Biblioteca Digital FCEN-UBA

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Estudio de mutaciones noveles como causa de la deficiencia de 21hidroxilasa

Taboas, Melisa

2014-09-16

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Taboas, Melisa. (2014-09-16). Estudio de mutaciones noveles como causa de la deficiencia de 21-hidroxilasa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Taboas, Melisa. "Estudio de mutaciones noveles como causa de la deficiencia de 21hidroxilasa". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-09-16.

EXACTAS Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293 **Contacto:** digital@bl.fcen.uba.ar



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio de mutaciones noveles como causa de la

deficiencia de 21-hidroxilasa

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos

Aires en el área ciencias biológicas

Melisa Taboas

Directora de Tesis: Dra Liliana Dain

Consejero de Estudios: Dr. Norberto Iussem

Lugar de Trabajo: Centro Nacional de Genética Médica (CENAGEM) "Dr. Eduardo

Castilla", ANLIS.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET.

Fecha de defensa: 16 de septiembre de 2014, Buenos Aires.

ESTUDIO DE MUTACIONES NOVELES COMO CAUSA DE LA DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA

RESUMEN

Con el nombre de Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC) se conoce a un conjunto de enfermedades autosómicas recesivas en las que se encuentra afectada la esteroidogénesis adrenal. En el 95% de los casos, la HSC se produce por deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa. Esta deficiencia puede manifestarse en forma severa o clásica (FC), o leve o no clásica (FNC). La enzima está codificada por el gen *CYP21A2*, que se encuentra duplicado y repetido en tándem junto a un pseudogen *CYP21A1P* con el que comparte 98% de identidad de secuencia. La elevada identidad de secuencia produce que la región sea propensa al alineamiento incorrecto y a la recombinación desigual, como así también a la transferencia de secuencias del pseudogen al gen mediante el mecanismo de conversión génica. La mayor parte de los afectados son compuesto heterocigotas ya que poseen diferentes mutaciones en cada uno de sus alelos. En estos casos, la manifestación clínica de la enfermedad será aquella que se relaciona con el alelo con mayor actividad enzimática. Si bien la mayor parte de los pacientes presentan mutaciones derivadas del pseudogen, hasta la fecha se identificaron más de 240 mutaciones diferentes como causales de la patología.

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se analizó la presencia de las 10 mutaciones más frecuentes derivadas del pseudogén en pacientes con deficiencia de 21-hidoxilasa de nuestra población. En esta tesis se estudió por secuenciación todo el gen *CYP21A2* y su región promotora en muestras de ADN de 87 pacientes (15 FC y 72 FNC) en los cuales restaba determinar el defecto causante de la patología en uno o en ambos alelos del gen.

Nuestro análisis reveló la presencia de 12 mutaciones poco frecuentes ya descriptas previamente y 7 mutaciones noveles, 6 en la región codificante y 1 en un sitio aceptor de *splicing* en el intrón 5. Para todas las mutaciones noveles halladas se analizaron 50 individuos de la población general mediante amplificación de la región de interés y cortes con enzimas de restricción y en ningún caso se halló la presencia de las mismas. Se hallaron asimismo, variantes de secuencias no descriptas previamente en regiones promotoras e intrónicas que se clasificaron como polimorfismos ya sea porque las mismas se observaron también en individuos de la población general, o bien porque no se encuentran en sitios que *a priori* pudieran afectar el *splicing*, respectivamente.

A los efectos de analizar la implicancia biológica de las mutaciones noveles halladas, se realizaron aproximaciones bioinformáticas y ensayos funcionales. Dado que la proteína CYP21A2 humana no está cristalizada, la misma se modeló mediante herramientas in silico a partir de 18 cristalografías de otras proteínas de la familia CYP. Una vez obtenido el modelo, se analizó la estabilidad de las mutantes aminoacídicas halladas que no generaban corrimiento del marco de lectura. Las predicciones indicaron cambios en la estabilidad y/o carga de la superficie de la proteína que sugerirían un posible efecto deletéreo de las mismas. Para los ensayos funcionales, se realizaron mutagénesis dirigidas sobre un vector que contiene al ADNc de CYP21A2, transfección en células COS-7 y estimación de la expresión de la proteína y de su actividad mediante Western Blot y cromatografía en placa delgada (TLC), respectivamente. En todos los casos, las mutantes presentaron una actividad enzimática residual (AER) entre el 15 y el 50%, que se corresponderían con alelos relacionados a la FNC de la patología. En uno de los pacientes, una de las mutaciones noveles se encontraba en el mismo alelo con otra descripta previamente. Los ensayos funcionales demostraron que si bien las mismas en forma aislada son leves, la presencia de ambas en cis predice un alelo severo con una AER cercana al 2%. Para algunas de las mutaciones puntuales y para la doble mutante se observó una disminución en la cantidad de proteína resultante.

Para la mutación en el sitio aceptor de *splicing* en el intrón 5, los análisis bioinformáticos predijeron la anulación del sitio canónico y la presencia de 2 sitios crípticos de *splicing*, uno en la mitad del intrón 5 y otro en el exón 6. Para evaluar la eficiencia de *splicing in vitro*, los estudios funcionales consistieron en la construcción de un minigén mediante amplificación de un fragmento entre el exón 4 y el exón 7 del gen, posterior clonado en un vector de expresión, transfección en células HeLa, HEK-293 e Y-1 y valoración del ARNm obtenido por RT-PCR. Los ensayos revelaron que la mutante presentaba un ARNm más corto que la salvaje producto de una deleción de 16 nucleótidos debido a la utilización del sitio críptico de *splicing* dentro del exón 6. Esta deleción generaría un codón de terminación prematuro que predice un alelo severo relacionado con la FC de la patología.

Mediante este estudio, el genotipo se completó en 27 de los 87 pacientes (100% de los pacientes FC y 16,6% FNC). Estos resultados señalarían que es probable que el valor de 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) post estímulo con ACTH (test que se realiza para incluir a los pacientes de la FNC), esté sobreestimando la prevalencia de la patología. A los efectos de

disciminar si los valores hormonales difieren entre los pacientes FNC totalmente genotipificados y aquellos que no, se compararon los valores hormonales de 17-OHP basal y post estimulación con ACTH, así como los de Dehidroepiandrosterona-sulfato (DHEA-S), Testosterona (T) y Androstenediona (A) de 271 pacientes diagnosticados como FNC. Los mismos fueron agrupados de acuerdo a si poseen los 2 alelos mutados, uno o ninguno. Los resultados obtenidos indican que no hay diferencias significativas entre los grupos estudiados cuando se analizaron los valores de A, T y DHEA-S. Sin embargo, en el caso de 17-OHP basal y post ACTH, se observan diferencias significativas entre aquellos que poseen ambos alelos con mutación y los demás grupos de estudio. Asimismo, se observó que si los pacientes presentaban valores de 17-OHP post ACTH entre 10 (valor hormonal de corte para la inclusión de pacientes) y 20 ng/ml, sólo en el 23% se hallaban los 2 alelos mutados Si el valor hormonal era mayor a 20 ng/ml, el 85% posee ambos alelos con mutación.

Por último, analizando los genotipos encontrados en todos los pacientes de nuestra cohorte, ya sea mediante secuenciación o mediante el estudio de las 10 mutaciónes más frecuentes, observamos que en un 97,7% de los pacientes el fenotipo se correspondía con el genotipo hallado. Las principales discordancias se hallaron en pacientes con la mutación p.I172N, ya que la misma se asoció tanto a la forma virilizante simple (VS) como a la forma perdedora de sal. Por otro lado, si bien la mutación p.R356W está altamente relacionada a la forma PS de la enfermedad, un paciente VS presentaba esta mutación en heterocigosis compuesta con otra mutación que predice una enzima sin actividad en el alelo homólogo. Asimismo, en la literatura se describe a la mutación poco frecuente p.H62L como una mutación leve y asociada a la FNC de la patología. En esta tesis, sin embargo, se refiere que la misma se relacionaría también con la forma VS de la enfermedad. Por último, la mutación poco frecuente p.R341P se asocia a la forma VS, si bien en este trabajo se describe un paciente PS que poseía esta mutación en heterocigosis compuesta con la mutación poco frecuente p.R341P.

<u>Palabras claves</u>: Hiperplasia Suprarrenal Congénita; deficiencia 21-hidroxilasa; gen *CYP21A2*; mutaciones noveles; estudio funcional.

STUDY OF NOVEL MUTATIONS AS THE CAUSE OF 21-HYDROXYLASE DEFICIENCY

SUMMARY

Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) is an autosomal recessive disease caused, in 95 % of cases, by the deficiency of the 21–hydroxylase enzyme. This disorder, which is the most frequent inborn error of metabolism, has a broad spectrum of clinical forms, ranging from severe or classical, which includes the salt-wasting (SW) and simple virilising (SV) forms, to the mild late onset or non-classical form of CAH (NCCAH). The enzyme is encoded by the *CYP21A2* gene, which is duplicated and repeated in tandem along with the *CYP21A1P* pseudogene with which it shares 98 % of sequence identity. The high degree of sequence identity makes this region prone to misalignment and unequal recombination, as well as the transference of sequences from the pseudogene to the gene by gene conversion. Although most of the patients presented pseudogene derived mutations, approximately 240 mutations haven been described up to date.

In this work, DNA from 87 patients (15 CCAH and 72 NCCAH) was analyzed by complete gene sequencing. In these patients the determination of the defect causing the disease remained inconclusive after the study of the 10 most frequent pseudogen-derived mutations. We found 12 less frequent mutations previously described, and 7 novel ones, 6 of them in the coding region and one in an acceptor splice site in intron 5. For all the novel mutations, DNA from 50 randomly selected individuals from the general population were analyzed by PCR amplification followed by restriction enzyme assays, but none of these mutations were found. We also found novel sequence variants in in the promoter region of the gene and in introns that were classified as polymorphisms, either because they were found in individuals from the general population, or because they are placed in regions that might not affect splicing outcome, respectively.

In order to study the biological consequences of the novel mutations, bioinformatic approaches and functional assays were performed. Since human CYP21A2 was not crystallized yet, the protein was modeled by means of *in silico* tools using 18 other CYP proteins as templates followed by the estimation of the mutant protein stability. Molecular modeling studies revealed changes in the stability and/or surface charge of the protein that could be related to the clinical manifestations found in the patients. For functional assays,

site-directed mutagenesis of a vector containing the *CYP21A2* cDNA were performed, followed by transfection into COS-7 cells and estimation of the protein expression by Western blotting (WB) and its activity by TLC. In all cases, the mutants showed a residual enzymatic activity (REA) lesser than 50% of the wild type protein. Accordingly, all the variants predict alleles compatible to the mild NCCAH form of the disease. In one patient, one of the novel mutations was found in the same allele with another previously described. Functional assays showed that while the mutations in isolation are mild, the presence of both mutations in *cis* predict a severe allele with a REA close to 2%. In the WB assays, some of the isolated mutants and the double one showed less amount of the protein in comparison with the wild type.

For the novel mutation in the acceptor splcing site of intron 5, *in silico* analyses predicted the disruption of the canonical site. Besides, two strong putative cryptic splicing sites, one located in the intron 5 and one in exon 6 were predicted. For functional assays, splicing reporter minigenes were constructed comprising the genomic region from exon 4 to exon 7 of the *CYP21A2* gene. The vector was transiently transfected into HEK-293, HeLa, Y-1 cells and splicing was assessed by RT-PCR. We demonstrate that the allele with the intron 5 mutation completely abolishes the use of the canonical splicing site. Instead, the use of the cryptic splicing acceptor site within exon 6 created an mRNA with a 16 nt deletion leading to the appearance of a premature stop codon. A severe allele related to the classical form of the disease is strongly suggested by this mutation.

After our work, the genotype was completed in 27 out of 87 patients (100 % of the CCAH and 16,6% of the NCCAH). This results may indicate that the currently cut-off hormonal levels used for the diagnosis of NCCAH is overestimating the prevalence of the disease. To evaluate if hormone values differ between the NCCAH patients fully genotyped and those with at least one non-determined allele, basal and post ACTH stimulation 17-hydroxyprogesterone (17-OHP), dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S), testosterone (T) and androstenedione (A) values were compared in 271 patients diagnosed as NCCAH. Patients were grouped according to whether they had 2 mutated alleles, one or no one. Our analysis revealed no significant differences between groups when the values of A, T and DHEA-S were compared. However, basal and post ACTH 17-OHP levels were statistically different between those patients having both mutated alleles and those with one or no one. Among patients with 17-OHP post ACTH values between 10 (currently cut-off value) and 20

ng/ml, only a 23 % had 2 mutated alleles, whereas if the values were greater than 20 ng/ml, 85 % of patients had mutations in both alleles.

Finally, analyzing the genotypes found in all our patients, either after sequencing or by studying the 10 most frequent mutations, we observed a 97,7% phenotype-genotype correlation, while discrepancies were found mostly associated to the p.I172N mutation. Patients having this mutation presented either with the SV form or with the SW one. In addition, while p.R356W mutation is strongly associated with the SW form of the disease, we found the mutation in one patient SV with another severe mutation in the homologous allele. On the other hand, the less frequent p.H62L is described in literature related to the mild NCCAH form. In this work, however, it is reported associated to the SV form of the disease. Finally, the less frequent SV p.R341P mutation, is herein described in a SW patient having the c.283-13A / C> G mutation in the homologous allele.

Keywords: Congenital adrenal hyperplasia; 21-hydroxylase deficiency; *CYP21A2* gene, novel mutations, functional studies.

AGRADECIMIENTOS:

Durante estos casi 6 años de la realización de mi doctorado, por suerte me llené de gente a la que hoy quiero agradecerle.

En primer lugar, a la Dra Liliana Dain, o Lili para nosotros, por abrirme las puertas del laboratorio, por permitirme trabajar con este grupo de gente hermoso al que me duele en el alma dejar, por guiarme en todo el desarrollo de esta tesis y por sus infinitas correcciones a las que aunque ella no lo crea, aprendí a valorar.

A Noe (Lic.Noemí Buzzalino) por ser mucho más que una jefa, por su amor maternal para todos nosotros, por su calidez humana, por sus charlas, sus consejos, su musicalización, su VALORRRRR, su kiosco polirubro y sus ganas de tirar siempre para adelante.

A San y Lili Alba (Sandra Rozental y Liliana Alba), por mirarme siempre con una sonrisa, por aguantarme en mi búsqueda infinita de historias clínicas y fundamentalmente por hacerme sentir siempre en casa.

Al Centro Nacional de Genética Médica (CNGM) y al Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) por permitirme realizar mi trabajo todo este tiempo.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al CONICET por otorgarme las becas que me permitieron poder realizar mi doctorado estos 6 años.

A Nora Ceballos y Alberto Kornblihtt, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme avanzar en mi doctorado, A Luciana Gómez Acuña por guiarme con los experimentos y a todas las chicas de Nora por lograr que hacer una TLC sea algo ameno.

A Alejandro Nadra por su inmensa colaboración con todo el análisis bioinformático.

A Iani por enseñarme a hacer Western Blot, a Ceci por iniciarme en cultivo celular y a Barbi por su ayuda con los controles de algunas mutaciones.

A la facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA por permitirme estudiar durante mi licenciatura y ahora durante mi doctorado.

A mi grupo de trabajo del CNGM, Lu, Mari, Krlis, Tani y Ceci. Por hacer que viajar 4 horas por día para ir a trabajar se pueda convertir en algo lindo, por los mates, las charlas, las carcajadas, por el hermoso grupo que formamos, porque considero que somos más que un lindo grupo de trabajo, porque los ADORO.

Nuevamente a Lu, porque fue quien me recibió el primer día para la primer entrevista, porque fue quien me enseñó a hacer mi primer gel de agarosa, porque me brindó todos sus desayunos y almuerzos durante estos 6 años, porque me prestó siempre una oreja, un consejo y un abrazo, porque me bancó en TODAS, y por ser una gran AMIGA.

Nuevamente a Krlis (el rey de los agradecimientos en las tesis de nuestro grupo) por ayudarme tanto con la búsqueda de papers, la bioinformática, por su paciencia, su generosidad y los cafés de Starbucks.

A mis amigas que no forman parte del ambiente laboral, por aguantar mis ausencias durante la escritura de esta tesis, por apoyarme y aconsejarme siempre, por ser las mejores amigas que alguien puede tener.

A toda mi familia política por hacerme sentir de la familia desde el primer día, en especial al tío Gerardo por llevarme tantas veces en auto hasta el trabajo, por prestarme su impresora y por ser tan hermoso.

A mis padres, por apoyarme incondicionalmente en cada minuto de mi vida, por apoyarme en mi carrera desde el inicio, por incentivarme, ayudarme, y mostrarme que nunca hay que bajar los brazos. Pá, gracias por valorar mis decisiones, aún cuando tuve la loca idea de estudiar astronomía y vos me llevabas los viernes a la noche al observatorio. Mami, gracias infinitas por tu inmensa ayuda, por ayudarme tanto con Kiara desde que nació y tuve que volver a trabajar y sobre todo durante estos meses de escritura, sos incondicional. Gracias a ambos por la relación hermosa que tenemos y por ser los mejores padres que uno puede tener.

Por último, gracias Ari, por aguantar todo este camino a mi lado, con todo lo que eso implica. Por bancarte los fines de semana sin vernos ya desde la carrera de Licenciatura. Por leer electroferogramas conmigo. Por bancarte mis semanas eternas frente a esta computadora. Por siempre incentivarme a ser más y sobre todas las cosas, por darme el mejor resultado que pude obtener en estos años de doctorado, nuestra hija. TE AMO.

A mi hija, Kiara.

<u>ÍNDICE</u>

-CAPÍTULO I-INTRODUCCIÓN	1
I.2. SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDEAS	3
I.2.1 SÍNTESIS, CAPTACIÓN Y TRANSPORTE DE COLESTEROL	3
I.2.2 ESTEROIDOGÉNESIS	4
I.2.2.1. CONVERSIÓN DE COLESTEROL A PREGNENOLONA	5
I.2.2.2. SISTEMAS ENZIMÁTICOS	5
I.2.2.3. SÍNTESIS DE CORTISOL	9
I.2.2.4. SÌNTESIS DE MINERALCORTICOIDES	9
I.2.2.5. SÍNTESIS DE ANDRÓGENOS	9
I.3.1. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MINERALCORTICOIDES	10
I.3.2. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUCOCORTICOIDES Y ANDRÓGENOS	
SUPRARRENALES	12
I.4. HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGENITA	14
I.5. DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA	16
I.5.1. PRESENTACIÓN CLÍNICA	16
I.5.1.1. FORMA CLÁSICA CON PÉRDIDA SALINA	16
I.5.1.2. FORMA CLÁSICA VIRIZANTE SIMPLE	18
I.5.1.3. FORMA NO CLÁSICA O DE PRESENTACIÓN TARDÍA	20
I.5.1.4. FORMA CRÍPTICA	21
I.5.2. DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA EN CIFRAS	22
I.5.3. VALORACIÓN HORMONAL EN EL DÉFICIT DE 21-HIDROXILASA	23
I.5.4. SCREENING O PESQUISA NEONATAL	25
I.5.5. GENÉTICA MOLECULAR	27
I.5.5.1. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y DEFICIENCIA DE 21-	
HIDROXILASA	27
I.5.5.2. ESTRUCTURA DEL GEN CYP21A2	29
I.5.6. CORRELACIÓN ENTRE FENOTIPO Y GENOTIPO	36
I.5.7. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	38
I.5.7.1. DIAGNÓSTICO MOLECULAR	38
I.5.7.2. DIAGNÓSTICO PRENATAL DEL DÉFICIT DE 21-HIDROXILASA	40
I.5.7.3. TRATAMIENTO	41
I.5.7.3.1 TRATAMIENTO DE LAS FORMAS CLÁSICAS	41
I.5.7.3.2. TRATAMIENTO DE LAS FORMAS NO CLÁSICAS	43
I.5.8. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA 21-HIDROXILASA	44

-CAPÍTULO II- MARCO TEÓRICO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
II.1. MARCO TEÓRICO	50
II.2. HIPOTESIS	53
II.3. OBJETIVOS	53
II.3.1. OBJETIVO GENERAL II 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
-CAPÍTULO III.MATERIALES V MÉTODOS	53
ASPECTOS ÉTICOS	<u> </u>
III 1 1 MUESTRAS	55
III 1 1 DA CIENTES	
III.1.1.1 ACHENTES III.1.1.2. INDIVIDUOS DE LA POBLACIÓN GENERAL	57
III.1.2. EXTRACCIÓN DE SANGRE Y ADN	57
III.1.3. BÚSQUEDA DE MUTACIONES NÓVELES	58
III.1.3.1. PRIMER AMPLIFICACIÓN DIFERENCIAL DEL GEN <i>CYP21A2</i> III.1.3.2. ANÁLISIS DE LAS 10 MUTACIONES MÁS FRECUENTES DERIVADAS DEL	58
PSEUDOGEN III.1.3.3. SEGUNDA AMPLIFICACIÓN DIFERENCIAL DEL GEN <i>CYP21A2</i> PARA EL ESTUDIO DE MUTA CIONES MENOS EDECLIENTES O NOVEL ES	61
ESTUDIO DE MUTACIONES MENOS PRECUENTES O NOVELES III.1.3.4. CORTES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN EN MUESTRAS DE INDIVIDU LA POBLAICIÓN GENERAL PARA LOS CAMBIOS NOVELES HALLADOS EN	os de
REGIONES CODIFICANTES III.1.3.5. PCRs ALELO ESPECÍFICAS PARA DETERMINAR LA SEGREGACIÓN DE I	65 LAS
MUTACIONES HALLADAS 111.1.3.6. ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS <i>HLA</i>	66 71
III.1.4. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LAS VARIANTES NOVELES HALLADAS	71
III.1.4.1. VARIANTES EN REGIONES CODIFICANTES	71
111,1,4,2, VAKIAN I EƏ EN IN I KUNEƏ	/2

