

ORIGINAL BREVE

## Síndrome suprarrenal congénito virilizante con mutación de novo I172N: estudio de un nuevo caso

I. Díez López<sup>a,\*</sup>, A. Rodríguez Estévez<sup>a</sup>, E. González Molina<sup>a</sup>, M. Martínez Ayucar<sup>a</sup>, B. Rodríguez Pérez<sup>a</sup> y B. Ezquieta Zubicaray<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Pediatría, Hospital de Txagorritxu, Vitoria, España

<sup>b</sup>Laboratorio Diagnóstico Molecular, Hospital Infantil Gregorio Marañón, Madrid, España

<sup>c</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

Recibido el 21 de mayo de 2009; aceptado el 28 de agosto de 2009

Disponible en Internet el 9 de octubre de 2009

### PALABRAS CLAVE

Hiperplasia suprarrenal;  
CYP21A2;  
Mutación de novo I172N

### KEYWORDS

Congenital adrenal hyperplasia;  
CYP21A2;  
Novo mutations

### Resumen

La forma clásica de hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa (21-OHD) se debe a mutaciones del gen *CYP21A2*. La gran mayoría de los alelos deficientes muestran mutaciones que preexisten en un seudogen homólogo y localizado en tandem: *CYP21A1*. Los alelos se heredan de los padres portadores, y las mutaciones de novo en el transcurso de la gametogénesis o en el desarrollo fetal son excepcionales. Este artículo describe a una paciente afectada de 21-OHD clásico que presentó en su alelo materno la mutación de novo I172N en heterocigosis compuesta con la mutación grave R356W heredada del padre. La madre de la paciente resultó negativa en el estudio de mutaciones del gen *CYP21A2*. El estudio complementario de marcadores indirectos tipo microsatélite confirmó una segregación correcta de los alelos parentales. La mutación I172N (en heterocigosis compuesta con mutación nula) da lugar a un fenotipo muy característico neonatal virilizante que no asocia crisis de pérdida salina.

© 2009 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Virilizing congenital adrenogenital syndrome with a de novo I172N mutation: Study of a new case

### Abstract

The classical form of congenital adrenal hyperplasia is the result of mutations in the 21-hydroxylase gene (*CYP21A2*). Most deficient alleles carry pre-existing mutations in the *CYP21PA* homologue pseudogene, located in tandem. Mutant alleles are inherited from carrier parents, and *de novo* mutations during gametogenesis or foetal development are

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ignacio.diezlopez@osakidetza.net (I. Díez López).

exceptional. The present paper describes a *de novo* mutation occurring at the maternal allele (I172N) of a patient with a classical form of 21-hydroxylase deficiency, whose father was heterozygous for R356W. The mother did not carry the mutation. Microsatellite analyses confirmed a correct allelic segregation. The I172N mutation (in compound heterozygosity with a null mutation) gives rise to a virilizing phenotype not associated with salt-wasting.

© 2009 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) se debe en un 95% de los casos al déficit de la 21-hidroxilasa (21-OHD). Esta enfermedad autosómica recesiva presenta un amplio espectro de formas clínicas, desde las clásicas neonatales, que en su variante perdedora de sal pueden dañar la vida de estos niños, hasta formas atenuadas denominadas no clásicas, en que los síntomas aparecen en la etapa pediátrica o adulta, e incluso formas crípticas u oligosintomáticas.

Es una enfermedad común en sus formas leves, especialmente en el área mediterránea<sup>1</sup>, y no infrecuente en sus formas graves (frecuencia de portadores de mutación grave de 1:50–1:60), en las que cabe la posibilidad de plantear un tratamiento prenatal que previene la virilización de los fetos femeninos afectados<sup>2</sup>. Existe una estrecha correlación genotipo/fenotipo y se ha señalado que la genotipificación puede ser relevante para la categorización de estos pacientes<sup>3</sup>.

