

11204
16



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

DEFECTOS MOLECULARES EN SUJETOS AFECTADOS
CON DIFERENTES VARIEDADES DE HIPERPLASIA
SUPRARRENAL CONGENITA: ASOCIACION CON LA
EXPRESION FENOTIPICA.

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE ESPECIALISTA EN
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION HUMANA

P R E S E N T A

Médico Cirujano Maria Mercedes Landaverde Molina



TUTORES DE TESIS:

DR. FERNANDO LARREA GALLO

DRA. MA. DEL CARMEN CRAVIOTO GALINDO

MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE, 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

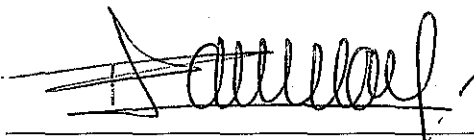
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

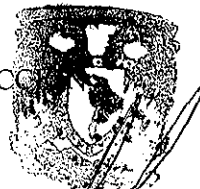

DR. LUIS FEDERICO USCANGA DOMÍNGUEZ
DIRECTOR GENERAL DE ENSEÑANZA. INCMNSZ




INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
"DR. SALVADOR ZUBIRAN"
DIRECCION DE ENSEÑANZA
México, D.F.


DR. FERNANDO LARREA GALLO

TUTOR DE TESIS
PROFESOR TITULAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCION
INCMNSZ.




DIVISION DE ESPECIALIZACION
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U. N. A. M.


DRA. MARIA DEL CARMEN CRAVIOTO GALINDO

TUTORA DE TESIS.
PROFESORA ADJUNTA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCION.
INCMNSZ.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, EN COLABORACIÓN CON LA UNIDAD DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y MEDICINA GENÓMICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN, CON EL APOYO ECONÓMICO DE LA BECA CLAVE PMC 001/2001-2002 PARA ESTUDIOS DE ESPECIALIDAD OTORGADA POR PLACIRH/PROGRESAR.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A la memoria del Dr. Salvador Zubirán

Al Dr. Fernando Larrea Gallo

A la Dra. María del Carmen Cravioto

A los Departamentos de Biología de la Reproducción y Biología Molecular

A PLACIRH/PROGRESAR

“ Rememoro con placer haber podido servir con devoción a los que sufren y haber contribuido aunque fuera muy modestamente en el progreso de esa amada ciencia nuestra.

Como actividades inherentes inseparables de su ejercicio, tuve asimismo pasión por la enseñanza, el médico tiene en la entraña misma de su ser un afán sin límites de servir y de enseñar, actividades esta última a que me dediqué con pasión y que ha sido siempre gratificante. ¡Como no ha de serlo!, al ver a través de los años convertidos en maestros y relevantes figuras de la medicina, a quienes con orgullo he podido llamar discípulos y a quienes un día supuso la esperanza de que fructificara el esfuerzo y el afán de enseñar lo mismo en la cátedra que en el diario quehacer de la vida.

Con que orgullo se escucha el ser llamado Maestro....”

Dr. Salvador Zubirán, 1980.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**A mis madres y hermanas:
Por su amor, ejemplo y apoyo incondicional.**

**A mis amigos:
Por su cariño y palabras de aliento....**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ABREVIATURAS

RESUMEN

INTRODUCCION	10
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y METODOS	24
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABREVIATURAS

a	Adenina
A	Alanina
ACTH	Hormona adrenocoticotrópica
AN	Androstendiona
AD	Aldosterona
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
c	Citosina
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
C	Cisteína
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CYP	Citocromo P450
D	Ácido aspártico
DHEA	Dehidroepiandrosterona
E	Ácido glutámico
Ex	Exón
F	Fenilalanina
g	Guanina
G	Glicina
H	Histidina
HSC	Hiperplasia suprarrenal congénita
I	Isoleucina
In	Intrón
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
K	Lisina
L	Leucina
M	Metionina
N	Aspargina
NC	No clásica
P	Prolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PS	Perdedora de sal
P4	Progesterona
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
SF	Cortisol
t	Timina
T	Treonina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TT	Testosterona
V	Valina
VS	Virilizante simple
W	Triptófano
Y	Tirosina
X	Codón de terminación
17CE	17 Cetosteroides
17OHE	17 Hidroxiesteroides
17OHP4	17 α -hidroxiprogesterona
→	Sustituído por

La HSC por deficiencia enzimática de la 21-hidroxilasa es un trastorno autosómico recesivo que se caracteriza por alteraciones en la biosíntesis de los glucocorticoides. Este defecto se acompaña del incremento en la secreción de ACTH y en la biotransformación de los andrógenos por las glándulas suprarrenales. La enfermedad es causada por mutaciones en el gen de la 21-hidroxilasa (CYP21).

Este trabajo describe la asociación entre las diferentes variedades de HSC y las alteraciones estructurales del gen CYP21 en 9 pacientes Mexicanos. Los diagnósticos se establecieron tanto clínicamente como por la cuantificación en suero de precursores hormonales en la síntesis de SF. Para el análisis molecular se llevó a cabo la amplificación enzimática selectiva del gen CYP21 por PCR y secuenciación directa de los productos obtenidos a partir de DNA genómico. Las mutaciones homocigotas asociadas a la HSC variedad VS fueron I172N y la mutación del In 2 (c/a g). Se identificó la presencia de una o diversas mutaciones en la mitad de los 18 alelos estudiados. En 3 casos se encontró más de una mutación en cada paciente. En 4 sujetos no se evidenció la existencia de alteración estructural en los segmentos analizados. Se identificó una familia con tres hermanos afectados con diferentes mutaciones, con fenotipo VS y posible patrón no usual de herencia.

En este estudio, la presencia de heterocigotos compuestos que expresaron la deficiencia enzimática, así como de los casos sin mutación identificada, de el individuo con HSC variedad VS con polimorfismo homocigoto del Ex 10 y el patrón no común de transmisión de las mutaciones en familias sugieren la complejidad molecular de esta patología y la existencia de otros mecanismos involucrados en la variabilidad fenotípica no claramente elucidados a la actualidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA

La HSC se refiere a un grupo de enfermedades autosómicas recesivas que son el resultado de la disminución o ausencia de actividad de las enzimas necesarias para la síntesis del SF en las glándulas suprarrenales, constituyendo una de las causas más frecuentes de los errores del metabolismo innato en los seres humanos.^{1,2} Dentro de este grupo, la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa (P450c21) es la más frecuente ya que se presenta en cerca del 90% de los pacientes con HSC.³

La HSC virilizante por deficiencia de la 21-hidroxilasa es la causa más común de ambigüedad genital en la mujer. Esta entidad se conoce como pseudohermafroditismo femenino, descrita inicialmente a mediados del siglo 19 y su fisiopatología conocida hasta mediados del siglo 20.³ En la actualidad con la ayuda de técnicas de biología molecular se han establecido sus mecanismos de transmisión genética los que distan mucho de la simplicidad de su naturaleza recesiva, sino que por el contrario, siendo más complejos sin tener todavía el conocimiento adecuado de ellos.⁴

La incidencia de la variedad PS, la más severa en la población general, se estima entre 1:10,000 y 1:18,000 recién nacidos mientras que en la forma NC en la población de Europa del Este y Judía es de alrededor del 3 al 4%.^{3,5,6} La frecuencia de portadores para la forma NC, dependiendo de la etnicidad, varía entre 1 en 5 y

1 en 50 individuos y para la forma clásica o severa es aproximadamente de 1 en 60.

Se conoce que las bases moleculares subyacentes de la enfermedad difieren entre las poblaciones Mexicana y Caucásica no sólo por el tipo y frecuencia de las mutaciones, sino también por los mecanismos genéticos involucrados en su transmisión.⁷⁻⁹ Ordóñez y colaboradores en una serie de 47 casos de pacientes Mexicanos con HSC por deficiencia de la 21-hidroxilasa observaron la presencia de diversas mutaciones en el 80% de los alelos estudiados.⁸ La delección y grandes conversiones del gen CYP21 fueron poco frecuentes en la población Mexicana (1%) mientras que la frecuencia encontrada de éstas en otros grupos Europeos varió entre el 25 y 45%.^{3,7}

La HSC se manifiesta clínicamente como un síndrome de sintomatología diversa donde se encuentra alterada la síntesis de AD y SF.¹⁰ Su fisiopatología reside en la síntesis anormal de SF con la consecuente alteración en los mecanismos de retroalimentación negativa que ejerce el SF a nivel de la glándula hipofisaria, dando como resultado la excesiva secreción de ACTH (Fig. 1). La sobrestimulación de la corteza suprarrenal trae como consecuencia la acumulación de precursores de esteroides (principalmente 17OHP4). Estos precursores son biotransformados a andrógenos, los que en sujetos 46,XX ocasionan los signos de virilización de los genitales exteriores,^{2,3,10} y dependiendo del grado de afección enzimática se acompañan de variantes fenotípicas, existiendo al menos tres formas distintas, la PS, la VS y la NC.

