
Análisis genético molecular de hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa: estudio familiar y diagnóstico de portadores en población navarra

Genetic molecular analysis of congenital suprarenal hyperplasia through deficit of 21-hydroxylase: family study and diagnosis of carriers in the population of navarra

M. Oyarzábal¹, M.J. Chueca¹, B. Ezquieta²

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de 21-hidroxilasa (21-OH) es una enfermedad hereditaria monogénica autosómica recesiva responsable de cerca del 95% de los casos de hiperplasia suprarrenal congénita (HSC). Esta enfermedad presenta un espectro de manifestaciones clínicas muy amplio; desde formas severas que se presentan al nacimiento, en las que la virilización puede ir o no acompañada de un síndrome pierde sal, hasta formas más leves en que los signos de virilización se presentan más tardíamente. La incidencia de la forma severa es 1:10.000, mientras que las formas tardías son mucho más frecuentes en nuestra población, 1:100. La frecuencia de portadores es de 1/50 en las formas severas y de 1/5 en formas tardías. Estas formas clínicamente leves, que son de frecuente consulta en Pediatría y de reciente diagnóstico mediante adecuados estudios funcionales, pueden ser al igual que los familiares de las formas severas, portadoras de alelos con mutaciones severas. Este hecho, que sólo puede ser puesto de manifiesto mediante análisis del ADN, es de indudable

interés ya que ha de considerarse que en esta patología existe la posibilidad de tratamiento prenatal^{1,3}.

El gen responsable de la enfermedad se denomina CYP21B y se encuentra, junto a su pseudogén CYP21A, ligado a los genes del complemento C4A y C4B, dentro de la región III del complejo HLA en el brazo corto del cromosoma 6. Existen dos tipos de mecanismos básicos de producción de mutaciones en este gen: delección del gen funcional por recombinación asimétrica en la meiosis y mutaciones puntuales en el gen funcional, probablemente transferidas a partir del pseudogén por un mecanismo de conversión génica². Actualmente es posible el análisis directo del gen y la detección de las mutaciones causantes de la enfermedad. Es importante señalar que las formas tardías pueden ser portadoras de mutaciones severas, sin que, clínica o bioquímicamente, ello sea manifiesto. La informatividad de estos estudios puede ser completada mediante un análisis indirecto del gen apoyado en el polimorfismo de microsatélites en la región HLA. El análisis directo del gen implicado en la enfer-

ANALES Sis San Navarra 1999, 22 (Supl. 3): 261-265.

1. Servicio de Pediatría. Hospital Virgen del Camino. Pamplona.
2. Sección de Endocrinología. Servicio de Bioquímica. Hospital la Paz. Madrid.

Correspondencia:
Mirentxu Oyarzábal Irigoyen
C/ Esquiroz 20-8º D
31007 Pamplona
Tfno. 948 422612
Fax 948 429924

medad permite un diagnóstico más preciso, una mejor caracterización de los enfermos y un enfoque más objetivo del tratamiento.

El análisis del gen de la 21-OH plantea además la evidente e inmediata utilidad en la realización de diagnóstico prenatal y de portadores en nuestra población. Recientemente se han publicado^{4,5} los resultados del grupo de Estados Unidos poniendo de manifiesto la eficacia de un correcto diagnóstico prenatal y tratamiento en esta enfermedad. En esta deficiencia la mayor gravedad clínica estriba en dos puntos: las formas pierde-sal en varones, que pone en peligro su vida cuando no se conoce su situación de enfermo; y la virilización en las niñas, que, además de los problemas sociales y psicológicos, obliga a repetidas intervenciones quirúrgicas. El conocimiento de la situación de enfermo en el varón y el tratamiento intraútero en la niña afecta resuelven estos problemas. El diagnóstico de portadores unido a un adecuado diagnóstico y tratamiento prenatal, que es posible en esta patología, permite moderar la gravedad de las formas pierde-sal y prevenir el pseudohermafroditismo femenino, evitando las grandes repercusiones psicosociales y los gastos derivados de las múltiples intervenciones quirúrgicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se ha realizado en 25 familias (101 individuos) de la Comunidad Autónoma de Navarra con al menos un caso afecto de HSC por deficiencia de 21-hidroxilasa, en las distintas formas de presentación clínica: pierde-sal (8 familias), virilizante simple (2 familias) y tardía (10 familias). Se han incluido en el estudio formas de hiperandrogenismo funcional con 17OH progesterona tras test de ACTH por encima de la normalidad (5 familias), por encontrarse estos pacientes en un riesgo superior de ser portadores del déficit de 21-hidroxilasa.