III.2.1 MODELADO MOLECULAR	73
III.3.1.1. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA	75
III.3.1.2 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS COS-7	80
III.3.1.3. CROMATOGRAFÍA EN PLACA DELGADA (TLC)	81
III.3.1.4. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE B-GALACTOSIDASA	82
III.3.1.5. PROTEÍNAS TOTALES. ENSAYO DE BRADFORD	83
III.3.1.6. ENSAYO DE WESTERN BLOT (WB)	83
III.3.2 ANÁLISIS DE MUTACIONES EN REGIONES NO CODIFICANTES	85
III.3.2.1. CONSTRUCCIÓN DE UN MINIGEN PARA LOS ENSAYOS FUNCIONALES	85
III.3.2.2. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK-293, HELA E Y-1	89
III.3.2.3 EXTRACCIÓN DE ARN	90
III.3.2.4. RT-PCR	91
III.4.2. CORRELACIÓN ENTRE EL FENOTIPO OBSERVADO Y EL ESPERADO DE	
ACUERDO AL GENOTIPO HALLADO PARA LOS PACIENTES CLÁSICOS Y NO	
CLÁSICOS DE NUESTRA COHORTE	95
-CAPÍTULO IV- RESULTADOS	96
IV.1.1. SECUENCIACIÓN DEL GEN CYP21A2	98
IV.1.2. BÚSQUEDA DE LAS VARIANTES NOVELES EN INDIVIDUOS DE LA	
POBLACIÓN GENERAL	103
IV.1.3. GENOTIPO, CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS DE LOS	
PACIENTES CON MUTACIONES NOVELES	104
IV.1.3.1 MUTACIONES EN REGIONES CODIFICANTES	105
IV.1.3.2. MUTACIONES EN INTRONES	115
IV.1.3.3. VARIANTES POLIMÓRFICAS HALLADAS	118
IV1. 4. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LAS MUTACIONES NOVELES	119
IV.1.4.1. MUTACIONES EN REGIONES CODIFICANTES	119
IV.1.4.2. MUTACIONES EN INTRONES	122
IV.2.1. MODELADO MOLECULAR	125

																/						
TX 7	1	^		Т	TOTO	DE	TCT		I ID		DE	TA	C	DD/	TT	TIN		1 1 /	TT 17	ГА.	NTT	TTC
I V .	· 4.	Z . A	INA		1212	DE		ADI		АIJ	175	1 A		FKU	<i>)</i> [יוועי	NA.) IVI		ΙA		
		_							_		~~~		-~				1					

IV.3.1. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS MUTACIONES EN LA REGIÓN CODIFICAN	<u>ГЕ</u>
	134
IV.3.1.1. ANALISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	136
IV.3.1.2. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT	138
<u>IV.3.2. ANALISIS FUNCIONAL DE LA MUTACION C.652-2A>G EN LA REGIÓN</u>	
INTRÓNICA	<u>139</u>
IV.4.1. ANÁLISIS DE PARÁMETROS FENOTÌPICOS EN PACIENTES NO CLÁSICOS	Y
SU CORRELACION CON EL GENOTIPO	143
IV.4.2. CORRELACION ENTRE EL FENOTIPO OBSERVADO Y EL ESPERADO DE	140
ACUERDO AL GENOTIPO HALLADO EN PACIENTES CLASICOS Y NO CLASICOS	149
CADÍTULO V DISCUSIÓN	155
-CALIFICED V- DISCUSION	
V 1. CAMBIOS HALLADOS EN REGIONES CODIFICANTES DEL GEN CYP2142	161
V.I. CAMBIOS HALLADOS EN REGIONES CODIFICANTES DEL GENCH 21/12	
V.1.1. MUTACIONES MENOS FRECUENTES YA DESCRIPTAS PREVIAMENTE EN L	A
LITERATURA	161
IV.1.2. MUTACIONES NOVELES HALLADAS EN LA REGIÓN CODIFICANTE DEL GI	EN
EN PACIENTES DE NUESTRA POBLACIÓN	169
V.1.2. CAMBIOS EN INTRONES DEL GEN CYP21A2	180
V.1.3. CAMBIOS EN REGIONES PROMOTORAS DEL GEN CYP21A2	182
	~
V.2. MODELADO MOLECULAR Y ENSAYOS FUNCIONALES DE LAS MUTACIONES	<u>5</u>
NOVELES PUNTUALES DE LA REGION CODIFICANTE	186
V 2. ΑΝΆΙ ΙΣΙς <i>ΙΝ ΜΙΤ</i> ΡΩ ΝΕΙ Α ΜΗΤΑ CΙΏΝ C (52.24× C	107
V.5. ANALISIS IN VITRO DE LA MUTACIÓN C.052-2A>G	197
V 4 ANÁLISIS DE PARÁMETROS FENOTÌPICOS EN LOS PACIENTES DE NUESTRA	4
COHORTE Y SU CORRELACIÓN CON EL GENOTIPO	<u>-</u> 200
V.4.1. CORRELACIÓN ENTRE EL FENOTIPO OBSERVADO Y EL ESPERADO DE	
ACUERDO AL GENOTIPO HALLADO EN PACIENTES CLÁSICOS Y NO CLÁSICOS	
TOTALMENTE GENOTIPIFICADOS	207
V.5. CONCLUSIONES FINALES	215

ANEXOS	243
ANEXO 1	jError! Marcador no definido.
ANEXO 2	jError! Marcador no definido.
ANEXO 3	jError! Marcador no definido.
ANEXO 4	244
ANEXO 5	249

Resultados parciales de esta tesis formaron parte de las siguientes publicaciones científicas:

Structure-based analysis of five novel disease-causing mutations in 21-hydroxylase-deficient patients
Minutolo C, Nadra AD, Fernández C, Taboas M, Buzzalino N, Casali B, Belli S, Charreau EH, Alba L, Dain L.
PLoS One. 2011 Jan 11;6(1):e15899. doi: 10.1371/journal.pone.0015899.

Isolated p.H62L Mutation in the CYP21A2 Gene in a Simple Virilizing 21-Hydroxylase Deficient Patient

Taboas M, Fernández C, Belli S, Buzzalino N, Alba L, Dain L. Case Rep Genet. 2013;2013:143781. doi: 10.1155/2013/143781. Epub 2013 Jul 7.

Functional studies of p.R132C, p.R149C, p.M283V, p.E431K, and a novel c.652-2A>G mutations of the CYP21A2 gene

Taboas M, Gómez Acuña L, Scaia MF, Bruque CD, Buzzalino N, Stivel M, Ceballos NR, Dain L.

PLoS One. 2014 Mar 25;9(3):e92181. doi: 10.1371/journal.pone.0092181. eCollection 2014.

-CAPÍTULO I-INTRODUCCIÓN

I.1.-GLANDULAS SUPRARRENALES

Las glándulas suprarrenales son dos estructuras piramidales localizadas encima del polo superior de ambos riñones en una posición discretamente media y miden aproximadamente 2,5 x 5 cm, con un espesor de 1 cm. Constan de 2 tipos glandulares distintos, la corteza y la médula, envueltos en una cápsula común. El 85-90% de su masa total corresponde a la capa externa o corteza, la cual a su vez se divide en tres zonas: la más externa, denominada glomerulosa, encargada fundamentalmente de la síntesis de mineralocorticoides, la zona intermedia o fasciculada que secreta glucocorticoides, y la más interna denominada reticular, que sintetiza sobre todo andrógenos y en menor medida glucocorticoides (Figura 1). En el ser humano el principal mineralocorticoide es la aldosterona, el glucocorticoide más cortisol y los principales andrógenos suprarrenales abundante es el son la dehidroepiandosterona (DHEA) y la DHEA-sulfato (DHEA-S). El porcentaje que resta de la glándula corresponde a la médula suprarrenal que está estrechamente relacionada con el sistema nervioso simpático y responde a su estímulo con la liberación de catecolaminas.



Figura 1: Esquema representativo de las diferentes capas de la glándula suprarrenal

Esquema modificado de Stewart y Krone, 2011.

I.2. SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDEAS

I.2.1 SÍNTESIS, CAPTACIÓN Y TRANSPORTE DE COLESTEROL

La esteroidogénesis suprarrenal está definida por una serie concatenada de reacciones enzimáticas que permiten la conversión del colesterol en diversos esteroides biológicamente activos. La corteza suprarrenal sintetiza tres clases diferentes de hormonas: los glucocorticoides, los mineralcorticoides y los andrógenos.

El colesterol destinado a la síntesis de hormonas esteroideas puede tener tres orígenes: el que procede de la dieta, el que se sintetiza *de novo* a partir de acetato, regulado por la enzima 3β-hidroxi-3metilglutamil.coenzima A (HMG-CoAreductasa), y el que proviene de los depósitos en los tejidos esteroidogénicos en forma de esteres de colesterol (Gwynne y col., 1982). La mayoría del colesterol empleado en la síntesis de hormonas esteroideas procede de la dieta y es transportado en forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL).

La captación de LDL-colesterol en la glándula suprarrenal es estimulada por la hormona adrenocorticotropina (ACTH). La mayor parte de la captación de LDL es mediada por receptores específicos para LDL que, por endocitosis mediada por receptor, formarán vesículas que se unen a los lisosomas donde los esteres de colesterol son hidrolizados para liberar el colesterol que servirá de sustrato para la formación de esteroides. El número de receptores para LDL en la superficie celular está regulado de forma negativa por la captación de LDL-colesterol a través de la endocitosis (Kovanen y col., 1979). La ACTH aumenta el número de receptores para LDL en la superficie celular, la actividad de colesterol esterasa que libera la LDL a partir de los esteres de colesterol o de gotitas lipidicas almacenadas y, como consecuencia, la cantidad de colesterol libre intracelular (Shima y col., 1972).

I.2.2 ESTEROIDOGÉNESIS

La mayoría de las enzímas responsables de la esteroidogénesis pertenecen al grupo de proteínas citocromo P450 (Fraser, 1992). Estas proteínas son oxidasas que poseen un grupo HEMO, captan hierro y ocupan un lugar terminal en la cadena de transporte de electrones que media la biotransformación de muchas sustancias de origen endógeno y exógeno. Reducen O₂ empleando electrones donados por NADPH. Se localizan en la mitocondria o en los microsomas y se denominan así porque tienen un pico de absorbancia a 450 nm cuando se encuentran reducidas con monóxido de carbono.

Las reacciones enzimáticas de la esteroidogénesis suprarrenal están compartimentalizadas dentro de la célula y se distribuyen entre la mitocondria y el retículo endoplasmático. Las enzimas mitocondriales son la P450scc y la P450c11, mientras que las microsomales son la P450c17 y la P450c21 o 21-hidroxilasa (**Figura 2**).





Preg: Pregnenolona; 17OH-Preg:17-hidroxipregnenolona; Prog: progesterona; 17OH-Prog: 17-hidroxiprogesterona; DOCA: 11-deoxicorticosterona, 18-OH-DOCA: 18-hidroxicorticosterona. 11-desox: 11-desoxicortisol; 3β–HSD: 3β-hidroxiesteroidedeshidrogenasa B5-B4; DHEA: Dehidroepiandrosterona, P450c21: 21-hidroxilasa, P450c17: 17-hidroxilasa, P450c11-β1: 11β-hidroxilasa, P450c11AR-β2: Aldosterona sintetasa, P450scc: Colesterol desmolasa. Modificado de Oliver y col., 2000.

Capítulo I- Introducción

I.2.2.1. CONVERSIÓN DE COLESTEROL A PREGNENOLONA

El colesterol libre es insoluble en el citosol, por lo que es transportado a través del citoplasma hasta la mitocondria unida a una proteína transportadora, la StARD4 (Rodriguez-Agudo y col., 2008). Posteriormente, el colesterol atraviesa la membrana mitocondrial hasta el citoplasma mediante la proteína StAR (Stocco y Clark, 1996). Esta proteína se sintetiza muy rápidamente en respuesta al AMP cíclico (AMPc) y tiene una vida media muy corta, lo que permite un rápido control de la esteroidogénesis (Miller, 2007).

La reacción limitante en la biosíntesis de los esteroides es el paso de conversión de colesterol a pregnenolona que se realiza en la mitocondria (**Figura 2**). De hecho, todas aquellas hormonas que son capaces de estimular de forma aguda la producción de esteroides, aumentan el pasaje de colesterol a pregnenolona. Esta conversión está mediada por la enzima P450scc, también denominada colesterol desmolasa, sintetizada por el gen *CYP11A1*.

La conversión del colesterol a pregnenolona comprende 3 etapas: dos hidroxilaciones en posición 20 y 22 y la escisión de la molécula entre los carbonos 20 y 22 dando lugar a la formación de pregnenolona y ácido isocaproico (Miller, 1988; Arlt y Stewart, 2005).

La síntesis de la proteína P450scc es estimulada por la ACTH liberada por la hipófisis (ver más adelante). La unión de ACTH a su receptor de membrana aumenta la concentración intracelular de AMPc, que a su vez estimula la actividad esterasa para la liberación del colesterol de los esteres almacenados y aumenta la transcripción de *CYP11A1* (Kim y col., 1997; Arukwe, 2008). La pregnenolona sale rápidamente de la mitocondria y es modificada secuencialmente para dar lugar a los distintos tipos de esteroides.

I.2.2.2. SISTEMAS ENZIMÁTICOS

La pregnenolona que se sintetiza a partir del colesterol se utiliza como sustrato por los sistemas enzimáticos que se ubican en el retículo endoplasmático. En el retículo

Capítulo I- Introducción

endoplasmático, la pregnenolona puede sufrir 2 conversiones: su conversión a 17hidroxipregnenolona, reacción catalizada por P450c17 o 17-hidroxilasa (codificada por el gen *CYP17*), o el pasaje a progesterona, reacción catalizada por la enzíma 3βhidroxiesteroidedeshidrogenasa B5-B4 o 3β-HSD. En este último caso, se produce la deshidrogenación del hidroxilo en posición 3β y la isomerización del doble enlace de posición 5-6 a 3-4. A partir de la progesterona y por sucesivas hidroxilaciones en los carbonos 21, 11 y 18, se forma la aldosterona (**Figura 2**) en la zona glomerular de la glándula.

En el retículo endoplasmático la proteína P450c17 tiene una actividad dual. Por un lado presenta actividad de 17-hidroxilasa que media la conversion de pregnenolona en 17-hidroxipregnenolona y de progesterona en 17-hidroxiprogesterona (17-OHP). Por el otro, tiene actividad de 17,20-liasa que media la conversion de 17-hidroxipregnenolona en Dehidroepiandrosterona (DHEA) y de 17-OHP en androstendiona. El hecho de que la P450c17 tenga 2 actividades, implica que la enzíma desempeña un papel clave en la orientación de la esteroidogénesis hacia la biosíntesis de glucocorticoides (actividad 17-hidroxilasa, pero no de liasa) o de esteroides sexuales (presencia de las 2 actividades). En la glándula suprarrenal la enzíma tiene poca actividad de liasa, mientras que esta actividad es muy importante en el testículo (Hall, 1991; Akhtar y col., 2005). Por otro lado, en las zonas fascicular y reticular existe una mayor actividad 17-hidroxilasa que en la zona glomerular.

La enzíma 3β -HSD cataliza la conversión de pregnenolona a progesterona, de 17hidroxipregnenolona a 17-OHP y de DHEA a androstendiona. Este paso es necesario para la síntesis de glucocorticoides, mineralcorticoides y esteroides sexuales.

La enzíma 21-hidroxilasa es también un citocromo microsomal P450 (P450c21) y está codificada por el gen *CYP21A2*. Se encuentra en el retículo endoplasmático y utiliza a la

progesterona y a la 17-OHP como sustratos para producir 11-desoxicorticosterona (DOC) y 11-desoxicortisol respectivamente (White y col., 1984a; White y col., 1984b). Se demostró por estudios inmunohistoquimicos que la enzima está presente en las tres zonas de la corteza suprarrenal, con una intensidad más marcada en las zonas glomerulosa y reticular. Sin embargo, la actividad enzimática 21-hidroxilasa no es necesaria para la biosíntesis de esteroides sexuales y por ello la P450c21 no se expresa en las gónadas.

La última etapa corresponde a la biosíntesis de aldosterona en la zona glomerulosa y de cortisol en la zona fasciculada. Estas reacciones son catalizadas por dos enzímas P450c11 codificadas por genes diferentes: el *CYP11B1* y el *CYP11B2*.

En la zona glomerulosa, la proteína P450c11aldosintetasa codificada por el gen *CYP11B2* es responsable de tres actividades enzimaticas (Okamoto y col., 2005):

- La 11β-hidroxilación de DOC a corticosterona.
- La 18-hidroxilación que convierte la corticosterona en 18- hidroxicorticosterona.
- La 18-oxidación que convierte la 18-hidroxicorticosterona en aldosterona.

Este sistema enzimático recibe el nombre de P450c11/Aldosterona sintetasa (AS).

En la zona fasciculada, la otra enzíma P450c11 cataliza de forma muy activa la transformacion de 11-desoxicortisol en cortisol por su actividad 11 β -hidroxilasa. La actividad 18-hidroxilasa de esta enzíma es 10 veces más débil que la de P450c11-aldosintetasa.

Aunque los genes *CYP11B1* y *CYP11B2* comparten una identidad de secuencia del 95%, las secuencias promotoras difieren entre sí. Es esta diferencia la que permite una regulación de las etapas finales de la biosíntesis de los glucocorticoides y mineralcorticoides por la ACTH y la angiotensina II, respectivamente (Mornet y col., 1989; Muller y Oertle, 1993).

Si bien hay algunas enzimas esteroidogénicas que se expresan de forma ubicua en el tejido corticosuprarrenal, el producto principal final generado en cada zona dependerá de la

expresión diferencial de algunas de las enzimas de la esteroidogénesis en áreas concretas de la corteza suprarrenal. Por otra parte, la capacidad de las distintas enzimas de la esteroidogénesis de actuar sobre más de un sustrato, posibilita la generación de un mismo producto final a través de diversas vías (**Figura 3**). Es así que en el ser humano, por ejemplo, la falta de P450c17 en la zona glomerular, en contraste a la abundante expresión de P450c11/aldosterona sintetasa, determinan la síntesis de aldosterona en esa área mientras que la elevada expresión de P450c17 en la zona fascicular promueve la síntesis de grandes cantidades de cortisol en dicha zona. A su vez, la zona reticular expresa altos niveles de P450c17 pero no de P450c21 que junto a los muy bajos niveles de 3-βHSD y P450c11, dirige la síntesis hacía la producción de DHEA y su derivado DHEA-sulfato (DHEA-S).





DOCA: 11-deoxicorticosterona, 3β –HSD: 3β -hidroxiesteroidedeshidrogenasa B5-B4 DHEA: Dehidroepiandrosterona, DHEA-S: DHEA-Sulfato, P450c21: 21-hidroxilasa, P450c17: 17-hidroxilasa o 17,20 liasa, P450c11- β 1: 11 β -hidroxilasa, P450scc: Colesterol desmolasa, ST: sulfatasa. Esquema modificado de Pombo y col., 2009.

I.2.2.3. SÍNTESIS DE CORTISOL

En la zona fascicular, la síntesis de cortisol se realiza a partir de la 17-hidroxilación de la pregnenolona por la enzíma P450c17 en el retículo endoplasmático liso. Se produce 17-hidroxipregnenolona que pasa a 17-OHP por la conversión de su doble enlace 5-6 en un doble enlace en la posición 4-5 por la acción de 3 β -HSD también localizada en el retículo endoplasmático liso. A su vez, la 17-OHP por acción de la P450c21 se transforma en 11-desoxicortisol. Este compuesto se hidroxila en la mitocondria por acción de la P450c11- β 1 para formar cortisol (**Figura 2**).

En esta cascada de reacciones enzimáticas, el principal factor determinante es la abundante expresión de *CYP17* y su actividad preferencial de 17-hidroxilasa (frente a una escasa actividad de 17,20 liasa) que dirige la síntesis hacia 17-hidroxipregnenolona y 17-OHP (precursores de cortisol) y la consecuente disminución de la síntesis de aldosterona.

I.2.2.4. SÌNTESIS DE MINERALCORTICOIDES

La síntesis de mineralocorticoides tiene lugar en la zona glomerular donde la falta de expresión de P450c17 dirige la conversión de la pregnenolona en progesterona por acción de la enzima 3β -HSD (**Figura 3**). La progesterona que se sintetiza en el retículo endoplasmático sufre una hidroxilación en posición C21 para convertirse en DOC por acción de P450c21 (Miller, 1988; Arlt y Stewart. 2005). Finalmente, el DOC es transformado en aldosterona por acción del sistema enzimático AS ubicado en la membrana interna de la mitocondria.

