## JUSTIFICACIÓN

La Hiperplasia Suprarrenal Congénita es un grupo de entidades clínicas del metabolismo esteroideo con alta frecuencia en nuestra población. Su diagnóstico oportuno es de gran importancia para evitar complicaciones metabólicas, es por esto que su detección temprana mediante el tamiz metabólico se ha implementado, de gran utilidad principalmente para pacientes con cariotipos 46, XY, en los que no se observa compromiso genital.

El diagnóstico temprano mejorará la respuesta terapéutica y habrá menos complicaciones asociadas.

Es importante la realización del estudio molecular para caracterizar de forma apropiada la mutación, valorar el tipo de mutación que se trata y con esto otorgar un asesoramiento genético adecuado para los pacientes afectados.

## OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar mutaciones del gen *CYP21A2* de pacientes con diagnóstico clínico de Hiperplasia Suprarrenal Congénita clásica mediante el estudio de ligación múltiple dependiente de sonda (MLPA), y como complemento análisis con Secuenciación Sanger.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar la frecuencia de mutaciones tipo delección/duplicación en el gen *CYP21A2* en pacientes que cumplan criterios clínicos de Hiperplasia Suprarrenal Congénita clásica.
2. Establecer frecuencias de mutaciones puntuales mediante la técnica de Secuenciación Sanger.
3. Brindar adecuado asesoramiento genético a los pacientes y familiares portadores de este tipo de mutaciones del gen *CYP21A2*.

## **METODOLOGÍA**

### **DISEÑO DEL ESTUDIO**

El presente trabajo es un estudio de corte transversal, descriptivo y observacional

### **POBLACIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.**

La población en estudio está conformada por individuos que acudieron a la consulta de la clínica de Diferenciación Sexual del Servicio de Genética del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”,

Fueron 43 pacientes con diagnóstico clínico de Hiperplasia Suprarrenal congénita los que se incluyeron en el estudio, encontrando siete pacientes con HSC clásica y 36 con HSC no clásica.

El tipo de muestreo que se aplicó en este trabajo es el muestreo por conveniencia, y de casos consecutivos

.

#### CRITERIOS DE SELECCIÓN.

#### CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

1. Individuo con criterios clínicos compatibles con Hiperplasia Suprarrenal Congénita.
2. Individuos que acepten y firmen el consentimiento informado para la toma de muestra de sangre periférica.
3. En caso de menores de edad, que los padres otorguen su autorización para la realización del estudio molecular.

#### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

1. Pacientes que ya cuenten con diagnóstico molecular de mutación en el gen *CYP21A2* caracterizada mediante otra técnica molecular.

## MÉTODOS.

El algoritmo mediante el cual se llevó a cabo el reclutamiento de los pacientes , la información clínica y la prueba molecular, consta de los siguientes pasos:

1. Se recabó información sobre pacientes que recibieron consulta de Genética en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.
2. Se estableció contacto por primera vez con estos pacientes mediante la consulta en el servicio de Genética, se realizó árbol genealógico para evaluar la presencia de familiares afectados como parte de la realización del expediente clínico, además se realizó una ficha de criterios clínicos (Anexo 2), la cual cuenta con datos relevantes para el diagnóstico clínico.
3. Se valoró a los pacientes mediante la exploración física para determinar el cumplimiento de criterios clínicos compatibles con Hiperplasia Suprarrenal Congénita.
4. A los pacientes que aceptaron ser parte del protocolo, se les explicó las bases del estudio de investigación y se les otorgó el documento de consentimiento informado para su lectura y la aclaración de las dudas que se presentaran.
5. Una vez firmado el Consentimiento Informado, se procede a la toma de muestra de 10 ml de sangre periférica.
6. A los pacientes menores de edad, el estudio también involucró a los padres para analizar el estado de portadores.
7. De los 10 ml de sangre periférica se realizó la extracción-purificación de ADN de las muestras a estudiar.
8. Se realizó el estudio del gen *CYP21A2* mediante la técnica de MLPA, electroforesis capilar y análisis de los resultados de cada uno de los pacientes y sus familiares.

9. Como complemento se realizó Secuenciación Sanger tanto a pacientes con resultado negativo para MLPA como a los familiares de los pacientes heterocigotos compuestos para detectar mutaciones puntuales del gen *CYP21A2*.

## MÉTODOS Y TÉCNICAS.

### 1. EXTRACCIÓN DE ADN

Se utilizó un kit comercial para la extracción de ADN, de la marca Qiagen. El proceso se realizó siguiendo las instrucciones comerciales del kit.

### 2. LIGACIÓN MÚLTIPLE DEPENDIENTE DE SONDA (MLPA).

- Reactivos.
  - Buffer para MLPA.
  - SALSA MLPA
  - Ligasa buffer.
  - Ligasa 65
  - SALSA PCR primer mix.
  - SALSA polimerasa.
  - Formamida
  - Agua destilada
- Descripción de las sondas utilizadas.
  - SALSA MLPA probemix P050-B3 CAH

Diseñada para detectar deleciones/duplicaciones de uno o más exones de genes cuyas sondas mencionaremos a continuación:

    - Contiene cinco sondas para el gen *CYP21A2* (exones 1, 3,4,6 y 8).
    - Contiene sondas para las siguientes mutaciones en el mismo gen: deleción de 8pb, cluster E6, I172N y Q318.
    - Contiene tres sondas específicas para el *CYP21A1P*.

- Tres sondas para al gen *TNXB*.
  - Una sonda para en gen *C4A*.
  - Una sonda para el gen *C4B*.
  - Una sonda para el gen *ATF6B*.
  - Dos sondas localizadas en 6p21.3.
  - Una sonda específica del cromosoma Y (*UTY*).
  - Diez y seis sondas de referencia.
- Protocolo para una reacción de MLPA
    - Desnaturalización del ADN (1 día)
      1. 5uL de ADN (20ng/uL) en tiras de PCR (alternativamente en placa de 48 para un total de 100 ng de reacción).
      2. Desnaturalizar a 98°C/ 5 minutos y enfriar a 25°C.
    - Hibridación del ADN (día 1)
      1. Homogeneizar por vortexeo las soluciones “MLPA probemix” y “MLPA buffer.
      2. Preparar en MMH (Master Mix de Hibridación):
      3. Homogeneizar el MMH por vortexeo.
      4. Tomar 3 uL de MMH para adicionar a cada una de las muestras desnaturalizadas.
      5. Someter a una incubación a 95°C/1 min y luego a 60°C/16-20 horas.
    - Reacción de ligación (día 2)
      1. Homogeneizar los dos buffers de ligasa por vortexeo. No vortexear a la ligasa misma, este procedimiento la inhibe.
      2. Preparar el MML (Master Mix de Ligación).
      3. Homogeneizar suavemente el MML por pipeteo.

4. Después de la incubación de las muestras a 60°C por el tiempo antes indicado, incubar a 54°C, al alcanzar esta temperatura añadir a cada una 32uL de MML y mezclar por pipeteo.
  5. Continuar la incubación a 54°C por 15 minutos, luego inactivar la enzima a 98°C por 5 minutos y detener la reacción a 20°C. Guardar los tubos a 4°C (máximo dejarlos así hasta una semana).
- Reacción de PCR (día 2)
    1. Homogeneizar el SALSA PCR primer mix por vortexeo.
    2. Precalentar en las manos a la polimerasa durante 10 minutos.
    3. Preparar el MMP (Master Mix PCR).
    4. Homogeneizar el MMP suavemente por pipeteo (mantener el hielo hasta su uso).
    5. A temperatura ambiente tomar 10 uL de MMp y añadirlos a cada una de las muestras ligadas. Mezclar por pipeteo suave.
    6. Correr el siguiente programa de PCR: (95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos)\* 35 ciclos; 72°C por 20 minutos y 15 °C por tiempo indefinido
    7. Cubrir las reacciones con papel aluminio o meterlos en una caja oscura, gusrdar a 4°C hasta una semana o a -20°C por más tiempo.
  - Electroforesis capilar (día 3)
    1. Preparar el MC (Mix de Corrida)

2. Homogeneizar el MC por pipeteo.
3. Colocar en tubos de PCR 15uL de MC y añadir 1uL de muestra, tomados con punta filtro. Homogeneizar por pipeteo.
4. Desnaturalizar a 95°C la muestra total (16uL) durante 5 minutos y al terminar colocar inmediatamente en la placa congelada.
5. Agregar el contenido desnaturalizado en cada tubo a un pozo de la placa de electroforesis.
6. Correr las muestras en electroforesis capilar bajo las siguientes condiciones: temperatura del capilar 50°C por 120 segundos; voltaje de inyección de 1.6 kv, tiempo de inyección 30 segundos; tiempo de corrida 60 minutos a 4.8kv.

