



CIENCIAS BIOMÉDICAS

Artículo original de investigación

Diagnóstico molecular de Hiperplasia Adrenal Congénita por deficiencia de 21 hidroxilasa en pacientes cubanos

Teresa Collazo Mesa ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-3984-9189>
Mercedes Arceo Álvarez ¹ <https://orcid.org/0000-0003-3029-0179>
Lainet Santos Merencio ¹ <https://orcid.org/0000-0002-1006-7108>
Tania M. Espinosa Reyes ² <https://orcid.org/0000-0001-6979-1291>
Adrian de J González Navarro ¹ <https://orcid.org/0000-0003-0324-8709>
Ixchel López Reyes ¹ <https://orcid.org/0000-0000-0087-4567>
Alejandro Esperón Álvarez ¹ <https://orcid.org/0000-0000-0482-7877>
Lidice Reyes Navarro ¹ <https://orcid.org/0000-0002-1006-7108>
Marileivi García Heredia ¹ <https://orcid.org/0000-0002-1006-7108>
Paulina Araceli Lantigua Cruz ¹ <https://orcid.org/0000-0002-8549-2571>

¹ Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba

² Instituto Nacional de Endocrinología. La Habana, Cuba

*Autor para la correspondencia: tcollazo@infomed.sld.cu

Editor

Lisset González Navarro
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Traductor

Darwin A. Arduengo García
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

RESUMEN

Introducción: La Hiperplasia Adrenal Congénita por déficit de 21-hidroxilasa, es una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva con un amplio espectro de manifestaciones clínicas. Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 6. Las mutaciones específicas en el gen dan lugar a una pérdida de la actividad enzimática de la enzima 21-hidroxilasa más o menos severa, que según su grado se puede correlacionar con las distintas formas clínicas. **Objetivo:** Realizar el diagnóstico molecular de 5 de las mutaciones: P30L, intrón 2, del8pb, I172N y G318X. **Métodos:** La investigación se llevó a cabo de acuerdo a los principios éticos de la declaración de Helsinki. El ADN se extrajo a partir de muestras de sangre periférica y líquido amniótico de 270 casos. Posteriormente se amplificó el gen CYP21B mediante técnicas de PCR en 2 fragmentos que se solapan. A partir de estos se amplificaron los fragmentos que contienen las mutaciones en estudio. **Resultados:** De las 270 muestras, 161 (60 %) presentaron al menos 1 de las mutaciones estudiadas. La mutación intrón 2 se identificó en 70 de los casos. Las mutaciones P30L y del8pb se identificaron en 34 y 33 casos respectivamente, la mutación G318X fue identificada en 22 casos y 8 casos con la mutación I172N. En 36 de los casos se identificó la presencia de más de 1 mutación, 147 casos resultaron heterocigóticos y 36 heterocigóticos compuestos. La mutación que resultó más frecuente fue intrón 2, seguida por P30L, del 8pb, G318X y I172N respectivamente. Se realizaron 13 diagnósticos prenatales de los cuales 2 resultaron afectados. **Conclusiones:** El análisis directo del gen implicado en la enfermedad permite un diagnóstico más preciso, una mejor caracterización de los enfermos y un enfoque más objetivo del tratamiento y la posibilidad de brindarlo en el período prenatal.

Molecular diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency in Cuban patients

ABSTRACT

Introduction: Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency is an autosomal recessive genetic disease with a wide spectrum of clinical manifestations. This gene is located on the short arm of chromosome 6. Specific mutations in the gene give rise to a more or less severe loss of the enzymatic activity of the 21-hydroxylase enzyme, which, depending on its degree, can be correlated with the different clinical forms. **Objective:** To carry out the molecular diagnosis of five of the mutations: P30L, Intron 2, del8bp, I172N and G318X. **Methods:** The research was carried out in accordance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki. DNA was extracted from peripheral blood and amniotic fluid samples of 270 cases. Subsequently, the CYP21B gene was amplified by PCR techniques in two overlapping fragments. From these, they were amplified the fragments containing the mutations under study. **Results:** Of the 270 samples, 161 (60%) presented at least one of the studied mutations. It was identified Intron 2 mutation in 70 of the cases. They were identified the P30L and del8bp mutations in 34 and 33 cases respectively. They were identified the G318X mutation in 22 cases and the I172N mutation in 8 cases. It was identified in 36 of the cases the presence of more than one mutation, 147 cases were heterozygous and 36 compounds heterozygous. The most frequent mutation was Intron 2, followed by P30L, del8bp, G318X and I172N respectively. They were made 13 prenatal diagnoses, of which 2 were affected. **Conclusions:** The direct analysis of the gene involved in the disease allows a more precise diagnosis, a better characterization of the patients and a more objective approach to treatment and the possibility of providing it in the prenatal period.