I.2.2.5. SÍNTESIS DE ANDRÓGENOS

La síntesis de andrógenos suprarrenales tiene lugar preferentemente en la zona reticular y comparte con la síntesis de glucocorticoides el conjunto de reacciones que conducen a la formación de 17-hidroxipregnenolona y 17-OHP (**Figura 3**). A partir de este punto, la actividad 17,20 liasa de la enzima P450c17 determina la conversión de 17-

Capítulo I- Introducción

hidroxipregnenolona en DHEA y 17-OHP en androstenediona, respectivamente. En el humano, la capacidad de la P450c17 liasa de convertir 17-OHP en androstenediona es muy limitada. Por el contario, su capacidad de conversión utilizando 17-hidroxipregnenolona como sustrato es muy elevada y por lo tanto existe una síntesis preferencial de DHEA. Una parte significativa de los andrógenos suprarrenales son sulfatados antes de ser vertidos al torrente sanguíneo.

I.3. REGULACIÓN ENDÓCRINA DE LA ESTEROIDOGÉNESIS

La secreción de los esteroides corticosuprarrenales está sometida a un preciso sistema de control en el que operan, principalmente, señales endócrinas y otros factores sistémicos así como cambios en la concentración de electrolitos (Martin y col., 2000; Arlt y Stewart, 2005). Además, la secreción corticosuprarrenal (fundamentalmente de cortisol) presenta un marcado ritmo circadiano que está condicionado por el patrón de sueño/vigilia. Todo ello sugiere la existencia de mecanismos de control muy precisos que permiten ajustar la tasa de secreción de los distintos esteroides suprarrenales a las demandas fisiológicas del organismo.

I.3.1. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MINERALCORTICOIDES

La aldosterona es el mineralcorticoide más potente; mejora la retención de sodio y de agua y aumenta la tensión arterial. La regulación de la síntesis y liberación de aldosterona está estrechamente relacionada con su acción biológica. Los principales estimuladores fisiológicos son:

- La activación del sistema renina-angiotensina (Peach, 1977).
- El aumento de niveles de potasio extracelular que es proporcional al déficit de sodio en el plasma (Ehrhart-Bornstein y Bornstein, 2008).

Capítulo I- Introducción

El sistema renina-angiotensina es un sistema hormonal que ayuda a regular a largo plazo la presión sanguínea y el volumen extracelular corporal. Las células granulares del aparato yuxtaglomerular que se localizan en la arteria aferente son las encargadas de secretar la renina: La misma tiene función de proteasa que activa el angiotensinógeno presente en la circulación sanguínea y que se produce en el hígado. Esta activación da como resultado la formación de angiotensina I. Al pasar por los pulmones, la angiotensina I se convierte en angiotensina II (A-II) por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (**Figura 4**).

La A-II tiene las siguientes funciones:

- Es el vasoconstrictor más potente del organismo después de la endotelina.
- Estimula la secreción de hormona antidiurética (ADH, también llamada vasopresina) por la neurohipófisis. La ADH estimula la reabsorción a nivel renal de agua y produce la sensación de sed.
- Estimula la secreción de la aldosterona por las glándulas suprarrenales que aumenta la reabsorción de sodio y de agua a nivel renal. La retención de sodio y de agua producirá un incremento de volumen sanguíneo que tiene como resultado un aumento en la presión arterial (Figura 4).
- Estimula la actividad del sistema simpático que tiene también un efecto vasoconstrictor.

El sistema se activa cuando hay pérdida de volumen sanguíneo, una caída en la presión sanguínea (como en una hemorragia) y en especial cuando hay aumento de la osmolaridad del plasma. Más aún, incrementos moderados de los niveles de potasio aumentan en forma significativa la secreción de aldosterona mientras que situaciones de hipopotasemia se asocian a una reducción de su síntesis (Lopez-Calderon y col., 2009). Además, la secreción

de aldosterona es sensible a cambios en la concentración de sodio y puede ser estimulada por la ACTH hipofisiaria. Este efecto estimulador es mucho menos potente que el de la A-II y el potasio.





Enzimas proteolíticas que intervienen en la síntesis de angiotensina II, renina y ECA. ECA: Enzíma convertidora de angiotensina, IECA: inhibidor de ECA, Vd: Vasodilatadoras. Modificado de Oliver y col., 2000.

I.3.2. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUCOCORTICOIDES Y ANDRÓGENOS SUPRARRENALES

La síntesis de glucocorticoides en la zona fascicular está bajo el control casi exclusivo de la ACTH hipofisiaria. A su vez, el neuropéptido hipotalámico CRH (hormona liberadora de corticotrofina) estimula la síntesis y la liberación de ACTH. El cortisol participa activamente en la autorregulación de este sistema hormonal a través de acciones de retroalimentación negativas tanto a nivel hipotalámico como hipofisario. La organización funcional de este eje neuroendócrino se representa en la **Figura 5**.



Figura 5: Representación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HHS)

El eje HHS es responsable del control fisiológico de la secreción de cortisol. CRH: Hormona liberadora de corticotrofina, ACTH: Adrenocorticotrofina. Esquema modificado de Stewart y Krone, 2011.

La ACTH, como regulador hormonal casi exclusivo de la síntesis de cortisol, provoca la activación de receptores específicos de membrana presentes en las células de la zona fascicular y en menor medida de la zona reticular. Estos receptores están acoplados a proteínas Gs, con el consiguiente aumento de los niveles intracelulares de AMPc y posterior fosforilación de proteínas. Esta activación provoca que la síntesis de cortisol se produzca de dos maneras: por un lado se produce un efecto agudo, a los pocos minutos, mediado por un aumento de la proteína StAR que da lugar a un incremento en la translocación de colesterol al interior de la mitocondria y su conversión en pregnenolona (Liu y col., 1996; Lehoux y col., 1998). Por el otro lado, se produce un efecto crónico o a largo plazo, por el cual el estímulo de ACTH incrementa la expresión de diversas enzimas implicadas en la síntesis de cortisol tales como P450scc, P450c17, P450c21 y P450c11. Asimismo, el estímulo sostenido de la ACTH aumenta la síntesis *de novo* de colesterol, favorece la hidrólisis de ésteres de

Capítulo I- Introducción

colesterol almacenados en gotas lipídicas e induce un efecto hipertrófico sobre la corteza suprarrenal. El cortisol que se produce opera como el principal inhibidor de la síntesis y secreción de CRH hipotalámica y de ACTH a nivel hipofisiario a través de circuitos de retroalimentación negativa (**Figura 5**).

La secreción de ACTH y cortisol es pulsátil y está marcada por un ritmo circadiano acoplado al patrón de sueño/vigilia. En el ser humano, la secreción de cortisol es máxima entre las 4:00 y las 8:00 (antes de despertar y con valores de hasta 20 µg/dl) y mínima entre las 20:00 y 24:00 (valores aproximadamente 5µg/dl).

La síntesis de los andrógenos suprarrenales por las zonas fascicular y reticular, al igual que lo que ocurre con el cortisol, depende de la ACTH hipofisaria. Los propios esteroides suprarrenales y las catecolaminas de la médula modulan la respuesta de las células suprarrenales a la ACTH. En la zona reticular existe una menor actividad de 11-hidroxilasa que en las otras dos zonas, lo que hace que se sintetice una mayor proporción de andrógenos. Entre los factores que inhiben la actividad de la 11-hidroxilasa se encuentran el cortisol, la androstenediona y la adrenalina. Esta situación provoca que la zona reticular, al encontrarse sometida a mayores concentraciones de estas hormonas que las otras capas, sintetice fundamentalmente DHEA, DHEA-S y en menor proporción, androstenediona. Además, la P450c17 presente en las células de la zona reticular posee una actividad muy alta de 17,20 liasa. Todo ello dirige la ruta de síntesis hacia la formación de andrógenos (**Figura 3**).

I.4. HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGENITA

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) define un grupo de enfermedades congénitas en las que se produce un error en la esteroidogénesis suprarrenal. La síntesis de glucocorticoides, mineralcorticoides y andrógenos puede verse afectada de forma global o

Capítulo I- Introducción

parcial, dando lugar a un grupo heterogéneo de cuadros clínicos que pueden manifestarse en el período neonatal, durante la infancia, la adolescencia o en la edad adulta. Las alteraciones en la acción enzimática darán lugar a una disminución en la síntesis de las hormonas situadas por debajo del bloqueo y un aumento de los productos previos a dicho bloqueo. El bloqueo enzimático afecta siempre en mayor o menor grado a la síntesis de cortisol, que se compensa con un aumento de ACTH, la cual al actuar en forma temprana durante el desarrollo embrionario y fetal, provoca una hipertrofia de la glándula suprarrenal.

Se conocen distintas formas de HSC. Las mismas se producen por deficiencia de alguna de las enzimas de la via esteroidogénica entre las que se encuentran aquellas que se producen por la deficiencia de la 11 β -hidroxilasa, la de 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, el déficit de P450c17 (17-hidroxilasa, aislada o combinada con la deficiencia de 17,20 liasa), de colesterol desmolasa, de P450c21, o bien por déficit de la enzíma que provee los electrones, la llamada P450 oxidorreductasa o POR (Pandey y col., 2004; Miller, 2005; Scott y Miller, 2008). Una subforma de este grupo complejo de enfermedades es la deficiencia de la enzima StAR que causa hiperplasia adrenal congénita lipoide y cuya característica principal es la acumulación de lípidos que llevan a la destrucción celular.

Entre las diferentes formas de HSC, el 90-95% de los casos se debe a un déficit de la enzíma 21-hidroxilasa o P450c21, deficiencia que se produce por alguna alteración en el gen *CYP21A2* que la codifica (ver más adelante). La HSC por deficit de 11 β -hidroxilasa es la segunda en frecuencia, se debe a mutaciones en el gen *CYP11B1* y tiene una incidencia aproximada de 1:100.000-1:200.000. Se refleja en un aumento de los niveles plasmáticos del precursor del cortisol (11-desoxicortisol) y de la corticosterona (11-desoxicorticosterona). Como este último esteroide tiene actividad mineralocorticoide, los enfermos presentan hipertensión. Se ven aumentadas las hormonas sexuales, por lo tanto se puede observar una

Capítulo I- Introducción

virilización posnatal.

Las otras formas de HSC son de baja incidencia. En todos los casos hay un déficit de glucocorticoide y déficit de hormonas sexuales, excepto en la HSC por déficit de 3β -HSD en donde las hormonas sexuales se encuentran reducidas en el hombre y aumentadas en las mujeres quienes pueden presentar virilización posnatal. Asimismo, en las diferentes HSC existe un déficit de mineralocorticoides, excepto en la HSC por déficit de 17-hidroxilasa donde los mismos se encuentran aumentados. Este aumento de los niveles de mineralocorticoides da lugar a la aparición de hipertensión (Stewart y Krone, 2011).

I.5. DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA

I.5.1. PRESENTACIÓN CLÍNICA

La deficiencia de 21-hidroxilasa exhibe 3 formas de presentación clínica: la forma con pérdida salina (PS), la forma virilizante simple (VS), que en conjunto constituyen la forma clásica de la enfermedad (FC), y la forma no clásica (FNC) o de presentación tardía.

I.5.1.1. FORMA CLÁSICA CON PÉRDIDA SALINA

Es la forma de presentación clínica más grave de la enfermedad. Surge como consecuencia de la deficiencia de la síntesis de mineralcorticoides y se presenta en alrededor del 75% de los afectados de la forma clásica (Forest, 2004). El déficit de aldosterona produce una pérdida renal de sodio, retención de potasio, natriuresis elevada y depleción de la volemia. Generalmente se presenta entre los 5 y 10 días de vida y se caracteriza por un cuadro progresivo de anorexia, ausencia de ganancia ponderal, decaimiento, poliuria y vómitos. Si no se reconoce el cuadro y no se realiza el tratamiento adecuado precozmente, puede evolucionar en poco tiempo a un cuadro severo de deshidratación hipotónica y shock hipovolémico de consecuencias letales. Analíticamente se caracteriza por acidosis metabólica

Capítulo I- Introducción

hiponatrémica e hiperpotasémica, disminución de aldosterona, elevada actividad de renina plasmática (ARP) con una relación ARP/aldosterona elevada.

El cuadro de pérdida salina no se desarrolla sino hasta después del nacimiento, dado que durante la gestación, la homeostasis electrolítica del feto afectado por la deficiencia se mantiene a expensas de la placenta, la función renal y suprarrenal materna (Speiser y White, 2003). Los pacientes presentan asociado un déficit severo de cortisol que agrava y potencia el déficit de mineralcorticoides. En condiciones fisiológicas, los glucocorticoides aumentan la contractilidad muscular esquelética, mejoran la contractilidad cardíaca, el gasto cardíaco y la sensibilidad a la acción de las catecolaminas. En su ausencia, por lo tanto, disminuye el gasto cardíaco, el filtrado glomerular y la capacidad para excretar agua.

El exceso de secreción de andrógenos que se produce en la suprarrenal no afecta la diferenciación de los genitales externos en el varón. Sin embargo, el hiperandrogenismo produce una virilización de los genitales externos en las niñas. En las mujeres afectadas, cuando la suprarrenal fetal comienza a producir andrógenos en cantidades elevadas, el seno urogenital se encuentra en proceso de septación y los niveles de andrógenos pueden impedir la formación de la vagina y la uretra como estructuras separadas e independientes. Los andrógenos actuarán sobre sus receptores induciendo hipertrofia de clítoris, fusión de los labios mayores y migración rostral del orificio uretral-vaginal. Se produce una virilización progresiva y variable de los genitales externos que lleva a la aparición de genitales ambiguos (**Figura 6**). El máximo grado de virilización dará lugar a un fenotipo masculino con hipertrofia reniforme del clítoris, hipospadias perineal y labios mayores escrotalizados con ausencia de testículos. Las niñas muy virilizadas pueden ser erróneamente identificadas como varones con criptorquidia.



Figura 6: Diferentes grados de masculinización y ambigüedad genital

1: Genitales femeninos normales, 2: Hipertrofia de clítoris, 3: Hipertrofia de clítoris, fusión de labios mayores y seno urogenital único, 4: Hipertrofia de clítoris con hipospadias perineal, fusión de labios mayores con apariencia escrotal, 5: Hipertrofia de clítoris con meato urinario en punta, apariencia completa de genitales masculinos Esquema modificado de Prader, 1954.

Las estructuras derivadas del conducto de Wolff, por su parte, requieren concentraciones locales mucho más altas de testosterona que los genitales externos para lograr su completa diferenciación. Las estructuras mullerianas, al no ser órganos diana para la acción androgénica, se desarrollan con normalidad. Por lo tanto, el desarrollo del útero, trompas y los 2/3 internos de la vagina son normales en las niñas. En el varón, se observa desde una simple hiperpigmentación melánica no racial hasta macrogenitosomia (Rodríguez y col., 2006). El grado de gravedad de la virilización no se correlaciona con el grado de severidad de pérdida salina.

I.5.1.2. FORMA CLÁSICA VIRIZANTE SIMPLE

Esta forma clínica se presenta en el 25% de los casos de déficit clásico de 21-hidroxilasa y se caracteriza por un déficit en la síntesis de cortisol y un exceso en la producción de andrógenos suprarrenales desde la época fetal. A diferencia de la forma PS, la síntesis de aldosterona no se ve alterada en forma grave, por lo que se mantiene la homeostasis del sodio

Capítulo I- Introducción

a pesar de que los niveles de renina pueden estar elevados. Estos pacientes presentan por lo tanto, una virilización severa pero sin signos clínicos de pérdida salina. Las niñas son identificadas precozmente por la virilización de los genitales externos, pero los niños y las niñas con una virilización leve se suelen diagnosticar más tardiamente, generalmente en la infancia cuando se ponen de manifiesto los signos de hiperandrogenismo. Las niñas tienen genitales externos con un grado variable de virilización.

En la etapa posnatal, el exceso de andrógenos continúa virilizando los genitales y determina la aparición de una pseudopubertad precoz en ambos sexos. Los signos de hiperandrogenismo incluyen pubarca, axilarca, aumento del olor corporal, acné severo, crecimiento exagerado del pene e hipertrofia de clítoris. En ocasiones, se observa un cuadro de pubertad precoz central asociado que se produce por la privación androgénica hipotalamo-hipofisaria y que provoca que se active el eje hipotalamo-hipofiso-gonadal.

Un control inadecuado de la enfermedad puede dar lugar a que las niñas presenten acné, hirsutismo y disfunción ovárica. La mayoría de las mujeres que presentan esta forma de la enfermedad tienen la menarca a una edad normal, aunque presentan en la edad adulta oligomenorrea y una disminución de la fertilidad. Los factores que pueden contribuir a que existan problemas de fertilidad son un inadecuado control del hiperandrogenísmo que induce ciclos anovulatorios, alteración del eje hipotálamo-hipofiso-ovárico, ovario poliquístico, excesiva producción ovárica de andrógenos. Por otro lado, puede ocurrir una activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Holmes-Walker y col., 1995; White y Speiser, 2000).

Los varones adolescentes y adultos con la deficiencia de 21-hidroxilasa clásica pueden tener una pubertad normal al igual que la función testicular, la espermatogénesis y la fertilidad. Sin embargo, se describió que hasta el 30% de los pacientes adultos desarrollan infertilidad
(Cabrera y col., 2001). Asimismo, los pacientes que no son tratados en forma eficiente presentan nódulos testiculares que destruyen progresivamente los túbulos testiculares y las células de Leydig, presentan bajos niveles de testosterona y aumento de las gonadotrofinas. Estos nódulos aumentan en los períodos en los que la ACTH está elevada y disminuyen con el tratamiento glucocorticoideo (Cutfield y col., 1983; Combes-Moukhovsky y col., 1994). El aumento prolongado de andrógenos suprarrenales, que son aromatizados periféricamente a estrógenos, puede producir la supresión de la secreción de gonadotrofinas alterando el crecimiento y funcionamiento testicular y producir atrofia testicular y azoospermia (Bonaccorsi y col., 1987; New y col., 1988; Blumberg y col., 1991; Cabrera y col., 2001; White y Speiser, 2002).

En ambos sexos, el exceso de andrógenos sin tratamiento progresaría hacia la aparición de pubarca precoz, genitales ambiguos en la niña, aceleración de la maduración ósea, cierre precoz de las epífisis y talla baja en el adulto (DiMartino-Nardi y col., 1986; Premawardhana y col., 1997; Hargitai y col., 2001; Cabrera y col., 2001).

I.5.1.3. FORMA NO CLÁSICA O DE PRESENTACIÓN TARDÍA

Es una deficiencia enzimática parcial, con actividad de 21-hidroxilasa suficiente para la síntesis de mineralocorticoides y en general de cortisol y que se acompaña de una superproducción de andrógenos fuera del periodo neonatal. Clínicamente se manifiesta por un cuadro variable de hiperandrogenismo que se evidencia durante la infancia, la adolescencia o incluso comenzar en la edad adulta. Habitualmente se produce en la segunda infancia o en edades peri o postpuberales. Generalmente estos síntomas de hiperandrogenismo son poco marcados y son coincidentes con el inicio de la adrenarca. En este período, aumenta la actividad de 17-hidroxilasa y disminuye la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa lo que favorece la producción suprarrenal de andrógenos (Speiser, 2000; Liu y col., 2008). En esta

Capítulo I- Introducción

presentación clínica, no existe síndrome de pérdida salina ni virilización prenatal, por lo que las niñas al nacimiento presentan genitales femeninos normales.

La FNC suele cursar con pubarca prematura, aceleración de la edad ósea, baja talla en la edad adulta, hirsutismo, acné, irregularidades menstruales, alopecía en la región temporal e infertilidad. Asimismo, se suele asociar la presencia de oligomenorrea y de ovario poliquístico (New, 2006; Liu y col., 2008). Los signos clínicos no difieren de los que se presentan por otras causas de hiperandrogenismos, por lo que los pacientes son generalmente detectados a partir de los ensayos bioquímicos y/o moleculares para determinar el origen de la afección. Entre el 5 y el 10% de todos los pacientes que manifiestan signos de hiperandrogenismo poseen mutaciones en el gen *CYP21A2* (gen que codifica para la 21-hidroxilasa) en ambos alelos (Kamel y col., 2003; Carmina y col., 2006).

Los varones pueden presentar oligoozospermia y disminución de la fertilidad.

I.5.1.4. FORMA CRÍPTICA

Algunos pacientes, tanto varones como mujeres, pueden no manifestar síntomas de la enfermedad aunque presenten alteraciones bioquímicas y genético-moleculares comparables a los que tienen síntomas. Generalmente se detectan al realizar los estudios de familiares de los afectados o en programas de tamizaje (*screening*) neonatal. El seguimiento longitudinal de estos casos a menudo muestra que los signos de hiperandrogenismo aparecen posteriormente (Cabrera y col., 2001).

En la **Figura 7** se representan, a modo de resumen, las diferentes manifestaciones clínicas de la deficiencia de 21- hidroxilasa



Figura 7: Espectro de formas clínicas del déficit de 21-hidroxilasa

El déficit de 21-hidroxilasa da lugar a un espectro amplio de manifestaciones clínicas que está en relación con la cronología de aparición de los síntomas y con la gravedad del déficit enzimático. Modificado de Nebot, 2003.

