

120
2e7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

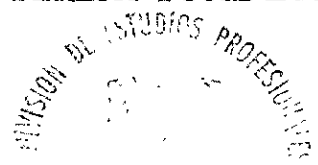
FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS DE MUTACIONES EN PACIENTES CON HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGENITA POR DEFICIENCIA DE LA ENZIMA 21-HIDROXILASA: CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD FENOTIPICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MARIA LUISA ORDOÑEZ SANCHEZ

DIRECTORA DE TESIS:
MARIA TERESA TUSIE LUNA



MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

5
25390



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TITULO:

**Análisis de mutaciones en pacientes con hiperplasia suprarrenal
congénita por deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa: caracterización
molecular de la diversidad fenotípica**

TESIS

Que para obtener el título de:

BIOLOGA

PRESENTA:

Ordóñez Sánchez María Luisa

Directora de tesis: María Teresa Tusié Luna

México D. F.

1998



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

ANÁLISIS DE MUTACIONES EN PACIENTES CON HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGENITA POR DEFICIENCIA DE LA ENZIMA 21-HIDROXILASA: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD FENOTÍPICA.

realizado por MARIA LUISA ORDOÑEZ SANCHEZ

con número de cuenta 3234725-5 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	MARIA TERESA TUSIE LUNA
Propietario	ROSARIO RODRIGUEZ ARNAIZ
Propietario	LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA
Suplente	JUAN PABLO MENDEZ BLANCO
Suplente	SANDRA LUC GOMEZ ARROYO

[Handwritten signatures and stamps]

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

M. en C. Alejandro Martínez Mora
Consejo Departamental de Biología

[Handwritten signature]



DEPARTAMENTO

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL
LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR,
DE LA UNIDAD DE GENETICA DE LA
NUTRICION DEL INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

A mis padres y hermanos por todo lo que me han dado siempre

**Agradezco muy especialmente a mi
directora de Tesis María Teresa
Tusié Luna y a Salvador Gamboa
Cardiel la confianza y el apoyo que
me han brindado**

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION

Hiperplasia suprarrenal congénita	1
Tratamiento	3
Metabolismo de las hormonas esteroides	4
Relaciones estructura función	8
Bases moleculares de la deficiencia 21-hidroxilasa	10
Mutaciones asociadas a las diferentes formas clínicas	12

OBJETIVOS

15

MATERIAL Y METODOS

16

Población de estudio	16
I. Digestión con proteinasa K	17
II. Extracción con fenol	17
III. Southern blot	18
III.1 Marcaje de sonda para Southern blot	20
III.2 Hibridación	21
IV. Síntesis de oligonucleótidos	21
V. Amplificaciones por PCR	23
VI. Gel de agarosa para purificación de DNA	25
VII. Purificación de DNA con la técnica de polvo de vidrio	25
VIII. Secuencia de DNA por el método de Sanger	26
IX. Gel de acrilamida para secuenciación	27
X. Secuenciación de DNA por PCR	27

RESULTADOS

30

Análisis de mutaciones en pacientes con deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa.	30
Identificación de posibles mutaciones nuevas.	31
Identificación de cambios de secuencia que representan posibles polimorfismos.	31
Identificación de pacientes potencialmente portadores de mutaciones nuevas.	32
Identificación de familias donde no existe segregación de la mutación correspondiente en alguno de los padres.	32
Identificación de mutaciones y combinación de mutaciones asociadas a fenotipos particulares.	32

DISCUSION

34

CONCLUSIONES

38

REFERENCIAS

39

RESUMEN

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) es el término aplicado a un grupo de enfermedades autosómicas recesivas de la esteroidogénesis suprarrenal, la cual se caracteriza por alteraciones en la actividad de alguna de las enzimas requeridas para la síntesis de cortisol, el 90% de los pacientes con HSC presentan deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa, debida a mutaciones en el gen CYP21. Este gen se encuentra dentro del complejo mayor de histocompatibilidad HLA en el brazo corto del cromosoma 6, existiendo un pseudogen en esta misma región. La mayoría de las mutaciones descritas en pacientes se encuentran normalmente en el pseudogen.

Este trabajo describe el análisis de mutaciones en 47 familias mexicanas con HSC por deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa. Para identificar las mutaciones puntuales se realizaron amplificaciones por PCR específicas para el gen funcional seguidas de secuenciación directa. Para identificar las deleciones totales del gen se realizó digestión del DNA con enzimas de restricción y Southern blot con una sonda de cDNA completo del gen CYP21. Los resultados más importantes que se desprenden de este estudio son: a) la presencia de relativamente pocas mutaciones o combinaciones de estas asociadas a fenotipos particulares, b) la presencia de mutaciones nuevas, c) la presencia de genotipos idénticos en pacientes con fenotipos discordantes d) la identificación de pacientes que no presentan ninguna de las mutaciones reportadas previamente y e) una aparente alta frecuencia de mutaciones en línea germinal.

INTRODUCCION

Hiperplasia suprarrenal congénita.

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) es el término aplicado a un grupo de enfermedades autosómicas recesivas que son el resultado de una actividad ausente o disminuída de alguna de las cinco enzimas necesarias para la síntesis de gluco y mineralocorticoides en las glándulas suprarrenales, constituyendo uno de los errores innatos del metabolismo más frecuentes en humanos (New 1987, White y New 1992). La deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa (P450_{C21}) se presenta en más del 90% de los pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita (White y New 1992). Esta entidad se manifiesta clínicamente como un síndrome de sintomatología diversa donde se encuentran alteradas la síntesis de aldosterona y cortisol (White et al. 1987).

La incidencia de la forma más severa en la población general se calcula en 1 de cada 14000 recién nacidos (Pang et al. 1988, Miller y Morel 1989) mientras que la forma no clásica está presente en cerca del 2-3% de los Europeos del Este y los Judíos (Speiser et al. 1985).

La fisiopatología de esta entidad es atribuída a la disminución de la síntesis de cortisol con consecuente alteración en la retroalimentación negativa a la hipófisis dando como resultado una excesiva secreción de ACTH. La sobreestimulación en la corteza suprarrenal trae como consecuencia acumulación de precursores esteroideos (principalmente 17-hidroxiprogesterona), (White et al. 1987) (Fig. 1). Estos precursores son desviados a síntesis de andrógenos los cuales causan virilización pre y posnatal de diversos grados. Al nacimiento las mujeres tienen ovarios, trompas de falopio y útero normales con genitales externos masculinizados, dando como resultado errores de asignación de sexo. En hombres, el síndrome es irreconocible al nacimiento. Como consecuencia de la sobreproducción de andrógenos posnatalmente ambos sexos son afectados por crecimiento óseo acelerado con fusión temprana de epifisis y consecuente baja estatura. Otros signos y síntomas de exceso de andrógenos incluyen pubertad precoz, acné e infertilidad (Speiser et al. 1985, White et al. 1987, White y New 1992, Tajima et al. 1993).

En mujeres adultas, el exceso de andrógenos puede manifestarse por acné, amenorrea e infertilidad como consecuencia de ovarios poliquísticos o alteraciones en el eje hipotálamo-

hipófisis-ovarios. En hombres el decremento en la fertilidad puede deberse a oligospermia (New 1987, White et al. 1987).

Existen al menos tres formas clínicas distintas: la perdedora de sal (PS) y la virilizante simple (VS) siendo éstas las más graves y la atenuada o no clásica (Tabla 1).

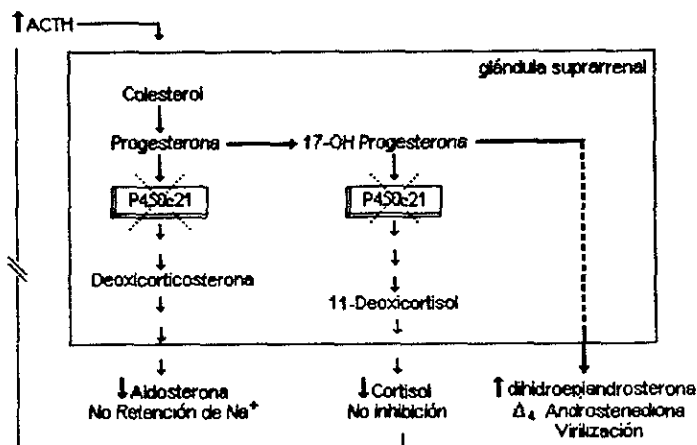


Figura 1. Consecuencias bioquímicas de la deficiencia 21-hidroxilasa.

La deficiencia de 21-hidroxilasa conduce a un decremento en la síntesis de cortisol y aldosterona. Cuando no hay síntesis de cortisol la secreción de ACTH se incrementa y ésta estimula constantemente a la corteza suprarrenal, para producir gluco y mineralocorticoides. Como consecuencia del bloqueo enzimático, los precursores proximales se desvían a síntesis de andrógenos. Este incremento en andrógenos da por resultado virilización. Si además existe deficiencia en la síntesis de aldosterona los pacientes presentan hiponatremia y deshidratación llegando hasta choque hipovolémico y la muerte posnatal.

Características	Forma Clásica	Forma No Clásica
Frecuencia de la enfermedad	Perdedora de sal y Virilizante simple 1:14,000	1:100
Virilización prenatal	Mujeres	No
Virilización posnatal	Hombres y mujeres	Variable
Perdida de sal	60-75%	No
Niveles de 17-hidroxyprogesterona	Gran elevación	Elevación moderada
Después de estimulación con ACTH	(>20,000 ng/dl)	(2000-15,000 ng/dl)

Tabla 1. Comparación de las características de las formas clásica y no clásica de la deficiencia 21-hidroxilasa.

Forma Perdedora de Sal: las síntesis de aldosterona y cortisol se encuentran severamente afectadas, la sobreproducción suprarrenal de precursores de andrógenos ocasionan virilización pre y posnatal, la cual es más evidente en mujeres por presentar ambigüedad genital (Speiser et al. 1992). Los hombres con esta alteración generalmente no son diagnosticados al nacimiento sino hasta la primera crisis hiponatrémica que se presenta en los primeros días o semanas de vida (Miller y Morel 1989).

Las manifestaciones clínicas son hiponatremia (concentración baja de sodio <120 mM), hiperkalemia (concentración alta de potasio >6.5 mM) bajos niveles de aldosterona en suero y elevada excreción de sodio en orina (Kuhnle et al 1986).

Forma Virilizante Simple: en individuos del sexo femenino esta forma clínica se manifiesta con virilización, ambigüedad genital e incremento de concentración de 17-hidroxiprogesterona. Los individuos masculinos con este fenotipo escapan al diagnóstico hasta los 4-7 años cuando presentan pubertad precoz con aparición de vello púbico, axilar y facial además de tener edad ósea avanzada (Miller y Morel 1989). En ambos sexos no se presentan crisis suprarrenales ya que se mantienen los niveles normales de aldosterona.

Forma No clásica: llamada también forma atenuada, esta es la más común. Los síntomas por exceso de andrógenos en ambos sexos son hirsutismo, acné o infertilidad y en mujeres puede presentarse oligomenorrea.

Tratamiento.

Las investigaciones recientes se han enfocado en el tratamiento prenatal de esta enfermedad para prevenir la virilización *in utero* de las mujeres afectadas. El principio de la terapia prenatal consiste en proveer de niveles de glucocorticoides suficientes para suprimir los efectos de la estimulación suprarrenal por corticotropina. Se ha empleado dexametasona debido a que atraviesa fácilmente la placenta. El tratamiento se inicia antes de las 8 semanas de gestación.

En los pacientes recién nacidos se reemplaza la deficiencia de hormonas administrando hidrocortisona o prednisona para suprimir la secreción de ACTH por la pituitaria causando el decremento de andrógenos suprarrenales hasta el rango normal. Los síntomas de exceso de

andrógenos desaparecen en los pacientes con fenotipo perdedor de sal cuando los mineralocorticoides son sustituidos con fludrocortisona oral, a ciertos pacientes se les da una suplementación de sal en la dieta. Los pacientes con fenotipo no clásico son tratados con hidrocortisona.

El control médico que se lleva es por medio de exámenes regulares con atención particular en la velocidad de crecimiento óseo por medio de radiografías.

Aquellos pacientes con ambigüedad genital requieren de cirugía reconstructiva (vaginoplastia, recesión de clítoris o ambos), y en determinados casos es complementado con tratamiento psicológico (White et al. 1987, Kempe et al. 1989).

Metabolismo de las hormonas esteroides.

Las glándulas suprarrenales son dos cuerpos pequeños que se localizan en la parte superior de cada riñón (Fig. 2A) Estas se encuentran divididas en corteza y médula. La corteza suprarrenal consiste histológicamente de 3 zonas distintas: la glomerulosa, la fasciculada y la reticular (Fig. 2B). En el humano en la zona glomerulosa, se producen hormonas mineralocorticoides, en la zona fasciculada se producen glucocorticoides y en la reticular se producen andrógenos. La esteroidogénesis suprarrenal utiliza un grupo de proteínas microsomales P450s y mitocondriales además de la enzima 3β hidroxisteroide deshidrogenasa (3β HSD) que no es un citocromo P450 (Fig. 3) (Finkelstein et al. 1979, White et al. 1987, Hadley 1992).

