

PROTOCOLO DE TRABAJO DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS MÉDICAS.

1.-TITULO: Caracterización de la secreción de prolactina y tiotropina en mujeres adultas con deficiencia de 21-hidroxilasa.

2. NOMBRE DEL ALUMNO: Dr. Juan Carlos Paredes Palma.

FIRMA:

3. NOMBRE DEL TUTOR: Dra. Ma. Del Carmen Cravioto Galindo.

FIRMA:

4. DIRECCIÓN: Departamento de Biología de la Reproducción.
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán.

Vasco de Quiroga No. 15.
Col. Sección XVI.
Delegación Tlalpan, CP. 14000
México, D.F.
Tel. 5487-0900 Exts. 2415 y 2416.

5. PATROCINIO: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(CONACYT).

Mayo 2007



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.

TABLA DE CONTENIDO

ANTECEDENTES

JUSTIFICACION Y DEFINICION DEL PROBLEMA

HIPOTESIS

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS

ESTUDIO ESPERIMENTAL

METODOLOGIA

ANEXOS

BIBLIOGRAFIA

PALABRAS CALVE : CARACTERIZACIÓN, SECRECIÓN, TIROTROPINA, PROLACTINA, MUJERES, DEFICIENCIA, HIDROXILASA.

ANTECEDENTES.

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) es una entidad clínica caracterizada por defectos en el funcionamiento de distintos complejos enzimáticos requeridos para la biosíntesis de cortisol y aldosterona. Se han identificado cinco defectos enzimáticos que pueden causar la HSC, que son las deficiencias de: 21-hidroxi-lasa, 11 β -hidroxilasa, 20-hidroxi-lasa, 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenada Δ 4- Δ 5-isomerasa y 17 α -hidroxilasa. La deficiencia de 21-hidroxi-lasa es la causa más frecuente de HSC.^(1,2)

Existen tres formas de presentación clínica de la deficiencia de 21-hidroxi-lasa: la forma clásica que se subdivide en las formas virilizante simple y la perdedora de sal y la forma no clásica. Estas variantes clínicas se correlacionan con el grado de actividad enzimática, así se estima que en la forma clásica perdedora de sal la actividad es de 0%, en la clásica virilizante simple es de 1-2% y en la no clásica varía entre 20 y 50%.⁽¹⁻³⁾

La forma clásica perdedora de sal se manifiesta desde la etapa neonatal con episodios de insuficiencia suprarrenal en ambos sexos. Las mujeres pueden presentar además genitales ambíguos y virilización, mientras que los varones por lo general tienen genitales normales al nacimiento, y desarrollan pubertad precoz durante la infancia. En la forma virilizante simple no existen crisis suprarrenales a menos que existan condiciones importantes de estrés.^(2,3)

La forma no clásica de la enfermedad se manifiesta por datos de hiperandrogenismo tales como: hirsutismo, acné y/o alopecia, y oligoanovulación, de inicio peri ó postpuberal. Es decir, un cuadro clínico similar al observado en el “Síndrome de Ovarios Poliquísticos”.^(2,3)

La deficiencia de 21-hidroxi-lasa se hereda como un rasgo autosómico recesivo. Se ha demostrado que el gen que codifica a la 21-hidroxi-lasa se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, cerca del locus del gen de histocompatibilidad HLA-B.⁽⁴⁾

La deficiencia de 21-hidroxi-lasa se origina por deleciones, mutaciones o inserciones en el gen que codifica para CYP21A2 y pseudogen CYP21A1P⁽⁵⁻⁷⁾ (ver anexo III).

En cuanto a lo conocido actualmente en la fisiopatología de las pacientes con deficiencia de 21-hidroxi-lasa se sabe que dado que los pacientes con este trastorno no pueden formar las cantidades normales de cortisol se produce un aumento compensador de las hormonas liberadora de corticotropina (CRH) y de la corticotropina (ACTH) lo que provoca la hiperplasia de las glándulas suprarrenales.⁽⁴⁾

Las concentraciones excesivas de ACTH estimulan la producción de esteroides hasta el punto del bloqueo enzimático, con el aumento resultante de los precursores, entre

los cuáles, el que se ha utilizado como marcador de la enfermedad es la 17α -hidroxiprogesterona (17OH-P4), sin embargo también se encuentran incrementados otros andrógenos suprarrenales como la dehidroepiandrosterona (DHEA) y su fracción sulfatada (DHEAS), así como andrógenos producidos en ovario como la androstendiona (Δ^4 -A) y la testosterona (T)⁽⁴⁾ (Ver anexo I).

Se han descrito ya los efectos de los progestágenos, los andrógenos, el cortisol, la angiotensina II y la aldosterona sobre el eje hipotálamo-hipofisis en otras enfermedades que cursan con producción deficiente de cortisol o bien en sujetos sanos. Inclusive se ha descrito el efecto del cortisol y ACTH en la secreción de tirotropina (TSH) y prolactina (PRL) en sujetos con hipocortisolismo. Sin embargo en ninguno de los casos se ha descrito la secreción de PRL y TSH en pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa, que además de tener hipocortisolismo e hipoadosteronismo, tienen concentraciones incrementadas de andrógenos, progestágenos y su repercusión clínica por ende no se ha considerado

Con respecto a lo anterior, se han hecho estudios en ratas hembras sanas en donde se sabe que los progestágenos pueden actuar a nivel hipotalámico en el núcleo arcuato y área preóptica inhibiendo la actividad de la tiroxina-hidroxilasa con lo que las concentraciones de dopamina disminuirían provocando que menores concentraciones de dopamina actúen a nivel del lactotrofo hipofisario con el concomitante incremento de PRL⁽⁸⁾.

De hecho se ha observado un incremento agudo de las concentraciones de PRL en mujeres ovariectomizadas posterior a una aplicación de 10mg de progesterona.⁽⁹⁾

También se ha observado que en mujeres con otras condiciones que cursan con deficiencia de glucocorticoides, como la insuficiencia suprarrenal primaria autoinmune (Enfermedad de Addison) y la ausencia quirúrgica de suprarrenales (en el tratamiento de la enfermedad de Cushing), las concentraciones de PRL y TSH se incrementan, revirtiendo rápidamente con la administración de glucocorticoides. En el caso de 2 mujeres con Enfermedad de Addison inclusive se documentó galactorrea.^(10,11) También se han informado casos aislados de mujeres con Addison con presencia de prolactinomas.^(11,12)

Por otra parte se ha observado que en mujeres con estados de hipercortisolismo como el estrés prolongado, en unidades de terapia intensiva, existe disminución de las concentraciones séricas de PRL.⁽¹³⁾ -Esto último también se observó en condiciones experimentales, como un incremento de cortisol inducido por la administración de ACTH a hombres y mujeres sanos⁽¹⁴⁾. Cabe hacer mención que en estos estados de hipercortisolismo o hipocortisolismo en donde se observaron incrementos ó disminución en las concentraciones de PRL y TSH ninguno cuenta con incremento de progestágenos y andrógenos como es el caso de la deficiencia de 21-hidroxilasa.

La estructura y capacidad funcional del ováριο de las pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa parece estar preservada. Esto anterior se demuestra con el éxito de embarazos a término posterior a una adecuada sustitución gluco y mineralocorticoide (15).

Sin embargo en algunas pacientes a pesar de una adecuado tratamiento no se logra el embarazo, por lo que el papel de la exposición prolongada a hiperprolactinemia en la reserva folicular ovárica antes de un adecuado tratamiento en estas pacientes cobraría importancia. Se ha determinado que la hiperprolactinemia persistente puede tener efecto luteolítico, inhibición de la foliculogénesis ovárica y en casos severos daño ovárico permanente. (16)

También se ha determinado que pudiera existir una producción ovárica incrementada de andrógenos en los pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa clásica y mayor propensión a Síndrome de Ovarios Poliquísticos (SOP), producto de una androgenización perinatal del eje hipotálamo-hipófisis, causando una hipersecreción de la hormona luteinizante (LH) en la pubertad (17).