### 3. SECUENCIACIÓN SANGER.

Se realizó Secuenciación Sanger, de acuerdo al protocolo estándar de la técnica que se utiliza rutinariamente (10).

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicará estadística descriptiva para establecer frecuencias de mutaciones detectadas mediante el MLPA y Secuenciación Sanger.

## RESULTADOS.

### 1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA MUESTRA.

Se incluyeron un total de 43 pacientes con diagnóstico clínico de Hiperplasia Suprarrenal Congénita, a los cuales se les realizó estudio de MLPA y de forma complementaria Secuenciación Sanger. Del total de los pacientes incluidos, el 25.58% fueron del sexo de asignación masculino (n=11) y el 74.41% con sexo de asignación femenino (n=32). Figura 6.



Figura 6. Frecuencia de sexo de asignación en pacientes estudiados.

El árbol genealógico mostró solamente un caso familiar con dos afectados con características clínicas compatibles con HSC clásica, hermanos, ambos con la forma virilizante simple, sin embargo no fue posible el estudio del individuo III-1 ni de los padres. Figura 7.

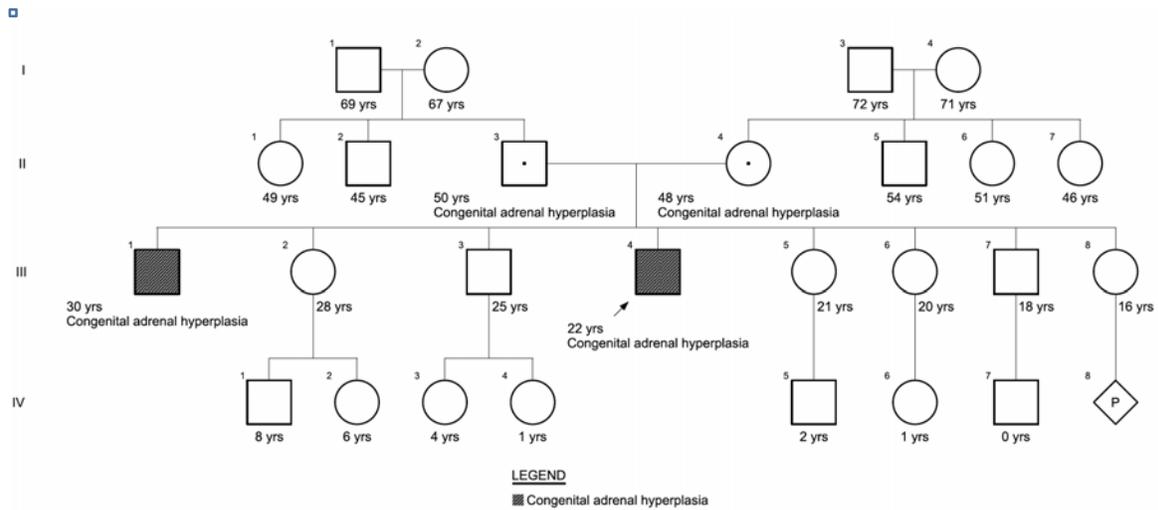


Figura 7. Árbol genealógico de familia con dos afectados.

## 2. HALLAZGOS CLÍNICOS

Del total de los pacientes con diagnóstico clínico, la Hiperplasia Suprarrenal Congénita Clásica se presentó en el 16.28% de los casos ( $n = 7$ ) y el 83.72% ( $n = 36$ ) presentó características clínicas de Hiperplasia Suprarrenal Congénita no clásica (Figura 8).

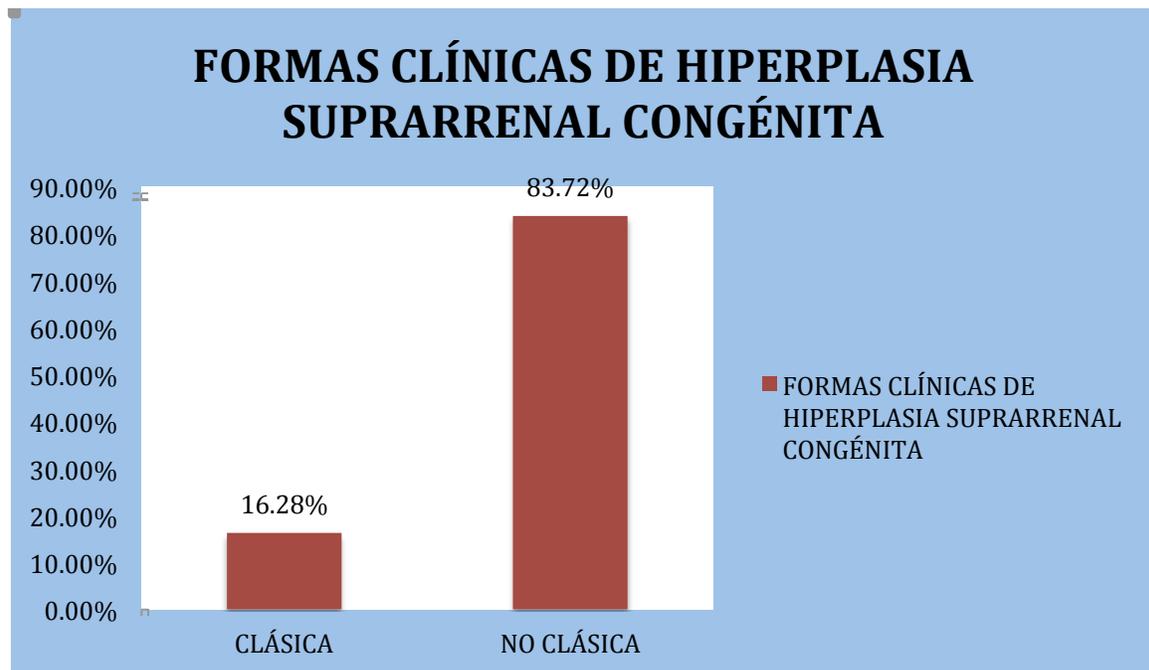


Figura 8. Frecuencia de formas clínicas de HSC en los pacientes estudiados.

Los datos clínicos predominantes en pacientes con diagnóstico de HSC clásica son la ambigüedad genital, crisis hiponatrémicas y talla baja. (Tabla 5).

Tabla 5. Formas clínicas y datos clínicos relevantes en pacientes con diagnóstico de HSC clásica

NÚMERO DE PACIENTE	DIAGNÓSTICO CLÍNICO (FORMA CLÍNICA)	EDAD	SEXO DE ASIGNACIÓN	DATOS CLÍNICOS OBJETIVOS
1.	Forma perdedora de sal.	21 días.	Femenino	Ambigüedad genital Prader III, crisis hiponatrémicas, insuficiencia suprarrenal.
2.	Forma perdedora de sal.	6 meses	Femenino	Ambigüedad genital Prader III, crisis hiponatrémicas, insuficiencia suprarrenal.
3.	Forma virilizante simple	22 años	Masculino	Hipospadias penoescrotal, talla baja proporcionada, presencia de estructuras müllerianas.
4.	Forma perdedora de sal	4 meses	Femenino	Ambigüedad genital, crisis hiponatrémica severa,
5	Forma virilizante simple	12 años	Femenino	Punertad precoz, ambigüedad genital Prader II, hirsutismo..
6.	Forma virilizante simple	3 años	Femenino	Hipertrofia de clítoris.
7.	Forma virilizante simple	8 años	Masculino	Pubertad precoz, hiperpigmentación de genitales.

### 3. ESTUDIO MOLECULAR MEDIANTE AMPLIFICACIÓN POR LIGACIÓN MÚLTIPLE DEPENDIENTE DE SONDA (MLPA) Y SECUENCIACIÓN

Se realizó estudio molecular con la Técnica de MLPA, los resultados fueron positivos para alteraciones del gen *CYP21A2* en 4 de 43 pacientes, resultado que se confirmó al repetir nuevamente el estudio. Tabla 6.