El cortisol es sintetizado en la zona fasciculada en 5 pasos: El citocromo mitocondrial colesterol desmolasa (P450_{sc}) elimina la cadena lateral del colesterol para producir pregnonolona. Este es el paso limitante en la síntesis de hormonas esteroides ya que es controlada por la disponibilidad del sustrato. Pregnonolona es deshidrogenada en el retículo endoplásmico por la 3β HSD para formar un intermediario (pregnonolona-5-ene-3, 20 diona) la cual pasando por una isomerización con una transferencia de la doble unión de la posición 5-6 a la posición 4-5 forman progesterona, posteriormente ésta, es sucesivamente hidroxilada en las posiciones 17, 21, 11, por P450_{17 α} , P450_{c21}, P450_{11 β} , respectivamente (White et al. 1987, Speiser et al. 1992b).

La vía biosintética para la aldosterona es similar a la del cortisol excepto por la participación de la enzima P450_{17α}, que no se expresa en la zona glomerulosa. Para la síntesis de aldosterona la pregnonolona es convertida a progesterona y entonces sucesivamente es hidroxilada en las posiciones 21 11 y 18 para producir respectivamente deoxicorticosterona, corticosterona y 18 hidroxicorticosterona. La etapa final de la síntesis de aldosterona es la oxidación del grupo 18 hidroxil a un aldehído por una enzima diferente P450_{11β} en la zona glomerulosa que cataliza ambas etapas de hidroxilación de la 18-hidroxicorticosterona (Fig. 3) (Finkelstein et al. 1979, White et al. 1987, Hadley 1992).

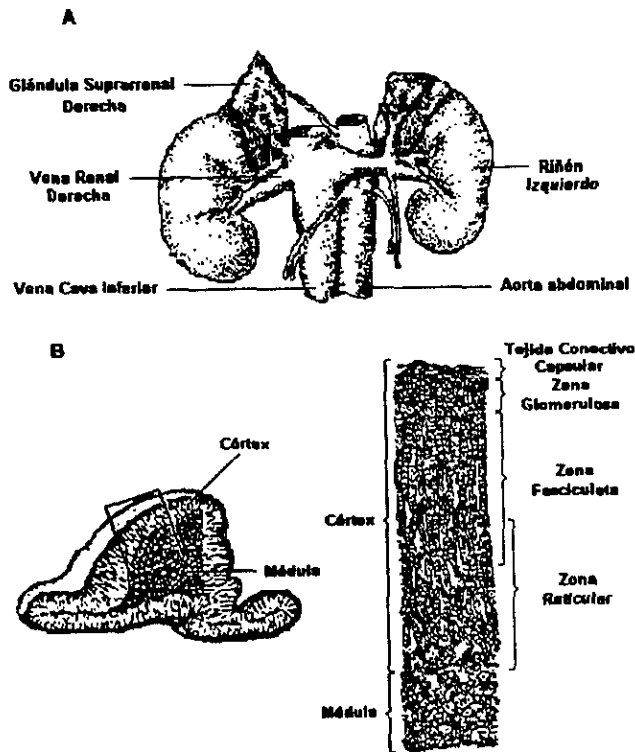


Figura 2. A) Anatomía de las glándulas suprarrenales.
 B) Representación microanatómica de la corteza suprarrenal en humanos.

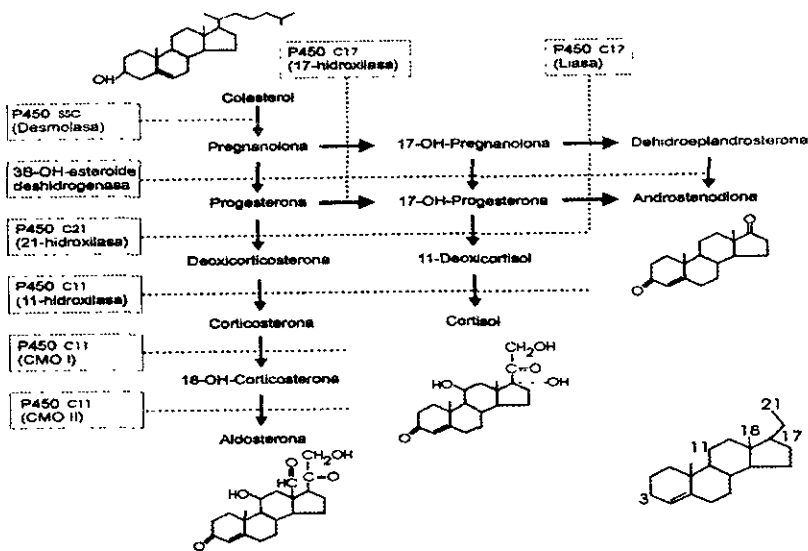


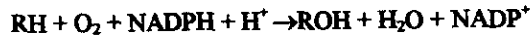
Figura 3. Vía esteroidogénica de la corteza suprarrenal.

El cortisol es sintetizado a partir del colesterol en la zona fasciculada; el colesterol es cortado para formar pregnanolona, la cual después de una deshidrogenación e isomerización forma progesterona. Esta es sucesivamente hidroxilada en las posiciones 17, 21 y 11 para producir cortisol. La aldosterona es sintetizada exclusivamente en la zona glomerulosa donde la enzima P450_{11β} tiene una actividad adicional de 18-hidroxiase y deshidrogenasa sobre la corticosterona para producir aldosterona. En la zona reticular la 17, 20 liasa convierte 17-hidropregnanolona y 17-hidroxiprogesteroa en hidropiandrosterona y androstenediona respectivamente, la cual es convertida a testosterona en tejidos extra-adrenales.

La distribución zonal de la esteroidogénesis ha sido determinada por inmunoquímica en la corteza suprarrenal de cobayo y bovino. Las relaciones de esta distribución en la síntesis de esteroides ha sido establecida a través de la identificación de la actividad de hidroxilasa correspondiente en mitocondrias y microsomas aislados de cada zona. Mientras que algunos P450s esteroidogénicos se ubican sobre la membrana interior de la mitocondria (P450_{scc} y 11β) otros son localizados sobre la membrana del retículo endoplásmico (P450_{17α}, P450_{C21}) (Churchill y Kimura 1979, Menard et al. 1979).

Los citocromos P450 son enzimas que tienen un grupo hemo y se encuentran localizadas en las membranas de retículo endoplásmico o en la membrana mitocondrial de aproximadamente 50 Kd. Están involucrados en el metabolismo de compuestos lipofílicos como esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas, leucotrenos y drogas. Algunos P450 se expresan en el hígado o en el pulmón y son inducidos a niveles altos por una variedad de drogas y otros xenobióticos tales como

fenobarbitales e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Los citocromos deben su nombre al pico de absorción máximo que presentan a 450 nm cuando los complejos enzimáticos se reducen con monóxido de carbono. Las monooxigenasas, oxigenasas o enzimas de función mezclada, catalizan reacciones en las cuales un átomo de oxígeno molecular es transferido al sustrato (R) y el otro es reducido a H₂O.



El sistema de citocromos P450 monooxigenas incluye un citocromo P450 reductasa dependiente de NADPH, el citocromo P450 neutro y un componente fosfolípido de membrana. En el caso de los citocromos P450s mitocondriales proteínas no hemo como la adrenodoxina reductasa son utilizados por la citocromo P450 reductasa. Los electrones de la NADPH son transferidos vía reductasa a la adrenodoxina, la cual transfiere los electrones a una forma férrica oxidada del citocromo P450, la forma ferrosa del P450 entonces activa el O₂ para finalmente hidroxilar el sustrato (Fig. 4). El átomo (Fe⁺³ o Fe⁺²) de la unión no covalente del grupo hemo es coordinado para el tetrapirrol de la porfirina IX. Los nitrógenos pirroles aportan 4 uniones para el hierro en posiciones ecuatoriales, dando dos posiciones axiales para ser llenadas por otros ligandos como O₂, CO₂ o CO.

La primera etapa en el ciclo de la reacción de P450 se determina por la formación del complejo enzima-sustrato. Las características espectroscópicas de este complejo dependen del tipo de sustrato unido; sustratos con los que se enlazan a residuos no polares de aminoácidos del sitio activo que al ser hidroxilados inducen un cambio de banda de espectro a azul con bandas de absorción a 385-390 nm como mínimo y 425-435 como máximo, son los que se denominan de cambio tipo I. Otros tipos de compuestos, los cuales se asume se unen directamente al grupo hemo de hierro, inducen un cambio de banda a rojo y llegan a un máximo de absorción de 425-435 nm y un mínimo de 390-410 nm y se llaman de tipo II; estos compuestos actúan como inhibidores no como sustratos (Ortiz 1986, Ruckpaul y Rein 1989).

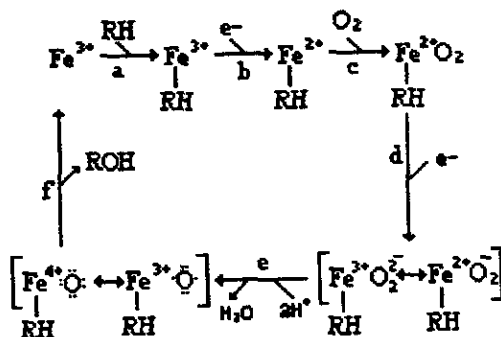


Figura 4. Ciclo de reacción del P450:

- La unión del sustrato (RH) al P450 donde el hierro del hemo está en estado férrico (Fe³⁺)
- Un electrón es transferido del NADPH para reducir el hierro al estado ferroso (Fe²⁺)
- La unión del O₂ al complejo enzima-sustrato
- Un segundo electrón del NADPH es transferido al complejo enzima-sustrato-O₂
- La molécula de oxígeno se adhiere y el átomo de oxígeno es reducido a H₂O
- El sustrato es hidroxilado y es liberado por la enzima como ROH.

Relaciones estructura función.

Diferentes enzimas P450 muestran una pequeña conservación de secuencia. La enzima P450_{C21} en su secuencia de aminoácidos es 28% homóloga a otros P450s, los residuos de aminoácidos hidrofóbicos son los más conservados. Si todos los P450 se derivan de un ancestro común los intrones pudieron ser insertados o movidos durante la evolución de estos genes, hecho que sugiere una relación evolutiva distante con otros P450 ya que sus intrones difieren en número y localización de los otros genes P450 (White 1987). Con base en la presencia de regiones de aminoácidos hidrofóbicos se han propuesto regiones transmembranales, en las que los dos posibles segmentos para unir sustrato están localizados del mismo lado, así como el grupo hemo (Fig. 5A).

Los residuos de aminoácidos muy conservados que realizan funciones específicas se relacionan con una cisteína localizada en la posición terminal de todos los P450s (Cis-428 en P450_{C21}), la cual se propone para unir al grupo prostético hemo. El área alrededor de esta cisteína está relativamente bien conservada (6 residuos a cada lado). El extremo amino terminal es un dominio hidrofóbico que se encuentra muy conservado en los citocromos P450s especialmente una prolina (Pro-30) (Hu et al 1996).

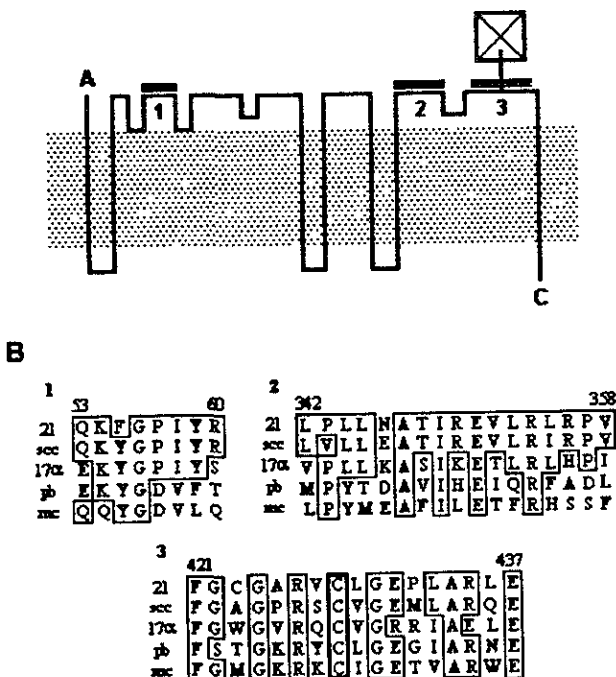


Figura 5. Representación esquemática del P450_{C21}

A) Esta proteína se encuentra dentro de la membrana del retículo endoplásmico indicada por el área punteada. Algunos segmentos transmembranales, de 16 residuos hidrofóbicos y neutros y otros segmentos intramembranales los cuales son demasiado pequeños para atravesar la membrana. Se marca el grupo amino (A) y carboxil terminal (C). El grupo prostético hemo está representado por el cuadro con la cruz. Las tres áreas de mayor interés son marcadas con barras y numeradas. **B)** Se muestran las secuencias de aminoácidos de esas áreas y se comparan con áreas homólogas en otras 4 enzimas: 17-hidroxilasa suprarrenal bovina (17 α), enzima suprarrenal bovina que corta la cadena lateral del colesterol (scc), P450 hepático de ratón inducido por fenobarbital (pb); P450 hepático humano inducido por hidrocarburos policíclicos (mc). Los residuos iguales se marcan en cajas. El inicio y final de las áreas de cada una de las regiones conservadas se numeraron. El residuo cisteína remarcado en la tercera región conservada se ha propuesto como importante para el grupo funcional hemo. Las secuencias son: A alanina, C cisteína, D ac. aspártico, E ac glutámico, F fenilalanina, G glicina, H histidina, I isoleucina, K lisina, L leucina, M metionina, N asparagina, P prolina, Q glutamina, R arginina, S serina, T treonina, V valina, W triptofano, Y tirosina.

