

ANALISIS MOLECULAR DE LAS MUTACIONES MAS FRECUENTES ASOCIADAS A LA HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGENITA POR DEFICIT DE LA ENZIMA 21 HIDROXILASA

ANDREA DARDIS¹, ROXANA MARINO¹, IGNACIO BERGADA², MARIA EUGENIA ESCOBAR²,
MIRTA GRYNGARTEN², MARCO A. RIVAROLA¹, ALICIA BELGOROSKY¹¹ Laboratorio de Investigación, Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan; ² Servicio de Endocrinología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires

Resumen El 90% de los casos de HSC se deben al déficit de la enzima P450c21. En el humano ha sido descrito un gen activo que codifica para la enzima 21 hidroxilasa, el CYP21B, y un gen no funcional denominado CYP21A. Estos genes, ubicados en el brazo corto del cromosoma 6, presentan una homología entre sí del 98%. La alta homología entre los genes CYP21 y la complejidad de este locus génico, dificulta su análisis a nivel molecular y la interpretación de los resultados obtenidos. El objetivo del presente estudio fue elaborar una estrategia adecuada para la caracterización de las alteraciones más frecuentes descritas del gen CYP21B. Se analizaron 77 individuos con diagnóstico clínico y bioquímico de HSC por déficit de la enzima P450c21, pertenecientes a 73 familias no relacionadas (146 cromosomas). La estrategia elaborada permitió diferenciar pacientes con mutaciones puntuales (MP) homocigotas, pacientes con MP en un alelo y deleciones o conversiones en el otro, o pacientes con MP en un alelo y las MP Ex3 o Cluster Ex6 en el otro, aun cuando los progenitores del paciente no estuvieran disponibles para el estudio. Por otro lado, permitió discriminar deleciones o conversiones heterocigotas de duplicaciones del gen no funcional CYP21A, así como deleciones de los genes CYP21A y B, de un número de copias normales de estos dos genes. Un análisis exhaustivo del conjunto de los resultados obtenidos en el análisis molecular de este gen resulta indispensable para efectuar una caracterización adecuada de las alteraciones presentes en este locus.

Palabras clave: hiperplasia suprarrenal congénita, mutaciones, gen CYP21B

Abstract *Molecular analysis of the most frequent mutations associated with congenital adrenal hyperplasia secondary to steroid 21-hydroxylase enzyme deficiency.* Most cases (90%) of congenital adrenal hyperplasia (CAH) are secondary to steroid 21-hydroxylase enzyme deficiency (P450c21). In human, the P450c21 gene (CYP21B) is present along with a non functional pseudogene (CYP21A). These genes, located in chromosome 6, present a sequence homology of 98%. This high homology and the complexity of this gene locus brings about considerable difficulties in its molecular analysis and in the interpretation of the results. The aim of the present study was to elaborate an adequate strategy for the analysis of the most frequent mutations described in the CYP21B gene. A total of 77 patients with clinical and biochemical diagnosis of CAH secondary to P450c21 enzyme deficiency, as well as 170 unaffected relatives, were studied. They belonged to 73 unrelated families (146 chromosomes). The strategy allowed for the differentiation of patients with homozygous point mutations (PM), with PM in one allele and deletions, conversions, Ex3 or Cluster Ex6 PM in the other, even though parents were not always available for the study. Furthermore, it allowed for the discrimination of heterozygous deletions or conversions of the CYP21B gene from duplications of the non functional gene CYP21A, as well as CYP21B and A deletions from normal copies of the two genes. An exhaustive molecular analysis of this gene is necessary for an adequate characterization of the alterations present in this locus.

Key words: congenital adrenal hyperplasia, CYP21B gene mutations

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC), es un conjunto de síndromes producidos como consecuencia del déficit hereditario de alguna de las enzimas que intervienen en la síntesis de cortisol a partir de colesterol¹.