Para el análisis directo del gen de la esteroide 21-hidroxilasa, se ha practicado un despistaje de las 12 mutaciones más frecuentes^{3,6,7} en esta enfermedad mediante una batería de pruebas que nos ha permitido detectar el 100% de las mutaciones de

formas severas y el 78% de las mutaciones de formas leves. Los alelos cuya mutación no haya sido caracterizada han pasado a ser analizados como se indica posteriormente.

El análisis indirecto del gen, se ha realizado mediante el estudio de microsatélites en la región HLA (D6S273, D6S439 y TAP 1)⁷ y ha permitido completar la informatividad para la detección de portadores, a la par que incrementar la precisión del diagnóstico. Se han puesto a punto 2 nuevos marcadores D6S265 y TNF para perfilar mejor la caracterización de cromosomas en los que hemos podido poner de manifiesto la existencia de una mutación nueva no descrita.

La detección de mutaciones nuevas en el gen de la 21-hidroxilasa, se ha llevado a cabo mediante dos tipos de abordajes: polimorfismo de la cadena sencilla de ADN (SSCP) y secuenciación directa del gen.

Métodos aplicados en el análisis molecular

Extracción de ADN de los leucocitos de sangre periférica de pacientes y familiares de deficiencia de 21-hidroxilasa.

Detección de deleciones, conversiones grandes y duplicaciones en el CYP21 mediante digestión de ADN con los enzimas de restricción Bgl II, Taq I y Kpn I y análisis de los fragmentos de restricción mediante la técnica de Southern utilizando la sonda específica de CYP21, pC21/3c³.

Densitometría óptica sobre las autorradiografías para la evaluación de la intensidad relativa de los fragmentos polimórficos asociados a gen y pseudogén.

Diseño y síntesis de los oligonucleótidos requeridos, tanto para la PCR, como para la hibridación específica de alelo.

Amplificación específica del gen CYP21 mediante la PCR, utilizando los oligonucleótidos descritos para las zonas diferenciales de gen y pseudogén^{3,9}.

Detección de 10 mutaciones puntuales por hibridación específica de alelo normal y mutado (ASO). Se incluirán las mutaciones descritas en formas clásicas: 654 A/C-G intrón 2, Del8pb exón 3, Ile172-Asn exón 4, Ile-Val-Glu-Lys236-239-Asn-Glu-Glu-Lys en

exón 6, 306insT en exón 7, Gln318-Stop y Arg356-Trp en exón 8; y tardías: Pro 30-Leu en exón 1, Val281-Leu en exón 7 y Pro453-Ser en exón 10. Para el marcaje de oligonucleótidos se empleará un marcaje no radioactivo con digoxigenina y revelado por quimioluminiscencia⁷.

Análisis indirecto del gen mediante estudio de los microsátélites D6S265, D6S273, D6S439 y TAP 1 en la región HLA⁸. También se ha utilizado un marcaje no radioactivo con fluorescencia y análisis en cromatografía capilar (ABIPrism 310, Perkin Elmer) y análisis de fragmentos con programa GeneScan.

Electroforesis en geles nativos de ADN desnaturalizado para detección del polimorfismo de la cadena sencilla (SSCP) en fragmentos de 100-200 pb. Se emplearán fragmentos amplificados y posteriormente digeridos con ER.

Tinción mediante método de Ag para aumentar la sensibilidad de esta técnica. Alternativamente se realizará marcaje radioactivo mediante incorporación del isótopo radioactivo.

Secuenciación de aquellos alelos candidatos a presentar mutaciones por método directo empleando polimerasa termoestable en termociclador y dideoxinucleótidos terminadores marcados con fluorescencia. Análisis mediante cromatografía capilar en ABIPrism310, Perkin Elmer.

