

Hiperplasia suprarrenal congénita. Correlación genotipo/fenotipo

Begoña Ezquieta Zubicaray

Laboratorio de Diagnóstico Molecular. Servicio de Bioquímica. Hospital G. Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

ESTUDIO DE LA RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO EN LA HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA (HSC)

Una importante aplicación de la caracterización molecular de los pacientes con HSC por deficiencia de 21-OH (21OHD) es la posibilidad de establecer una relación entre los hallazgos moleculares y el fenotipo ó grado de severidad de la presentación clínica (clásica CL; pierde sal PS ó virilizante simple VS; no clásica NC). La correlación es tan directa que algunos autores consideran que el genotipaje de mutaciones puede ser más relevante que la propia categorización clínica de estos pacientes, ya que la severidad clínica puede estar condicionada por el stress y otros factores ambientales y queda oscurecida por factores relacionados con el sexo.

Hay dos situaciones especialmente importantes, en las que el diagnóstico molecular es totalmente "ciego" (porque la forma clínica todavía no se ha desarrollado), el diagnóstico prenatal y los estudios moleculares tras cribado neonatal positivo dudoso, en las que los datos derivados del estudio genotípico pueden ser utilizados para orientar el potencial comportamiento clínico y actuar de forma acorde. En ambas hemos constatado la gran relación existente entre el dato molecular anticipado y la evolución clínica posterior. El diagnóstico molecular permite, no sólo conocer la situación del feto para mantener ó no un tratamiento prenatal ya instaurado, sino definir si se plantea ó no la indicación del tratamiento (si ambos progenitores presentan mutación severa: anteriormente, sólo cuando había un primer hijo afecto; ahora, también en pacientes y portadores genotipados). Por otro lado, ante datos positivos del cribado neonatal, especialmente aquellos que son "border line" ó falsos y los no acompañados de clínica evidente, se ha de hacer un seguimiento clínico, en el que el dato negativo del estudio molecular básico resulta de ayuda.

La existencia de esta correlación ha de ser establecida mediante el estudio de grupos amplios de pacientes, que hayan sido clasificados según la severidad de la forma clínica, y cuyo genotipo se conozca de forma completa (dos alelos segregados) tras un análisis específico y depurado.

Correlación genotipo/fenotipo en enfermedades monogénicas y poligénicas

La 21OHD, tanto en sus formas leves como severas, es una enfermedad monogénica autonómica recesiva, en la que los signos clínicos se derivan del grado de déficit enzimático condicionado por ambos alelos deficientes, paterno y materno, el cual dará lugar a la acumulación de precursores y la falta de los productos finales de esta vía metabólica. De hecho, todos los trabajos y revisiones recientes resaltan esta estrecha relación (por supuesto, no total), y es importante conocer que algunas faltas de correlación descritas en el pasado se debían a errores analíticos ó de interpretación (motivados por la complejidad del locus 21OH y su mecanismo de producción de mutaciones) que pueden y deben ser evitados. Por otro lado, no debemos olvidar que la clínica de hiperandrogenismo (típica de las formas NC de la deficiencia) es debida, sólo en un pequeño porcentaje, a las mutaciones en ambos alelos de este gen recesivo, siendo en su mayoría de base poligénica, es decir, fruto de la interacción de variantes polimórficas normales de genes diversos. La aparición de signos de hiperandrogenismo en los portadores 21OHD ha sido descrita por algunos autores y rechazada por otros.

Los estudios de correlación genotipo-fenotipo han de ser, por el momento, aplicados a entidades de base monogénica ya que lo limitado de nuestro análisis ante variables poligénicas (de las que sólo manejamos una fracción) hace que no podamos establecer las relaciones y con ello predecir fenotipos. Es de esperar que el inmenso avance propiciado por el conocimiento de la secuencia del DNA humano y el derivado del desarrollo