En la variedad PS, tanto la síntesis de AD y SF se encuentra afectada. La sobreproducción suprarrenal de andrógenos ocasiona la virilización pre y posnatal, la cual es más evidente en recién nacidos femeninos por la presencia de

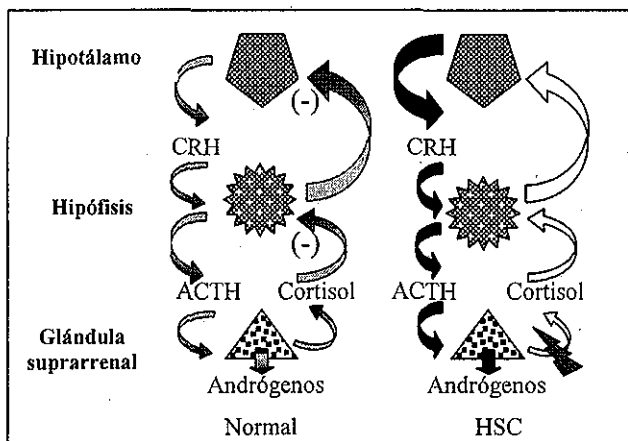


FIGURA 1. En una persona normal (izquierda), la glándula suprarrenal produce tanto SF, AD como andrógenos. Cuando existen alteraciones en la síntesis de SF (HSC), por la pérdida de la retroalimentación negativa, la secreción de ACTH se incrementa y estimula a la corteza suprarrenal. Como consecuencia del bloqueo enzimático, se acumulan los precursores que se biotransforman a los andrógenos. Este incremento en los andrógenos da por resultado el cuadro clínico de virilización.

ambigüedad genital. Al nacimiento, los sujetos 46,XX tienen ovarios, trompas de Falopio y útero con genitales exteriores virilizados por lo que frecuentemente existe error en la asignación del sexo. Los individuos 46,XY, con deficiencia enzimática de la 21-hidroxilasa variedad PS, generalmente no son diagnosticados al nacimiento, sino hasta cuando las manifestaciones de los primeros signos de insuficiencia suprarrenal aguda se hacen aparentes. La presencia de hiponatremia, hiperkalemia, bajas concentraciones de AD en suero y la elevada excreción de sodio en orina sugieren el diagnóstico. Ambos sexos, como resultado de la sobreproducción de andrógenos suprarrenales, son afectados por corta estatura debido al crecimiento óseo acelerado, fusión temprana de las epífisis de crecimiento y el desarrollo de pubertad precoz.^{2-4, 11}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la variedad VS, los individuos de sexo femenino cursan con ambigüedad de genitales exteriores e incremento de 17OHP4. Los individuos masculinos escapan al diagnóstico hasta los 4 – 7 años cuando presentan pubertad precoz con aparición de vello púbico, axilar y facial, además de la edad ósea avanzada. Independientemente del sexo, los sujetos afectados con la variedad VS de la HSC cursan sin insuficiencia suprarrenal ya que la síntesis de AD no se encuentra alterada.^{2-4, 11}

La forma NC, también conocida como variedad tardía o atenuada, es la manifestación más común de la HSC. En esta variedad no existe la deficiencia de SF o AD y los sujetos afectados se presentan con signos de hiperandrogenismo alrededor de la pubertad. La HSC variedad NC debe considerarse dentro de las posibilidades diagnósticas en aquellas pacientes con manifestaciones de hiperandrogenismo, oligomenorrea, amenorrea o infertilidad. Los sujetos 46,XY con esta variante por lo regular son asintomáticos; sin embargo, en algunos casos desarrollan pubertad precoz y/o la presencia de tumores de restos suprarrenales a nivel testicular.^{2-4,11}

SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES POR LA CORTEZA SUPRARRENAL

Las glándulas suprarrenales se encuentran divididas en corteza y médula.^{3,10,12} Desde el punto de vista histológico la corteza suprarrenal adulta se compone de 3 zonas distintas: glomerulosa, fasciculada y reticular. La zona glomerulosa, la más externa, produce mineralocorticoides (AD). En esta zona, la actividad de la 17 α -hidroxilasa es deficiente y por ende la síntesis de SF y andrógenos. La zona glomerulosa no está bien definida y sus pequeñas células pobres en lípidos están distribuidas por debajo de la cápsula suprarrenal. La

secreción de AD es regulada principalmente por el sistema renina-angiotensina y por el potasio. La zona fasciculada, la intermedia y la más gruesa de la corteza suprarrenal, produce SF y andrógenos. Las células de la zona fasciculada son grandes y ricas en lípidos por lo que se les denomina "células claras". La zona reticular, la más interna, rodea a la médula y produce SF y andrógenos. Estas dos últimas zonas son reguladas por ACTH y se caracterizan por ser deficientes de la enzima CYP11B2 por lo que la síntesis de mineralocorticoides se encuentra ausente.

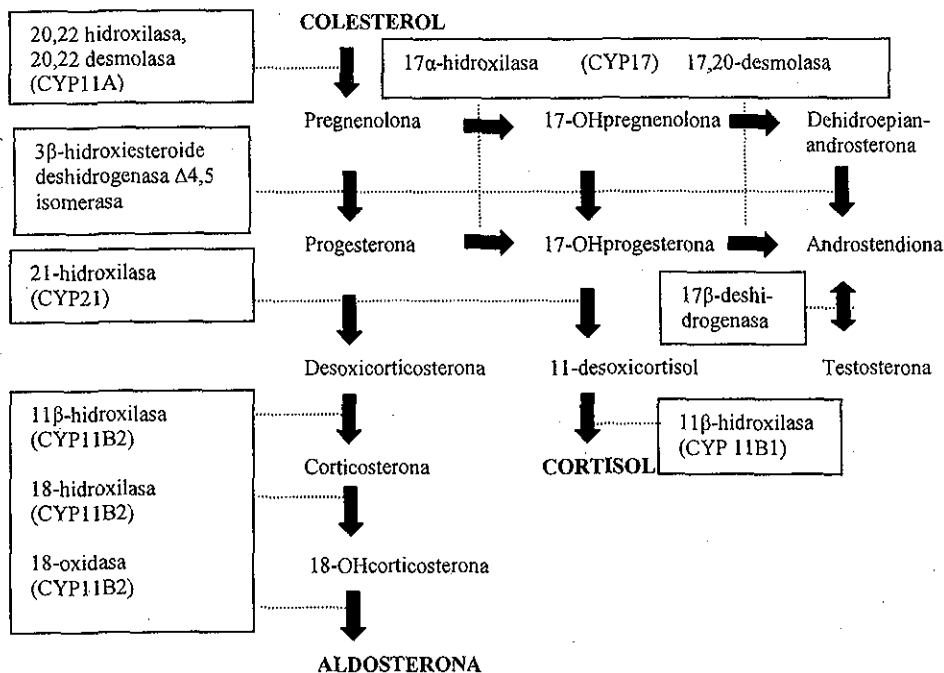


FIGURA 2. Biosíntesis de mineralocorticoides (AD), glucocorticoides (SF) y andrógenos (DHEA y TT) por las glándulas suprarrenales. Las enzimas que catalizan cada biotransformación están señaladas en cuadros. Para las actividades enzimáticas mediadas por citocromos P450 específicos se muestran en paréntesis. Los últimos tres pasos en la biosíntesis de AD son producto de la actividad del citocromo CYP11B2. El CYP17 realiza dos funciones catalíticas, la 17α-hidroxilación y la actividad de 17,20-desmolasa.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Las principales hormonas secretadas por la corteza suprarrenal son el SF, los andrógenos y la AD.^{3,10} En la Fig. 2 se muestran las vías de biosíntesis principales y los precursores en la síntesis de esteroides por la corteza suprarrenal. La mayor parte de las enzimas involucradas en la síntesis de SF y AD pertenecen a la familia de los CYP, un grupo de proteínas mitocondriales y del retículo endoplásmico con excepción de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa $\Delta 4,5$ isomerasa. Los CYP son enzimas que tienen el grupo hemo y están involucrados en el metabolismo de compuestos lipofílicos como las hormonas esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas y leucotrenos.^{13,14}

La enzima 21-hidroxilasa (P450c21, CYP21) biotransforma la 17OHP4 en 11-desoxicortisol y la P4 en corticosterona.^{3,10,12} El CYP21 contiene normalmente 494 residuos de aminoácidos y su peso molecular es de 52 kDa.³ La comparación entre las secuencias de aminoácidos de varios CYP ha permitido identificar los residuos más conservados los que presumiblemente son importantes en su función catalítica (Fig. 3). La enzima P450c21 es 28% homóloga en su secuencia de aminoácidos con otros citocromos de la misma familia siendo los residuos hidrofóbicos los más conservados.^{15,16} Estudios comparativos de la secuencia estructural entre los citocromos CYP21, CYP17 y CYP11A han identificado dos regiones conservadas localizadas cerca del amino terminal (Q53-R60 en CYP21) y del carboxilo terminal (L342-V358 en CYP21), respectivamente.³

El grupo hem es crítico para la función catalítica y se relaciona con un residuo de C localizado en la posición terminal de todos los CYP (C428 en P450c21). Las mutaciones en C428 en el CYP21 se acompañan de la inactivación de la enzima.³

