

ARTÍCULO ORIGINAL

Correlación fenotipo genotipo en pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita diagnosticados por tamizaje neonatal

Genotype-phenotype correlation in patients with congenital adrenal hyperplasia diagnosed by neonatal screening

Elayne Esther Santana Hernández¹, Teresa Collazo Mesa², Víctor Jesús Tamayo Chang³, Martha Motes Velásquez⁴, Yuriela Betancourt Loyola⁵

¹Especialista de Primer y Segundo Grado en Medicina General Integral y Genética Clínica. Asistente e Investigadora Agregada. Centro Provincial de Genética Médica de Holguín. Correo electrónico: esantana@hpuh.hlg.sld.cu

²Doctora en Ciencias de la Salud. Licenciada en Bioquímica. Investigadora Auxiliar. Centro nacional de Genética Médica, La Habana. Correo electrónico: tcollazo@infomed.sld.cu

³Especialista de Primer y Segundo Grado en Genética Clínica. Máster en Atención Integral al Niño. Profesor Auxiliar. Centro Provincial de Genética Médica. Holguín. Correo electrónico: vtamayo@hpuh.hlg.sld.cu

⁴Especialista de Primer Grado en Endocrinología. Asistente. Hospital Pediátrico "Octavio de la Concepción de la Pedraja", Holguín. Correo electrónico: mmotres@hpuh.hlg.sld.cu

⁵Especialista de Primer Grado en Medicina General Integral y Endocrinología. Hospital Pediátrico "Octavio de la Concepción de la Pedraja", Holguín. Correo electrónico: curie@hpuh.hlg.sld.cu

Recibido: 6 de mayo de 2015.

Aprobado: 28 de julio de 2015.

RESUMEN

Introducción: la hiperplasia suprarrenal congénita engloba todos los trastornos hereditarios de la esteroidogenia suprarrenal del cortisol, transmitido por las mutaciones con carácter autosómico recesivo. El déficit de enzimático 21 hidroxilasa es la forma más frecuente de esta enfermedad, constituyendo del 90 al 95% de los casos.

Objetivo: describir la correlación fenotipo-genotipo en pacientes con hiperplasia

suprarrenal congénita diagnosticados por tamizaje neonatal.

Material y método: se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo, a 8 neonatos con hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21 hidroxilasa diagnosticado por tamizaje. Se les pidió consentimiento informado, para realizar el examen físico y la extracción de sangre para cuantificación de 17 hidroxiprogesterona y estudio molecular. Este último se efectuó en el Centro Nacional de Genética; se buscaron las mutaciones (P30L, Intrón 2, delección de 8 pb y G318X).

Resultados: el 62,5% de los pacientes presentaron síntomas clínicos, los dos pacientes en los que se presentó la forma clásica perdedora de sal, que es la forma neonatal grave, exhiben varias mutaciones en el pseudogen y en el gen activo la mutación del intrón 2, el 50% de las madres fueron homocigóticas o heterocigóticas a estas mutaciones.

Conclusiones: la mutación más frecuente encontrada fue la del Intrón 2. Entre las características clínicas, prevaleció la macrogenitosomía y virilización simple. Se logró realizar la correlación del fenotipo y el genotipo a la mayoría de los afectados.

DeCS: Hiperplasia suprarrenal congénita; Oxigenasas de función mixta.

ABSTRACT

Introduction: congenital adrenal hyperplasia encompasses all inherited disorders of adrenal steroidogenesis cortisol, transmitted by autosomal recessive mutations. The enzyme 21-hydroxylase deficiency is the most frequent form of this disease, constituting 90 to 95% of cases.

Objective: To correlate the phenotypic characteristics with genotype in patients suffering from congenital adrenal hyperplasia diagnosed by neonatal screening in Holguin province, Cuba.

Material and method: a retrospective descriptive study was performed in 8 neonates with congenital adrenal hyperplasia per 21-hydroxylase deficiency, diagnosed by screening. They were asked for informed consent to perform physical examination and blood collection for the quantification of 17-hydroxyprogesterone and a molecular study that was performed at the Genetic National Center; mutations (P30L, Intron 2, 8 bp deletion and G318X) were sought.

Results: 62.5% of the patients presented clinical symptoms, the two patients who presented the classic salt loss form, which is the severe neonatal disorder, exhibit various mutations in the pseudogene and the active gene mutation Intron 2, where 50% of mothers were homozygous or heterozygous for these mutations.