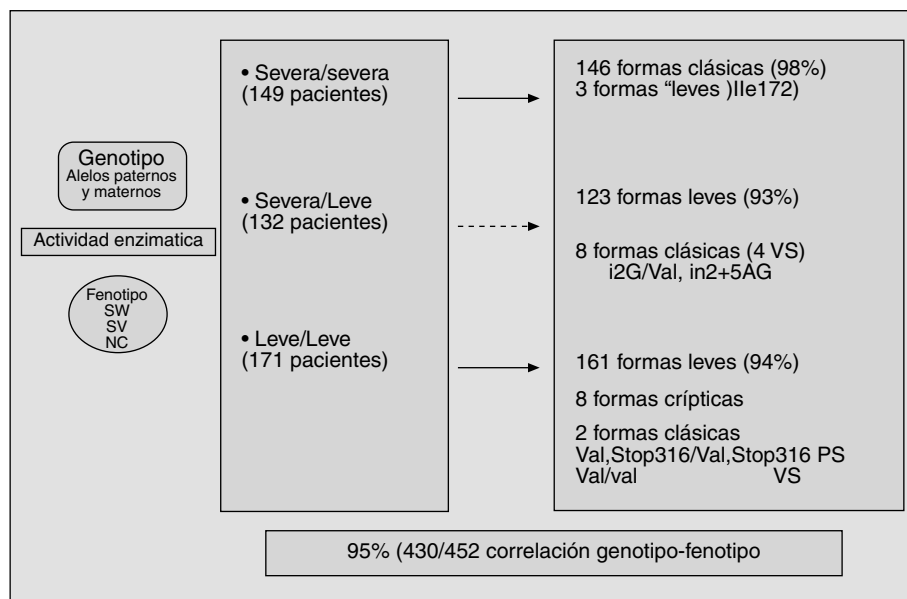


Fig. 1. Correlación genotipo-fenotipo en 452 enfermos en HSC 210HD completamente genotipados en CYP21A2.

de las herramientas de genotipaje a gran escala y el análisis computacional permitan el análisis conjunto de estas variables y, con ello, abordar en un futuro no lejano el manejo de las entidades poligénicas.

Elevada prevalencia y gran potencial de caracterización molecular en la 21OHD

Centrándonos en la entidad monogénica 21OHD, los datos de correlación obtenidos en 452 pacientes completamente genotipados y clasificados en base al diagnóstico clínico (PS, VS, leve/no clásico, oligosintomático/críptico) establecido por los Endocrinólogos, son indicadores también en nuestra población de una elevada relación 95% (Fig 1) que analizaremos más adelante.

El gran potencial de caracterización molecular de los alelos 21OHD es debido a que la mayoría de los alelos mutados se producen por unos mecanismos comunes de recombinación asimétrica y conversión génica (que son consecuencia de la constitución del locus, con una duplicación gen/ pseudogén no funcional) y el análisis de una batería limitada de mutaciones (aquellas generadas por estos mecanismos Fig 2) ó "cribado básico" constituido por el estudio de deleciones, conversiones y mutaciones puntuales recurrentes permite detectar una gran mayoría de alelos, 93% en forma CL y 85% en NC. Ello dota de un gran rendimiento diagnóstico al estudio molecular, si bien, no debemos olvidar que lo dificulta en el sentido de que hace imprescindible garantizar una especificidad y una adecuada interpretación de resultados. El hecho de que la 21OHD sea una entidad frecuente (portadores de mutación severa, 1:60; leve 1:8) contribuye a que las series de pacientes sean muy amplias (Figs 1,3). Por todo ello se dispone de información fenotípica de gran número "combinaciones" de

alelos deficientes que nos permite elaborar un estudio significativo.

Los alelos no caracterizados en el "cribado básico" son sometidos a secuenciación directa, que tiene un gran potencial de caracterización de los alelos clásicos (severos), completando la caracterización hasta el 99% (Figs 2,3), pero tiene un menor rendimiento en las formas NC con un leve incremento de tan sólo un 2% de caracterización complementaria. Se especula que puedan presentar alteraciones en zonas reguladoras no exploradas. Recientemente hemos tenido ocasión de caracterizar una variante en la región promotora (-4b C/T) en una forma VS. Curiosamente, el pequeño número de pacientes clásicos que queda sin caracterizar tras el estudio completo, son formas VS. No debemos perder de vista que ha de contemplarse también la posibilidad de que se deban a mutaciones en otros genes como, obviamente la 11beta hidroxilasa, y también el gen de la P450 oxidoreductasa (enzima auxiliar de estos enzimas, ver Fig 3), cuyas mutaciones se han descrito recientemente en la HSC por "déficit combinado 17-21OH".

En la Fig 3 se incluye la Tabla relativa a las frecuencias de mutaciones en las tres formas clínicas, PS, VS y NC de forma independiente; ya que, si se hiciera de forma conjunta, la asociación específica de algunas mutaciones a determinados fenotipos quedaría enmascarada, y se distorsionaría la distribución de frecuencias según incluyéramos un mayor ó menor número de cada tipo de pacientes.

Mutaciones graves y leves. Mutaciones recurrentes y nuevas.

Los estudios de actividad enzimática de los alelos mutados se realizan in vitro. La mutación se introduce en el