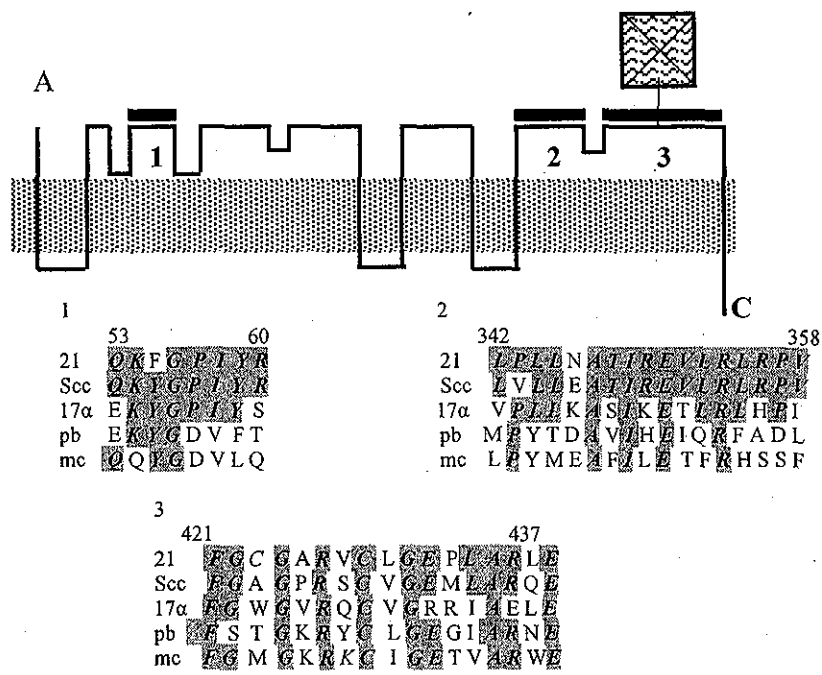


FIGURA 3. Representación esquemática del citocromo P450c21. Esta proteína se encuentra en la membrana del retículo endoplásmico indicada por el área punteada. Se señala el grupo amino (A) y carboxilo terminal (C). El grupo prostético hemo está representado por el cuadro con la cruz. Las tres áreas de mayor interés están señaladas por barras y numeradas. Se muestran también las secuencias de aminoácidos (letras mayúsculas) de esas áreas y se comparan con áreas homólogas en otras 4 enzimas: 17 hidroxilasa suprarrenal bovina (17α), enzima suprarrenal bovina que corta la cadena lateral del colesterol (scc), el P450 hepático inducido por fenobarbital en ratón (pb) y el P450 hepático humano inducido por hidrocarburos policíclicos (mc). Los residuos que son iguales están señalados con letras cursivas. El inicio y final de las áreas de cada una de las regiones conservadas se numeran. El residuo cisteína marcado en la región 3 es importante para el grupo funcional hemo.

El SF es sintetizado en la zona fasciculada (Fig. 2). El paso limitante en la biosíntesis de SF es la disponibilidad del colesterol en la célula para ser incorporado a la membrana interna mitocondrial y biotransformado en pregnenolona por acción de la ACTH.¹² Este paso incluye dos hidroxilaciones y la hidrólisis de la cadena lateral del colesterol, producto de la acción de la enzima conocida como 20,22 hidroxilasa, 20,22-desmolasa (CYP11A, P450scc).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Posteriormente el citocromo P450c17 (CYP17, 17 α -hidroxilasa) en el retículo endoplásmico liso de la zona fasciculada convierte pregnenolona a 17 α -OHpregnenolona. La enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ 4,5 isomerasa, utilizando como sustrato a la 17 α -OHpregnenolona, sintetiza la 17OHP4, la que posteriormente es hidroxilada en la posición 21 por acción de la 21-hidroxilasa (CYP21, P450c21) y dar lugar a la síntesis del 11-desoxicortisol. Este precursor es hidroxilado en el carbono 11 por acción de la 11 β -hidroxilasa (CYP11B1, P450c11) y ser finalmente biotransformado en SF.^{3,10,12,14}

La síntesis de AD es similar a la descrita para el SF, excepto por la ausencia de la actividad de la 17 α -hidroxilasa. Para la síntesis de AD, la pregnenolona es biotransformada en P4 por acción de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ 4,5 isomerasa; posteriormente el precursor es hidroxilado en los carbonos 21, 11 y 18 para dar lugar a la síntesis de desoxicorticosterona, corticosterona y 18-desoxicorticosterona, respectivamente. Las hidroxilaciones en los carbonos 11 y 18 así como la formación del grupo aldehído son catalizadas por la misma enzima.^{3,12,14}

BASES MOLECULARES DE LA DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA

El gen de la 21-hidroxilasa (CYP21, CYP21A2, CYP21B) se expresa únicamente en la corteza suprarrenal. Este gen está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3) en la región que codifica para la clase III del complejo mayor de histocompatibilidad (Fig 4). Este gen tiene 3.1 kb de longitud y contiene 10 Ex y 9 In.^{1,3} Además del gen que codifica para la enzima 21-hidroxilasa, también existe un pseudogen (CYP21P, CYP21A1P o CYP21A).^{17,18} Estos dos genes se encuentran adyacentes a los genes que codifican el componente C4A y

C4B del complemento. El gen CYP21, CYP21P, C4A y C4B son transcritos en la misma dirección.¹⁹ El gen CYP21 y el pseudogen CYP21P tienen 98% de homología en la región codificadora y 95% en los In.³

6p21.3

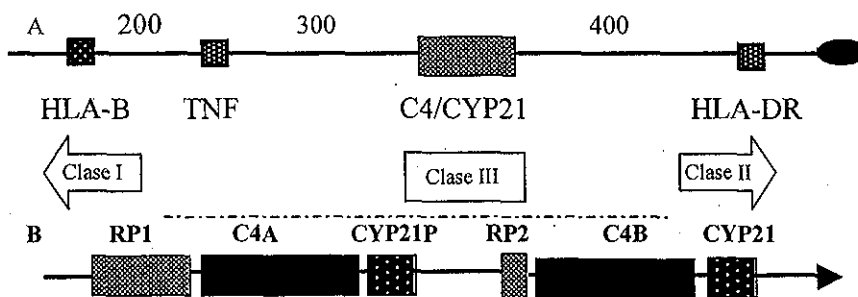


FIGURA 4. A. Localización de el gen y el pseudogen CYP21 dentro del complejo de histocompatibilidad en el cromosoma 6p21.3. Existen otros genes en esta región que aparecen en la figura y que codifican para factor de necrosis tumoral (TNF) y otros miembros del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA-B y HLA-DR). La dirección del centrómero está indicado por el círculo negro a la derecha de la línea. Los números indican la distancia entre los genes expresada en kilobases. B. Se encuentra diagramada la región C4/CYP21. La flecha denota la dirección de la transcripción. Se utilizan las abreviaturas: pseudogen de 21-hidroxilasa (CYP21P), genes que codifican para la fracción cuatro del complemento en suero (C4A y C4B), gen que codifica para una proteína putativa nuclear de función no conocida (RP1) y la copia truncada de este gen (RP2).

Los cambios estructurales observados en el gen CYP21, para la mayoría de las mutaciones que se han identificado en pacientes con la deficiencia de 21-hidroxilasa, ocurren a nivel de pseudogen.^{1,3,18} Por esta razón se ha propuesto que las mutaciones del gen CYP21 en su mayoría son el resultado de recombinaciones entre el CYP21 y el CYP21P. Las deleciones del gen CYP21 son ocasionadas por el intercambio desigual de las secuencias de DNA entre las cromátides de los cromosomas homólogos durante la meiosis y las mutaciones puntuales por conversiones génicas que transfieren mutaciones deletéreas provenientes del CYP21P.^{20,21} En pacientes con deficiencia de la 21-hidroxilasa, las mutaciones

puntuales son las más frecuentes, representando las dos terceras partes de las mutantes en las poblaciones estudiadas.^{8,11,22,23}

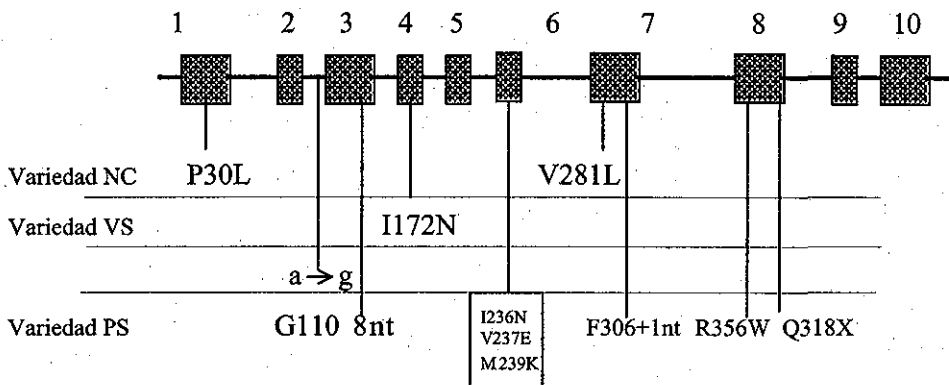


FIGURA 5. Mutaciones del gen CYP21 relacionadas con la deficiencia de la 21-hidroxilasa. Se esquematiza el gen CYP21, los exones con números y las mutaciones del gen CYP21 con posible transferencia por conversión génica. Estas mutaciones están característicamente asociadas a diferentes fenotipos. Existe más de una docena de mutaciones adicionales poco frecuentes, que representan menos del 5% de todos los alelos. Las mutaciones están representadas por su nombre.