Keywords: mutations; Congenital Adrenal Hyperplasia; prenatal diagnosis; gene

INTRODUCCIÓN

La Hiperplasia Adrenal Congénita (HAC) abarca un conjunto de trastornos de herencia autosómica recesiva, causados por la deficiencia de alguna de las enzimas de la vía esteroidogénica suprarrenal. ^(1,2) La prevalencia estimada es de 1/14 000 y la incidencia anual varía de 1/5000 a 1/15 000 nacidos vivos. ⁽³⁾ En Cuba se ha estimado a través de la determinación de los niveles de 17-hidroxiprogesterona que su prevalencia es de 1/15 245. ⁽⁴⁾

Más del 90 % de los casos de HAC se debe a un déficit de actividad 21-hidroxilasa (HAC-21OHD). ⁽⁵⁾ Este trastorno presenta 3 características clínicas fundamentales: insuficiencia suprarrenal, pérdida de sal e hiperandrogenia. ⁽⁶⁾ Según la gravedad y el momento de aparición de las manifestaciones clínicas se distinguen 3 grupos principales: formas clásicas-severas (déficit enzimático completo, pérdida de sal, virilización en el caso de las hembras e inicio en etapa fetal), formas clásicas-moderadas (déficit enzimático casi completo, viriliza-

ción simple sin pérdida de sal e inicio fetal) y no clásicas-leves (déficit enzimático parcial, signos de hiperandrogenia e inicio tardío). ⁽⁷⁾ También se han reportado formas crípticas, con un déficit enzimático parcial y sin manifestaciones clínicas. ⁽⁸⁾

La HAC-21OHD está causada por mutaciones en el gen CYP21A2, localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3). Este gen codifica al citocromo P450c21, responsable de la actividad 21-hidroxilasa suprarrenal. El CYP21A2 tiene una longitud de aproximadamente 3,4 Kb y consta de 10 exones y 9 intrones. Se encuentra cercano a un pseudogen llamado CYP21A1P, con el cual presenta un alto porcentaje de identidad de secuencia. ⁽⁹⁾ Esto facilita la ocurrencia de eventos de recombinación meiótica asimétrica y microconversiones génicas entre ambos *loci*, que originan las mutaciones más frecuentes en el CYP21A2 causantes de HAC-21OHD. ⁽¹⁾

Las mutaciones específicas en el gen dan lugar a la pérdida de la actividad enzimática de la enzima 21-

hidroxilasa más o menos severa, que según su grado se puede correlacionar con las distintas formas clínicas, todas están asociadas a una anomalía genética. ⁽¹⁰⁾

El 75 % aproximadamente de las mutaciones en el gen CYP21B detectables son mutaciones puntuales. Estas pueden estar solas en el gen o asociadas con deleciones, duplicaciones o conversiones génicas del pseudogen CYP21A y el gen C4.

La mayor parte de las mutaciones puntuales localizadas en el gen CYP21B proceden de microconversiones que tienen su origen en el pseudogen que, funcionando como un reservorio de mutaciones, transfiere sus bases a las homólogas del gen. También se ha descrito el fenómeno inverso. Estas mutaciones son recurrentes en su mayoría, lo cual significa que, si se conocen en el pseudogen, se facilita su búsqueda en el gen.

Las mutaciones del pseudogen CYP21A que, al transmitirse por microconversión génica al gen funcional CYP21B, ocasionan pérdida de funcionalidad son: Pro30Leu, intrón 2, Delección de 8pb, Ile172Asn, entre otras. ⁽¹¹⁻¹⁴⁾ Además, se han identificado mutaciones en el gen CYP21B que no están presentes en el pseudogen CYP21A, y que por lo tanto no son aparentemente microconversiones génicas, sino mutaciones de tipo clásico. ^(15,16)

Las mutaciones que tienen como consecuencia la síntesis de una proteína truncada: delección de 8 pares de bases en el exón 3, aparición de un codón stop, están ligadas a una forma clásica con pérdida de sal. Todas estas mutaciones suprimen completamente la actividad 21-hidroxilasa. ⁽¹⁷⁾

Otras mutaciones que corresponden a sustituciones de aminoácidos de clase diferente R356W (arginina en triptófano) e I172N (isoleucina en asparagina) dan una proteína que tiene una actividad enzimática muy disminuida y también son responsables de formas clásicas. ⁽¹⁷⁾

Teniendo en cuenta la frecuencia de las mutaciones descritas en el mundo y el origen étnico de la población cubana se propuso la estandarización y detección de las mutaciones: G318X, intrón 2, P30L, del 8pb e I172N, las cuales nos permitirán caracterizar a las familias cubanas afectadas, ampliar los servicios de nuestro sistema nacional de salud, establecer una relación genotipo-fenotipo, teniendo en cuenta que para esta patología existe la posibilidad de tratamiento prenatal, la realización del estudio de portadores y del diagnóstico prenatal.