I.5.2. DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA EN CIFRAS

La HSC por déficit de 21-hidroxilasa es la metabolopatia hereditaria más frecuente, con una incidencia general para las FC de 1/15.000 (Pang y col., 1988; Trakakis y col., 2009). Su incidencia, sin embargo, es variable según las poblaciones estudiadas y la forma de recolectar los datos (por ejemplo si los mismos son extraídos o no de los programas de detección precoz). En poblaciones como la de Yupik Eskimos de Alaska y en la población de La Reunión, Francia, la frecuencia es mucho más elevada: 1/282 y 1/2141, respectivamente (Pang y Clark, 2009).

Por su parte, la frecuencia estimada para las FNC es mucho más elevada que para las FC (Speiser y col., 1985; Sherman y col., 1988). Se estima una incidencia entre 1/100-1/1000 en la población caucásica y es especialmente frecuente entre los judios Ashkanazis (1/27), los hispanos (1/53), los yugoslavos (1/63) y los italianos (1/333) (Speiser y col., 1985; Kuttenn y col., 1985; Wilson y col., 2007; Escobar-Morreale y col., 2008).

Para la población caucásica se estima una frecuencia de portadores de 1/50 a 1/60 para las formas severas y de aproximadamente 1/5 para las formas tardías (Alonso y Ezquieta, 2012).

I.5.3. VALORACIÓN HORMONAL EN EL DÉFICIT DE 21-HIDROXILASA

La característica más importante de la deficiencia es el valor elevado de 17-OHP, el principal sustrato de la enzima.

La 17-OHP en sangre periférica es normalmente alta al nacer, con valores que oscilan entre 5-10 ng/ml en los recién nacidos a término. En el recién nacido prematuro, la 17-OHP basal suele alcanzar valores superiores que disminuyen a partir del segundo día de vida. Para la FC, los valores plasmáticos de 17-OHP basales se encuentran muy aumentados (50 a 500 ng/ml), por lo tanto, el aumento del valor basal de 17-OHP es considerado de valor diagnóstico. Los pacientes de la FC PS presentan además, valores plasmáticos bajos de aldosterona, sin embargo resulta un mejor parámetro medir los niveles de actividad de renina en plasma (ARP, >4,5ng/ml/h) (Oliver y col., 2000).

En la FNC, debido a que el bloqueo enzimático es menos severo, un leve aumento de los niveles de 17-OHP basal será evidente pero fuera del período neonatal. En algunos casos incluso, esta forma clínica puede cursar con valores normales de esta hormona (Azziz y col., 1989). El diagnóstico clínico de la FNC se confirma por los valores basales de 17-OHP mayores a 6 ng/ml (valor normal de 17-OHP: 2 ng/ml). En presencia de niveles inferiores a 6 ng/ml y mayores a 2 ng/ml, se debe realizar el test de estímulo con ACTH (o test de Synacthen, ACTH 1-24 sintética) con dosis de 0,25 mg y determinaciones de 17-OHP basal y a los 60 minutos.

En la **Figura 8** se representa un nomograma que compara los niveles de 17-OHP pre y postinyección de ACTH sintética en sujetos normales, en portadores y en afectados con la FC y la FNC. Se puede notar con claridad que se solapan los valores entre los individuos sanos y los portadores (New y col., 1983).



Figura 8: Valores de 17-OHP basales y post-estímulo con ACTH en individuos sanos y afectados

Nomograma que compara los niveles de 17-OHP antes y después de la inyección de ACTH sintética en sujetos sanos y con déficit de 21-hidroxilasa. Nótese que los valores de los individuos normales se solapan con los portadores heterocigotas (esquema adaptado de New y col., 1983).

Los niveles basales de 17-OHP pueden ser muy variables en un mismo individuo en función de la hora o del estrés en el momento de la toma de sangre e incluso en la fase del ciclo menstrual. Por lo tanto, se recomienda que la valoración de los niveles hormonales así como la prueba de estimulación con ACTH se realice a las 8 hs, período en el cual según el ritmo circadiano la secreción la 17-OHP es más elevada. En la mujer, el dosaje debe realizarse en la fase folicular temprana y antes de cualquier tratamiento. Se considera una respuesta positiva al test de ACTH, si los niveles de 17-OHP superan al menos 3 veces la respuesta máxima obtenida para los individuos controles. En general, estos valores oscilan entre 10 y 14 ng/ml (Azziz y col., 1989).

En las FC y las FNC los andrógenos (testosterona, androstenediona y DHEA-S) suelen encontrarse elevados, como en cualquier hiperandrogenismo. Sin embargo, en la FNC en ocasiones se observan valores normales para estas hormonas.

I.5.4. SCREENING O PESQUISA NEONATAL

Un programa de pesquisa neonatal se define como el conjunto de acciones coordinadas que permiten detectar los recién nacidos sospechosos de padecer enfermedades que causan una severa discapacidad mental o física que puede ser evitada con medidas de tratamiento.

Según la Academia Americana de Pediatría existen requisitos para que una enfermedad sea candidata a ser considerada para su rastreo neonatal:

- Debe ser frecuente, inaparente en el momento de nacer y causar una severa morbilidad mental y/o física y/o mortalidad al no ser detectada.
- Su diagnóstico precoz debe representar un beneficio incuestionable, razonable en la comparación de costos (financieros y de recursos).
- Debe existir una prueba de pesquisa neonatal rápida, simple y realizable, un tratamiento efectivo y disponible y un sistema que permita el correcto diagnóstico, consejo, tratamiento y seguimiento de los detectados.

La deficiencia de 21-hidroxilasa cumple con los criterios generales de enfermedades en las cuales resulta importante realizar un *screening* neonatal, ya que existe una prueba económica para su detección y un tratamiento eficaz y de bajo costo que permite una calidad de vida normal.

El programa de detección precoz neonatal de déficit de 21-hidroxilasa tiene los siguientes objetivos (Rodriguez y col., 2006; Grosse y Vliet, 2007):

- Anticipar la aparición de una crisis de pérdida salina grave y potencialmente mortal.
- Evitar la incorrecta asignación de sexo en una niña con genitales externos virilizados.
- Detectar precozmente las formas virilizantes simples para evitar la hiperandrogenización durante la infancia.

Capítulo I- Introducción

Se ha demostrado que el *screening* neonatal reduce la edad de diagnóstico en los niños con la deficiencia de 21-hidroxilasa y disminuye la mortalidad asociada (Brosnan y Brosnan, 2000; Honour y Torresani, 2001; Brosnan y col., 2001). La detección precoz de las formas no clásicas no es el objetivo del *screening* y en general no son detectadas en estos programas. Sin embargo en algunas ocasiones se detectaron pacientes que cursan con esta forma de la patología y los mismos pueden beneficiarse por un tratamiento precoz y un correcto seguimiento.

La detección temprana de la deficiencia se basa en la medición a las 48 horas de vida de la 17-OHP obtenida de la gota de sangre extraída del talón de todos los recién nacidos. La metodología utilizada en general comprende su valoración mediante ELISA, RIA o DELFIA (Van der Kamp y Wit., 2004; Hayashi y col., 2011; Barra y col., 2012). Los valores considerados como normales varían para cada laboratorio en función de la técnica utilizada para su determinación. En los casos positivos, se debe realizar una confirmación diagnóstica mediante una segunda toma de muestra ya que suele existir un aumento fisiológico de 17-OHP en las primeras 24 horas de vida que rápidamente desciende a valores normales. Los niños prematuros y los neonatos con otras enfermedades asociadas, tienden a presentar niveles más altos de 17-OHP (Van der Kamp y col., 2005). Por lo tanto conviene repetir la determinación 10-15 días más tarde.

La pesquisa neonatal obligatoria (PNO) para la deficiencia de 21-hidroxilasa se implementó por ley a partir de octubre del 2005 en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Ley 1808) y en todo el territorio nacional en agosto de 2007 (Ley 26279). Los primeros estudios fueron realizados por la Federación Endocrinológica Infantil (FEI). Sobre 80.436 recién nacidos pesquisados en un período de 9 años, se estimó una incidencia de HSC por déficit de 21-hidroxilasa de 1/8.937 (Gruñeiro-Papendiechk y col., 2008). Por su parte, los datos

proporcionados por el GCBA para el período 2005-2010 arrojaron una incidencia de 1:16.650, con un total de 166.502 recién nacidos pesquisados (Datos obtenidos de la Dirección General Adjunta Redes de Servicios de Salud, Programa de pesquisa neonatal, 2010).

I.5.5. GENÉTICA MOLECULAR

I.5.5.1. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) es un segmento del genoma humano ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.31) en el cual se encuentran los genes cuyos productos están implicados en la presentación de antígenos a los linfocitos T. Los genes del CMH conforman el sistema HLA (siglas en inglés para: human leukocyte antigen) que en humanos posee 3.600 Kb y 140 genes, está dividido en HLA I – HLA III – HLA II y constituye la región más densa en genes y más polimórfica del genoma (Figura 9). En el HLA clase I hay 3 genes, denominados HLA-A, HLA-B y HLA-C y en el HLA II también hay 3 genes, el HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR. Dentro del HLA de tipo III están algunos genes que también se asocian con el sistema inmunem (C2, C4, factor B, citoquinas TNF-α, LTA, LTB y proteínas de choque térmico), si bien la mayoría son estructural y funcionalmente diferentes a los HLA I y II. La región del HLA clase III posee 730 Kb y está compuesta por 62 genes, entre los que se enceuntra el CYP21A2 (Milner y Campbell, 2001), más del 14% de la secuencia es codificante, alrededor del 72% de la región se transcribe y hay un promedio de 8,5 genes por cada 100 Kb (Xie y col., 2003). Teniendo en cuenta que se ha estimado que hay menos de 11 genes por megabase (Mb) (Lander y col., 2001), el HLA III es la región más densa en genes del genoma humano.



Figura 9: Estructura del CMH humano

Los genes *CYP21* se sitúan en el cromosoma 6p21.3, en la región CMH III. *CYP21A2* es el gen activo y *CYP21A1* es el pseudogen. Se representa un cromosoma bimodular estándar, las cajas representan a los genes, cuyos nombres figuran en la parte superior, las flechas señalan el sentido de la transcripción de cada uno. Modificado de Koppens, 2002.

Determinados *loci* del CMH se asocian con cierta frecuencia con algunas enfermedades autoinmunes, inflamatorias e infecciosas (Miretti y col., 2005). Sin embargo, y dada la ubicación en el genoma, también existe una asociación entre ciertos haplotipos del CMH y formas particulares del déficit en 21-hidroxilasa (Dupont y col., 1977). Es así que se demostró una asociación entre la FC PS y el *HLA*-A*3, *HLA*-B*47, *HLA*-DR*7 en la población del norte de Europa. Por su parte, la FNC se asocia con frecuencia con el haplotipo *HLA*-B*14, *HLA*-DR*1, particularmente en la población Judío Ashquenazí (Laron y col., 1980; Pollack y col., 1981), y se demostró que este haplotipo se asocia con la mutación p.V281L (en el *CYP21A2*) y con la duplicación del C4A y del pseudogen *CYP21A1P* (Werkmeister y col., 1986; Garlepp y col., 1986).

I.5.5.2. ESTRUCTURA DEL GEN CYP21A2

Gen CYP21A2

El gen estructural que codifica para la enzíma 21-hidroxilasa es el *CYP21A2*. Este gen tiene un tamaño de 3,2 Kb, y forma parte del módulo RCCX que se ubica dentro del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), específicamente en la región del CMH-III en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3, **Figura 9**).

El módulo RCCX (denominado así por los genes que lo componen <u>RP</u>, <u>C4</u>, <u>CYP21 y TNX</u>) comprende parte del gen *RP1*, los genes del factor 4 del complemento (*C4A* y *B*), los genes *CYP21A2* y *CYP21A1* (pseudogen no funcional), una región del gen *TNXB* y los pseudogenes *TNXA* y *RP2*. El gen *RP1* codifica para una proteína nuclear similar a la DNA-helicasa, siendo el *RP2* su copia no funcional. Por su parte, el gen *TNXB* codifica una proteína de matriz extracelular, la tenascina X (Bristol y col., 1993) y su secuencia se superpone con la del *CYP21A2*, pero se transcribe desde la cadena de ADN opuesta. Por su parte, *TNXA* es la copia truncada de *TNXB* y se superpone con *CYP21A1* (Yang y col., 1999).

Aproximadamente el 60% de los cromosomas contienen 2 módulos, con un gen activo (*CYP21A2*) en uno de ellos y un pseudogen inactivo (*CYP21A1*) en el otro (White y New, 1986). Sin embargo, se han descripto cromosomas monomodulares, trimodulares y tetramodulares por duplicación/deleción del módulo que contiene al gen o al pseudogen (Lee, 2004).

El *CYP21A2* y el *CYP21A1* poseen 10 exones y presentan una elevada identidad de secuencia: un 98% en secuencias de exones y un 96% en secuencias de intrones (White y col., 1986).

Capítulo I- Introducción

Debido a la alta identidad de secuencia entre el gen *CYP21A2* y el pseudogen *CYP21A1* y a la organización repetitiva en tándem de esta región, esta zona es proclive a que se produzcan apareamientos desiguales entre los cromosomas y/o cromátidas, siendo la causa de la mayor parte de los defectos genéticos asociados a la patología (Morel y col., 1989; Speiser y col., 1992).

Existen principalmente dos mecanismos que son los responsables de los defectos genéticos que causan el déficit de la enzima:

- Recombinación desigual: Se produce entre los cromosomas homólogos durante la meiosis. Como consecuencia, se producirán deleciones y duplicaciones que podrán involucrar al gen o al pseudogen, además de otros genes que forman parte del módulo. Por este mecanismo se generan entre un 20-40% de los alelos deficientes.En la Figura 10 se representa el mecanismo de recombinación desigual que genera un locus duplicado y uno delecionado.
- Conversión génica: mecanismo por el cual se realiza una copia no recíproca de una porción de secuencia de una cromátida a otra. Puede abarcar unos cientos de pares de bases (macroconversión) o bien, puede ser pequeña e involucrar sólo algunos pares de bases (microconversión). Como resultado de este tipo de mecanismo, se obtiene un gen quimera o híbrido, formado por secuencias del pseudogen y el gen (*CYP21A1-CYP21A2*). Alrededor del 80 al 90% de las mutaciones halladas en los pacientes con la deficiencia de 21-hidroxilasa son consecuencia de la transferencia de mutaciones que se encuentran en el pseudogen al gen *CYP21A2* (Harada y col., 1987; Urabe y col., 1990; Collier y col., 1993). Debido a este mecanismo, no es infrecuente la presencia de más de una mutación en el mismo alelo (Ezquieta y col., 1995; Bachega)

y col., 1998; Ezquieta y col., 1992). En la **Figura 11,** se muestra un esquema representativo de este mecanismo.





Se esquematizan dos posibles mecanismos de recombinación desigual durante la meiosis. Para simplicidad del gráfico se omitieron representar los genes RP y TNX. Los puntos 1 y 2 representan puntos de recombinación. Si la recombinación se produce hacia la izquierda de C4B (1 en el esquema), dará lugar a una duplicación del pseudogen en uno de lso cromosomas y a la deleción del mismo en el cromosoma homólogo, manteniendo la estructura el gen funcional *CYP21A2*. Las recombinaciones intragénicas (como por ejemplo la representada en el punto 2 del esquema), dará lugar a un gen híbrido *CYP21A1/CYP21A2* no funcional en unos de los alelos, que tiene secuencia de pseudogen en el extremo 5' y del gen activo en el extremo 3'. Esquema modificado de Oliver y col., 2000.



Figura 11: Esquema representativo del mecanismo molecular de conversión génica

Mecanismo de conversión génica debido a la transferencia no recíproca de secuencias durante la mitosis o meiosis. Para simplicidad del esquema se omitieron representar los genes RP y TNX. (I) Alelo normal. (II) Alelo portador de la conversión CYP21A1P/CYP21A2 con secuencias del pseudogen. Esquema modificado de Oliver y col., 2000.

El mecanismo particular por el cual se generan las mutaciones en el gen *CYP21A2* explica la elevada frecuencia de esta enfermedad. Hay 10 mutaciones muy frecuentes que son transmitidas del pseudogen al gen (**Figura 12**). El análisis de esta batería limitada de mutaciones permite la detección de un gran número de alelos lo que facilita el estudio molecular.

Las mutaciones que no derivan del pseudogén, representan mutaciones ocasionales y suelen aparecer en familias o en individuos aislados. En algunos casos sin embargo, se ha verificado la presencia de mutaciones menos frecuentes presentes con elevada frecuencia en determinadas poblaciones que se corresponden, muy probablemente, a efectos fundadores (Billerbeck y col., 1999; Loidi y col., 2006). Hasta el presente se reportaron alrededor de 240 mutaciones como causales de la patología (Human Genome Mutation Database, http://www.hgmd.org).

Figura 12: Estructura del gen *CYP21A2* y de las 10 mutaciones más frecuentes derivadas del pseudogen



Estructura del gen *CYP21A2* con sus 10 exones y regiones intrónicas. Se indican las 10 mutaciones que se detectan con más frecuencia derivadas del pseudogén y las correspondientes formas clínicas de deficiencia de 21-hidroxilasa asociadas a las mismas. En la parte superior se ubican las bases involucradas y en la inferior se nombra el aminoácido o región involucrada. Entre paréntesis, se consiga la actividad residual de la enzima para cada mutación. Esquema modificado de White y col., 2000.

Región promotora basal

El estudio más detallado y definitivo de la región promotora del gen *CYP21A2* humano fue realizado por Chang y Chung (Chang y Chung, 1995). Sus resultados permitieron determinar que la transcripción del pseudogen era aproximadamente 5 veces menor a la del gen, pero que a pesar de esto, los promotores de ambos genes respondían al estímulo con AMPc. Posteriormente, establecieron que la distinta actividad transcripcional se debía a la secuencia nucleotídica ubicada en los primeros 176 pb río arriba del gen, región en la cual el *CYP21A2* y *CYP21A1P* poseen 4 diferencias: c.-126C>T, c.-113G>A, c.-110T>C y c.-103A>G

(Higashi y col., 1986, White y col., 1986). Los resultados obtenidos por diferentes autores (Kagawa y Waterman, 1991; Chin y Chang, 1998; Araujo y col., 2007), evidenciaron que la disminución en la actividad transcripcional del pseudogén, es consecuencia de la menor afinidad de unión a varios factores de transcripción (FT), debido a las 4 diferencias nucleotídicas, de las cuales, las ubicadas a -126 y -113 serían las más importantes.

El cambio c.-126C>T se encuentra formando parte de un sitio de unión para el FT Sp1, que a su vez solapa otro sitio de unión cercano para el FT ASP (Kagawa y Waterman, 1990; 1991; 1992; Araujo y col., 2007). El cambio c.-113G>A no se encuentra en un sitio de unión a un FT determinado, pero es similar al sitio de Sp1 (Chin y Chang, 1998). Los otros 2 cambios podrían formar parte de un sitio de unión a NF-GMb, un FT identificado en granulocitos y macrófagos (Shannon y col., 1990).

Por otra parte, se había determinado en ratón que el NGFI-B interactuaba con la secuencia AAAGGTCA río arriba del gen de la 21-hidroxilasa murino y que por estímulo con ACTH en células Y1 se inducía su síntesis (Wilson y col., 1993; Li y col., 1997). En el gen humano, este sitio se ubica a aproximadamente -240 pb del inicio de la transcripción del gen humano y también se encuentra presente en el pseudogén. Diferentes ensayos, permitieron concluir que el NGFB-I también era responsable de activar la transcripción del *CYP21A2* en respuesta a la estimulación con ACTH/AMPc (Chang y Chung, 1995; Wilson y col., 1993; Li y col., 1997). Por lo tanto, existen 2 regiones en el promotor basal del *CYP21A2* implicadas en la respuesta a AMPc, la primera abarca desde -140 a -107 y une a ASP y Sp1, y la segunda se ubica desde -244 a - 237 e interactúa con NGFI-B.

Otro FT crítico para la expresión basal del gen de la 21-hidroxilasa es el SF-1 (de las siglas en inglés para *steroidogenic factor 1*). Este factor es fundamental para la expresión de la mayor parte de los genes esteroidogénicos (Lala y col., 1995; Val y col., 2003). La región

promotora del *CYP21A2* humano contiene un sitio consenso de unión a SF-1 (CCAAGGCCA, los nucleótidos subrayados los más importantes para la unión) ubicado desde -167 a -175 (Higashi y col., 1986; White y col., 1986). Aunque Rice y col. (Rice y col., 1990) demostraron que el SF-1 era esencial para la expresión de la 21-hidroxilasa murina, la función de este posible sitio en el *CYP21A2* humano no ha sido evaluada experimentalmente.

Regiones regulatorias de la transcripción

Además del promotor basal, se han descripto 3 regiones distales regulatorias de la transcripción. Una de ellas corresponde a un elemento respondedor a AMPc. La segunda se denomina Promotor Z (PZ). La tercera se describió recientemente y su regulación estaría mediada por un complejo formado por el receptor nuclear VDR11de la Vitamina D.