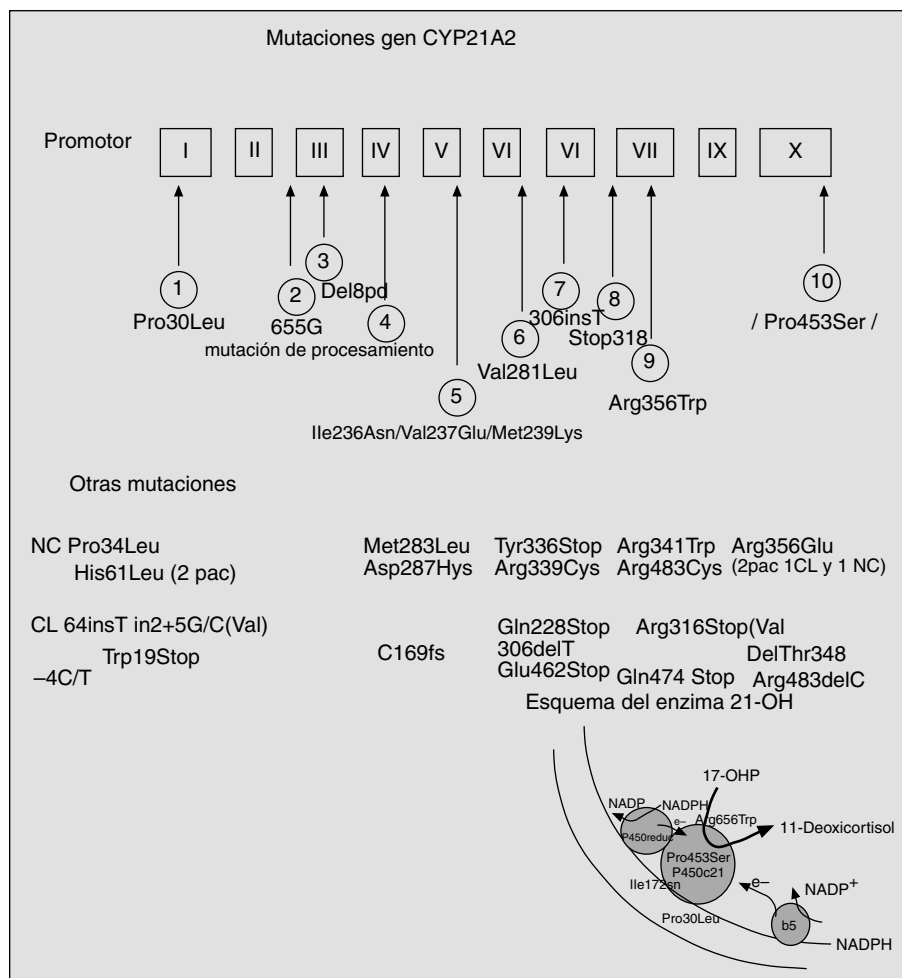


Fig. 2. Mutaciones puntuales detectadas en el gen CYP21A2 (severas, negros y leves, azul recurrente (arriba) y "raras" (detectadas por recuenciación en nuestra población, abajo). Figura esquemática de la esteroide 21-hidroxilasa ubicada en la membrana microsomal y sus enzima auxiliares y localización de las mutaciones.

gen mediante mutagénesis dirigida, expresándose posteriormente y evaluando la actividad del enzima mutado frente a un control, que proviene de la expresión, también in vitro, del gen normal. De esta manera se ha definido como mutación severa del gen de la 21-OH, aquella que deja una actividad residual menor ó igual que el 1%. Se incluyen también como mutaciones severas aquellas que, en homocigosis, se asocian invariablemente con formas PS. Son, por ello, mutaciones severas: las deleciones y conversiones grandes; las mutaciones que dan lugar a que aparezca un codón de parada, tanto porque el cambio de base genere un codón de parada (Gln318Stop), como porque suponga una inserción o deleción de base/s y el consiguiente desplazamiento de la fase de lectura con la aparición del "Stop" (deleción 8pb y 306insT); mutaciones de cambio de aminoácido que se ubican en el dominio de centro activo (Arg356Trp y triple mutación del exón 6); y la mutación que afecta al procesamiento del mRNA (655 A6C>G). La mutación de cambio de aminoácido, Ile172Asn, da lugar a un enzima con una actividad residual del 1-2% y se asocia con formas VS (Fig 3). La mu-

tación 655G puede también comportarse como moderadamente severa, asociándose en ese caso en homocigosis con formas neonatales no PS (en esta serie, una gran mayoría (18/20) de los homocigotos 655G fueron formas PS).

Las 21 nuevas mutaciones que hemos detectado en estos pacientes se recogen en la Fig 2. En las formas CL (64insT, Gln228Stop, Arg316Stop, C169 "frame shift", Trp19Stop, 306delT, DelThr348, Glu462Stop, Gln474Stop, Arg483delC) son mutaciones del tipo: codones de parada, desplazamientos de fase de lectura o cambios no conservativos en regiones importantes para la funcionalidad (centro activo, zona de interacción con los enzimas auxiliares, anclaje en la membrana, transferencia de electrón). En las formas NC (Pro34Leu, Met283Leu, His61Leu, Asp287Hys, Arg339Cys, Arg341Trp) son mutaciones generalmente de cambio de aminoácido, aunque en un pequeño porcentaje se ha detectado alguna mutación severa (Tyr336Stop, Arg356Glu, Arg483delC) lo que tiene importancia en el consejo genético. En ocasiones, estas nuevas mutaciones que encontramos en pacientes es-