Se conocen más de 40 mutaciones distintas que incluyen: deleciones parciales o totales del gen, mutaciones que afectan el procesamiento del RNA, mutaciones puntuales que cambian un aminoácido por otro y mutaciones que generan codones de terminación. Tales mutaciones se presentan en la Tabla 1.³

Para algunas mutaciones se conocen las frecuencias alélicas en los pacientes incluyendo lo descrito en la población Mexicana (Tabla 2). Ordoñez y colaboradores refirieron tales frecuencias alélicas por medio del estudio alélico de 47 pacientes Mexicanos.⁸ Varios informes sugieren que aproximadamente el 45% de los pacientes afectados con la deficiencia de la 21-hidroxilasa son heterocigotos compuestos y el 20% de todos los alelos afectados tienen más de una mutación por

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

lo que la diversidad de la expresión fenotípica es debida a la heterogeneidad de los alelos mutantes.^{8,11,22,24}

TABLA 1. Mutaciones causantes de deficiencia de la 21-hidroxilasa.

Nombre ^a	Mutación/nt ^b	Ex/In	Actividad % nI ^c	Fenotipo
Delección			0	PS
Conversión			0	PS
+L9	28+ctg	Ex 1	100	Normal
W22X	66 g→a	Ex 1	0	PS
W22+Int	64+tt	Ex 1	0	PS
P30L	89 c→t	Ex 1	30-60	NC
P30Q	89 c→a	Ex 1	0	PS
Y47Δ1nt	138Δt	Ex 1	0	PS
Intron 1 empalme aceptor	295 a→g	In 1		PS
G90V	366 g→t	Ex 2	0	VS
Intrón 2 empalme donador	387 g→a	In 2		
Intrón 2 "g"	656 a/c→g	In 2	<5	VS-PS
K102R	684 a→g	Ex 3		Normal
P105L	693 c→t	Ex 3	60	NC
G110Δ8nt	Δ708-715	Ex 3	0	PS
C168Δ1nt	991-992 tg→a	Ex 4	0	PS
I172N	1001 t→a	Ex 4	1	VS
G178A	1019 g→c	Ex 5	0-19	PS
D183E	1123 c→g	Ex 5	100	Normal
ΔE196	Δ1160-1162	Ex 5	6-23	
I236N	1382 t→a	Ex 6	0	PS
V237E	1385 t→a			
M239K	1391 t→a			
S268T	1647 g→c	Ex 7	100	Normal
V281L	1685 g→t	Ex 7	20-50	NC
G291S	1715 g→a	Ex 7	0.8	PS
G291C	1715 g→t	Ex 7		PS
W302X	1750 g→a	Ex 7	0	PS
F306+Int	1759+tt	Ex 7	0	PS
Intrón7 empalme donador	1781 g→c	In 7		PS
Intrón7 empalme donador	1782 t→g	In 7		
R316X	1990 c→t	Ex 8	0	PS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Q318X	1996 c→t	Ex 8	0	PS
S330Δ10nt	Δ2032-2041	Ex 8	0	PS
R339H	2060 g→a	Ex 8	20-50	NC
R354H	2105 g→a	Ex 8	0	
R356W	2110 c→t	Ex 8	0	PS
R356P	2111 g→c	Ex 8	0.2	
R356Q	2111 g→a	Ex 8	1	
E380D	2267 g→t	Ex 9	30	
V397+16nt	duplicación 2303-2318	Ex 9	0	PS
W406X	2341 g→a	Ex 9	0	PS
G424S	2494 g→a	Ex 10		VS
P453S	2580 c→t	Ex 10	20-50	NC
P475ΔInt	Δ2649	Ex 10	0	
R483P	2672 g→c	Ex 10	1-2	
R483ΔInt	2672-2273 gg→c	Ex 10	0	PS
N493S	2702 a→c	Ex 10	100	Normal

^a Deleción (Δ), inserción (+) y nucleótido (nt). Los residuos de aminácidos están señalados con su nombre(mayúsculas) y la posición en la secuencia estructural enzimática. Por ejemplo: P105L es la sustitución de la prolina-30 por leucina ^b Referido al número de nt y con letras a las bases orgánicas involucradas. ^c Actividad enzimática en cultivos celulares cuando se ha expresado la mutación. No descrito en los espacios vacíos.

Cada mutación se asocia de forma específica a una de las tres variedades de deficiencia de 21-hidroxilasa (Tabla 1). Estudios invitro han demostrado que las mutaciones que resultan en deficiencia total de la actividad de la 21-hidroxilasa se asocian con el fenotipo PS; aquellas que reducen la actividad enzimática en 98% se correlacionan a la variedad VS y las que disminuyen tal actividad enzimática a sólo un 10 – 75% corresponden a la variedad NC.^{2,25} Las mutaciones principales descritas para la HSC variedad PS son R356W, Q318X, I236N/V237E/M239K, G110Δ8nt, In 2 “g” (c/a → g), grandes conversiones y deleciones. El fenotipo VS se ha descrito asociado a las mutaciones I172N e In 2 “g”.

Como se muestra en la tabla 1 el grado de afección de la actividad enzimática puede ser predecible a partir del tipo y localización de las mutaciones pero, al considerar el alto porcentaje de heterocigotos compuestos que expresa la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

deficiencia enzimática esta predicción se pierde.^{3,4,8} Se ha descrito además que una misma alteración molecular manifiesta diferentes fenotipos.⁸ Por lo tanto, la expresión fenotípica del defecto enzimático de la 21-hidroxilasa depende de otros factores como la sensibilidad periférica a la acción de los andrógenos.^{2,4,8,26.}

TABLA 2. Frecuencias alélicas de mutaciones puntuales para deficiencia de 21-hidroxilasa previamente reportadas en pacientes con HSC y de forma específica en población mexicana.

Ex/In.	Mutación	Frecuencias reportadas previamente (%)	Frecuencia población mexicana (%)
E1	P30L	17	8.5
I2	a/c → g	26 - 42	47.9
E3	Del 8 bp	7.5 - 10	2.1
E4	I172N	7.5 - 10	11.7
	I236N		
E6	V237E	3	0
	M239K		
E7 ₁	V281L	10.6	8.5
E7 ₂	Inserción t	1	1.0
I7	c → g	NR	0
E8 ₁	Q318X	3 - 7	4.2
E8 ₂	R356W	14	7.4
E9	W406X	NR	0
E10	P453S	NR	2.1
Del	Delección gen CYP21	11 - 35	1.0

Las mutaciones están referidas por sus nombres. No reportadas previamente (NR)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

OBJETIVO GENERAL

Establecer las asociaciones entre las diversas variantes de expresión clínica de la hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia de la 21-hidroxilasa con el tipo de mutación a nivel molecular.

MATERIALES Y METODOS

CASOS:

Se revisaron 55 expedientes de pacientes con diagnóstico de HSC de la consulta externa del Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ. Treinta dos expedientes correspondieron a pacientes con diagnóstico de HSC por deficiencia de la 21-hidroxilasa (25 casos femeninos y 7 masculinos). De acuerdo a su presentación clínica, el 78.13% correspondió a la variedad VS, 18.75% a la PS y el 3.12% a la variedad NC. Del análisis de estos 32 casos de HSC se identificaron aquellos que cumplieron criterios clínicos y de laboratorio hormonal de deficiencia de la 21-hidroxilasa, además de contar con la descripción del tipo y localización de la mutación por estudios a nivel molecular.

Los criterios considerados fueron los siguientes:

- 1) Clínicos: virilización de genitales exteriores, insuficiencia suprarrenal, pubertad precoz, edad ósea avanzada, hiperpigmentación, acné, hirsutismo o alteraciones menstruales.
- 2) Bioquímicos: Concentraciones en suero de 17OHP4, P4, AN y SF o en orina de 17CE, 17OHE, Pregnanliol y Pregnantriol diagnósticas de deficiencia de la 21-hidroxilasa.
- 3) Análisis molecular.