Sin embargo, el 90% de los casos de HSC se deben al déficit de la enzima 21 hidroxilasa (P450c21). Esta deficiencia, es un desorden autosómico recesivo que presenta tres formas clínicas. Dos de ellas se expresan fenotípicamente durante la vida fetal, y se denominan formas clásicas (FC). Estas incluyen una forma severa en la cual está alterada tanto la síntesis de cortisol como de la aldosterona, conocida como forma perdedora de sal (FPS), y una forma menos severa, en la cual la función mineralcorticoidea está conservada, conocida como forma virilizante simple (FVS). En ambas, el exceso en la pro-

Recibido: 20-I-2000

Acceptado: 19-VII-2000

Dirección postal: Dra. Alicia Belgorosky, Laboratorio de Investigación, Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, Combate de los Pozos 1881, 1245 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4308-5325 e-mail: abelgo@impsat.com.ar

ducción de andrógenos adrenales, resulta en la virilización de los genitales externos en el feto femenino. Finalmente ha sido descrita una forma de expresión tardía (FNC), en la cual el exceso de producción de andrógenos adrenales se manifiesta en la prepubertad tardía o en la adolescencia y se denomina forma no clásica².

En el humano ha sido descrito un gen activo que codifica para la enzima 21 hidroxilasa, el CYP21B, y un pseudogen no funcional denominado CYP21A, duplicados en tandem junto con los genes que codifican para los componentes C4 del complemento, C4A y C4B³. Estos genes se encuentran ubicados en el brazo corto del cromosoma 6 banda 21.3 y presentan una homología entre sí del 98%.

El análisis molecular del gen CYP21B en pacientes con HSC por déficit de 21 hidroxilasa, en poblaciones norteamericana y europeas, permitieron determinar que aproximadamente el 25% de estos pacientes presentan macrodeleciones de aproximadamente 30 Kb, que incluyen no sólo gran parte de la región 5' del gen CYP21B sino también todo el gen C4B y la región 3' del gen CYP21A, o macroconversiones del gen CYP21B en una forma similar al CPY21A⁴. El 75% restante presenta microconversiones génicas o mutaciones puntuales (MP). Las MP más frecuentes descritas en las FC son: I172N, R356W y Q318X, un cambio de C por G en el intrón 2, que generaría un sitio aceptor de splicing 12 bases corriente arriba del sitio aceptor de splicing normal, denominada In2, una delección de 8 pb en el exón 3 que genera un corrimiento del marco de lectura y la aparición de un codón de terminación prematuro, denominada Ex3 y tres sustituciones T por A en los codones 234-238 que determina un cambio en la secuencia de aminoácidos Ile-Val-Glu-Met por Asn-Glu-Glu-Lys, denominada Cluster Ex6. En las FNC las MPs más frecuentes descritas son: P30L y V281L.

Por otro lado, han sido descritas delecciones del gen CYP21A asociadas a delecciones del gen C4 A o B en población normal⁵, y duplicaciones del gen CYP21A y C4B frecuentemente asociadas a la forma no clásica de HSC por déficit de 21 hidroxilasa⁶. Dada la alta homología entre los genes CYP21 y la complejidad de este locus génico, el estudio a nivel molecular resulta dificultoso; siendo necesario implementar metodologías y estrategias adecuadas para realizarlo.

El objetivo del presente estudio fue establecer una estrategia de estudio para un adecuado diagnóstico molecular de HSC por déficit de la enzima P450c21.

Material y métodos

Material clínico

El análisis de las alteraciones moleculares más frecuentes del gen CYP21B descritas en otras poblaciones, fue realizado en

77 individuos con diagnóstico clínico y bioquímico de HSC por déficit de la enzima P450c21, pertenecientes a 73 familias no relacionadas (146 cromosomas). Treinta y ocho familias (76 cromosomas) presentaron la FPS, 15 (30 cromosomas) la FVS y 20 (40 cromosomas) la FNC.

En 55 familias se realizó el estudio molecular en ambos progenitores, en 16 sólo se analizó a uno de ellos y en 2 ninguno de los progenitores estuvo disponible para el estudio. Se analizaron también un total de 44 hermanos no afectados. En total se estudiaron 247 individuos.

Todas las pacientes de sexo femenino, con las FC (n = 40, 29 FPS y 11 FVS) presentaron ambigüedad genital al nacer, y el diagnóstico de HSC fue confirmado por la detección de niveles basales elevados de 17 OH progesterona en suero. Los pacientes de ambos sexos con la FPS (29 mujeres y 11 varones) fueron diagnosticados luego de presentar crisis perdedora de sal, durante las primeras 4 semanas de vida post-natal. Los pacientes de sexo masculino con la FVS (n = 5), presentaron alguno de los siguientes signos característicos: pseudo-pubertad precoz con testículos pequeños, pubarca precoz, velocidad de crecimiento acelerada y adelanto de la edad ósea.