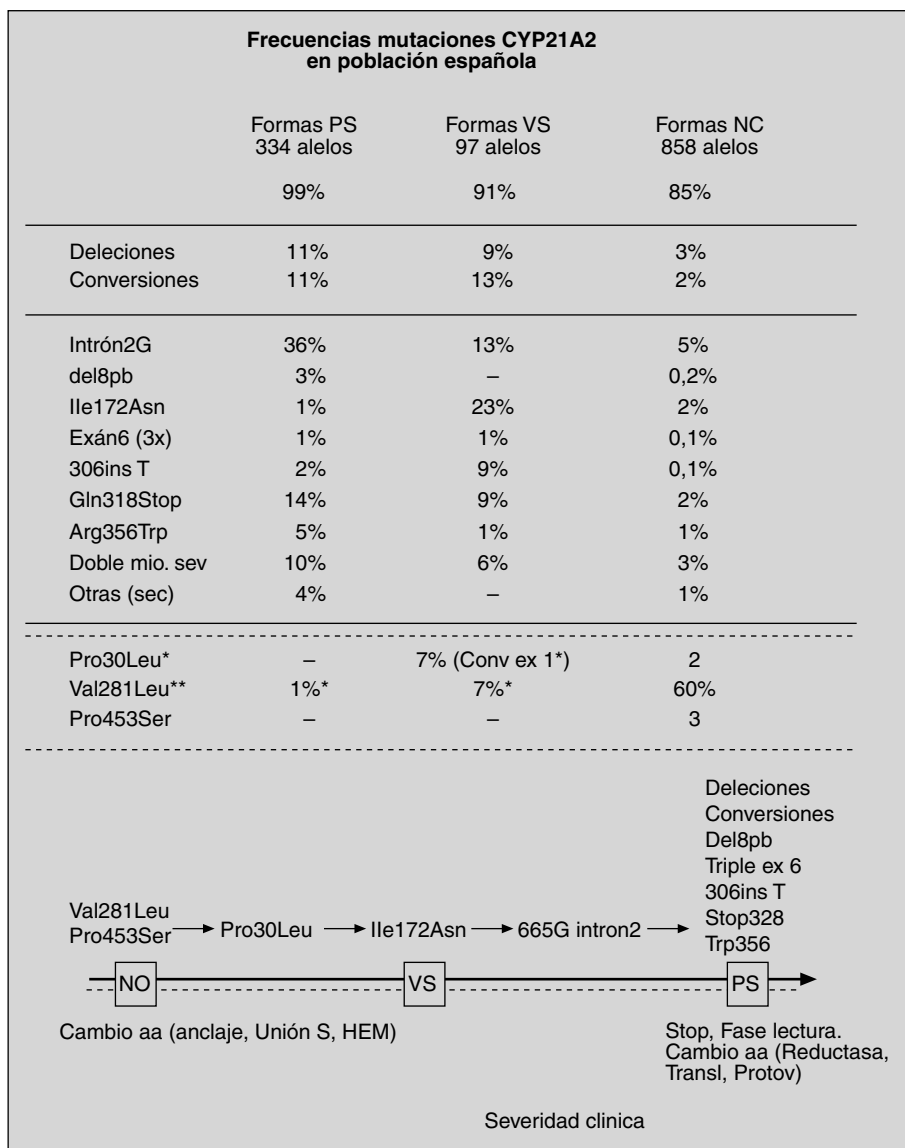


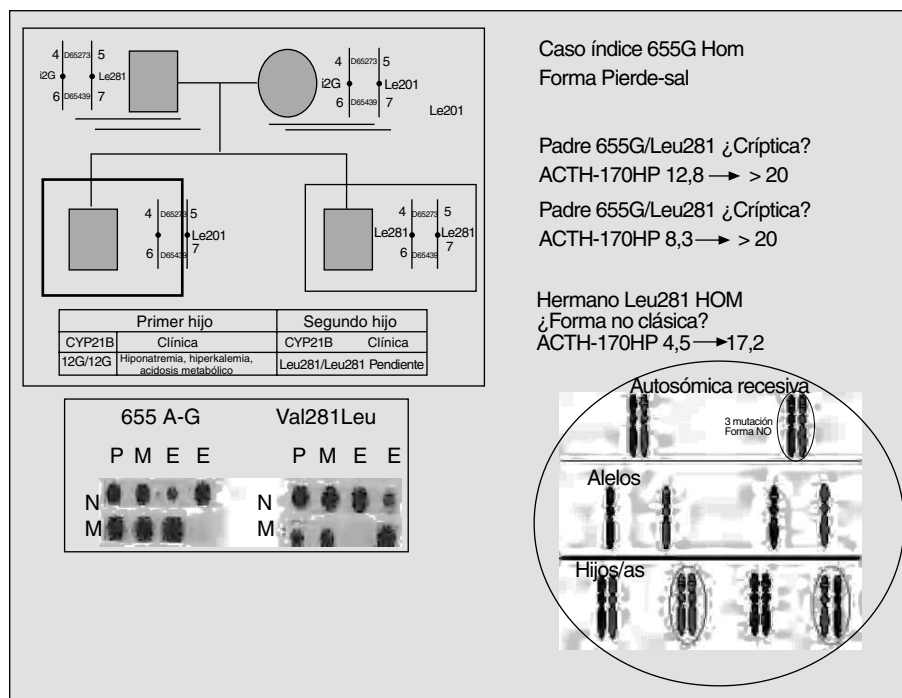
Fig. 3. Distribución de frecuencias de los distintos tipos de alelos mutados 21OH en las distintas formas clínicas en población española (severos entre líneas continuas, y leves entre líneas discontinuas).