Únicamente 9 casos cumplieron con los requisitos arriba señalados y fueron incluidos para su análisis. La evaluación del fenotipo se basó en la historia, examen físico, presencia o ausencia de alteraciones electrolíticas y datos de concentraciones hormonales. Para el diagnóstico de la variedad PS en los sujetos

femeninos se consideró la presencia de ambigüedad de genitales exteriores, hiperpotasemia, hiponatremia, bajas concentraciones de AD en suero o alta excreción de sodio en orina y en los sujetos masculinos, la presencia de insuficiencia suprarrenal. Los casos femeninos con ambigüedad de genitales exteriores sin datos de insuficiencia suprarrenal se consideraron como variedad VS. Los casos masculinos de HSC variedad VS se diagnosticaron de acuerdo a manifestaciones características de exceso de andrógenos como la pubertad precoz y edad ósea avanzada. Para el diagnóstico de HSC variedad no clásica se consideró el apareamiento puberal de signos de hiperandrogenismo como hirsutismo, acné, irregularidades menstruales y/o infertilidad.

Las concentraciones hormonales de 17OHP4, P4 y AN así como 17CE, 17OHE, Pregnanliol y Pregnantriol en orina, se cuantificaron en condiciones basales o con estimulación de las glándulas suprarrenales con ACTH (0.25mg). La presencia de uno o varios criterios clínicos, elevación de las concentraciones de 17OHP4, P4, AN, 17CE, Pregnanliol o Pregnantriol, además del análisis molecular condujo al diagnóstico fenotípico de HSC por deficiencia de la 21-hidroxilasa.

MÉTODOS

La cuantificación de 17OHP4, P4, AN, T, SF y DHEA en suero se llevó a cabo por radioinmunoanálisis de doble anticuerpo utilizando antisueros específicos para cada uno de los esteroides estudiados. La determinación en orina de pregnanliol, y pregnantriol se realizó por medio de técnicas colorimétricas después de su separación por cromatografía en columna. Los coeficientes de variación intra e interanálisis, así como la sensibilidad de estos métodos han sido informados previamente.²⁷⁻³¹

Para el caso del estudio molecular del gen de la 21-hidroxilasa se obtuvieron muestras de sangre periférica de los 9 pacientes para la extracción de ADN de leucocitos por el método de fenol.¹¹ Para el análisis de las diferentes mutaciones, la metodología utilizada se dividió en dos partes: detección de las deleciones totales del gen CYP21 por medio de análisis de hibridación por Southern blot y detección de las mutaciones puntuales a través de amplificaciones por medio de PCR y secuenciación directa.^{8,11}

Las deleciones del gen CYP21 fueron determinadas por análisis de Southern blot de los productos de digestión enzimática de ADN. El ADN fue tratado con las enzimas de restricción TaqI y Bgl II y los productos de digestión enzimática fueron separados en geles de agarosa. Esta metodología permite distinguir entre el gen y el pseudogen. La utilización de la enzima TaqI resulta en la generación de 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 se identifican dos bandas correspondientes al gen funcional (10kb) y al pseudogen (12kb). La sonda que se utilizó es el cADN completo de la 21-hidroxilasa. El análisis densitométrico de las autoradiografías se realizó con el sistema Ambis 4000.^{7,32}

Para determinar la presencia de mutaciones puntuales se realizó secuenciación directa del gen. Se diseñaron pares (sentido y antisentido) de oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR del gen CYP21 y para la secuenciación con ayuda del programa Oligo 4.0. Los oligonucleótidos empleados para el análisis de secuencia se diseñaron para que estuvieran a una distancia de 50 a 70 bases del sitio de la mutación que fue analizada. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3. Iniciadores usados en la amplificación y secuenciación (SEC) del gen CYP21.

	Iniciadores	Posición	Uso
A	5' <u>gtgggaggg</u> ta <u>ctgaag</u> 3'	5's	PCR y SEC
B	3' cctgcttt <u>ctcccc</u> acca 5'	In 2a	PCR
C	5' atct <u>ggagg</u> gagaaagc 3'	In 2s	PCR y SEC
D	3' agagcagggag <u>tagtctc</u> 5'	Ex 3a	PCR
E	5' ctgctctgggag <u>actac</u> 3'	Ex 3s	PCR
F	3' cctgagaaagggaaatcacgtc 5'	Ex 5a	PCR
G	3' ctgc <u>atctccac</u> gatg <u>gat</u> 5'	Ex 6a	PCR
H	5' agggatcacat <u>ctggg</u> gat 3'	Ex 6s	PCR
I	3' aagcctcaatcctctgc <u>agcg</u> 5'	3'a	PCR
J	5' atgacctcccacctcag 3'	In 2s	SEC
k	5' cactgtttctccacagcgc 3'	In 3s	SEC
L	5' ctctttcacctctgca 3'	In 6s	SEC
M	5' tgggtgctgagggagcg 3'	In 7s	SEC
N	5' agcaggtgactcccaggg 3'	In 8s	SEC
O	5' tgaaaatgtggtgaggc 3'	In 9s	SEC
P	5' ccactgcagtgatcct 3'	Ex 10s	SEC
Q	5' aagaactccagagctctg 3'	Ex 10s	SEC

Sentido (s), antisentido (a). Las bases subrayadas le confieren especificidad al iniciador para la amplificación del gen CYP21.

Con los oligonucleótidos sintetizados previamente se llevó a cabo la amplificación por medio de PCR. La localización de los iniciadores utilizados para amplificar las 6 diferentes regiones son mostrados en la Fig. 6. Se utilizó como control ADN de un cósmido que contiene el pseudogen. Ante la presencia de una mutación en particular se realizaron dos amplificaciones y secuenciaciones directas de manera independiente con la finalidad de confirmar su existencia.⁸

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

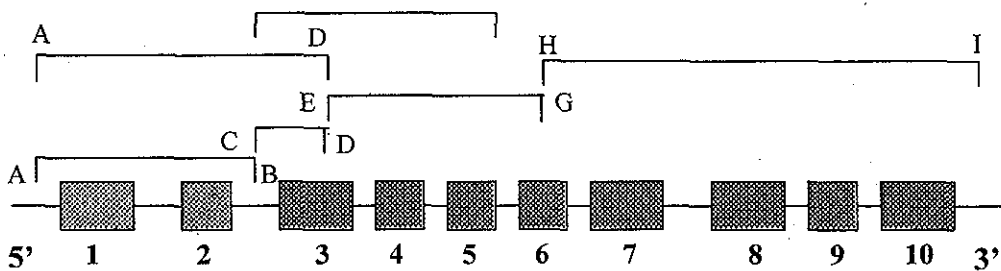


FIGURA 6. Esquema de las 6 diferentes regiones del gen CYP amplificadas por PCR. Los Ex se encuentran numerados. Las letras se refieren a los iniciadores correspondientes señalados en la tabla 3.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se incluyeron 9 pacientes quienes cumplieron con los criterios clínicos, de laboratorio hormonal y moleculares de HSC por deficiencia de la 21-hidroxilasa. De los casos incluidos, tres correspondieron a la misma familia y los otros 6 fueron casos no relacionados.

En la Tabla 4 se muestran los aspectos clínicos de los pacientes. Cinco de los casos de esta serie fueron mujeres. La edad de inicio de las manifestaciones clínicas fue en el período neonatal en las mujeres y en la edad pre-escolar en los varones. La edad de los sujetos a su ingreso varió entre 1 mes y 27 años.

Los pacientes presentaron fenotipo VS en 8 casos y PS solo en un caso. Cuatro sujetos afectados con el fenotipo VS fueron mujeres. Todas ellas presentaron ambigüedad de genitales exteriores. La mitad presentó pubertad precoz y en un caso se encontró amenorrea primaria. Todos los sujetos 46, XY presentaron la variedad VS de la HSC y en todos ellos la pubertad precoz fue la manifestación común de la enfermedad. En una paciente 45, XX, t (13,14) las manifestaciones clínicas correspondieron a la variedad PS (Tabla 4.)

Dentro de los antecedentes familiares es importante considerar que de los 9 casos, 5 sujetos tuvieron un familiar con diagnóstico de HSC, 2 individuos no tuvieron este antecedente y en los 2 restantes no fue posible establecerlo.

TABLA 4. Aspectos clínicos en los pacientes con deficiencia de la 21-hidroxilasa.

Px	Sexo	Edad PMC	Edad de ingreso INCMNSZ	Edad Actual	V	Manifestaciones Clínicas	Antecedentes Familiares
1	M	5 a	17 a	20 a	VS	PP, EOA e HP	1 Ha (PS)
2	M	4 a	27 a	33 a	VS	PP	1 Ha (VS)
3	F	RN	19 a	30 a	VS	AG, AP, H y TB	Nc
4	F	RN	1 m	14 a	PS	AG y ISA	Nc
5	F	RN	18 a	23 a	VS	AG	No
6	M	2 a	18 a	25 a	VS	PP, EOA	No
7	M	1 a	4 a	24 a	VS	PP y EOA	2 Has (VS)
8	F	RN	6 a	25 a	VS	AG, PP y EOA	1 Ha y 1 Ho (ambos VS)
9	F	RN	9 a	24 a	VS	AG, PP y EOA	1 Ha y 1 Ho (ambos VS)

Paciente (Px), femenino (F), masculino (M), edad de primeras manifestaciones clínicas (PMC), año (a), mes (m), recién nacido (RN), variedad (V), pubertad precoz (PP), edad ósea avanzada (EOA), hiperpigmentación (HP), ambigüedad genital (AG), amenorrea primaria (AP), hirsutismo (H), talla baja (TB), insuficiencia suprarrenal aguda (ISA), hermana (Ha), hermano (Ho), ninguno (No) y no concluyente (Nc).