Los pacientes con la FNC (19 mujeres y 2 varones) presentaron como signo clínico pubarca precoz, asociada en algunos casos a hipertrofia de clítoris en las niñas. Estos pacientes fueron diagnosticados en base a los niveles séricos de 17OH progesterona basales > 2 ng/ml y post estímulo con ACTH elevados, > 10 ng/ml.

Métodos

Utilizando la técnica de PCR en presencia de primers específicos^{7,8} se amplificaron 4 fragmentos del gen CYP21B (Fig. 1, panel superior). Las mutaciones P30L, In2, Ex3, I172N, Cluster

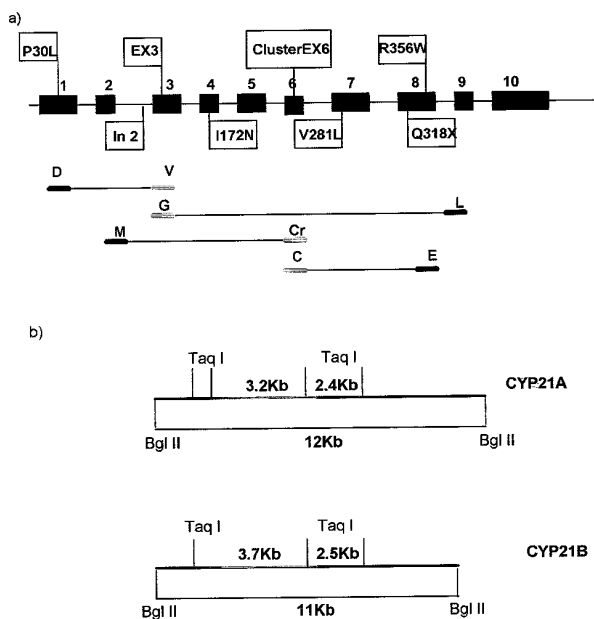


Fig. 1.- a) esquema de los 10 exones y 9 intrones del gen CYP21B, mutaciones puntuales más frecuentes descritas y localización de los primers utilizados en la PCR.

— Primers específico para el gen CYP21B

— Primers específico para los genes CYP21A y B

b) Esquema de los fragmentos de los genes CYP21A y B generados por digestión con las enzimas de restricción Taq I y Bgl II.

Ex6, V281L y R356W fueron analizadas utilizando la técnica de hibridación con oligonucleótidos alelo específicos, ASO⁷, mientras que la MP Q318X fue estudiada mediante digestión con la enzima de restricción Pst1⁹. La presencia de deleciones o macroconversiones génicas fue analizada mediante la técnica de Southern blot¹⁰, utilizando para la digestión del ADN genómico las enzimas Taq1 y Bgl II (Fig. 1, panel inferior).

El análisis molecular del gen CYP21B fue realizado en el paciente, y una vez detectada la alteración se procede a la búsqueda de la misma en los padres y hermanos.

Resultados

Estrategia

El primer paso en el análisis molecular del gen CYP21B, es la amplificación por PCR de los cuatro fragmentos del gen que se muestran en la Fig. 1, panel superior.

1) La ausencia de producto amplificado con los 4 pares de primers, observada en 2 pacientes, sugiere la presencia de deleciones o macroconversiones del gen CYP21B en ambos alelos. Este resultado fue confirmado en ambos realizando un análisis del ADN utilizando la técnica de Southern blot, digiriendo el ADN genómico con la enzima de restricción Taq I. Las deleciones o macroconversiones del gen CYP21B homocigotas generan un patrón de bandas caracterizado por la ausencia de la banda de 3.7 Kb correspondiente al gen funcional CYP21B (Fig. 2 B, C).

2) La ausencia de producto amplificado utilizando los primers D-V y G-L, pero en presencia de amplificación con M-Cr y C-E, obtenida en 3 pacientes, descarta la presencia de deleciones o macroconversiones en ambos alelos. Sin embargo deleciones o macroconversiones

parciales que involucren los primeros exones del gen pero no del exón 6 en adelante, impedirían la amplificación con los pares de primers D-V y G-L y seguiría siendo posible la amplificación específica con los pares de primers M-Cr y C-E. Por lo tanto deleciones o macroconversiones parciales, ya sea en forma homocigota o asociadas con deleciones o macroconversiones más grandes, deben ser tenidas en cuenta. La confirmación también debe realizarse a través de un análisis de Southern blot en presencia de la enzima de restricción Taq I. El patrón de bandas, será igual al del caso anterior, dado que estará ausente la banda de 3.7 Kb correspondiente al gen CYP21B. Este resultado fue obtenido en 2 de los 3 pacientes.

