

ESTUDIO BIOMOLECULAR EN PACIENTE CON DISPLASIA FIBROSA  
POLIOSTÓTICA EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA DE LA FACULTAD DE  
SALUD DE LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA DE NEIVA EN EL AÑO 2016

CHRISTIAN MAURICIO DIAZ PASCUAS  
JUAN DAVID DIAZ PASCUAS  
DAVID FERNANDO FARAH BORRERO

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE SALUD  
PROGRAMA DE MEDICINA  
NEIVA – HUILA  
2018

ESTUDIO BIOMOLECULAR EN PACIENTE CON DISPLASIA FIBROSA  
POLIOSTÓTICA EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA DE LA FACULTAD DE  
SALUD DE LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA DE NEIVA EN EL AÑO 2016

CHRISTIAN MAURICIO DIAZ PASCUAS  
JUAN DAVID DIAZ PASCUAS  
DAVID FERNANDO FARAH BORRERO

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar el título de  
Medico(a)

Asesor  
DOLLY CASTRO BETANCOURTH  
Enfermero MSc en  
Salud pública y epidemiología.

Asesor  
HENRY OSTOS ALFONSO  
Medico MSc en Genetica Clinica

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA  
FACULTAD DE SALUD  
PROGRAMA DE MEDICINA  
NEIVA – HUILA  
2018  
NOTA DE ACEPTACION

NOTA DE ACEPTACION

*Aprobado*

---

---

---

---

FIRMA JURADOS

*Jolly Quinto*

---

---

12 de Diciembre de 2016, Neiva.

## DEDICATORIA

A nuestras familias por el apoyo que nos brindaron durante nuestro proceso de formación.

A nuestro asesor por compartirnos sus conocimientos para sacar adelante nuestro proyecto de investigación y ser base fundamental para alcanzar los objetivos planteados.

Cristian, Juan David y David.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos:

A los profesores Dolly Castro Y Henry Ostos asesores, por sus conocimientos como aporte al desarrollo del presente trabajo de investigación.

A los docentes de la Universidad Surcolombiana del Programa de Medicina por dedicar parte de su tiempo a impartir conocimientos.

## CONTENIDO

|                                    | Pág. |
|------------------------------------|------|
| INTRODUCCIÓN                       | 14   |
| 1 ANTECEDENTES                     | 15   |
| 1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS    | 15   |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA      | 17   |
| 3. JUSTIFICACIÓN                   | 21   |
| 4. OBJETIVOS                       | 22   |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL               | 22   |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS          | 22   |
| 5. MARCO TEÓRICO                   | 23   |
| 6. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES | 27   |
| 7. DISEÑO METODOLÓGICO             | 29   |
| 7.1 TIPO DE ESTUDIO                | 29   |

|  | Pág. |
|--|------|
| 7.2 LUGAR  | 29   |
| 7.3 POBLACIÓN Y MUESTRA                                    | 29   |
| 7.4 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS | 29   |
| 7.4.1 Muestra.   | 30   |
| 7.4.2 Procedimiento.                                       | 30   |
| 7.5 INSTRUMENTO PARA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN            | 32   |
| 7.6 CODIFICACIÓN Y TABULACIÓN                              | 32   |
| 7.7 FUENTES DE INFORMACIÓN                                 | 32   |
| 7.8 PLAN DE ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS                     | 32   |
| 8 CONSIDERACIONES ÉTICAS                                   | 33   |
| 9 MODELO ADMINISTRATIVO                                    | 35   |
| 9.1 CRONOGRAMA   | 35   |
| 9.2 PRESUPUESTO  | 35   |

|                               | Pág. |
|-------------------------------|------|
| 10 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS | 39   |
| 11 DISCUSIÓN                  | 45   |
| 12. CONCLUSIONES              | 47   |
| 13 RECOMENDACIONES            | 48   |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS    | 49   |
| ANEXOS                        | 50   |



## LISTA DE TABLAS

|                                 | Pág. |
|---------------------------------|------|
| Tabla 1 Variables a evaluar     | 27   |
| Tabla 2 Secuencia de los Primer | 30   |
| Tabla 3 Datos del paciente      | 42   |

## LISTA DE FIGURAS

|                              | Pág. |
|------------------------------|------|
| Figura 1 Integridad del ADN  | 43   |
| Figura 2 Resultado de la PCR | 44   |

## LISTA DE ANEXOS

|  | Pág. |
|--|------|
| Anexo A Formato de recolección de la información | 51   |
| Anexo B Consentimiento informado                 | 52   |

## RESUMEN

La displasia fibrosa es un trastorno óseo crónico benigno, no hereditario y poco frecuente que causa alteración monostótica o poliostótica, debido al reemplazo del hueso normal por hueso displásico infiltrado por tejido conectivo fibroso. Por lo general se diagnostica en la infancia o la adolescencia. Nuestra investigación surge por un paciente con un cuadro clínico sugestivo de displasia fibrosa. El propósito de nuestra investigación es estudiar el cuadro clínico del paciente y conocer si presenta mutaciones activantes heterocigotas en el codón 201 del exón 8 del gen que codifica para la subunidad alfa de la proteína G (GNAS1) usando un estudio de PCR.

Se realizó un estudio cualitativo, descriptivo y de tipo transversal realizado en la ciudad de Neiva en un paciente que presenta un diagnóstico clínico de displasia fibrosa al que se le realiza una revisión exhaustiva de la historia clínica, laboratorios, imágenes diagnósticas, estudio histopatológico y cuadro clínico comparándolo con lo expuesto en la literatura disponible actualmente, buscando verificar la presencia de la patología y posteriormente realizando el análisis molecular por una técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) de tipo convencional en busca de una mutación específica de reemplazo de arginina por histidina en el codón 201 del exón 8 del gen que codifica para la subunidad alfa de la proteína G (GNAS1).

Resultados: El paciente presenta un diagnóstico de displasia fibrosa, la cual es apoyada por un estudio clínico, basado en la presentación de dolor bilateral en la región distal anteromedial de la pierna, y asociado a la presencia de masa palpable, cuya evidencia clínica, es posteriormente respaldada con los resultados imagenológicos mostrando en las radiografías esclerosis en tercio medio de tibias y peroné y en fémur se observa lesión aparentemente quística en tercio distal de ambos fémures.

Por último se realiza un estudio histopatológico del tejido óseo correspondiente del cual termina reforzando lo planteado a partir de los anteriores estudios, el diagnóstico de displasia fibrosa poliostótica.

## ABSTRACT

Fibrous dysplasia is an uncommon non-hereditary chronic bone disease that causes mono or polyostotic alterations, caused by the replacement of normal bone tissue by dysplastic bone infiltrated by connective tissue. It is usually diagnosed in the infancy and adolescence. Our research arises with a patient with clinical manifestations suggestive of fibrous dysplasia. The purpose of this research is to study the clinical manifestations of the patient and to determine if there is a heterozygous activating mutation in the codon 201 from the exon 8 from the gene codifying for alpha subunit of the G protein (GNAS1) using polymerase chain reaction techniques

A qualitative, descriptive and cross - sectional study was carried out in the city of Neiva in a patient presenting a clinical diagnosis of fibrous dysplasia, who underwent an exhaustive review of the clinical history, laboratories, diagnostic images, histopathological study and clinical analysis, comparing it with what is exposed in the currently available literature, seeking to verify the presence of the pathology and subsequently performing the molecular analysis by a conventional polymerase chain reaction (PCR) technique in search of a specific arginine replacement mutation By histidine at codon 201 of exon 8 of the gene encoding the alpha subunit of G protein (GNAS1).

The patient presents a diagnosis of fibrous dysplasia, which is supported by clinical analysis, based on the presentation of bilateral pain in the distal anteromedial region of both legs, and associated to a palpable mass, this clinical evidence is then supported by imagenologic studies showing sclerosis on the medial one third of both the tibia and the fibula and an apparently cystic lesion in the distal region of both femurs.

Finally a histopathologic study of the correspondent bone tissue is performed which reinforces the clinical diagnosis of fibrous dysplasia.

## INTRODUCCIÓN

La presente investigación sobre displasia fibrosa se centra en el estudio biomolecular de un paciente con cuadro sugestivo de dicha patología, mediante PCR convencional y comparar el cuadro clínico que éste presenta con lo descrito en la literatura disponible.

El problema de nuestra investigación surge por un paciente que asiste a la consulta externa de los servicios de genética y ortopedia con diagnóstico de quiste óseo bilateral por lo cual se envía a biopsia, siendo sugestiva de displasia fibrosa a confirmar con estudio molecular. La displasia fibrosa es un desorden óseo muy poco común, donde el hueso y la médula ósea son reemplazados por tejido fibro-óseo, llevando a fracturas, deformidad y dolor. El propósito de nuestra investigación es estudiar el cuadro clínico del paciente y conocer si presenta mutaciones activantes heterocigotas en el codón 201 del exón 8 del gen que codifica para la subunidad alfa de la proteína G (GNAS1) mediante el análisis de una muestra de sangre usando un estudio de PCR.

El estudio tuvo ciertas limitaciones como el hecho de tener una muestra de un solo paciente, esto debido a la relativa rareza de la condición y la dificultad para obtener protocolos específicos de PCR de otros trabajos, razón por la cual se necesitó de un proceso de estandarización de la técnica.

Esta investigación tiene el potencial de tener un alcance global como antecedente que facilita el desarrollo de posteriores investigaciones.

Iniciaremos haciendo un recuento de los antecedentes sobre estudios existentes en la literatura acerca de la displasia fibrosa, continuando con la presentación del caso, planteamiento del problema de nuestra investigación, así como una explicación de en qué consiste la patología, su causa, cuadro clínico, forma en que se diagnostica y tratamiento. Luego se presentará la metodología que se utilizó para realizar la investigación y finalmente los resultados obtenidos basados en la historia clínica y el estudio genético del paciente, lo cual se compara posteriormente con lo hallado en la revisión bibliográfica, llegando a partir de esto a varias conclusiones y recomendaciones importantes.