Los P450 de la corteza suprarrenal involucrados en la síntesis de esteroides parecen ser específicos a su sustrato. La colesterol desmolasa (P450_{scc}), la 17 α hidroxilasa (P450_{17 α}) y la 21 hidroxilasa (P450_{C21}) actúan sobre las posiciones adyacentes de la molécula esteroide. Las posibles regiones de unión a esteroides muestran un alto grado de conservación comparado con regiones homólogas de enzimas P450 que no usan esteroides como sustrato. Para determinar si tales regiones de unión pueden ser identificadas, se han comparado la enzima P450_{C21} humana, la

P450_{sc} bovina, y la P450_{17 α} suprarrenal bovina, la enzima P450 hepática de ratón inducida por fenobarbital y la P450 hepática humana inducida por hidrocarburos policíclicos. Estas presentan una homología entre sí de 23-33% en su secuencia de aminoácidos (Fig. 5b). Se encuentran tres regiones de secuencia como las más conservadas, una incluye los aminoácidos del 53 al 60 en P450_{C21} en la colesterol desmolasa (P450_{sc}) se encuentran 7 residuos conservados y 6 en la P450_{17 α} pero sólo tres residuos con las enzimas hepáticas, la segunda área conservada se ubica entre los residuos 342 al 358 donde se conservan 10 residuos con P450_{17 α} , y 15 residuos con P450_{sc}. La tercera zona se encuentra alrededor de la cisteína (428 en P450_{C21}) en la cual entre 7 y 18 residuos son los conservados (White 1987).

Bases moleculares de la deficiencia 21-hidroxilasa.

El gen que codifica para la enzima 21-hidroxilasa (CYP21) es un citocromo microsomal P450 que interviene en la síntesis de glucocorticoides y mineralocorticoides y se expresa únicamente en la corteza suprarrenal. Está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p23) dentro de la región que codifica para el sistema de la clase III del complejo principal de histocompatibilidad (HLA) (Fig. 6a). Este gen tiene una longitud de 3.4 kb aproximadamente, y contiene 10 exones y 9 intrones. (White et al. 1986, Higashi et al. 1986, Rodrigues et al. 1987).

Además del gen funcional que codifica para la enzima 21-hidroxilasa (CYP21) existe un pseudogen (CYP21P). Estos dos genes se encuentran adyacentes y entre cada uno de ellos se localizan los genes C4A y C4B que codifican para el factor cuatro del complemento sérico (White et al. 1985, White et al. 1986, Higashi et al. 1986). El gen y el pseudogen tienen un 98% de homología en la región codificadora y un 96% en los intrones (Rodrigues et al. 1987).

Existen varias diferencias entre el gen y el pseudogen que hacen inactivo a este último. El pseudogen tiene una delección de 8 pares de bases en el exón 3 (GAGACTAC) (White et al. 1988), una inserción de una base en el exón 7 (Mornet et al. 1991) y un cambio de base en el exón 8 (CAG \rightarrow TAG), estos cambios generan terminaciones prematuras del gen. Además se encuentran otros cambios como el localizado en intrón 2 (A \rightarrow G) que afecta el procesamiento del RNA

mensajero y 3 cambios en el exón 6 (T → A 1380, 1383, 1389) (Higashi et al. 1986, White et al. 1986). Además de un cambio de base en el exón 4 (ATC → AAC) (Amor et al. 1988).

La mayoría de las mutaciones que se han identificado en el gen CYP21 en pacientes con la deficiencia 21-hidroxilasa se localizan normalmente en el CYP21P (Fig. 6b). Por esta razón se ha propuesto que la presencia de eventos de entrecruzamiento ilegítimo entre ambos genes durante la meiosis dan como resultado deleciones o duplicaciones del gen, mientras que eventos de conversión génica traerían como resultado la transferencia de mutaciones puntuales (Higashi et al. 1988a). Los alelos que tienen mutaciones puntuales son los más frecuentes en pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa representando dos terceras partes de los alelos mutantes en todas las poblaciones estudiadas hasta ahora (Morel et al. 1989, Speiser et al. 1992, Wilson et al. 1995a). Se han descrito mutaciones que no se encuentran en el pseudogen y cuyo efecto sobre la actividad de la enzima ha sido demostrado a través de ensayos de expresión (Helmberg et al. 1992, Nikoshkov et al. 1997).

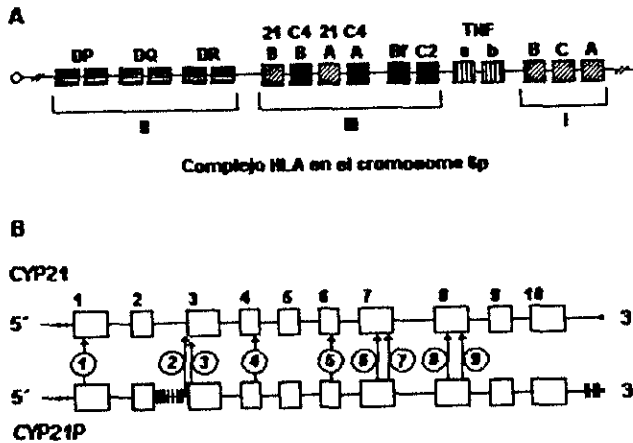


Figura 6. Arreglo de genes en el complejo principal de histocompatibilidad HLA sobre el brazo corto del cromosoma 6. A) El centrómero está representado por un círculo; grupos designados por números romanos indican los genes de las clases del complejo de histocompatibilidad; los genes 21B (CYP21) y 21A (CYP21P) están localizados en la región III alternados con 2 genes que codifican para el cuarto componente del complemento sérico (C4B y C4A). TNF son los genes del factor de necrosis tumoral. B) Sitios de cambio de secuencia entre el pseudogen y el gen activo que causan deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa. Están marcadas con números en círculo: 1) exón 1 Pro30, 2) intrón 2, 3) exón 3 deleción de 8 pb, 4) exón 4 Ile172, 5) exón 6 mutaciones en cluster, 6) exón 7 Val281, 7) exón 7 inserción de T, 8) exón 8 Gln318, 9) exón 8 Arg356. Otras líneas verticales representan diferencias entre los genes que parecen no alterar la actividad de la enzima.

Algunas mutaciones que se han identificado en los pacientes han sido estudiadas a través de ensayos de expresión como son: la mutación en exón 7 Val281 → Leu cuyo efecto es una actividad del 20-50%, la mutación en el exón 4 Ile172 → Asn tiene una actividad residual del 2% (Speiser et al. 1992), la mutación en "cluster" del exón 6 Ile-Val-Met → Asn-Glu-Lis, resulta en una enzima inactiva (Tusié et al. 1990). La mutación Pro30 → Leu resulta en una proteína con el 30% de la actividad normal (Tusié et al. 1991), la mutación Pro453 → Ser reduce la actividad de la enzima hasta un 50% para hidroxilar 17-hidroxiprogesterona y un 20% de lo normal para metabolizar progesterona (Helmberg et al. 1992).

Mutaciones asociadas a las diferentes formas clínicas.

Se conocen 17 mutaciones distintas (Fig. 7) entre las que se encuentran deleciones parciales o totales del gen, mutaciones que afectan el procesamiento del RNA (Higashi et al. 1988a, Lajic y Wedell 1997) mutaciones puntuales que cambian un aminoácido por otro (Tusié et al. 1991) y mutaciones que generan codones de terminación (Higashi et al. 1988b, Tusié et al. 1990, Speiser et al. 1992, Lajic y Wedell 1997). Para la mayoría de las mutaciones se conocen las frecuencias alélicas en los pacientes, como se muestra en la tabla 2.

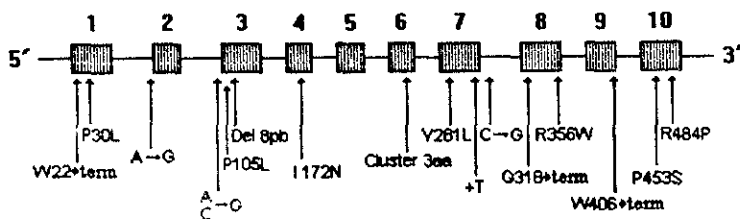


Figura 7 Gen funcional CYP21 donde se indican las 16 mutaciones puntuales incluyendo la deleción de 8 pb reportadas en la literatura y su localización dentro del gen. Las mutaciones Trp22 → codón terminación, Pro105 → Leu, A → G en intrón 1, y Arg484 → Pro no se analizaron en esta tesis.

	Mutación	frecuencia reportada (%)	Referencias
E1	Trp22 → terminación	NR	
E1	Pro30 → Leu	17*	(Tusié et al. 1991)
I 1	A → G	NR	
I 2	A C → G	26 - 42	(Higashi et al. 1991, Owerbach et al. 1990, Wilson et al. 1995a)
E3	Pro105 → Leu	NR	
E3	Del 8 pb	7.5 - 10	(Wilson et al. 1995a, Carrera et al. 1996)
E4	Ile172 → Asn	7.5 - 10	(Higashi et al. 1991, Wilson et al. 1995a)
	Ile236 → Asn		
E6	Val237 → Glu	3	(Higashi et al. 1991)
	Met239 → Lis		
E7 ₁	Val281 → Leu	10.6	(Wilson et al. 1995a)
E7 ₂	inserción de T	1	(Higashi et al. 1991, Speiser et al. 1992)
I 7	C → G	NR	
E8 ₁	Gln318 → Terminación	3-7	(Globerman et al. 1988, Owerbach et al. 1990)
E8 ₂	Arg356 → Trp	14	(Carrera et al. 1996, Higashi et al. 1991)
E9	Trp406 → terminación	NR	
E10	Pro453 → Ser	NR	
E10	Arg484 → Pro	NR	
Del	Delección del gen CYP21	11 - 35	(Wilson et al. 1995a, Araujo et al. 1996, Owerbach et al. 1990)

Tabla 2. Frecuencias alélicas reportadas para cada mutación analizada. (*) para esta mutación la frecuencia alélica solo ha sido reportada en pacientes con el fenotipo No Clásico. NR indica que no se han reportado frecuencias alélicas.

Distintas mutaciones se han asociado frecuentemente con determinados fenotipos:

Para la forma perdedora de sal, las mutaciones que frecuentemente se asocian son aquellas que inhiben completamente la síntesis de la proteína o dan como resultado una proteína inactiva, entre éstas se incluyen: a) las delecciones parciales o totales del gen CYP21, b) la mutación del intrón 2 que se localiza 13 bases antes de comenzar el exón 3. Esta mutación afecta el procesamiento del RNA mensajero y es la que se encuentra con más frecuencia en pacientes con esta entidad (Higashi et al. 1988b, Higashi et al. 1991), c) mutaciones que afectan el marco de lectura traduccional y que generan codones sin sentido como la delección de 8 pares de bases en el exón 3, el cambio en el exón 8 Glu318 → codón de terminación y el "cluster" en el exón 6 (Globerman et al. 1988, Tusié et al. 1990, Speiser et al. 1992). Una mutación puntual que cambia un aminoácido por otro en el exón 8 (Arg356 → Trp) situado en el sitio probable de unión a sustrato (Tusié et al. 1990, Chiou et al. 1990).

La forma virilizante simple ha sido asociada con la mutación de Ile172 → Asp localizada en exón 4 (Tusié et al. 1990, Chiou et al. 1990).

La forma no clásica se ha asociado con la mutación de Val281 → Leu en exón 7 (Speiser et al. 1988, Speiser et al. 1992), la mutación Pro30 → Leu localizada en el exón 1 (Tusié et al. 1990, Tusié et al. 1991) y una mutación en exón 10 Pro453 → Ser (Helmberg et al. 1992).