Por otro lado, dado que la secuencia con la cual hibridizan los primers V y G coinciden con la mutación Ex3, la presencia de esta mutación, ya sea en forma homocigota o asociada a deleciones o macroconversiones impediría la amplificación de los fragmentos D-V y G-L. Esta posibilidad debe también ser tenida en cuenta, y puede confirmarse realizando dot blot para la mutación Ex3 y el análisis de Southern blot con la enzima de restricción Taq I. Si el paciente presenta la mutación Ex3 en ambos alelos, el patrón de bandas obtenido en el Southern blot será totalmente normal. Sin embargo la presencia de Ex3 en un alelo y deleciones o macroconversión en el otro alelo, generará un patrón característico de bandas donde la ausencia del gen activo en un alelo, provoca una disminución de la intensidad de la banda de 3.7 Kb con respecto a la banda de 3.2 Kb, pudiendo incrementarse la relación de intensidades entre 3.2 y 3.7 al doble (delección) o al triple (macroconversión) (Fig. 2 A, B, C y 3 A, B, C). En este caso un

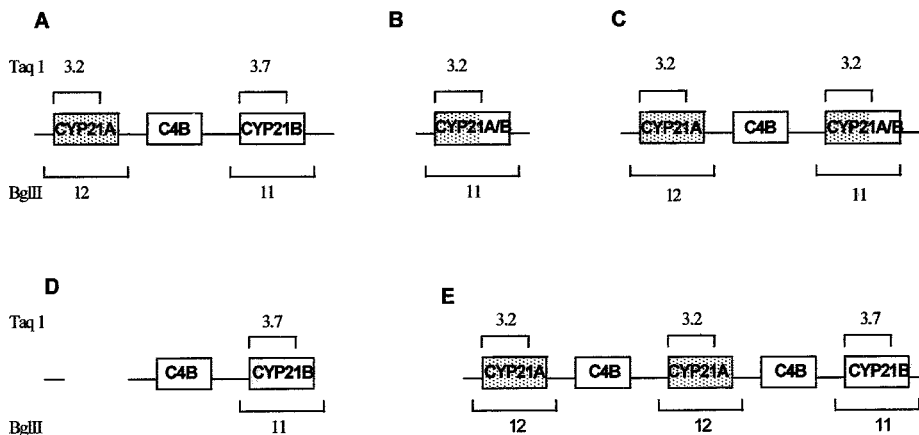


Fig. 2.- Esquema del locus C4/CYP21. Fragmentos generados por digestión con las enzimas de restricción Taq 1 y Bgl II. A: alelo normal. B: alelo con delección del gen CYP21B. C: alelo con conversión del gen CYP21B. D: alelo con delección del gen CYP21A. E: alelo con duplicación del gen CYP21A.