## 1 ANTECEDENTES

### 1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

La displasia fibrosa ósea es un trastorno raro del esqueleto en el que el hueso normal y la médula ósea son reemplazados por tejido fibroso óseo, lo que lleva a la fractura, deterioro funcional óseo, deformidad y dolor. Esta enfermedad puede ocurrir en asociación con hiperpigmentación cutánea y alteraciones endocrinológicas hiperfuncionantes, incluyendo hipertiroidismo, pubertad precoz, exceso de la hormona del crecimiento, y el síndrome de Cushing, llevando a un cuadro patológico conocido como síndrome de McCune-Albright (MAS). Es una patología poco frecuente en nuestro medio pero deben ser estudiados los casos que se presenten, varios investigadores se han interesado en esta enfermedad llevando a cabo distintos tipos de estudio a partir de este fenómeno.(1)

Un estudio importante realizado por la doctora Rossana y colaboradores en el año 2001 “Estudio clínico-molecular de pacientes chilenas con síndrome de McCune-Albright”, por medio de PCR alelo específica teniendo una muestra de ADN obtenidos a partir de los leucocitos, cuyo objetivo del estudio era describir la comparación de la clínica de este síndrome (pubertad precoz, hiperpigmentación cutánea y DISPLASIA FIBROSA) con la presencia de la mutación en el codón 201 del exón 8 del gen específico que algunas niñas portaban y otras no, demostrando que no existe una relación directa entre la presencia del gen mutado y las manifestaciones o alteraciones clínicas que compone este síndrome debido a que no es criterio tener la mutación para poseer esta patología, por ello no se encontraron diferencias en la severidad de los síntomas o en la edad de presentación de los que tienen la mutación y los que no la tienen. Concluyendo así que la mutación R201H se puede detectar en las células blancas de la sangre, en aproximadamente el 70% de los casos y en donde los pacientes presentan una amplia variabilidad clínica con el mismo defecto molecular. (1)

De igual forma se ha reportado un estudio de caso en el 2013 en el que el doctor Miguel Ángel Flores y colaboradores en un estudio de revisión, de un paciente con displasia fibrosa poliostótica con afectación de la columna torácica, tuvieron como objetivo mostrar que esta enfermedad puede generar lesión también en la columna torácica, debido a que es poco frecuente que se vea afectada esta región, ya que los sitios más comunes de esta enfermedad son: todos los huesos largos, los huesos craneofaciales, las costillas y la pelvis y es muy raro en la

columna, donde aproximadamente 4.2% se asocian a esta, y la zona más afectada es la lumbar, mas no la torácica. (2)

Por otro lado, Alison M Boyce y colaboradores, realizaron un estudio en 2012, en el que presentaron el caso de una niña de nueve años de edad que presentaba manifestaciones graves de displasia fibrosa, asociado a una lesión femoral de rápida expansión, mostrando en estudio de biopsia ósea, una marcada expresión del marcador RANKL, que es una proteína de la superficie celular implicado en muchos procesos celulares, incluyendo la osteoclastogénesis, y en donde se informa que se sobreexpresa en células óseas de pacientes con displasia fibrosa. El objetivo de este estudio era comprobar la efectividad de un anticuerpo monoclonal en esta enfermedad llamado denosumab, cuya acción es inhibir la activación del receptor de NF-kB ligando (RANKL) y en el que su uso es aprobado para el tratamiento de la osteoporosis y la prevención de eventos relacionados con el esqueleto de las metástasis óseas. Se demostró que el denosumab conduce a una reducción dramática de la expansión de la lesión y del dolor relacionado con la enfermedad, pero también se asoció con la aparición de efectos adversos significativos, por ende es importante garantizar el estudio de este medicamento para confirmar su eficacia y determinar el potencial de morbilidad. (3)



## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La displasia fibrosa es una enfermedad genética no hereditaria caracterizada por la presencia de lesiones fibro-ósneas intramedulares benignas que se manifiestan con dolor, deformidad y fracturas en el hueso afectado, fue descrita por primera vez por Lichtenstein y Jaffe en la década de 1940. Se puede presentar en un solo hueso (monostótica) o en múltiples huesos (poliostótica) y puede o no estar asociada a otras comorbilidades. (4)

Es causada por una mutación postcigótica sin sentido en el gen que codifica para la subunidad alfa de la proteína G estimuladora "Gs" situado en el complejo GNAS del cromosoma 20q13, esta mutación resulta en anomalías en la diferenciación de osteoblastos y de la resorción de hueso que por lo general se encuentra aumentada. (5) Se cree que la gravedad de la presentación es dependiente del momento del desarrollo del cigoto en el que ocurrió la mutación, es decir, una mutación más temprana llegaría a afectar un mayor número de células produciendo un cuadro más grave. (5)

La presentación clínica puede ocurrir a cualquier edad aunque suelen detectarse la mayoría de las lesiones durante la juventud. La enfermedad no tiene predilección de género. Los sitios comunes de presentación son los huesos largos, las costillas, la pelvis y los huesos craneofaciales. Algunos pacientes con manifestaciones poliostóticas presentan anomalías endocrinas (principalmente pubertad precoz) y manchas "Café con leche", que en conjunto se conoce como síndrome de McCune-Albright, también pueden presentarse masas en tejido blando que son conocidas en el síndrome de Mazabraud. (6)

La presentación monostótica es más frecuente y suelen crecer de manera proporcional al crecimiento normal del hueso, en contraposición la forma poliostótica es más rara, sus lesiones continúan creciendo al terminar el crecimiento esquelético y generan deformidades severas incluso desde la niñez, las manchas café con leche de la piel se presentan a menudo en el tronco y las áreas proximales de las extremidades y suelen presentar bordes pocos definidos y accidentados en comparación por ejemplo a las manchas presentes en la neurofibromatosis difusa. Otra presentación poco frecuente de la displasia fibrosa es el síndrome de Mazabraud caracterizado por masas de tejido conectivo laxo llamados mixomas que se localizan de manera intramuscular. (7)

El cuadro clínico suele ser asintomático, sobre todo en presentaciones monostóticas. Los principales síntomas son dolor, deformidad y fracturas. El dolor suele ser signo de fracturas en áreas de alto estrés como el cuello del fémur, se ha descrito que en pacientes femeninas el dolor se puede acentuar durante el embarazo y en ciertos momentos del ciclo menstrual debido a la estimulación de receptores de estrógeno que se encuentra en las lesiones óseas.(7)

El diagnóstico se realiza con imágenes radiológicas, biopsias de patología, reportes endocrinológicos y estudios de biología molecular. No existe un tratamiento uniforme para la displasia fibrosa pero suele ser tratada con una combinación de analgésicos, bifosfonatos, vitamina D y anticuerpos que actúan en RANKL. El manejo quirúrgico es útil en ciertas circunstancias para tratar y prevenir fracturas y deformidades. (4)

Este trabajo de investigación tendrá como población a un paciente con diagnóstico de displasia fibrosa ósea, residente en la ciudad de Neiva cuya investigación se desarrollará en el laboratorio de genética de la facultad de salud de la universidad Surcolombiana, una vez se obtengan los datos de la muestra para analizar.

Este Laboratorio de medicina Genómica cuenta con un espacio físico de aproximadamente de 200 m<sup>2</sup>, con sala de espera para los pacientes que vienen a tomarse las muestras, un consultorio de toma de muestras, dos baños, un espacio separado de oficinas, una zona de neveras, un área de PRE PCR donde se hace la extracción de ADN O ARN y preparación de la mezcla de PCR. Además cuenta con dos cabinas de seguridad biológicas, un área de POST PCR que cuenta con los equipos específicos para el montaje de las pruebas, el tiempo real y el secuenciador, el área de citogenética en donde se realizan los cariotipos y donde se encuentra el microscopio para la lectura de las células, y por último el área de lavado.

Por otro lado el grupo de investigación que se realiza en el laboratorio de medicina genómica, tiene tres líneas principales de investigación: Enfermedades infecciosas, Enfermedades Crónicas y cáncer; Biodiversidad y seguridad alimentaria. Vinculados con estas se han realizado investigaciones en enfermedades genéticas como los defectos del tubo neural que han permitido justificar una ordenanza de la Gobernación del Huila para prevenir su ocurrencia en el departamento. Igualmente se sigue trabajando con estas y otras alteraciones de gran impacto en la comunidad como labio y/o paladar hendido y cardiopatías congénitas en los cuales se tiene convenios con grupos nacionales e

internacionales. En enfermedades infecciosas se trabaja en conocer, diagnosticar y manejar las infecciones relacionadas con el embarazo y recién nacidos; promoviendo programas que conlleven a medidas de salud pública para su prevención. En enfermedades crónicas y cáncer se buscan alteraciones moleculares que se relacionan con enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Toda la tecnología adquirida se ha proyectado para fortalecer el diagnóstico una vez validadas las pruebas, así como en el grupo de trasplantes de órganos se hace diagnóstico en citogenética y molecular para muchas enfermedades de tipo infeccioso y cáncer.

El grupo está conformado por profesionales de diferentes áreas como Inmunología, Bacteriología, Biología, Genética, Pediatría, Medicina Interna, Cardiología, Endocrinología y Gineco-Obstetricia. Al grupo se encuentra asociado el semillero de investigación ERKLAREN y en su trabajo se involucra activamente la participación de estudiantes haciéndoles partícipes con responsabilidad de los proyectos en que se comprometen.

En la línea de Biodiversidad se cuenta con Médicos Veterinarios, Zootecnistas, Biólogos y el común denominador es girar alrededor de equipos de alta tecnología que ha ido adquiriendo y que permite realizar investigaciones con solvencia en Biología molecular, cultivo de tejidos y campos de biotecnología.

El Laboratorio de medicina Genómica actualmente se encuentra habilitado como laboratorio de alta complejidad para prestar los servicios de pruebas diagnósticas moleculares, pruebas de inmunogenética y estudios de trasplante renal a las diferentes EPS de la región surcolombiana.