El cribado básico de 10 mutaciones puntuales (P30L, 655A>C, delección 8pb, I172N, I236N/V237E/M239K, V281L, 306insT, Q318X, R356W y P453S), delecciones y conversiones permite caracterizar un gran número de alelos anormales. Existe un pseudogen homólogo, duplicado en tándem, que presenta las alteraciones puntuales mencionadas y que, por procesos de recombinación asimétrica y conversión génica, puede originar los alelos anormales<sup>3–5</sup>. El porcentaje de alelos 21-OHD caracterizados tras el cribado básico de estas mutaciones recurrentes en nuestra población es del 93% para las formas clásicas y del 85% para las formas no clásicas (algo menor)<sup>6</sup>.

El pequeño porcentaje de alelos 21-OHD clásicos restante presenta mutaciones producidas por los mecanismos tradicionales, y su caracterización se realiza mediante la secuenciación completa del gen. Estas mutaciones no frecuentes o raras se encuentran generalmente en hemici-gosis y heteroci-gosis compuesta con las mutaciones antes mencionadas<sup>5</sup>, aunque también se han descrito homoci-gotos, generalmente por consanguinidad<sup>7</sup>.

Actualmente, estas nuevas mutaciones se recogen en la base de datos HGMD (Human Gene Mutation Database) del Institute of Medical Genetics en Cardiff (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>).

La frecuencia del déficit clásico, establecida en estudios retrospectivos en diferentes países<sup>8</sup> a partir de los casos diagnosticados, osciló entre 1/15.000 y 1/23.044 nacimientos. La incidencia mundial de la HSC por 21-OHD determinada por los programas de cribado es del orden de 1/14.554 nacidos vivos, de los que aproximadamente el 75% pertenece al fenotipo con pérdida salina<sup>9</sup>. La American Academy of Pediatrics estima que la prevalencia de las

formas clásicas de HSC por 21-OHD se encuentra aproximadamente entre 1/12.000 y 1/15.000 nacimientos<sup>9</sup>.

En varios países de nuestro entorno y en algunas comunidades autónomas del ámbito nacional existen centros que incluyen la detección neonatal de la HSC para su área de influencia sanitaria; Extremadura, Madrid, Castilla-La Mancha, Galicia y Aragón lo incluyen en la actualidad, lo que representa una cobertura del 28% de los recién nacidos españoles. En otras comunidades, como Murcia y País Vasco, aunque se ofertó anteriormente, dejó de realizarse en los años 1997 y 1995, respectivamente. Los datos obtenidos de este cribado neonatal definen una incidencia de 1/16.100 niños<sup>10</sup>.

El hecho de que los resultados del cribado se informen en el mismo tiempo cronológico que el inicio clínico de la enfermedad, la valoración en la sala de maternidad de las formas virilizantes y la escasa incidencia total de estas formas graves han llevado a que algunos sistemas de salud con una correcta cobertura perinatal de la población, como el sistema vasco, retiren de su programa este cribado neonatal. Recientemente en este aspecto, algunos autores, como Grosse et al<sup>11</sup>, han definido una mortalidad inferior al 4% de las formas graves, y defienden un avance en la detección y la sospecha clínica. Este artículo ha suscitado una importante discusión<sup>12</sup> y algunos autores han resaltado el interés de realizar este tipo de cribado, tal y como queda recogido en los documentos de consenso de las sociedades americana y europea de endocrinología pediátrica<sup>13,14</sup>. De cualquier manera, los casos diagnosticados, tanto de forma clínica como por cribado neonatal, requieren del diagnóstico molecular que permitirá la confirmación diagnóstica, la detección de portadores y el diagnóstico prenatal requerido en el tratamiento prenatal que es posible plantear en esta enfermedad.

Presentamos el caso de una niña afectada de una forma virilizante de HSC detectada en la etapa perinatal que presentó una heteroci-gosis compuesta (R356W/I172N) de mutaciones graves. Únicamente el padre resultó portador (R356W) y no se evidenció mutación alguna en la madre biológica.