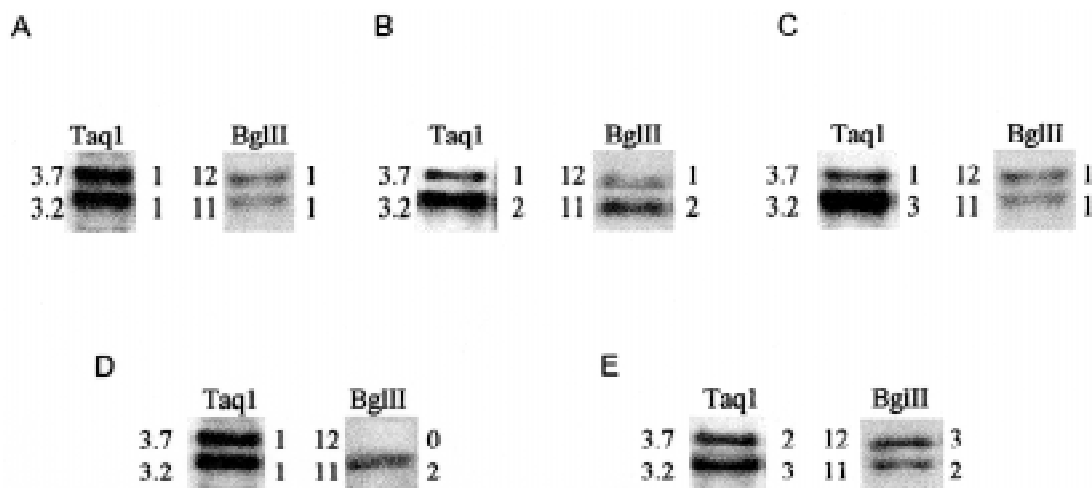


Fig. 3.— Autorradiografía del análisis de Southern blot utilizando las enzimas de restricción Taq I y Bgl II. A la izquierda de cada autorradiografía figuran los tamaños de las bandas generadas y a la derecha la dosis de cada una de ellas. A: normal. B: delección heterocigota del gen CYP21B. C: conversión heterocigota del gen CYP21B. D: delección del gen CYP21A en un alelo y del gen CYP21B en el otro alelo. E: duplicación heterocigota del gen CYP21A.

segundo Southern, digiriendo el ADN con la enzima de restricción BglIII, permite diferenciar más claramente la delección de la macroconversión génica. En presencia de una delección génica genera un fragmento de 11 Kb de mayor intensidad que el de 12 Kb, mientras que la presencia de una macroconversión génica genera un patrón de bandas normal (Fig. 2 A, B, C y 3 A, B, C). Este resultado fue obtenido en un paciente.

3) De modo similar, la ausencia de producto amplificado utilizando los primers C-E y M-Cr, pero presente con D-V y G-L, sugiere la presencia de la mutación Cluster Ex6, ya sea en forma homocigota o asociada a delección o macroconversión génica, dado que la región del gen con la cual hibridan los primers C y Cr coinciden con la mutación Cluster Ex6. Sin embargo, a diferencia del caso anterior, no han sido descritas delecciones o macroconversiones génicas parciales de la región 3' del gen CYP21B. El modo de confirmar el diagnóstico molecular es realizando nuevamente, un estudio por dot blot de la mutación Cluster Ex6 y analizar la presencia de delecciones o macroconversiones a través del análisis de Southern blot utilizando la enzima de restricción Taq I y Bgl II. Este resultado no fue observado en ninguno de los pacientes analizados.

4) Cuando la amplificación por PCR es positiva en presencia de los 4 pares de primers (68 pacientes) se procede a la búsqueda de MPs ya sea por ASO o digestión con enzimas de restricción.

a) En 14 pacientes se halló sólo una MP en forma heterocigota, permaneciendo la alteración de uno de los alelos no detectada.

b) Dos MP en forma heterocigota, fueron observadas en 28 pacientes. Sin embargo éstas pueden estar presentes en alelos diferentes o en el mismo alelo, siendo necesario en este caso realizar obligatoriamente el estudio en los padres. Once pacientes presentaron dos MP en el mismo alelo.

Si ambas MP corresponden al mismo alelo y además son contiguas se completa el estudio realizando un análisis de Southern blot para determinar si las mismas son parte de delecciones o macroconversiones génicas parciales. Este resultado fue obtenido en 7 de los 11 pacientes.

c) En 22 pacientes se observó hibridación del producto de PCR utilizando para realizar la búsqueda de una determinada MP solamente con el oligonucleótido de secuencia mutada. En estos casos resulta necesario definir si el paciente presenta esta MP en sus dos alelos (13 de 22), o bien presenta un alelo con dicha mutación mientras que el otro alelo no está siendo amplificado, ya sea por la presencia de una delección o macroconversión génica (5 de 22) o bien porque la presencia de una MP, Ex3 o Cluster Ex6 en la región del ADN donde hibridan los primers utilizados en la PCR (4 de 22).