Las manifestaciones clínicas que presentó cada paciente y que se consideraron importantes para establecer el diagnóstico de HSC por deficiencia de la 21-hidroxilasa se especifican en la tabla 5.

En la tabla 6 se muestran de manera conjunta las concentraciones hormonales realizadas a los 9 pacientes. Seis pacientes tuvieron concentraciones elevadas de 17OHP4. Concentraciones de 4A o P4 se realizaron en el 88.8% de los casos.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TABLA 5. Expresión clínica de la deficiencia enzimática de la 21-hidroxilasa

Px	V	Manifestaciones clínicas
1	VS	Sujeto masculino cuyos motivos de consulta a la edad de 5 años fueron talla alta y antecedentes familiares de una hermana con HSC PS. A su ingreso presenta peso y talla por arriba de la percentila 97, vello corporal abundante, vello púbico y edad ósea para 12 años. Es referido a la edad de 17 años con los antecedentes de HSC y pubertad precoz. El examen físico mostró talla de 157 cms, vello púbico tanner 5, pene de 8 cm con testículos sin particularidades.
2	VS	Caso masculino con antecedentes familiares de consanguinidad entre los padres y una hermana con HSC VS. Consultó a los 5 años de edad por presentar acné, talla alta y desarrollo de caracteres sexuales secundarios. Se refiere presentó pubertad precoz y genitales exteriores tanner 5 a los 7 años de edad. Ingresó al INCMNSZ a la edad de 27 años con talla de 159 cms, vello púbico tanner 5, pene de 9 cm y volumen testicular de 25 cm.
3	VS	Sujeto 46, XX con ambigüedad de genitales exteriores al nacimiento. Consulta por primera vez a la edad de 19 años por virilización de genitales exteriores, amenorrea primaria e hirsutismo. El examen físico mostró talla baja de 133 cms, distribución corporal androide, hirsutismo y genitales externos con labios mayores, menores e introito vaginal existentes y clitoris de 5 - 6 cms de tipo peniforme.
4	PS	Sujeto 45, XY, t(13,14) con consulta a la edad de un mes por ambigüedad de genitales exteriores e hiperpigmentación generalizada. A su ingreso, el examen físico mostró labios mayores escrotalizados, y la apariencia de un microfalo con hipospadia. No evidencia de vagina.
5	VS	Caso 46, XX que ingresó a los 9 días de nacida con ambigüedad de genitales exteriores. Le realizaron el diagnóstico de HSC, cirugía reconstructiva genital e iniciaron terapia supresiva con glucocorticoides. Es referida en descontrol metabólico a la edad de 18 años. El examen físico de ingreso mostró talla de 155 cms, mamas tanner 4, labios vulvares mayores redundantes y menores hipotróficos, clitoris pequeño e introito vaginal presente.
6	VS	Caso masculino que a los 4 años de edad consultó por talla y peso mayores que lo esperado a su edad y crecimiento testicular. Cuando ingresó le refieren voz grave, acné, vello púbico tanner 2 y nodulaciones paratesticulares múltiples de 0.5 - 2.5 cms. A los 8 años presentó una edad ósea de 17 años y cuadro clínico de pubertad precoz. Es referido al INCMNSZ con los antecedentes diagnósticos de HSC, pubertad precoz y tumor de restos suprarrenales paratesticulares. Ingresó a los 18 años de edad con 155 cms de talla, vello púbico tanner 5, pene 11 cm y volumen testicular bilateral de 26 cm.
7	VS	Suje Caso 46,XY con peso y talla mayores que lo acorde a su edad y crecimiento marcado de pene a los 4 años de edad. El examen físico de ingreso mostró talla de 115 cms, vello púbico tanner 2, pene de 8 cms, escroto rugoso y pigmentado y volumen testicular bilateral de 4 cc.
8	VS	Caso 46,XX con ambigüedad de genitales exteriores al nacimiento. En otro hospital le diagnosticaron HSC, realizaron cirugía reconstructiva genital e iniciaron terapia supresiva con glucocorticoides. Por crecimiento progresivo de clitoris y apareamiento de vello púbico consultó en el INCMNSZ a la edad de 6 años. A su ingreso, el examen físico mostró talla de 124 cms, no crecimiento mamario, vello púbico tanner 2, clitoris de 3 cms, labios mayores rugosos y escrotalizados con meatos urinario y vaginal independientes.
9	VS	Caso 46,XX que consultó a la edad de 6 años con historia de ambigüedad de genitales exteriores al nacimiento, aumento progresivo en el tamaño de clitoris, rugosidad de labios mayores y vello axilar. En otro hospital le diagnosticaron HSC, realizaron cirugía genital correctiva e iniciaron terapia supresiva con glucocorticoides. Por presentar crecimiento recidivante del clitoris consultó en el INCMNSZ a la edad de 9 años. El examen físico de ingreso mostró talla de 140 cms, voz grave, vello axilar, tanner mamario 1, vello púbico tanner 4, clitoris de 3 cms, labios mayores rugosos y escrotalizados con meatos urinario y vaginal independientes.

Los casos 7,8 y 9 corresponden a la misma familia (hermanos). V (variedad).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 6. Concentraciones hormonales en suero y cariotipos en los 9 sujetos con deficiencia de la 21-hidroxilasa.

Px	Edad	17OHP4 ng/ml	TT ng/ml	AN ng/ml	P4 Ng/ml	SF ng/ml	DHEA ng/ml	Cariotipo y otros estudios
1	17 a.	18 (<2)	5 (3-9)	6 (0.8-2.3)	ND	127 (70-210)	2 (1.5-8)	ND
2	27 a.	16 (<2)	5 (3-9)	10 (0.8-2.3)	ND	91 (70-210)	11 (1.6-8)	ND
3	19 a.	6 (<1)	3 (0.3-0.7)	15 (0.8-0.3)	ND	115 (70-210)	6 (1.6-8)	46, XX
4	1 m.	12 (<2.2)	ND	ND	4 (0.1-0.3)	200 (70-210)	ND	45,XX, (t13,14) Na ⁺ : 124 meq/l K ⁺ : 7.8 meq/l
5	18 a.	>20 (1-3.6)	ND	>10 (0.8-2.3)	ND	ND	4 (1.6-8)	46, XX
6	12 a.	12 (<2)	ND	ND	ND	35 (70-210)	ND	ND
7	4a.	ND	ND	ND	13 (0.1-0.3)	87 (70-210)	ND	46, XY
8	6a.	ND	ND	ND	19 (0.1-0.3)	84 (70-210)	ND	46, XX
9	9a.	ND	ND	ND	12 (0.1-0.3)	ND	ND	46, XX

Paciente (Px), año (a), mes (m), dato no disponible (ND), sodio (Na⁺) y potasio (K⁺). En paréntesis se refieren las concentraciones normales de cada hormona de manera ajustada a la edad y sexo.

En la tabla 7 se señala el análisis molecular y su correlación con la variedad fenotípica en cada uno de los pacientes. Se presentan las mutaciones encontradas en los 6 segmentos analizados y su localización. En el 44.4% (casos 2,3,4 y 6) no se logró encontrar cambios en la secuencia estructural de los segmentos estudiados, a pesar de que su perfil clínico y bioquímico fue compatible con el diagnóstico de HSC por deficiencia de la 21-hidroxilasa.

En 5 pacientes se logró identificar alteraciones en el análisis molecular y 4 de ellos fueron portadores de más de una mutación en las secuencias estructurales analizadas. De los 18 alelos estudiados, en la mitad de ellos fue evidente la

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

presencia de por lo menos una mutación. El tamaño de la serie no permitió el cálculo adecuado de la frecuencia alélica de cada mutación (Tabla7).

Las mutaciones que se encontraron en los pacientes con HSC variedad VS fueron P30L, c/a → g en In 2, I172N, V281L y R356W y N493S. En la única paciente con variedad PS no se encontró mutación en los segmentos analizados.

Las mutaciones encontradas en forma homocigota fueron c/a → g, I172N y N493S. El resto de mutaciones presentes afectaron sólo a uno de los alelos.

En los tres casos familiares, ninguno tuvo HSC con la variedad PS. El análisis molecular mostró diferentes mutaciones en cada uno de ellos. En una paciente (caso 8) se identificó la mutación I172N en el Ex4 que provocó la sustitución de t por a en el nucleótido 1001 de manera homocigota; además se encontró la coexistencia de las mutaciones P30L en Ex1, R356W en Ex8 y el polimorfismo N493S del Ex10 de forma heterocigota. En la segunda paciente (caso 9) se identificaron las mutaciones en I2 de a/c → g, V281L en Ex7 y N493S en Ex10 en uno de los alelos, mientras que en el tercer paciente (caso 7) sólo se identificó el polimorfismo N493S de forma homocigota.