La región que responde a AMPc está ubicada entre -2587 a -2498 río arriba del inicio de la transcripción del *CYP21A2*, a aproximadamente 300 pb río abajo del gen *C4*. Se determinó la presencia de al menos 2 elementos regulatorios en la región, uno correspondiente a la mitad de un sitio consenso CRE que interactuaría con algún miembro de la familia de FT CREB/ATF, y un elemento similar a los CAAT, presente en diversos "*enhancers*" que interactuaría con una proteína C/EBP (siglas en inglés para: CCAAT/*enhancer-binding protein*) (Watanabe y col., 1993).

El PZ, por su parte, funcionaría como un "*enhancer*" para la transcripción del gen *CYP21A2*, formando parte intrínseca del promotor del gen *CYP21A2* que participa de la expresión adrenal-específica de la 21-hidroxilasa. Se ubica entre -5.6 a -4.6 Kb en el intrón 35 del gen C4 y posee 3 sitios de unión a FT, 2 a SF-1 y el otro a NF-W2 (Dorn y col., 1989; Tee y col., 1995).

Por su parte, Lundqvist y col. (Lundqvist y col., 2012) describieron que la VitD suprime la expresión del ARNm de *CYP21A2* en células NCI-H295R. Los autores determinaron la

presencia de un elemento de respuesta a la VitD denominado VDRE (siglas en inglés para: *vitamin D responsive element*) ubicado entre -6377 a -6382 pb desde el inicio de la transcripción del *CYP21A2*. El efecto de la VitD estaría mediado por un complejo formado por el receptor nuclear de la VitD llamado VDR (siglas en inglés para: *vitamin D receptor*) en conjunto con la presencia de co- moduladores como VDIR (siglas en inglés para: *VDR interacting repressor*) y WSTF (siglas en inglés para: *Williams síndrome transcription factor*).

I.5.6. CORRELACIÓN ENTRE FENOTIPO Y GENOTIPO

A partir de la realización de los estudios moleculares en diferentes poblaciones, se ha podido demostrar que en la deficiencia de 21-hidroxilasa las mutaciones que crean un codón de terminación prematuro, cambian sitios de procesamiento del ARN mensajero o alteran el marco de lectura se asocian fundamentalmente con la FC PS. Por otro lado, las mutaciones de cambio de sentido, dependiendo del aminoácido afectado, se asocian a las tres formas clínicas (Bas y col., 2009; New y col., 2013). En líneas generales, se agrupa a las diferentes mutaciones según las actividades enzimáticas residuales en severas, moderadas o leves (Wedell y col., 1994; Krone y col., 1998; Krone y col., 2000; Tardy y col., 2010). Una mutación será severa (grupo A) cuando posea una actividad enzimática residual menor al 1%, moderada (grupo B) con 1-2% de actividad residual y leve (grupo C) con 20-60% de actividad residual (**Figuras 12 y 13**).

Un 65-75% de los afectados son compuestos heterocigotas, en donde el individuo afectado presenta distintas mutaciones en cada uno de sus alelos. En estos casos, la manifestación clínica de la enfermedad se asocia con el alelo que presenta actividad enzimática residual más alta, es decir el alelo menos severamente afectado. (Speiser y col. 1992; Wedell y col., 1994; Ezquieta y col., 1995; Bachega y col., 1998). Se espera por lo tanto, que un paciente con la

FC PS presente un genotipo severo/severo, un paciente con la FC VS, genotipos moderado/ severo o moderado/moderado y uno de la FNC, leve/severo, leve/moderado o leve/leve.



Figura 13: Correlación genotipo-fenotipo en el déficit de 21-hidroxilasa

Las mutaciones se clasifican en grupos (A, B, y C) de acuerdo a la actividad residual (AR) de la enzima 21-hidroxilasa obtenida de los ensayos *in vitro*. En el gráfico se representa la severidad de las mutaciones derivadas del pesudogen y la forma clínica a la que se asocian. Así las mutaciones más severas, con baja AR que se detectan en las FC, se representan en el lado izquierdo de la figura y las menos severas, relacionadas con un fenotipo NC, en el lado derecho. (PS: Perdedor de sal, SV: Virilizante simple, NC: No clásico) Esquema modificado de Krone y col., 2007.

Si bien existe una alta correlación entre los diferentes genotipos y el fenotipo del paciente, no siempre el genotipo predice el fenotipo. Hay mutaciones particulares que se asociarían con más de un fenotipo (Speiser y col., 1992). Un ejemplo de variabilidad lo constituye la mutación c.283-13A/C>G, que genera un sitio aceptor de *splicing* alternativo en el nucleótido 655 y que adiciona 19 nucleótidos más en el ARNm resultante. Esta mutación se presenta en el 25% de los alelos afectados con la FC PS. No obstante, hay estudios que explican que en cierto número de células se produciría un *splicing* normal y esto sería suficiente para que la actividad enzimática pueda sintetizar una pequeña cantidad de aldosterona y por lo tanto prevenir la pérdida salina. El fenotipo del paciente, será, por lo tanto VS y no PS (Wilson y col., 1995; Speiser y White, 1998). Asimismo, Wilson y col. (Wilson y col., 1995)

Capítulo I- Introducción

detectaron pacientes PS que presentaban la mutación p.I172N, aunque en la literatura se la describe a mayoritariamente asociada a la forma de VS.

Finalmente, existirían otros factores genéticos y ambientales que podrían influenciar en el fenotipo. Esta presunción se basa en diferentes hallazgos, entre los cuales se encuentran la presencia de esteroides que requieren 21-hidroxilación en pacientes que poseen mutaciones que predicen una ausencia completa de actividad de la 21-hidroxilasa (Speiser y col., 1991; Koppens y col., 1998), o en la existencia de la forma críptica de la patología. Actualmente, se postula que las diferencias entre el fenotipo esperado y el genotipo detectado podrían deberse a la presencia de genes modificadores de la función de la 21-hidroxilasa y de la acción de las hormonas esteroideas (Krone y col., 2000; Nadeau, 2001; Gomes y col., 2008; Bidet y col., 2009). Como sucede con otros desordenes hiperandrogénicos, es probable que la hiperplasia adrenal sea una patología progresiva con síntomas que empeoran con la edad de los pacientes (Moran y col., 2000).

I.5.7. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

I.5.7.1. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Como se mencionó previamente, la primera aproximación al diagnóstico del déficit de 21hidroxilasa se realiza midiendo los niveles de 17-OHP luego de la estimulación o no, con ACTH. Si bien la presentación clínica y los dosajes hormonales son claros para el diagnóstico de las FC, pueden resultar de difícil interpretación para el diagnóstico de la FNC de la patología. Asimismo, los dosajes hormonales no diferencian claramente entre los individuos normales y los portadores heterocigotas. Es por este motivo que se sugiere la búsqueda de mutaciones en el gen *CYP21A2* como complemento del diagnóstico clínico y bioquímico.

El estudio directo de las mutaciones en el gen *CYP21A2* consiste en poder estudiar diferencialmente el gen de su pseudogén, ya que este último es inactivo y presenta la mayor

Capítulo I- Introducción

parte de las mutaciones de interés. Actualmente, este paso se realiza por el método de PCR (acrónimo de Reacción en cadena de la polimerasa, en inglés *Polymerase Chain Reaction*) con cebadores específicos para *CYP21A2*, los cuales impiden la amplificación simultánea del *CYP21A1*. El producto del primer paso se utiliza en una segunda etapa para la detección de las mutaciones en estudio. El estudio de las mutaciones más comunes se realiza utilizando diferentes técnicas de PCR (PCR-alelo-específicas, PCR y posterior corte con enzimas de restricción) o bien por secuenciación (Lee y Wijs, 2000).

El estudio conjunto de deleciones, conversiones y microconversiones permite la caracterización del 90-95% de los alelos de los pacientes afectados (Forest, 2004). La informatividad del estudio molecular es elevada y, únicamente en un 5-8% de los pacientes con formas clásicas, este cribado permite la caracterización de un único alelo. Si se ha excluido la consanguineidad, es muy infrecuente (<1%) que no sea caracterizado ninguno de los alelos en una FC.

Las técnicas mencionadas anteriormente no son adecuadas para detectar grandes deleciones y/o duplicaciones, especialmente en heterocigosis, así como tampoco para detectar grandes conversiones que se presentan con una frecuencia significativa en la población. Estas anomalías se interpretan mejor si se incorporan miembros de la familia al estudio y se utiliza la metodología de Southern-blot o bien el análisis por MLPA.

En el caso de que se realice la secuenciación, siempre que se identifique una nueva alteración genética en las secuencias exónicas, intrónicas o en la región promotora del gen *CYP21A2* es importante evaluar y predecir sus consecuencias en la actividad enzimática en diferentes niveles:

 La naturaleza del aminoácido alterado, la alteración estructural asociada y la consecuencia en la actividad enzimática mediante ensayos *in vitro*.

- Las posibles alteraciones de los sitios de *splicing* (eliminación o creación de un nuevo sitio de *splicing*).
- Alteraciones en la expresión del gen.

I.5.7.2. DIAGNÓSTICO PRENATAL DEL DÉFICIT DE 21-HIDROXILASA

En los fetos femeninos, la exposición excesiva a andrógenos adrenales en el período crítico del desarrollo sexual entre la semana 7 y 12 de gestación produce diferentes grados de masculinización y ambigüedad genital incluyendo clitoromegalia, fusión de pliegues labiales y migración del orificio perianal vaginal/uretral pero con desarrollo de conductos mullerianos normales (**Figura 6**).

Dicha ambigüedad genital puede ser corregida por cirugía en las niñas recién nacidas. Sin embargo, la administración prenatal de dexametasona durante este período, generalmente antes de la semana 8 de gestación, suprime la actividad fetal del eje HHS suprimiendo la superproducción adrenal y la masculinización inapropiada.

La finalidad del diagnóstico prenatal de la HSC por déficit de 21-hidroxilasa es, por lo tanto, la prevención de la virilización de los genitales en los fetos femeninos que, teniendo en cuenta su precocidad, tiene además la ventaja de permitir la interrupción del tratamiento en el caso de embarazos con fetos no afectados (Nimkarm y col., 2007).

Los primeros estudios prenatales consistían en la medición de 17-OHP en líquido amniótico entre las semanas 15-18 de gestación (Frasier y col., 1975). No obstante, y debido a la alta frecuencia de falsos negativos, hoy en día estos métodos se han sustituidos por el análisis molecular de mutaciones del gen *CYP21A2*. Este método proporciona una mayor sensibilidad y facilita su diagnóstico temprano dado que es posible su realización en la semana 10-12 de gestación (Nimkarm y New, 2007).

I.5.7.3. TRATAMIENTO

I.5.7.3.1 TRATAMIENTO DE LAS FORMAS CLÁSICAS

Glucocorticoides

Los pacientes con déficit severo de 21-hidroxilasa requieren tratamientos con corticoides de por vida. El objetivo es inhibir la secreción excesiva de CRH por el hipotálamo, la ACTH por la glándula pituitaria y reducir finalmente los niveles elevados de esteroides adrenales. En los niños, la droga de elección es la hidrocortisona en dosis de 10 a 20 mg/m²/día. Todas las dosis recomendadas para el tratamiento, exceden los valores fisiológicos de secreción de corticoides y son necesarias para suprimir en forma adecuada la síntesis de andrógenos adrenales. La vida media corta de la hidrocortisona minimiza la supresión del crecimiento y otros efectos adversos de un tratamiento prolongado con glucocorticoides más potentes tales como la prednisona y la dexametasona, pero debido a esto, una simple dosis diaria no es suficientemente efectiva para regular la secreción adrenocortical. La eficacia del tratamiento se monitorea midiendo los niveles de 17-OHP y androstenediona.

En los niños deben realizarse radiografías anualmente para monitorear cuidadosamente su línea de crecimiento y determinar la edad ósea. Tanto los adolescentes como los adultos pueden ser tratados con prednisona (5 a 7,5 mg por día dividido en dos dosis) o dexametasona (0,25 a 0,5mg por día divididos en una o dos dosis). Los pacientes deben ser monitoreados cuidadosamente frente a signos cushinoides iatrogénicos tales como una rápida ganancia de peso, hipertensión, estrías de pigmentación y/u osteopenia (White y Speiser, 2000).

Mineralocorticoides

Los recién nacidos con la forma perdedora de sal requieren mineralocorticoides (usualmente 0.1 a 0.2 mg de fludrocortisona diariamente) y suplementos de cloruro de sodio (1 a 2 g

diarios). Las dosis de fludrocortisona generalmente son menores luego de la infancia temprana. Los pacientes con la FC VS secretan en general una cantidad adecuada de aldosterona, sin embargo, son tratados con fludrocortisona con el objeto de generar supresión adrenocortical. Esto permite reducir la dosis de glucocorticoides requerida para mantener valores aceptables de 17-OHP. La ARP o su determinación directa suelen usarse para monitorear adecuadamente el reemplazo de mineralocorticoides y sodio (White y Speiser, 2000).

Genitales ambiguos

En los casos de las niñas que presentan genitales ambiguos, se recomienda la cirugía reparadora. Las mismas se realizan generalmente entre los 2 y 6 meses de vida, momento en el cual los tejidos se encuentran flexibles y se minimiza el trauma psicológico.

Tratamiento prenatal

El tratamiento prenatal con glucocorticoides debe iniciarse lo antes posible; se recomienda antes de la semana 8 de gestación y la droga de elección es la dexametasona en dosis de 20mg/Kg/día divida en tres veces. La dexametasona atraviesa la placenta y tiene mejor efecto de inhibición sobre la ACTH hipofisiaria (Pang y Clark, 1992). El medicamento se mantiene hasta la semana 10-12 de gestación, momento en el cual se toma una muestra de vellosidades coriónicas para la obtención de ADN del feto para la determinación del sexo mediante el análisis de cariotipo o la amplificación del gen SRY (*sex-determining region Y*). Si el feto es XY, la dexametasona debe suspenderse. Si el feto es XX, la dexametasona se suspende ante la ausencia de mutaciones o la presencia de un solo alelo afectado. Sin embargo, si los dos alelos del feto están mutados, el tratamiento debe mantenerse hasta el nacimiento. En este caso, luego del nacimiento se inicia la sustitución de los glucocorticoides y mineralocorticoides (López-Calderón y col., 2009).

Capítulo I- Introducción

Se ha reportado que entre un 5 al 8% de las madres presentan complicaciones como consecuencia del tratamiento prenatal, como por ejemplo un aumento ponderal exagerado, estrías, facies cushinoides, cefalea, hipertensión, irritabilidad, intolerancia a la glucosa, etc, (Pang y Clark, 1992). Por lo tanto, se aconseja disminuir la dosis de dexametasona a partir de la semana 20 de gestación. En cuanto a los fetos, no existirían evidencias que sugieran que el tratamiento prenatal aumente la mortalidad. Entre los recién nacidos, tampoco se ha observado diferencias significativas al analizar el peso, la altura, el perímetro cefálico y la presencia de malformaciones, entre aquellos recién nacidos que fueron tratados con respecto a los que no fueron tratados (Oliver y col., 2000; Nimkarn y New, 2007).

Se debe tener en cuenta que si bien el tratamiento prenatal se considera eficaz en la prevención de la virilización genital externa y los datos disponibles indican que es seguro tanto para los fetos como para las madres, sólo una de cada 8 gestaciones corresponde a un feto de sexo femenino afectado que debería ser tratado con dexametasona hasta el momento del nacimiento. Los otros siete fetos que no presentan riesgos, sin embargo, estarán expuestos al tratamiento hasta la semana 13 de gestación, momento en el que se poseen los resultados y se suspendería el tratamiento (Lopez-Calderon y col., 2009).

I.5.7.3.2. TRATAMIENTO DE LAS FORMAS NO CLÁSICAS

Las indicaciones terapéuticas se realizan en función de los síntomas predominantes y de la edad. Si el diagnóstico es en la infancia, la hidrocortisona es el tratamiento de elección para frenar el hiperandrogenismo, que puede dar lugar a un aumento en la edad ósea y pubertad adelantada. Si la enfermedad se inicia en el periodo puberal o postpuberal, la hidrocortisona también es la droga de elección, en ocasiones con un antiandrógeno asociado si hay síntomas como hirsutismo. La dexametasona sólo se utiliza al terminar el crecimiento, si la hidrocortisona no controla la enfermedad.

Por otro lado, algunos pacientes son tratados con anticonceptivos orales. En adolescentes y adultos es frecuente la aparición de manifestaciones en la posmenarca temprana. La utilización de corticoides para el tratamiento del hirsutismo puede ser menos efectiva que el uso de anticonceptivos y/o antiandrógenos. Los anticonceptivos son la terapia inicial del hirsutismo con el agregado de un antiandrógeno en aquellas mujeres que logran una mejoría subóptima. En los pacientes que presentan oligomenorrea y en los que no se busca embarazo, los anticonceptivos son también el tratamiento de elección (Alba y col., 2009).

I.5.8. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA 21-HIDROXILASA

El gen funcional *CYP21A2*, como ya se mencionó, está constituido por 10 exones. Tiene un tamaño de 3,2 Kb y codifica para un ARN mensajero (ARNm) de aproximadamente 2 Kb. La proteína 21-hidroxilasa tiene 495 aminoácidos, posee una masa molecular de 52 KDa, contiene un grupo prostético HEMO, es una monooxigenasa de esteroides en posición 21 de localización microsomal y es una citocromo P450 (CYP).

Las CYPs son un grupo de enzimas que constituyen una superfamilia de más de 1300 proteínas que contienen un grupo HEMO y que son fisiológicamente importantes en numerosos organismos. Están presentes desde los protistas hasta en los seres humanos (Nelson y col., 1993) y en su mayoría son monooxigenasas que catalizan reacciones de hidroxilación mediante la incorporación de un átomo de oxígeno en sus sustratos, aumentando así su polaridad.

Las CYPs se dividen en familias y subfamilias según la similitud en la secuencia de los aminoácidos. En los mamíferos, se han descripto 22 familias, que se pueden subdividir funcionalmente en las que desintoxican principalmente compuestos xenobióticos, y las que son esenciales en el metabolismo de sustratos endógenos tales como hormonas esteroides, prostaglandinas, leucotrienos, ácidos grasos y ácidos biliares.

Para muchas de las CYP procariotas se determinó su estructura tridimensional mediante difracción de rayos-X. La CYP102 bacteriana (antes llamada P450BM-3) se propuso originalmente como el prototipo más preciso de proteínas CYPs microsomales (Ravichandran y col., 1993) y en ausencia de estructuras cristalizadas de citocromo P450 de mamíferos, se utilizó a esta proteína bacteriana como el templado preferencial para el modelado de dichas estructuras (Szklarz y Halpert, 1997), incluyendo la CYP21 humana (Mornet y Glibrat, 2000). Sin embargo, en los últimos años, se obtuvieron las cristalografías de un número cada vez mayor de proteínas CYP cuyas estructuras se depositaron en el Banco de Datos de Proteínas (PDB). Entre ellas, hay cinco de mamíferos, la CYP2C5, CYP2B4, CYP2C9, CYP2C8 y CYP3A4, de las cuales las últimas 3 son proteínas humanas (Williams y col., 2000; Scott y col., 2003; Williams y col., 2003; Williams y col., 2004; Yano y col., 2004; Schoch y col., 2004).

La primera estructura de P450 eucariota resuelta, CYP2C5, es una 21-hidroxilasa de conejo que utiliza progesterona y que se expresa en microsomas. La comparación de secuencias revela que CYP2C5 es uno de los homólogos evolutivamente más cercanos de la CYP21 humana. Este modelo estructural se utilizó para analizar el efecto de nuevas mutaciones en *CYP21A2* y poder predecir las consecuencias de las mismas en la estructura y función de la proteína humana (Williams y col., 2000; Robins y col., 2006) (**Figura 14**).

Los estudios de cristalización de diversas CYPs han permitido comprobar que existe una elevada conservación topográfica y de estructura tridimensional de las diferentes P450s (Graham y Peterson, 1999). En forma general, las P450s están constituidas por una combinación de regiones de α -hélices y de hojas plegadas β fundamentalmente en la región de la proteína que rodea al grupo HEMO, mientras que las regiones más variables son las que constituyen los lugares de anclaje a la membrana o de unión y reconocimiento de sustratos.

La alta conservación de la región del HEMO, que se corresponde con el centro catalítico de las enzímas, refleja un mecanismo común de transferencia de electrones y protones (Williams y col., 2000). Por su parte, las enzimas permanecen ancladas a la membrana a través de una hélice hidrofóbica cercana al extremo N-terminal, por lo que la mayor parte de la proteína se sitúa en la cara citosólica de la membrana. Ésta hélice transmembrana es seguida por una serie de aminoácidos básicos cuyos residuos interaccionan con las cargas negativas de los lípidos de la membrana.



Figura 14: Modelo de la proteína P450c21

Se señalan con flechas las diferentes α -hélices y hojas plagadas β predichas. En rojo se muestran algunas mutaciones relacionadas con la forma PS de la deficiencia de 21-hidroxilasa, en azul con la forma VS y en marrón con la FNC. El grupo HEMO se muestra en rojo y el sustrato en verde. Esquema obtenido de Robins y col., 2006.