d) En 4 casos no se detectó ninguna MP, realizándose la búsqueda de delecciones o macroconversiones heterocigotas, a través del análisis por Southern blot digiriendo el ADN genómico de los pacientes con las enzimas de restricción Taq I y Bgl II. Si el patrón de bandas en el Southern en presencia de Taq I es normal, puede tratarse de un paciente con una delección del gen CYP21B en un alelo asociada a una delección del gen CYP21A en el otro alelo, en cuyo caso la relación entre

las bandas de 3.7 y 3.2 Kb no se altera (1 de 4 pacientes) (Fig. 2 B, D y 3 D). La digestión en presencia de la enzima Bgl II permite discriminar esta situación dado que las deleciones del gen CYP21B no sólo involucran gran parte de la región 5' del mismo sino también todo el gen C4B y parte del gen CYP21A, generándose un híbrido CYP21A/B que genera una banda de 11 Kb al ser digerido con esta enzima, y desaparece la banda de 12 Kb como se observa en la Fig. 2 B. Por otro lado, las deleciones del gen CYP21A darán lugar a la desaparición de la banda de 12 Kb característica en presencia de Bgl II (Fig. 2 D). Por lo tanto pacientes con deleciones del gen CYP21B asociadas a deleciones del gen CYP21A, presentarán un patrón de bandas caracterizado por la desaparición de la banda de 12 Kb en presencia de Bgl II como se muestra en la Fig. 3 D. Tres pacientes presentaron un patrón de bandas normal utilizando ambas enzimas. En estos pacientes la alteración del gen CYP21B no pudo ser discriminada.

En todos los casos en que se realizó el análisis de Southern blot en presencia de Taq 1 y se obtuvo un patrón de bandas alterado, se realizó un segundo Southern utilizando la enzima Bgl II con el fin de diferenciar entre una deleción o macroconversión heterocigota del gen CYP21B de duplicaciones del gen no funcional CYP21A (Fig. 2 E y 3 E). Duplicaciones del gen no funcional fueron observadas en 8 pacientes.

Frecuencia de las mutaciones analizadas

Utilizando esta estrategia de estudio del gen CYP21B, se analizaron las alteraciones más frecuentes descritas de este gen en nuestra población de pacientes las formas clásica y no clásica de HSC por déficit de la enzima P450c21.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de este estudio.

De los 21 alelos pertenecientes a pacientes con la FPS (27.6%) que presentaron deleciones o macroconversiones génicas, un 9% presentaron deleciones o macroconversiones parciales del extremo 5' del gen, cuya extensión fue solamente hasta el intrón 2, un 39% presentaron deleciones o macroconversiones parciales que comprendieron hasta los 5 primeros exones y sus correspondientes intrones; finalmente, el 52% restante presentaron deleciones o macroconversiones que incluyeron al menos hasta el exón 6 del gen CYP21B. Por otro lado, las deleciones o macroconversiones génicas detectadas en pacientes con las FVS y FNC (3.3% y 2.5% respectivamente), incluyeron al menos hasta el exón 6 del gen CYP21B.

Es interesante que de 9 pacientes con la FNC de esta patología, en los que se realizó el estudio por Southern blot, 8 presentaron duplicaciones del gen no funcional CYP21A.

TABLA 1.— Frecuencia de las alteraciones génicas más frecuentes descritas del gen CYP21B

Alteración génica	Frecuencia %		
	FPS	FC*	FNC
Del o Conv	27.6	3.3	2.5
ln2	27.6	16.6	10.0
Q318X	14.5	3.3	2.5
l172N	0	43.3	0
Ex3	5.3	3.3	2.5
R356W	4	3.3	0
Cluster Ex6	2.6	0	0
V281L	0	3.3	57.5
P30L	0	3.3	2.5
ln2-Q318X**	1.3	0	0
ln2-V281L**	1.3	0	0
ln2-Ex3**	1.3	0	0
ln2-Cluster Ex6-R356W**	0	3.3	0
ND	14.5	17	22.5

ND = no detectado

* Datos parcialmente publicados

** Las MPs separadas por guión representan MPs halladas en el mismo alelo

Por otro lado, esta estrategia metodológica ha permitido determinar que 4 progenitores (2 de sexo femenino y 2 de sexo masculino) de pacientes con esta forma clínica estaban afectados y no habían sido diagnosticados, dado que se detectaron alteraciones del gen CYP21B en sus 2 alelos (genotipos: ln2/V281L, ln2/V281L, V281L/V281L, V281L/V281L).

Finalmente, el porcentaje de alelos cuya alteración no pudo ser determinada, fue del 14.5%, 17% y 22.5% en la FVS, FPS y FNC, respectivamente. El porcentaje de alelos que presentaron más de una mutación en la FPS y FVS fue del 3.9 y 3.3 respectivamente (Tabla 1).

Discusión

El análisis molecular de las alteraciones del gen CYP21B presenta varias dificultades.