Ahora bien, referíamos que la displasia fibrosa ósea es una enfermedad poco frecuente, los pocos casos que se presentan deben ser diagnosticados oportunamente. Y considerando que ésta es una alteración o mutación genética su diagnóstico se debe confirmar a partir de estudios moleculares que respalden la clínica de esta enfermedad.

Siendo esta patología de baja frecuencia se ha realizado una búsqueda de reportes de casos en el año 2014 donde no se encontró ningún dato verídico asociado a ésta enfermedad en el municipio de Neiva.

El problema de nuestra investigación surge por un paciente que asiste a la consulta externa de los servicios de genética y ortopedia con diagnóstico de quiste óseo bilateral y que dice que ha aumentado el dolor, por lo cual se envía a biopsia. Se procede a realizar radiográficas y gammagráficas, donde el resultado de la biopsia e historial, refiere que el caso es sugestivo de displasia fibrosa a confirmar con estudio molecular. El paciente presenta lesiones tibiales simétricas y bilaterales, lo cual es sugestivo de algún tipo de alteración genética hereditaria. Si es cierto que presenta lesiones óseo-fibrosas, pero la displasia fibrosa no es la única enfermedad que tiene estas características. Hay varios síndromes descritos que muestran rasgos histológicos similares, aunque también es probable que no haya ningún caso como el que está descrito previamente.

La displasia fibrosa es un desorden óseo muy poco común, donde el hueso y la médula ósea son reemplazados por tejido fibro-óseo, llevando a fracturas, deformidad y dolor. Esta enfermedad está poco estudiada en la población de Neiva. El propósito de nuestra investigación es estudiar el cuadro clínico del paciente y conocer si presenta mutaciones activantes heterocigotas en el codón 201 del exón 8 del gen que codifica para la subunidad alfa de la proteína G (GNAS1) mediante el análisis de una muestra de sangre usando un estudio de PCR bajo el protocolo estandarizado por este grupo de investigación.

A partir de este planteamiento se formula la siguiente pregunta de investigación:

¿Presenta el paciente una mutación en el codón 201 del exón 8 del gen GNAS1 que pueda explicar el cuadro clínico que manifiesta?

### 3. JUSTIFICACIÓN

La displasia fibrosa es una enfermedad muy poco estudiada y de difícil diagnóstico debido a la falta de recursos que nos faciliten confirmar la presencia de la misma a partir de la clínica dado que esta puede ser muy variable y fácil de confundir con patologías con cuadros similares. El uso de estudios biomoleculares para la confirmación de esta enfermedad es muy poco usado de manera regular y podría ser de gran ayuda para despejar las dudas que tiene el personal médico y la incertidumbre que se genera en el paciente al no tener pleno conocimiento de su padecimiento.

Entre estos métodos podemos encontrar el análisis mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para identificar ciertas secuencias en el ADN que son características de los pacientes que presentan el cuadro y que debemos confirmar que estén presentes, esto nos demuestra la importancia del estudio y difusión de la patología a la comunidad médica en nuestro medio, para hacer posible un diagnóstico oportuno y un tratamiento adecuado.

Esta investigación es viable debido a que las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa son una herramienta cada vez más asequible y presente en el arsenal de métodos diagnósticos, en especial los de enfermedades poco comunes lo que permite a este estudio otorgar información de manera costo-eficiente y de uso práctico.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe una mutación del codón 201 del exón 8 del gen GNAS1 mediante un ensayo de reacción en cadena de polimerasa en el paciente que acude al laboratorio de medicina genómica de la facultad de salud en el 2015.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estandarizar la prueba diagnóstica para ese tipo de enfermedad genética

Comparar las manifestaciones clínicas con la fisiopatología subyacente a su código genético.

Describir la presencia de afecciones comunes o complicaciones de la displasia fibrosa en el paciente como fracturas, dolor corporal, claudicación o fatiga.

Verificar el diagnóstico de síndrome de displasia fibrosa de acuerdo a los datos obtenidos de la historia clínica del paciente.

## 5. MARCO TEÓRICO

La displasia fibrosa es una rara enfermedad del hueso que lleva a dolor óseo, fracturas y deformidad del hueso, y algunas veces progresa a compresión neurológica. Una pequeña parte de los pacientes también presenta anomalías endocrinas (< 5%), la más frecuente siendo la pubertad precoz. Muchos pacientes tienen compromiso óseo autolimitado, con pocos o sin síntomas, pero la enfermedad puede ser responsable de discapacidades significativas en aquellos pacientes que presentan dolor óseo, fracturas, deformidades y compromisos endocrinos. El típico síndrome de McCune Albright asocia displasia fibrosa, anomalías endocrinas y mancha café con leche. Importantes descubrimientos acerca de la fisiopatología de la enfermedad han sido ganados en las últimas dos décadas con la descripción de los genes mutados y las principales vías biológicas alteradas. También se han desarrollado terapias médicas con bifosfonatos en los últimos tiempos.

La displasia fibrosa es una enfermedad genética, no hereditaria que se debe a mutaciones poscigóticas en el gen que codifica para la subunidad de la proteína G estimuladora (Gs) en el locus del cromosoma 20q13 GNAS. Las dos mutaciones descritas (sustitución del residuo de arginina en el codón 201 por cisteína o histidina), las cuales son dominantes, son responsables del mosaicismo somático, y de las proteínas resultantes evidenciadas por la disminución de la actividad de la GTPasa, con incremento de la activación de la adenilato ciclasa como consecuencia. Por lo tanto las células mutadas constitutivamente generan mayores niveles de AMPc y tienen una alta tasa de proliferación. La activación de la vía Gsa/PK/CREB induce la sobreexpresión de c-fos en las lesiones de displasia fibrosa. (6)

Así la displasia fibrosa es debido a una proliferación y diferenciación anormal de las células estromales de la médula ósea, debido a mutaciones de la GNAS. En el tejido óseo se puede observar células fusiformes similares a fibroblastos que corresponden a osteoblasto pobremente diferenciados. La marca histológica de esta condición es la proliferación de tejido fibroso dentro de la médula ósea, producida por estas células pre-osteoblásticas anormalmente diferenciadas. La mutación puede ocurrir antes de la gastrulación (es decir cuando las tres líneas germinales: ectodermo, endodermo y mesodermo, se separan con determinación del linaje celular) dado que el síndrome de McCune Albright involucra múltiples tejidos que se originan de las tres líneas germinales embrionarias. En adición, las células del hueso, también se derivan de dos capas: el mesodermo y el ectodermo. Como la enfermedad presenta un espectro amplio, desde la displasia

fibrosa monostótica benigna hasta severos casos de McCune Albright, se ha especulado que el tiempo en el que ocurre la mutación determina la severidad de la enfermedad. El paradigma actual es que a más temprana sea la mutación mayor será el espectro de órganos afectados, con la severidad de la enfermedad siendo proporcional al número de células afectadas. (8) Se ha sugerido que el aumento del AMPc puede inhibir el factor de transcripción Runx2 del osteoblasto, así contribuyendo a la diferenciación osteoblástica anormal. En esos osteoblastos la secreción de interleucina 6 está incrementada como resultado de la activación de la proteína G, con consecuente activación de los osteoclastos circundantes, permitiendo a la lesión expandirse y crear lesiones osteolíticas. Otros factores menores han sido considerados, como la elevación del factor de crecimiento  $\beta$  derivados de las plaquetas, que contribuyen a la activación osteoclástica, y a la elevación de receptores de esteroides sexuales en las células mutadas, lo que explicaría los síntomas discordantes durante el embarazo o el uso de anticonceptivos orales. (9)

Se ha observado que la producción de AMPc se encuentra elevada en tejidos afectados con McCuneAlbright. El crecimiento de glándulas endocrinas y secreciones hormonales están estimuladas incluso en ausencia de hormonas estimuladoras, lo cual es la principal característica biológica de este síndrome. Específicamente, pubertad precoz, sin evidencia de hipersecreción de hormonas gonadotropinas. De manera similar, la AMPc está aumentado en melanocitos y dendritas de pacientes con McCune Albright. Algunas disfunciones endocrinas también pueden tener un origen central, debido a tumores pituitarios relacionados con mutaciones Gs  $\alpha$  activantes de la misma. (10)

La prevalencia de la enfermedad es desconocida. Contando el número de pacientes en comunidades pequeñas isleñas aisladas, se ha estimado que la prevalencia puede ser alrededor 1 de cada 30.000 (datos no publicados). La respectiva prevalencia de acuerdo a las formas de la enfermedad en monostótica y poliestótica es difícil de estimar porque el conocimiento disponible se basa únicamente en series de casos, con evidentes sesgo en la selección pues provienen de cirugías ortopédicas y faciales. Aunque probablemente las formas monostóticas representan el 60% de todos los pacientes con FD, y la proporción de pacientes síndrome de McCune Albright es probable que sea de menos del 5% de todos los pacientes con displasia fibrosa. La proporción de sexos es 1:1. (11)

La displasia fibrosa es una enfermedad frecuentemente asintomática. Esta pueda tener cambios observados en una radiografía interpretada. En muchos pacientes sin embargo, la enfermedad se diagnostica a causa de dolor óseo, deformidad ósea, o fractura por fragilidad. Los síntomas suelen aparecer durante la infancia,



pero el primer dolor óseo o fractura, puede ser observado en la tercera, cuarta o incluso quinta década de la vida. Los primeros síntomas aparecen antes de los quince años de edad en el 80% de los pacientes. El dolor óseo puede surgir a causa de una fractura completa o incompleta, o también puede aparecer por una pseudo-inflamación ósea sin ningún tipo de activación aparente. Su intensidad es variable de ser mínima a insoportable y puede ser desencadenada con la palpación. Una fractura patológica es un método común de diagnosticar la displasia fibrosa. Las fracturas se producen debido a lesiones osteolíticas por debilitamiento de los huesos largos, o por deformidades adquiridas durante el crecimiento. Los sitios más comunes de esta enfermedad son: todos los huesos largos, los huesos craneofaciales, las costillas y la pelvis, es raro que afecte la columna, donde la zona más afectada es la lumbar. En cuanto a las formas en que se presenta la enfermedad, se tiene que la variedad monostótica aparece en el fémur, la tibia, las costillas y la base del cráneo; es asintomática, de aparición más temprana, las lesiones crecen aun después de la madurez esquelética y tienden a afectar sólo un lado del cuerpo. Por otro lado la displasia fibrosa poliostótica se manifiesta alrededor de los 10 años de edad, con lesiones de apariencia más agresiva y progresión rápida. Ocasiona los síntomas clásicos ya mencionados (dolor, fractura patológica, claudicación o deformidad de la extremidad.) En otras ocasiones aparece con disfunción endocrina (acromegalia, hipertiroidismo, síndrome de Cushing y manchas café con leche) que constituye el síndrome de McCune-Albright. (2)

A parte del estudio clínico, el diagnóstico se realiza con imágenes radiológicas, biopsias de patología, reportes endocrinológicos y estudios de biología molecular.