Tabla 6. Estudio de MLPA en pacientes con diagnóstico clínico de HSC clásica.

NÚMERO DE PACIENTE	DIAGNÓSTICO CLÍNICO (FORMA CLÍNICA)	RESULTADO DEL MLPA
1.	Forma perdedora de sal.	Delección del exón 4 al 8
2.	Forma perdedora de sal.	Mutación I172N
3.	Forma virilizante simple	Delección de 8 pb , incluye I172N y delección del cluster E6 (Q318X)
4.	Forma perdedora de sal	Mutación heterocigota en I172N/duplicación en la posición Q318X
5	Forma virilizante simple	Patrón normal
6.	Forma virilizante simple	Patrón normal
7.	Forma virilizante simple	Patrón normal

En todos los casos negativos al estudio por MLPA se realizó Secuenciación Sanger. Los resultados obtenidos mostraron mutaciones puntuales homocigotas en siete individuos, (16.27%) y 26 polimorfismos previamente reportados del gen *CYP21A2*, (60.24%), en el resto de los casos no se observó ningún cambio. Tabla 7.

De los casos positivos para alteraciones del gen mediante MLPA, con delecciones y duplicaciones todos presentaron un fenotipo severo de la enfermedad principalmente con déficit de aldosterona y ambigüedad genital.

Tabla 7. Resultados de Secuenciación Sanger en pacientes con HSC clásica negativos para MLPA y pacientes con HSC no clásica.

NÚMERO DE PACIENTE	DIAGNÓSTICO CLÍNICO (FORMA CLÍNICA)	RESULTADO DE SECUENCIACIÓN SANGER
5	HSC CLÁSICA VIRILIZANTE SIMPLE	Mutación puntual
6	HSC VIRILIZANTE SIMPLE	5 polimorfismos
7	HSC VIRILIZANTE SIMPLE	Una mutación puntual y un polimorfismo
8	HSC NO CLÁSICA	Patrón normal
9	HSC NO CLÁSICA	Patrón normal
10	HSC NO CLÁSICA	Patrón normal
11	HSC NO CLÁSICA	7 polimorfismos
12	HSC NO CLÁSICA	3 polimorfismos
13	HSC NO CLÁSICA	7 polimorfismos
14	HSC NO CLÁSICA	3 polimorfismos
15	HSC NO CLÁSICA	8 polimorfismos
16	HSC NO CLÁSICA	1 polimorfismo
17	HSC NO CLÁSICA	1 polimorfismo
18	HSC NO CLÁSICA	2 polimorfismos
19	HSC NO CLÁSICA	2 polimorfismos
20	HSC NO CLÁSICA	V282 normal
21	HSC NO CLÁSICA	6 polimorfismos
22	HSC NO CLÁSICA	3 polimorfismos
23	HSC NO CLÁSICA	6 polimorfismos
24	HSC NO CLÁSICA	V282 normal
25	HSC NO CLÁSICA	4 polimorfismos
26	HSC NO CLÁSICA	2 polimorfismos
27	HSC NO CLÁSICA	6 polimorfismos
28	HSC NO CLÁSICA	2 polimorfismos
29	HSC NO CLÁSICA	2 polimorfismos
30	HSC NO CLÁSICA	6 polimorfismos
31	HSC NO CLÁSICA	3 polimorfismos
32	HSC NO CLÁSICA	6 polimorfismos
33	HSC NO CLÁSICA	3 polimorfismos
34	HSC NO CLÁSICA	4 polimorfismos
35	HSC NO CLÁSICA	2 polimorfismos
36	HSC NO CLÁSICA	4 polimorfismos
37	HSC NO CLÁSICA	Patrón normal
38	HSC NO CLÁSICA	4 polimorfismos
39	HSC NO CLÁSICA	2 polimorfismos
40	HSC NO CLÁSICA	Patrón normal
41	HSC NO CLÁSICA	Patrón normal
42	HSC NO CLÁSICA	4 polimorfismos
43	HSC NO CLÁSICA	Patrón normal

En caso 1 se pudo realizar el estudio de MLPA y Secuenciación Sanger a los padres del individuo afectado, se pudo identificar el estado de heterocigoto en los padres, deleción del exón 4 al 8 en la madre, detectado por MLPA y el padre con una mutación puntual en el intrón 2 (IVS2AS, A/C-G, -13) identificada mediante Secuenciación Sanger, determinando de esta forma el estado de heterocigoto compuesto en el paciente. Figuras 9, 10, 11 y 12.

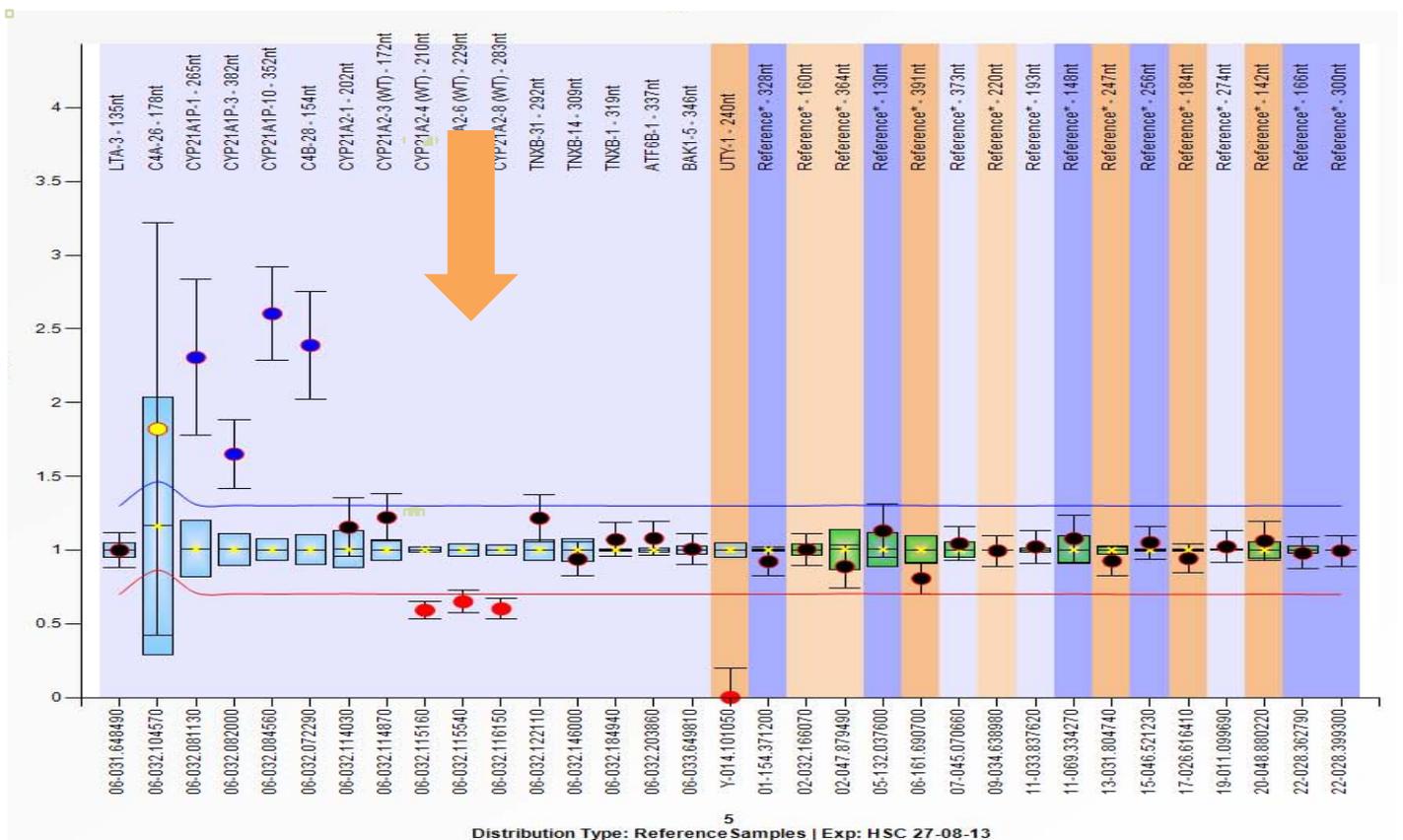


Figura 9. Gráfica del patrón de CYP21A2 en caso índice, obsérvese en la flecha la deleción de las tres regiones correspondientes a los exones 4, 6 y 8.