Los casos 7, 8 y 9, miembros de la misma familia, mostraron análisis moleculares diferentes. El árbol genealógico (Fig. 7) no muestra otros afectados en las generaciones incluidas. El patrón conocido de herencia recesiva de esta patología implica que los padres deben de ser portadores obligados, así mismo la presencia de heterocigotos en los abuelos. La isonimia observada permite suponer probable consanguinidad, existiendo de tal forma más probabilidad de transmitir la HSC por deficiencia de 21-hidroxilasa como trastorno autosómico recesivo. Esta

familia, de acuerdo a los tipos de mutaciones encontradas, es portadora de un patrón poco usual de herencia.

TABLA 7. Análisis molecular en los pacientes deficiencia de la 21-hidroxilasa.

Px	V	Mutación	Ex / In	Alelos afectados
1	VS	a/c → g	In 2	++
2	VS	Nd		
3	VS	Nd		
4	PS	Nd		
5	VS	a/c → g V281L	In 2 Ex 7	++ -+
6	VS	Nd		
7	VS	N493S	Ex 10	++
8	VS	P30L I172N R356W N493S	Ex 1 Ex 4 Ex 8 Ex 10	-+ ++ -+ -+
9	VS	a/c → g V281L N493S	In 2 Ex 7 Ex 10	-+ -+ -+

Paciente (Px), variedad (V), no alteración estructural en los segmentos analizados, mutación en los dos alelos (++) y mutación en un alelo (-+).

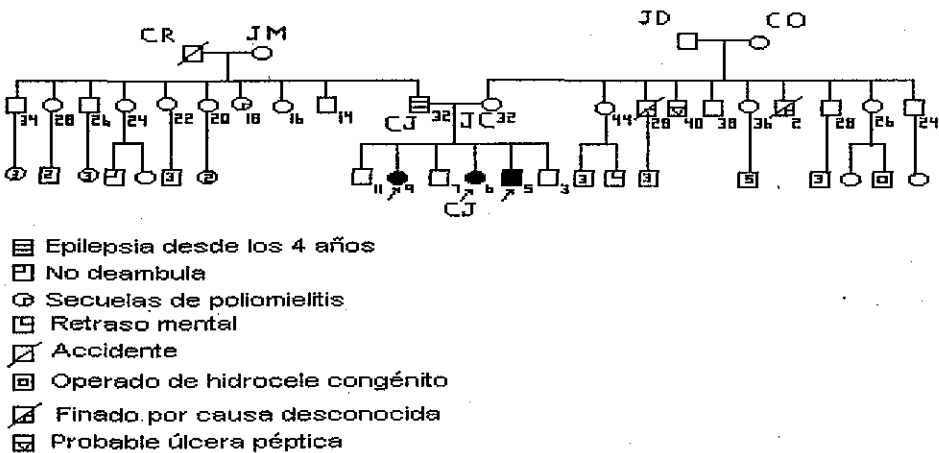


FIGURA 7. Árbol genealógico con tres casos (7, 8 y 9) con diagnóstico de deficiencia de 21-hidroxilasa.

De los 9 individuos estudiados solo en tres se realizó estimulación de las glándulas suprarrenales con ACTH (0.25 mg IV) en 8 horas. Las determinaciones en orina de pregnandioli, pregnantrioli, 17CE y 17OHE de 4 días consecutivos (2 días pre y 2 días post-estimulación) de los casos 7,8 y 9 se muestran en la tabla 8. Los 17CE, pregnandioli y pregnantrioli elevados y las cuantificaciones bajas de 17OHE se consideraron como criterios diagnósticos de HSC.

TABLA 8. Determinación de metabolitos urinarios en los tres casos familiares.

Px	17 Cetoesteroides mg/24h		17 OHesteroides mg/24h		Pregnandioli Mg/24h		Pregnantrioli mg/24h	
	B	E	B	E	B	E	B	E
7	14.0/4.4	20.3/9.1	Nd/Nd	Nd/Nd	7.2/4.6	17.2/4.6	1.7/1.3	3.8/1.5
8	8.0/6.1	11.6/3.9	Nd/Nd	1.6/Nd	5.3/4.8	14.9/3.5	3.1/1.6	5.1/1.6
9	19.2/22.5	33.4/20.3	0.4/Nd	0.4/Nd	7.7/19.4	12.0/7.5	2.3/7.2	5.6/3.0

Condiciones basales (B) y bajo estimulación (E) con prueba de ACTH IV con 0.25 mg. No detectable (Nd). Valores normales: 17CE de 0-1 mg/24h, 17OHE de 1.7-5.2mg/24h, Pregnandioli y pregnantrioli < 1 mg/24h

En la tabla 9 se resumen los aspectos diagnósticos, tanto clínicos como hormonales, de los tres hermanos (2 mujeres y 1 hombre) con fenotipos VS al momento de su ingreso.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TABLA 9. Criterios diagnósticos en los casos familiares con deficiencia de 21-hidroxilasa.

Px	Aspectos Diagnósticos			
	Clinicos	Hormonales basales	Hormonales bajo estimulación (Prueba IV ACTH 0.25mg)	Cariotipo
7	PP y EOA	P4, Pregnan diol, Pregnan triol y 17CE altos. 17OHE bajos.	Pregnan diol, Pregnan triol y 17CE altos. 17OHE bajos. SF basal: 87.9 ng/ml y RM de 229.0 ng/ml a las 8 h. P4 basal: 8.9 ng/ml y RM de 45.3 ng/ml a las 8 h.	46,XY
8	AG, PP y EOA	P4, Pregnan diol, Pregnan triol y 17CE altos. 17OHE bajos	Pregnan diol, Pregnan triol y 17CE altos. 17OHE bajos. SF basal: 80.1 ng/ml y RM de 124.5 ng/ml a las 8 h. P4 basal: 19.0 ng/ml y RM de 24.8 ng/ml a las 8 h.	46,XX
9	AG, PP y EOA	P4, Pregnan diol, Pregnan triol y 17CE altos. 17OHE bajos	Pregnan diol, Pregnan triol y 17CE altos. 17OHE bajos. P4 basal: 11.9 ng/ml y RM de 21.0 ng/ml a las 7 h.	46,XX

Paciente (Px), pubertad precoz (PP), edad ósea avanzada (EOA), ambigüedad genital (AG) y respuesta máxima (RM).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Se analizaron los 9 pacientes con diagnóstico clínico y hormonal de HSC por deficiencia de la 21-hidroxilasa. En su mayoría los casos estudiados presentaron HSC variedad VS (8 sujetos) y solo un caso correspondió al fenotipo PS.

Se ha descrito que existen diferencias en las bases moleculares de la deficiencia de 21-hidroxilasa entre las poblaciones Mexicana y Caucásica, tanto en el tipo y frecuencia de las mutaciones, como también en los mecanismos involucrados en la transmisión de la enfermedad.⁷⁻⁹

El estudio reveló la presencia de mutaciones en la mitad de los 18 alelos estudiados. No se establecieron las frecuencias alélicas para cada una de las mutaciones ni tampoco se realizó la comparación de frecuencias con otros grupos étnicos por el pequeño número de casos incluidos. Se detectaron mutaciones para el In 2 y los Ex 1,4,7,8 y 10 en 5 de los 9 pacientes estudiados. No se encontró ningún caso de delección de CYP21. Las mutaciones encontradas han sido descritas previamente en la literatura.^{2,3}

La mutación en In 2 (In 2 "g") se detectó con mayor frecuencia. Esta mutación se presentó en tres pacientes, dos casos homocigotos y uno heterocigoto. El nucleótido localizado 13 pares de bases antes del final del In 2 (nt 656) contiene una a o una c en individuos normales. La mutación a g constituye la alteración alélica más frecuente en la deficiencia de 21-hidroxilasa clásica y se observa asociada a los fenotipos VS y preferentemente PS. Esta mutación resulta en la pérdida del 95% de la actividad enzimática en cultivos celulares.³ En este estudio, el fenotipo de los pacientes homocigotos para esta mutación fue VS. En el caso heterocigoto que se presentó de forma conjunta con las mutaciones R356W y N493S el fenotipo expresado fue VS.

El caso de la mutación I172N homocigota en Ex 4 correspondió al fenotipo VS. Esta paciente presentó también mutaciones en uno de los alelos del Ex 1 (P30L), Ex 8 (R356W) y Ex 10 (N493S). En la literatura, la mutación I172N es la única específicamente asociada con la variedad VS, con una actividad enzimática del 1% en cultivos celulares.³ La mutación en Ex 1, en la que P es sustituida por L por el cambio de c a t en el nucleótido 89, produce una enzima con 30 -60% de actividad cuando es expresada en cultivos celulares.^{3,33} P30L se ha asociado al fenotipo no clásico con signos severos de exceso de andrógenos y ha sido descrita

en un sexto de los alelos involucrados en pacientes con HSC no clásica. La mutación R356W en el Ex 8 se asocia a la variedad PS y a inactividad enzimática y la mutación del exón 10 corresponde a polimorfismos.³ Pese a la variabilidad de los alelos mutantes, la expresión fenotípica en esta paciente se asoció a la mutación homocigota descrita para el EX 4.