Distintos reportes sugieren que hasta un 45% de los pacientes son heterocigotos compuestos y aproximadamente un 20% de todos los alelos en pacientes tienen más de una mutación, sugiriendo que el rango tan amplio en la expresión fenotípica es debida a la alta heterogeneidad de los alelos mutantes (Speiser et al. 1992, Wedell y Luthman 1993a, Wilson et al. 1995b).

OBJETIVOS

Determinar el tipo y la frecuencia de las distintas mutaciones puntuales reportadas en otras poblaciones, en un grupo de 47 pacientes mexicanos no relacionados portadores de deficiencia de 21-hidroxilasa.

Identificar posibles mutaciones y polimorfismos nuevos en la población mexicana.

Determinar la frecuencia de esos cambios de secuencia en nuestra población de estudio.

Identificar pacientes con posibles mutaciones en la región reguladora del gen a través de identificar aquéllos con mutaciones idénticas en la región codificadora que presenten fenotipos discordantes.

Determinar la frecuencia de posibles mutaciones de línea germinal entre las familias de estudio.

Establecer las bases para el diseño y la implementación de un método diagnóstico para la identificación de las mutaciones responsables de esta entidad, en familias afectadas que sean captadas en el futuro.

MATERIAL Y METODOS

Nuestra población de estudio fue captada de tres centros hospitalarios del Distrito Federal: el Instituto Nacional de Pediatría (INP), el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán y el centro médico "La Raza" del IMSS. Los pacientes son originarios de 18 estados de la república (Coahuila, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sinaloa, San Luis Potosí, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas). La edad al diagnóstico varía desde un día de nacido (pacientes con fenotipo perdedor de sal) hasta los 21 años (pacientes con fenotipo no clásico), teniendo un total de 34 mujeres y 13 hombres.

Se analizaron un total de 47 pacientes no relacionados con deficiencia 21-hidroxilasa. 21 perdedores de sal, 23 virilizantes simples y 3 no clásicos. Estos fueron diagnosticados de acuerdo a los siguientes criterios: Los pacientes con virilización de genitales externos, presencia de hiponatremia, hipercalemia, vómito y crisis suprarrenal se diagnosticaron como portadores del fenotipo perdedor de sal; pacientes con virilización de genitales externos, crecimiento óseo acelerado, aparición prematura de vello sexual e hiperpigmentación se clasificaron con la forma virilizante simple, los pacientes con fenotipo no clásico presentaban hirsutismo y acné. Además se les determinó niveles de dihidroepiandrosterona y cortisol en orina y suero y de testosterona y 17-hidroxiprogesterona en suero (Kempe et al. 1989).

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de los pacientes y de ambos padres (cuando estuvieron disponibles). El DNA fue extraído por el método de digestión proteínasa K/SDS seguida del protocolo por extracción de fenol (Speiser et al. 1992). Para el análisis de las diferentes mutaciones la metodología se dividió en dos partes; una para detectar las deleciones totales del gen CYP21 (análisis de hibridación por Southern blot) y la otra para determinar las mutaciones puntuales (secuenciación directa del gen).

I. Digestión con proteinasa K.

1. Colectar 5-20 ml de sangre periférica en un tubo falcon de 50 ml que contenga 100µl de EDTA al 15% a pH 8
2. Congelar a -80° C
3. Descongelar la sangre con el fin de lisar las células, agregar amortiguador TE 10/10 frío hasta llegar a un volumen de 50 ml
4. Mezclar y colocar 5 min a 4° C
5. Centrifugar 10 min a 3000 rpm
6. Desechar sobrenadante. Estos pasos se repiten cuantas veces sea necesario (en este paso se rompen por lisis térmica los eritrocitos y se limpia la muestra de hemoglobina)
7. El botón obtenido se resuspende en 2 ml de amortiguador TE 10/5
8. Adicionar 40µl de proteinasa K (10mg/ml), adicionar 100µl de SDS al 10% y mezclar
9. Incubar a 37° C toda la noche. La solución es transparente y viscosa
10. Guardar a 4° C hasta continuar el proceso

II. Extracción con fenol.

1. Añadir volúmenes iguales de fenol y mezclar en agitador por 1-2 horas
2. Centrifugar por 30 min a 3000 rpm para separar las fases
3. Transferir la fase acuosa superior a un tubo de 50 ml de centrifuga (esta fase contiene el DNA)
4. Añadir un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1) y mezclar
5. Centrifugar 30 min a 3000 rpm para separar las fases
6. Transferir la capa superior acuosa a un tubo de centrifuga nuevo
7. Agregar 0.5 volumen de acetato de amonio 7.5 M
8. Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto frío y mezclar (el DNA se precipita como fibras blancas)
9. Centrifugar 30 min a 3000 rpm
10. Aspirar el sobrenadante y agregar 2 ml de etanol al 70%
11. Centrifugar 30 min a 3000 rpm

12. Quitar el sobrenadante

13. Resuspender el DNA en un ml de agua bidestilada

14. Las muestras de DNA se cuantificaron en espectrofotómetro: 5µl de las muestras y 500µl de agua bidestilada a una longitud de onda de 260 nm

$$[\text{DNA}] = \text{DO} \times \text{FD} \times \text{F DNA} = \text{ng}/\mu\text{l}$$

[DNA] = [concentración de DNA]

Densidad Optica= DO

Factor de Dilución=FD

Factor DNA Doble cadena=F DNA.

III. Southern blot.

Para realizar la hibridación se digirió el DNA con las enzimas de restricción TaqI y Bgl II (USB). El patrón normal de bandas que se obtiene después de la digestión con endonucleasas de restricción Taq I y Bgl II permite distinguir entre el gen y el pseudogen

Empleando la enzima Taq I obtenemos 4 bandas: 2 que corresponden al gen (3.7 y 2.5 Kb) y 2 al pseudogen (3.2 y 2.4 Kb). Con la enzima Bgl II identificamos dos bandas correspondiendo la de 10 Kb al gen funcional y la de 12 Kb al pseudogen (White et al. 1985, White et al. 1988, Morel et al. 1989)

La mezcla de reacción es la siguiente:

Agua Amortiguador 10X DNA	6µl 5 µg/µl
Enzima Taq I ó Bgl II 15 U/µl	2 U/mg de DNA
volumen total 60µl	

1. Incubar a 37° C toda la noche
2. Al término agregar 20µl de acetato de sodio y 500µl de etanol frío
3. Incubar 2 horas a -70° C
4. Centrifugar 30 min a máxima velocidad, eliminar el sobrenadante
5. Agregar 100µl de etanol al 70%
6. Centrifugar 5 min a máxima velocidad, retirar el sobrenadante

7. Se resuspende en 20µl y se le agregan 5µl de amortiguador de cargado (azul de bromofenol 0.25%, cianol-xileno 0.25% y de glicerol 30%) para cargarlo en el gel de agarosa
8. El gel que se emplea es de agarosa-HE al 1% corrido en cámara horizontal con amortiguador de corrida TAE 1X (Tris-base 0.04M, EDTA 0.002M, ácido acético glacial) preparado de la siguiente manera:

Agua	196 ml
Agarosa-HE	2 gr
Amortiguador TAE 50X	4 ml
Bromuro de etidio 10mg/ml	10µl

Colocar en un matraz Erlenmeyer de 500 ml la agarosa, el agua y el amortiguador TAE

Calentar 3 min en horno de microondas

Agitar hasta que esté tibio y agregar el bromuro de etidio

Vaciar la mezcla en la cámara

9. El marcador de peso molecular que se utiliza es el DNA de fago lambda digerido con Hind III
10. El gel se corre durante 16 horas a 35 volts
11. Sacar el gel y ponerlo en una charola con solución HCl 0.25M por 30 min con agitación
12. Eliminar la solución y adicionar una solución de desnaturalización (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) por 30 min con agitación (2 veces)
13. Quitar solución y agregar solución de neutralización (1.5M NaCl, 0.5M tris-HCl pH. 7.2, 0.001M EDTA) por 30 min con agitación (dos veces)
14. Preparar la charola para la transferencia por capilaridad con solución 20X SSC (3M NaCl, 0.3M citrato de sodio) papel 3MM de un tamaño menor que el gel y uno más grande y la membrana de nylon
15. Se coloca el gel en una base dentro de la charola con el papel filtro grande abajo, luego el gel, la membrana nylon y los papeles filtro; al final algo pesado para ejercer presión, se cubre con plastipac para evitar la evaporación del amortiguador y se deja de 24 a 36 horas
16. Se desmonta la transferencia y la membrana nylon se pone en una solución 2X SSC por 30 min en agitación

17. Al término se saca y aún húmeda se coloca entre dos papeles filtro y se irradia con luz ultravioleta utilizando un aparato de crosslinking (1 min, 1200 μ joules, Stratagene) para fijar permanentemente el DNA a la membrana
18. Se coloca en el horno a 115° C por 1.5 horas, para asegurar el proceso de fijación de DNA
19. Se lava en 500ml de solución de 0.1X SSC/0.5% SDS a 65° C durante 30 min con agitación
20. La membrana de nylon húmeda se coloca en una bolsa de plástico tipo seal-A-meal, la cual se sella

III.1 Marcaje de la sonda.

El marcaje radiactivo de la sonda se lleva a cabo con el kit Random Primed DNA labeling. La sonda que se utiliza es el cDNA completo de la 21-hidroxilasa, el cDNA se encuentra dentro de un vector tipo pUC13 con sitios BamHI en los extremos. Se utiliza el fragmento cortado con BamHI y purificado con polvo de vidrio en un gel de agarosa

1. Se toman 10 μ l (3 μ l de la sonda y 7 μ l de agua), aproximadamente 30 ng de DNA y se calienta a 95° C por 5 min
2. Colocarla en hielo y dar un pulso
3. Adicionar 1 μ l de cada dNTP (G, A, T); 2 μ l de amortiguador de reacción, 1 μ l de enzima Klenow y 5 μ l P³² α CTP (3000 Ci/mmol)
4. Mezclar e incubar a 37° C una hora
5. Al término de la incubación tomar 1 μ l de la mezcla en un tubo ependorf de 1.5ml y agregarle 99 μ l de agua (1:100) y seguir incubando el resto
6. De la mezcla 1:100 tomar 5 μ l y colocarlos en papel Whatman DAE8, secar con aire y lavar 3 veces con solución de fosfatos 0.5M de 5 min cada lavado, lavar con agua 2 min, sumergir en etanol, secar y depositarlo en un frasco con 10 ml de líquido de centelleo (tritosol) para obtener las cuentas específicas y calcular el porcentaje de incorporación
7. De esta misma mezcla tomar otros 5 μ l y colocarlos en papel Whatman, secar con aire y ponerlo en un tubo con 10 ml de líquido de centelleo (tritosol) para obtener las cuentas totales
8. Los tubos se cuentan en un contador de líquido de centelleo para conocer la eficiencia del marcaje (se obtiene un 40% de incorporación) La sonda marcada se guarda a -20° C

III.2 Hibridación.

1. A la membrana de nylon se le agregan 20 ml de la solución de prehibridación (formamida 50%, SDS 1%, Denhart's 5X, SSC 5X, fosfatos 0.05M) con 200µg/ml de DNA de esperma de salmón previamente hervido 10 min y puesto a 4° C
2. Se sella la bolsa y se incuba a 42° C por 8 horas
3. Quitar la solución de prehibridación y agregar 18 ml de solución de prehibridación a 65° C, 2% dextrán-sulfato y la sonda marcada a la cual se le agregan 200µg/ml de DNA de esperma de salmón y se hierve a 96° C por 10 min
4. Sellar la bolsa y dejar a 42° C agitando toda la noche
5. Al día siguiente se elimina la solución y se procede a los lavados
6. Colocar la membrana en una charola y lavarla 20 min a temperatura ambiente y agitación con 400 ml de solución SSC 2X, SDS 0.5% dos veces
7. Se lava 20 min a temperatura ambiente y agitación con 400 ml de solución SSC 0.5X, SDS 0.5%
8. Se lava 20 min a 37° C y agitación con 400 ml de solución SSC 0.5X, SDS 0.5%
9. Se lava 20 min a 42° C y agitación con 400 ml de solución SSC 0.25X, SDS 0.5%
10. Se lava 20 min a 42° C y agitación con 400 ml de solución SSC 0.1X, SDS 0.5%
11. La membrana se envuelve en plastipac y se expone a una placa de autorradiografía por 2 días y se revela
12. El análisis densitométrico de las autorradiografías se llevó a cabo con el sistema Ambis 4000

IV. Síntesis de oligonucleótidos.

1. Se diseñaron pares (sentido y antisentido) de oligonucleótidos específicos para las amplificaciones por PCR del gen CYP21 y para la secuenciación con ayuda del programa Oligo 4.0. Los oligonucleótidos empleados para secuenciar se diseñaron para que estuvieran a una distancia de 50 a 70 bases del sitio de la mutación que se analizó. Todos los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 3