## Caso clínico

Mujer de origen caucasiano procedente de una primera gestación sin incidencias de 39 semanas, padres no consanguíneos. La exploración física en maternidad pasó inadvertida. Ingresó a los 20 días de vida por cuadro compatible con sepsis clínica que cursó con fiebre de 38,9°C, rechazo de tomas, cianosis y decaimiento. La



**Figura 1** Aspecto de los genitales del caso índice al diagnóstico. A la derecha, esquema de los estadios del desarrollo genital masculino de Prader, donde se señala el que correspondería a nuestra paciente.

**Tabla 1** Resumen de datos analíticos y su progresión temporal

	Veinte días	Seis meses	Doce meses	Dos años
Sodio, mEq/l	123	139	135	135
17-OH-P, ng/ml	475	12,8	0,41	8,6
Testosterona, ng/ml	0,62	0,05	–	0,02
ARP, ng/ml/h	38	>24	7,7	6,2
Androstendiona, ng/ml	3	0,04	0,1	0,16
ACTH, pg/ml	166	–	46	–
Dosis hidrocortisona, mg/m <sup>2</sup>	20	15,8	15	16
Dosis 9-alfa-fluorcortisona, mg/día	0,05	0,05	0,10	0,05

ACTH: corticotropina; ARP: actividad de renina en plasma; OH-P: hidroxiprogesterona.

analítica al ingreso mostró acidosis metabólica (pH: 7,16, presión parcial de CO<sub>2</sub> [PCO<sub>2</sub>]: 60,8 y CO<sub>3</sub>H: 22,1), hiponatremia (Na: 123 mEq/l), hiperpotasemia (7,2 mEq/l) y calcio (12,5 mg/dl). proteína C reactiva (PCR): 85 mg/dl. En la exploración física se observó clitoromegalia, con fusión parcial de los labios mayores y el seno urogenital sin gónadas palpables (grado II–III de Prader (fig. 1)). El estudio hormonal reveló unos valores elevados de 17-hidroxiprogesterona (475,90 ng/ml) y la actividad de renina en plasma (ARP) era de 38 ng/ml/h (tabla 1). Presentó un cariotipo femenino normal (46XX) y genitales internos normales en ecografía pélvica.

Ante la sospecha de HSC se inició tratamiento con hidrocortisona (20 mg/m<sup>2</sup>/día en 3 dosis), 9-alfa-fludrocortisona (0,05 mg/día) y NaCl con buena evolución clínica. Se obtuvo el consentimiento informado y se procedió al estudio molecular del gen *CYP21A2*, que puso de manifiesto la presencia de mutaciones graves del gen (I172N y R356W) en heterocigosis compuesta (ver estudio genético más adelante).

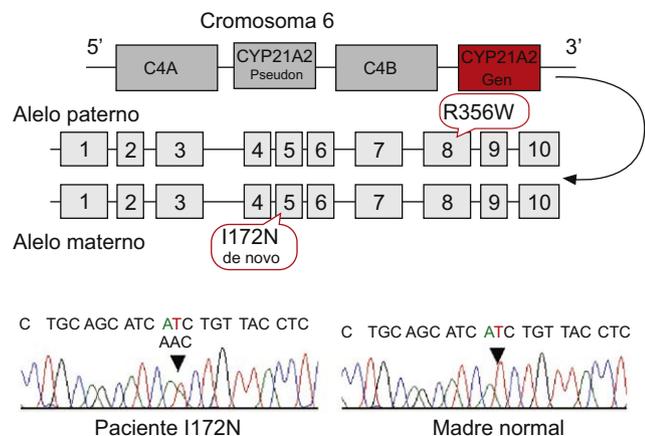
La sepsis clínica no pudo confirmarse mediante los cultivos (sangre y líquido cefalorraquídeo [LCR]) y la

paciente precisó tratamiento mineralcorticoide para mantener niveles de ARP normales para su edad (tabla 1). Durante su seguimiento no presentó episodios de descompensación con hipoglucemia ni crisis pierde sal. La dosis media requerida de hidrocortisona fue de 16 mg/m<sup>2</sup>/día y 0,05–0,10 mg/día de 9-alfa-fludrocortisona (tabla 1). Asimismo, se administró NaCl (1–2 g/día) durante los 2 primeros años de vida.