Los casos pertenecientes a la misma familia, con mutaciones diferentes entre ellos y sin mutación homocigota en común, presentaron fenotipo VS. Esta expresión clínica como HSC VS en los tres hermanos no se puede explicar por el polimorfismo compartido pues éste presenta un 100% de actividad enzimática normal. En los tres hermanos, solo la mutación homocigota I172N para uno de los casos femenino se correlaciona con la variedad clínica presentada.

En este estudio las mutaciones homocigotas encontradas (I172N e In 2 "g") se asociaron al fenotipo correspondiente en concordancia con otras series ya descritas. Aún con ello, se ha informado que la expresión clínica de la enfermedad no solo depende de las mutaciones presentes en el análisis molecular y que el fenotipo no siempre se correlaciona al genotipo.^{2,4,26}

En 8 alelos (4 pacientes) no se encontró ninguna mutación en los segmentos analizados. El perfil clínico y metabólico de estos pacientes fue compatible con deficiencia de la 21-hidroxilasa, por lo que es posible que estos casos sean candidatos a ser portadores de nuevas mutaciones puntuales o de mutaciones en la región reguladora del gen. Al igual que éstos, el paciente homocigoto para el polimorfismo N493S sin ninguna otra mutación identificada (caso 7) y los pacientes con mutaciones idénticas y fenotipos discordantes (descritos en otras series)⁸ son posibles candidatos a portar mutaciones en la región reguladora del gen. Es probable que existan también eventos de conversión génica no solo a nivel de la región codificadora, sino también a nivel de la región reguladora.

Otro aspecto de interés es la heterogeneidad en las mutaciones presentadas en los casos 7, 8 y 9. Ante las diversas mutaciones presentadas por los pacientes, debe de tomarse en consideración que puede tratarse de casos de no paternidad, aunque esta condición es poco probable por presuponer tres padres portadores obligados de mutaciones distintas. Ante la sospecha de no paternidad está indicada la realización de huella digital de ADN. Se han descrito con anterioridad familias con patrón poco usual de transmisión de la enfermedad.^{8,9} Los mecanismos genéticos involucrados en la transmisión de la enfermedad en esta familia podrían

ser la presencia de distintos alelos mutantes en los progenitores, mosaicismo gonadal o mutaciones *de novo*.

La identificación de familias con hijos afectados, en las que se pueda realizar el análisis de segregación de las mutaciones causantes de la enfermedad, contribuirá de manera significativa a esclarecer los mecanismos genéticos involucrados en la expresión de la deficiencia enzimática de 21-hidroxilasa, como también a proveer un mejor consejo genético.

CONCLUSIONES

Se analizaron 15 mutaciones previamente informadas en 9 pacientes con HSC por deficiencia de 21-hidroxilasa. El análisis molecular reveló la presencia de mutaciones en la mitad de los alelos estudiados.

En la forma homocigota se encontraron las siguientes mutaciones: en In2 el cambio de bases a/c → g, I172N en Ex 4 y el polimorfismo del Ex 10. La asociación de las dos primeras al fenotipo VS fue de acuerdo a lo descrito en otras series. Se encontraron otras mutaciones de forma heterocigota en el In 2 y los Ex 1, 7, 8 y 10. La deficiencia de 21-hidroxilasa se hereda de manera autosómica recesiva por lo que las mutaciones en forma heterocigota no deberían expresarse en variantes clínicas de la HSC. La presencia de pacientes heterocigotos compuestos que manifiestan la enfermedad y sus mecanismos de expresión son aspectos todavía no esclarecidos sobre esta patología.

Los 4 pacientes con mutaciones no identificadas en las secuencias estructurales analizadas y el paciente homocigoto para la mutación N493S con ninguna otra mutación identificada son candidatos a portar nuevas mutaciones o bien, mutaciones dentro del área reguladora del gen. Puede especularse que no sólo se den fenómenos de conversión génica a nivel del área codificadora sino también en la región reguladora.

Se identificó una familia con tres miembros afectados con diversas mutaciones y sin ninguna mutación homocigota en común, lo que sugiere sean casos de no paternidad o un patrón poco usual de herencia. Como explicación a este hallazgo se sugiere la posibilidad de distintos alelos mutantes en los progenitores, mosaicismo gonadal o posibles mutaciones *de novo*.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Merke D, Bornstein S, Avila N, Chrousos G. Future directions in the study and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Ann Intern Med.* 2002;136:320-334.
3. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev.* 2000;21:245-291.
4. Wilson R, Mercado A, Cheng K, New M. Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:2322-2329.
5. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1985;37:650-667.
6. Tusie MT, White PC. Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:10796-10800.
7. Tusie MT, Ramirez S, Ordoñez ML, Cabello J, Altamirano N, Calzada R, Robles C, Mendoza F, Mendez JP, Terán M. Low frequency of deletion alleles in patients with steroid 21-hydroxylase deficiency in a Mexican population. *Human Genet.* 1996;98:376-379.
8. Ordoñez M, Ramírez S, López A, Riba L, Gamboa S, Cerrillo M, Altamirano N, Calzada R, Robles C, Mendoza F, Tusie M. Molecular genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population: identification of possible new mutations and high prevalence of apparent germ-line mutations. *Hum Genet.* 1998;102:170-177.

9. López A, Riba L, Ordoñez M, Ramírez S, Cerrillo M, Tusié M. Uniparental disomy for chromosome 6 results in steroid 21-hydroxylase deficiency: evidence of different genetic mechanisms involved in the production of the disease. *J Med Genet.* 1998;35:1014-1019.
10. White PC, New MI, Dupont B. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med.* 1987;316:1519-1524, 1580-1586.
11. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Tusié MT, Lesser M, New MI, Perrin CW. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest.* 1992;90:584-595.
12. Findling J, Aron D y Tyrrell B. Glucocorticoides y andrógenos suprarrenales. En: Greespan F y Strewler G. Editorial Manual moderno, México. *Endocrinología básica y clínica.* 4ª edición. 2000;361-410.
13. Finkelstein M, Schaefer JM. Inborn errors of steroid biosynthesis. *Physiol Rev.* 1979;59:353-406.
14. Lingappa V, Mellon S. Síntesis y liberación de hormonas. En: Greespan F y Strewler G. Editorial Manual moderno, México. *Endocrinología básica y clínica.* 4ª edición. 2000;43-64.
15. White CP. Genetics of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Rec Prog Horm Res.* 1987;43:305-336.
16. Picado-Leonard J, Miller WL. Homologous sequences in steroidogenic enzymes, steroid receptors and a steroid binding protein suggest a consensus steroid binding sequence. *Mol Endocrinol.* 1988; 2:1145-1150.
17. White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:5111-5115.
18. Higashi Y, Hidefumi Y, Yamane M, Gotoh O. 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.* 1986;83:2842-2845.

19. White PC, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin DD, New MI, Dupont B, Strominger JL. Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:1089-1093.
20. White PC, Vitek A, Dupont B, New MI. Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:4436-4440.
21. Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Fujii-Kuriyama Y. 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.
22. Wilson R, Wei J-Q, Cheng K, Mercado A, New MI. Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allelic-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:1635-1640.
23. Mornet E, Crété P, Kuttann F, Raux-Demay M, Boué J, White PC, Boué A. Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet*. 1991;48:79-88.
24. Helmberg A, Tusie-Luna MT, Tabarelli M, Kofler R, White PC. R339 and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. *Mol Endocrinol*. 1992;6:1318-1322.
25. Jaaskelainen J, Levo A, Voutilainen R, Partanen J. Population-wide evaluation of disease manifestation in relation to molecular genotype in steroid 21-hydroxylase (CYP-21) deficiency: good correlation in a well defined population. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:3293-3297.
26. Deneux C, Tardy V, Dib A, Mornet E, Billaud L, Charron D, Morel Y, Kuttann. Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:207-213.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

27. Kucharska M. Use of Zimmermann reaction for the determination of 3-keto and 20-ketosteroids. *Acta Pol Pharm.* 1969;1:69-74.
28. Merino MC, García RF, Flores MS. A simplified method in determination of blood 17-hydroxiprogesterone by radioimmunoassay. *Ginecol Obstet Mex.* 1994;62:354-361.
29. Scott JZ, Stanczyk FZ, Goebelsmann U, Mishell DR. A double-antibody radioimmunoassay for serum progesterone using progesterone-3-(O-carboxymethyl) oximino-[125I]-iodo-histamine as radioligand. *Steroids.* 1978;3:393-405.
30. Collins W, Mansfield MD, Alladina N, Sommerville I. Radioimmunoassay of plasma testosterone. *J Steroid Biochem.* 1972;3:333-348.
31. Jeffcoate SL. A radioimmunoassay for testosterone, androstenedione and other 3-oxo-4-unsaturated steroids. *J Endocrinol.* 1971;3:2-3.
32. Tusié M, Traktman P, White P. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP-21) using recombinant vaccinia virus. *J Biol Chem.* 1990;265:20916-20922.
33. Tusie MT, Speiser PW, Dunic M, New MI, Perrin CW. A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol Endocrinol.* 1991;5:685-692.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**