2. El gen se amplificó en varios segmentos, el diseño de los oligonucleótidos de amplificación se llevo a cabo tomando en cuenta las diferencias que hay entre gen y pseudogen como se muestra en la figura 8
3. La síntesis de los oligonucleótidos se realizó con el sintetizador Oligo 1000 de Beckman.
4. La determinación de la concentración se llevó a cabo por espectrometría de forma semejante a la cuantificación del DNA genómico
5. Para corroborar que los oligonucleótidos sintetizados fueran del peso molecular deseado y libres de productos de menor peso molecular se corrieron en un minigel de acrilamida al 20% por una hora a 100 volts con amortiguador TBE 0.5X (Tris-base 0.045 M, EDTA 0.001M, ácido bórico 2.75%) con el siguiente protocolo:

Acrilamida-bisacrilamida 30%(29:1)	5ml
Urea	5gr
Amortiguador TBE 10X	1ml
Agua	1ml
Persulfato de Amonio 10%	25µl
TEMED	10µl

- a) En un vaso de precipitados de 100 ml se disuelve la acrilamida-bis, la urea, el amortiguador y el agua
- b) Cuando esté bien disuelta la urea se agrega el persulfato de amonio y el TEMED
- c) Colocar la mezcla en los vidrios, esperar a que polimerice y cargar los oligonucleótidos, 3µl del oligonucleótido con 5µl de amortiguador de terminación (95% formamida, 20mM EDTA, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% cianol-xileno) para el gel de secuencia y un oligonucleótido control para verificar el peso molecular
- d) Al terminar la corrida se revisa el gel con luz ultravioleta (los oligonucleótidos se observan como bandas color café)

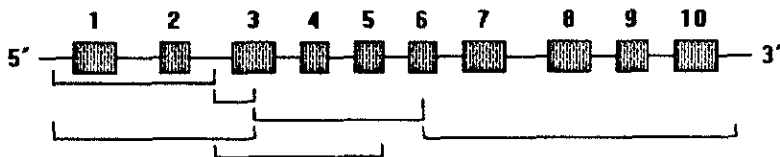


Figura 8. Esquema del gen CYP21 donde se muestran los fragmentos en los que se amplificó por PCR tomando en cuenta las diferencias de secuencia que hay entre gen y pseudogen para hacer la amplificación específica al gen CYP21.

		<u>Localización</u>	<u>Uso</u>
1	5' GTGGGAGGGT <u>ACCTGAAG</u> 3'	5's	PCR y SEC
2	3' CCTGCTTTCTCC <u>CCACCA</u> 5'	I2a	PCR
3	5' ATCTGGTGGGAGAAAGC 3'	I2s	PCR y SEC
4	3' AGAGCAGGGAGTAGTCTC 5'	E3a	PCR
5	5' CTGTCCTTGGGAGACTAC 3'	E3s	PCR
6	3' CCTGAGAAAGGGAATCACGTC 5'	E5a	PCR
7	3' CTGCATCTCC <u>ACGATGTGAT</u> 5'	E6a	PCR
8	5' AGGGATCACATCGTGGAGAT 3'	E6s	PCR
9	3' CGGGGAGGTTGGTTGAGTGCT 5'	3'a	PCR
10	5' ATGATCCTCCCACCTCAG 3'	I2s	SEC
11	5' CACTGTTTCTCCACAGCGCAT 3'	I3s	SEC
12	5' CTCCTTTCACCCTCTGCA 3'	I6s	SEC
13	5' TGGGTTGCTGAGGGAGCG 3'	I7s	SEC
14	5' AGCAGGTGACTCCCGAGG 3'	I8s	SEC
15	5' TGAAAATGTGGTGGAGGC 3'	I9s	SEC
16	5' CCACTGCAGTGTCATCCT 3'	E10s	SEC
17	5' AAGAACTCCAGAGCTCTG 3'	E10s	SEC

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación y secuenciación del gen donde se indica la localización en el gen y su uso. Las bases subrayadas indican las bases que dan la especificidad de amplificación del gen.

V. Amplificaciones por PCR.

Con los oligonucleótidos sintetizados previamente se lleva a cabo la amplificación con el kit de PCR Ampligene de Perkin-Elmer. Los PCRs se corren con controles de agua y DNA de dos distintos cósmidos que contienen el gen y el pseudogen. La mezcla de amplificación fue la siguiente:

Concentraciones iniciales	Volumen	Concentraciones finales
Agua	29 ml	
Amortiguador de reacción 10X	5µl	1X
MgCl 25mM	3µl	1.5mM
dNTPs 10mM	1µl	2mM
Formamida 100%	1.5µl	3%
Oligos 50 ng/µl	0.5µl	1ng
Taq Pol 5U/µl	0.5µl	0.05 U
Albúmina 0.1mg	5µl	0.01mg
DNA	5µl	0.5-1 µg
volumen total	50µl	
aceite mineral	60µl	

con el siguiente programa de amplificación:

E1	94° C	3 min
E2	94° C	1 min
E3	58-63° C*	1.5 min
E4	72° C	3 min
40 ciclos a partir de la etapa 2		
E5	4° C	

* La temperatura de alineamiento depende de las T_m (temperatura de separación) de los pares de oligonucleótidos empleados

La temperatura de alineamiento seleccionada fue la siguiente:

Región	T _m	Oligonucleotidos empleados
5' a I2	62° C	1, 2
I2 a E3	58° C	3, 4
E3 a E6	61° C	5, 7
E6 a 3'	63° C	8, 9
5' a E3	58° C	1, 5
I2 a E5	59° C	3, 6

Para analizar la mutación que se encuentra en el intrón 2 se amplificó esta región con diferentes pares de oligonucleótidos (1,4; 3,6; 3,4) (ver sección discusión)

VI. Gel de agarosa para purificación de DNA (remoción de los oligonucleótidos de amplificación).

Se procede a purificar los fragmentos de PCR deseados y ésto se hace por medio de un gel de agarosa 1% preparado como se indica en la parte III inciso 8 corrido con amortiguador TAE 1X en una cámara horizontal de electroforesis a 80 volts por 1.5 horas

1. Las muestras se colocan en el gel con 5µl de amortiguador de cargado y un marcador de peso molecular (DNA de ϕ X174 digerido con HincII ó DNA de fago lambda digerido con HindIII)
2. Al término de la corrida se revisa el gel en el transiluminador de luz ultravioleta y con una espátula se corta la banda deseada colocándola en un tubo ependorf de 1.5 ml

VII. Purificación de DNA con la técnica de polvo de vidrio.

Para esta metodología empleamos el kit USBioclean

1. Agregar al tubo que contiene la banda de agarosa con el DNA, 500µl de la solución NaI 6M
2. Incubar a 55° C el tiempo necesario para que la agarosa se funda
3. Incubar 1 min a 4° C
4. Agregar 10µl de la suspensión de polvo de vidrio (bien mezclada). Incubar en hielo 15 min
5. Centrifugar a máxima velocidad por tres min. Desechar el sobrenadante con una pipeta de punta adelgazada
6. Lavar el botón con 700µl de la solución de lavado a -20° C (0.2 M Tris-HCl pH 7.5, 1.0 M NaCl, 20mM EDTA, etanol 50%), centrifugar por 3 min a máxima velocidad y desechar sobrenadante. Este paso se repite tres veces
7. Agregar 20µl de agua e incubar a 55° C durante 5 min
8. Centrifugar por 5 min a máxima velocidad
9. Recuperar el sobrenadante y colocarlo en un tubo ependorf de 0.5µl
10. Secar en SAVANT y guardar a -20° C

VIII. Secuenciación de DNA por el método de Sanger.

Los productos amplificados por PCR ya purificados se emplean para secuenciación con el kit sequenase versión 2.0 USB con el siguiente protocolo:

1. Preparar la dilución de la mezcla de marcaje requerida (1:5,1:10,1:15; dependiendo de la región que se desee leer)
2. Disolver el DNA en 7 μ l de agua
3. Agregar 1 μ l de oligonucleótido (100ng/ μ l)
4. Agregar 1 μ l de DMSO (dimetilsulfóxido) y agitar
5. Incubar a 95° C durante 3 min
6. Sumergir en etanol y hielo seco
7. Preparar los tubos con G, A, T, C con 2.5 μ l c/u de ddNTPs (mezcla de dideoxinucleótidos)
8. Descongelar en mano el tubo con el DNA y centrifugar (un pulso)
9. Añadir 2 μ l de amortiguador de sequenasa 5X
10. Adicionar 1 μ l de DTT (0.1 M)
11. Agregar 2 μ l de la dilución de la mezcla de marcaje
12. Agregar 0.5 μ l α S³⁵ ATP (1000 Ci/mmol) agitar en vortex ligeramente
13. Agregar 2 μ l de enzima sequenasa agitar en vortex ligeramente
14. Incubar a temperatura ambiente 3 min
15. Precalentar los tubos con ddNTPs a 48° C 1 min antes del término de la incubación anterior
16. A cada tubo se le agregan 3 7 μ l de la reacción, dar un pulso
17. Incubar los tubos por 3 min a 48°C
18. Poner 4 μ l de amortiguador de terminación dar pulso
19. Cargar las muestras en el gel 3 μ l de cada uno (previamente desnaturalizadas a 95° C) en el orden G, A, T, C, correr el gel a 1800 volts el tiempo necesario para resolver adecuadamente las cadenas de DNA en la región que se desea leer

IX. Gel de acrilamida para secuenciación.

Las reacciones de secuencia se corren en un gel de acrilamida al 8% de acuerdo al siguiente protocolo:

Acrilamida-bisacrilamida 30% (29:1)	10 ml
Amortiguador TBE 10X	4 ml
Urea	23 grs
Agua	20 ml
Persulfato de amonio 10%	125µl
TEMED	25µl

1. Disolver la urea con la acrilamida-bis, el amortiguador y el agua
2. Lavar los vidrios de secuenciación con agua y jabón, secarlos y siliconizarlos con sigmacote (Sigma)
3. Empalmarlos y colocarle las pinzas
4. Ya disuelta la urea agregarle el TEMED, el persulfato de amonio y agitar
5. Vaciar la solución en los vidrios y esperar a que polimerice
6. Preparar el amortiguador de corrida TBE 0.5X
7. Al término de la corrida separar los vidrios y fijar el gel con la solución metanol:ac.acético (10%) durante 15 min. Enjuagar con agua, colocar el gel en papel Whatman 3mm secar el gel durante una hora a vacío y a una temperatura de 80° C
8. Exponer el gel a una placa de autorradiografía a temperatura ambiente el tiempo necesario y revelar. Leer la secuencia e identificar los cambios presentes

X. Secuenciación de DNA por PCR.

La técnica de secuenciación por PCR se empleó debido a que el fragmento de PCR de la región del exón 6 al extremo 3' del gen es muy grande (1800 pb) y se utilizó el producto de una sola amplificación para secuenciar dos exones (con este método se requiere menor concentración de DNA). Para esta técnica se empleó el kit Thermosequenase cycle Amersham con el siguiente procedimiento:

Kinación del oligonucleótido:

Agua	5.5µl
Oligonucleótido 100ng/µl	2µl
Amortiguador kinasa 5X	1µl
Enzima kinasa 10 U/µl	0.5µl
P ³² γ ATP (6000 Ci/mmol)	0.5µl

- a) Mezclar todo en un tubo ependorf 0.5ml
 - b) Incubar a 37° C por 30 min
 - c) Incubar a 70° C por 15 min, colocar en hielo
 - d) Tomar 0.5µl con 5µl de amortiguador de terminación de secuencia correrlo en minigel acrilamida como el descrito en la parte IV inciso 5 con el mismo oligonucleótido sin marcar como control; este gel se expone a una placa de autorradiografía por 10 min a -70° C y se revela la placa
1. Preparar los tubos con 4µl G, A, T, C c/u de ddNTPs (mezcla de dideoxinucleótidos)
 2. Tomar la mitad del DNA obtenido de la purificación con el polvo de vidrio en un tubo ependorf de 0.5ml y llevarlo a un volumen de 12.5µl
 3. Aeste agregarle 2µl de amortiguador sequenasa
 4. Añadir 1µl de oligonucleótido marcado radiactivamente
 5. Adicionar 2µl de enzima thermosequenasa, mezclar ligeramente
 6. Agregar 4µl de esta mezcla a cada tubo de los ddNTPs
 7. Agregar 10µl de aceite mineral, dar un pulso en la centrifuga
 8. Colocar los tubos en el termociclador con el siguiente programa:

E 1	95° C	3 min
E 2	95° C	30 seg
E 3	70° C	30 seg
40 ciclos a partir de la etapa 2		
E 4	4° C	

9. Al término del programa agregar a cada tubo 4µl de amortiguador de terminación

10. La realización del gel empleado lleva el mismo procedimiento que el otro protocolo de secuencia con la diferencia que éste se expone a una placa de autorradiografía con pantallas intensificadoras a -80°C , ya que el isótopo empleado es P^{32} .