Se ha descrito que los estrógenos son potentes inductores de la producción de PRL, a través de la hiperplasia e hipertrofia del lactotrofo o bien a través de alterar el tono dopaminérgico e incrementar la respuesta a otros neuromoduladores. (18,19) Estudios recientes han identificado el papel regulador del factor B transformador del crecimiento (TGF) en la acción del estradiol sobre el lactotrofo como mecanismo de origen de prolactinomas. (20) No se ha detectado incremento en las concentraciones promedio de estrógenos de las pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa en comparación con mujeres sanas y en edad reproductiva. (15) Sin embargo el efecto estrogénico persistente a nivel del lactotrofo hipofisario presente en las mujeres con deficiencia de 21-hidroxilasa no puede dejarse de considerar como un factor coadyuvante.

En cuanto a los mecanismos que pudieran sustentar la existencia de una relación inversa entre las concentraciones de cortisol por un lado y las de PRL y TSH por el otro, se ha observado que el cortisol ejerce un efecto supresor de la transcripción del gen de PRL (21)

Otras hormonas como la angiotensina II y las endorfinas podrían contribuir a la elevación de PRL en las pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa. La angiotensina II es capaz de estimular la secreción de prolactina según se ha demostrado en estudios *in vitro* (22) posiblemente a través de una acción autócrina mediada por receptores AT II específicos, (22) ya que renina, angiotensinógeno y la enzima convertidora de angiotensina (ECA) están presentes en el lactotrofo de hipófisis normales (23). La angiotensina II, incrementada en déficit de aldosterona induce la liberación de PRL a través de un mecanismo dependiente de calcio. (24,25) En primates la inyección intracerebro-ventricular de angiotensina II, incrementa los niveles de PRL plasmática en una forma dosis dependiente. (25)

En condiciones fisiológicas la PRL tiene un efecto sinérgico con ACTH en las células suprarrenales para incrementar la secreción de andrógenos a través de la inhibición

parcial de 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.⁽²⁶⁾ Por lo que el aumento de PRL esperado en las pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa puede tener un papel importante en la producción suprarrenal de andrógenos.

En cuanto a la regulación de la TSH existen datos que indican que el cortisol tiene una influencia negativa en la secreción de TSH y que cambios moderados en la biosíntesis de cortisol (como en el caso de la deficiencia de 21-hidroxilasa) se asocian a discretas alteraciones de la TSH.⁽³⁾ Es sabido que en estados de hipercortisolismo como el Síndrome de Cushing disminuye la amplitud de los pulsos de secreción de TSH y la media de TSH en 24hrs.⁽⁴⁾ En modelos animales (ratas), como en seres humanos, la administración de glucocorticoides inhibe la función tiroidea y cuando se infunde corticosterona en la adenohipófisis de ratas se suprime significativamente la respuesta hipofisaria de la TSH a la estimulación de la hormona liberadora de tirotropina (TRH). De forma contraria la adrenalectomía en ratas resulta en un incremento del RNA mensajero de la pro-TRH en las neuronas del núcleo paraventricular, mientras que la infusión de corticosterona y dexametasona en ratas intactas resulta en una reducción del RNA mensajero de la prepro-TRH.⁽⁴⁾ Se ha propuesto además que los cambios inducidos por el cortisol sobre la secreción de TSH pudieran estar mediados por alteraciones recíprocas en la liberación de CRH y β -endorfinas⁽⁴⁾

Algunos autores han propuesto que las alteraciones en la TSH pueden ser debidas a opiodes endógenos (claramente implicados en el control de la secreción de gonadotropinas, ACTH y vasopresina), sin embargo este efecto sobre la PRL y TSH es ampliamente controvertido.⁽²⁷⁾ Estudios en modelos animales reportan que los opiodes tienen una influencia inhibitoria sobre la secreción de TSH aparentemente mediadas por una disminución de la liberación de TRH en el hipotálamo. Algunos datos experimentales han sugerido que los opiodes endógenos puede influenciar la liberación de TSH hipofisaria por vía de una interacción con los receptores opiodes sobre las terminaciones nerviosas dopaminérgicas que disminuyen la liberación de dopamina en la eminencia media^(4,27)

Si bien en la literatura no existe información del papel del cortisol, aldosterona, andrógenos y progestágenos en la regulación hipofisaria de las pacientes con deficiencia de 21 α -hidroxilasa, a este respecto, en un estudio piloto realizado en nuestro Departamento observamos que en algunos varones portadores de la deficiencia de 21 α -hidroxilasa las concentraciones de PRL se encontraban elevadas, dentro de un amplio rango⁽²⁸⁾. Interesantemente en este año en seguimiento a lo observado se realizó un estudio en hombres con deficiencia de 21 α -hidroxilasa en donde se observó que en condiciones basales y posterior a estimulación con metoclopramida y TRH las concentraciones de PRL fueron significativamente mayores que los controles⁽²⁹⁾. A pesar de la anterior el estudio homólogo en mujeres con deficiencia de 21 α -hidroxilasa cobra mayor importancia, por que nos ayudará a comprender el papel regulador que puedan tener otros complejos hormonales que no se encuentran normalmente en los varones como el hiperestrogénismo persistente así como la forma en la que el ovario se adapta al bloqueo enzimático, las acciones periféricas y centrales de la Prolactina en la reproductividad y regulación hipotálamo

hipofisaria de estas mujeres.

Estos datos permiten inferir que en las pacientes con deficiencia de 21- α hidroxilasa pueden presentar alteraciones de la síntesis y/o secreción y regulación hipotálamo-hipofisis-gonada, secundarias a la deficiencia crónica de corticosteroides, aldosterona y también a la cantidad excesiva de andrógenos y progestágenos acumulados como consecuencia del bloqueo enzimático y que se manifestarían con un incremento en la Prolactina y TSH con implicaciones clínicas no documentadas.

B y C) Justificación y Definición del problema

La deficiencia de 21 α hidroxilasa es uno de los trastornos autosómicos recesivos más comunes en los humanos. Si bien es cierto la prevalencia de la forma clásica en la población mundial es infrecuente (1-10 000 para la virilizante simple y 1-60 000 para la perdedora de sal). En el caso de la forma no clásica la prevalencia es mayor (1-1000) y en los hispanos dicha frecuencia se ha reportado aún mayor (10 a 20 - 1000)^(4,30). Así mismo si partimos del hecho que la mayor parte de los pacientes con la forma no clásica de la enfermedad son portadores heterocigotos para un alelo afectado con una mutación de pérdida severa del funcionamiento enzimático (27-76%), éstos se encuentran en un riesgo incrementado de concebir un niño(a) con la forma clásica de la enfermedad si el padre también carga la mutación de pérdida severa del funcionamiento enzimático.⁽³¹⁾ La probabilidad calculada de tener un niño(a) afectado con la forma clásica entre padres no clásicos es de 1-480 y la probabilidad calculada para una mujer no clásica de concebir un no clásico es de 1-32 (si damos por hecho que la prevalencia de portar un gen con una mutación de mediano funcionamiento enzimático en la población general es de 1-16).^(4,31) En estudios prospectivos actuales se ha observado que el riesgo de una madre no clásica para 21 hidroxilasa de tener un bebé con la forma clásica de la enfermedad es de 2.5% y que el 14.8% de los niños(a) de madres no clásicas tienen la forma no clásica de la enfermedad⁽³⁰⁾.