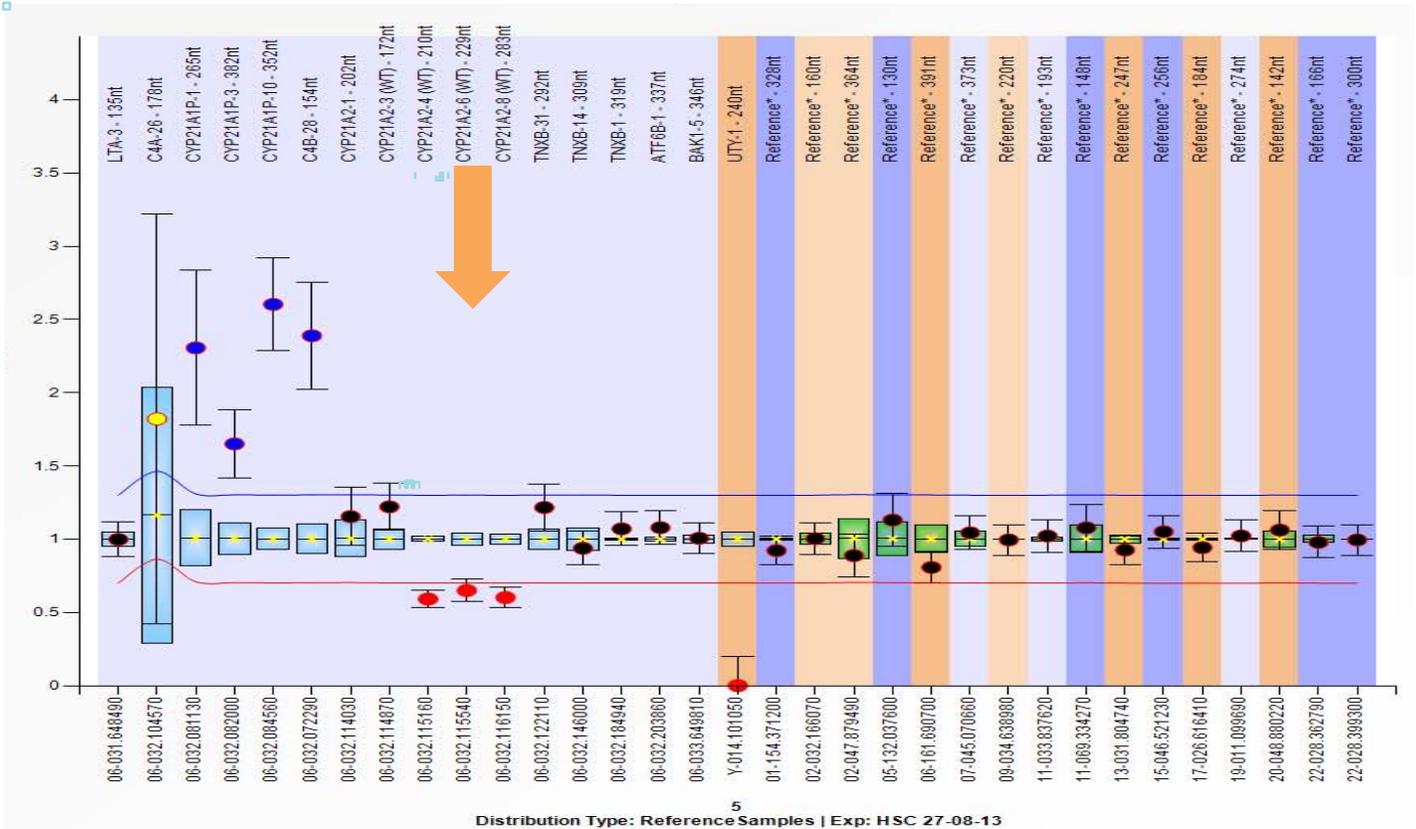


Figura 10. Gráfica del patrón de *CYP21A2* en madre del caso índice, obsérvese en la flecha la delección de las tres regiones correspondientes a los exones 4, 6 y 8, idéntica a la del probando..

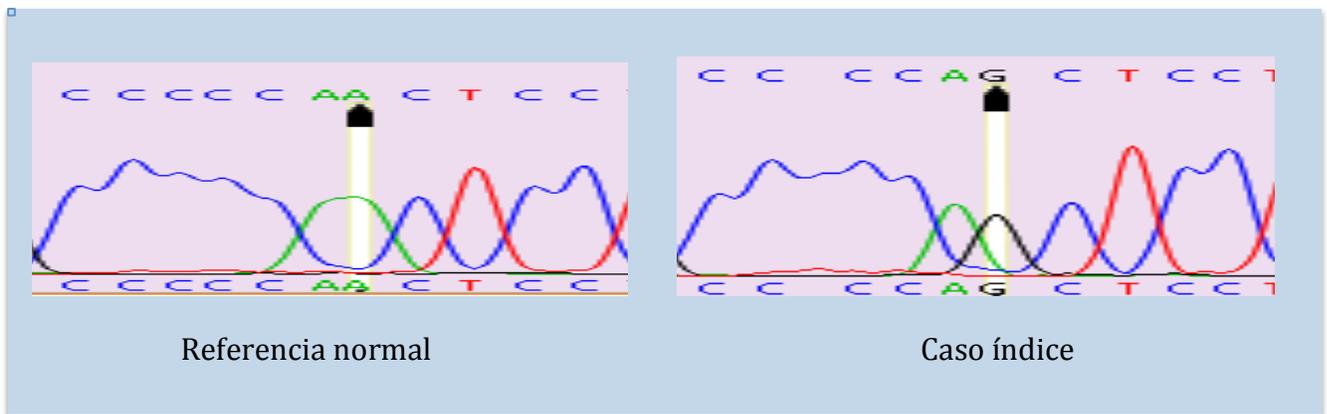


Figura 11. Electroferograma de Secuenciación Sanger del gen *CYP21A2* del caso índice, mutación intrónica en la cual hay una sustitución heterocigota de A por G (rs6467).

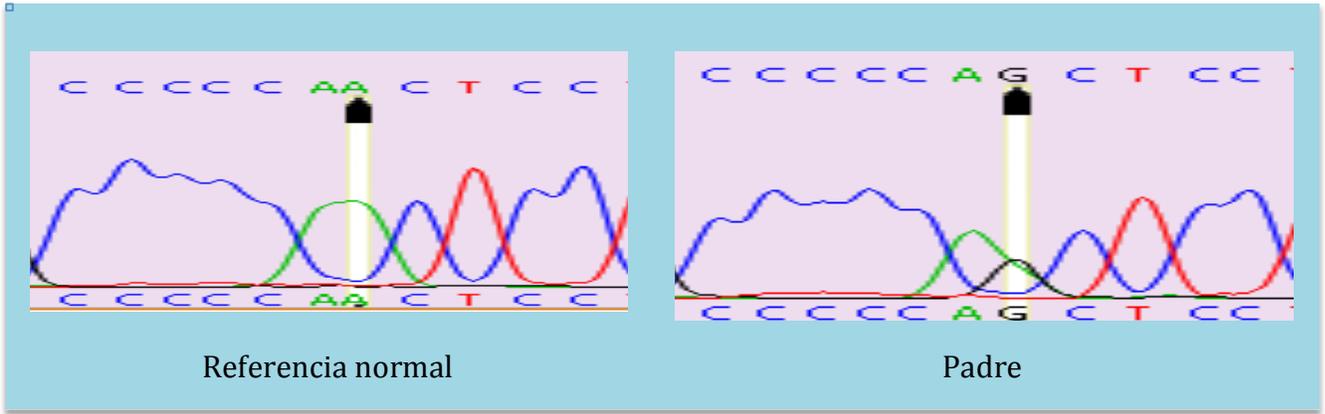


Figura 12. Electroferograma del patrón de Secuenciación Sanger del gen *CYP21A2* del padre del caso índice, se observa mutación intrónica en la cual hay una sustitución heterocigota de A por G (rs6467), idéntica a la del probando.