pañoles (alguna de ellas en dos pacientes no relacionados) ya se habían detectado en pacientes de otras poblaciones y recogido en la base de datos específica de CYP21A2 (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>), donde quedan recogidos los alelos deficientes que se van publicando. Desde un punto de vista asistencial, que es el que nos ocupa, este hecho tiene gran interés, ya que el hecho de que existan pacientes no relacionados con idénticos alelos mutados ayuda a conocer la trascendencia fenotípica (clínica) del hallazgo molecular. No debemos olvidar que no todas los cambios encontrados en la secuencia son mutaciones y muy frecuentemente se trata de polimorfismos. Las nuevas mutaciones se producen por los mecanismos tradicionales y no deben ser confundidas con las mutaciones “de novo” que, aunque son infrecuentes, 1% de los alelos mutados, sí se producen en 21OHD aunque en este

caso por los mecanismos propios del locus 21OH, recombinación asimétrica y conversión génica. Es importante descartar errores de toma de muestra, temas de paternidad y donaciones para fertilización in vitro. También hemos detectado dos mutaciones de procesamiento del RNAm que afectan a nucleótidos consenso de estas regiones intrónicas (in2+5G>A gen 21OH, in3-2G>A gen 11OH) y otras variantes intrónicas como in8-34 A/G gen 21OH.

Las mutaciones se consideran leves cuando el enzima mutado in vitro muestra una actividad igual ó menor al 25% y/o sus constantes enzimáticas se ven afectadas (velocidad máxima, especificidad de sustrato). Estas mutaciones son: Val281Leu, Pro30Leu y Pro453Ser. La mutación Pro30Leu ha de ser considerada leve-severa ya que en ocasiones se presenta en formas VS. En este estudio se han detectado alelos en los que la Pro30Leu

Fig. 4. Formas clínicas distintas en una misma familia: pierde-sal en índice y no clásica/críptica en padres y hermano. Patrón de herencia Mendeliana autosómica recesiva en que aparece un tercer alelo (continuo) con mutación leve que segrega en hermano que presentaría forma no clásica/críptica (continuo) al igual que el progenitor, mientras que el caso índice sería una forma clásica (discontinuo).



formaba parte de una conversión que involucraba también a la región promotora (ver más adelante). La mutación Pro453Ser fue inicialmente descrita como no debida a mecanismo de conversión, aunque algunos autores han detectado posteriormente algunos pseudogenes que la presentan y se ha encontrado de forma recurrente en todas las poblaciones, siempre asociada con la forma NC. La mutación Arg339His es también una mutación leve aunque no se debe al mecanismo de microconversión y es más infrecuente. En la Fig 3 se esquematiza la esteroide 21-hidroxilasa con sus enzimas auxiliares en la membrana microsomal, indicando la ubicación de las mutaciones de cambio de aminoácido en los correspondientes dominios funcionales de la proteína: centro activo e interacción con enzimas auxiliares y transferencia de protones (triple mutación en exón 6 y Arg356Asn), unión a membrana (Ile172Asn y Pro30Leu) y unión de grupo prostético (Val281Leu y Pro453Ser). En cuanto a las nuevas mutaciones detectadas por secuenciación aquellas en que aparecen codones de parada, desplazamientos de fase de lectura se consideran severas. Los cambios de aminoácido no conservativos en regiones importantes para la funcionalidad (centro activo, zona de interacción con los enzimas auxiliares, anclaje en la membrana, transferencia de electrón) pueden ser considerados severos pero son los estudios in vitro los que documentan su gravedad. Los cambios de aminoácido en regiones de menor importancia funcional deben ser documentados in vitro o haberse encontrado en pacientes no relacionados y no estar presentes en cromosomas normales.

Datos de correlación genotipo/fenotipo en población española

Para el estudio de la correlación genotipo/fenotipo los pacientes se agrupan según combinen en su genotipo dos mutaciones severas, una mutación leve y una severa o dos mutaciones leves. Según definió Speiser la afectación enzimática esperada de la combinación de dos mutaciones severas sería total (actividad nula), mientras que sería parcial cuando se combinaran dos mutaciones leves ó una mutación leve y una severa. El estudio de correlación genotipo/fenotipo sólo puede hacerse sobre los pacientes completamente genotipados (mutaciones caracterizadas en ambos alelos paterno y materno). Podemos afirmar que existe una muy fuerte, aunque no total, relación (430/453, 95% de los pacientes mostraron el fenotipo esperado).