Del mismo modo el impacto clínico en la comprensión del esquema fisiopatológico completo de la enfermedad traerá consigo la posibilidad de desarrollar tratamientos alternos o bien complementarios a los glucocorticoides utilizados actualmente, evitando los efectos adversos ya bien conocidos de dichos medicamentos como: Síndrome de Cushing iatrógeno, Diabetes secundaria, Hipertensión secundaria y Osteoporosis entre otras. Así como nos ayudará a la comprensión de los procesos de regulación neuroendocrina en el humano, que en la mayor parte de los casos aún no se comprenden.

Así mismo el entendimiento del papel de la hiperprolactinemia probablemente observada en los pacientes con el defecto enzimático, en el caso de las mujeres, traerá consigo la comprensión del por qué a pesar que algunas mujeres con adecuado tratamiento de sustitución glucocorticoide no se embarazan, esto debido a que puedan

tener una reserva folicular reducida, falla en la implantación y/o función lútea anormal, que ya se ha establecido bien que puede ser provocado por un estado hiperprolactinémico prolongado, como en el caso que pudieran presentar nuestras pacientes.

Si bien es cierto se ha establecido ya fehacientemente parte del esquema fisiopatológico de la deficiencia de 21α -hidroxilasa, dicho esquema en cuanto a la compresión de los patrones de secreción hipotalámica e hipofisaria así como la forma de regulación neuroendocrina y gonadal esta incompleto y no se ha investigado en ninguna parte del mundo y no permite establecer hasta el momento otras alternativas de tratamiento que no sean tan deletéreos como los glucocorticoides.

D) Hipótesis:

Las pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa presentan un incremento en las concentraciones de PRL y TSH en estado basal y posterior a estimulación con metoclopramida y TRH con respecto a mujeres adultas sanas, secundario a la deficiencia crónica de cortisol y en menor grado de aldosterona y también a la cantidad excesiva de andrógenos y progestágenos acumulados como consecuencia del bloqueo enzimático.

6.- Objetivos generales y específicos:

Objetivo general: Caracterizar la secreción de la Prolactina y Tirotropina hipofisaria en mujeres adultas con deficiencia de 21-hidroxilasa.

Objetivos específicos: 1) Determinar las concentraciones basales de PRL, TSH, LH, FSH en mujeres afectadas con deficiencia de 21-hidroxilasa con y sin tratamiento con glucocorticoides 2) Investigar las características de la respuesta hipofisaria en términos de PRL y TSH a la administración iv de TRH en mujeres afectadas con y sin tratamiento con glucocorticoides 3) Investigar las características de la secreción de PRL bajo estímulo de metoclopramida en mujeres afectadas con y sin tratamiento con glucocorticoides.

7.- Diseño del estudio, b) descripción de la maniobra o intervención, c) Cálculo del tamaño de muestra, d) mecanismo de asignación del tratamiento, e) grupos de tratamiento y f) duración del seguimiento individual.

a) Estudio experimental, no aleatorizado, prospectivo.

b) A 5 mujeres adultas con diagnóstico de deficiencia de 21-hidroxilasa clásica virilizante simple, y a 5 mujeres con deficiencia no clásica de 21-hidroxilasa y sin presencia de tumoraciones hipofisarias y/o para-axiales cerebrales, atendidos en el Departamento de Biología de la Reproducción del INCMSZ, se les practicará evaluación hormonal de la función hipofisaria en condiciones basales y post-estimulación con la hormona hipotalámica liberadora de tirotrópina (TRH) y con el antagonista dopaminérgico metoclopramida. Dicha evaluación se realizará en dos ocasiones, sin y con tratamiento sustitutivo a base de dexametasona: 0.50mg vo diarios administrados en una dosis nocturna (con regularidad menstrual de por lo menos 2 ciclos y con 17-hidroxiprogesterona menor de 2ng/mL y andostendiona entre 700 y 2000 pg/mL)

De igual manera se estudiarán como controles 10 mujeres sanas, adultas, pareados por edad ± 2 años e IMC. Una vez que la paciente y su control hayan entregado por escrito consentimiento para participar en el estudio se llevará a cabo una entrevista directa, utilizando un cuestionario preestructurado y validado, integrado por reactivos encaminado a obtener y/o actualizar información relacionada con las características demográficas y clínicas. En el caso de los afectados se considerará con especial atención la historia familiar de deficiencia de 21-hidroxilasa.

Se investigarán los tratamientos que se hubiesen practicados con anterioridad al estudio. Previamente se realizarán sesiones de consenso para establecer los criterios de clasificación de las variables por registrar. Finalmente se practicará exploración física y se obtendrán muestras sanguíneas para realizar biometría hemática, química sanguínea (glucosa, BUN, creatinina), electrolitos séricos, perfil de lípidos y examen general de orina.

Después de descartar alguna alteración en los exámenes generales que contraindiquen la participación en el estudio, se procederá a la evaluación funcional hormonal. Esta se realizará en 2 sesiones, separadas por un intervalo no mayor a dos semanas.

Los estudios de laboratorio (cuantificaciones hormonales y secuenciación genética de las mutaciones en los afectados) serán realizadas por el alumno de maestría auxiliado por personal calificado en la realización de dichos procesos.

SESION 1. Prueba de estimulación con metoclopramida

Después de un ayuno de 10 a 12 hrs, se canalizará una vena periférica utilizando un catéter No. 16 a través del cual se obtendrán las muestras sanguíneas. Se mantendrá permeable mediante infusión de solución salina 0.9%. Después de 30 minutos de reposo, entre las 7:00 y 8:30hrs AM se tomarán 19 muestras sanguíneas, la primera de 20mL y las subsecuentes de 6mL, con intervalo de 20 minutos. En seguida se administrará por v.o una dosis única de 10mg de metoclopramida y se continuará el muestreo cada 30 minutos (6ml) durante 3hrs. En cada tiempo de muestreo los primeros 0.3ml de sangre serán desechados para evitar un error de dilución. En todas las muestras obtenidas en condiciones basales y después de estimulación se cuantificará PRL. Además en las muestras basales se determinará en una sola ocasión ACTH, cortisol, 17OH-P4, progesterona (P4), Δ 4A, DHEA, LH, FSH, T y E₂. El volumen de sangre total a obtener será de aproximadamente 165ml. El suero se centrifugará y almacenará a -20° C hasta su análisis.

SESION 2. Prueba de TRH

Bajo las mismas circunstancias ya descritas para la prueba de metoclopramida y después de haber obtenido las 19 muestras basales, se administrarán 200µg de TRH en bolo único i.v., continuando con los muestreos a los tiempos +5, +10, +15, +20, +30, y +60 minutos post-estímulo. En cada tiempo se obtendrán 6ml de sangre para cuantificar PRL y TSH. En las muestras basales se cuantificarán además T₃, T₄, en una sola ocasión. Al final de la prueba la cantidad de sangre total obtenida será de aproximadamente 150 mL.

- c) Debido a que se trata de un estudio piloto el cálculo de tamaño de muestra se realizará en base a parámetros no probabilísticos siendo éste de conveniencia, con lo que se decide incluir 5 individuos en cada grupo de los casos y 9 controles.
- d) Todos los pacientes con deficiencia de 21 α -hidroxilasa recibirán tratamiento con dexametasona 0.50mg diarios, durante tres meses, iniciando después del estudio basal. Los controles no recibirán tratamiento.
- e) Diez pacientes mujeres con deficiencia de 21 α -hidroxilasa sin tratamiento glucocorticoide y 10 controles sanas.
- f) Las pacientes con la deficiencia de 21-hidroxilasa tendrán un total de seguimiento de 5 meses: un mes para evaluación clínica general y estudio hormonal en condiciones sin tratamiento, cinco meses bajo tratamiento con glucocorticoides y un mes de estudio hormonal bajo tratamiento. El grupo control permanecerá en el estudio solo un mes, que es el tiempo requerido para llevar a cabo la evaluación clínica general y el estudio hormonal que se realizará en una sola ocasión.