El presente trabajo se propuso los siguientes objetivos: Introducir la detección de las mutaciones G318X, intrón 2, P30L, del 8pb e I172N del gen CYP21A2 en el esquema de estudio molecular de HAC-21OHD; estandarizar los métodos para la detección de las mutaciones G318X, intrón 2, P30L, del 8pb e I172N del gen CYP21A2; detectar las mutaciones G318X, intrón 2, P30L, del 8pb e I172N en pacientes cubanos con HAC-21OHD y realizar el diagnóstico de portadores y diagnóstico prenatal a las familias afectadas que lo soliciten.

MÉTODOS

Selección de las muestras

La realización del estudio se llevó a cabo de acuerdo a los principios éticos de la declaración de Helsinki. Se incluyeron 270 muestras de ADN que incluían pacientes con diagnóstico clínico de HAC-21OHD, padres, fetos y familiares. En todos los casos, las muestras procedieron de pacientes cuyo consentimiento informado fue obtenido previamente para el proyecto de investigación Estudio Clínico-Molecular de Hiperplasia Adrenal Congénita por déficit de 21-hidroxilasa, desarrollado en conjunto por el CNGM, donde se realizó el presente trabajo, y el Instituto Nacional de Endocrinología.

Extracción de ADN

Las muestras fueron extraídas a partir de 10 mL de sangre periférica y 20 mL de líquido amniótico por el método de precipitación salina y cuantificadas en un equipo BioSpec-Mini(DNA/RNA/Protein Analyzer). ⁽¹⁸⁾ Se emplearon diluciones de trabajo con una concentración de ADN aproximada de 100 ng/ μ L.

Detección de las mutaciones

De las mutaciones más comunes del gen 21-hidroxilasa, 5 se han analizado en todos los individuos motivo del estudio, empleándose diferentes estrategias para su detección.

El gen CYP21B se amplificó en 2 fragmentos solapados, para ello realizamos 2 PCR (F1 y F2).

PCR-F1: Amplifica desde el exón 1 hasta el exón 6, obteniéndose un producto de 1339 pb. La reacción de PCR se realizó añadiendo: 1 μ L de DNA genómico estudio [250 μ g/mL]; 18,2 μ L de H₂O estéril; 2,5 μ L de Tampón 10x con MgCl₂; 1 μ L de dNTPs (5mM); 1 μ L del cebador directo (F) [10 pmol/ μ L]; 1 μ L del cebador reverso (R) [10 pmol/ μ L]; 0,3 μ L de la Taq polimerasa. Se utilizaron los cebadores P1 y P2, este último específico del gen CYP21B (tabla 1). El programa de 0 a utilizar fue: 1 ciclo 96 °C durante 3 min, 35 ciclos de 94 °C durante 30 seg, 60 °C durante 30 seg, 72 °C durante 2 min, finalizar a 4 °C. El producto de PCR se comprueba en un gel de agarosa al 0,8 % y el producto que se obtiene es de 1338 pb. A partir de este producto de PCR se amplifica usando el método ACRES-PCR para las mutaciones: P30L, intrón 2 y del 8pb, el producto de PCR es de 249 pb, 378 pb y 89 pb respectivamente, posteriormente el producto de PCR para las mutaciones P30L e intrón 2 son digeridos con la enzima de restricción Hha I y el producto es visualizado en gel de agarosa al 3 % en un transiluminador UV.