Los pacientes con dos mutaciones severas, homocigotos ó heterocigotos compuestos, presentaron formas CL en un 98% (146/149). Los tres pacientes diagnosticados de forma NC en este grupo, presentaban la mutación Ile172Asn y su 17OHP (superior a 100ng/mL) denotaba déficit severos. Se trataba de dos niñas (clitomegalia en una de ellas y pubarquia (4 a) en la otra) y un varón, presentando todos ellos severa AEO. Los pacientes con dos mutaciones leves presentaron mayoritariamente una forma leve (161/171, 94%), y 8 de ellos mostraron una forma críptica. Las formas crípticas sí manifiestan bioquímicamente la deficiencia, tanto su 17OHP basal como tras estímulo con ACTH es alta; la falta de relación estaría, no entre los hallazgos moleculares y el déficit enzimático sino, entre el grado de dé-

ficit enzimático y la clínica generada por esos andrógenos en exceso. De cualquier manera, se han contabilizado como falta de correlación genotipo-fenotipo. Dos pacientes homocigotos para Val281Leu, habían sido diagnosticados de formas CL. En uno de los casos se trataba de una forma PS y el estudio complementario de secuenciación mostró la existencia de una segunda mutación Arg386Stop también en homocigosis (por consanguinidad no conocida y documentada por marcadores indirectos), por lo que no debe contabilizarse como falta de correlación. En el segundo caso se trataba de una paciente etiquetada como forma VS con clitoromegalia y 17OHP basales de 8 y 14ng/mL.

En lo que se refiere la correlación en pacientes que presentaron las mutaciones no recurrentes detectadas por secuenciación, se encontró una buena correlación. En las formas CL, las alteraciones se localizan en zonas codificantes y ocasionan desplazamientos de la fase de lectura y codones de parada (Fig 2). Mientras que en las formas NC se detectan cambios de aminoácido no conservativos. Los alelos "raros" se detectan generalmente en heterocigosis compuesta con las mutaciones frecuentes y en algún caso aislado en homocigosis. La consanguinidad no conocida en ancestros debe ser siempre considerada cuando un paciente con forma CL resulta negativo (ambos alelos) en el cribado básico. La situación más improbable, se nos ha planteado en un paciente (de origen ecuatoriano) con una forma PS que era heterocigoto compuesto para dos mutaciones "raras" (C169fs/Gln462Stop).

Los heterocigotos compuestos para mutación leve y severa presentaron mayoritariamente (123/132, 93%) una forma leve, como podíamos esperar del déficit enzimático parcial producido por este genotipo. En este grupo se encontró una mayor dispersión, ya que se encontraron 8 pacientes con formas CL (4 de ellas VS). Todos ellos presentaban Val281Leu en el alelo leve, lo que ha sido también descrito en otras series. En una de las formas PS, la secuenciación complementaria nos permitió poner de manifiesto que existía una segunda mutación en el alelo Val281Leu, que afectaba a una base consenso (conservada en 80%) implicada en el procesamiento del RNAm, pero no hemos encontrado otras alteraciones en el resto. De cualquier manera, no podemos excluir que exista alteración en otras zonas de regulación de la expresión (ya que éstas se extienden más allá de las bases próximas al inicio de la proteína) y estos alelos deben ser "interpretados" como severos en el consejo genético. Cabe señalar que en este grupo de mutación leve/severa también se encontraron formas crípticas y oligosintomáticas tanto en pacientes adultos como pediátricos).

Correlación genotipo/fenotipo en las formas VS

Las formas VS presentaron mayoritariamente una heterocigosis compuesta para Ile172Asn y cualquiera

de las mutaciones severas (Fig 3), aunque cuatro pacientes presentaban Val281Leu en heterocigosis con una mutación severa y han sido mencionadas más arriba. La actividad residual del alelo Ile172Asn, aunque reducida 1-2%, podría explicar la producción mínima de aldosterona que previniera la pérdida de sal. Dos formas VS fueron homocigotas para la mutación de procesamiento del intrón 2, este hecho, que ha sido también descrito en otras series, se atribuye a un cierto grado de procesamiento alternativo correcto del mRNA en estas pacientes. El resto de pacientes homocigotos para esta mutación en nuestra serie (18 pacientes) asociaron formas PS. Dos pacientes que presentaban la mutación Ile172Asn en heterocigosis compuesta con mutación severa y un tercero que la presentaba en homo/hemizigosis habían sido diagnosticados como formas NC y han sido comentados en el apartado anterior. La mutación Pro30Leu del exón 1, también se encontró asociada con estas formas VS, 7% de alelos (Fig 3) y debe ser considerada leve/severa. En estos alelos hemos podido documentar, mediante el estudio de Southern, que la microconversión se extiende a la región promotora, lo que podría condicionar que se viera afectado también el nivel de expresión de la proteína y fuera mayor el grado de déficit