8. Criterios: a) inclusión b) exclusión y c) eliminación

- a) Se incluirán mujeres con diagnóstico molecular de deficiencia de 21-hidroxilasa, que no hayan recibido tratamiento con glucocorticoides y/o mineralocorticoides en 3 meses previos y que en caso de que estén bajo tratamiento no existe contraindicación para suspenderlos con fines de participar en el estudio. Los controles serán mujeres adultas, sanas, que no reciban medicamentos que afecten los resultados del estudio.
- b) Se excluirán pacientes bajo tratamiento e imposibilidad para suspenderlo o que no pudieran cumplir con otro procedimiento del estudio. Así mismo se excluirán cuando exista anemia, hipertensión, cardiopatías, tumores cerebrales diferentes a los prolactinomas, insuficiencia renal aguda o crónica (creatinina >1.5 mg/dL) o hepática. Consumo en un mes previo de metoclopramida, veraliprida, domperidona, cisaprida, inhibidores de la recaptura de serotonina, fenotiazinas, haloperidol, inhibidores de la monoaminooxidasa, reserpina, alfa-metil-dopa, verapamilo y cocaína.
- c) Se eliminarán sólo aquellas participantes que durante el estudio presentaran alguna de las contraindicaciones antes señaladas, o cualquier otra condición grave que impidiera continuar.

9. a) Variables a medir principal y secundarias b) frecuencia de las mediciones, c) criterios de éxito y falla en caso necesario y d) estrategia del análisis estadístico.

a) La variable independiente será el grado de deficiencia de 21-hidroxilasa mientras que las variables dependientes serán las concentraciones de PRL y TSH. Otras variables intervinientes o complementarias que se medirán son T3, T4, ACTH, cortisol, 17OHP4, P4, DHEA, Δ 4A T, E2, aldosterona así como actividad plasmática de la renina.

VARIABLE	DEFINICIÓN
1.-Deficiencia de 21 Hidroxilasa	Variable independiente Variable cualitativa ordinal
Escala de Medición	
virilizante simple.	<p>Diagnóstico basado en características clínicas, hormonales y moleculares.</p> <p>Clínicas:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.-Alteraciones en la diferenciación sexual, con una clasificación de Prader mayor de 1. (ver anexo II) 2.-Amenorrea primaria, secundaria , irregularidades menstruales y/o pubertad precoz. 3.-Infertilidad , pérdidas gestacionales recurrentes. 4.-Crecimiento lineal acelerado en la pubertad pero con talla baja final. 5.- Hiperandrogenismo. (FW>16) 6.-Cuadros de desequilibrio hidroelectrolítico. <p>Hormonales:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.-Concentraciones de 17OHP4 mayor de 10 ng/mL en cuantificación basal en fase folicular temprana o bien posterior a una prueba de ACTH 0.25mg con concentración a las 2 hrs mayor de 17OHP4, en los casos en los que la concentración basal de 17OHP4 este entre 2 y 6 ng/mL. 2.-Concentraciones de : <ul style="list-style-type: none"> Testosterona >0.75ng/mL, Androstendiona>2000pg/mL Dehidroepiandrosterona>9.8 ng/mL ACTH normal alta (7-9.8ng/mL) o bien>100 pg/mL. Cortisol en orina normal bajo(21-60 ug/24hrs) o bien <21ug/24hrs. <p>Moleculares:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- Identificación de mutaciones asociadas a la forma virilizante simple. (ver anexo III).
no clásica.	<p>Diagnóstico basado en características clínicas, hormonales y moleculares.</p> <p>Clínicas:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.- Cuadro clínico de inicio en la menarca, sugestivo de Síndrome de ovarios poliquísticos (oligomenorrea, hiperandrogenismo, hiperandrogenemia, usg endocavitario con status de poliquistosis ovárica). 2.-Infertilidad y pérdidas gestacionales recurrentes. 3.- Posibles alteraciones de la diferenciación sexual, con una clasificación de Prader menor o igual a 1.(ver anexo II) <p>Hormonales:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.-Concentraciones de 17OHP4 mayor de 10 ng/mL en cuantificación basal en fase folicular temprana o bien posterior a una prueba de ACTH 0.25mg con concentración a las 2 hrs mayor de 17OHP4, en los casos en los que la concentración basal de 17OHP4 este entre 2 y 6 ng/mL. 2.-Concentraciones de : <ul style="list-style-type: none"> Testosterona >0.75ng/mL, Androstendiona>2000pg/mL

	<p>Dehidroepiandrosterona >9.8 ng/mL ACTH normal alta (7-9.8ng/mL) o bien >100 pg/mL. Cortisol en orina normal bajo (21-60 ug/24hrs) o bien < 21ug/24hrs.</p> <p>Moleculares: 1.- Identificación de mutaciones asociadas a la forma no clásica. (ver anexo III).</p>
2.-Cuantificación de prolactina, y tiotropina	<p>Variables dependientes Variables cuantitativas continuas</p>
Escala de Medición	
Prolactina	<p>Hormona hipofisaria que contiene 198 aminoácidos y peso molecular de 21 500kDa, homologa a Hormona de crecimiento y lactógeno placentario, su gen de expresión esta ubicado en el cromosoma 6 y es secretada por el grupo celular hipofisario denominado lactotrópo. Se cuantificara mediante IRMA en los laboratorios del departamento de Biología de la Reproducción y los resultados se expresarán en ng/mL</p>
Tiotropina	<p>Hormona hipofisaria que es secretada por el grupo hipofisario denominado tiotropo, relacionada con la LH y FSH , con las cuáles comparten una subunidad alfa pero tienen una unidad beta específica. Se cuantificará mediante IRMA en los laboratorios del departamento de Biología de la Reproducción y los resultados se expresarán en uUI/mL</p>
3.-Cuantificaciones de otras Hormonas	<p>Variables intervinientes o complementarias. Variables cuantitativas continuas.</p>
Escala de Medición	
Tiroxina	<p>Hormona glicoprotéica derivada de la tiroglobulina producida y secretada en la glándula tiroidea. Será cuantificada en los laboratorios centrales del INNSZ con las técnicas establecidas por él mismo. Los resultados se expresarán en nmol/mL.</p>
Leiotironina	<p>Hormona glicoprotéica derivada de la tiroglobulina producida y secretada en la glándula tiroidea. Será cuantificada en los laboratorios centrales del INNSZ con las técnicas establecidas por él mismo. Los resultados se expresarán en nmol/mL.</p>
Hormona Folículo Estimulante y Hormona Leutinizante	<p>Hormonas hipofisarias que son secretadas por un grupo celular hipofisario denominado gonadotropo, cuentan con una unidad α común a otras hormonas glucoproteicas pero una unidad β específica. Será cuantificada en los laboratorios centrales del INNSZ con las técnicas establecidas por él mismo. Los resultados se expresarán en mIU/mL.</p>
Adrenocorticotropina	<p>Hormona hipofisaria que contiene 39 aminoácidos derivada de la biotransformación de la Pro-opiomelanocortina (POMC). Será cuantificada en los laboratorios centrales del INNSZ con las técnicas establecidas por él mismo. Los resultados se expresarán en pg/mL</p>
Cortisol	<p>Hormona esteroidea producto de la biotransformación de colesterol con paso limitante del 11 desoxicortisol a cortisol por medio de la actividad de la 11 β hidroxilasa. Será cuantificada en los laboratorios centrales del INNSZ con las técnicas establecidas por él mismo. Los resultados se expresarán en ug/dL.</p>