En la Figura 13 y 14 se muestra el electroferograma de uno de los pacientes positivo para dos deleciones detectadas mediante MLPA, en el cual no fue necesario algún estudio complementario.

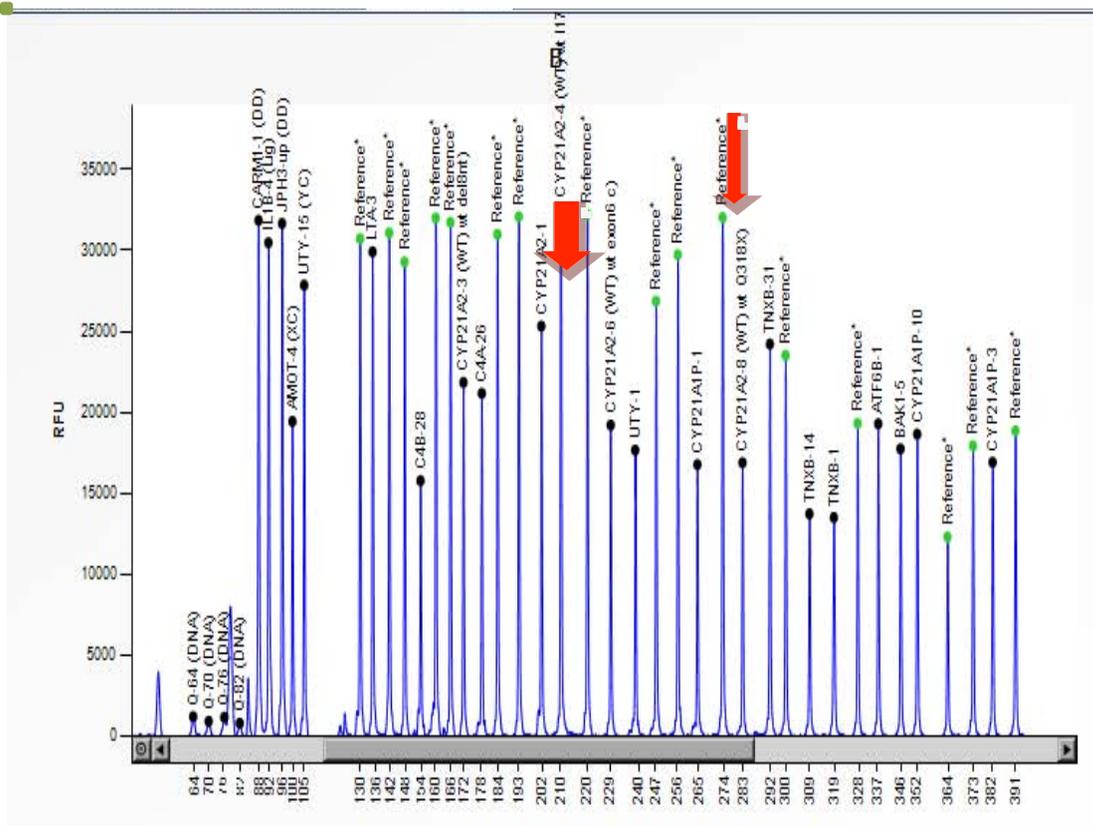


Figura 13. Electroferograma que muestra la fluorescencia de las sondas que reconocen regiones específicas en una muestra de referencia normal.

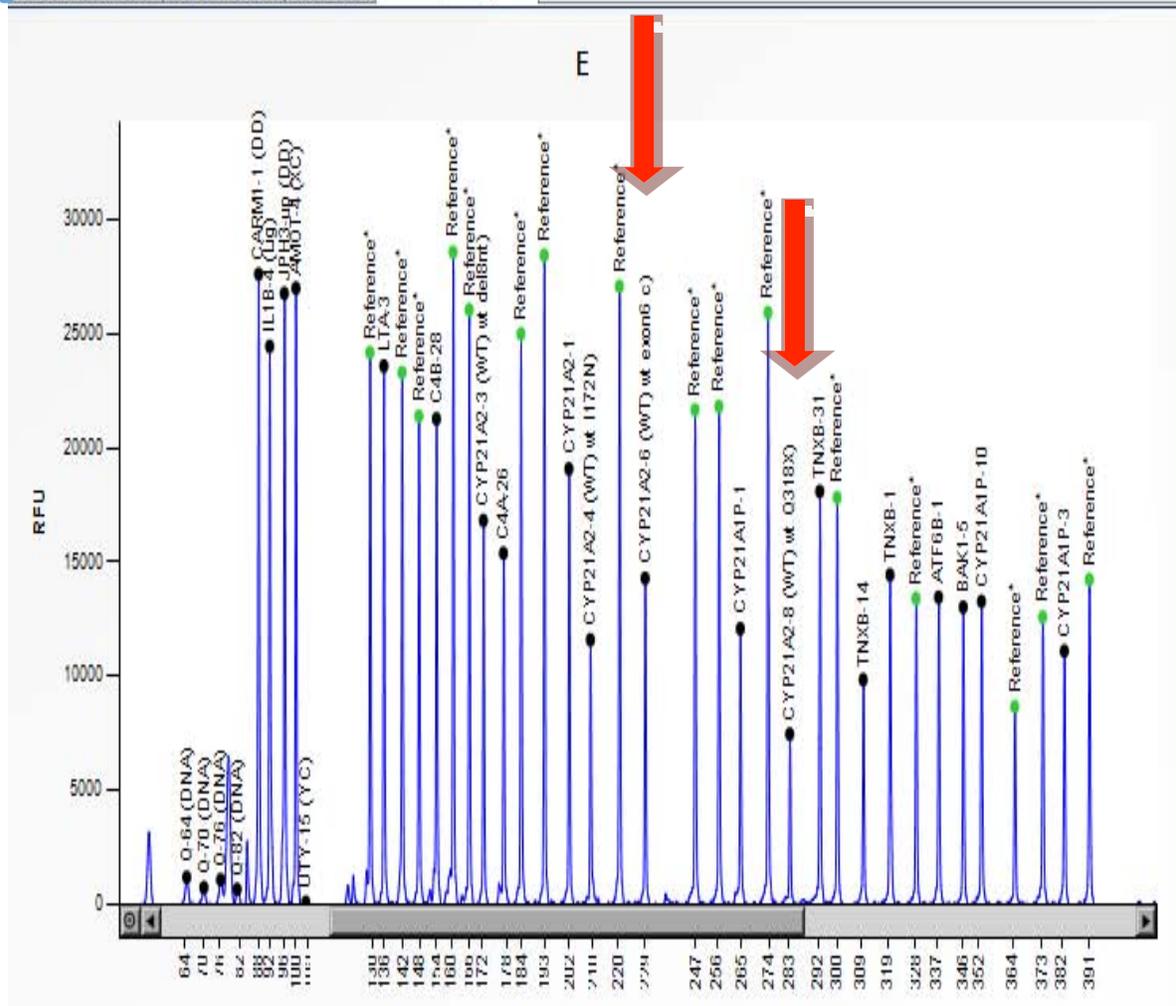


Figura 14. Electroferograma de caso índice donde se observa una disminución en la sonda 01974-L011507 I172N en el exón 4 y de la sonda 05477-L04895 Q818X en el exón 8.

## DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se identificaron un total de 43 pacientes con diagnóstico de Hiperplasia Suprarrenal Congénita, lo que representa aproximadamente el 30% de la solicitud de consulta para la Clínica de Diferenciación Sexual de la Unidad de Genética Médica del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga".

La presentación de la Hiperplasia Suprarrenal Congénita es autosómica recesiva, asumiendo que al menos uno de los padres es portador de alguna mutación en los genes relacionados con enzimas de la esteroidogénesis (2,4). Generalmente existe un aumento en la incidencia del padecimiento cuando se asocian factores como la endogamia y consanguinidad (3).

En relación a la edad, la mayoría de los pacientes estudiados con Hiperplasia Suprarrenal Congénita clásica se encontraban en la etapa de lactante representando el 57.14 %, seguido de escolares 28.57% y un adulto representando el 14.28%. Las edades de diagnóstico son similares a las reportadas en la literatura (3,13,14,15). Se contó oportunamente con las herramientas necesarias para realizar un diagnóstico clínico oportuno. Realizar el diagnóstico precoz de la HSC es de suma importancia debido al riesgo incrementado de presentar crisis suprarrenales por deficiencia de cortisol (13,14).