En las radiografías se observan imágenes radiopacas con aspecto de vidrio esmerilado, mal definida en sus límites; puede ser unilocular o multilocular, con expansión de cortical ósea. Existen tres tipos de lesiones, según si predomina el componente de tejido óseo o fibroso: lesión tipo quístico (radiolúcida con margen reactivo, ninguna trabécula y espesor de cortical normal), lesiones tipo pagetoide (patrón trabecular más denso que el hueso normal) y deformidad en cayado o bastón (amplia afectación del fémur proximal que produce la característica deformidad en varus, que parece la curva de un bastón). La TAC permite determinar con más exactitud la localización y extensión de las lesiones. Sin embargo, en la resonancia magnética, la intensidad de señal es moderadamente baja en T1, mientras que en T2 es alta o media; con gadolinio, las lesiones muestran un incremento del contraste en la parte central y en los anillos periféricos. La gammagrafía es el estudio más rápido para determinar la distribución de lesiones esqueléticas, además de permitir descubrir lesiones en sitios insospechados; este estudio revela la intensa captación del radioisótopo, que refleja la magnitud del tumor, en especial cuando la lesión está activa.

En términos histológicos es una colección irregular de trozos pequeños de tejido inmaduro rodeado por abundante proliferación fibroblástica de matriz de tejido fibroso y tejido trabecular inmaduro. Algunas lesiones contienen grandes cantidades de cartílago benigno y otras, componentes quísticos. Pero los rasgos más típicos incluyen hueso trabecular displásico truncado que produce segmentos cortos e irregulares del hueso (llamados sopa de alfabeto chino); no hay evidencia de actividad osteoblástica, propia de la lesión.

No existe un tratamiento uniforme para la displasia fibrosa pero suele ser tratada con una combinación de analgésicos, bifosfonatos, vitamina D y anticuerpos que actúan en RANKL. El manejo quirúrgico es útil en ciertas circunstancias para tratar y prevenir fracturas y deformidades.

Para superar los problemas asociados con el análisis de mutaciones genómicas que pueden estar presentes en un bajo rendimiento variable a lo largo del cuerpo, un estudio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido la amplificación selectiva de los productos a partir del alelo mutante. Esta técnica utiliza la mutagénesis dirigida al sitio para generar un producto de PCR, para el alelo normal que es susceptible a endonucleasa de restricción de digestión, mientras que el alelo mutante es resistente a la digestión. Los ciclos de amplificación y digestión consecutivas y repetitivas permiten el enriquecimiento selectivo del producto a partir del alelo mutante. La técnica se ha aplicado al análisis de los pacientes con displasia fibrosa ósea, donde la consecuencias sobre el gen que codifica para la subunidad de la proteína G estimuladora, puede variar de lesiones monostótica a poliostótica, y se han realizado con el ADN aislado tanto de muestras de biopsia de hueso y leucocitos de sangre periférica. (12)

## 6. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla 1 Variables a evaluar

| VARIABLE                    | DEFINICIÓN   | CATEGORÍA                            | NIVEL DE MEDICIÓN | INDICADOR  |
|-----------------------------|--|--------------------------------------|-------------------|------------|
| Género                      | Conjunto de características diferenciadas que cada sociedad asigna a hombres y mujeres | Masculino, femenino                  | Nominal           | Porcentaje |
| Estado civil                | Clase o condición de una persona en el orden social.                                   | Casado, viudo, soltero, separado.    | Nominal           | Porcentaje |
| Etnia                       | Color de piel  | Caucásico, negro, mestizo y asiático | Nominal           | Porcentaje |
| Tener trabajo               | Tener actualmente un trabajo estable   | Si, No.                              | Nominal           | Porcentaje |
| Edad                        | Edad en años actualmente   | Número                               | Razón             | Promedio   |
| Fecha de Inicio de síntomas | momento desde la aparición de los síntomas   | Fecha                                | Razón             | Promedio   |
| Fecha de Diagnóstico        | momento desde que se dicta el diagnóstico  | Fecha                                | Razón             | Promedio   |
| Comorbilidades              | Fracturas  | Si, No.                              | Nominal           | Porcentaje |
|                             | Trastornos endocrinológicos  | Si, No.                              | Nominal           | Porcentaje |
|                             | obesidad   | Si, No.                              | Nominal           | Porcentaje |
| Título académico            | Reconocimiento de carácter académico, al culminar un programa                          | Primaria, Secundaria, Universidad    | Nominal - Ordinal | Porcentaje |
| Funcionalidad física        | movilidad libre sin dependencia de terceros para realizar tareas                       | Si, No.                              | Nominal           | Porcentaje |

|                       |  |                    |         |            |
|-----------------------|--|--------------------|---------|------------|
| autónoma              | cotidianas   |                    |         |            |
| Dolor corporal        | Molestias superficiales o profundas, que pueden ser generalizadas o localizadas. | Si, No.            | Nominal | Porcentaje |
| Fatiga                | Sensación de cansancio extremo   | Si, No.            | Nominal | porcentaje |
| Diagnóstico de la PCR | presencia de la mutación en el codón 201 del exón 8 del gen GNAS1                | Positivo, negativo | Nominal | Porcentaje |

## 7. DISEÑO METODOLÓGICO

### 7.1 TIPO DE ESTUDIO

Es un estudio cualitativo de tipo descriptivo, específicamente un reporte o estudio de caso, ya que tiene como fin, reedificar o describir los aspectos de la historia natural de una enfermedad y los factores que intervienen o inciden en su aparición. Y en cuanto al tiempo es un estudio de tipo transversal, debido a que estamos estudiando esta enfermedad en un periodo corto de tiempo.

### 7.2 LUGAR

La investigación se llevará a cabo en la facultad de salud de la Universidad Surcolombiana de la ciudad de Neiva, Huila, Colombia. Específicamente en el laboratorio de medicina genómica ubicado allí.

### 7.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

Un paciente que presenta un cuadro clínico congruente con las manifestaciones características de la displasia fibrosa, residente en el municipio de Neiva.

El tipo de muestreo es no probabilístico por conveniencia, y corresponde a la totalidad de la población, ya que es una patología con poca incidencia.

### 7.4 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

7.4.1 Muestra. Se recolectaron muestras de sangre periférica 4 ml en tubo marca Vacuette® tapa lila con EDTA previo a consentimiento informado.

7.4.2 Procedimiento. La técnica de amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que consiste en la amplificación in vitro de un fragmento de ADN específico. Para llevar a cabo el estudio de amplificación es necesario conocer, al menos parcialmente, la secuencia del fragmento a amplificar (un gen, una parte de un gen, una región no codificadora), en nuestro caso en el codón 201 del exón 8 del gen que codifica para la subunidad alfa de la proteína G (GNAS1) en el que la arginina es remplazada por histidina en los pacientes enfermos. Básicamente, se trata de replicar una y otra vez ese mismo fragmento de ADN y, para ello, debemos realizar in vitro lo que hacen las células in vivo para replicar su ADN.

Así entonces, se trata de disponer en un tubo de ensayo el ADN (muestra de sangre) de la persona en estudio.

Extracción de DNA: El DNA de las muestra de sangre fue extraído, implementado el Kit comercial PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen, Estados Unidos), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Para la extracción de DNA, se emplearán muestras de sangre completas, un volumen de 200ul. El DNA extraído fue cuantificado con el Nanodrop, y la integridad se observó en geles de agarosa 1.5%. Finalmente se almaceno a -20°C hasta su análisis.

PCR: Para el diagnóstico de la mutación seguimos el protocolo de Román et al. (2001); 10 pmol de cada uno de los primer, 200 mM dNTP, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 2 unidades de TaqPolimerasa (Fermentas®). Se utilizará 60 ng de ADN genómico extraído para completar un volumen final de reacción de 25µL y usando los primer descritos en la tabla 2.(1)

Tabla 2 Secuencia de los Primer

|  |  |
|--|--|
| Secuencia normal para el codón 201 sense | Forward: TCA GGA CCT GCT TCG CTG CCG     |
|  | Reverse: GCT GCT GGC CAC CAC GAA GAT GAT |

|  |   |
|--|---|
| Secuencia mutada para el codón 201 sense | Forward: TCA GGA CCT GCT TCG CTG<br>CCA     |
|  | Reverse: CGC AGG GGG TGG GCG GTC<br>ACT CCA |

Una vez tenemos todos los componentes en nuestro tubo de reacción, tenemos que favorecer de alguna forma que ocurra la síntesis de ADN. Para ello, lo primero que debemos hacer es facilitar la desnaturalización del ADN.

1. Desnaturalización. Se conseguiría elevando la temperatura del tubo de reacción durante cinco minutos a 95 °C, a continuación, permitir el alineamiento de los primers (apareamiento con su región complementaria).

2. Alineamiento. Se desciende la temperatura hasta una temperatura 94°C durante un minuto, 65 °C durante un minuto, 55 °C, Y por último, facilitar que la polimerasa lleve a cabo la síntesis de ADN utilizando como cebadores los extremos 3' de los primers utilizados.