17.-hidroxiprogesterona	Hormona esteroidea producto de la biotransformación de colesterol con paso limitante de la progesterona a 17 hidroxiprogesterona por medio de la actividad de la enzima 17 α Hidroxilasa. Será cuantificada mediante IRMA en los laboratorios del departamento de Biología de la Reproducción y los resultados serán expresados en ng/mL.
Progesterona	Hormona esteroidea producto de la biotransformación de colesterol con paso limitante de la pregnenolona a progesterona a través de la actividad de la enzima 3 β hidroxisteroide deshidrogenada. Será cuantificada en los laboratorios centrales del INNSZ con las técnicas establecidas por él mismo. Los resultados se expresarán en ng/dL.
Dehidroepiandrosterona	Hormona esteroidea producto de la biotransformación del colesterol con paso limitante de la 17 α hidroxipregnenolona a dehidroepiandrosterona a través de la actividad de la enzima 17,20 Liasa. Será cuantificada en los laboratorios centrales del INNSZ con las técnicas establecidas por él mismo. Los resultados se expresarán en ng/mL
Androstendiona	Hormona esteroidea producto de la biotransformación de colesterol con paso limitante de 17 α hidroxiprogesterona a androstendiona o bien de dehidroepiandrosterona a androstendiona a través de la actividad de la 17,20 liasa en el caso del primero y de la 3 β hidroxisteroide deshidrogenada en el segundo. Será cuantificada en los laboratorios centrales del INNSZ con las técnicas establecidas por él mismo. Los resultados se expresarán en pg/mL
Testosterona	Hormona esteroidea producto de la biotransformación del colesterol con paso limitante de la androstendiona a testosterona, o bien de androstenediol a testosterona a través de la enzima 17 β hidroxisteroide deshidrogenada en el primero y de la 3 β hidroxisteroide deshidrogenada en el segundo. Será cuantificada en los laboratorios centrales del INNSZ con las técnicas establecidas por él mismo. Los resultados se expresarán en ng/mL.
Estradiol	Hormona esteroidea producto de la biotransformación del colesterol con paso limitante de la aromatización de la testosterona a estradiol y de estrona a estradiol a través de la enzima aromatasa en el primero y de la 17 β hidroxisteroide deshidrogenada tipo 2 en el segundo. Será cuantificada en los laboratorios centrales del INNSZ con las técnicas establecidas por él mismo. Los resultados se expresarán en pg/mL.
Aldosterona	Hormona mineralocorticoide producto de la biotransformación de colesterol con paso limitante de la corticosterona a aldosterona a través de la actividad de la enzima 18-Hidroxilasa-oxidasa y de la actividad del sistema renina angiotensina. Será cuantificada en los laboratorios centrales del INNSZ con las técnicas establecidas por él mismo. Los resultados se expresarán en pg/mL.

b) Frecuencia de mediciones: Ver inciso 7b

c) Criterios de éxito y falla: No aplica

d) Se calculará promedio, error estándar de la media y desviación estándar, de las concentraciones cuantificadas de PRL y TSH en los pacientes y controles en condiciones basales y posterior a estimulación con TRH y metoclopramida. Se cuantificará el pico máximo de secreción, delta y porcentaje de cambio de PRL y TSH en controles y en pacientes con y sin tratamiento con dexametasona posteriores a la estimulación con metoclopramida y TRH. La comparación entre grupos se realizará con U de Mann Whitney. Se considerará diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$.

10.-Estudios con riesgo: a) tipo, b) frecuencia y c) justificación.

- e) Mínimo. Se efectuará procedimiento de rutina como punción venosa y colocación de catéter periférico del No. 16 de forma transitoria para tomar las muestras sanguíneas y para administrar la TRH. Además de dolor local y equimosis que pudieran causar la venopunción no se contemplan otros riesgos como infección, ya que se utilizará material estéril y desechable. La TRH es una hormona sintética ampliamente utilizada en estudios diagnósticos y de investigación humanas. Se ha evidenciado en menos del 1% crisis hipertensiva. La metoclopramida es un medicamento utilizado en la práctica clínica rutinaria que posee propiedades gastroenterocinéticas, antieméticas y analgésicas centrales. No se conocen efectos adversos secundarios a la administración de una dosis. La dexametasona que se administrará a los pacientes durante 3 meses constituye un recurso terapéutico habitual para el padecimiento y sus efectos secundarios son aceptables en la práctica regular.
- f) A los pacientes se les canalizará en vena periférica en 4 ocasiones y a los controles sólo en 2. Se contempla que en cada una de las sesiones de estudio se les realizará una sola punción, ya que para administración del estímulo y obtención de muestras sanguíneas se utilizará el mismo catéter. El volumen total de sangre requerida será de 50mL en la sesión 1 y de 75mL en la sesión 2. Se estimulará con TRH en dos ocasiones a los pacientes y en una ocasión a los controles por lo que el volumen total será de aproximadamente 250 y 125mL.
- g) Las cateterizaciones referidas se justifican por ser el medio óptimo para la obtención de varias muestras sanguíneas, evitándose las incomodidades de punciones múltiples. La hormona TRH es un estímulo específico y óptimo para la valoración hormonal que se plantea. La metoclopramida por ser un potente estimulador de la PRL es una prueba utilizada en la valoración de esta hormona. La cantidad

total de sangre obtenida a lo largo del estudio (aproximadamente 250 mL en pacientes y 125mL en controles) es significativamente menor a las que se aceptan en donaciones habituales sin comprometer la salud de los donadores. La información que se obtendrá del estudio justifica planamente los procedimientos.

11. a) Beneficios esperados, b) riesgos potenciales (presencia de complicaciones o efectos adversos, considerar interacciones medicamentosas) c) ponderación de riesgos contra beneficios y d) procedimientos a seguir en caso de que se presenten algunos riesgos.

h) Para los pacientes:

Casos: Contribuir al conocimiento de su padecimiento con lo cual pudiera beneficiar a sus familiares dado el carácter hereditario del padecimiento. Así como la comprensión de su secreción de PRL y TSH y permitir completar el entendimiento del esquema fisiopatológico de la deficiencia de 21 hidroxilasa y con esto plantear el uso de otras opciones terapéuticas complementarias o bien diferentes al uso prolongado de esteroides, los cuáles tienen los efectos adversos ya comentados.

Controles: Obtener una evaluación médica integral, realizada por el alumno de maestría, el cual cuenta con la especialidad de Medicina Interna. Se les realizarán exámenes generales de laboratorio (biometría hemática completa, química sanguínea, electrolitos séricos, examen general de orina, perfil de lípidos y ginecológico) sin costo. Del mismo modo en el caso de encontrarse alguna enfermedad se iniciará tratamiento y realizar las referencias pertinentes a las subespecialidades.

- i) No se esperan
- j) Los beneficios superan a los riesgos a los que se someterá a los participantes
- k) Si bien no se contemplan riesgos impuestos por la participación del estudio, cualquier situación no esperada se atenderá de acuerdo a los requerimientos del problema, utilizando las instalaciones y lineamientos institucionales.

- 12.- a) Métodos de detección, b) medidas de seguridad para el diagnóstico oportuno y prevención de dichos eventos y c) procedimientos a seguir en caso de que se presenten.

- a)No aplica
- b)No aplica
- c)No aplica

13.- Especificación de la manera en que serán observados los preceptos éticos para investigación en humanos.

CONSIDERACIONES ÉTICAS:

1.-CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PACIENTE:

El propósito del estudio, riesgos y beneficios, así como el derecho de la pacientes a abandonar la investigación en cualquier momento sin que le perjudique en su atención serán explicados ampliamente y resumidos en una hoja de información que se le entregarán. Así mismo se les explicará (verbalmente y en la hoja de información) que su sangre solo se utilizará para los propósitos del estudio y que los datos obtenidos serán confidenciales. El sujeto firmará la carta de consentimiento en presencia de dos testigos; una vez que el proceso de información se haya completado y que todas las dudas en relación con los procedimientos del estudio hubieran sido aclaradas.