Capítulo I- Introducción

Los sustratos de CYP son moléculas relativamente hidrófobas, al igual que las hormonas esteroideas. Este es el motivo por el cual los sitios de unión al sustrato están formados principalmente por residuos de aminoácidos hidrofóbicos. A partir de estudios realizados en los que se compararon las secuencias de las enzimas 21-hidroxilasa, 17-hidroxilasa y esterol desmolasa, se identificaron dos áreas altamente conservadas de unión al sustrato: una cerca del extremo N-terminal (Q53-R60 en CYP21) y otra hacia el extremo C-terminal (L342-V358 en CYP21) (White, 1987; Picado-Leonard y Miller, 1998). La estructura cristalina de CYP102 confirma que la primer área conservada corresponde a un profundo bolsillo constituido por una estructura β -plegada (residuo E38-A44 en CYP21) que conforma el sitio de unión al sustrato. La segunda, corresponde a la hélice K (L311-W325 en CYP21) que no interactúa con el sustrato pero que forma parte de un sitio de anclaje para una proteína accesoria transportadora de electrones: citocromo P450 oxido-reductasa o POR. El resto de los segmentos que forman parte del bolsillo de unión al sustrato están distribuidos a lo largo del péptido, y no presentan secuencias particularmente conservadas. Las diferentes α -hélices, hojas plegadas β y sitios activos de la proteína se visualizan en la **Figura 15.**

La región de anclaje a la membrana del microsoma y la región del centro activo donde se unen los sustratos, 17-OHP y progesterona, así como las regiones de interacción con las enzímas auxiliares o zonas de transferencia de electrones y protones son importantes para la funcionalidad de la proteína

Figura 15: Diferentes hélices, hojas plegadas y sitios de unión a sustratos, ligando o HEMO para un modelo de la proteína 21-hidroxilasa humana



Las regiones α -hélices se esquematizan en rojo y las estructuras de hoja plegada como una flecha verde. Con puntos rojos se muestran los aminoácidos que interactúan el HEMO, los azules los que interactúan con esteroides, y con puntos rojos y azules los que interactúan tanto con el HEMO como con esteroides. Las mutaciones en rojo se relacionan con la forma PS, las azules con VS, las marrones con FNC, en negro se muestran las mutaciones noveles y en verde los polimorfismos. Esquema modificado de Robins, y col., 2006.

-CAPÍTULO II-MARCO TEÓRICO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1. MARCO TEÓRICO

En América latina, en las últimas décadas tuvo lugar un proceso conocido como transición epidemiológica caracterizado por una disminución de la mortalidad por desnutrición y enfermedades infectocontagiosas, y un incremento relativo de las afecciones crónicodegenerativas. Aunque en los países de bajos y medianos ingresos aún se enfrentan a las llamadas enfermedades de la pobreza, las enfermedades crónicas y los trastornos con base total o parcialmente genética comienzan a ser un problema de salud pública (Reunión conjunta, La Haya, 1999). Dentro de estas entidades están incluidas las anomalías congénitas (AC). Estas constituyen todas las condiciones potencialmente patológicas (morfológicas y/o funcionales) que se originan antes del nacimiento y que incluyen los desórdenes causados por factores genéticos, ambientales, mixtos o desconocidos, y que pueden ser evidentes desde el nacimiento o manifestarse más tardíamente en la vida. Su prevalencia global al nacimiento es aproximadamente 3 a 5% (Harris y Reid, 1997). Sin embargo, debido al diagnóstico de patologías funcionales de aparición más tardía (ceguera, sordera, retardo mental, entre otros), asciende al 8% a los 5 años de edad y explican la mayor parte de las internaciones en hospitales pediátricos. En el sector público de salud en Argentina, se estima una prevalencia de AC morfológicas detectadas al momento del nacimiento del 1,78% (Groisman y col., 2012). Las AC incrementaron su importancia relativa en la mortalidad infantil (MI), pasando a ser en nuestro país la segunda causa de MI y explicando el 25.24% de las defunciones en menores de 12 meses de vida (Estadísticas Vitales, Programa Nacional de Estadísticas de Salud: www.deis.gov.ar, Ministerio de Salud de la Nación; www.msal.gov.ar).

En las últimas décadas la genética clínica ha adquirido una gran relevancia como consecuencia de los avances en el desarrollo de las técnicas diagnósticas, las cuales tienen un enorme impacto en la práctica médica y han permitido un progreso notable en la definición de síndromes genéticos y detección de portadores, así como también, en la prevención y diagnóstico prenatal de los mismos.

En este contexto, en el año 1998 nuestro grupo de trabajo inició los estudios genéticos en Hiperplasia Suprarrenal Congénita por déficit de 21-hidroxilasa en nuestra población. La elección de esta patología se basó principalmente en dos consideraciones:

- a. El déficit de 21-hidroxilasa comprende un amplio espectro de manifestaciones que van desde las formas severas con pérdida salina hasta aquellas con signos leves de hiperandrogenismo. Para la forma leve o no clásica, se estima una incidencia de alrededor de 1/1000, *y constituye la enfermedad genética autosómica recesiva de mayor frecuencia*. Esta patología en todas sus formas, tiene una característica poco frecuente entre las enfermedades genéticas: *para ella existe un tratamiento efectivo y económico, que permite una calidad de vida normal*.
- b. Al momento de iniciar el trabajo, el diagnóstico molecular de la deficiencia de 21-hidroxilasa se realizaba en nuestro país sólo en un hospital pediátrico, *por lo tanto, el diagnóstico en los individuos adultos quedaba sin resolución.* Teniendo en cuenta que el análisis molecular representaba y representa hasta el día de hoy el diagnóstico de certeza de la patología, se consideró necesario desarrollar un algoritmo de estudio que permitiera, en primera instancia, estimar la frecuencia con que los diferentes defectos en el gen se presentaban en niños, adolescentes y adultos de nuestra población. El conocimiento de las mutaciones responsables del cuadro clínico, permitiría no sólo dar un diagnóstico de certeza, sino reconocer los riesgos, asesorar a los pacientes y tomar las medidas preventivas oportunamente.

Nuestro grupo de trabajo inició el estudio molecular de la deficiencia de 21-hidroxilasa como un estudio colaborativo entre el Centro Nacional de Genética (CNGM, ANLIS), el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME),la División de Endocrinología del Hospital Durand y el Servicio de Pediatría del Hospital Italiano de la Ciudad de Buenos Aires. Los

primeros estudios realizado, permitieron estimar la distribución de las 10 mutaciones más frecuentes en una muestra preliminar de afectados (Dain y col 2002, Pasqualini 2007)

Al momento de iniciar este trabajo de tesis, alrededor de 400 familias habían sido estudiadas y se detectaron mutaciones en el 93% de los alelos clásicos y en alrededor del 70% de los alelos pertenecientes a los pacientes no clásicos.

El alto número de alelos no determinados, especialmente en la FNC, podría estar indicando la presencia de mutaciones menos frecuentes o noveles en el gen estructural o en zonas regulatorias.

En forma no excluyente, el alto número de alelos de la FNC aún no caracterizados, podría estar indicando, en concordancia con lo sugerido por otros autores (Ezquieta y col., 1995; Bachega y col., 2000; Ezquieta y col., 2006), que el valor de corte propuesto para la 17-OHP post-estímulo con ACTH (prueba bioquímica utilizada como diagnóstico diferencial de la FNC), estaría sobrestimando la frecuencia de la patología.

Asimismo, y como se mencionó en la introducción, no siempre un mismo genotipo se ve reflejado en un mismo fenotipo (Speiser y col., 1992; Wilson y col., 1995). Sin embargo, para sustentar esta afirmación, es necesario tanto para las FC como para las FNC, una buena caracterización genotípica de los pacientes para descartar la presencia de otras mutaciones o variantes que pudieran influenciar en la actividad enzimática que finalmente presenta la enzima. Este análisis no se había realizado previamente en nuestro grupo de trabajo dado que la secuenciación no era el método utilizado para la caracterización molecular de los alelos afectados y además muchos de los pacientes poseían sólo uno o ninguno de los alelos determinados.

El trabajo realizado en esta tesis, por lo tanto, tuvo como eje central dar respuesta a estos interrogantes.

II.2. HIPOTESIS

- El alto número de alelos no caracterizados se corresponden con la presencia de mutaciones noveles o menos frecuentes en las regiones codificantes del gen y su región promotora.
- Los valores hormonales de los pacientes no clásicos con los dos alelos mutados difieren de aquellos que presentan los pacientes que poseen sólo un alelo mutado o sin ninguna mutación.
- Existe una alta correlación entre el genotipo de los pacientes y el fenotipo que desarrollan.

II.3. OBJETIVOS

II.3.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la presencia de mutaciones noveles o menos frecuentes como causa de la deficiencia de la 21-hidroxilasa.

II.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar las regiones codificantes, intrónicas y promotoras del gen *CYP21A2* en pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa en los que restaba determinar al menos un alelo.
- Simular, mediante programas de modelado molecular, las posibles implicancias biológicas de las mutaciones noveles halladas en regiones codificantes.
- 3. Analizar la expresión *in vitro* de mutaciones noveles halladas.
- 4. Correlacionar el genotipo hallado en los pacientes con el-fenotipo que exhiben.

-CAPÍTULO III-MATERIALES Y MÉTODOS

ASPECTOS ÉTICOS

Todas las investigaciones realizadas en este trabajo se llevaron a cabo de acuerdo con los principios expresados en la declaración de Helsinki. Para todas las muestras incluidas, se solicitó la firma de un consentimiento informado por escrito del individuo (Ver modelo en el ANEXO 5).

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Medicina y Biología Experimental (IBYME), y del Centro Nacional de Genética Médica (CNGM), Buenos Aires, Argentina (Ver ANEXO 5).

OBJETIVO 1: Analizar las regiones codificantes, intrónicas y promotoras del gen *CYP21A2* en pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa en los que restaba determinar al menos un alelo

III.1.1. MUESTRAS

III.1.1.1.PACIENTES

La evaluación endocrinológica y genética de la mayor parte de los pacientes incluidos en este trabajo se llevó a cabo en la División de Endocrinología del Hospital Durand, en el servicio de pediatría del Hospital Italiano y en el Centro Nacional de Genética Médica, Buenos Aires, Argentina, si bien se incluyeron muestras de diferentes centros endocrinológicos y genéticos del interior de la Argentina.

Para la realización de esta primera parte del estudio se incluyeron 87 pacientes: 9 muestras de pacientes perdedores de sal, 6 muestras de pacientes virilizantes simples y 72 muestras de la forma NC de la patología en los que restaba determinar al menos un alelo luego del estudio de las 10 mutaciones más frecuentes del gen. Los pacientes incluidos para esta parte del
estudio se consignan en el ANEXO 1. Para los pacientes en los que se hallaron mutaciones noveles, y en caso que estuvieran disponibles, se analizaron muestras de ambos padres.

Criterios de inclusión:

- Para los pacientes de la FC perdedores de sal: crisis de deshidratación salina dentro del primer mes de vida, genitales ambiguos en las niñas, acelerado crecimiento óseo en ambos sexos. Elevada 17-OHP basal y elevada actividad de renina plasmática (>4,5ng/ml/h), hiponatremia e hipercalemia.
- Para los pacientes de la FC virilizantes simples: genitales ambiguos en las niñas, acelerado crecimiento óseo en ambos sexos sin signos de deshidratación. Elevada 17-OHP basal.
- Para los pacientes de la FNC: síntomas generales de hiperandrogenismo de inicio tardío fuera del período neonatal con al menos alguna de estas características: pubertad o pubarca pseudoprecoz, alteraciones en la menstruación, infertilidad, hirsutismo y/o acné, alopecía. Valores de 17-OHP basal y a los 60 minutos post estimulación con Synacten (ACTH sintética, bolo intravenoso de 0.25ng/ml)por encima de al menos tres veces el límite superior normal. Los puntos de corte para la inclusión fueron establecidos con anterioridad en nuestro laboratorio (Dain y col., 2002) y se corresponden con valores de 17-OHP post ACTH de 10 ng/ml con niveles basales ≥ a 2 ng/ml y para aquellos pacientes sin prueba de ACTH, valores de 17-OHP basal > a 6 ng/ml.

Criterios de exclusión:

• Individuos que no hubieran firmado el consentimiento informado.

- Pacientes con diagnóstico presuntivo de HSC FNC que aun con valores hormonales con criterio de inclusión, presentaran otro tipo de sintomatología clínica que pudiera ser compatible con un diagnóstico de poliquistosis ovárica como por ejemplo signos Cushinoides.
- Pacientes con diagnóstico presuntivo de HSC FNC en los que no se contaba con los valores hormonales de al menos 17-OHP basal o post ACTH según correspondiera.
- Pacientes con diagnóstico presuntivo de HSC FNC que presentaban valores de 17-OHP basal mayor a 6 ng/ml, pero que la prueba de ACTH fuera inferior a 10 ng/ml.

III.1.1.2. INDIVIDUOS DE LA POBLACIÓN GENERAL

Se incluyeron muestras de 50 individuos aparentemente sanos de la población general tomados al azar y en forma anónima que derivan de bancos de sangre y laboratorios relacionados.

III.1.2. EXTRACCIÓN DE SANGRE Y ADN

Para los pacientes y los individuos de la población general se tomaron alrededor de 5 ml de sangre por punción venosa anticoagulada con EDTA al 5%.

Para la extracción de ADN, se tomaron 3 ml de sangre periférica y se colocaron en un tubo Falcon de 15 ml. Se agregó solución de lisis RBC (de las siglas en inglés de *red blood cell*), hasta llenar el tubo. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 rpm. Los lavados con RBC y la centrifugación se repitieron hasta que la solución no tuviese coloración roja.

Una vez obtenida una solución limpia, se descartó el sobrenadante. Luego se agregaron 3 ml de buffer TEN (Tris-EDTA-NaCl) para resuspender el pellet. Se adicionaron 20 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) y 200 µl SDS 10 % o 100 µl de SDS 20%. Se incubó durante toda

noche (ON) a 37° con agitación. Luego de la incubación, se agregó 1 ml de NaCl 5 M y se mezcló vigorosamente. Se centrifugó la solución durante 10 minutos a velocidad máxima. El sobrenadante se pasó a un tubo de 15 ml y se agregaron 2 volúmenes de etanol 100%. Se agitó la mezcla hasta que el ADN estuviese completamente precipitado. El ADN se extrajo de la solución con una pipeta de vidrio. Luego, se sumergió la pipeta en etanol 70 % (3 veces) y se dejó secar hasta que el ADN se tornó transparente. El ADN se resuspendió en buffer TE (Tris-EDTA) o agua destilada a 37°C ON, de manera de obtener una concentración de ADN de aproximadamente 50 -100 ng/ μ l.

La solución de ADN así obtenida se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm (1 OD= $50 \mu g/ml$). Una relación 260/280 mayor a 0.7 se consideró como adecuada para los estudios. Véase la preparación de soluciones en el ANEXO 4.

III.1.3. BÚSQUEDA DE MUTACIONES NÓVELES

III.1.3.1. PRIMER AMPLIFICACIÓN DIFERENCIAL DEL GEN CYP21A2

Se utilizaron alrededor de 2 μ l de la solución de ADN genómico de cada individuo para realizar una primera ronda de amplificación por PCR con el objetivo de diferenciar el gen del pseudogen. Para tal fin, se amplificó el gen en 2 fragmentos que se solapan - llamados 5' y 3'- que incluyen la secuencia desde el nucleoótido -416 en la zona promotora hasta el nucleótido 2795 en la región 3' no codificante (3'UTR), con cebadores que aparean en regiones específicas del gen y por lo tanto no aparean en el pseudogén (**Tabla 1**). De esta forma se asegura que solo se amplifique el gen *CYP21A2* en ambos fragmentos.

Los cebadores utilizados para el fragmento 5' fueron el LD1 y el LD33. Los cebadores utilizados para el fragmento 3' fueron el LD7 y LD4. Los cebadores LD7 y LD33 son los que le confieren a la reacción la especificidad diferencial al reconocer sólo las secuencias que están presentes en el gen. Los controles de especificidad de estas reacciones fueron realizados

con anterioridad a este trabajo en la puesta punto del estudio de las 10 mutaciones más frecuentes (Dain y col., 2002).

Los componentes y soluciones utilizados para la reacción de PCR se detallan en la **Tabla 2**. El buffer, la enzima Taq DNA polimerasa, el MgCl₂ y los dNTPs utilizados en todas las reacciones de PCR de esta tesis fueron de Invitrogen.

Las condiciones de ciclado utilizadas para ambos fragmentos fueron:

- a) Desnaturalización inicial: 94 °C: 1'30"
- b) 94 °C: 40 \sim 55 °C: 30 \sim 72 °C: 3 \sim 30 ciclos
- c) Extensión: 72 °C 10'

El chequeo de la reacción se realizó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. El tamaño de los fragmentos esperados para cada región era de 1807 pb para el 5´ y de 2097 pb para el 3´.

En todos los experimentos de esta tesis se utilizó buffer TAE 1X (ver ANEXO, sección V.3) tanto para la preparación de los geles de agarosa, como para la electroforesis posterior. El voltaje de corrida fue en promedio de 75-85 V y el tiempo de electroforesis fue variable en función del tamaño de los fragmentos a analizar.

NOMBRE DEL CEBADOR	ORIENTACIÓN	SECUENCIA 5'-3'	REFERENCIA	
LD1	Sentido	TTCAGGCGATTCAGGAAGCG	Wedell y Luthman, 1993a	
LD2	Sentido	GGTGCTGAACTCCAAGAGG	Wedell y Luthman, 1993a	
LD4	Antisentido	ACTGTGTTTTACAGGGGGGGAG	Wedell y col., 1992	
LD6	Antisentido	CAGAGCAGGGAGTAGTCTC	Wedell y Luthman, 1993a	
<u>LD7</u>	Sentido	CCTGTCCTTGGGAGACTACT	Wedell y Luthman, 1993a	
LD13	Sentido	AGGGATCACATCGTGGAGAT	Este trabajo	
LD33	Antisentido	GCATCTCCACGATGTGA	Owerbach y col., 1992	
LD38	Sentido	GCACCACACGGCCCAGCA	Wedell y Luthman, 1993a	
4-5F	Sentido	GCACAGCGGCCTGCTGAACT	Blanché y col., 1997	
4-5R	Antisentido	CAGGGGTGTCTAGGCTCCAG	Blanché y col., 1997	
7F	Sentido	CAGGCCAGCCGCTCAGCC	Blanché y col., 1997	
7R	Antisentido	GGGAAGGAGCCTTTTGCTTG	Blanché y col., 1997	
10F	Sentido	TGCCGTGAAAATGTGGTGGA	Blanché y col., 1997	
10R	Antisentido	GCAATAAAGGAGAAACTGAGG	Blanché y col., 1997	
PROMR	Antisentido	AGCTTCCACCAGTTCCAC	Blanché y col., 1997	
P431R	Antisentido	CCAGGCGCGCCAACCGCT	Minutolo y col., 2011	
MM266	Sentido	TGGCCTCCCTGGAGCCCCT	Este trabajo	
Val-wtF	Sentido	ACAGCTCCTGGAAGGGCACG	Minutolo y col., 2011	
Val-wtR	Antisentido	ACTGCAGCCATGTGCAA	Wedell y Luthman, 1993a	
Val-mutF	Sentido	ACAGCTCCTGGAAGGGCACT	Minutolo y col., 2011	
Val-mutR	Antisentido	CTGCAGCCATGTGCAC	Wedell y Luthman, 1993a	
R483Q-wt	Antisentido	GCTGTGCCGCCCCATCCCCC3	Este trabajo	
R483Q- mut	Antisentido	GCTGTGCCGCCCATCCCCT	Este trabajo	
I5-wt	Sentido	CATTCTCATGCTTCCTGCCGCA	Este trabajo	
I5-mut	Sentido	CATTCTCATGCTTCCTGCCGCG	Este trabajo	
R132C	Sentido	TGCTGCTGGGCATCTGTGACTCCATGGAG	Este trabajo	
R149C	Sentido	CAGGAGTTCTGTGAGTGCATGAGAGCCCAGC	Este trabajo	
M283V	Sentido	GGGCACGTGCACGTGGCTGCAGTGG	Este trabajo	
D322G	Sentido	CAGGAGGAGCTAGGCCACGAACTGGGC	Este trabajo	
E431K	Sentido	TGTGCCTGGGCAAGCCGCTGGCG	Este trabajo	
I172N	Sentido	CTCACCTGCAGCATCAACTGTTACCTCACCTTC	Este trabajo	
Exón4- BstEII	Sentido	GCGGGTGACCCATCATCTGTTACCTCACC TTC	Este trabajo	
Exón7- BstEII	Antisentido	GCCGGTCACCGTTTGCTGTGGTCTCAGTG	Este trabajo	
AlfaGli1F	Sentido	ACCCCTCACTCTGCTTCTC	Este trabajo	
pSVcDNA	Antisentido	GGTATTTGGAGGTCAGCA	Este trabajo	
CDNAF	Sentido	ACTGCCTGCTGGTGACCCATC	Este trabajo	
CDNAR	Antisentido	CGGCCAGGGTCACCGTTTG	Este Trabajo	

Tabla1: Cebadores utilizados para las distintas amplificaciones por PCR

Los cebadores en negrita y subrayados son específicos del gen CYP21A2 y no aparean con el pseudogén CYP21A1.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	VOLUMEN (μl) 5´y 3´	VOLUMEN (µl) F1 y F2	VOLUMEN (µl) F3 yF4	CONCENTRACIÓN FINAL
H ₂ O		37,3	40,9	38,4	
Buffer	10X	5	5	5	1X
MgCl ₂	25Mm	1,5	1,5	1,5	1,5mM
DMSO	100%	2,5	-	2,5	5%
DNTPs	25mM	0,4	0,4	0,4	200µM
Cebador sentido	50μΜ	0,5	0,5	0,5	0,5µM
Cebador antisentido	50μΜ	0,5	0,5	0,5	0,5µM
Taq Polimerasa	5U/ml	0,3	0,2	0,2	1,5U/1U
ADN	~100-ng/ml	2	1	1	2-4 ng/ml

Tabla 2: Mezcla de PCR para los fragmentos 5['], 3['], F1, F2, F3 y F4

En todos los casos, el volumen final de reacción fue de 50 µl. DMSO: Dimetil sulfóxido.