La paciente ha mantenido una talla en percentiles 3-10 con discreto retraso en la edad ósea de 6 meses a la edad cronológica de 2 años (talla diana: 153 cm). Al año de edad se realizó genitoplastia completa con buenos resultados cosméticos. En el transcurso de la elaboración de este manuscrito la madre presentó una nueva gestación de la misma pareja biológica, cuyo estudio molecular también se realizó.

### Estudio genético

Se extrajo ADN a partir de leucocitos de sangre periférica de la paciente y de ambos padres y se procedió a la



**Figura 2** Esquema del gen *CYP21A2*, donde se señala la localización de las mutaciones identificadas. Estudios de secuenciación en el afectado y en la madre que confirman la mutación de novo I172N en el caso índice, ausente en el ADN materno.

amplificación específica del gen *CYP21A2*, según la técnica recogida en Ezquieta et al<sup>6</sup>. El análisis directo del gen se realizó mediante estudio de deleciones y conversiones por técnica de Southern, y el cribado de las mutaciones puntuales recurrentes (P30L, 655G, deleción 8 pb, I172N, triple mutación del exón 6, V281L, 306insT, Q318X, R356W y P453S) se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa e hibridación específica del alelo. El estudio básico incluye también la mutación R426H, que se ha incorporado en nuestro cribado (Ezquieta et al, manuscrito en preparación) porque permite completar la caracterización de los alelos de las formas virilizantes simples. Para la secuenciación directa se utilizaron dideoxinucleótidos fluorescentes y un ABIPrism 3100 de la línea instrumental de secuenciación del Hospital Gregorio Marañón, como se describe en Ezquieta et al<sup>7</sup>. El estudio se completó con el análisis indirecto de microsatélites del cromosoma 6, asociados al gen *CYP21A2*, D6S273 y D6S439 y el microsatélite intragénico del factor de necrosis tumoral (TNF)<sup>7</sup>. También se analizaron marcadores de los cromosomas X e Y de la región pseudoautosómica (DXY233 y DXY234) y microsatélite intragénico del gen *SHOX* mediante la utilización de los cebadores recogidos en Ezquieta et al<sup>25</sup>.

El árbol familiar se muestra en la figura 2 que detalla la segregación de alelos en la familia tanto en el análisis directo (mutaciones detectadas) como en el análisis indirecto (microsatélites asociados). El cribado básico de mutaciones mostró que el caso índice presentaba 2 mutaciones graves: I172N y R356W. El estudio de segregación alélica demostró el origen paterno de la mutación R356W y la ausencia de la mutación I172N en el ADN materno. La secuenciación directa de los alelos en una nueva muestra confirmó la presencia de la mutación en el caso índice y su ausencia en la madre (fig. 2). El genotipo detectado en la paciente se corresponde con el cuadro clínico virilizante de la enfermedad, ya que la mutación I172N asocia una actividad enzimática residual que evita la pérdida salina, aunque sí puede existir descompensación electrolítica y respuesta de renina.

El estudio complementario de marcadores tipo microsatélite de la región de antígenos de histocompatibilidad (HLA) D6S273, D6S439 y polimorfismo intrónico del gen *TNF* pudo evidenciar la procedencia de los alelos paterno y materno (fig. 3). El estudio confirmatorio de segregación se completó con los marcadores DXY233, DXY234 y el marcador intragénico del gen *SHOX*<sup>25</sup> de la región pseudoautosómica de los cromosomas sexuales.