RESULTADOS

Se ha establecido el diagnóstico de portadores de mutaciones severas tanto en padres y hermanos de pacientes con formas neonatales, como en más de una tercera parte de las formas tardías, lo cual no hubiera sido posible sin disponer de estas técnicas moleculares. También han podido ser diagnosticadas formas crípticas de la deficiencia y reducir o confirmar el riesgo de ser portador en los hiperandrogenismos funcionales. Dichos datos han sido contrastados con los hallazgos bioquímicos. Los resultados del análisis molecular han sido concordantes y han confirmado el diagnóstico clínico. Únicamente una familia diagnosticada como forma pierde sal no severa en otro centro hospitalario, hubo de ser reevaluada a la vista de los

datos moleculares, comprobándose que bioquímica y clínicamente dicho cuadro más se correspondía con una forma leve de la deficiencia, como sugería el patrón molecular.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

En 71 individuos se ha caracterizado mutación en el gen de la esteroide 21-hidroxilasa, correspondiendo a 21 Pacientes y 48 portadores (33 de ellos con mutaciones severas del gen). Se han detectado 3 formas crípticas, 2 eran hermanos y un padre de paciente.

Los tipos de mutaciones detectadas han sido 8 y quedan enumeradas como sigue:

- Gln318Stop (severa) en 10 cromosomas
- Val281Leu (leve) en 12 cromosomas
- 655 A o C -G (severa) en 7 cromosomas
- Delección/conversión (severa) en 3 cromosomas
- 64insT (exón 1, severa, NUEVA) en 2 cromosomas
- Triple mutación exón 6 (severa) en 1 cromosoma
- Ile172Asn (severa, activ residual 1%) en 1 cromosoma
- Delección 8pb en 1 cromosoma
- Polimorfismo Gly326 en 1 cromosoma

(nº de cromosomas considerando únicamente cromosomas de pacientes sin parentesco)

Ha existido una buena correlación genotipo/fenotipo en todos los casos estudiados: todos los pacientes que presentaron dos mutaciones severas (9 pacientes) presentaron una forma pierde sal; una paciente que presentó una combinación de mutación severa/mutación severa con actividad residual del 1% presentó una forma virilizante simple sin pérdida salina, aunque otra paciente con una forma clínica similar presentó una combinación de mutación leve y severa; cinco pacientes que presentaron mutación severa/mutación leve presentaron una forma no clásica; y dos pacientes que mostraron mutación leve en ambos alelos presentaron una forma no clásica de la deficiencia.

DISCUSIÓN

El análisis genético molecular de HSC en población navarra se ha realizado sobre familias con al menos un caso afecto. Se han estudiado familias con distintas formas clínicas de la deficiencia: desde formas neonatales, severas que presentaron un síndrome pierde-sal y severa virilización en las niñas (alguna de ellas habían sido inadecuadamente sexadas como varones), hasta formas más leves, tardías en que los signos de virilización aparecieron en el periodo de la infancia. También hemos podido estudiar una forma severa neonatal con virilización pero no acompañada de síndrome pierde-sal. En todas ellas se había realizado un diagnóstico clínico adecuado en el Servicio de Pediatría del Hospital Virgen del Camino. Por tratarse de una enfermedad hereditaria se han incluido en el estudio, además de los pacientes, los padres y hermanos de los afectados.

El análisis molecular, que se ha llevado a cabo en el Servicio de Bioquímica del Hospital La Paz, nos ha permitido la caracterización de mutaciones del gen de la esteroide 21-hidroxilasa presentes en todos los pacientes con formas severas de la deficiencia (20/20 cromosomas 100%). En las formas leves de la deficiencia hemos caracterizado un 78% (14/18 cromosomas) de los alelos. En los pacientes con hiperandrogenismo funcional cabe esperar que pueda existir un alelo mutado por paciente, y hemos podido detectar dos portadores, uno de ellos de mutación severa.

El análisis se ha realizado por tres tipos de abordajes:

1. Un análisis directo del gen estudiando una batería de mutaciones (12 tipos de mutaciones) que en población española permite caracterizar el 90% de los alelos mutados^{3,6}. Se han detectado 8 tipos de mutaciones, 7 de ellas de tipo severo. Cinco de los pacientes con formas tardías y uno de los hiperandrogenismos funcionales han presentado mutaciones severas, por lo que son susceptibles de consejo genético, al igual que los padres y hermanos portadores de las formas clásicas (20 padres y 8 hermanos).

2. Un análisis directo del gen mediante secuenciación del gen de aquellos pacientes que en el análisis de SSCP presentaban patrón sugestivo de mutación. Nos ha permitido la caracterización de los dos cromosomas con mutación severa en una forma pierde-sal cuyas mutaciones no habían sido identificadas en el estudio 1. Hemos detectado una mutación nueva no descrita, 65insT que supone un desplazamiento en la fase de lectura en el primer exón del gen que daría lugar a una proteína truncada a nivel del exón 2.