PCR-F2: Amplifica desde el exón 3 hasta el exón 10, obteniéndose un producto de 2220 pb. La reacción de PCR se realizó añadiendo: 1 μ L de DNA genómico estudio [250 μ g/mL];

Tabla 1. Primers utilizados para la detección de las mutaciones: P30L, Intron 2, G318X, del8pb e I172N

Mutación	Primers	Secuencia
PCR-F1	P1	TGGAAGCTGGTGGAAAGCTCCGG
PCR-F1	P2	GCATCTCCACGATGTGA
PCR-F2	P3	TTGTCCTGGGAGACTACTCC
PCR-F2	P4	ACCTCTCGACCCAGTATGACT
P30	P5	GCTCCGGAGCCTCCACCTCG
P30	P6	TTGGAGTTCAGACCAC
Intron 2	P7	GTGGTGTGAAGTCCAA
Intron 2	P8	ACACCAGCTTGTCTGCAGGAGGCG
Del 8pb	P9	AGCCCCAACTCTCTCTGCA
Del 8pb	P10	TGTGGGCTTCCAGAGC
I172N	P11	TCTCTCTCTCACCTGCAGCATCG
G318X	P12	ACCGGCCACTCAGGCTCACTGGG
G318X	P13	GCCAGTTCGTGGTCTAGC

18,2 µL de H₂O estéril; 2,5 µL de Tampón 10x con MgCl₂; 1 µL de dNTPs (5 mM); 1 µL del cebador directo (F) [10 pmol/µL]; 1 µL del cebador reverso (R) [10 pmol/µL]; 0,3 µL de la Taq polimerasa. Se utilizaron los cebadores P3, específico del gen CYP21B, y P4 (ver tabla 1). El programa de termociclador a utilizar fue: 1 ciclo 96 °C durante 3 min, 35 ciclos de 94 °C durante 30 seg, 61 °C durante 30 seg, 72 °C durante 4 min, finalizar con 1 ciclo a 4 °C. El producto de PCR se comprueba en un gel de agarosa al 0,8 % y el producto que se obtiene es de 2220 pb. A partir de este producto de PCR se amplifica usando el método ACRS-PCR para la mutación I172N, generando un producto de PCR de 416 pb que es digerido con la enzima de restricción Taq I, además se detecta la mutación G318X por el método PCR-RFLP generando un fragmento de 136 pb que es digerido con la enzima Pst I y el producto es visualizado en gel de agarosa al 3 % en un transiluminador UV. Una vez comprobada la amplificación de las muestras en las PCR F1 y F2 se realiza dilución 1:100 para los productos de la F1 y 1:120 para los productos de la F2.

Se presentan las secuencias de los primers utilizados para la detección de las 5 mutaciones (ver tabla 1). A partir de la dilución 1:100 de los productos de la F1, mediante posteriores reamplificaciones por PCR y digestiones de los productos de estas con enzimas de restricción específicas, se detectarán las mutaciones P30L; intrón 2 y exón 3 (deleción 8-pb).

Para ello, de cada tubo de dilución 1:100 se realizan 3 PCR independientes cada una de las cuales permitirá detectar una mutación (P30L; intrón 2 y exón 3). Todas se realizan con las mismas cantidades de reacción de PCR mencionadas en F1, pero con cebadores distintos según la mutación (cebadores P5

y P6 para la mutación P30L; P7 y P8 para la mutación intrón 2 y cebadores P9 y P10 para la mutación exón 3) (ver tabla 1).

El programa de termociclador utilizado para las 3 PCR es el mismo: 1 ciclo 96 °C durante 3 min, 35 ciclos de 94 °C durante 30 seg, 60 °C durante 30 seg, 72 °C durante 1 min, 1 ciclo 72 °C durante 5 min, finalizar con un ciclo a 4 °C. A partir de la dilución 1:120 de los productos de la F2, mediante posteriores reamplificaciones por PCR y digestiones de los productos de estas con enzimas de restricción específicas, se detectarán las mutaciones I172N y G318X.

Para ello, de cada tubo de dilución 1:120 se realizan 2 PCR independientes cada una de las cuales permitirá detectar una de las anteriormente citadas mutaciones. Todas se realizan con las mismas cantidades de reacción de PCR mencionadas en F2, pero con cebadores distintos según la mutación (cebadores P11 y P2 para la mutación I172N; P12 y P13 para la mutación G318X (ver tabla 1).

Los 2 PCR se realizaron con el mismo programa de termociclador: 1 ciclo 96 °C durante 3 min, 35 ciclos de 94 °C durante 30 seg, 60 °C durante 30 seg, 72 °C durante 1 min, 1 ciclo 72 °C durante 5 min, finalizar con un ciclo a 4 °C. Con el producto obtenido de las 5 anteriores PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % para comprobar la amplificación. Debe observarse la banda correspondiente a la fracción de DNA amplificado correspondiendo con el tamaño en pb esperado.