3. Extensión. Se vuelve a aumentar la temperatura hasta los 72 °C durante 40 segundos, con una extensión final de cinco minutos a 72 °C.

Estos tres pasos constituyen un ciclo el programa de amplificación será de 35 ciclos, permitirá obtener, como resultado de un experimento de amplificación, millones de copias del fragmento de interés.

Todo esto, por supuesto, se realiza de forma automatizada. Para ello, los tubos de reacción se introducen en un termociclador PTC 100 que de forma automática realiza los 35 ciclos de amplificación.

Los productos obtenidos fueron corridos en geles de agarosa al 2% a 70V durante una hora. Se utilizara un marcador de peso molecular de 50pb (Fermentas®) y se revelaron en transiluminador ultravioleta.

## 7.5 INSTRUMENTO PARA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

El instrumento principal usado en esta investigación fueron los resultados del análisis por PCR, sin embargo se utilizó un cuestionario sencillo que se aplicará al paciente para recolectar algunos datos importantes para conocer las características del individuo y el grado de afectación causado por la patología. (Ver anexo A).

## 7.6 CODIFICACIÓN Y TABULACIÓN

La información se tabulo mediante una base de datos creada para tal fin, en el programa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation). Ésta base de datos y su registro correspondiente fue manejada por los investigadores, los cuales ingresaron la información recolectada, para posteriormente continuar con el proceso de análisis.

## 7.7 FUENTES DE INFORMACIÓN

Las fuentes de información utilizadas en esta investigación son principalmente directas, los datos más importantes provienen de los resultados del análisis mediante PCR y de información obtenida del paciente. También se obtuvo información de fuentes indirectas como la historia clínica previa del paciente para confirmar el diagnóstico clínico probable de la patología investigada.

## 7.8 PLAN DE ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

El análisis se realizó describiendo las variables de estudio y se compararon con investigaciones previas sobre el tema, el estudio clínico previo del paciente y los resultados del estudio biomolecular con PCR. Se analizaron la información en el software Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation) y habiendo obtenido los resultados mediante el estudio genético respectivo, se procedió a determinar si el paciente cursa con la mutación del gen específico que conlleva a la presentación de su enfermedad.



## 8 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se consulta la resolución 8430 de 1993 de la República de Colombia del Ministerio de Salud que establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Para el desarrollo de esta investigación se hará énfasis en el Título II, de la investigación en seres humanos, basados en el capítulo 1 de los aspectos éticos de la investigación en seres humanos , y específicamente en los siguientes artículos: artículo 5 el cual habla sobre el respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y su bienestar, artículo 6 que trata los criterios a tener en cuenta en una investigación en seres humanos, artículo 8 sobre la protección de la privacidad del individuo, sujeto de investigación, identificándolo solo cuando los resultados lo requieran y éste lo autorice.

De acuerdo con el artículo 11 de la resolución 8430, ésta investigación se clasifica en la categoría tipo B, investigación con riesgo mínimo, en la que se emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes como lo es en este caso la extracción de sangre por punción venosa en adultos.

Se llevará a cabo la utilización del Consentimiento Informado por escrito basado en los artículos 14, 15 y 16, el cual será firmado por el participante como autorización para hacer parte de la investigación, y previamente se dará una explicación verbal de los objetivos del estudio, riesgos y beneficios que puede llegar tener y se atenderá cualquier inquietud que tenga el participante. (Ver Anexo B)

La realización de la presente investigación no conlleva en su concepto, en su desarrollo, ni en la publicación de resultados, lesiones a la dignidad humana y menos aún en su integridad, a las personas que intervienen en el estudio. Se garantizarán los principios de beneficencia, no maleficencia y justicia, para el manejo de todos los datos e información recolectada en la revisión de las historias clínicas, la información se utilizará exclusivamente con fines investigativos y ésta no será utilizada en detrimento de la integridad física, moral y espiritual de los participantes. La investigación se realizará por personal en formación profesional, con conocimiento y experiencia para cuidar la integridad del ser humano.

De igual manera se garantiza la no alteración de las intervenciones médicas propias de cada paciente y el suministro de fármacos adicionales a los mismos.

En cuanto a los beneficios que obtiene el paciente al participar en la investigación incluyen la adquisición de información pertinente a su patología lo que le permitiría tener mayor seguridad y conocimiento sobre su diagnóstico y que se realice su intención altruista de ofrecer mayor conocimiento científico sobre su condición para lograr un diagnóstico y tratamiento tempranos a pacientes afectados por cuadros clínicos de características similares. La realización de la investigación conlleva costos que serían justificables dados los potenciales beneficios para la Universidad Surcolombiana (USCO) y demás entes investigadores asociados como lo son la producción de literatura científica publicable y la reafirmación de la USCO como una importante fuente de investigación académica.

El estudio tiene la capacidad de tener un impacto a corto plazo como marco de referencia para posteriores estudios que quieran describir la patología y en especial aquellos que estén interesados en investigar métodos diagnósticos de tipo molecular y a largo plazo como información que aumenta el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad, información que se puede usar para el desarrollo de medidas terapéuticas y curativas posiblemente mediante técnicas de edición genética.

El estudio tiene entonces el potencial de tener un alcance global como antecedente que facilita el desarrollo de posteriores investigaciones.

## 9 MODELO ADMINISTRATIVO

### 9.1 CRONOGRAMA

| ACTIVIDADES                     | 2015   |            |         |           |           | 2016  |         |       |       |      |       |       |        |            |         |           |           |
|---------------------------------|--------|------------|---------|-----------|-----------|-------|---------|-------|-------|------|-------|-------|--------|------------|---------|-----------|-----------|
|                                 | AGOSTO | SEPTIEMBRE | OCTUBRE | NOVIEMBRE | DICIEMBRE | ENERO | FEBRERO | MARZO | ABRIL | MAYO | JUNIO | JULIO | AGOSTO | SEPTIEMBRE | OCTUBRE | NOVIEMBRE | DICIEMBRE |
| ELABORACIÓN DE ANTEPROYECTO     | X      | X          | X       | X         |           |       |         |       |       |      |       |       |        |            |         |           |           |
| MARCO TEÓRICO                   |        |            | X       | X         | X         |       |         |       |       |      |       |       |        |            |         |           |           |
| ELABORACIÓN METODOLÓGICA        |        |            |         |           |           | X     | X       |       |       |      |       |       |        |            |         |           |           |
| ELABORACIÓN INSTRUMENTO         |        |            |         |           |           |       |         | X     | X     | X    |       |       |        |            |         |           |           |
| APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA      |        |            |         |           |           |       |         |       |       |      | X     |       |        |            |         |           |           |
| RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN   |        |            |         |           |           |       |         |       |       |      | X     | X     |        |            |         |           |           |
| PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN |        |            |         |           |           |       |         |       |       |      |       |       | X      | X          | X       |           |           |
| ANÁLISIS DE RESULTADOS          |        |            |         |           |           |       |         |       |       |      |       |       |        |            | X       | X         |           |
| ELABORACIÓN INFORME FINAL       |        |            |         |           |           |       |         |       |       |      |       |       |        |            |         | X         |           |

### 9.2 PRESUPUESTO

Presupuesto global de la propuesta por fuentes de financiación (en miles de \$).

| RUBROS                   | FUENTES        |                | TOTAL  |
|--------------------------|----------------|----------------|--------|
|                          | USCO           | CONTRAPARTIDA. |        |
| PERSONAL                 |                | 50.000         | 50.000 |
| EQUIPOS                  |                | 9.450          | 9.450  |
| SOFTWARE                 |                |                |        |
| MATERIALES               |                | 31.350         | 31.350 |
| SALIDAS DE CAMPO         |                |                |        |
| MATERIAL BIBLIOGRÁFICO   |                |                |        |
| PUBLICACIONES Y PATENTES |                | 1.500          | 1.500  |
| SERVICIOS TÉCNICOS       |                |                |        |
| VIAJES                   |                | 2.000          | 2.000  |
| CONSTRUCCIONES           | No financiable |                |        |
| MANTENIMIENTO            | No financiable |                |        |
| ADMINISTRACIÓN           | (3% del total) |                |        |

|       |             |  |        |
|-------|-------------|--|--------|
|       | solicitado) |  |        |
|       |             |  |        |
| TOTAL |             |  | 94.300 |

Descripción de los gastos de personal (en miles de \$).

| Nombre del Investigador / Experto/ Auxiliar | Formación Académica | Función dentro en el proyecto | DEDICACIÓN Horas/semana | RECURSOS |               |                 | TOTAL  |
|---|---------------------|-------------------------------|-------------------------|----------|---------------|-----------------|--------|
|   |                     |                               |                         | USCO     | Contrapartida |                 |        |
|   |                     |                               |                         |          | LMG           | Otras fuentes * |        |
| Henry Ostos Alfonso                         | MD. M.Sc.           | Investigador Principal        | 10                      | 10.000   |               |                 | 10.000 |
| Frank Barreiro                              | MVZ                 | Co investigador               | 30                      | 25.000   |               |                 | 25.000 |
| Dolly Castro                                | M.Sc.               | Asesora metodológica          | 4                       | 7.800    |               |                 | 7.800  |
| David Farah                                 | Est. MD             | Estudiante de medicina        | 10                      | 5.000    |               |                 | 5.000  |
| Juan David Díaz                             | Est. MD             | Estudiante de medicina        | 10                      | 5.000    |               |                 | 5.000  |
| Cristian Díaz                               | Est. MD             | Estudiante de medicina        | 10                      | 5.000    |               |                 | 5.000  |
| TOTAL                                       |                     |                               |                         |          |               |                 | 57.800 |

\* Agregar una columna para cada fuente de financiación adicional distinta de la entidad que presenta el proyecto.