2.-CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LOS CONTROLES:

A cada uno de los controles participantes se les proporcionará información amplia acerca del propósito del estudio, de los beneficios que pudieran obtener de su atención y que tienen la posibilidad de abandonar la investigación en cualquier momento. Igualmente se enfatizará que la sangre solo será utilizada para los propósitos del estudio y que los datos obtenidos serán confidenciales. El sujeto firmará la carta de consentimiento en presencia de dos testigos, una vez que el proceso de información se haya completado, y que todas sus dudas en relación con los procedimientos del estudio hubieran sido aclaradas.

3.-CONFIDENCIALIDAD:

La información de los sujetos que participen en el estudio será considerada confidencial y transmitida de una manera que no permita la identificación de los individuos.

4.-COMITÉ DE ÉTICA:

El estudio no podrá comenzar si el protocolo y las cartas de consentimiento informado no han sido revisados y aprobados por el Comité de Investigación Biomédica en Humanos del INCMNSZ.

14.-Especificación de los costos que la investigación genere para los sujetos del estudio y los incentivos que se ofrecen en caso que corresponda.

Los estudios hormonales realizados con motivo del estudio se efectuarán sin costos para las participantes. Aquellos estudios que se realicen adicionalmente como parte de la atención del padecimiento y ajenos a los propósitos de la investigación, serán cubiertos directamente por la paciente según corresponda. No se proporciona ninguna compensación económica ni a las pacientes ni a las controles.

ANEXO I

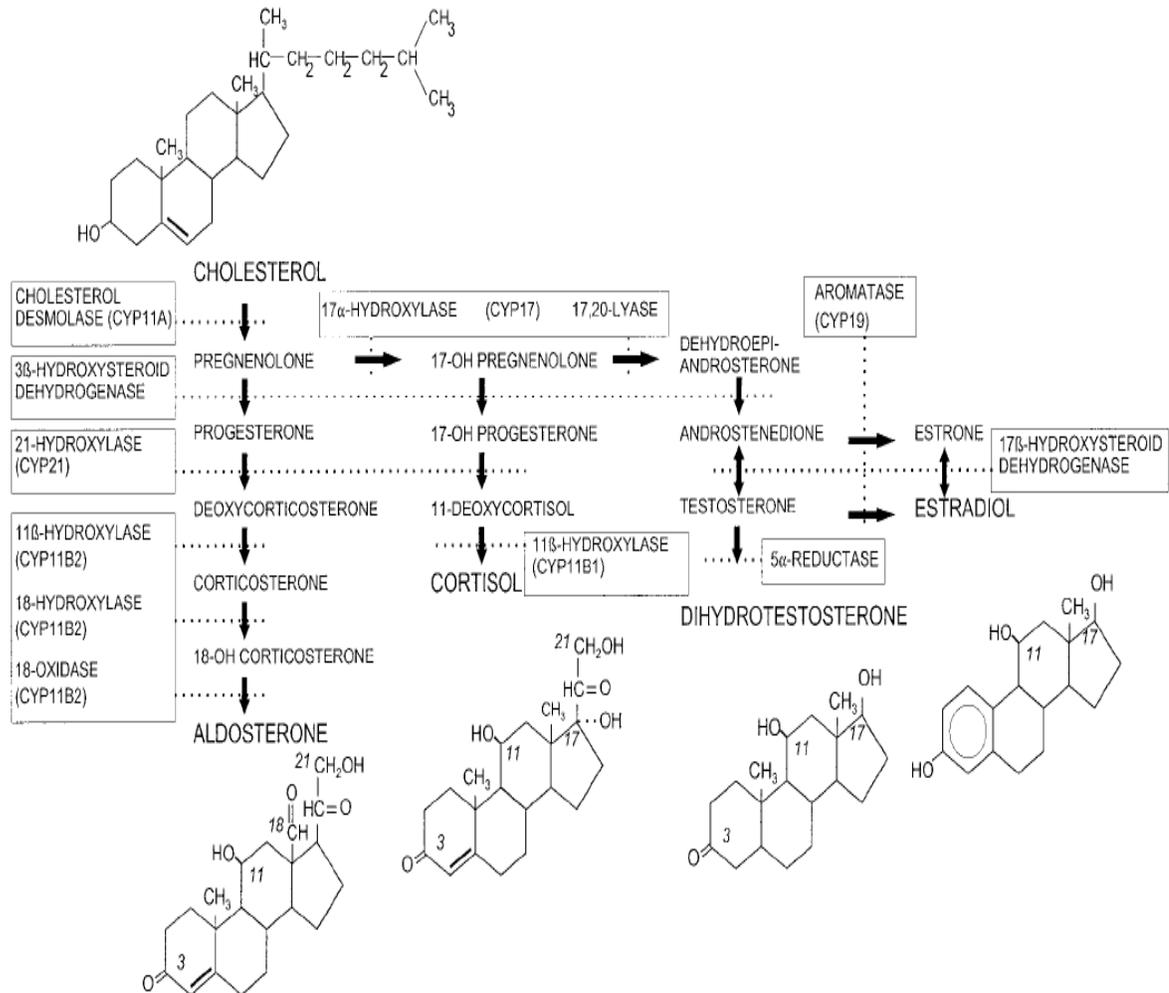


FIG. 1. Pathways of steroid biosynthesis. The pathways for synthesis of progesterone and mineralocorticoids (aldosterone), glucocorticoids (cortisol), androgens (testosterone and dihydrotestosterone), and estrogens (estrone and estradiol) are arranged from left to right. The enzymatic activities catalyzing each bioconversion are written in boxes. For those activities mediated by specific cytochromes P450, the systematic name of the enzyme ("CYP" followed by a number) is listed in parentheses. CYP11B2 and CYP17 have multiple activities. The planar structures of cholesterol, aldosterone, cortisol, dihydrotestosterone, and estradiol are placed near the corresponding labels.

ANEXO II

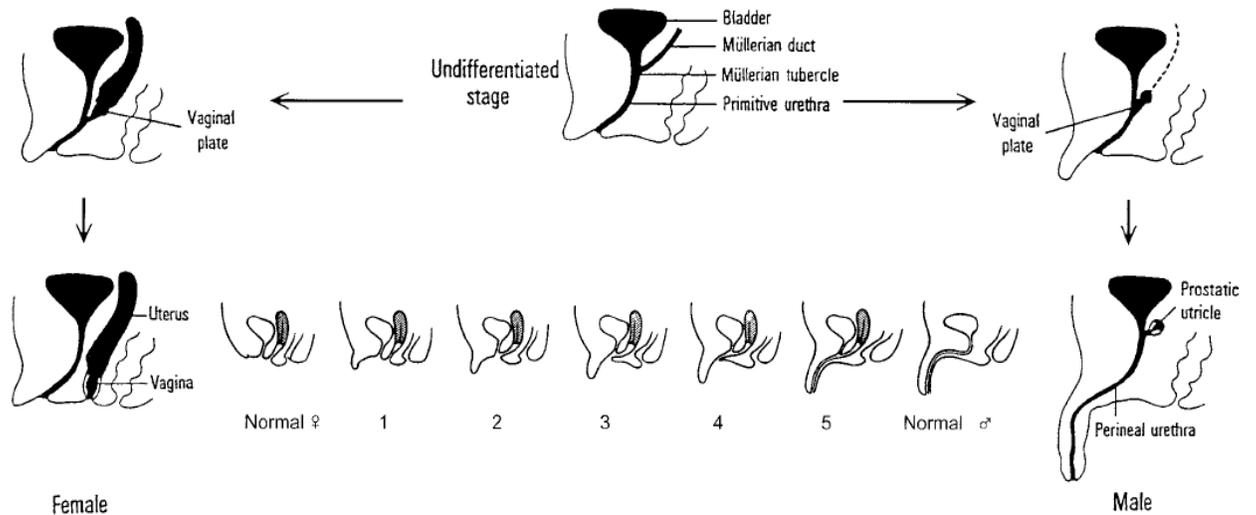


FIG. 3. Normal and abnormal differentiation of the urogenital sinus and external genitalia (cross-sectional view). Diagrams of normal female and male anatomy flank a series of schematic representations of different degrees of virilization of females, graded using the scale developed by Prader (64). [Adapted from Refs. 64 and 213]. Note that the uterus persists in virilized females even when the external genitalia have a completely masculine appearance (Prader grade 5).