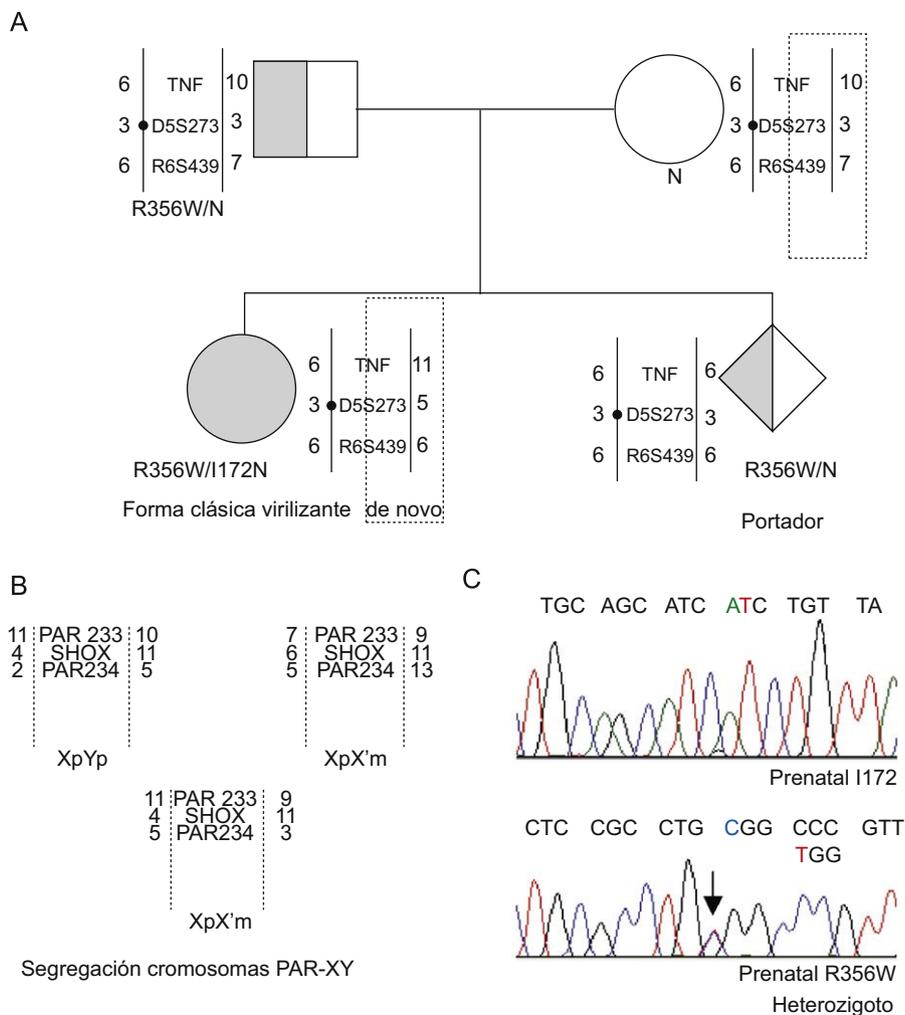
Posteriormente a este estudio inicial, y conocida una nueva gestación de la madre, se decidió realizar el estudio genético prenatal mediante amniocentesis y cultivo de amniocitos para obtención de ADN. Al utilizar las técnicas moleculares descritas, se documentó que este feto (46XY) era portador de una de las 2 mutaciones graves del caso índice: la R356W (origen paterno). El alelo materno heredado por el feto es el alelo normal (fig. 3). Estos hallazgos se han confirmado tras el nacimiento y en la actualidad es un varón aparentemente sano para el 21-OHD.

## Discusión

La detección temprana de formas virilizantes neonatales<sup>1</sup> por el 21-OHD es importante, ya que el tratamiento adecuado da lugar a una evolución clínica más favorable. La base molecular de estas formas clínicas, también recesivas como las formas pierde sal, está constituida por 2 alelos de nula o muy baja funcionalidad denominados graves, aunque generalmente uno de ellos mantiene una mínima actividad residual, generalmente la mutación puntual I172N<sup>15-17</sup>.