Descripción de los equipos que se planea adquirir (en miles de \$).

| EQUIPO | JUSTIFICACIÓN | RECURSOS |               | TOTAL |
|--------|---------------|----------|---------------|-------|
|        |               | USCO     | Contrapartida |       |
|        |               |          |               |       |
| TOTAL  |               |          |               |       |

Descripción y cuantificación de los equipos de uso propio (en miles de \$)

| EQUIPO                        | VALOR (CONTRAPARTIDA) |
|-------------------------------|-----------------------|
| Ultracentrífuga refrigerada   | 3.000                 |
| Nevera -20 °C                 | 500                   |
| Termociclador PTC 100 BIO-RAD | 1.000                 |
| Termociclador real time       | 3.000                 |

|                            |              |
|----------------------------|--------------|
| Cabina de extracción       | 400          |
| Cámara de electroforesis   | 100          |
| Fuente de Poder            | 50           |
| Transiluminador            | 150          |
| Foto documentador          | 200          |
| Impresora de foto de geles | 50           |
| <b>TOTAL</b>               | <b>8.450</b> |

Descripción del software que se planea adquirir (en miles de \$).

| SOFTWARE | JUSTIFICACIÓN | RECURSOS    |               | TOTAL |
|----------|---------------|-------------|---------------|-------|
|          |               | Colciencias | Contrapartida |       |
|          |               |             |               |       |
|          |               |             |               |       |
|          |               |             |               |       |
|          | <b>TOTAL</b>  |             |               |       |

Descripción y justificación de los viajes (en miles de \$)

| Lugar /No. De viajes | Justificación ** | Pasajes (\$) | Estadía (\$) | Total días | Recursos |               | Total |
|----------------------|------------------|--------------|--------------|------------|----------|---------------|-------|
|                      |                  |              |              |            | USCO     | Contrapartida |       |
|                      |                  |              |              |            |          |               |       |
|                      |                  |              |              |            |          |               |       |
|                      | <b>TOTAL</b>     |              |              |            |          |               |       |

\*\* Se debe justificar cada viaje en términos de su necesidad para el éxito del proyecto

Valoración de salidas de campo (en miles de \$)

| Ítem | Costo unitario | # | Total |
|------|----------------|---|-------|
|      |                |   |       |
|      |                |   |       |
|      |                |   |       |
|      | <b>TOTAL</b>   |   |       |

Materiales y suministros (en miles de \$)

| Materiales*   | Justificación                     | Valor |
|---|-----------------------------------|-------|
| Primer específicos y sonda (primers Forward – reversed) | Validación y desarrollo de la PCR | 9.000 |
| Kit de extracción de DNA (QIAamp                        | Extraer el DNA y                  | 8.000 |

|                                 |  |        |
|---------------------------------|--|--------|
| DNA mini Kit, Qiagen)           | muestras experimentales                |        |
| Taqman Master Mix               | Validación y desarrollo de la PCR      | 6.000  |
| Puntas de 10, 100, 1000 ul      | Validación y desarrollo de la PCR      | 1.000  |
| Viales para PCR (0.2 ml)        | Corrido de las PCR                     | 500    |
| Tubos ependorffs (0,6 y 1.5 ml) | Almacenamiento de DNA                  | 200    |
| Agarosa                         | Geles de revelado                      | 300    |
| TBE                             | Electroforesis                         | 200    |
| Marcado de peso molecular       | Validación y desarrollo de la PCR      | 550    |
| Bromuro de ethidium             | Tinción de geles                       | 100    |
| Papelería                       | Información e informes                 | 2.000  |
| Alcohol industrial por galón    | Desinfección de los puestos de trabajo | 150    |
| Caja guantes nitrilo x 100      | Cultivos microbiológicos               | 1.000  |
| Agua free Nuclease              | Reconstitución DNA y Primers           | 500    |
| MaterialFungible                | Procesamiento de muestras              | 1.000  |
| ImplementosdelaLaboratorio      | Correcto funcionamiento del proyecto   | 1.000  |
| TOTAL                           |  | 31.500 |

Pueden agruparse por categorías, ej.: vidriería, reactivos, papelería, etc., suscripciones a revistas, libros, etc.

#### Servicios Técnicos (en miles de \$)

| Tipo de servicio | Justificación | Valor |
|------------------|---------------|-------|
|                  |               |       |
|                  |               |       |
| TOTAL            |               |       |

#### PUBLICACIONES Y PATENTES (en miles de \$)

| Ítem                   | Justificación  | Valor |
|------------------------|--|-------|
| Jornada de divulgación | Socialización de resultados en eventos científicos del área de investigación | 1.000 |
| Artículo científico    | Publicaciones en revistas  | 500   |
| TOTAL                  |  | 1.500 |

## 10 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Tras una revisión minuciosa de los archivos médicos del paciente, incluyendo historia clínica, imágenes diagnósticas, reportes de patología, entre otros, se encontraron los siguientes datos:

Un paciente masculino de 32 años de edad procedente de la ciudad de Neiva quien consultó por cuadro clínico de aproximadamente 1 mes de evolución consistente en dolor constante de tipo opresivo en la región anteromedial de la pierna con puntaje en la escala análoga del dolor de 6/10 el cual no se irradiaba a ninguna parte del cuerpo, asociado al ejercicio y que cesaba con la ingesta de analgésicos de tipo AINES y reposo.

Entre los antecedentes personales de importancia encontramos:

Patológicos: hipertensión arterial, obesidad (IMC: 37,96), hiperprolactinemia, hernia discal de L4, L5 y S1.

Quirúrgicos: tenorrafia de extensores de mano izquierda hace 5 años.

Medicamentos: losartán potásico x 50mg (TAB) 2 veces al día (10am – 9pm), hidroclorotiazida x 25mg (TAB) 1 vez al día (10am).

Antecedentes toxicológicos: alergia al enalapril.

Antecedentes familiares: Hipertensión arterial en padre y madre, Diabetes mellitus tipo 2 en padre.

Además en el apartado de revisión por sistemas y examen físico, reportan los siguientes hallazgos: alteraciones en el sistema osteomuscular, con una limitación para la marcha excesiva y mantenimiento de posición de pie por tiempo excesivo. También las extremidades superiores presentaban deformidad muscular en el brazo derecho y las extremidades inferiores mostraban deformidad en piernas con angulación tibial y presentación de parestesias en el muslo derecho.

Entre otros estudios complementarios de la historia que apoyan el diagnóstico de displasia fibrosa están:

Diagnóstico de quiste óseo benigno (referido por el paciente) a los 7 años de edad.

2009/10/22: diagnóstico de tumor benigno de los huesos largos del miembro inferior por la especialidad de ortopedia.

2011/05/02: en radiografías se observa esclerosis en tercio medio de tibias y peroné, en región del fémur se observa lesión aparentemente quística en tercio distal

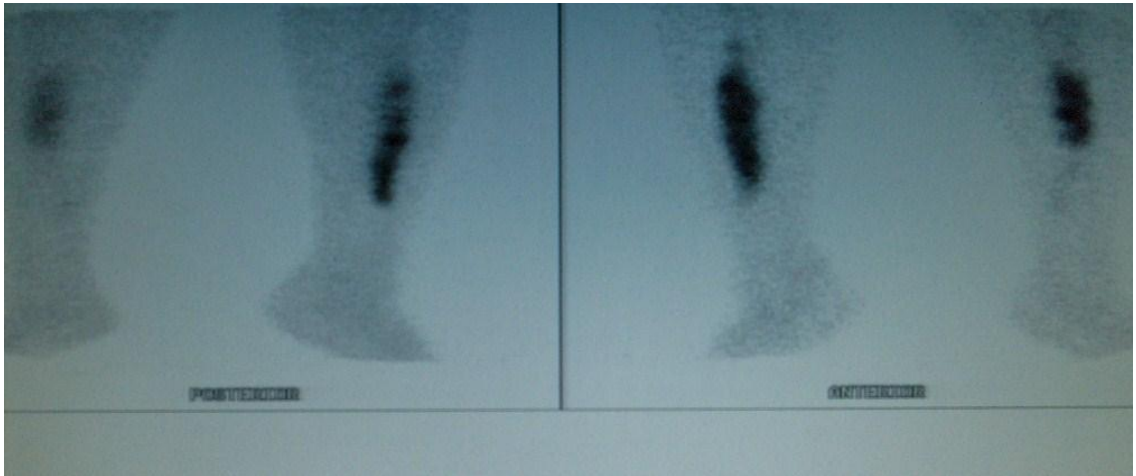
2011/06/13: en radiografías de húmero se observó lesión parecida a quiste. En metáfisis en cráneo se observa progreso de lesiones de iguales características en región superior de parietales. Diagnóstico de enfermedad ósea de Paget por la especialidad de genética. Posteriormente por estudio histopatológico mediante biopsia se determina el diagnóstico de displasia fibrosa polioestótica.

2011/09/26: gammagrafía muestra lesiones hipercaptantes simétricas de tibia y peroné.