RESULTADOS

Análisis de mutaciones en pacientes con deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa

Se llevó a cabo el análisis de mutaciones puntuales por medio del cual identificamos la presencia de mutaciones en el 78.7% de los alelos, obteniendo las frecuencias alélicas para las 13 mutaciones analizadas. Se encontró diferencia significativa en la frecuencia alélica con respecto a otras poblaciones únicamente para la delección completa del gen (Tabla 4).

La búsqueda de delecciones a través de ensayos de hibridación se llevó a cabo en los 47 pacientes (21 con el fenotipo PS, 23 con el de VS y 3 con el fenotipo NC). En 3 de ellos (12, 21 y 22) se identificó una posible delección heterocigota del gen funcional CYP21 (disminución de la intensidad de la banda de 3.7 Kb) cuando el análisis se hizo utilizando DNA genómico digerido con la enzima de restricción TaqI. De estos 3 pacientes solo en el paciente #9 se confirmó la delección heterocigota utilizando para el análisis DNA digerido con una segunda enzima de restricción (Bgl II). Este análisis se realizó utilizando al menos 2 enzimas de restricción ya que con frecuencia existen conversiones génicas en los sitios de reconocimiento de estas enzimas. Por lo tanto la frecuencia de alelos de delección en nuestra población fué menor al 1%. Al estudiar la segregación encontramos que la madre era la portadora de la delección en esta familia.

Se determinaron las frecuencias alélicas de las 13 mutaciones en ambos sexos (Tabla 5). Se encontró diferencia significativa en la distribución por sexos para las mutaciones exón 8 (Arg→Trp) y la mutación en exón 10 (Pro453 → Ser).

Se identificó un 34% de los pacientes como heterocigotos compuestos ya que poseen distintas mutaciones en ambos alelos (Tabla 6).

De las trece mutaciones analizadas, 10 de ellas se encontraron en nuestra población (E1, I2, E3, E4, E7₁, E7₂, E8₁, E8₂, E10 y la delección completa del gen CYP21).

Adicionalmente a la búsqueda de 13 mutaciones de las 17 reportadas, se identificó la mutación en el codón 484 (Arg → Pro) descrita previamente (Wedell y Luthman 1993b), en el paciente #34.

Identificación de posibles mutaciones nuevas

Se identificaron dos posibles mutaciones nuevas. Una de estas encontrada en el paciente #37 con el fenotipo perdedor de sal. Esta mutación se localiza en el exón 10 y consiste en la delección homocigota de una timina en el codón 475.

La segunda se identificó en el paciente #28 que tiene el fenotipo no clásico y fue encontrada en el intrón 7 (T → C) en la base 1785.

Identificación de cambios de secuencia que representan posibles polimorfismos

Se identificaron dos cambios de secuencia en el exón 3 que representan posibles polimorfismos, ambos resultan en un cambio de base de A → G (que origina una sustitución de Lisina→Arginina) en los codones 98 y 102. La sustitución de Lis98 → Arg se encontró en el paciente #3 que además presenta la mutación en el intrón 2 en forma homocigota. La sustitución Lis102 → Arg se identificó en 15 pacientes (1, 5, 12, 21, 24, 25, 27, 32, 33, 39, 40, 41, 42, 44 y 47).

Se identificó también un cambio de secuencia en exón 10 que resulta en la sustitución Asn493→Ser con una frecuencia alélica del 41.5%. Ya que el efecto funcional de esta alteración no ha sido estudiado, se analizó su frecuencia alélica en 20 individuos normales (clínicamente sanos y sin historia familiar de hiperplasia suprarrenal congénita). No se encontró diferencia significativa en la frecuencia alélica de este cambio entre individuos normales y pacientes (37.5 vs 41.5%) ($p=0.5$), sin embargo, encontramos diferencia significativa en la proporción de individuos homocigotos portadores de este cambio entre los pacientes (24 vs 3) ($p=0.01$).

Identificamos adicionalmente un cambio de secuencia localizado en el exón 5 que resulta en la sustitución Asp183 → Glu en 3 pacientes (33, 41, 42) con una frecuencia alélica de 5.3%. Este cambio de secuencia existe en el pseudogen y su efecto funcional no ha sido aún estudiado.

Identificación de pacientes potencialmente portadores de mutaciones nuevas

Se identificaron 5 pacientes (7, 17, 21, 26, 42) (2 PS y 3 VS), en los cuales no encontramos ninguna de las 13 mutaciones que se analizaron, a pesar de que su perfil clínico y bioquímico es compatible con el diagnóstico de deficiencia 21-hidroxilasa (tabla 7). Algunos de estos pacientes tienen posibles mutaciones nuevas: el paciente #42 es portador de los cambios Lis102 → Arg y Asp183 → Glu en forma homocigota, el paciente #21 presenta en forma heterocigota los cambios Lis102 → Arg y Asn493 → Ser y los pacientes #7 y #26 tienen la sustitución de Asn493 → Ser en forma homocigota. Adicionalmente identificamos 10 pacientes en los cuales solo se ha identificado la mutación responsable en uno de los alelos.

Identificación de familias donde no existe segregación de la mutación correspondiente en alguno de los padres

Se identificaron 9 familias en las cuales alguno de los padres no tenía la mutación presente en el hijo (Tabla 8), estas familias podían representar casos de no paternidad. En ellas se realizó análisis de huella digital de DNA utilizando análisis con marcadores microsatélites localizados en distintos cromosomas. Se confirmó paternidad positiva en todas ellas con una probabilidad de no paternidad del orden de 10^{-12} a 10^{-16} (estos resultados fueron obtenidos como parte de otra tesis de grado)

Identificación de mutaciones y combinación de mutaciones asociadas a fenotipos particulares

Se encontraron relativamente pocas mutaciones o combinaciones de éstas asociadas a cada uno de los fenotipos clínicos. Las combinaciones de mutaciones (genotipos) identificadas en cada una de las formas clínicas de la enfermedad se ilustran en la figura 9. Siete de las 13 mutaciones estudiadas se identificaron en pacientes con el fenotipo de pérdida de sal (I2, E3, E4, E7₁, E7₂, E8₁ y E8₂), siete se encontraron en pacientes con la forma de virilización simple (E1, I2, E4, E7₁, E8₂, E10 y delección total del gen) mientras que solo una (E1) se encontró en un paciente con la

forma atenuada o no clásica de la enfermedad. De acuerdo a estos resultados podemos postular que la búsqueda de 10 de las 13 mutaciones analizadas permite la identificación de las mutaciones responsables de esta entidad en aproximadamente el 80% de los alelos mutantes en pacientes mexicanos. Es interesante que las mutaciones Val281 → Leu y Pro453 → Ser previamente asociadas al fenotipo no clásico no parecen ser las responsables de esta forma clínica en la población mexicana.

	Mutación	Frecuencia encontrada en nuestra población (%)
E1	Pro30 → Leu	8.5
I 2	A → G C	47.9
E3	Del 8 bp	2.1
E4	Ile172 → Asn Ile236 → Asn	11.7
E6	Val237 → Glu Met239 → Lis	0
E7₁	Val281 → Leu	8.5
E7₂	inserción de T	1.0
I 7	C → G	0
E8₁	Gln318 → Terminación	4.2
E8₂	Arg356 → Trp	7.4
E9	Trp406 → Terminación	0
E10	Pro453 → Ser	2.1
Del	Delección del gen CYP21	1.0

Tabla 4.- Frecuencia alélica de las mutaciones puntuales y la delección del gen obtenida en la población mexicana.

	<u>Hombres</u>	<u>Mujeres</u>
E1	7.7	8.8
I 2	38.4	48.5
E3	0	2.9
E4	15.4	10.3
E6	0	0
E7₁	7.7	8.8
E7₂	3.8	0
I 7	0	0
E8₁	3.8	4.4
E8₂	0	10.3*
E9	0	0
E10	7.7	0*
Del CYP21	0	1.4

Tabla 5. Distribución de las frecuencias alélicas de las mutaciones analizadas en ambos sexos. El asterisco indica aquellas mutaciones para las que se observó diferencia significativa en la distribución por sexos

Pac	Fen	E 1	I 2	E 3	E 4	E 7 ₁	E 7 ₂	I 7	E 8 ₁	E 8 ₂	E 9	E 10	Del CYP21	posibles mutaciones y/o polimorfismos nuevos
35	VS	--	--	--	++	--	--	--	--	--	--	--	--	
36	VS	--	--	--	+-	--	--	--	--	--	--	--	--	
37	PS	--	--	--	--	--	--	--	++	--	--	--	--	Del T 475
38	PS	--	--	++	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
39	VS	+-	+-	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	AAG → AGG 102 +- AAC → AGC 493+-
40	PS	--	++	--	--	+-	--	--	--	--	--	--	--	AAG → AGG 102 ++ AAC → AGC 493 ++
41	PS	--	++	--	+-	--	--	--	--	--	--	--	--	AAG → AGG 102 ++ GAC → GAG 183 ++
42	PS	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	AAG → AGG 102 ++ GAC → GAG 183 ++
43	PS	--	++	--	--	+-	--	--	--	--	--	--	--	AAC → AGC 493 ++
44	VS	--	--	--	++	--	--	--	--	--	--	--	--	AAG → AGG 102 ++ AAC → AGC 493 +-
45	PS	--	--	--	--	--	--	--	--	++	--	--	--	
46	VS	--	--	--	--	--	--	--	--	+-	--	--	--	
47	PS	--	++	--	--	+-	--	--	--	--	--	--	--	AAG → AGG 102 ++ AAC → AGC 493 ++

Tabla 6. Análisis de mutaciones en pacientes con deficiencia 21-hidroxilasa. Se presentan todas las mutaciones analizadas y la presencia o ausencia de éstas en todos los pacientes: fenotipo perdedor de sal (PS), virilizante simple (VS) y no clásico (NC), mutación en los dos alelos (++), mutación en un alelo (+-), sin mutación (- -), región que no se secuenció (//) y los cambios encontrados como posibles mutaciones y polimorfismos.

Pac	Fenotipo	Edad Dx	Sexo	Signos o síntomas al diagnóstico	Niveles 17-OHPg ng/ml	Perfil androgénico			Tratamiento
						Δ_4 A	DHEA	Test	
7	PS	16 días	F	AG, CA	15.02	--	--	--	--
17	VS	3 años	M	MG, PP	13.6		10.0	3.2	HC
21	VS	1.7 años	F	AG	295	1.4	1.14	0.47	P
26	VS	4 años	M	PP	1054	46.7	--	1.14	P
42	PS	23 días	F	AG, CA	> 25	--	--	--	P + F + S

Tabla 7. Perfil hormonal y clínico de los pacientes sin mutaciones conocidas. Fenotipo perdedor de sal (PS), fenotipo virilizante simple (VS), ambigüedad genital (AG), crisis adrenal (CA), macrogenitosmia, (MG), pubertad precoz (PP), prednisona (P), flornief (F), hidrocortisona (HC), suplementación de sal en la dieta (S), androstenediona (Δ_4 A), dihidroepiandrosterona (DHEA), testosterona (test). Estos tres son expresados como nmol/l; el nivel de 17 hidroxiprogesterona es basal (no hay estimulación con ACTH) el valor normal de 17-OHPg es de 1 a 10 ng/ml.