Conclusions: the most frequent mutation found was Intron 2. Among the clinical features, macrogenitosomia prevailed and simple virilization. The correlation of phenotype-genotype was accomplished to the most affected.

DeCS: Congenital adrenal hyperplasia; Mixed function oxygenases.

INTRODUCCIÓN

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) comprende un grupo de trastornos autosómicos recesivos que comprometen la síntesis del cortisol y otros esteroides

adrenales, provocando un aumento compensatorio de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), hiperplasia adrenal y acumulación de metabolitos anteriores al bloqueo metabólico. La expresión fenotípica dependerá de la naturaleza y severidad del defecto enzimático para la síntesis del cortisol y/o aldosterona.¹⁻³

El déficit de 21-hidroxilasa (21-OH) es la causa más frecuente de esta enfermedad, caracterizada clínicamente por signos de hiperandrogenismo y déficit mineralocorticoide.^{1,2} Se trata de una enfermedad hereditaria, determinante es el déficit de la enzima 21-hidroxilasa del citocromo enzimático P450c21, codificada por el gen funcional CYP21 (o CYP21B) identificado en 1985, localizado en el complejo mayor de histocompatibilidad HLA (CMH), mapeado su locus en la región 6p21,3 del brazo corto del cromosoma 6, que se dispone en tándem con un gen inactivo llamado CYP21P (seudogen CYP21A).²⁻³

Ambos genes se encuentran adyacentes a los genes C4A y C4B, que codifican para el cuarto componente del complemento; el orden de los genes es C4A-CYP21A-C4B-CYP21B.³ Por estudios de caracterización molecular en pacientes con diferentes tipos de deficiencia de 21-OH se identificaron varias mutaciones: a) de lesiones en estado homocigoto del gen CYP21B en la forma clásica perdedora de sal, y b) pequeños intercambios de secuencia entre los genes CYP21A y CYP21B, fenómeno denominado "conversión génica", que conducen a la transferencia de una de las mutaciones del seudo gen al gen funcional, además se han identificado varios polimorfismos normales en el gen CYP21B, los cuales no afectan la actividad de 21-OH.^{4,5} La observación de que este gen segrega junto con los determinantes antigénicos del complejo HLA-B sugirió el estudio de haplotipos de CMH en familias afectadas con la deficiencia de 21-OH, lo que ha permitido establecer que cualquier miembro de una familia que comparta un haplotipo con el sujeto afectado, es portador del gen del defecto enzimático.⁵

Los estudios genéticos y clínicos han demostrado la existencia de formas graves y moderadas, en función del grado de afectación enzimática. En las formas graves o clásicas el déficit es completo e inician sus manifestaciones en la época fetal, en las formas moderadas o no clásicas el déficit es parcial y se manifiestan clínicamente en la infancia y la adolescencia, e incluso pueden pasar inadvertidas hasta la edad adulta.⁶⁻⁸

El déficit de 21-OH presenta dos características fundamentales: insuficiencia suprarrenal e hiperandrogenismo, que derivan directa o indirectamente de la incapacidad de transformar 17 hidroxiprogesterona (17 OHP) en 11 desoxicortisol (déficit de secreción de cortisol) y progesterona en desoxicorticosterona (déficit de secreción de aldosterona), así como la acumulación de 17 OHP, androstenodiona, testosterona y de sus metabolitos respectivos.⁹

El espectro continuo de manifestaciones clínicas se clasifica en dos formas:

a) la forma clásica, que puede ser completa (virilizante y perdedora de sal) o incompleta (virilizante simple).

b) la forma no clásica, que puede ser sintomática o no, donde el déficit enzimático, por lo general moderado, cursa con ausencia de ambigüedad genital al nacimiento y signos de virilización posterior (adrenarquia o seudo pubertad precoz, hirsutismo, acné, irregularidades menstruales e infertilidad).¹⁰

La incidencia de las formas clásicas es de 1 de 15 000 nacimientos y en las formas no clásicas de 1 de 500 a 1 000 en población de raza blanca.⁸⁻¹¹ Los mecanismos de daño génico responsables del defecto son principalmente la conversión génica y la delección parcial o total del gen. La conversión génica es la causa más frecuente y se estima que es responsable de más del 80% de los casos con deficiencia de 21-OH. La conversión génica conduce a la inactivación del gen CYP21 al incorporarse a estas secuencias normalmente presentes en el pseudogen inactivo y altamente homólogo, denominado CYP21P. De esta forma, el traspaso de secuencias de un gen inactivo al activo conduce a la síntesis de una enzima con una reducida o nula actividad, determinando la caída en los niveles de cortisol y aldosterona.¹²