El presente trabajo incluyó el estudio clínico de los 7 pacientes con diagnóstico de HSC clásica y se pudo diferenciar la variedad perdedora de sal en el 42.85% de los pacientes y la forma virilizante simple en el 57.14%. En el

presente estudio se decidió incluir el análisis clínico molecular de 36 pacientes con diagnóstico clínico de Hiperplasia Suprarrenal Congénita no clásica.

Los siete pacientes estudiados con fenotipo clásico fueron también clasificados de acuerdo a su sexo de asignación en el cual el sexo femenino se encontró en el 71.42%, mientras que el sexo de asignación masculino fue en el 28.57%. De los dos pacientes con sexo de asignación masculino, uno cuenta con cariotipo XX y el otro cariotipo XY, pero ambos tienen la misma forma clínica, virilizante simple.

En los pacientes 46XX con variante perdedora de sal se observa más afectación genital, la mayoría fueron lactantes, en todos se observó ambigüedad genital con escala de Prader superior o igual a 3, similar a lo reportado en la literatura (3,5). Las variantes virilizantes presentaron un fenotipo con nula manifestación por deficiencia de mineralocorticoides, con una virilización progresiva condicionando en la infancia la presencia de pseudopubertad precoz con talla baja final (3,5)

En relación al estudio molecular por MLPA, se trata de un estudio diseñado para identificar deleciones y mutaciones deletéreas asociadas a formas graves.(10,16,17).

Es de importancia el análisis de las mutaciones detectadas por MLPA en los pacientes con resultado positivo ya que los tres pacientes que presentan la variante perdedora de sal tienen grandes deleciones del gen *CYP21A2*, lo cuál hace del MLPA una técnica ideal, tanto por su rapidez como por su coste, para ser utilizada como protocolo en pacientes con fenotipos severos de a enfermedad.

El estudio de Secuenciación del gen *CYP21A2*, mediante la técnica de Secuenciación Sanger en este trabajo demostró que los pacientes con fenotipo clásico presentan mutaciones puntuales lo que indica que este tipo de mutaciones generalmente se asocia a fenotipos menos severos. De la misma forma en los pacientes estudiados con diagnóstico clínico de HSC no clásica, del total de los pacientes estudiados (n= 36), el 77.78% presentó al menos un polimorfismo en el gen *CYP21A2*, y 22.2% presentaron un patrón normal. Estos resultados nos indican que el abordaje molecular en las formas no clásicas es más complejo en comparación con los fenotipos clásicos. La presentación de estos datos abre preguntas acerca de la relevancia de la presencia de estos polimorfismos en la presentación clínica.

## CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se caracterizaron las diferentes mutaciones del gen *CYP21A2* detectadas por el estudio de MLPA en pacientes con Hiperplasia Suprarrenal Congénita Clásica.

Este estudio demostró la utilidad del MLPA en la detección de deleciones/duplicaciones del gen, lo cual está fuertemente asociado a la severidad de la presentación clínica.

Este estudio demostró que formas menos severas de HSC clásica, las cuales no son detectadas por MLPA, se pueden detectar utilizando el estudio de Secuenciación con la técnica de Sanger.

Este estudio demostró que el abordaje molecular de las formas no clásicas de la HSC debe extenderse al estudio de otros genes aparte del *CYP21A2* y deja la puerta abierta a próximos estudios para analizar la relevancia de los polimorfismos en este gen como parte importante en la fisiopatología de la enfermedad.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Huynh T., McGown I, Cowley D. et al. The Clinical and Biochemical Spectrum of Congenital Adrenal Hyperplasia Secondary to 21-Hydroxylase Deficiency. *Clin Biochem Rev.* 2009; 30: 75-86.
- 2) Sahakitrungruang T. Clinical and molecular review of atypical congenital adrenal hyperplasia. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2015; 20:1-7.
- 3) Forest M.G. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Human Reproduction Update.* 2004; 10 (6): 469–485.
- 4) Valsalan R., Zimmermann A. Ambiguous genitalia and hypertension in a patient with congenital adrenal hyperplasia. *Internal Medicine Journal.* 2013. 334-337.
- 5) Labarta J.I., de Arriba A., Ferrández A. Hiperplasia suprarrenal congénita. *Protoc diagn ter pediatr.* 2011; 1:117-128.
- 6) Speiser P.W., Azziz R., Baskin L. S. et al. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(9):4133–4160.
- 7) Auchus R.J., Chang A. Y. 46,XX DSD : the masculinized female. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2010: 219–242.
- 8) Latorre S., Garzón C., Manosalva G. et al. Hiperplasia adrenal congénita por déficit de 21 hidroxilasa: un reto diagnóstico y terapéutico. *repert med cir.* 2016; 25(2):79–88.
- 9) Xu Z., Chen W. Merke D. et al. Comprehensive Mutation Analysis of the CYP21A2 Gene An Efficient Multistep Approach to the Molecular Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia. *The Journal of Molecular Diagnostics,* 2013; 15 (6): 745-753.
- 10) Choi J., Kim G., Yoo H. Recent advances in biochemical and molecular analysis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2016; 21:1-6.

- 11) Torres N., Mello<sup>2</sup> M.P., Germano<sup>3</sup> C.M.R. Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the *CYP21A1P* to the *CYP21A2* gene in congenital adrenal hyperplasia. *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36(10):1311-1318.
- 12) Allen L. Trastornos del desarrollo sexual. *Obstet Gynecol Clin N Am.* 2009; 36: 25-45.
- 13) Sarafoglou K, Lorentz C.P., Otten N. Molecular testing in congenital adrenal hyperplasia due to 21 $\alpha$ -hydroxylase deficiency in the era of newborn screening. *Clin Genet.* 2012; 82: 64–70.
- 14) Sharma R., Seth A. Congenital Adrenal Hyperplasia: Issues in Diagnosis and Treatment in Children. *Indian J Pediatr.* 2014; 81(2):178–185.
- 15) Tamizaje, diagnóstico y tratamiento del paciente con Hiperplasia Suprarrenal Congénita por deficiencia de 21 hidroxilasa. Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica: IMSS-715-14. 2014.
- 16) Kirac D., Guney A.I., Akcay<sup>3</sup> T. et al. The Frequency and the Effects of 21-Hydroxylase Gene Defects in Congenital Adrenal Hyperplasia Patients. *Annals of Human Genetics.* 2014; 78: 399–409.
- 17) SALSA MLPA KIT P050-B2 CAH. Description versión 24. 2009.
- 18) Labarta J.I., Bello E., Ferrández A., Mayayo E. Hiperplasia suprarrenal congénita: diagnóstico, tratamiento y evolución a largo plazo. *Endocrinol Nutr.* 2004;51(6):359-373.
19. Iguácel A. O. Hiperplasia suprarrenal congénita. Tratamiento. En: *Corteza Suprarrenal. 4º. Curso de Posgrado de la Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica.* 1999; 93-104.
20. Rodríguez S. A., Rodríguez A. J., Dobón W. P., Miguez N.C. et al. Hiperplasia suprarrenal congénita por defecto de la 21-hidroxilasa. *Acta Pediatr Esp.* 2001; 59:497-510.
21. Ritzen E.M. Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia: a commentary. *Trends Endocrinol Metab.* 1998; 9:293-5.