Correlación genotipo/fenotipo Deficiencia de 11b hidroxilasa

En los estudios de deficiencia de 11-OH (11OHD), el reducido número de pacientes impide constituir grupos grandes de análisis y únicamente podemos hacer valoraciones individualizadas. En nuestra corta serie de pacientes caracterizados con 11OHD, se encontró una buena correlación, ya que todos los pacientes presentaron, bien mutaciones de desplazamiento de fase de lectura (ins AG), bien mutaciones de cambio de aminoácido no conservativo en región de centro activo (Gly411Arg) o un híbrido que involucraba a CYP11B1 y CYP11B2 (11hidroxilasa y aldosterona sintetasa). Este último con una clínica de difícil manejo e interpretación, forma PS neonatal con HSC tardía y cuadros de hipertensión, ginecomastia, tumor testicular, queda "clarificada" de una forma precisa desde su base molecular que involucra a ambos genes y su regulación. Debemos señalar que todos estos pacientes fueron homocigotos, como sin duda cabe esperar de una enfermedad recesiva y rara, a diferencia de 21OHD en que los pacientes son en su mayoría heterocigotos compuestos por su elevada frecuencia de portadores. Hemos de señalar también que 6 pacientes, que habían sido diagnosticados de 11OHD, resultaron genóticamente 21-OHD (mutaciones severas de CYP21B en ambos alelos con una buena correlación).

¿Por qué “fallaría” la correlación genotipo/fenotipo?

El grado de severidad clínica es continuo

Un 12-20% de las discordancias halladas se deben a este factor. Hemos de tener en consideración el que el grado de severidad clínica no admite clasificaciones estrictas y es en las formas intermedias donde se concentran las discordancias. La mutación Ile172Asn deja una actividad residual que puede no siempre evitar el síndrome PS; de hecho, a parte de controlarse mejor farmacológicamente con suplemento mineralocorticoide, las formas VS muestran actividad de renina elevada. Por otro lado, las formas VS que se observan en homocigotos para la mutación 655G del intrón 2 podría deberse a una cierta actividad residual, por un cierto grado de procesamiento alternativo correcto en algunos pacientes. También encontramos que, a veces, la percepción del clínico es diferente y formas clínicas intermedias similares son clasificadas de forma distinta. Hemos observado que si se utilizan criterios analíticos para etiquetar formas clínicas (renina elevada en VS, que lleve a diagnóstico PS) ó no se permite la normal evolución clínica (terapia sustitutiva previa que evita la crisis, que lleve a diagnóstico VS) hay una falta de correlación aparente.

Caracterización incompleta de los alelos

Como ya hemos comentado, los alelos con mutación leve detectada en el “cribado básico” pueden presentar una mutación severa adicional no caracterizada (alelo con doble mutación Val281-Stop316, conversión que incluye región promotora en 5' y Pro30 en exón1 ya mencionadas) y en ese caso se comportarían como graves. Los estudios complementarios de secuenciación y Southern nos ayudan a ponerlos de manifiesto, aunque por el momento siguen quedándose fuera del estudio algunas zonas regulación no reconocidas o demasiado extensas para una valoración asistencial.

Correlación delimitada a déficit bioquímico/genotipo (formas crípticas)

Puede existir una perfecta correlación entre los defectos moleculares y el grado de déficit enzimático y ser la expresión fenotípica la que no refleja el grado de deficiencia. Este sería el caso de las formas crípticas/oligosintomáticas. La correlación genotipo/déficit bioquímico es tan importante que, al menos en población pediátrica hemos encontrado que los niveles del metabolito marcador 17OHP pueden predecir la heterocigosis compuesta con mutación severa. Hemos de reseñar que esta fuerte correlación se da cuando estamos ante una situación de deficiencia, leve ó severa, con dos alelos mutados; no en la situación de portador en la que la 17OHP basal es siempre normal y puede estar elevada tras estimulación con ACTH sólo en el 50-75% de los casos; aun que nunca distingue entre portador de mutación leve ó

severa. Las formas crípticas ya eran conocidas antes de disponer de la caracterización molecular y en ellas, aun existiendo andrógenos elevados, no hay una expresividad clínica. Probablemente debamos entender estas formas dentro del contexto poligénico del hiperandrogenismo, y lo mismo que decimos ahora que existirían variables de la normalidad que contribuyeran al fenotipo “hiper”, podría haber otras que redujeran esta expresividad. Por otro lado, con vistas al consejo genético, no olvidemos que estas formas crípticas pueden ser también heterocigotas compuestas con mutación severa.

Factores que modifican la expresión fenotípica

Como ya hemos comentado en el apartado anterior, factores ambientales y genéticos que implican a otros genes pueden condicionar el resultado fenotípico final. Por ejemplo, la menor severidad de la clínica del déficit con la edad e incluso la aparición de ciertos niveles de aldosterona en adultos con delección en homocigosis (que en la etapa pediátrica fueron formas PS) que se atribuye a cierta actividad 21 hidroxilante inespecífica en otros tejidos. También las variantes polimórficas potencialmente implicadas en hiperandrogenismo podrían estar implicados. En estos casos al encontramos ya ante una entidad poligénica no cabe hablar de correlación genotipo/fenotipo, como comentábamos al inicio de la presentación, hasta que tengamos un conocimiento completo de las variables implicadas.