Digestión de los productos de PCR

Para detectar la presencia o ausencia de las mutaciones es necesario proceder a la digestión del producto de PCR con una enzima de restricción específica, excepto en la mutación exón 3 (deleción 8-pb) que no requiere de dicho procedimiento (tabla 2).

Mutación P30L

Se realiza digestión con la enzima de restricción HhaI del producto de PCR obtenido al amplificar con los cebadores específicos para esta mutación P5, con una modificación que da lugar a una diana de restricción para esta enzima cuando la mutación no está presente, y P6.

Se realiza en tubo *ependorf* de 1,5 mL: 5 µL del producto PCR, 3 µL H₂O estéril, 1 µL del tampón para la enzima HhaI y 1 µL de Enzima HhaI.

Incubar en baño maría a 37 °C durante un mínimo de 3 h, pudiéndose prolongar durante toda la noche. Finalizada la digestión, realizar 1 electroforesis en gel de agarosa al 3 %. Aplicar 250 volt por 45 min. Teñir el gel con bromuro de etidio. Interpretación de resultados: banda correspondiente al alelo normal de 228pb, banda correspondiente al alelo mutado de 249pb.

Tabla 2. Características del análisis mutacional en el gen CYP21B

Mutación	Cebadores	Producto de PCR (pb)	Enzima de restricción	Tamaño de los fragmentos(pb)	
				Normal	Mutado
P30L	P5 P6	249	Hha I	21,228	249
Intrón 2	P7 P8	378	Hha I	378	354,24
del 8pb	P9 P10	89	-	89	81
I172N	P11 P2	416	Taq I	416	394,22
G318X	P12 P13	136	Pst I	111,25	136

Mutación intrón 2

Se realiza digestión con la enzima de restricción HhaI del producto de PCR obtenido al amplificar con los cebadores específicos para esta mutación P7 y P8, este último modificado, dando lugar a 1 diana de restricción para la enzima sólo cuando el nucleótido G (mutado) esté presente. Se realiza en tubo *ependorf* de 1,5 mL: 2 µL del producto PCR, 6 µL H₂O estéril, 1 µL del tampón para la enzima HhaI, 1 µL de Enzima HhaI. Incubar en baño maría a 37 °C durante un mínimo de 3 h, pudiéndose prolongar durante toda la noche. Finalizada la digestión, realizar 1 electroforesis en gel de agarosa al 3 %. Aplicar 250 volt por 45 min. Teñir el gel con bromuro de etidio.

Interpretación de los resultados: banda correspondiente al alelo normal de 378pb, banda correspondiente al alelo mutado de 354pb.

Mutación G318X

Se realiza digestión con la enzima de restricción PstI del producto de PCR obtenido al amplificar con los cebadores específicos para esta mutación P12 y P13, ninguno de ellos modificado. Cuando esta mutación está presente, hay una pérdida de la diana de restricción para la enzima. Se realiza en tubo *ependorf* de 1.5 mL: 5 µL del producto PCR, 3 µL H₂O estéril, 1 µL del tampón para la enzima PstI, 1 µL de Enzima PstI.

Incubar en baño maría a 37 °C durante un mínimo de 3 h, pudiéndose prolongar durante toda la noche. Finalizada la digestión, realizar 1 electroforesis en gel de agarosa al 3 %. Aplicar 250 volt por 45 min. Teñir el gel con bromuro de etidio

Interpretación de los resultados: banda correspondiente al alelo normal de 111 pb, banda correspondiente al alelo mutado de 136 pb.

Mutación I172N

Se realiza digestión con la enzima de restricción Taq I del producto de PCR obtenido al amplificar con los cebadores específicos para esta mutación P11, se modifica creando una diana de restricción para la enzima cuando la mutación está presente, y P2. Se realiza en tubo *ependorf* de 1,5 mL:

5 µL del producto PCR, 3 µL H₂O estéril, 1 µL del tampón para la enzima Taq I, 1 µL de enzima Taq I. Incubar en baño maría a 65 °C durante toda la noche. Finalizada la digestión, realizar 1 electroforesis en gel de agarosa al 3 %. Aplicar 250 volt 45 min. Teñir el gel con bromuro de etidio.

Interpretación de resultados: banda correspondiente al alelo normal de 416pb, banda correspondiente al alelo mutado de 394pb.

Mutación exón 3 (delección 8-pb)

Directamente con el producto de PCR obtenido al amplificar con los cebadores específicos para esta mutación P9 y P10 (ver tabla 1), realizar una electroforesis en gel de agarosa al 3 %. Aplicar 250 volt por 1 h. Teñir el gel con bromuro de etidio.