Aunque el fenotipo más frecuentemente relacionado con la mutación I172N<sup>18</sup> es el virilizante simple, se han publicado diferentes formas clínicas asociadas<sup>22,23</sup>, que incluyen formas pierde sal, virilizantes simples y formas no clásicas; la frecuencia de pérdida salina es del 25-65%<sup>27</sup>. Esta variabilidad se debe, en la gran mayoría de los casos, a las mutaciones presentes en el segundo alelo, y el cuadro clínico es de tipo no clásico cuando la segunda mutación es de tipo leve<sup>28,29</sup>. La forma pierde sal es más frecuente en aquellos individuos que presentan una segunda mutación más grave<sup>30</sup>. La forma de presentación clínica del paciente que aquí presentamos fue de una pérdida salina, en un contexto clínico de un cuadro febril, aunque la sepsis no pudo confirmarse mediante los cultivos. La virilización, que pasó inicialmente desapercibida, fue moderada, y la ausencia de episodios de descompensación o pérdida salina durante la evolución clínica posterior serían compatibles con un déficit enzimático no completo concordante con el esperado del genotipo detectado: una mutación nula (R456W) y una alteración que deja una actividad residual (I172N). El requerimiento mineralocorticoide para el mantenimiento de los niveles de la ARP sería una característica compartida con las formas clásicas sin pérdida salina<sup>3,13</sup>.

En la actualidad, la detección de un nuevo caso clínico de la forma grave de la deficiencia puede tener su clave en el cribado neonatal<sup>13,14</sup> o mediante una detallada exploración en salas de maternidad/neonatos. La sospecha se confirma mediante el diagnóstico apoyado por los estudios genéticos y se debe analizar también a los familiares de primer grado<sup>11,12</sup>. Ello no sólo facilita una mejor caracterización del genotipo, ya que permite segregar las mutaciones



**Figura 3** A) Representación del árbol familiar con la segregación de los alelos CYP21A2, tanto directa como indirecta. Los cromosomas se esquematizan como barras en las que se indican de forma numérica los distintos tipos de alelos de los microsatélites D6S273, D6S439 y el marcador intrónico de TNF y el haplotipo que configuran para cada uno de los cromosomas 6p del grupo familiar. B) También se recoge la segregación informativa de los cromosomas sexuales mediante la utilización de los marcadores de la región PAR, DXY233, DXY234 y microsatélite intragénico del gen *SHOX*. Estudios de secuenciación parcial de los exones 4 y 8 de la muestra prenatal que documentan que el nuevo hijo es únicamente portador de la mutación 356W.

detectadas, sino que establece la situación de portadores en los miembros de la familia y posibilita un futuro consejo genético. Debe tenerse en especial consideración que es posible evitar la virilización de un nuevo feto femenino afectado mediante tratamiento prenatal<sup>1,2</sup>.

Se requiere un estudio completo, como el presentado, para poder documentar el posible origen de novo de la mutación detectada. Tanto los marcadores microsatélite del complejo HLA en el autosoma 6 como los marcadores no autosómicos de la región PAR de los cromosomas sexuales X e Y documentaron una adecuada segregación de alelos en esta familia. El estudio de segregación de los alelos parentales en las enfermedades recesivas ha llevado a documentar mutaciones en sólo uno de ellos, y no es infrecuente en la literatura médica la identificación del gen afectado en la madre, pero no así en el padre. La consiguiente sospecha de no paternidad biológica suele resolverse mediante estudios de segregación de marcadores polimórficos informativos. Los estudios en bancos de sangre<sup>24</sup> han mostrado que la duda

de la posible paternidad biológica debe tenerse en consideración para documentar mutaciones de novo.

Otra causa de aparentes alelos de novo detectados en la genotipificación de casos afectados de HSC y que en la actualidad no resulta infrecuente es el antecedente de reproducción asistida con donación de esperma u óvulos<sup>31</sup>. La elevada frecuencia de portadores en población general y la posible asociación de la infertilidad en este cuadro clínico han podido contribuir a este hecho.

El posterior embarazo de la madre del caso índice nos ha permitido estudiar genéticamente al feto, aunque dentro del protocolo de valoración de necesidad de tratamiento prenatal con dexametasona<sup>15</sup> éste se consideró inadecuado, ya que no se cumplía el supuesto de riesgo 1:4 de feto afectado. El estudio molecular se realizó en cultivo de amniocitos y mostró que el feto era sólo portador de una de las 2 mutaciones graves del caso índice (la de origen paterno [R356W]). El alelo materno (no portador de mutación) presente en la muestra fetal resultó ser el no heredado por el caso índice, por lo que

no pudo quedar documentado si otras células germinales tampoco presentaban la mutación descrita.