Desde el punto de vista clínico humoral el diagnóstico del déficit de 21-OH está determinado por el incremento del precursor del cortisol 17-OH-progesterona en presencia de virilización acompañada o no de pérdida de sal (deshidratación, hiponatremia e hiperpotasemia).¹³

Los mecanismos de daño génico han sido estudiados en diferentes grupos étnicos, determinándose que un número reducido de alteraciones da cuenta de la mayoría de los casos de deficiencia de 21-OH. En el centro nacional se estudiaron a todos los pacientes diagnosticados por tamizaje neonatal con déficit de 21 hidroxilasa desde el 2005-2013 siendo en su totalidad 8 niños, a los cuales se les realizó cuantificación de 17 hidroxiprogesterona (17-OHP) en sangre periférica en tres ocasiones para confirmar diagnóstico.

Se realiza este trabajo con el objetivo de describir la correlación fenotipo genotipo en pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita diagnosticados por tamizaje neonatal.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo, de serie de casos, a los 8 enfermos con hiperplasia suprarrenal congénita diagnosticados en tamizaje neonatal por déficit de 21 hidroxilasa detectados en el periodo 2005-2013 en la provincia de Holguín. La muestra lo formaron 8 neonatos con tamizaje alterado que se confirmaron con tres muestras posteriores. Se revisaron los registros del laboratorio provincial de SUMA para obtener los datos de los recién nacidos.

El comité de ética del Centro Nacional de Genética Médica aprobó la realización del estudio molecular de estos pacientes bajo los principios éticos que corresponden a este tipo de investigación. Se les pidió consentimiento a los padres para realizarle exploración física y los demás exámenes que fueran necesarios para poder confirmar el diagnóstico.

Se les confeccionó historia clínica genética, se le extrajo 10 ml de sangre periférica para análisis molecular, la que se almacenó a 4 grados y se envió en termo refrigerado en avión al Centro Nacional de Genética en La Habana para el análisis de la mutaciones, y con esta misma muestra se obtuvo la cuantificación de 17-OHP por SUMA. Se les efectuó en tres ocasiones la cuantificación de esta para la confirmación enzimática ya que como se describen tres pacientes no presentaron manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Se correlacionaron los hallazgos encontrados al examen físico con los resultados de laboratorio, las mutaciones que presentaron.

RESULTADOS

Los 8 pacientes con HSC por déficit de 21-OH, con diagnóstico por tamizaje neonatal, correspondientes 5 al sexo masculino y 3 al sexo femenino, donde 3 de estos recién nacidos no presentaron características clínicas de la enfermedad y donde solo uno de ellos presentó la forma neonatal grave de la enfermedad a los 5 días de nacido, con vómitos que lo llevaron a la deshidratación perdedora de sal severa e irreversible, falleciendo a los 29 días, siendo este el único paciente cuyo ADN no se logró estudiar.

Se describen las características clínicas presentada por cada uno de estos pacientes, en el momento que se realiza el diagnóstico de HSC. Como se aprecia, solo tres pacientes no mostraron manifestaciones clínicas para un 37,5% y el 62,5% presentaron síntomas y signos de la enfermedad en el primer mes de vida. (Tabla 1)

Tabla 1. Características clínicas de cada uno de los pacientes diagnosticados por tamizaje.

Pacientes	Características clínicas de presentación de la enfermedad
Paciente 1	Macrogenitosomía.
Paciente 2	Sin manifestaciones clínicas.
Paciente 3	Macrogenitosomía, crisis suprarrenal con deshidratación perdedora de sal.
Paciente 4	Virilización genital simple.
Paciente 5	Virilización genital simple hipertrofia de clítoris.
Paciente 6	Sin clínica, hizo una crisis suprarrenal con deshidratación perdedora de sal severa irreversible fallece.
Paciente 7	Sin manifestaciones clínicas.
Paciente 8	Sin manifestaciones clínicas.

Fuente: Historias clínicas y examen físico.

Se describen las mutaciones encontradas donde se presentaron mayoritariamente deleciones del gen, alteraciones del *splicing* a nivel del intron 2 y las mutaciones G318X, P30L y del8pb, que conforman las cuatro mutaciones estudiadas hasta el momento, en el Centro Nacional de Genética en La Habana. (Tabla 2)

Tabla 2. Mutaciones génicas encontradas en estos pacientes.