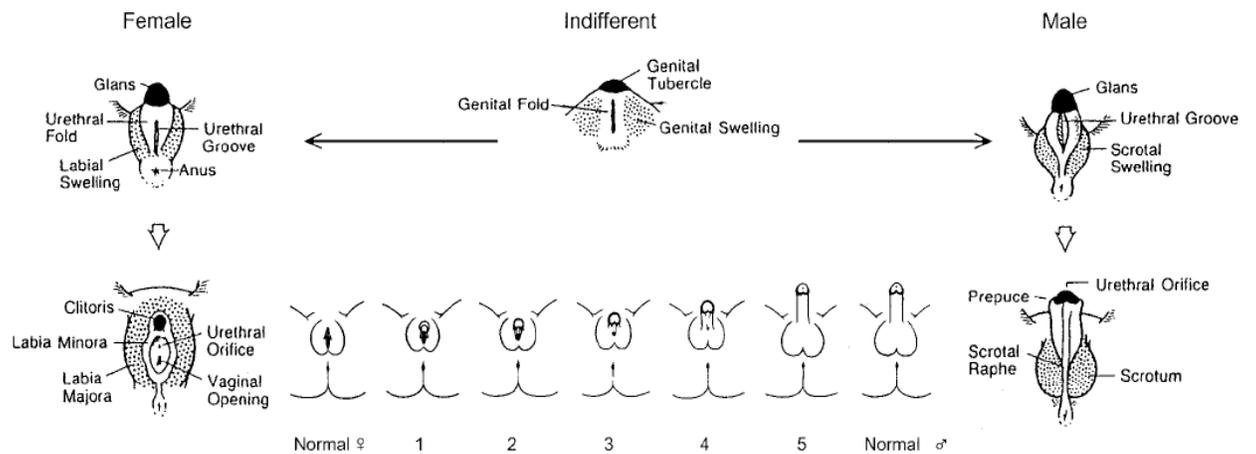


FIG. 4. Normal and abnormal differentiation of the external genitalia (external view). Diagrams of normal female and male anatomy flank a series of schematic representations of different degrees of virilization, graded using the scale developed by Prader (64). [Adapted from Refs. 64 and 213].

ANEXO III

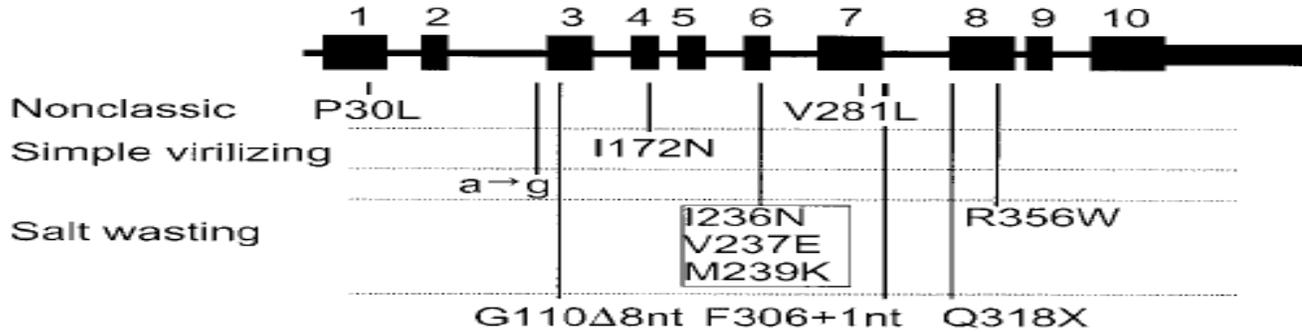


TABLE 4. Mutations causing 21-hydroxylase deficiency

Name ^{a,b}	Mutation/nt ^c	E/I ^d	Activity % nl ^e	Effect	Clinical severity ^f	References
*Deletion			0	No enzyme	SW	(2)
*Conversion			0	No enzyme	SW	(411)
*+L9	28 +CTG	E1	100	Normal polymorphism	Normal	(345)
W22X	66 G→A	E1	0	Nonsense	SW	(474)
W22+1nt	64+T	E1	0	Frameshift	SW	(483)
*P30L	89 C→T	E1	30–60	?Orientation in ER	NC	(438)
P30Q	89 C→A	E1	0	?Orientation in ER	SW	(469)
Y47Δ1 nt	138AT	E1	0	Frameshift	SW	(484)
Intron 1 splice acceptor	295 A→G	I1		Abnormal splicing	SW	(474)
G90V	366 G→T	E2	0		SV	(367,475)
Intron 2 splice donor	387 G→A	I2		Abnormal splicing		(478)
*Intron 2 "g"	656 A/C→G	I2	<5	Abnormal splicing	SV-SW	(414,418)
Y97X	670 C→A	E3	0	Nonsense		(476)
K102R	684 A→G	E3		Normal polymorphism	Normal	(345)
P105L	693 C→T	E3	60		NC	(473)
*G110Δ8nt	Δ708-715	E3	0	Frameshift	SW	
C168Δ1nt	991-992 TG→A	E4	0	Frameshift	SW	(485)
*I172N	1001 T→A	E4	1	?Insertion in ER	SV	(346,415)
G178A	1019 G→C	E5	0–19		SW	(367,475)
D183E	1123 C→G	E5	100	Normal polymorphism	Normal	(418)
ΔE196	Δ1160-1162	E5	6–23	Unstable enzyme		(437)
*I236N	1382 T→A	E6	0	?Substrate binding	SW	(346,415)
*V237E	1385 T→A					
*M239K	1391 T→A					
S268T	1647 G→C	E7	100	Normal polymorphism	Normal	(345,438)
*V281L	1685 G→T	E7	20–50	?Insertion in ER ?Heme binding	NC	(206,346)
G291S	1715 G→A	E7	0.8	?Proton transfer from H ₂ O to heme	SW	(437,473)
G291C	1715 G→T	E7			SW	(367,475)
W302X	1750 G→A	E7	0	Nonsense	SW	(477)
*F306+1nt	1759+T	E7	0	Frameshift	SW	
Intron 7 splice donor	1781 G→C	I7		Abnormal splicing	SW	(480)
Intron 7 splice donor	1782 T→G	I7		Abnormal splicing		(427)
R316X	1990 C→T	E8	0	Nonsense	SW	(478)
*Q318X	1996 C→T	E8	0	Nonsense	SW	(416)
S330Δ10nt	Δ2032-2041	E8	0	Frameshift	SW	(478)
R339H	2060 G→A	E8	20–50		NC	(439)
R354H	2105 G→A	E8	0	Interactions with reductase		(367,475)
*R356W	2110 C→T	E8	0	Interactions with reductase	SW	(365)
R356P	2111 G→C	E8	0.2	Interactions with reductase		(366)
R356Q	2111 G→A	E8	1	Interactions with reductase		(366)
E380D	2267 G→T	E9	30	Decreased heme binding		(479,540)
V397+16 nt	Duplication 2303-2318	E9	0	Frameshift	SW	(478)
W405X	2341 G→A	E9	0	Nonsense	SW	(480)
G424S	2494 G→A	E10			SV	(481)
P453S	2580 C→T	E10	20–50		NC	(439,472)
P475Δ1nt	Δ2649	E10	0	Frameshift		(427)
R483P	2672 G→C	E10	1–2	Unstable enzyme		(482)
R483Δ1nt	2672-2273 GG→C	E10	0	Frameshift	SW	(473)
N493S	2702 A→G	E10	100	Normal polymorphism	Normal	(345)

^a Δ, Deletion; +, insertion; nt, nucleotide. Single letter amino acid codes: A, alanine; C, cysteine; D, aspartic acid; E, glutamic acid; F, phenylalanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; K, lysine; L, leucine; M, methionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; W, tryptophan; Y, tyrosine; X, stop codon. As an example of mutation terminology, W22X is a nonsense mutation of tryptophan-22.