22. New M. Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia: the United States experience. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2001; 30:1-14.
23. Zachmann M., Tassinari D., Prader A. Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency: a study of 25 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:222-9.
24. Pang S. Congenital adrenal hyperplasia owing to 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Endocrinol Clin North Am.* 2001;30:81-101.
25. Zachmann M. Congenital adrenal hyperplasia due to 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Eur J Pediatr.*1996;155:259-61.
26. Yanase T., Simpson E.R., Waterman M.R. 17 $\beta$ -hydroxylase/ 17,20-lyase deficiency: from clinical investigation to molecular definition. *Endocr Rev.* 1991;12:91-108.
27. Miller W.L. Congenital lipid adrenal hyperplasia: the human gene knockout for the steroidogenic acute regulatory protein. *J Mol Endocrinol.* 1997;19:227-40.
28. Bens S., Mohn A., Yu B. Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia: Functional Characterization of Three Novel Mutations in the STAR Gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(3):1301–130.
29. Bhangoo A., Gu W. X., Pavlakis S. et al. Phenotypic features associated with mutations in steroidogenic acute regulatory protein. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2005; 90(11):6303-6309.
30. Bose H.S., Sugawara T., Straus J.F. et al. The pathophysiology and genetics of congenital lipid adrenal hyperplasia. *N Engl J Med.* 1996;335:1870-8.
31. Matsuo N., Tsuzaki S., Anzo M. et al. The phenotypic definition congenital lipid adrenal hyperplasia: analysis of the 67 Japanese patients. *Horm Res.* 1994;(Suppl 41):106.
32. Yoo H.W., Kim G.H. Molecular and clinical characterization of korean patients with congenital lipid adrenal hyperplasia. *J Ped Endocrinol Metab.* 1998;11:707-11.

ANEXOS.

Anexo. I

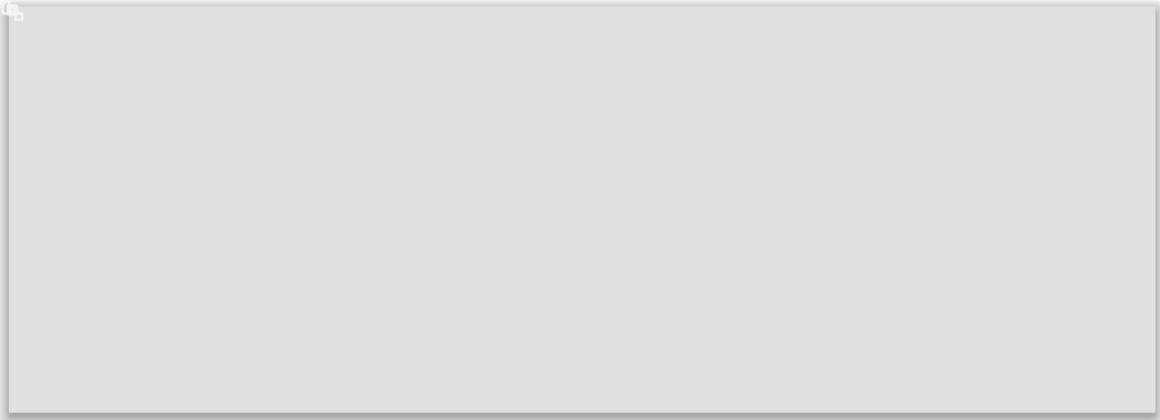
HOJA DE DATOS PARA PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE  
HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA

Nombre.

Número de caso.

Edad.

Árbol genealógico.



Antecedentes perinatales

-----Inicio prematuro de trabajo de parto

-----Hiponatremia neonatal

.....Hiperpigmentación de genitales.

Peso al nacimiento.....

DATOS CLÍNICOS

.....Ambigüedad genital: Prader:.....

..... Crisis hiponatrémicas

.....Gónada palpable

.....Talla baja

.....Hiperpigmentación en área genital

.....Hirsutismo

.....Síndrome de Ovario Poliquístico

.....Amenorrea: primaria.....

secundaria.....

ESTUDIOS DE LABORATORIO Y GABINETE:

Anexo II.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO:  
“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MUTACIONES EN EL GEN *CYP21A2* MEDIANTE  
EL ESTUDIO DE LIGACIÓN MÚLTIPLE DEPENDIENTE DE Sonda EN PACIENTES CON  
HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA CLÁSICA”

**Investigador principal.** Dra. Gloria Eugenia Queipo García

**Dirección del investigador.** Unidad de Genética, Unidad 311 A, Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Dr Balmis 169, Colonia Doctores, Cuauhtémoc, Ciudad de México.

**Teléfono de contacto del investigador:** 27892000 ext 1278 y 1279

### INTRODUCCIÓN

Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento, pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga.

Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud, la Declaración de Helsinki y las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética.

Para decidir si participa o no en este estudio, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los riesgos y beneficios con el fin de tomar una decisión informada. Este formato de consentimiento informado le dará información detallada acerca del estudio de investigación que podrá comentar con su médico tratante o con algún miembro del equipo de investigadores. Al final se le pedirá que forme parte del proyecto y de ser así, bajo ninguna presión o intimidación, se le invitará a firmar este consentimiento informado.

Procedimiento para dar su consentimiento: usted tiene el derecho a decidir si quiere participar en esta investigación, y se puede solicitar todo el tiempo que requiera para

considerar esta invitación. El investigador le explicará ampliamente los beneficios y riesgos del proyecto sin ningún tipo de presión y tendrá todo el tiempo que requiera para pensar solo o con quien usted decida consultarlo para decirle al investigador acerca de su decisión. Esta decisión no tendrá efecto alguno sobre su atención médica en el Hospital. Al final de esta explicación, usted debe entender los puntos siguientes

1. L justificación y los objetivos de la investigación.
2. Los procedimientos que se utilizarán y su propósito, incluyendo la identificación de que son procedimientos experimentales.
3. Los riesgos o molestias previstos.
4. Los beneficios que se pueden observar.
5. Los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para el sujeto.
6. Garantía para recibir respuestas a las preguntas y aclarar cualquier duda sobre los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento de la materia.
7. La libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se generen perjuicios en su atención y el tratamiento.
8. La seguridad de que no va a identificar al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relativa a su privacidad.
9. El compromiso de proporcionar información actualizada obtenida durante el estudio, aunque esto podría afectar la disposición para continuar con su participación en el estudio.
10. La disponibilidad de tratamiento médico y compensación a que legalmente tiene derecho, en el caso de que ocurran daños causados directamente por la investigación. Puede solicitar más tiempo o llevar a casa este formulario antes de dar una decisión final en los días futuros.

#### INVITACIÓN A PARTICIPAR Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

Estimado Sr. (a).....

El Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” le invitan a participar en este estudio de investigación que tiene como objetivo: \_Identificar este tipo de

mutaciones en los pacientes de nuestro Hospital que cumplan con los criterios de inclusión con la finalidad de determinar:

1. Mutaciones relacionadas con Hiperplasia Suprarrenal congénita.
2. Identificación dentro de la familia de aquellos individuos que tengan estado de portador.

Usted /su familiar fue invitado al estudio debido a que cuenta con características clínicas compatibles con Hiperplasia Suprarrenal Congénita.

#### PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Su participación en el estudio consiste en: una entrevista con el médico genetista para obtener información familiar y en la toma de muestra de sangre venosa. ÚNICAMENTE SE LE PIDE ACUDIR EN UNA OCASIÓN para la realización de estos procedimientos.

Las responsabilidades de los participantes incluyen: *reportar cambios de dirección o del estado de salud y acudir a recoger su desarrollo de manera personal una vez que se le contacte.*

#### RIESGOS E INCONVENIENTES

El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, señala que la obtención de muestras biológicas representa un riesgo mínimo dentro de la investigación. Los riesgos de la toma de muestra sanguínea son: posibilidad de sangrado ligero o moretón en el sitio de la punción, mareo o sensación de desmayo y raramente puede producirse punción arterial. El personal que extraerá la muestra sanguínea está entrenado para ello, lo que minimizará los riesgos de complicaciones.

Los datos acerca de su identidad y su información médica no serán revelados en ningún momento como lo estipula la Ley. Las muestras de sangre periférica que se obtienen para el estudio se identifican con un código que garantiza el anonimato de las y los pacientes y dicho código solo podrá ser revelado en caso necesario por el médico genetista responsable del proyecto.

Toda información que proporcione y la que exista en mi expediente del Hospital es confidencial y solo será utilizada para fines de investigación.

#### BENEFICIOS POTENCIALES

La detección de mutaciones en el gen *CYP21A2*, es de gran importancia para establecer el diagnóstico de Hiperplasia Suprarrenal congénita, y poder detectar el estado de portadores en los padres de los pacientes afectados y establecer una escala de riesgos de recurrencia.

#### CONSIDERACIONES ECONÓMICAS.

No se cobrará ninguna tarifa por participar en el estudio ni se le hará pago alguno. Todos los procedimientos que deriven de mi participación como son la obtención y almacenamiento de las muestras para material genético (ADN) no tendrán ningún costo.