Pacientes	Mutaciones
Paciente 1	No se encontró ninguna de las cuatro mutaciones.
Paciente 2	No se encontró ninguna de las cuatro mutaciones.
Paciente 3	Homocigótico G318X y heterocigótico P30L, del8pb, intrón 2.
Paciente 4	Homocigótica intrón 2.
Paciente 5	No se encontró ninguna de las cuatro mutaciones.
Paciente 6	No pudo estudiarse. Fallecido.
Paciente 7	No se encontró ninguna de las cuatro mutaciones.
Paciente 8	Heterocigótica intrón 2.

Fuente: Historia clínicas (resultados de los estudios moleculares).

DISCUSIÓN

La presencia en recién nacidos de genitales externos ambiguos, vómitos y desequilibrio hidroelectrolítico, sugiere el diagnóstico de HSC. Pero en un varón con genitales normales, sin un tamizaje neonatal positivo no es fácil hacerle el diagnóstico. Esto fue lo ocurrido en el caso 6, con diagnóstico tardío y que falleció antes de poder tratarlo, siendo diferente en las féminas por la característica virilización de genitales externos, como lo sucedido en el paciente número 5, lo que constituye una emergencia en la atención del recién nacido y obliga al manejo interdisciplinario para asignación de sexo legal.

La HSC puede estar sujeta a muchas dificultades diagnósticas, ya que su cortejo sintomático es parecido al de otros errores congénitos del metabolismo, y no es el único trastorno capaz de producir ambigüedad genital.¹⁻³

Se conoce que la mutación más importante es la que aparece en el gen activo, que en la mayoría de los casos apareció la mutación del intrón 2, que se sabe que es una zona de I2 splice: cambio de A a G en el intrón 2 que crea un sitio de splicing aberrante.³⁻⁵

La mutación del intrón 2 fue la encontrada con más frecuencia, en 3 pacientes para un 37,5%. En cuatro de los enfermos estudiados no presentaron ninguna de las mutaciones buscadas. En estos pacientes encontramos la mutación predominante en otros estudios descritos anteriormente.^{6, 7}

En los estudios realizados en tres de los casos no se hallaron las mutaciones que afectan a estos pacientes, pero sin embargo sí se encontraron en padres y hermanos en todos los casos. Por lo que deben tener otras mutaciones diferentes a las cuatro que fueron estudiadas, pudiendo tener cualquiera de las 52 mutaciones descritas en la literatura para esta enfermedad.⁸

Se han detectado más de 50 mutaciones en el gen *CYP17*, la mayoría de las cuales se producen al azar. No obstante, su frecuencia depende en gran medida de la población de la que se trate. En el caso de España, las mutaciones que con mayor frecuencia provocan esta enfermedad son W206R y R362C, localizadas ambas en el exón 7; esto

no concuerda con lo encontrado en los estudios moleculares en los pacientes estudiados en la provincia.⁶⁻⁸

En el paciente 2 no se le encontró ninguna de las cuatro mutaciones estudiadas. Su progenitora en el interrogatorio refirió acné facial, menarquía tardía y menstruaciones irregulares, cuando se le realiza examen físico presenta hipertrofia del clítoris que no es cubierto por los labios mayores, siendo ella homocigótica para el intrón 2, pudiendo ser una enferma. Como lo señalado en otras investigaciones.

El paciente 3 y el 6 son los únicos que presentaron las formas perdedoras de sal, de estos solo el 3 pudo estudiarse y solo en este en el gen principal, que es homocigótico para G138X y heterocigótico para del8pb, intron2, P30L. Sin embargo, al interrogar a sus padres y el examen físico fue negativo, como se describe en otros estudios. Considerándose portadores de varias mutaciones y se les explicó el alto riesgo que tienen ambos como pareja.