Aunque las mutaciones de novo del gen *CYP21A2* se han detectado en estudios con amplias cohortes, se ha estimado que son muy infrecuentes (<1:5.000) en la población general. Menos del 1% de las mutaciones *CYP21* inactivadoras tienen este origen<sup>19-21</sup>, por lo que su descripción en la literatura médica es rara. Tajima et al<sup>26</sup> y Collier et al<sup>28</sup> describieron las primeras mutaciones de novo en 1993, precisamente en 2 pacientes con mutación del gen *CYP21A2*. Baumgartner-Parzer et al<sup>27</sup> describieron uno de los casos más recientemente publicados. Todas las mutaciones de novo descritas hasta el momento, incluida la que aquí se documenta, se producen por los mecanismos que dan lugar a las distintas variantes alélicas (recombinación asimétrica y conversión génica) en el proceso de gametogénesis (meiosis) y su posterior fusión en la fecundación, por lo que no se puede descartar un mosaicismo germinal en estos casos.

En el caso de novo publicado por Collier et al<sup>28</sup> también se evidenció el origen materno de la mutación mediante el estudio de secuenciación de los genes y la comparación de los diferentes nucleótidos, pero no se realizó un estudio de microsatélites como el presentado. Tajima et al<sup>26</sup> presentaron un caso de mutación de novo en una paciente afectada de forma clásica detectada en el cribado neonatal con estudio negativo de varios hermanos, pero tampoco se realizó estudio de microsatélites para valoración de la segregación parental. En el caso más reciente de Baumgartner-Parzer et al<sup>27</sup> se presentó a una paciente que mostraba una heterocigosis compuesta de 1172N de novo, como el caso presentado, y la mutación de procesamiento del ARN mensajero 655G del intrón 2. Al igual que nuestro caso, no desarrolló rasgos clínicamente evidentes, aunque la ambigüedad genital fue mayor.

En resumen, el caso que presentamos ilustra la importancia de realizar el estudio genético no sólo del paciente, sino también de los padres, anteriormente llamados "portadores obligados". Este hecho podrá tener importantes implicaciones, no sólo medicolegales, sino también de planificación familiar.

## Agradecimientos

Al proyecto FIS PI061179 de uno de los autores (B.E.) de este artículo, sin el cual este trabajo no hubiera sido posible. Este caso ha sido presentado<sup>32</sup> en su vertiente clínica por estos autores.