Interpretación de resultados: banda correspondiente al alelo normal de 89pb, banda correspondiente al alelo mutado de 81pb.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 270 muestras analizadas, 57 de ellas correspondieron a padres y hermanas de los afectados y 13 a diagnósticos prenatales. La mutación P30 L, fue detectada en 37 cromosomas, de ellos 3 casos homocigóticos y 31 heterocigóticos. Con la presencia de la mutación intrón 2, aparece un sitio de restricción, fueron detectados 18 casos homocigóticos y 52 casos heterocigóticos para un total de 88 cromosomas con dicha mutación.

La mutación G318X, la cual provoca un codón de parada en el exón 8, provoca que desaparezca el sitio de restricción, estuvo presente en 2 casos en homocigosis y 29 heterocigóticos, para un total de 33 cromosomas positivos para dicha mutación. Fueron detectados 3 casos homocigóticos y 30 casos heterocigóticos, para un total de 36 cromosomas positivos para la mutación delección de 8 pares de bases (del 8pb), que provoca la síntesis de 1 proteína truncada.

La mutación I172N, en la cual para su detección se crea una diana de restricción para la enzima cuando la mutación está presente, fueron identificados 3 casos homocigóticos y 5 heterocigóticos para un total de 11 cromosomas afectados.

En la tabla 3 se presenta la distribución genotípica de las mutaciones G318X, intrón 2, P30L, del 8 pb e I172N en las muestras analizadas. De las mutaciones analizadas, la más frecuente en la muestra estudiada resultó ser intrón 2, seguida por P30L, del 8pb, G318X y I172N respectivamente.

Además, se detectaron 36 casos heterocigóticos compuestos (tabla 4), resultando la combinación más frecuentemente encontrada P30L-del 8 pb-intrón 2.

Se realizaron 13 diagnósticos prenatales a familias que lo solicitaron, las cuales tenían antecedentes con algún hijo previo afectado o por sospecha de algún signo clínico en el ultrasonido, de los cuales 2 resultaron afectados para dicha enfermedad.

Por primera vez se han podido caracterizar molecularmente pacientes afectados con Hiperplasia Adrenal Congénita por déficit de 21 hidroxilasa. Los avances en el desarrollo de la Biología Molecular han ayudado a una mejor comprensión de esta compleja enfermedad de origen genético. La evidente existencia en la actualidad de una elevada mortalidad de varones recién nacidos con pérdida salina no diagnosticados, o diagnosticados tardíamente; un pseudohermafroditismo femenino, que, además de los problemas sociales y psicológicos, obliga a repetidas intervenciones quirúrgicas; y de otras complicaciones, como aceleración de la maduración esquelética con talla corta definitiva, desarrollo precoz de caracteres sexuales secundarios en varones y mayor virilización en niñas, son motivos suficientemente importantes para continuar hoy en día profundizando en la caracterización de esta patología, para facilitar no solo su diagnóstico, sino también su tratamiento precoz.

La estrategia utilizada en este estudio para el análisis directo del gen 21-hidroxilasa ofrece resultados satisfactorios. Con ella se ha detectado la mutación causal en el 45 % de los cromosomas afectados, resultando un comienzo adecuado para el diagnóstico molecular de dicha enfermedad, la cual molecularmente resulta bien compleja.

Más de 200 mutaciones han sido descritas. La gran mayoría de las mutaciones que causan deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa descritas hasta el momento son el resultado de 2 tipos de mecanismos: recombinación asimétrica entre

los genes CYP21B y CYP21A en la meiosis, debido a la gran homología entre los fragmentos duplicados C4A-21A-XA y C4B-21B-XB, de 35 Kb de longitud, que explica el apareamiento incorrecto que tiene lugar entre ellos originando duplicaciones, grandes conversiones génicas y deleciones^(19,20) del gen CYP21B y pseudogen CYP21A; y por otro lado microconversiones génicas^(21,22) que introducen en el gen CYP21B mutaciones puntuales, por transferencia de las mutaciones deletéreas del pseudogen CYP21A, que convierten al gen CYP21B en no funcional. Las mutaciones específicas en el gen dan lugar a una pérdida de la actividad enzimática de la enzima 21-hidroxilasa más o menos severa, que según su grado se puede correlacionar con las distintas formas clínicas.^(23,24) Todas las formas clínicas están asociadas a una anomalía genética.