3. Un análisis indirecto del gen mediante marcadores polimórficos tipo microsatélite (5 marcadores) en la región HLA' que nos ha permitido caracterizar los alelos mutados en los cromosomas no caracterizados y una mayor precisión en el diagnóstico de portadores.

El estudio ha permitido detectar los portadores de la deficiencia dentro de las familias con algún caso afecto. Hemos detectado 48 portadores, 33 de ellos con mutaciones severas del gen. Hemos de señalar que, incluso en las formas leves de la deficiencia, hemos encontrados portadores de mutaciones de este tipo (5 de las 9 familias con esta forma de la deficiencia han presentado en uno de los alelos una mutación severa) lo que tiene importantes implicaciones en lo que se refiere al consejo genético en estas familias. El estudio molecular también nos ha permitido detectar tres formas crípticas de la deficiencia. Hemos detectado una mutación severa del gen 21-OH en uno de los hiperandrogenismos funcionales estudiados, pudiendo descartar mutaciones severas en los cuatro casos de hiperandrogenismo restantes. Los estudios bioquímicos de los portadores caracterizados a nivel molecular nos han permitido precisar mejor los dinteles diagnósticos para esta deficiencia, encontrándose en preparación un manuscrito en el que se estudia una serie de pacientes con hiperandrogenismo en que se incluyen estos pacientes.

La distribución y frecuencia de los distintos tipos de mutaciones en población navarra parece ser algo diferente de la encontrada en población española en lo que se refiere a una de las mutaciones

severas, Gln318Stop en el exón 8 del gen. Esta mutación ha resultado ser más frecuente (43% frente a 10%) en Navarra.

Hemos encontrado una fuerte asociación entre la severidad de la mutación y la gravedad en la forma clínica (relación genotipo-fenotipo) como ya había sido señalado en otras poblaciones^{3,8}. En todos los casos, los hallazgos moleculares correlacionaron con la forma clínica diagnosticada.

El análisis del gen de la esteroide 21-hidroxiolasa nos ha permitido la caracterización de todos los pacientes con formas neonatales de la deficiencia (pierde-sal ó virilizante simple). Todos ellos han presentado mutaciones severas en ambos alelos, paterno y materno. En ninguno de los casos la mutación encontrada se ha producido *de novo*, los progenitores han resultado portadores en cada uno de los casos. Cuatro de los hermanos de pacientes han resultado también portadores.

Las formas tardías o leves de la deficiencia han sido caracterizadas parcialmente, 14 de 18 alelos (78%). Cinco de los pacientes han mostrado mutaciones severas en uno de los cromosomas, con importantes implicaciones para el consejo genético. Hemos detectado tres formas crípticas de la deficiencia, confirmadas con el estudio bioquímico.

La distribución y frecuencia de mutaciones en población navarra ha resultado algo peculiar, con una mayor frecuencia para la mutación severa Gln318Stop. Hemos caracterizado una mutación nueva no descrita en un paciente con una forma pierde-sal, una mutación de desplaza-

miento de la fase de lectura que genera un codón de parada.

BIBLIOGRAFÍA

1. AZZIZ R, DEWAILLY D, OWEBACH D. Clinical Review 56: Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 810-815.
2. MILLER WL. Clinical Review 54: Genetics, diagnosis and management of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 241-246.
3. EZQUIETA B, OLIVER A, GRACIA R, GANCEDO PG. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Hum Genet* 1995; 96: 198-204.
4. MERCADO AB, WILSON RC, CHENG KC, WEI JQ, NEW MI. Prenatal treatment and diagnosis of congenital adrenal hyperplasia owing to steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2014-2020.
5. SPEISER PW, DUPONT J, ZHU D, SERRAT J, BUEGELEISEN M, TUSIE-LUNA MT et al. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 1992; 90: 584-595.
6. EZQUIETA B, VARELA JM, JARIEGO C, OLIVER A, GRACIA R. Nonisotopic detection of point mutations in CYP21B gene in steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Chem* 1996; 42: 1108-1110.
7. EZQUIETA B, JARIEGO C, VARELA JM, OLIVER A, GRACIA R. Microsatellite markers in the indirect analysis of the steroid 21-hydroxylase gene. *Prenat Diagn.* 1997; 17: 429-434.
8. WEDELL A, THILEN A, RITZÉN EM, STENGLER B, LUTHMAN M. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 1145-1152.