Pac	Mutación	Marcadores probados y alelos correspondientes										Σ PCA
		D11S976	D12S86	D12S395	D12S1349	D20S17	D6S265	D6S299	D11S921	D12S342		
2	Pac + +	134, 136	130, 148	224, 240	202, 202	121, 129	220, 226	252, 252	230, 236			
	P - -	134, 142	148, 152	240, 240	202, 204	121, 129	224, 226	250, 252	226, 230			2.1 x 10 ⁻¹⁵
	M + -	134, 136	130, 148	224, 244	202, 204	127, 129	218, 220	250, 252	236, 236			5.4 x 10 ⁻¹⁶
6	Pac + +	132, 134	134, 148	236, 236	202, 202	125, 133	222, 230	252, 252	224, 224			
	P ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
	M - -	134, 142	134, 144	224, 236	202, 202	121, 125	220, 230	252, 252	224, 238			8.4 x 10 ⁻¹⁵
13	Pac + +	134, 136	148, 152	240, 240	202, 204	127, 133	224, 232	250, 252	220, 224			
	P ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
	M - -	134, 136	142, 148	240, 240	198, 202	125, 133	224, 230	252, 252	220, 220			1.5 x 10 ⁻¹³
15	Pac + +	136, 142	120, 146	240, 244	198, 198	125, 127	218, 228	248, 252	234, 236			
	P ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
	M - -	138, 142	120, 154	224, 244	198, 198	125, 125	218, 228	248, 252	224, 234			3.2 x 10 ⁻¹⁴
20	Pac + -	134, 142	134, 150	224, 236	198, 202	125, 129	230, 232	248, 252	226, 228			
	P - -	130, 134	150, 154	224, 224	198, 202	125, 129	220, 230	248, 252	226, 226			2.1 x 10 ⁻¹³
	M - -	138, 142	134, 148	236, 244	198, 198	129, 129	222, 232	248, 252	224, 228			2.6 x 10 ⁻¹³
22	Pac + +	140, 144	136, 146	224, 236	198, 204	125, 129	226, 228	248, 254	226, 234			
	P + -	134, 144	136, 144	236, 240	198, 204	129, 129	226, 232	248, 252	226, 236			2.8 x 10 ⁻¹³
	M - -	140, 144	146, 150	224, 232	198, 198	125, 129	222, 228	250, 254	224, 236			5.1 x 10 ⁻¹⁵
23	Pac + -	130, 134	136, 146	240, 240	196, 202	127, 129	224, 228	250, 252	232, 234			
	P - -	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
	M - -	130, 134	144, 146	240, 240	198, 202	125, 129	224, 228	248, 252	226, 234			1.8 x 10 ⁻¹³
24	Pac + -	132, 136	130, 146	232, 240	198, 198	125, 125	226, 230	248, 250	222, 240			
	P ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
	M - -	132, 136	146, 160	240, 240	198, 204	125, 125	222, 226	246, 248	222, 240			1.2 x 10 ⁻¹⁶
25	Pac + +	138, 140	148, 150	224, 228	202, 204	129, 131	230, 230	250, 250	220, 238			
	P + -	140, 142	142, 148	224, 240	198, 202	125, 131	224, 230	248, 250	220, 224			1.3 x 10 ⁻¹³
	M - -	138, 140	142, 150	224, 240	198, 204	125, 129	230, 232	250, 252	224, 238			7.7 x 10 ⁻¹³

Tabla 8. Análisis de huella digital del DNA donde se muestran los marcadores microsatélites analizados y los alelos correspondientes determinados para cada individuo. Mutaciones detectadas en el gen CYP21 en pacientes (Pac), Padre (P), Madre (M), presencia de mutación en ambos alelos + +, ausencia de mutación en ambos alelos - -, presencia de mutación en un alelo + -, muestra no disponible ND. La última columna muestra el valor de la probabilidad de coincidencia al azar determinada considerando todos los marcadores analizados.

E1	I2	E3	E4	E6	E7 ₁	E7 ₂	I7	E8 ₁	E8 ₂	E9	E10	Del	Pac
----	----	----	----	----	-----------------	-----------------	----	-----------------	-----------------	----	-----	-----	-----

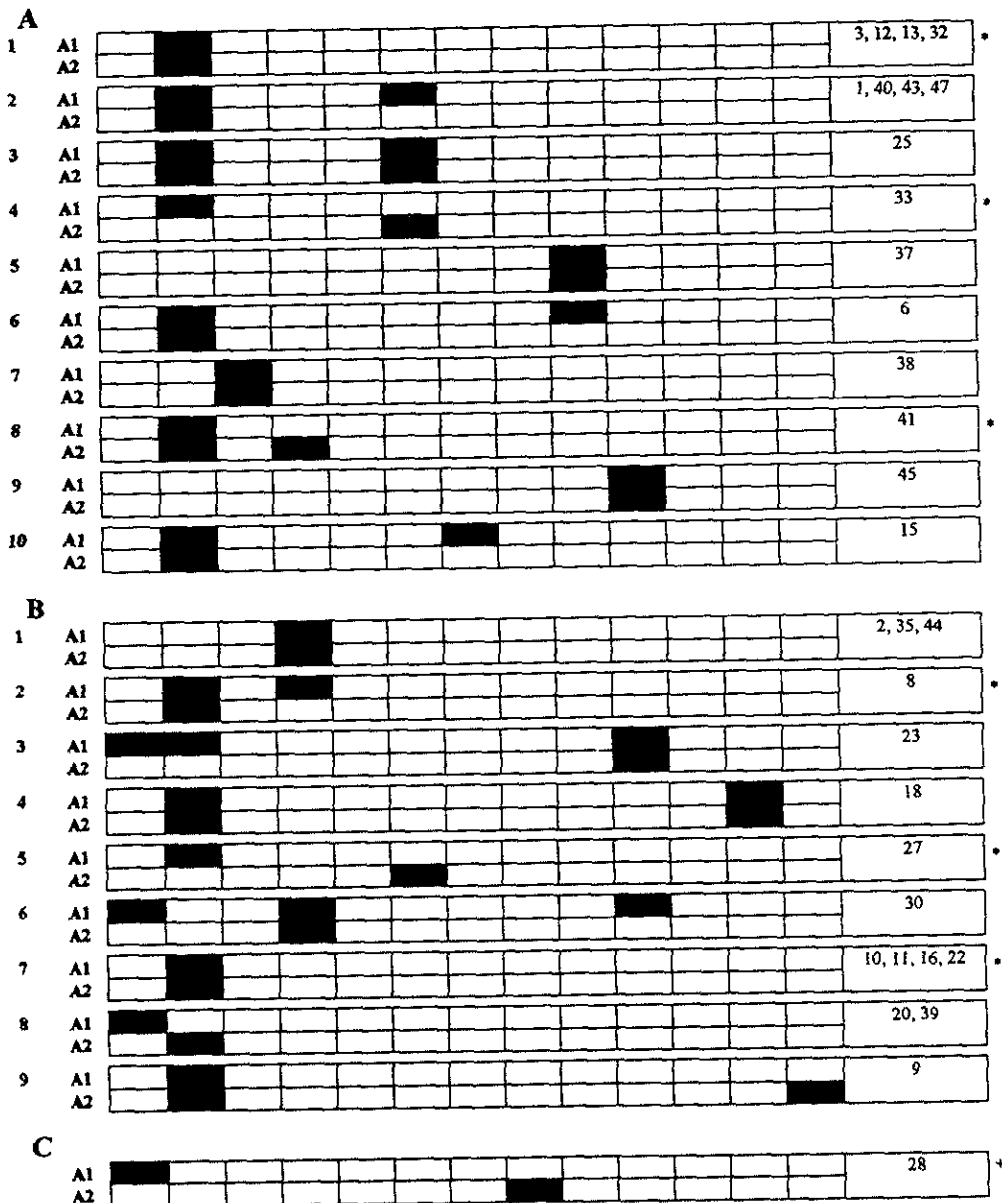


Figura 9. Combinación de mutaciones (genotipos) en los diferentes fenotipos de la enfermedad.

La mutación o mutaciones presentes en cada uno de los alelos y la combinación de mutaciones en ambos alelos en pacientes con las diferentes formas clínicas. Genotipos en pacientes con la forma de perdedor de sal A, genotipos en pacientes con la forma virilizante simple B, genotipos en pacientes con la forma no clásica C. Alelo 1 (A1), Alelo 2 (A2), el asterisco indica la combinación de alelos presentes en pacientes con diferentes fenotipos, posible mutación nueva identificada en Intrón 7 (T→1785) (+)

DISCUSION

Se analizaron 94 alelos correspondientes a 47 pacientes mexicanos no relacionados, diagnosticados clínicamente con deficiencia 21-hidroxilasa. El estudio reveló la presencia de mutaciones previamente reportadas en 78.7% de los alelos mutantes.

Los alelos con delección completa del gen CYP21 muestran una frecuencia muy baja entre los pacientes estudiados (menor del 1%) (Tusié et al. 1996). Una posible explicación a este hallazgo es la alta proporción de mujeres con respecto a varones (2.6:1) entre los pacientes clínicamente diagnosticados (nuestra población de estudio). Esto sugiere que los varones en el período posnatal no son diagnosticados oportunamente, a diferencia de las mujeres que presentan ambigüedad de genitales y una gran mayoría de ellos mueren como consecuencia de crisis de pérdida de sal. Esta suposición implicaría también que los varones tienen una mayor frecuencia de deleciones que las mujeres.

Para determinar si existen diferencias en las frecuencias alélicas de mutaciones entre ambos sexos, se calculó la frecuencia alélica de cada una de las 13 mutaciones puntuales analizadas y se encontró diferencia significativa en la distribución de sexos únicamente para la mutación del E₂ (R356W). Es posible entonces que entre ambos sexos existan diferencias para la delección del gen.

Recientemente han sido descritas mutaciones nuevas, asociadas a poblaciones particulares: una mutación en el intrón 1, Trp22 → terminación, Pro105 → Leu, y Arg484 → Pro se identificaron en pacientes suecos (Nikoskov et al. 1997, Lajic y Wedell 1997, Wedell y Luthman 1993b). La mutación Arg484 → Pro localizada en el exón 10 fue identificada en uno de nuestros pacientes (#34).

Identificamos una posible mutación nueva localizada en el exón 10, que corresponde a una delección de una timina en el codón 475 en el paciente #37. Esta mutación ocasionaría un cambio en el marco de lectura del gen. Dentro de esta región la sustitución de una Pro → Ser en la posición 453 ha mostrado que tiene efecto sobre la actividad enzimática, indicando que las mutaciones en el dominio carboxi terminal pueden alterar la actividad enzimática.

Identificamos también una posible mutación nueva en el intrón 7, en la posición 1785 en el paciente #28 que presenta el fenotipo no clásico. Esta alteración está localizada dentro del dinucleótido GT, una secuencia establecida como importante para el procesamiento del RNA

(Green 1991). Una mutación en la posición 1784 ha sido reportada previamente en pacientes suecos (Wedell y Luthman 1993a). El cambio de secuencia identificado en nuestro paciente puede ser una mutación esporádica ya que no se encontró en ningún otro paciente, ni ha sido previamente reportada como polimorfismo del pseudogen; sin embargo, pudiera tratarse también de un polimorfismo del pseudogen presente en la población mexicana.

Encontramos 2 sustituciones en el exón 3 en los codones 98 y 102 (Lis98 → Arg, Lis102 → Arg) que parecen corresponder a polimorfismos del gen ya que representan sustituciones de aminoácidos del mismo grupo polar. Sin embargo, la lisina en el codón 102 está conservada en la enzima bovina.

Ninguna de las posibles mutaciones nuevas o los polimorfismos identificadas por nosotros han sido reportados en el pseudogen y pudieran representar mutaciones *de novo*.

Adicionalmente identificamos la sustitución Asp183 → Glu en el exón 5 en tres pacientes (pacientes 33, 41, 42). Este cambio está presente en el pseudogen y su frecuencia alélica en nuestra población es de alrededor del 5%. Este cambio no ha sido reportado antes en pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa. El efecto funcional de esta sustitución aún no ha sido estudiado. El aspartato en la posición 183 se encuentra conservado en la enzima bovina, lo que sugiere que su sustitución podría alterar la actividad de la enzima.

Determinamos una alta proporción de homocigocidad para la sustitución de Asn493 → Ser entre nuestra población de pacientes (14 pacientes). Es posible que algunos de estos alelos porten además de este cambio alguna otra mutación en una posición aún no identificada y que ambos cambios se encuentren en desequilibrio de enlace.

En 20 alelos no se encontraron ninguna de las 13 mutaciones analizadas. En dos de estos 20 alelos identificamos posibles mutaciones nuevas. El perfil clínico y bioquímico de los pacientes que no presentan ninguna de las 13 mutaciones analizadas es compatible con el diagnóstico de deficiencia de 21-hidroxilasa, es posible entonces, que algunos de estos pacientes porten mutaciones en la región codificadora, dentro de los intrones o bien en la región reguladora del gen. Ya que se utilizó la secuenciación directa para el análisis de las 13 mutaciones conocidas, se cuenta ya con información de secuencia que equivale al 40-50% de la secuencia total del gen en todos los pacientes. De hecho, con esta estrategia fue posible la identificación de las posibles mutaciones nuevas encontradas en nuestra población.

Se identificó además una alta frecuencia de portadores obligados (alrededor del 20%) en los cuales no se identificaron la mutación o mutaciones encontradas en el paciente, al analizar el DNA genómico extraído de linfocitos sanguíneos. A través de la tipificación con marcadores microsátélites localizados en tres distintos cromosomas se demostró paternidad a través de huella digital de DNA en las nueve familias en cuestión. Una vez descartada la posibilidad de no paternidad al menos tres mecanismos genéticos pueden postularse para explicar este hallazgo: 1) la presencia de mosaicismo (posiblemente en gónada) en los portadores, 2) la ocurrencia de disomia uniparental y, 3) la existencia de mutaciones en la línea germinal como resultado de eventos de recombinación *de novo*. De estos tres mecanismos solo el último, ha sido documentado en células germinales de varones normales (no pacientes, ni portadores de deficiencia de 21-hidroxilasa) (Tusié y White 1995). Individuos normales presentan mutaciones germinales probablemente como consecuencia de mecanismos de recombinación, tanto entrecruzamiento ilegítimo como conversión génica en una proporción relativamente elevada de células gaméticas (en el orden de 1 en 10^3 a 1 en 10^6 células). Es interesante señalar que solo en una de las 9 familias donde se observó este fenómeno, existe el antecedente de un segundo miembro afectado, lo que sugiere la posibilidad de mutaciones en la línea germinal en la mayoría de las 8 familias restantes. La presencia de un segundo miembro afectado en la familia #20 es compatible con la presencia de mosaicismo gonadal en alguno de los progenitores. La presencia de mosaicismo o disomia uniparental no ha sido reportada antes para este padecimiento.