La mutación más frecuente encontrada en este estudio fue la mutación intrón 2, la cual coincide con lo reportado en otros países,^(25,26) dicha mutación crea un sitio alternativo de procesamiento de ARN y está asociado a la forma severa de la enfermedad, como pudo demostrarse por Espinosa y colaboradores en un estudio reciente donde correlacionó las características clínicas y el genotipo de los pacientes, los cuales se incluyen en este estudio.⁽²⁷⁾

Las mutaciones P30L, del 8pb y G318X, presentaron frecuencias similares. La P30L descrita en las formas no clásicas de la enfermedad y la del 8pb y G318X asociadas a la forma severa, aunque se reporta por un estudio previo que al realizar la correlación del genotipo fenotipo en un grupo de 55 pacientes incluidos en este estudio, no siempre se comportó de esta forma, aunque en la mayoría de los casos se pudo correlacionar el fenotipo y genotipo.

La mutación I172N fue la menos frecuente en la población estudiada, su frecuencia es de alrededor de un 3 %, inferior a lo descrito en otras poblaciones, pero si se comportan en aproximadamente el mismo orden que en otras poblaciones, según la frecuencia descrita en cada una de ellas.⁽²⁸⁾

En general las 5 mutaciones se encuentran con menor frecuencia que en otras poblaciones estudiadas, donde son responsables de más del 60 % de los cromosomas afec-

Tabla 3. Distribución genotípica de las mutaciones G318X, intrón 2, P30L, del 8pb e I172N en las muestras analizadas

Mutaciones	Homocigóticos	Heterocigóticos	Total de casos
G318X	2	29	31
intrón 2	18	52	70
P30L	3	31	34
del 8pb	3	30	33
I172N	3	5	8

Tabla 4. Combinaciones genotípicas en las muestras estudiadas

Mutaciones	Número de casos
P30L- intrón 2-del 8pb-G318X	2
Intrón 2- P30L	2
G318X- de 18pb- intrón 2- P30L	1
Intrón 2-G318X	5
P30L- del 8pb- intrón 2	18
del 8pb- intrón 2	3
P30L- del 8pb	3
Intrón 2- I172N	2

tados por dicha enfermedad, esto pudiera tener diferentes razones y entre ellas pudiera estar un diagnóstico clínico no certero de la enfermedad, ya que en un primer grupo de pacientes estudiados fueron detectadas estas mutaciones en más del 70 % de los cromosomas analizados, también puede estar relacionada con la mezcla racial que existe en nuestra población.

Según los resultados de esta investigación se realizara la incorporación de nuevas tecnologías para la detección de grandes reorganizaciones y la detección de otras mutaciones frecuentes en otras poblaciones.

Conclusiones

Por primera vez en Cuba se pudo caracterizar molecularmente a pacientes con Hiperplasia Adrenal Congénita por deficiencia de 21 hidroxilasa. El análisis directo del gen implicado en la enfermedad permite un diagnóstico más preciso una mejor caracterización de los enfermos y un enfoque más objetivo del tratamiento y la posibilidad de brindarlo en el período prenatal, así como un asesoramiento genético más personalizado. Se recomienda realizar la detección de otras mutaciones frecuente en otras poblaciones como la española e introducir la técnica de MPLA para la determinación de grandes reorganizaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Falhammar H, Wedell A y Nordenstrom A. Biochemical and genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine*. 2015;50(2):306-14.
- Speiser PW, Azziz R, Baskin LS et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21- hydroxylase deficiency: Endocrine Society an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:4133-60.
- Orphanet: una base de datos en línea de enfermedades raras y medicamentos huérfanos [Internet]. Francia: INSERM; 1999 [actualizado 06 diciembre 2023; citado 07 diciembre 2023]. Disponible en: <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin>
- Coto R, Varona J, Borrego J, *et al.* Resultados de la pesquisa de hiperplasia adrenal congénita en recién nacidos. *Rev Cubana Endocrinol*. 2011;37(2):136-46.
- Angoorani H, Haratian Z y Halabchi F. Congenital Adrenal Hyperplasia in an Elite Female Soccer Player; What Sports Medicine Clinicians Should Know about This? *Asian J Sports Med*. 2012;3(3):209-13.
- Miller WL y Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev*. 2011;32(1):81-151.
- Speiser PW y White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med*. 2003;349:776-88.
- Forest MG. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Reprod Update*. 2004;10(6):469-85.
- White PC. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5:490-98.
- Wedell A, Ritzen ME, Haglund-Stengler B *et al.* Steroid 21-hydroxylase deficiency: three new mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:7232-6.
- Tusie-Luna MT, Speiser PW, Dumic M *et al.* A mutation (Pro30Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol Endocrinol*. 1991;5:685-92.
- Owerbach D, Crawford YM, Draznin MB. Direct analysis of CYP21B genes in 21-hydroxylase deficiency using polymerase chain reaction amplification. *Mol Endocrinol*. 1990;4:125-31.
- Amor M, Parker KL, Globerman H *et al.* A mutation in the CYP21B gene (Ile-172 to Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:1600-1604.
- Chiou SH, Hu MC, Chung BC. A missense mutation at Ile-172-Asn or Arg-356Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biol Chem*. 1990;265:3549-52.
- Helmberg A, Tusie-Luna MT, Tabarelli M *et al.* R339H and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid deficiency that are not apparent gene conversion. *Mol Endocrinol*. 1992;6:1318-22.
- Wedell A, Luthman H. Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. *Hum Mol Genet*. 1993;2:459-504.
- Miller WL. Genetics, diagnosis and management of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78:241-46.
- Miller SA, Dykes DD y Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.