III.1.3.2. ANÁLISIS DE LAS 10 MUTACIONES MÁS FRECUENTES DERIVADAS DEL PSEUDOGEN

Las mutaciones p.P30L, c.283-13A/C>G, p.G110_Y112delfs (Del 8 pb), p.I172N, p.I236Np.V237E-p.M239K (Clu EX6), p.V281L, p.306insT, p.Q318*, p.R356W y p.P453S fueron analizadas por PCR alelo específicas o PCR-RFLP como se describió en Dain y col. (Dain y col., 2002). Esta parte del trabajo fue realizada por la Lic. Noemí Buzzalino en nuestro laboratorio como parte de los estudios de diagnóstico molecular de la patología.

Asimismo, la presencia de deleciones y/o macronversiones del gen así como las duplicaciones del mismo se analizaron mediante Southern blot y/o MLPA por la Dra. Cecilia Fernández en nuestro laboratorio como parte de su trabajo de tesis doctoral (Fernández C., 2014).

III.1.3.3. SEGUNDA AMPLIFICACIÓN DIFERENCIAL DEL GEN *CYP21A2* PARA EL ESTUDIO DE MUTACIONES MENOS FRECUENTES O NOVELES

En aquellos pacientes en los que luego del estudio de las 10 mutaciones más frecuentes del gen no se hallaron las dos mutaciones causantes de la enfermedad, se realizó una segunda ronda de amplificación diferencial con el objetivo de secuenciar el gen completo. Dado que los tamaños de los fragmentos 5' y 3 provenientes de la primera ronda de amplificación son muy largos para ser secuenciados, la segunda ronda de amplificación consistió en obtener 4 fragmentos superpuestos llamados F1, F2, F3 y F4, utilizando como templados los fragmentos 5' para los F1 y F2 y el 3' para los fragmentos F3 y F4 (**Figura 16**).





Los cebadores para cada fragmento de amplificación se representan con flechas. Los cebadores específicos del gen *CYP21A2* se muestran con estrellas.

La mezcla de reacción correspondiente a los fragmentos F1 y F2 así como para el F3 y el F4 se detalla en la **Tabla 2**.

Los cebadores utilizados fueron para el F1, el LD1 y el LD6; para el F2, el LD2 y el LD33; para el F3, el LD7 y el -7R y para el F4, el LD13 y el LD4.

Los cebadores LD6, LD33, LD7 y LD13 son específicos del gen. Las secuencias correspondientes de todos los cebadores utilizados se detallan en la **Tabla 1**.

Condiciones de ciclado

F1:

a) Desnaturalización: 94 °C 2'

- b) 94 °C 30 $\overset{\sim}{}$ 59 °C 30 $\overset{\sim}{}$ 72 °C 1 $\overset{\sim}{}$ 30 ciclos
- c) Extensión: 72 C° 5'

F2:

- a) Desnaturalización: 94 °C 2-
- b) 94 °C 40 $\stackrel{\checkmark}{}_{58 \circ C}$ 40 $\stackrel{\checkmark}{}_{72 \circ C}$ 1 $\stackrel{\prime}{}_{30 \circ \cdots}$ 30 ciclos
- c) Extensión: 72 C° 7'

F3 y F4:

- a) Desnaturalización: 94 °C 2'
- b) 94 °C 40 \sim 57 °C 30 \sim 72 °C 3 \sim 30 ciclos
- c) Extensión: 72 C° 10'

Los 4 fragmentos se chequearon en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio, con un marcador de peso molecular de 250 pb. Los tamaños esperados para cada uno de los

fragmentos eran de 1141 pb, 1128 pb, 1116 pb y 1423 pb, para F1, F2, F3 y F4, respectivamente.

Purificación y cuantificación de los productos de PCR de la segunda ronda de amplificación diferencial para su secuenciación

Los productos de las PCR de los F1-F4 fueron purificados mediante en kit "*Ilustra GFX PCR DNA and gel band purification kit*" de GE Healthcare. Para ello, cada fragmento se amplificó en 2 tubos para obtener un volumen final de 100µl. El producto amplificado se dispuso en un tubo eppendorf de 1,5 ml conteniendo 500 µl de buffer de captura, provisto por el kit, con el fin de desnaturalizar proteínas. Con posterioridad, la mezcla de ADN-buffer se colocó sobre la columna de purificación, montada sobre un tubo recolector también provisto por el kit, y se centrifugó durante 1 minuto a velocidad máxima. Luego de la centrifugación, se descartó el líquido presente en el tubo recolector. Se adicionaron sobre la membrana de la columna 500µl de buffer de lavado. Se centrifugó nuevamente a máxima velocidad durante 1 minuto y se descartó el líquido del tubo recolector. Luego la columna se traspasó a un tubo eppendorf de 1,5 ml y sobre la membrana de la misma se agregaron 30µl de agua destilada con el fin de eluir el producto de PCR. Se dejó a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto. Se descartó la columna y el eluído que contenía el producto de PCR purificado se guardó a -20°C hasta su utilización.

Los F1-F4 ya purificados fueron cuantificados para su posterior envío al servicio de secuenciación. La cuantificación se realizó por una electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio, con un marcador de masa (*Low mass* de Invitrogen) durante una hora a 75V. Luego de la electroforesis, se semicuantificó el fragmento amplificado por comparación visual con los fragmentos de masa conocida correspondientes al marcador de peso molecular.

Secuenciación

Alrededor de 20 µl de las muestras de los fragmentos F1-F4 se enviaron a secuenciar al servicio de Macrogen Korea, en una concentración aproximada de 50 ng/ml. Los resultados, en forma de electroferogramas, fueron analizados mediante el programa Bioedit o el Finch TV y la secuencia obtenida se comparó con la secuencia consenso del gen (M13936) publicada en la base de datos del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) mediante el algoritmo BLASTn.

III.1.3.4. CORTES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN EN MUESTRAS DE INDIVIDUOS DE LA POBLAICIÓN GENERAL PARA LOS CAMBIOS NOVELES HALLADOS EN REGIONES CODIFICANTES

Con el fin de descartar que aquellas mutaciones no descriptas previamente se correspondieran con polimorfismos poblacionales, se analizaron muestras de ADN de 50 sujetos seleccionados al azar de la población general mediante amplificación de la región de interés y cortes con enzimas de restricción (PCR-RFLP). Luego de la extracción de ADN, se realizó la primera ronda de amplificación diferencial del gen de la misma manera que fuera explicado precedentemente (apartado III.1.3.1.). Según la ubicación del cambio a estudiar, se amplificaron las regiones específicas en una segunda ronda de PCR, con cebadores que permitían, luego de una digestión con diferentes enzímas de restricción, diferenciar correctamente el alelo salvaje del mutado y los 3 genotipos posibles (homocigota salvaje, homocigota mutado y heterocigota). En la **Tabla 3** se detallan los cebadores utilizados para amplificar cada fragmento, las endonucleasas utilizadas, las condiciones de restricción y chequeo para cada variante, así como los tamaños de restricción esperados para cada caso. Las secuencias de los cebadores utilizados se detallan en la **Tabla 1**.

Para todos los casos, la mezcla de de reacción/muestra contenía:

H₂O.....c.s.p. 20 µl.

Buffer 10X......2 μ l (conc. final 1X)¹.

Enzima 10U/µ1.....0,5 µl (Conc. final 0,25U/µl).

ADN......5µl.

En el caso de las enzímas HhaI y BtgI se utilizó además 0,2µl de BSA 10 mg/ml por tubo de reacción, para lograr una concentración final de BSA 100µg/ml.

III.1.3.5. PCRs ALELO ESPECÍFICAS PARA DETERMINAR LA SEGREGACIÓN DE LAS MUTACIONES HALLADAS

Dado que no contábamos con los ADNs parentales, y con el fin de determinar si las variantes p.R149C, p.E431K y c.652-2A>G se encontraban en *cis* (en el mismo alelo) o en *trans* (en el alelo homólogo) con la/s otra/s mutación/es hallada/s en cada paciente, se realizaron PCRs alelo específicas.

MUTACIÓN p.R149C

La paciente con la mutación p.R149C, presentaba además la mutación p.V281L en heterocigosis. Para esta PCR alelo específica se utilizó como molde el fragmento 3' y los cebadores LD7 y Val-wtR para amplificar el alelo salvaje V281 y Val-mutR para amplificar el alelo con la mutación L281 (**Tabla 1**).

Se prepararon dos mezclas de reacción, que diferían sólo en el cebador específico: Val-wtR o Val-mutR, respectivamente.

¹ Composición variable dependiendo de la enzima utilizada. En todos los casos el buffer utilizado fue provisto por el fabricante.

REGIÓN	VARIANTE	CAMBIO	CEBADOR Sentido	CEBADOR Antisentido	FRAGMENTO (pb)	ER	T°	CHEQUEO	ALELO SALVAJE (pb)	ALELO MUTADO (pb)
E 3	g.782C>T	p.R132C	LD7	LD33	696	BtsCI	50	A 2%	77, 200, 419	200, 496
E 4	g.940C>T	p.R149C ¹	4-5F	4-5R	355	HhaI	37	A 2%	355	35,320
E 7	g.1695A>G	p.M283V ¹	7F	7R	274	HindIII	37	PA 8%	12, 27, 42, 72, 121	12, 27, 72, y 163
E 10	g.2515G>A	p.E431K ¹	10F	P431R	166	BsrBI	37	PA 8%	16,150	166
E 10	g.2511_2512del GG	p.L429fs ¹	10F	10R	389	BseDI	60	PA 8%	66, 77, 83, 141	66, 83, 218
E 10	g.2620_2621ins C	p.H466fs	MM266	10R	162	MwoI	60	PA 20%	68, 94	25, 43, 94
I 5	g.1329A>G	c.652- 2A>G	LD7	LD33	696	BtgI	37	A 2%	84, 612	75, 84, 537
I 8	g.2202G>A	c.1116- 34G>A	LD13	LD4	1424	MboI	37	PA 8%	3, 257, 336, 354, 474	3, 234, 240, 257, 336 , 354
ZP	g195T>C	-	LD1	PROM-R	488	TasI	65	A 2%	269, 219	488
ZP	g283 284insG	-	LD1	PROM-R	488	TaaI	65	A 2%	53, 82, 146, 207	83, 146, 261

Tabla 3: Cortes con enzímas de restricción para las variantes noveles halladas

E: Exón; I: Intrón; ZP: Zona Promotora; ER: Enzima de restricción; T^o: temperatura de restricción; A: agarosa; PA: Poliacrilamida. *: Los cortes con enzimas de restricción para estas mutaciones se realizaron con la colaboración de la Bioquímica Bárbara Casali. En todos los casos, los geles de agarosa se revelaron con bromuro de etidio y los de poliacrilamida se tiñeron en plata (Ver ANEXO 4).

Asimismo y para validar la presencia (o no) de las mutaciones en *trans*, se utilizó una alícuota del ADN del paciente HSC 552, que poseía las mutaciones p.V281L/p.I172N (p.I172N se ubica en el exón 4). En este paciente se determinó que ambas mutaciones se ubicaban en *trans* mediante el estudio de los ADNs parentales. Asimismo se incluyeron muestras de ADNs de pacientes homocigotas p.V281L y homocigotas salvajes como controles de especificidad de las PCRs.

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron:

- a) Desnaturalización: 94 °C 2'
- b) 94 °C 30" 58°C 30" 72 °C 1' 30 ciclos
 - c) Extensión: 72 C° 5'

El resultado del ciclado se chequeó en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, en presencia de un marcador de peso molecular de 250 pb. El tamaño esperado para este fragmento era de 981 pb. El producto de la reacción amplificación se envió al servicio de secuenciación para determinar en qué alelo se encontraba la mutación p.R149C, si en aquel que fuera amplificado con el cebador para la secuencia salvaje 281V o la mutada 281L. Los fragmentos obtenidos de la muestra HSC 552 se secuenciaron en paralelo.

MUTACIÓN p.E431K

En la paciente con la mutación p.E431K se hallaron además las mutaciones p.D322G y p.V281L en heterocigosis. Para esta PCR alelo específica se utilizó el fragmento 3' como molde y los cebadores LD4 y Val-wtF para amplificar el alelo salvaje V281 y LD4 y Val-mutF para amplificar el alelo mutado L281 (**Tabla 1**).

Se prepararon dos mezclas de reacción, que diferían sólo en el cebador específico: Val-wtF o Val-mutF, respectivamente.

Como control se utilizó el ADN del paciente HSC 523, que poseía las mutaciones p.V281L/p.P453S (esta última mutación en el exón 10) en *trans*. De igual manera que en el caso anterior, la presencia de ambas mutaciones en *trans* fue establecida a partir del análisis de los ADNs parentales.

La mezcla de reacción y las condiciones de ciclado utilizadas fueron iguales a las de la PCR anterior pero para esta última se utilizó una temperatura de *annealing* de 62°C.

El fragmento de amplificación se chequeó en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio en presencia de un marcador de peso molecular de 250 pb. El tamaño esperado del fragmento era de 1112 pb. Luego, el producto de la reacción se envió al servicio de secuenciación para determinar en qué alelo se encontraban las mutaciones p.E431K y p.D322G, si en aquel que fue amplificado con el cebador para la secuencia salvaje V281 o la mutada L281. Los productos de amplificación de la paciente HSC 523 se secuenciaron en paralelo.

MUTACIÓN c.652-2A>G

Esta mutación en el intrón 5 se la halló en una paciente que poseía también la mutación poco frecuente p.R483Q.

Se realizaron 2 PCRs alelo específicas a partir de los fragmentos 3' generados en la primera ronda de amplificación diferencial del gen para esta paciente.

Para la primer PCR alelo específica, se utilizaron los cebadores LD7- R483Q-wt para amplificar el alelo salvaje R483 y LD7- R483Q-mut para amplificar el alelo con la mutación Q483 (**Tabla 1**).

69

Se prepararon dos mezclas de reacción, que diferían sólo en el cebador específico: R483Q-wt o R483Q-mut, respectivamente.

.Las mezclas de reacción, al igual que las condiciones de ciclado utilizadas, son las mismas que para la PCR alelo específica anterior, pero con una temperatura de *annealing* de 70°C. Los fragmentos amplificados se chequearon en geles de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, en presencia de un marcador de peso molecular de 250 pb. El tamaño esperado de los fragmentos era de 1991 pb.

Los productos obtenidos con ambas mezclas de reacción en la PCR alelo específica se digirieron con la enzíma BtgI (utilizada para chequear los 50 controles de la población general para esta mutación) en las mismas condiciones mencionadas en la sección I1.1.3.6 de este capítulo. Para el alelo que poseía la mutación del intrón 5 se esperaban fragmentos de 936, 537, 434 y 84 pb, mientras que para el alelo con la secuencia salvaje se esperaban fragmentos de 971, 936 y 84 pb. En este caso no fue posible utilizar otros ADNs a modo de controles positivos de alguna de las mutaciones, dado que ningún otro paciente de nuestra cohorte poseía ninguna de las dos mutaciones en estudio. Sin embargo, se incluyeron muestras de ADNs sin mutaciones a modo de especificidad de amplificación del alelo salvaje R483 y ausencia de amplificación en caso de utilizar el cebador para el alelo mutado Q483.

Para la segunda PCR alelo específica se utilizaron los cebadores LD4 e I5-wt para amplificar el alelo salvaje c.652-2A y LD4 e I5-mut para amplificar el alelo con la mutación c.652-2G (**Tabla 1**). Se prepararon dos mezclas de reacción, que diferían sólo en el cebador específico: I5-wt o I5-mut, respectivamente. Las mezclas de reacción y las condiciones de ciclado utilizadas fueron las mismas que para la PCR alelo específica de la mutación p.E431K. No se incluyeron ADNs controles, excepto aquellos que pudieran servir para verificar amplificación del alelo salvaje en el intrón 5 y ausencia de amplificación en caso de utilizar el cebador mutado.

Los productos de la reacción se enviaron al servicio de secuenciación para determinar en qué alelo se hallaba la mutación p.R483Q, si en aquel amplificado con el cebador para la secuencia salvaje del intrón 5 o en aquel amplificado con el cebador para la secuencia mutada.

I1I.1.3.6. ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS HLA

En 3 pacientes que poseían la mutación novel p.M283V se realizó la tipificación de los haplotipos de *HLA* con el fin de evaluar si el evento se correspondía con un posible efecto fundador. Para este estudio, las muestras de ADN de las pacientes se enviaron al laboratorio de Inmunogenética del Hospital de Clínicas, José de San Martín, CABA. El estudio se realizó con el kit HLA Olerup SSP, mediante PCR-SSP multiplex, que analiza los genes de *HLA*-A, *HLA*-B y *HLA*-DR.

III.1.4. ANÁLISIS IN SILICO DE LAS VARIANTES NOVELES HALLADAS

Con el fin de estimar si los cambios noveles hallados podrían representar variantes potencialmente patogénicas, se realizó un análisis *in silico* mediante diferentes abordajes bioinformáticos.

III.1.4.1. VARIANTES EN REGIONES CODIFICANTES

Con el fin de evaluar si los cambios que se correspondían con residuos aminoacídicos se hallaban en regiones conservadas de la proteína P450c21, se comparó la secuencia proteica de diferentes mamíferos mediante el programa ClustalW (<u>http://www.genome.jp/tools</u>/clustalw/) que permite el alineamiento de multiples secuencias. Las secuencias elegidas correspondieron a las especies Homo sapiens (GI:14550409), Macaca mulatta

(GI:109070559), Sus scrofa (GI:55742758), Bos taurus (GI:61888872), Canis lupus familiaris (GI:55742762), Equs caballus (GI:149732361), Mus musculus (GI:160948604)y Rattus novergicus (GI:259906405).

III.1.4.2. VARIANTES EN INTRONES

Para analizar el posible efecto de los cambios noveles hallados en los intrones del gen *CYP21A2* sobre el mecanismo de *splicing*, se utilizó la herramienta bioinformática *Human splicing finder* (*HSF*) V.2.4.1 (Desmet y col., 2009). Este programa predice el efecto de mutaciones sobre sitios consenso de *splicing* y analiza también la presencia de motivos potencialmente implicados en este mecanismo en cualquier secuencia de ADN humano. El *HSF* brinda un valor consenso (VC) para cada sitio aceptor o donor de *splicing*. A partir del análisis de 400.000 sitios salvajes, el *HSF* recomienda considerar como sitio aceptor o donor fuerte de *splicing* cuando su VC es superior al 80% (Desmet y col., 2009). A su vez, cuando una mutación afecta directamente el VC, es importante considerar también el Δ VC entre la secuencia salvaje y la secuencia mutante. El *HSF*, luego de validar este algoritmo con 69 mutaciones, considera que un Δ VC superior a 10% significaría que la mutación en estudio afecta drásticamente el sitio de *splicing*.

Por lo tanto, en nuestro análisis se consideró un umbral del 80% en el valor consenso (VC) para estimar un sitio como posible sitio críptico de *splicing*. A su vez se consideró que si una mutación provocaba una reducción en el VC (Δ VC) de al menos un 10%, el cambio producido implicaría un impacto significativo en el *splicing*.

OBJETIVO 2: Simular, mediante programas de modelado molecular, las posibles implicancias biológicas de las mutaciones noveles halladas en regiones codificantes

III.2.1 MODELADO MOLECULAR

La posible relevancia clínica de las mutaciones halladas en la región codificante se evaluó mediante modelado molecular *in silico*. Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Alejandro Nadra, FCEN, UBA.

Dado que la proteína CYP21A2 humana no está cristalizada, en primer lugar, se llevó a cabo un modelado de homología semiautomático con Biskit *suites* (Grunberg y col., 2007), que utiliza al programa Modellerv91 como herramienta de modelado. Para ello, se utilizaron 18 plantillas o templados de otras CYP21 ya cristalizadas (**Tabla 4**) obtenidos a partir de la base de datos de proteínas PDB (<u>http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do</u>).