Se ha reportado amplificación selectiva del alelo mutante cuando se utiliza PCR para el análisis de la mutación del intrón 2 en pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa (Day et al. 1995; Day et al. 1996). Esta amplificación selectiva puede deberse a la falta de apareamiento de alguno de los oligonucleótidos de amplificación debido a cambios en la secuencia del gen por polimorfismos frecuentes en esta región. Del grupo de las 9 familias donde no se encontró la mutación correspondiente en alguno de los padres, en 4 de ellas el paciente es homocigoto para la mutación en el intrón 2. En estos cuatro pacientes descartamos la posibilidad de la amplificación selectiva del alelo mutante en el paciente, utilizando para el análisis de esta región productos de PCR originados de tres reacciones independientes empleando distintos pares de oligonucleótidos de amplificación, por lo que es poco factible que el hallazgo de homocigocidad en estos 4 pacientes se deba a un artefacto de PCR.

Identificamos tres grupos de pacientes potencialmente candidatos para portar mutaciones dentro de la región reguladora del gen: a) pacientes en los que no identificamos ninguna de las 13 mutaciones analizadas, b) pacientes homocigotos para el cambio Asn493 → Ser en exón 10 que no presentan ninguna de las 13 mutaciones reportadas y, c) pacientes portadores de mutaciones idénticas que presentan diferentes fenotipos (fenotipos discordantes).

Se ha demostrado que la región promotora del pseudogen muestra disminución de al menos 5 veces en la actividad transcripcional comparada con la del gen funcional (Chang y Chung 1995). Esta diferencia en la actividad transcripcional es presumiblemente el resultado de una disminución en la afinidad de unión para el factor nuclear Sp1 como consecuencia de un cambio de secuencia en la posición -117 en el pseudogen. Este cambio de secuencia pudiera existir también en el gen funcional CYP21 de alguno de nuestros pacientes, ya que es posible que ocurran eventos de conversión génica en esta región.

Las mutaciones que afecten la transcripción del gen pudieran explicar, por ejemplo, la expresión de la sintomatología en pacientes donde no se han encontrado mutaciones en la región codificadora del gen, o bien pudieran explicar diferencias en la severidad de la enfermedad en pacientes portadores de mutaciones idénticas (en exones y/o intrones) y que presentan fenotipos discordantes.

Basados en la identificación de mutaciones y las combinaciones de mutaciones presentes en cada fenotipo clínico, esta información puede ser muy útil en la implementación de estrategias de tamizaje molecular rápido en aquellos pacientes captados en el futuro.

Nuestros resultados muestran evidencia de la presencia de distintos mecanismos genéticos involucrados en la expresión de este padecimiento, y por lo tanto hacen notorias las diferencias en las bases moleculares del padecimiento entre la población caucásica y la población mexicana.

La identificación de familias con patrones inusuales de herencia puede contribuir al conocimiento de los distintos mecanismos genéticos involucrados en la expresión de este padecimiento y sentará las bases para un adecuado consejo genético, ya que las probabilidades de concebir a un segundo miembro afectado, cambian radicalmente de acuerdo al mecanismo genético por el cual se transfiere la mutación.

CONCLUSIONES

Se analizaron 13 de las 17 mutaciones reportadas en pacientes con deficiencia 21-hidroxilasa en 47 pacientes mexicanos no relacionados clínicamente diagnosticados con alguna de las variantes clínicas de la enfermedad.

El análisis mutacional reveló la presencia de la mutación responsable en el 78.7% de los alelos analizados.

Se identificaron 3 posibles mutaciones nuevas localizadas en el intrón 7 (T → C en la base 1785), en el exón 5 (Asp183 → Glu) y en el exón 10 (delección de una T en el codón 475), mientras que el cambio de Asp183 → Glu este presente en el pseudogen, las otras dos posibles mutaciones parecen haber ocurrido de forma esporádica.

Identificamos pacientes con mutaciones idénticas y fenotipos distintos, lo que sugiere la presencia de mutaciones adicionales en estos pacientes.

Se identificaron 9 familias con el patrón inusual de herencia donde alguno de los padres no porta la mutación o mutaciones identificadas en el paciente.

Habiendo demostrado paternidad positiva en estas 9 familias es posible postular una alta frecuencia de mutaciones en línea germinal.

REFERENCIAS

- Amor M., Parker L. K., Globerman H., New I. M., White C. P. (1988) Mutation in the CYP21B gene (Ile172→Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1600-1604.
- Araujo M., Sánchez M., Susuki L., Guerra G., Farah S., De Mello M. (1996) Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Brazilian J Med Biol Reseach* 29:1-13.
- Carrera P., Bordone L., Azzani T., Brunelli V., Garancini M., Chiumello G., Ferrari M. (1996) Point mutations in Italian patients with classic, non-classic and criptic forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet* 98:662-665.
- Chang S. and Chung B. (1995) Difference in transcriptional activity of two homologous CYP21A genes. *Mol Endo* 9:1330-1336.
- Chiou H. S., Hu M-C., Chung B-c. (1990) A missense mutation at Ile¹⁷²→Asn or Arg³⁵⁶→Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biol Chem* 265:3549-3552
- Churchill F. P. and Kimura T. (1979) Topological studies of cytochromes P-450_{mc} and P-450_{11β} in bovine adrenocortical inner mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 254:10443-10448.
- Day D. J., Speiser P. W., Schulze E., Bettendorf M., Fitness J., Barany F., White P. C. (1996) Identification of non-amplifying CYP21 genes when using PCR-based diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia (CAH) affected pedigrees. *Hum Mol Genet* 5:2039-2048
- Day D. J., Speiser P. W., White P. C., Barany F. (1995) Detection of steroid 21-hydroxylase deficiency alleles using a multiplexed ligation detection reaction and gene-specific PCR. *Genomics* 29:152-162.
- Finkelstein M. and Schaefer J. M. (1979) Inborn errors of steroid biosynthesis. *Physiol Rev* 59:353-406
- Globerman H., Amor M., Parker L. K., New I. M., White C. P. (1988) Nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency *J Clin Invest* 82:139-144
- Green M. (1991) Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing. *Ann Rev Cell Biol* 7 559-599.
- Hadley E. M. (1992) *Endocrinology*. Prentice Hall. Chapter 15 pp:391-429

- Helmberg A., Tusié L., Tabarelli M., Kofler R., White C. P. (1992) R339H and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. *Mol Endo* 6:1318-1322.
- Higashi Y., Yoshioka H., Yamane M., Gotoh O., Fujii-Kuriyama Y. (1986) Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: A pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2841-2845.
- Higashi Y., Tanae A., Inoue H., Fujii-Kuriyama Y. (1988a) Evidence for frequent gene conversion in the steroid 21-hydroxylase P450(c21) gene: implications for steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 42:017-025.
- Higashi Y., Tanae A., Inoue H., Hiromasa T., Fujii-Kuriyama Y. (1988b) Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase[P-450(C21)] deficiency in humans: Possible gene conversion products. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7486-7490.
- Higashi Y., Hiromasa T., Tanae A., Miki T., Nakura J., Kondo T., Ohura T., Ogawa E., Nakayama K. H., Fujii-Kuriyama Y. (1991) Effects of individual mutations in the P-450 (C21) pseudogene on the congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biochem* 109:638-644.
- Hu M-C., Hsu L-C., Hsu N-C., Chung B-c. (1996) Function and membrane topology of wild-type and mutated cytochrome P-450c21. *Biochem J.* 316:325-329.
- Kempe H. C., Silver K. H., O'Brien D., Fulginiti A. V., (1989) Diagnóstico y tratamientos pediátricos. *El manual moderno Mex. D. F. pag: 777-782.*
- Kunhle U., Land M., Ulick S. (1986) Evidence for the secretion of an antimineralocorticoid in congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 62:934-940.
- Lajic S. and Wedell A. (1997) An intron 1 splice mutation and a nonsense mutation (W23X) in CYP21 causing severe congenital adrenal hyperplasia. *Hum Genet* 98:182-184.
- Menard H. R., Guenther M. T., Kon H., Gillette R. J. (1979) Studies on the destruction of adrenal and testicular cytochrome P-450 by spironolactone. *J Biol Chem* 254:1726-1733.
- Miller L. W. and Morel Y. (1989) The molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. *Annu. Rev. Genet* 23:371-393.
- Morel Y., André J., Uring-Lambert U., Hauptmann G., Bétuel H., Tossi M., Forest G. M., David M., Bertrand J., Miller L.W. (1989) Rearrangements and point mutations of P450c21 genes distinguished by five restriction endonuclease haplotypes identified by a new probing strategy in 57 families with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Invest* 83:527-536.
- Mornet E., Créte P., Kuttann F., Raux-Demay M-C., Boué J., White C. P., Boué A (1991) Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am. J Hum Genet* 48:79-88.

- New I. M. (1987) Basic and clinical aspects of congenital adrenal hyperplasia. *J Steroid Biochem* 27:1-7.
- Nikoshkov A., Lajic S., Holst M., Wedell A., Luthman H. (1997) Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 82:194-199.
- Ortiz de Montellano P. R. (1986) *Cytochrome P-450 structure, mechanism and biochemistry* ed. Plenum Press, New York. pp:77-88.
- Owerbach D., Crawford Y., Draznin M. (1990) Direct analysis of the of CYP21B genes in 21-hydroxylase deficiency using polymerase chain reaction amplification. *Mol Endocrinol* 4:125-131.
- Pang S., Wallace M. A., Hofman L., Thuline H. C., Dorche C., Lyon C. T. Y., Dobbins R H., Kling S., Fujieda K., Suwa S. (1988) Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 81:866-874.
- Rodrigues R. N., Dunham I., Yu C. Y., Carroll C. M., Proter R.R., Campbell D.R. (1987) Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. *Embo J* 6:1653-1661.
- Ruckpaul K. y Rein H. (1989) *Frontiers in biotransformation: Basis and mechanism of regulation of cytochrome P-450*. Vol 1. Taylor y Francis, London pp:151-175.
- Speiser W. P., New I. M., White C. P. (1988) Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14, DR1. *N Engl J Med* 319:19-23.
- Speiser P. W., White C. P., New I. M. (1992b) The genetic basis of common diseases. Chapter 24. Oxford University Press. pp:529-550.
- Speiser P. W., Dupont B., Rubinstein P., Piazza A., Kastelan A., New I. M. (1985) High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 37:650-657.
- Speiser P. W., Dupont B., Zhu D., Serrat J., Buegeleisen M., Tusié L., Lesser M., New I. M., White C. P. (1992) Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 90:584-595.
- Tajima T., Fujieda K., Fujii-Kuriyama Y. (1993) De novo mutation causes steroid 21-hydroxylase deficiency in one family of HLA-Identical affected and unaffected siblings. *J Clin Endo Metab* 77:86-89.
- Tusié L., Traktman P., White C. P. (1990) Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *The J Biol Chem* 265:20916-20922.

- Tusié L. and White P. C. (1995) Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase) and CYP21P involve different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10796-10800.
- Tusié L., Speiser W. P., Dumic M., New I. M., White C. P. (1991) A mutation (Pro 30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol Endo* 5:685-692.
- Tusié L., Ramírez J. S., Ordoñez S., Cabello V. J., Altamirano B. N., Calzada L. R., Roblez V. C., Mendoza M. F., Méndez J. P., Teran G. M. (1996) Low frequency of deletion alleles in patients with steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population. *Hum Genet* 98:376-379.
- Wedell A. and Luthman H. (1993a) Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. *Hum Mol Genetics* 2:499-504.
- Wedell A. and Luthman H. (1993b) Steroid 21-hydroxylase (P450c21): a new allele and spread of mutations through the pseudogene. *Hum Genet* 91:236-240.
- White C. P., New I. M. and Dupont B. (1987) Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 316:1519-1524, 1580-1586.
- White C. P., Grossberger D., Onufer J. B., Chaplin D. D., New I. M., Dupont B., Strominger L. J. (1985) Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:1089-1093.
- White C. P., New I. M., Dupont B. (1986) Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5111-5115.
- White C. P., Vitek A., Dupont B., New I. M. (1988) Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4436-4440.
- White C. P. (1987) Genetics of steroid 21-hydroxylase deficiency. Recent progress in hormone research 43:305-336
- White C. P. and New I. M. (1992) Genetic basis of endocrine disease: congenital adrenal hyperplasia due 21-hydroxylase deficiency *J Clin Endo Metab* 74:6-11.
- Wilson R. C., Wei J. Q., Cheng K. C., Mercado A., New M. I. (1995a) Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1635-1640.
- Wilson R. C., Mercado A. B., Cheng K. C., New M. I. (1995b) Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2322-2329.