19. Morel Y, André J, Uring-Lambert B *et al.* Rearrangements and point mutations of P450c21 genes are distinguished by five restriction endonuclease haplotypes identified by a new probing strategy in 57 families with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Invest.* 1989;83:527-36.
20. White PC, Vitek A, Dupont B, *et al.* Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:4436-40.
21. Harada F, Kimura A, Iwanaga K *et al.* Gene conversion-like events cause steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;85:8091-4.
22. Higashi Y, Tanae A, Inoue H *et al.* Evidence for frequent gene conversion in the steroid 21-hydroxylase P-450 (C21) gene: implications for steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1988;42:17-25.
23. White PC, New MI. Genetic basis of endocrine disease 2: congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;74:6-11.
24. Speiser PW, Dupont J, Zhu D *et al.* Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest.* 1992;90:584-95.
25. Stenson PD, Mort M, Ball EV *et al.* The Human Gene Mutation Database (HGMD®): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. *Hum Genet.* 2020 Oct;139(10):1197-207. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02199-3>. PMID: 32596782; PMCID: PMC7497289.
26. Dracopoulou-Vabouli M, Maniati-Christidi M, Dacou-Voutetakis C. The spectrum of molecular defects of the CYP21 gene in the Hellenic population: variable concordance between genotype and phenotype in the different forms of congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:2845-8.
27. Espinosa Reyes TM, Collazo Mesa T, Lantigua Cruz PA *et al.* Genotype-Phenotype Correlation in Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency in Cuba. *Int J Endocrinol.* 2021 Enero;2021:9316284. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/9316284>. PMID: 33505466; PMCID: PMC7806372.
28. Baş F, Kayserili H, Darendeliler F *et al.* CYP21A2 Gene Mutations in Congenital Adrenal Hyperplasia: Genotype-phenotype correlation in Turkish children. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2009;1(3):116-28.

Recibido: 12/12/2023

Aprobado: 12/01/2024

Agradecimientos

Agradecemos a la Red Nacional de Genética Médica, la cual colaboró con el envío de muestras para la realización de la investigación.

Conflictos de interés

Los autores declaran no presentar conflictos de interés con la investigación presentada.

Contribución de los autores

Conceptualización: Teresa Collazo Mesa, Tania Maibel Espinosa, Paulina Araceli Lantigua Cruz

Análisis formal: Mercedes Arceo Álvarez, Lainet Santos Merencio

Investigación: Teresa Collazo Mesa, Mercedes Arceo Álvarez, Lainet Santos Merencio, Ixchel López Reyes, Marileivi García Heredia, Lidice Reyes, Alejandro Esperón Álvarez

Metodología: Teresa Collazo Mesa

Administración del proyecto: Tania Maibel Espinosa, Teresa Collazo Mesa

Visualización: Teresa Collazo Mesa

Redacción-borrador original: Teresa Collazo Mesa

Redacción-revisión y edición: Teresa Collazo Mesa

Financiamientos

La fuente de financiamiento fue el Ministerio de Salud Pública (MINSAP).

Cómo citar este artículo

Collazo Mesa T, Arceo Álvarez M, Santos Merencio L, Espinosa Reyes TM, González AJ Navarro, López Reyes I et al. Diagnóstico molecular de Hiperplasia Adrenal Congénita por deficiencia de 21 hidroxilasa en pacientes cubanos. *An Acad Cienc Cuba [Internet]* 2024 [citado en día, mes y año]; No(Vol):e1521. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1521>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2023.