^b Asterisks (*) denote mutations generated by intergenic recombinations between *CYP21* and *CYP21P*.

^c Nucleotides are numbered beginning with the A in the initial ATG of the coding sequence. Introns are included. Numbering is based on a consensus of sequences from Refs. 343–345; in general, numbers are 3 less than those in Ref. 345. A, C, G, and T are nucleotides and are not to be confused with single letter amino acid codes.

^d E, Exon; I, intron.

^e Activity when the mutant enzyme is expressed in cultured cells. When 2 numbers are present, the higher and lower numbers denote activity using 17-hydroxyprogesterone and progesterone as substrates, respectively. nl, Normal.

^f SW, Salt wasting; SV, simple virilizing; NC, nonclassic.

Bibliografía:

- 1.-Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 2003;349: 776-88.
- 2.-Yen S, Jaffe R, Barbien R. *Reproductive Endocrinology*. 6ta Ed. Edit. W.B. Saunders, 2005:30-80.
- 3.-Becker K, Bilezikian J, Bremen W, Hung W, Kaha R, Loriaux L, et al. *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. 3th Ed. Edit Lippincott Williams&Wilkins. 2001:145-70.
- 4.- White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr. Rev.* 2000;21:245-91.
- 5.- Tusié-Luna MT, Ramírez-Jiménez S, Ordóñez-Sánchez ML, Cabello-Villegas J, Terán-García M, Altamirano-Bustamante N, et al. Low frequency of deletion alleles in patients with steroid 21-hydroxylase deficiency in a Mexican population. *Hum. Genet.* 1996; 98: 376-85
- 6.-Tusie-Luna MT, White PC. Gene conversion and unequal crossovers between CYP21 (steroid-21-hydroxylase) and CYP21P involve different mechanisms. *PNAS*.1995; 92:10796-800.
- 7.-López-Gutiérrez AU, Riba L, Ordoñez-Sánchez ML, Ramírez-Jimenez S, Cerrillo-Hinojosa M, Tusie Luna MT. Uniparenteral disomy for chromosome 6 results in steroid 21-hydroxylase deficiency, evidence of different genetic mechanisms involved in the production of the disease. *J. Med. Genet.* 1998; 35:1014-9.
- 8.- Lonstein S and Blaustein D. Immunocytochemical Investigation of Nuclear Progesterone Receptor Expression within Dopaminergic Neurons of the Female Rat Brain. *J. Neuroendocrinol.* 2004;16:534-543.
- 9.- JS Rakoff JS and Yen SS Progesterone induced acute release of prolactin in estrogen primed ovariectomized women *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1978;47:918-21.
- 10.-Lever EG, McKerron CG, Auto-immune Addison's disease associated with hyperprolactinemia. *Clin. Endocrinol.* 1984;21:451-7.
- 11.-Hangaard J, Andersen M, Grodum E, Koldkjaer O, Hagen C. The effects of endogenous opioids and cortisol on thyrotropin and prolactin secretion in patients with Addison's disease associated with hyperprolactinemia. *Clin.Endocrinol.*1984; 21: 451-7.
- 12.-Akçay G, Aral F, Ozbey N, Azazli A, Orhan Y, Sencer E, et al. Pituitary macroadenoma in Addison's disease. *J. Int. Med. Res.* 1996;24:221-7.
- 13.-Van den Berghe G, Zegher F, Veldhuis J, Wouters P, Gouwy S, Stokman et al. Thyrotrophin and prolactin release in prolonged critical illness: dynamics of spontaneous secretion and effects of growth hormone-secretagogues. *Clin Endocrinol* 1997; 47:599-612.
- 14.-Bratush-Marrain P, Vierhapper H, Walshausl W, Nowothy P. Acute suppressive effects of ACTH-induced cortisol secretion on serum prolactin levels in healthy man. *Acta Endocrinol* 1982; 99:352-6.

- 15.- Jaaskelainen J, Hippelainen M, Kiekara O and Voutilainen R. Child rate, pregnancy outcome and ovarian function in females with classical 21-Hydroxylase deficiency. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand* 2000;79:687-93.
- 16.- Mark E, Fremaan BE, Kanyicska LA, Lerant A, RGY G. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiol. Rev.* 2000;80:1523-631.
- 17.-Randall B, Barnes R, Rosenfield D, Ehrmann J, Leona C, Lynne L. Ovarian Hyperandrogenism as a Result of Congenital Adrenal Virilizing Disorders: Evidence for Perinatal Masculinization of Neuroendocrine Function in Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004 ;79: 572-89.
- 18.- Maurer RA. Estradiol regulates the transcription of the prolactin gen. *J Biol Chem* 1982; 257:2133-39.
- 19.- Raymond V, Beaulieu M, Labrie F, Boissier J. Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. *Science* 1978;200:1173-8.
- 20.- Hentges S and Sarkar DK. Transforming growth factor-beta regulation of estradiol-induced prolactinomas. *Fron Neuroendocrinol.* 2001;22:340-63.
- 21.- Speiser PW, Heier L, Serrat J, New MI, Nass R. Failure of steroid-replacement to consistently normalize pituitary function in congenital adrenal hyperplasia: Hormonal and MRI data. *Horm. Res.* 1995;44:241-6.
- 22.- Anderson PW, Malarkey WB, Salk J, Kletskey OA, Hsueh WA, The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on prolactin-responses in normal and hyperprolactinemic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1989;69:518-22.
- 23.- Denolle T, Rhomer V, Saint-André JP, Guyane TT, Gailand F, Bigorgne JC, et al. Effect of the circulating renin-angiotensin system on prolactin release in human. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1990;70:288-92.
- 24.- Diaz-Torga G, González IA, Achával-Zaia R, Libertun C, Becú-Villalobos D, Angiotensin II-induced CA mobilization and prolactin release in human. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1990;70:288-92.
- 25.- Malarkey WB, Zvara BJ, Degroff VL. Angiotensin II promotes prolactin release from normal human anterior pituitary cell cultures in a calcium dependent manner. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1987;64:713-7.
- 26.- Higuchi k, Nawata M, Maki t, Higashizima M, Kato M, Ibayashi H. Prolactin has a direct effect on adrenal androgen secretion *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1984; 59: 714-18.
- 27.- Allolio B, Winkelmann W, Hipp FX, Kaulen D, Mies R. Effects of a met-enkephalin analog on adrenocorticotropin (ACTH), growth hormone, and prolactin in patients with ACTH hypersecretions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1982;55:1-7.
- 28.-Funnes K. Análisis molecular genético de pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa en población mexicana: correlación clínico-genética. 2004. Tesis para obtener el título de Biología de la Reproducción en el INN CMSZ.
- 29.-Vargas –Ortega G, Sequeira –Alvarado K, Cárdenas-Léon M, Tusié-Luna MT, Larrea F, Cravioto MC. Hiperprolactinemia en la deficiencia de 21-hidroxilasa. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* 2006:65.

30 Moran C, Azziz R, Weintrob N, Witchel S, Rohmer V, Dewailly A, et al. Reproductive Outcome of Women with 21-Hydroxylase-Deficient Nonclassic Adrenal Hyperplasia J. Clin. Endocrinol. Metab.2006; 91: 3451-56.

31.- New M. Nonclassical 21-hydroxylase deficiency J Clin Endocrinol Metab 2006;91: 4205-14.