Imágenes diagnósticas:







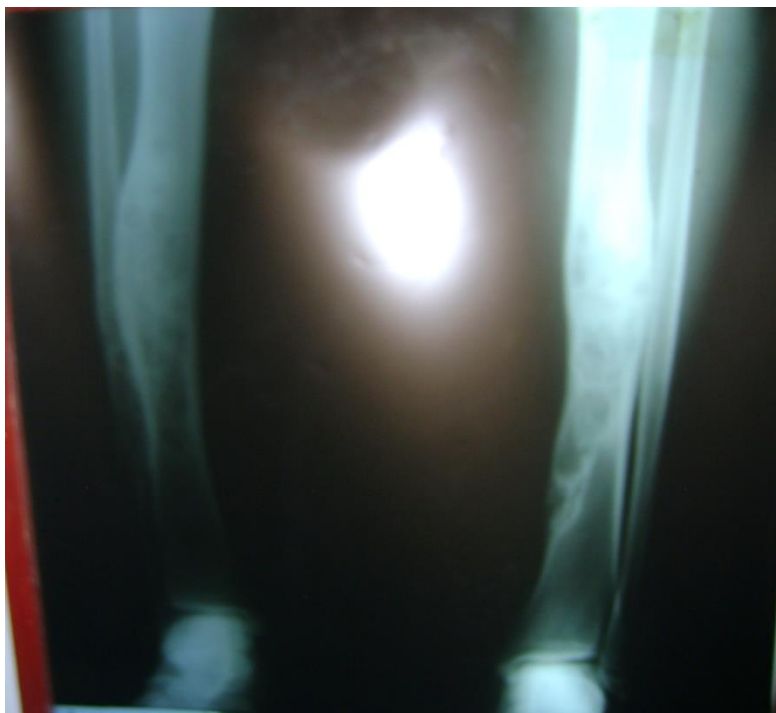


Tabla 3 Datos del paciente

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| GÉNERO                           | Masculino   |
| ESTADO CIVIL                     | Soltero   |
| TENER TRABAJO                    | Si  |
| EDAD                             | 32 Años   |
| FECHA DE INICIO DE SÍNTOMAS      | 26 de agosto de 1990  |
| FECHA DE DIAGNÓSTICO             | 06 de junio de 2011   |
| COMORBILIDADES                   | Fracturas: No<br>Trastorno endocrinológicos: Si<br>Obesidad: Si |
| TÍTULO ACADÉMICO                 | Universidad   |
| FUNCIONALIDAD FÍSICA<br>AUTÓNOMA | Si  |
| DOLOR CORPORAL                   | Si  |

|        |    |
|--------|----|
| FATIGA | Si |
|--------|----|

*Fuente:* Historia clínica aportada por el paciente.

Respecto al resultado obtenido en el estudio biomolecular, el cual fue protocolizado y estandarizado por este grupo de trabajo de investigación, la ausencia en este caso de la mutación en el codón 208 del exón 8 del gen que codifica para subunidad de la proteína G estimuladora del cromosoma 20q13, no me indica que dicha prueba sea confirmatoria de la enfermedad ya que correlacionando la clínica con la imagenología y el estudio histopatológico es posible realizar el diagnóstico.

Diagnóstico molecular pcr: La integridad se observó en un gel de agarosa 1.5%, donde utilizamos como control negativo solo agua, el DNA del paciente y dos controles de DNA, como lo pueden observar en la imagen N. 1 la integridad fue buena y cantidad fue medida en el Nanodrop y fue de 50ng/μl.

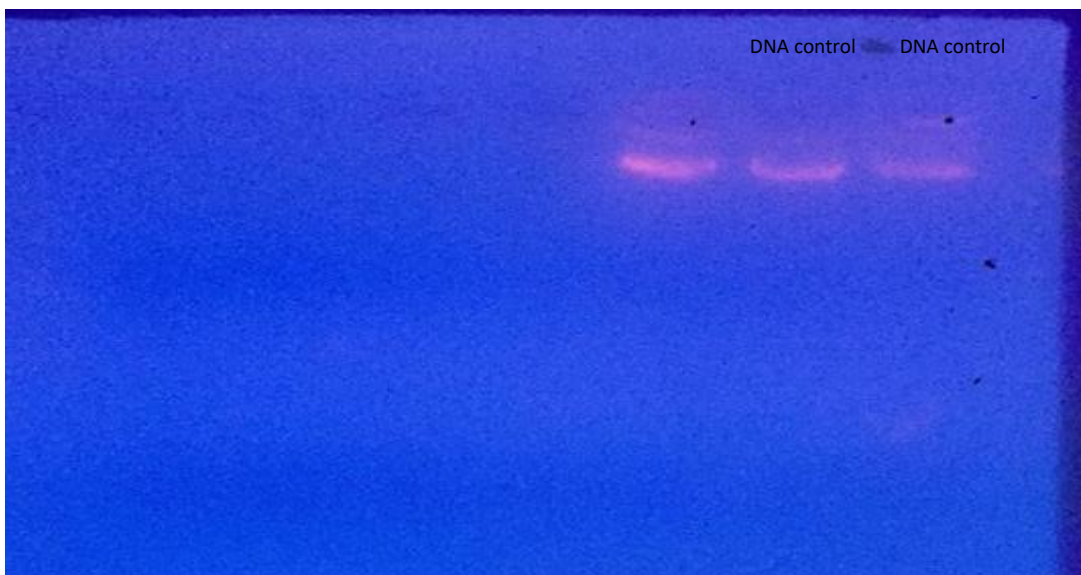


Figura 1 Integridad del ADN

La electroforesis se hizo en un gel de agarosa al 2%, se utilizó un marcador de peso molecular (MPM) de 25 pares de bases (PB), en el primer pozo se adiciono MPM, en el segundo pozo se adiciono el DNA del paciente y las primers de la región normal para gen, en el tercer pozo se adiciono DNA control de un paciente

normal y los primers de la región normal, en el cuarto pozo se adiciono DNA del paciente y los primers de la región mutada, en el quinto pozo se adiciono un DNA control de un paciente sano y los primers de la región mutada, el paciente no amplifico la región mutada pero si amplifico para el gen normal. Ver imagen N. 2

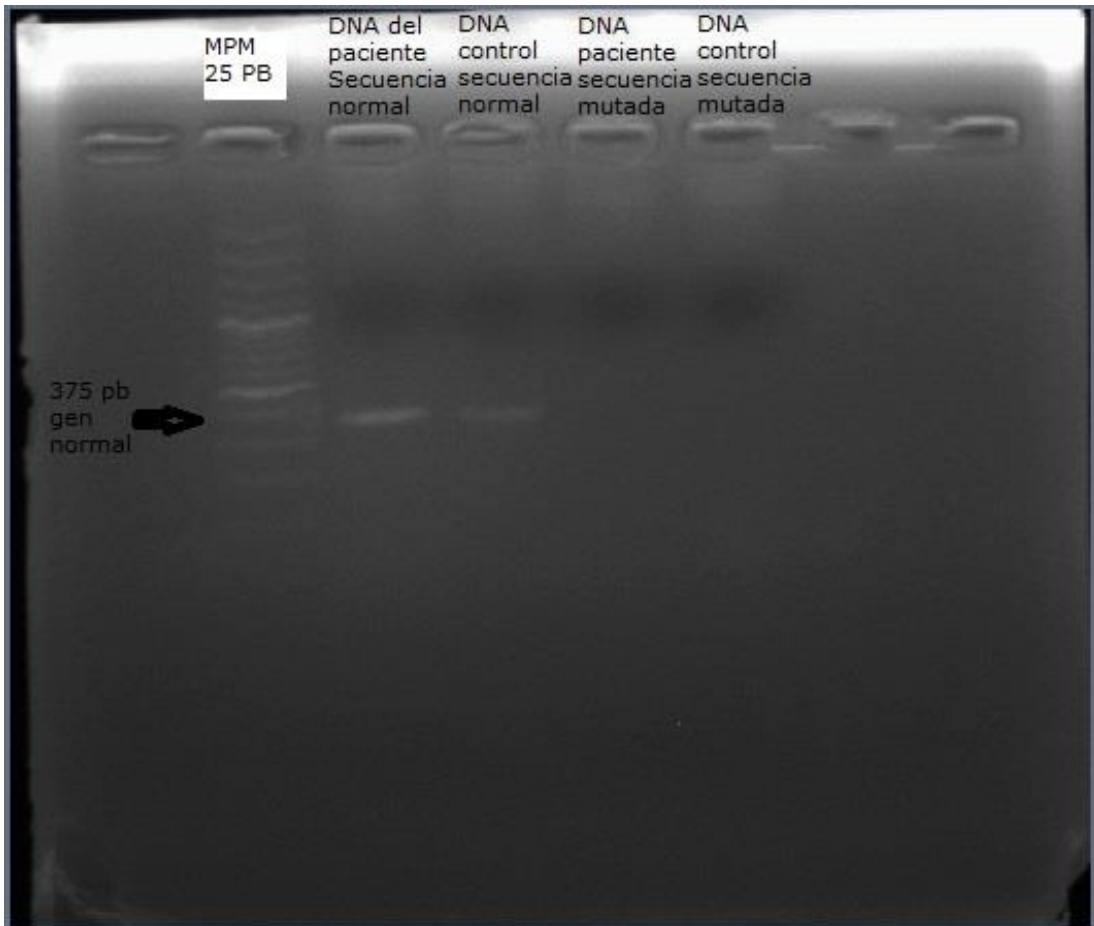


Figura 2 Resultado de la PCR

## 11 DISCUSIÓN

La displasia fibrosa es una enfermedad rara con poca literatura disponible, sobre la cual existen dudas respecto a su etiopatogenia, por esto es de gran relevancia la caracterización de la clínica de los pacientes.

DiCaprio y colaboradores, describen que el cuadro clínico de la displasia fibrosa se caracteriza por dolor óseo, acompañado de deformidad, fracturas patológicas y alteraciones radiográficas, los cuales son manifestados por el paciente de nuestro estudio. (13)

Rossana Román y colaboradores, estudiaron la relación entre la presentación clínica y una mutación activadora de la proteína GNAS1, usando métodos de biología molecular similares al del actual estudio, demostrando en ambos que no existe una relación directa entre la presencia del gen mutado y las alteraciones clínicas. (1) Sin embargo, al tener en cuenta que aún no existe una prueba molecular estándar para el diagnóstico confirmatorio de esta patología, este grupo de trabajo considera imprudente descartar el diagnóstico de displasia fibrosa por la ausencia de mutación en dicha prueba teniendo tanto una presentación de la clínica, imagenológica e histopatológica clara. Por otro lado, tampoco se excluye la idea de que dicha patología sea resultado de otro tipo de mutaciones, en localizaciones diferentes a la antes descrita.