La alta homología entre los genes CYP21A y B determina que para lograr una amplificación por PCR específica del gen activo, deban utilizarse primers que hibridicen con regiones del gen CYP21B cuya secuencia de bases sea diferente a la secuencia del gen no funcional CYP21A.

Por otro lado, las deleciones o macroconversiones génicas del gen CYP21B involucran parte del gen no funcional CYP21A, todo el gen C4 B y parte del gen CYP21B. Aunque estas alteraciones en general son de aproximadamente 30 Kb, la región del gen CYP21B que

resulta delecionada o convertida, es variable, pudiendo involucrar solamente el extremo 5' del mismo o prácticamente todo el gen activo. Además la presencia de deleciones o duplicaciones del gen no funcional CYP21A, determinan que el análisis de este locus a nivel molecular y la interpretación de los resultados sea sumamente compleja.

Es necesario por lo tanto, elaborar estrategias diagnósticas adecuadas para lograr caracterizar correctamente las alteraciones del gen CYP21B en pacientes con HSC por déficit de la enzima P450c21.

La implementación de la estrategia elaborada permitió diferenciar pacientes con MP homocigotas, pacientes con MP en un alelo y deleciones o conversiones en el otro, o pacientes MP en un alelo y las MP Ex3 o Cluster Ex6 en el otro, aun cuando los progenitores del paciente no estuvieran disponibles para el estudio.

La realización del análisis de Southern blot utilizando las enzimas de restricción Taq 1 y Bgl II permitió discriminar deleciones o conversiones heterocigotas de duplicaciones del gen no funcional CYP21A, así como deleciones de los genes CYP21A y B, de un número de copias normales de estos dos genes.

Algunos investigadores han utilizado la PCR alelo específica como metodología para la caracterización de las alteraciones del gen CYP21B en pacientes con HSC por déficit de la enzima P450c21¹¹. Sin embargo, en nuestra experiencia, la búsqueda de MP solamente no fue suficiente para determinar el genotipo completo, siendo necesario en la mayoría de los casos profundizar el estudio molecular con el análisis de Southern blot utilizando las enzimas de restricción Taq y Bgl II.

En un estudio previo realizado en un grupo de 38 pacientes afectados con las FC de HSC por déficit de P450c21, el porcentaje de alelos en los que se pudo detectar la alteración del gen CYP21B fue del 75%⁹. La presente estrategia permitió incrementar este porcentaje a un 85% y permitió además caracterizar un 77.5% de los alelos en los pacientes con la FNC de esta patología.

Cuatro pacientes (3 con la FPS y 1 con la FVS) presentaron más de una MP en el mismo alelo, lo que demuestra que frente al hallazgo de 2 o más MP en el paciente, es importante determinar si las mismas se encuentran en el mismo alelo o en alelos diferentes.

Por otro lado, un 15% de los pacientes con la FNC presentó alteraciones severas del gen CYP21B, características de las formas clásicas de esta patología. Esto es posible dado que la expresión clínica estaría determinada por el grado de actividad enzimática que posee la proteína transcrita a partir del alelo menos afectado. La búsqueda de alteraciones severas en este grupo de pacientes, sería especialmente relevante, dado que los mismos podrían transmitir una forma clínica más severa a su descendencia.

La frecuencia de deleciones o macroconversiones génicas halladas en el grupo de pacientes con la FNC en nuestra población fue más baja que la reportada en población norteamericana¹², sin embargo no queda claro en la información disponible, si el análisis de Southern blot fue realizado utilizando solamente la enzima de restricción Taq 1 o también en presencia de la enzima Bgl II. Esta información es particularmente relevante ya que la enzima Ta1, en ausencia de hibridación con una sonda para C4, no permite diferenciar las deleciones génicas de las duplicaciones del gen no funcional CYP21A. En nuestro grupo de pacientes con esta forma clínica, las duplicaciones del gen CYP21A fueron altamente frecuentes. Ha sido descrito, en otras poblaciones analizadas, que aproximadamente 1/3-1/2 de los pacientes con la FNC de esta patología presentan duplicaciones del gen CYP21A. Si bien existe una asociación estadísticamente significativa entre las duplicaciones del gen CYP21A y la FNC, las implicancias clínicas de dichas duplicaciones no quedan claras dado que también han sido halladas en individuos normales⁵.