Formas clínicas distintas en una misma familia

En ocasiones ha resultado discordante y llamativo el hecho de detectarse formas clínicas distintas en la misma familia, y ello ha llevado a pensar en fallos de correlación. Debemos señalar que en nuestra casuística, hemos encontrado una buena correlación cuando ello se ha analizado a nivel genotípico. En los casos que se ha tratado de hermanos con idéntico genotipo 21OH (57 familias con dos casos afectos, 16 PS, 3VS, 38 NC) la forma clínica ha sido la misma en ambos. Sin embargo, sí hemos detectado familias en las que el caso índice presentaba una forma CL pero uno de los progenitores y alguno de los hermanos era una forma leve. En estos casos hemos podido comprobar que nos encontrábamos ante, no dos alelos mutados y dos alelos sanos como es lo esperable en las enfermedades recesivas típicas; sino que había un tercer alelo mutado (generalmente, aunque no siempre, la prevalente mutación leve Val281Leu) que segregaba en los familiares afectos (Fig 4). Mostramos un ejemplo “extremo” de esta situación con un caso afecto PS y tres miembros restantes de la familia con una forma leve/oligosintomática/no diagnosticada, pero evidente a nivel bioquímico (estudios solicitados tras resultados estudio molecular, familia del Hospital Reina Sofía, Dr Cañete). Esta situación no es rara pero tampoco frecuente, la que sí es frecuente (11

casos en la serie) es aquella en que el caso índice presenta una forma CL y alguno de los hermanos portadores genotipados muestra signos de hiperandrogenismo, pero no una deficiencia NC.

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

Revisiones

White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000;21:245-91.

Merke D, Bernnstein SR Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 2005 365, 2125-2136

Speiser PW, White PC. Congenital Adrenal Hyperplasia. *N Eng J Med* 2003, 349, 776-788

Estudios en población española que recogen los resultados presentados

Ezquieta B, Oliver A, Gracia R, Gancedo PG. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Hum. Genet.* 96, 198-204 (1995)

Ezquieta B, Varela JM, Jariego CM, Oliver A, Gracia R. Nonisotopic detection of point mutations in the CYP21B gene in steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin. Chem.* 42, 1108-10(1996)

Rodríguez A, Ezquieta B, Varela JM, Molina M, Arnao MDR Diagnóstico genético molecular y tratamiento prenatal de la hiperplasia adrenal congénita por déficit de la enzima 21-hidroxilasa. *Med Clin* 109, 669-672 (1997)

Martínez Olmos M, Varela JM, Ezquieta B, Hillman N, Díez JJ Caracterización de las mutaciones del gen de la esteroide 21-hidroxilasa en una forma oligosintomática de hiperplasia suprarrenal congénita: Estudio familiar. *Med Clin* 109, 421-424 (1997)

Ezquieta B, Jariego CM, Varela JM, Oliver A, Gracia R. Microsatellite typing in the indirect analysis of steroid 21-hydroxylase gene. *Pren. Diag.* 17, 429-434 (1997)

Ezquieta B, Oyarzábal M, Jariego CM, Varela JM, Chueca M. A novel frameshift mutation in the first exon of the 21-OH gene found in homozygosity in an apparently non-consanguineous family. *Horm. Res.* 51, 135-141 (1999)

Lorenzo L, Ezquieta B, Lazareno NL, Mancheño E. Estudio genético molecular y hormonal de dos casos de heterocigotos en dos familias afectas de deficiencia de 21-hidroxilasa. *Acta Ped Esp* 59, 410-415 (2001)

Ezquieta B, Cueva E, Varela J. Aportaciones del análisis molecular en la hiperplasia suprarrenal congénita. *Acta Ped Esp.* 59, 479-496 (2001)

Ezquieta B, Cueva E, Varela J, Oliver A, Fernández J, Jariego C. Nonclassical 21-hydroxylase deficiency in children: association of adrenocorticotrophic hormone-stimulated 17-hydroxyprogesterone with the risk of compound heterozygosity with severe mutations. *Acta Paediatr* 2002;91:892-8.

Ezquieta B, Cueva E, Oyarzabal M, Oliver A, Varela J, Jariego C. Gene conversion (655 splicing mutation) and the founder effect (Gln318Stop) contribute to the most frequent severe point mutations in congenital adrenal hyperplasia in the Spanish population. *Clin. Genet* 62, 181-188 (2002)

Ezquieta B, Luzuriaga C Neonatal salt-wasting and 11-beta hydroxylase deficiency in a child carrying an homozygous deletion hybrid CYP11B2-CYP11B1 (Aldosterone synthase-11-hydroxylase). *Clin Genet* 66, 229-235 (2004)

Ezquieta B, Ruano MF, Dulin E, Arnao DR, Rodríguez A. Prevalencia de enfermedades recesivas frecuentes en población española mediante análisis de ADN en muestras del cribado neonatal. *Med Clin* 2005 125 (13) 493-5 (2005)