## Bibliografía

- White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev.* 2000;21:245-91.
- Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet.* 2005;365:2125-36.
- Wedell A, Thilen A, Ritzen EM, Stengler B, Luthman H. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: Implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78:1145-52.
- Ezquieta B, Cueva E, Oyarzabal M, Oliver A, Varela J, Jariego C. Gene conversion (655 splicing mutation) and the founder effect (Q318X) contribute to the most frequent severe point mutations in congenital adrenal hyperplasia in the Spanish population. *Clin Genet.* 2002;62:181-8.
- Bernal González C, Fernández Salas C, Ezquieta Zubizaray B. Alopecia androgénica prematura en un varón con déficit de 21-hidroxilasa no clásico. Nueva mutación grave (Y336X) del gen *CYP21A2* en 2 hermanos afectados. *Med Clin (Barc).* 2006;127:617-21.
- Ezquieta B, Oliver A, Gracia R, Gancedo PG. Analysis of steroid 21-hydroxylase mutations in the Spanish population. *Hum Genet.* 1995;96:198-204.
- Ezquieta B, Oyarzabal M, Jariego CM, Varela JM, Chueca M. A novel frameshift in the first exon of the 21-OH gene found in homozygosity in an apparently nonconsanguineous family. *Horm Res.* 1999;51:135-41.
- Labarta JI, Bello E, Ruiz-Echarri M, Rueda C, Martul P, Mayayo E, et al. Estado en la edad adulta y propuesta de optimización terapéutica de la hiperplasia suprarrenal congénita. *An Pediatr.* 2003;58:12-24.
- American Academy of Pediatrics. Section on Endocrinology and Committee on Genetics. Technical report: Congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics.* 2000;106:1511-8.
- Dulín Iñiguez E, Cortés Castell E, Chamorro Ureña F, Eguileor Gurtubai I, Espada Sáez-Torre M, Pámpols Ros T. Actividad de los centros de detección precoz neonatal de errores congénitos del metabolismo en España. Evaluación sanitaria (1996-1999). *Boletín del Real Patronato sobre Discapacidad.* 2.ª ed. N.º 49; 2001.
- Grosse E, Van Vliet JK. How many deaths can be prevented by newborn screening for congenital adrenal hyperplasia?. *Horm Res.* 2007;67:284-91.
- Leight KR. Commentary on 'How many deaths can be prevented by newborn screening for congenital adrenal hyperplasia?' by Grosse and Van Vliet *Horm Res.* 2007;68:195 author reply 203.
- Hughes I, Houk C, Ahmed SF, Lee PA, LWPES/ESPE Consensus Group. Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child.* 2006;91:554-63.
- Hughes C, Nihoul-Fékété B, Thomas P. Cohen-Kettenis consequences of the ESPE/LWPES guidelines for diagnosis and treatment of disorders of sex development. *Res Clin End Metabol.* 2007;21:351-65.
- Mercado AB. Prenatal treatment and diagnosis of congenital adrenal hyperplasia swing to 21-deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:2014-20.
- Speiser PW, Knochenhauer ES, Dewailly D, Fruzzetti F, Marcondes JA, Azziz R. A multicenter study of women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia: Relationship between genotype and phenotype. *Mol Genet Metab.* 2000;71:527-34.
- Martínez Olmos M, Varela JM, Ezquieta B, Hillman N, Díez JJ. Caracterización de las mutaciones del gen del esteroide 21-hidroxilasa en una forma oligosintomática de hiperplasia suprarrenal congénita: estudio familiar. *Med Clin (Barc).* 1997;109:421-4.
- Baumgartner-Parzer SM, Nowotny P, Heinze G, Waldhausl W, Vierhapper H. Carrier frequency of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in a middle European population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:775-8.
- White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev.* 2000;21:245-91.
- Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med.* 2003;349:776-88.
- Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, et al. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest.* 1992;90:584-95.
- Wedell A, Thilen A, Ritzen EM, Stengler B, Luthman H. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: Implications for genetic diagnosis and association

- with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78:1145–52.
23. Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:1059–65.
  24. American Association of Blood Banks. Annual Report Summary for testing in 2001. Report n.º 37.
  25. Ezquieta B, Cueva E, Oliver A, Gracia R. SHOX intragenic microsatellite analysis in patients with short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;15:139–48.
  26. Tajima T, Fujeida K, Fujii-Kuriyama Y. De novo mutation causes steroid 21-hydroxylase deficiency in one family of HLA-identical affected and unaffected siblings. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77:86–9.
  27. Baumgartner-Parzer SM, Nowotny P, Waldha U, Vierhapper H. A rare duplicated 21-hydroxylase haplotype and a *de novo* mutation: A family analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:2794–6.
  28. Collier S, Tassabehji M, Strachan T. A *de novo* pathological point mutation at the 21-hydroxylase locus: Implications for gene conversion in the human genome. *Nat Genet.* 1993;3:260–5.
  29. Pinto G, Tardy V, Trivin C, Thalassinos C, Lortat-Jacob S. Follow-up of 68 children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: Relevance of genotype for management. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:2624–33.
  30. Frish H, Battelino T, Shober E, Baumgartner-Parzer S, Nowotny P, Vierhapper H. Salt wasting in simple virilizing congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;14:1649–55.
  31. Ezquieta B, Alonso M, Álvarez E, Arnao DR, Rodríguez A, Siguero JP. Should 21-hydroxylase deficiency genotyping be considered in assisted reproductive technology programs?. *Fer Steril.* 2007;88:1437.
  32. Díez López I, Rodríguez Estevez A, González Molina E, Ezquieta Zubicaray B. De novo I172N mutation in a patient with 21-hydroxylase deficiency. *Med Clin (Barc).* 2009 Jul 1. [Epub ahead of print].