La precisión diagnóstica de las alteraciones del gen CYP21B, se vincula a la transferencia asistencial en el diagnóstico prenatal de esta patología, dado que esta información permite implementar conductas terapéuticas destinadas a evitar la virilización de los genitales externos en los fetos femeninos afectados^{13, 14, 15}. Además, posibilita precisar con mayor confiabilidad el diagnóstico en algunos pacientes con HSC con la FNC, en los cuales las técnicas bioquímicas clásicas no son concluyentes¹⁶.

Por estos motivos, realizar un análisis exhaustivo del conjunto de los resultados obtenidos en el análisis molecular de este gen resulta indispensable para efectuar una caracterización adecuada de las alteraciones presentes en este locus.

Agradecimientos: Se agradece la colaboración del Dr. Horacio Domené por la extracción de ADN de algunas muestras. Este trabajo fue llevado a cabo con subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

Bibliografía

1. Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 1988; 9: 295-318.
2. Chrousos GP, Loriaux DL, Mann DL, Cutler GB. Late-onset 21-hydroxylase deficiency mimicking idiopathic hirsutism or polycystic ovarian disease: an allelic variant of congenital virilizing adrenal hyperplasia with a milder enzymatic defect. *Ann Intern Med* 1982; 96: 143-8.
3. White PC, New MI, Dupont B. HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P450 specific for steroid 21 hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 82: 7505-9.
4. White PC, Vitek A, Dupont B, New MI. Characterization

- of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4436-40.
5. Morel Y, Andre J, Uring-Lambert B, Hauptman G, Bétuel H, Tosi M, Forest MG, David M, Bertrand J, Miller WL. Rearrangements and point mutations of P450c21 genes are distinguished by five restriction endonuclease haplotypes identified by a new probing strategy in 57 families with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Invest* 1989; 83: 527-36.
 6. Mornet E, Couillin P, Kutten F, et al. Association between restriction fragment length polymorphisms detected with a probe for human 21-hydroxylase (21-OH) and two clinical forms of 21-OH deficiency. *Hum Genet* 1986; 74: 402-8.
 7. Tusie-Luna MT, Speiser PhW, Domic M, New MI, White PC. A mutation (pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 685-92.
 8. Owerbach D, Crawford YM, Draznin MB. Direct analysis of CYP21B genes in 21-hydroxylase deficiency using polymerase chain reaction amplification. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 125-31.
 9. Dardis A, Bergadá I, Bergadá C, Rivarola MA, Belgorosky A. Mutations of the steroid 21-hydroxylase gene in an argentinian population of 36 patients with classical congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1997; 10: 55-61.
 10. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-17.
 11. Wedell A, Thilén A, Ritzén ME, 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.
 12. Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC, New MI. Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2322-9.
 13. Ward RM. Pharmacologic enhancement of fetal lung maturation. *Clin Perinatol* 1994; 21: 523-42.
 14. Speiser PW, New MI. Prenatal diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia. *Clin Perinatol* 1994; 21: 631-45.
 15. Mercado AB, Wilson RC, Cheng KC, Wei JQ, New MI. Prenatal treatment and diagnosis of congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2014-20.
 16. New MI, DuPont B, Pang S, Pollack MS and Levine LS. An update of congenital adrenal hyperplasia. *Rec Prog Hormone Res* 1981; 37: 105-81.

At the same time we (the scientists) must never forget what we can do best. In our searching for ways to understand better the world around us, we are a vital, if not the vital, key for ensuring that the various civilizations of men long prevail over the inherent chaos of the physical world about us. Thus, we have as much to lose from false humility as from elitist arrogance. In working toward the reconstruction of our societies, we must never forget that ideas are not only beautiful, but necessary.

Al mismo tiempo nosotros (los científicos) no debemos nunca olvidar lo que mejor sabemos hacer. En nuestro afán de encontrar medios para conocer mejor el mundo que nos rodea, somos una clave, sino *la* clave, para asegurar que las diversas civilizaciones humanas prevalezcan sobre el caos inherente al mundo físico alrededor nuestro. Así, tenemos tanto que perder con la falsa humildad como con la arrogancia elitista. Al trabajar hacia la reconstrucción de nuestras sociedades, no debemos nunca olvidar que las ideas son no sólo bellas, sino necesarias.

James D. Watson (1928-)

A Passion for DNA. Genes, Genomes and Society. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000, p 116