#### COMPENSACIÓN

Si sufre lesiones como resultado de su participación en este estudio, nosotros le proporcionaremos el tratamiento inmediato y lo referiremos, en caso de ameritarlo, al especialista médico que requiera. El Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” no brinda ningún tipo adicional de compensación para cubrir el daño.

#### ALTERNATIVAS A SU PARTICIPACIÓN

Su participación es voluntaria. Sin embargo, usted puede elegir no participar en el estudio.

#### POSIBLES PRODUCTOS COMERCIALES DERIVABLES DEL ESTUDIO

Los materiales serán propiedad del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Si un producto comercial es desarrollado como resultado del estudio, tal insumo será propiedad del Hospital o quienes ellos designen. En tal caso, usted no recibirá un beneficio financiero.

## ACCIONES A SEGUIR DESPUÉS DEL TÉRMINO DEL ESTUDIO.

Una vez que se le contacte para informar de los resultados del estudio, usted puede solicitar los resultados de sus exámenes clínicos y de las conclusiones del estudio a la Dra. Gloria Eugenia Queipo García de la Unidad de Genética.

La investigación es un proceso largo y complejo. El tiempo de entrega de resultados es de 4 a 8 semanas una vez tomada la muestra de sangre.

En cualquier momento podrá contactar con el médico genetista tratante y/o al médico genetista responsable del protocolo para resolver mis dudas respecto a este estudio.

El obtener los resultados finales del proyecto puede tomar varios meses.

## PARTICIPACIÓN Y RETIRO DEL ESTUDIO

Su participación es VOLUNTARIA. Si usted decide no participar, no se afectará su relación con el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” o su derecho para recibir atención médica o cualquier servicio al que tenga derecho. Si decide participar, tiene la libertad para retirar su consentimiento e interrumpir su participación en cualquier momento sin perjudicar su atención en el Hospital. Se le informará a tiempo si nueva información es obtenida que pueda afectar su decisión para continuar el estudio. En caso de que usted decida retirar su muestra de ADN, dicha muestra se le entregará si así lo desea o se desechará en presencia de usted.

## CONFIDENCIALIDAD Y MANEJO DE SU INFORMACIÓN

Su nombre no será usado en ninguno de los estudios. Las muestras biológicas obtenidas no contendrán ninguna información personal y se codificará con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación. Por disposición legal las muestras biológicas, incluyendo la sangre, con catalogadas como residuos peligrosos biológico-infecciosos y por esta razón durante el curso de la investigación, su muestra no podrá serle devuelta. Es posible que sus muestras biológicas así como su información médica y/o genética puedan ser usadas para otros proyectos de investigación análogos relacionados con la enfermedad en estudio. No podrán ser usados para estudios de investigación que no estén relacionados con condiciones

distintas a las estudiadas en este proyecto. Sus muestras podrán ser almacenadas por los investigadores hasta por 10 años.

Los códigos que identifican su muestra estarán solo disponibles a los investigadores titulares, quienes están obligados por Ley a no divulgar su identidad. Estos códigos serán guardados en un archivero con llave. Solo los investigadores tendrán acceso. Su confidencialidad será protegida como lo marca la ley. Será mantenida asignando códigos a su información. El código es un número de identificación que no incluye datos personales. Ninguna información sobre su persona será compartida con otros sin autorización, excepto:

- Si es necesario para proteger sus derechos y bienestar (por ejemplo, si ha sufrido una lesión y requiere tratamiento de emergencia);o
- Es solicitado por la Ley.

Monitores o auditores del estudio podrán tener acceso a la información de los participantes.

Si usted decide retirarse del estudio, podrá solicitar el retiro y destrucción de su material biológico y de su información . Todas las hojas de recolección de datos serán guardadas con las mismas medidas de confidencialidad, y solo los investigadores titulares tendrán acceso a los daos que tienen su nombre.

Los datos científicos obtenidos como parte de este estudio podrían ser utilizados en publicaciones o presentaciones médicas. Su nombre y otra información personal serán eliminados antes de usar los datos.

Si usted lo solicita su médico de cabecera será informado sobre su participación en el estudio.

#### PARA ESTUDIOS GENÉTICOS

Su material genético no será usado con fines distintos a los mencionados en este documento, solo para proyectos de investigación relacionados con la enfermedad en estudio. Si el investigador desea usarlo con fines distintos deberá notificarlo y solicitarle su firma en un documento similar al que usted está leyendo.

## IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES.

Si usted tiene preguntas sobre el estudio puede ponerse en contacto con la Dra. Gloria Eugenia Queipo García en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” (teléfono 27892000 ext 1278 y 1279).

## DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que he tenido y todas han sido respondidas satisfactoriamente. Para poder participar en el estudio, estoy de acuerdo en los siguientes puntos:

Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente. Los objetivos generales, particulares del reclutamiento y los posibles daños e inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.

Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mis muestras biológicas, 10ml aproximadamente de sangre venosa para ser utilizada en este estudio. Así mismo, mi información médica y biológica podrá ser utilizada para mismos fines.

Estoy de acuerdo, en caso de ser necesario, que se me contacte en el futuro si el proyecto requiere recolectar información adicional o si encuentran información relevante para mi salud.

Mi firma también indica que he recibido por duplicado este consentimiento informado.

### Por favor responda las siguientes preguntas

**SI**

**NO**

(marque por favor)

a. ¿Ha leído y entendido la forma de consentimiento informado, en su lenguaje materno?
b. ¿Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y de discutir este estudio?
c. ¿Ha recibido usted respuestas satisfactorias a todas sus preguntas?
d. ¿Ha recibido suficiente información acerca del estudio y ha

tenido el tiempo suficiente para tomar la decisión?		
e. ¿Entiende que su participación es voluntaria y que es libre de suspender su participación en este estudio en cualquier momento sin tener que justificar su decisión y sin que esto afecte su atención médica o sin la pérdida de los beneficios a los que de otra forma tenga derecho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. ¿Autoriza se de acceso a sus registros médicos para este estudio de investigación y para propósitos regulatorios a....., sus representantes, los auditores, oficinas regulatorias del estudio y otras agencias gubernamentales de salud en México y posiblemente otras agencias de salud en otros países.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
g. ¿Entiende los posibles riesgos , algunos de los cuales son aún desconocidos, de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
h. ¿Entiende que puede no recibir algún beneficio directo de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
i. ¿Entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales a los que es acreedor de otra forma como sujeto en un estudio de investigación?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
j. ¿Entiende que el médico participante en el estudio puede retirarlo del mismo sin su consentimiento, ya sea debido a que usted no siguió con los requerimientos del estudio o si el médico participante en el estudio considera que médicamente su retiro es en su mejor interés?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
k. ¿Entiende que el estudio puede ser suspendido por el patrocinador del estudio en cualquier momento?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
l. ¿Entiende que usted recibirá un original firmado y fechado de esta Forma de Consentimiento, para sus registros personales?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Declaraciónn del paciente:** Yo, ..... declaro que es mi decisión participar en el estudio. Mi participación es voluntaria. He

sido informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios. Si suspendo mi participación, recibiré el tratamiento médico habitual al que tengo derecho en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" y no sufriré perjuicio en mi atención médica o en futuros estudios de investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en el estudio. Puedo obtener los resultados de mis exámenes clínicos si los solicito.

Debo informar a los investigadores de cualquier cambio en mi estado de salud o en la ciudad donde resido, tan pronto como sea posible. He leído y entendido toda la información que me han dado sobre mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad para discutirlo y hacer preguntas. Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibiré una copia formada de este consentimiento informado.

.....	.....	.....
Nombre del Participante	Firma del Participante	Fecha

.....  
 Coloque su huella digital si no sabe escribir

.....	.....	.....
Nombre del Representante Legal (si aplica)	Firma del Representante legal	Fecha

.....	.....	.....
Nombre del Investigador que explicó el documento	Firma del Investigador	Fecha

.....	.....	.....
Nombre del Testigo 1	Firma del Testigo 1	Fecha

Relación con el participante:.....

Dirección:.....

.....  
Nombre del Testigo 2

.....  
Firma del Testigo 2

.....  
Fecha

Relación con el participante:.....

Dirección:.....

Lugar y Fecha:.....  
(El presente documento es original y consta de ..... páginas)