La frecuencia de delección del gen o alteraciones a nivel del *splicing* del intron 2 encontrada en el estudio, fue similar a la demostrada previamente por otros estudios en población caucásica y asiática, en las cuales estas alteraciones constituyen entre el 40-70% de los defectos genéticos encontrados en pacientes perdedores de sal.⁹⁻¹¹

El tratamiento con corticosteroides en estos pacientes tiene como objeto frenar la hipersecreción de ACTH y así disminuir la producción de andrógenos por la suprarrenal. En la etapa prenatal, los andrógenos pueden inducir la virilización de fetos femeninos y es por esta razón que el tratamiento debe ser instaurado precozmente, idealmente antes de la quinta semana.^{12, 13}

La caracterización molecular de las distintas formas de presentación de esta enfermedad ha orientado su diagnóstico y posibilitado el consejo genético de los pacientes y familiares afectados con las formas más graves de la enfermedad. Así, en la actualidad es posible realizar el diagnóstico prenatal de esta afección a través del estudio del ADN derivado de vellosidades coriales. Este examen puede realizarse tan precozmente como en la octava semana de gestación y permite con ello instaurar su tratamiento.

Todas las formas clínicas están asociadas a una anomalía en este gen, por lo que en la actualidad todos los pacientes deberían tener un diagnóstico genético, además del diagnóstico hormonal y clínico; paralelamente se debe hacer un estudio familiar que permita realizar el diagnóstico de portadores o de formas no clásicas oligosintomáticas y/o crípticas.

La mutación más frecuentemente encontrada es la del Intron2. Entre las características clínicas, prevaleció macrogenitosomía y la civilización simple. Se logró realizar la correlación del fenotipo y el genotipo a la mayoría de los afectados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kukreti P, Kandpal M, Jiloha RC. Mistaken gender identity in non-classical congenital adrenal hyperplasia. Indian J Psychiatry. 2014 Apr; 56(2): 182-4.

2. Kawano A, Kohno H, Miyako K. A Retrospective Analysis of the Growth Pattern in Patients with Salt-wasting 21-Hydroxylase Deficiency. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2014 Apr; 23(2): 27-34.
3. Morikawa S, Nakamura A, Fujikura K, Fukushi M, Hotsubo T, Miyata J, Ishizu K, Tajima T. Results from 28 years of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in sapporo. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2014 Apr; 23(2): 35-43.
4. Delvecchio M, Soldano L, Lonero A, Ventura A, Giordano P, Cavallo L et al. Evaluation of impact of steroid replacement treatment on bone health in children with 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine.* 2014 Jul 1; 48(3).
5. Joshi R, Das D, Tamhankar P, Shaikh S. Phenotypic variability in congenital lipoid adrenal hyperplasia. *Indian Pediatr.* 2014 May; 51(5): 399-400.
6. Al Hosani H, Salah M, Osman HM, Farag HM, El-Assiouty L, Saade D, et al. Expanding the comprehensive national neonatal screening programme in the United arab emirates from 1995 to 2011. *East Mediterr Health J.* 2014 Feb 11; 20(1): 17-23.
7. Almeida MQ, Kaupert LC, Brito LP, Lerario AM, Mariani BM, Ribeiro M et al. Increased expression of ACTH (MC2R) and androgen (AR) receptors in giant bilateral myelolipomas from patients with congenital adrenal hyperplasia. *BMC Endocr Disord.* 2014 May 12; 14: 42.
8. Gidlöf S, Wedell A, Guthenberg C, von Döbeln U, Nordenström A. Nationwide neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in sweden: a 26-year longitudinal prospective population-based study. *JAMA Pediatr.* 2014 Jun 1; 168(6): 567-74.
9. Yang Y, Zhou XY, Zhou XG. Clinical analysis of 52 cases of 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2015 Jun; 17(6): 613-7.
10. Odenwald B, Dörr HG, Bonfig W, Schmidt H, Fingerhut R, Wildner M, et al. Classic Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase-Deficiency: 13 Years of Neonatal Screening and Follow-up in Bavaria. *Klin Padiatr.* 2015 Jun 19; 227(05): 278-283.
11. Falhammar H, Nordenström A. Nonclassic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: clinical presentation, diagnosis, treatment, and outcome. *Endocrine.* 2015 Sep; 50(1): 32-50.
12. Turcu AF, Auchus RJ. Adrenal Steroidogenesis and Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2015 Jun; 44(2): 275-296.
13. Larrandaburu M, Matte U, Noble A, Olivera Z, Sanseverino MT, Nacul L, et al. Ethics, genetics and public policies in Uruguay: newborn and infant screening as a paradigm. *J Community Genet.* 2015; 6: 241.

Dra. Elayne Esther Santana Hernández. Especialista de Primer y Segundo Grado en Medicina General Integral y Genética Clínica. Asistente e Investigadora agregada. Centro Provincial de Genética Médica de Holguín. Correo electrónico: esantana@hpuh.hlg.sld.cu