Como ha sido mencionado en el presente estudio, sabemos que el paciente fue diagnosticado por estudios de histopatología e imagenología con displasia fibrosa de tipo polioestótica la cual representa alrededor del 30% del total de las displasias fibrosas, ello concuerda con lo encontrado en la literatura.(14) La causa de displasia fibrosa es de origen postcigótica, pero la simetría de las lesiones bilaterales de la extremidad inferior sugiere que la alteración pueda ser de origen hereditario; recientemente se ha identificado la mutación del gen que causa la displasia fibrosa, su análisis por biología molecular y determinación por PCR en tiempo real, podría ser útil para confirmar en última instancia la displasia fibrosa. (15)

A pesar de que los datos no son suficientes para realizar un diagnóstico certero de síndrome de McCune – Albright cabe resaltar que el paciente no presenta manchas color café con leche y que en algún momento presentó hiperprolactinemia de origen idiopático, la cual se asocia probablemente a la

displasia fibrosa. Llama la atención la masa que el paciente presenta en su brazo derecho ya que podría tratarse tal vez de un mixoma el cual a su vez está asociado, junto con la displasia fibrosa, al síndrome de Mazabraud.

Entre las limitaciones que encontramos en el estudio está el hecho de que solo se evaluó un paciente debido a la baja prevalencia de la patología. También se evidencio que en la parte de la biología molecular ninguno de los artículos publicados respecto al tema, especifican exactamente el protocolo para el procedimiento del estudio de PCR específico para esta enfermedad, por lo que se necesita estandarizarlos para poder replicarlo.

## 12. CONCLUSIONES

Se constató a partir del estudio clínico e histopatológico la presencia de un síndrome de displasia fibrosa

Se evidenció en el paciente la presencia de afecciones comunes de la displasia fibrosa como fatiga y dolor, en este caso bilateral en la región anteromedial de la pierna y complicaciones como alteraciones endocrinológicas en este caso hiperprolactinemia en el paciente.

## 13 RECOMENDACIONES

Consideramos la importancia de realizar un estudio biomolecular de acuerdo al protocolos descritos anteriormente.

Realizar estudios con una muestra más amplia usando casos y controles, con el fin de mejorar el alcance estadístico para así obtener resultados que representen de manera más fidedigna los datos de los pacientes con displasia fibrosa.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roman R, Johnson M, Codner E, Cattani A, Garcia H, Mericq V, et al. Clinical and molecular study of Chilean patients with McCune-Albright syndrome. *Revista medica de Chile*. 2001;129(12):1365-72.
2. Razo MÁF, Messina AFR, de Lara Castilla GF, Velásquez JJD, García LSH. Displasia fibrosa poliostótica con afectación en la columna torácica. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*. 2013;18(3):271-6.
3. Boyce AM, Chong WH, Yao J, Gafni RI, Kelly MH, Chamberlain CE, et al. Denosumab treatment for fibrous dysplasia. *Journal of bone and mineral research*. 2012;27(7):1462-70.
4. Lichtenstein L. Polyostotic fibrous dysplasia. *Archives of Surgery*. 1938;36(5):874-98.
5. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *New England Journal of Medicine*. 1991;325(24):1688-95.
6. Chapurlat RD, Orcel P. Fibrous dysplasia of bone and McCune-Albright syndrome. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2008;22(1):55-69.
7. Parekh SG, Donthineni-Rao R, Ricchetti E, Lackman RD. Fibrous dysplasia. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2004;12(5):305-13.
8. Spiegel AM. Mutations in G proteins and G protein-coupled receptors in endocrine disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1996;81(7):2434-42.
9. Kaplan FS, Fallon MD, Boden SD, Schmidt R, Senior M, Haddad JG. Estrogen receptors in bone in a patient with polyostotic fibrous dysplasia (McCune-Albright syndrome). *New England Journal of Medicine*. 1988;319(7):421-5.
10. Weinstein L. GNAS and McCune-Albright Syndrome/Fibrous Dysplasia, Albright Hereditary Osteodystrophy/Pseudohypoparathyroidism Type IA, Progressive Osseous Heteroplasia, and Pseudohypoparathyroidism Type IB. *OXFORD MONOGRAPHS ON MEDICAL GENETICS*. 2008;54(1):1277-88.
11. Ruggieri P, Sim FH, Bond JR, Krishnan Unni K. Malignancies in fibrous dysplasia. *Cancer*. 1994;73(5):1411-24.
12. Candelieri G, Roughley P, Glorieux F. Polymerase chain reaction-based technique for the selective enrichment and analysis of mosaic arg201 mutations in *Gas* from patients with fibrous dysplasia of bone. *Bone*. 1997;21(2):201-6.
13. DiCaprio MR, Enneking WF. Fibrous dysplasia. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2005;87(8):1848-64.
14. Buraczewski J, Dabska M. Pathogenesis of aneurysmal bone cyst: relationship between the aneurysmal bone cyst and fibrous dysplasia of bone. *Cancer*. 1971;28(3):597-604.
15. GU W, OGOSE A, MATSUBA A, KAWASHIMA H, HOTTA T, KUDO N, et al. Activating Gs  $\alpha$  mutation rarely occurs in musculoskeletal tumors other than fibrous dysplasia. *Anticancer research*. 2006;26(2B):1611-4.

# ANEXOS

## Anexo A Formato de recolección de la información



### ESTUDIO BIOMECCULAR DE UN PACIENTE CON DISPLASIA FIBROSA POLIOSTOTICA EN EL LABORATORIO DE GENETICA DE LA FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA DE NEIVA EN EL AÑO 2016

**OBEJETIVO DEL ESTUDIO:** Determinar si existe una mutación del codón 201 del exón 8 del gen GNAS1 mediante un ensayo de reacción en cadena de polimerasa en el paciente que acude al servicio de genética del hospital Hernando Moncaleano Perdomo en el 2015.

#### DATOS PERSONALES:

1. **Género:** Masculino Femenino.
2. **Edad:** \_\_\_\_\_
3. **Estado Civil:** Soltero Casado Viudo Separado
4. **Ocupación:**
5. **Nivel Académico:** Primaria Secundaria Universidad
6. **Etnia:** Caucásico Mestizo Negro Asiático
7. **Inicio De Síntomas:** Fecha
8. **Fecha De Diagnóstico:** Fecha
9. **Acompañante En Su Vivienda:** Familiar Amigo Ninguno  
Profesional De La Salud.
10. **Comorbilidades:** Fracturas (Si/No) Trastornos Endocrinológicos (Si/No)  
Obesidad (Si/No)
11. **Funcionalidad Física Autónoma (Si/No)**
12. **Dolor Corporal (Si/No)**
13. **Fatiga (Si/No)**
14. **Resultado De PCR:** (Positiva/Negativa)

Anexo B Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE  
INVESTIGACIÓN MÉDICA.

ESTUDIO BIOMECCULAR DE UN PACIENTE CON DISPLASIA FIBROSA  
POLIOSTÓTICA EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA DE LA FACULTAD DE  
SALUD DE LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA DE NEIVA EN EL AÑO 2016

INVESTIGADORES: Juan David Diaz Pascuas  
Christian Mauricio Diaz Pascuas  
David Fernando Farah Borrero

SEDE DONDE SE REALIZA EL ESTUDIO: Laboratorio de Medicina Genómica,  
Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana de Neiva.

NOMBRE DEL PACIENTE: \_\_\_\_\_

A usted se le está invitando a participar en el estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento.

1. Objetivo del estudio: Determinar si existe una mutación del codón 201 del exón 8 del gen GNAS1 mediante un ensayo de reacción en cadena de polimerasa en el paciente que acude al servicio de genética.
2. Justificación del estudio: La displasia fibrosa es una enfermedad muy poco estudiada y de difícil diagnóstico debido a la falta de recursos que nos faciliten confirmar la presencia de la misma a partir de la clínica dado que esta puede ser muy variable y fácil de confundir con patologías con cuadros similares. El uso de estudios biomoleculares para la confirmación de esta enfermedad es muy poco usado de manera regular y podría ser de gran ayuda para despejar las dudas que tiene el personal médico y la incertidumbre que se genera en el paciente al no tener pleno conocimiento de su padecimiento.
3. Beneficios del estudio: Los participantes de la investigación, sentirán satisfacción personal gracias a que su colaboración ayuda a contribuir a la comprensión más profunda de la patología y a la consecuente identificación mediante el uso de técnicas biomoleculares como el PCR, de factores asociados para que ésta se desarrolle, para lograr un diagnóstico y tratamiento tempranos.
4. Procedimientos del estudio: Se realizará un estudio biomolecular, donde se requiere obtener una muestra de sangre periférica del paciente en un tubo de 4 ml, para ser estudiada en el laboratorio genómico, a partir de unos métodos que sustenta el estudio de PCR.
5. Riesgos asociados al estudio: De acuerdo con el artículo 11 de la resolución 8430, ésta investigación se clasifica en la categoría tipo B, es decir, es una investigación con riesgo mínimo, en la que se emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes como lo es en este caso la extracción de sangre por punción venosa en adultos. Entre los posibles riesgos del procedimiento podemos encontrar: hematoma local, sangrado, infección local, mareos, debilidad, entre otros.
6. Aclaraciones:
  - Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.

- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

Si tiene alguna pregunta o si desea alguna aclaración por favor comunicarse con Juan David Díaz Pascuas al teléfono 3167574559, con David Fernando Farah al teléfono 3112486107.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede si así lo desea, firmar el consentimiento informado que forma parte de este documento.

#### EN CONSIDERACIÓN DE LO ANTERIOR

Yo, \_\_\_\_\_ identificado(a) con C.C N° \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria por el investigador que me entrevistó. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos, por lo tanto deseo participar voluntariamente en el proyecto de investigación.

\_\_\_\_\_  
Nombres y Apellidos del Participante

\_\_\_\_\_  
Firma del Participante  
C.C N°

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo 1

\_\_\_\_\_  
Firma del Testigo 1  
C.C N°

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo 2

\_\_\_\_\_  
Firma del Testigo 2  
C.C N°

Esta parte debe ser completada por el investigador (o su responsable).

He explicado al Sr. (a) \_\_\_\_\_ el propósito de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implican su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella (Resolución 8430 de 1993) una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

\_\_\_\_\_  
Firma del Investigador

\_\_\_\_\_  
Fecha