Tabla 4: Plantillas de diferentes CYP seleccionadas para generar el modelado deP450c21humana

PLANTILLA O TEMPLADO	СҮР	ORGANISMO	IDENTIDAD DE SECUENCIA CON P450c21(%)
1CPT_A	CYP-TERP	Pseudomonas sp.	28
1IO7_B	CYP119	Sulfolobus solfataricus	30
1UE8_A	hipotética	Sulfolobus tokodaii	30
1JFB_A	CYP55A1	Fusarium oxisporum	22
1LFK_A	CYP-OXIB	Amicolatopsis orientalis	24
1NR6_A	CYP2C5	Oryctolagus caniculus	31
1PQ2_B	CYP2C8	Homo sapiens	29
1R90_A	CYP2C9	Homo sapiens	29
1PO5_A	CYP2B4	Oryctolagus caniculus	28
1TQN_A	CYP3A4	Homo sapiens	24
1X8V_A	CYP51	Mycobacterium tuberculosis	25
2CD8_B	CYP107L1	Streptomyces venezuelae	30
2F9Q_D	CYP2D6	Homo sapiens	31
2FDV_D	CYP2A6	Homo sapiens	27
2FR7_A	CYP199A2	Rhodopseudomonas palustris	30
2HI4_A	CYP1A2	Homo sapiens	28
2IJ2_B	CYPBM3	Bacillus megaterium	26
2OJD_B	CYP2R1	Homo sapiens	30

El programa analiza las diferentes plantillas teniendo en cuenta su secuencia y su estructura y selecciona aquellas que son similares. Con los archivos PDB seleccionados, se genera un alineamiento y a partir del mismo varios modelos de la proteína en estudio. El programa le asigna un valor DOPE a cada modelo (que indica la calidad del modelo y la energía del mismo) y selecciona el de menor valor de energía. Una vez obtenido el mejor modelo, se utilizó el programa Foldx 3.0 beta (www.foldx.crg.es) como herramienta para generar las mutaciones puntuales y analizar los cambios que las misma producían en la estabilidad de la proteína. El programa FoldX es ampliamente utilizado para analizar cuantitativamente el efecto de mutaciones en la estructura/estabilidad de proteínas (Schymkowitz y col., 2005). La versión actual de FoldX no admite la presencia de grupos HEMO en la proteína, por lo que las mutaciones que involucren contactos directos con éste, fueron evaluadas sólo cualitativamente.

La mutagénesis *in silico* se llevó a cabo utilizando el comando BuildModel FoldX. La estabilidad se calculó utilizando el comando de estabilidad y las diferencias de dichas energías (expresadas como $\Delta\Delta G$) se calcularon restando la energía de la proteína salvaje a la obtenida para cada mutante. Se utilizó un umbral de $\Delta\Delta G$ de 1,6 kcal/mol que corresponde a dos veces la desviación estándar calculada con el programa FoldX. Valores superiores a este umbral fueron considerados como significativamente desestabilizantes de la proteína (Schymkowitz y col., 2005).

A los efectos de validar el modelo y la posible implicancia de las mutaciones noveles en la estabilidad de la proteína, inicialmente y a modo de referencia, se ensayaron 40 mutaciones puntuales cuyas actividades residuales (AR) *in vitro* ya habían sido descriptas en la literatura. Para cada una de estas mutantes se calculó la estabilidad mediante el programa FoldX y se realizó una correlación entre la estabilidad calculada y la AR reportada. A su vez, se

analizaron las mutaciones noveles y las 40 ya descriptas con otro modelo tridimensional 2GEG (PDB ID: 2GEG, Robins y col., 2006). Cada mutación se ensayó cinco veces con ambos modelos (Biskit y 2GEG) y los resultados se expresaron como la media del $\Delta\Delta G \pm$ las desviaciones estándar.

OBJETIVO 3: Analizar la expresión *in vitro* de mutaciones noveles halladas

III.3.1. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS MUTACIONES NOVELES EN REGIONES CODIFICANTES DEL GEN *CYP21A2*

III.3.1.1. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

A los efectos de estimar las implicancias biológicas de las mutaciones noveles halladas en los pacientes en la región codificante del *CYP21A2*, se realizaron ensayos de expresión y de actividad de las proteínas mutantes *in vitro*.

Para tal fin, las diferentes mutantes se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida sobre la secuencia del ADN copia (ADNc) del gen *CYP21A2* clonada en un vector de expresión pCMV4 (gentilmente cedido por la Dra. Wedell, Karolinska Institute, Suecia) (Nikoshko y col., 1997), utilizando un kit comercial (*QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis*, Stratagene). El inserto posee una longitud total de 2746 pb que incluye a toda la secuencia que se traduce a proteína, 10 nucléotidos (nt) del extremo 5′ no codificante y 28 nt del 3′ no codificante. El vector, a su vez posee resistencia a ampicilina (**Figura 17**).

Para cada reacción de mutagénesis dirigida se diseñaron cebadores específicos conteniendo la mutación a testear de acuerdo a las especificaciones del fabricante del kit. Asimismo, se generó una mutante que contenía la mutación p.I172N que posee una actividad residual de P450c21 de aproximadamente 2% y está asociada a la forma VS de la patología (Tusie-Luna y col., 1990). Esta construcción se utilizó como un control de baja actividad enzimática

residual. En una paciente, la mutación novel p.E431K se halló en el mismo alelo con la mutación p.D322G (ver sección Resultados apartado IV.1.3.). Por lo tanto, además de mutagenizar el vector con las mutantes en forma aislada, se obtuvo también la doble mutante. En este caso, se utilizaron los 2 cebadores (cada uno con la mutación correspondiente) en la misma orientación.

Las secuencias de los cebadores utilizados se detallan en la **Tabla 1** y son aquellos que se denominaron R132C, R149C, M283V, D322G, E431K e I172N.

Figura 17: Vector pCMV4



El ADNc del gen CYP21A2 se encuentra clonado bajo el promotor de CMV.

Reacción de PCR para la mutagénesis dirigida

Condiciones (por tubo):

H₂O.....c.s.p. 25 μl.

Buffer 10X.....2,5 μl (conc. final 1X).

QuickSolution.....0,75µl².

Cebadores.....X µl (100 ng)

dNTPs.....1 μl.

² La composición de la *Quick solution* se desconoce, ya que no es revelada por el fabricante.

QuickChange enzyme $2,5U/\mu l \dots l \mu l$ (conc. final $0,1U/\mu l$).

ADN......Χ μl (100 ng).

Condiciones del ciclado: a) Desnaturalización: 95 °C 1´ b) 95 °C 1´ 55 °C 1´ 55 °C 1´ 65 °C 2´/Kb

Una vez finalizado el ciclado se colocó la reacción en hielo por 2'.

Digestión con DpnI de los productos de PCR

El objetivo de este paso es digerir la hebra parental no mutada del plásmido que se encuentra metilada. Este paso se realizó por digestión con la enzima DpnI que es sensible a metilación. Para ello, se agregó 1 µl de enzima (concentración. inicial 10 U/µl, concentración. final 0,4U/µl) directamente sobre el tubo de reacción (producto de PCR). Se mezcló durante 1 minuto y se incubó a 37°C durante una hora en baño termostático.

Transformación de bacterias ultracompetentes

Se alicuotaron en un tubo tipo eppendorf previamente enfriado, 45 μ l de bacterias *Escherichia coli* DH5 α ultracompetentes XL10-Gold provistas por el kit y se colocaron en hielo. Se agregaron 2 μ l de β -Mercapto-etanol, se agitó y se incubó en hielo durante 10 minutos con agitación cada 2 minutos. Pasado ese tiempo, se transfirieron 1,5 μ l del producto de PCR ya digerido con DpnI al tubo con las bacterias. Se mezcló y se incubó la reacción por 30 minutos en hielo.

Mientras tanto, se incubaron 500 µl por tubo de medio LB líquido (ANEXO 4) a 42°C. Pasada la media hora de incubación, se incubaron las bacterias a 42°C durante 30 segundos y luego 2 minutos en hielo. Se agregaron los 500 μl del LB pre-entibiado y se incubó la reacción a 37°C durante una hora con agitación de 225–250 rpm.

Se plaquearon 100 µl de la reacción sobre placas de LB agar (ANEXO 4) con ampicilina (100 µg de ampicilina/ml de LB agar final) y se incubaron a 37°C durante toda la noche sin agitación.

Al día siguiente, se picaron colonias en condiciones de esterilidad (con un escarbadientes o tip esteril) y se colocaron en tubos tipo Falcon de 15 ml conteniendo 3 ml de medio LB líquido. Se incubaron a 37°C durante toda la noche con agitación de 225-250 rpm. Pasado ese tiempo, se reservaron 850 µl de ese cultivo líquido con 150 µl de glicerol al 87% estéril a - 70°C (cepario) de manera de poseer las cepas transformadas en forma estable para posibles usos posteriores. Del resto del cultivo, se utilizaron 1,5 ml para extracción de plásmido mediante mini-prep y posterior secuenciación.

Extracción de plásmido por mini-prep

La alícuota de 1,5 ml del cultivo líquido se centrifugó a 12.000g durante 30⁻⁻⁻. El pellet se resuspendió en 100 µl de la Solución I (ANEXO 4) en hielo. Se agregaron 200 µl de la Solución II (ANEXO 4) y se mezcló por inversión. Se incubó el tubo en hielo durante 5 minutos y se agregaron 150 µl de la solución III (ANEXO 4), se agitó por inversión y se dejó 5 minutos en hielo. Se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente a 12000-130000g. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se agregaron 2 volúmenes de etanol 100%. Se mezcló por inversión y se dejó 2 minutos a temperatura ambiente. Se repitió la centrifugación de 5 minutos a temperatura ambiente a 12000-130000g y se volcó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 1 ml de etanol 70% y se centrifugó nuevamente. Luego de volcar el sobrenadante, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente hasta que el mismo se tornó transparente. Finalmente, se resuspendió el pellet que contenía al ADN

plasmídico en 50 μ l de H₂O destilada estéril, con agregado de RNAsa 20 μ g/ml (1 μ l por reacción, concentración final 0,4 μ g/ml).

Secuenciación

A los efectos de verificar que sólo la mutación deseada estaba presente, los vectores purificados se enviaron al servicio de secuenciación. Los cebadores utilizados para la secuenciación fueron el LD2, LD6, LD33, LD13 y LD38 (**Tabla 1**) que abarcaron el inserto en toda su longitud. Una vez que se confirmó la presencia de sólo la mutación deseada (y la ausencia de otras), se procedió a realizar una midi-prep para obtener suficiente masa del vector mutagenizado para los ensayos posteriores de transfección celular.

Extracción de plásmido por midi-prep

Para la extracción del plásmido por midi-prep se utilizó el kit Nucleobond Xtra Midi Plus, de Macherey-Naguel. Para tal fin, se realizó un cultivo líquido en 200 ml de LB líquidoampicilina (0,5µl de ampicilina por ml de LB, concentración final 100 µg/ml) con las bacterias que poseían la mutación de interés a partir del cepario almacenado a -70°C. Se dejó crecer el cultivo toda la noche a 37°C con agitación de 225-250 rpm.

El cultivo se centrifugó durante 15 minutos a 4500-6000g y el pellet obtenido se resuspendió en 16 ml de buffer RES que posee RNAsa A. Luego las bacterias se lisaron con el agregado de 16 ml de buffer LYS, que contiene OHNa y SDS. El lisado se neutralizó con el agregado de 16 ml de buffer NEU, que contiene acetato de potasio. Se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos en hielo.

El lisado se filtró a través de la columna provista por el kit. Previo al filtrado, la columna se equilibró con 12 ml de buffer EQU para eliminar los residuos que puedan estar presentes en la membrana de la misma. Previo a la obtención del ADN plasmídico, se realizó un paso de retención de la fase que posee el ADN cromosómico desnaturalizado mediante un pasaje en

un papel de filtro que se agrega en la columna. Se realizó un lavado con 5 ml de buffer EQU del papel de filtro y se descartaron tanto el líquido del lavado como lo retenido en el papel. La columna se lavó con 8 ml de buffer WASH, y luego el plásmido retenido en la membrana se eluyó con 5 ml de buffer ELU³ en un tubo tipo Falcon de 15 ml. Se agregaron 3,5 ml de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. La solución se filtró por un filtro provisto por el kit. El filtro se lavó con 2 ml de etanol 70% y se dejó secar. El plásmido se eluyó con 200 μ l de buffer TRIS 1M en un tubo eppendorf de 1,5 ml. La concentración de plásmido se cuantificó por espectrofotometría 260/280 nm.

III.3.1.2 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS COS-7

Los vectores mutagenizados y purificados por midi-prep se transfectaron transitoriamente en células COS-7 (células de riñón de mono verde africano, $\text{ATCC}^{\textcircled{B}}$ CRL-1651TM) que no expresan P450c21 endógena. Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo con todas las variantes mutagenizadas así como con el vector salvaje o Wild Type (WT) y con el vector sin inserto (*mock*).

Las células COS-7 se crecieron en frascos T75 con medio DMEM-F12 con 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor) en estufa a 37°C con 5% de CO₂. Cuando las células estaban a un 80-90% de confluencia, se incubaron con tripsina–EDTA 1X (Invitrogen) durante 2 minutos a 37°C. La reacción se detuvo por el agregado de 2 ml de SFB. Las células se transfirieron a un tubo tipo Falcon de 15 ml, se centrifugaron a 1000 rpm y se resuspendieron en DMEM-F12.

Se plaquearon aproximadamente $1,6X10^5$ células en placas de 6 pocillos con 2 ml de DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB durante 24 hs. Pasado ese tiempo, se realizó un cambio de medio y se agregó la mezcla de transfección que contenía 100 µl de medio

³ Todos los buffers utilizados en esta reacción fueron provistos por el fabricante y su composición es desconocida.

DMEM-F12 con 1 µg de cada pCMV4-*CYP21A2* mutagenizado y 1 µg de un vector pSV-Gal que posee el gen codificante para β -galactosidasa, a los efectos de relativizar la eficiencia de la transfección y 4 µl de Fugene Trasfection HD (Roche). Se realizó una pre-incubación de la mezcla del vector con el Fugene a temperatura ambiente durante 15 minutos en tubos eppendorf de 1,5 ml previo al agregado a cada pocillo de la placa. Luego se incubó a 37°C durante 48 hs.

Cada mutante se ensayó por duplicado entre 2 y 4 experimentos diferentes y con vectores provenientes de diferentes colonias.

III.3.1.3. CROMATOGRAFÍA EN PLACA DELGADA (TLC)

Pasadas las 48 de la transfección, la actividad de la P450c21 se determinó mediante la medición de la tasa de conversión de [³H] progesterona y [³H] 17-OHP en [³H] desoxicorticosterona y [³H] 11-desoxicortisol, respectivamente (Perkin-Elmer). Para ello, se retiró el medio presente en cada pocillo de la placa que contenía la mezcla de transfección, y las células se incubaron durante 1 hora a 37°C con 500 µl de DMEM-F12 conteniendo 2 µM de progesterona o 17-OHP y 0,5µCi de los mismos sustratos marcados radioactivamente. Transcurrida la incubación, se recogieron los 500 µl del medio y los esteroides se extrajeron dos veces con 3 ml de cloruro de metileno frío y se evaporaron a sequedad. Las muestras se resuspendieron en 2-3 gotas de cloruro de metileno y se sembraron en placas de silica gel (Merck). Los sustratos y los productos se separaron por cromatografía en placa delgada o *TLC (Thin Layer Chromatography)* utilizando cloruro de metileno:acetona (70:10 v/v) como sistema disolvente. La separación se llevó a cabo durante 90 minutos aproximadamente. Las posiciones de 17-OHP, 11-desoxicortisol, progesterona y 11-desoxicorticosterona en la placa

para el sustrato y producto de cada muestra y la radiactividad se midió en un contador de centelleo DSA 1409 (Wallac Co). El líquido de centelleo para todas las muestras fue OptiPhase-Hi seguro 3 (Wallac Co). Las tasas de conversión de sustrato a producto para cada enzíma mutante se compararon con la de tipo salvaje (WT). La actividad enzimática se expresó como el porcentaje de conversión del sustrato en producto en comparación con el de las células transfectadas en paralelo con pCMV4-*CYP21A2* que codifica para la P450c21 de tipo salvaje, después de efectuar la corrección con la actividad de β -galactosidasa (ver medición de actividad de β -galactosidasa en apartado III3.1.4). En todos los casos, se realizó también un blanco de reacción en el que se incubaron las células en las mismas condiciones pero sin el agregado de los vectores mutantes y salvajes, El resultado obtenido para este blanco se restó a las demás mediciones obtenidas.

Los ensayos de TLC se realizaron en colaboración con la Dra. Nora Ceballos, FCEN, UBA.

III.3.1.4. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA

Para determinar la actividad de β -galactosidasa, se utilizó el kit *Beta-Galactosidase Enzyme Assay System* de Promega. Para ello, las placas de 6 pocillos con las células COS-7 adheridas se lavaron con buffer fosfato salino (PBS, ANEXO 4) y 400 µl de buffer de lisis provisto por el kit. Se dejó actuar durante 15 minutos en hielo y posteriormente se homogeneizó en el mismo pocillo. Los homogenatos se recolectaron y se centrifugaron durante 2 minutos a 4°C a 12.000g y el sobrenadante se transfirió a tubos limpios. Este lisado se utilizó tanto para determinar la actividad de β -galactosidasa, como para medir proteínas totales con el método de Bradford para los ensayos de *Western Blot* (ver apartado III.3.1.5).

Para el ensayo de β -galactosidasa, se tomaron 150 μ l del lisado y se le agregó la misma cantidad de *assay buffer* 2X provisto por el kit. Se mezcló por agitación y se incubó a 37°C

durante 30 minutos, momento en que la solución se tornó amarilla. La reacción se detuvo con el agregado de 500 µl de carbonato de sodio 1M y se midío la absorbancia a 420 nm.

Para realizar la conversión de esas lecturas de absorbancia a unidades enzimáticas, se realizó una curva de calibración con cantidades conocidas de β -galactosidasa provista por el kit y sus respectivas absorbancias. A partir de esta curva se extrapolaron los valores de unidades enzimáticas de acuerdo a la absorbancia de las muestras.

III.3.1.5. PROTEÍNAS TOTALES, ENSAYO DE BRADFORD

Para determinar la cantidad de proteínas totales presentes en el lisado, se realizó en primer lugar una curva de concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (*BSA*) como se muestra a continuación:

a) 800 μ l de agua destilada + 200 μ l de reactivo de Bradford (Conc. final de *BSA* 0 μ g/ ml).

b) 797,5 μ l de agua destilada + 2,5 μ l de *BSA* (1 μ g/ μ l) + 200 μ l de reactivo de Bradford (Conc. final de *BSA* 2,5 μ g/ ml).

c) 795 μ l de agua destilada + 5 μ l de *BSA* (1 μ g/ μ l) + 200 μ l de reactivo de Bradford (Conc. final de *BSA* 5 μ g/ ml).

d) 792,5 μ l de agua destilada + 7,5 μ l de *BSA* (1 μ g/ μ l) + 200 μ l de reactivo de Bradford (Conc. final de *BSA* 7,5 μ g/ ml).

Para cada una de las muestras de concentración desconocida se prepararon 2 tubos con 790 μ l de agua destilada, 10 μ l de muestra y 200 μ l de reactivo de Bradford. Se determinó la absorbancia a 595 nm y las concentraciones de las muestras se extrapolaron de la curva de calibración que se confeccionó con la *BSA*.

III.3.1.6. ENSAYO DE WESTERN BLOT (WB)

Con el objetivo de determinar los niveles de expresión de cada una de las mutantes, se mezclaron 23 g de proteínas provenientes del lisado celular de cada uno de los ensayos de

Capítulo III- Materiales y Métodos

transfección con buffer de craqueo 3X (ANEXO 4) y se hirvieron durante 1 min. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio al 10% (SDS-PAGE) (ANEXO 4) y se realizó la electroforesis a 200 V durante 1 hora en buffer de corrida (ANEXO 4). En una de las calles del gel se sembró el marcador de peso molecular *Full-range Amersham Rainbow Marker* que contiene proteínas en el rango de 12 a 225 kDa. Luego de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 100 V durante 1 hora en frío con buffer de transferencia (Ver ANEXO 4). Luego de la transferencia, la membrana se cortó a la altura de la banda de 52 kDa del marcador de peso molecular de peso molecular de transferencia (or sus respectivos anticuerpos. La actina posee un peso molecular de 44 kDa y la P450c21 de 55 kDa.

Luego de la transferencia y para la proteína P450c21, la membrana se bloqueó a 4°C en PBStween 0,2% (Ver ANEXO 4) con 5% de leche descremada en polvo en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego la membrana se incubó toda la noche a 4°C con una solución 1/30000 de antisuero antihumano policlonal de P450c21 de conejo (Ghayee y col., 2011) en la misma solución de bloqueo. El antisuero anti P450CYP21 humana fue gentilmente cedido por el Dr. W. Miller, de la Universidad de San Francisco, San Francisco, California, USA, y reconoce la región C-terminal de la proteína desde el aminoácido 265 al 494.

Para la β-actina, la membrana se bloqueó en la misma solución de bloqueo que se describió anteriormente seguida por la incubación con una dilución 1/800 del anticuerpo de ratón anti β-actina (Santa Cruz) durante toda la noche a 4°C en PBS-tween 0,2%. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos anti-conejo 1/4000 (Vector Lab) o anti-ratón 1/4000 (Santa Cruz) conjugados con peroxidasa disueltos en PBS en suero de caballo al 3%. Las bandas inmunopositivas se detectaron utilizando luminol 1,25 mM, ácido cumárico 0,198

84

mM y peróxido de hidrógeno 0,038 % v/v en buffer Tris-HCl 100 mM. El análisis densitométrico de las bandas correspondientes se realizó con el programa ImageGauge (Fuji Photo Film Co., LTD, Altura Software Inc). Se analizaron al menos dos extractos diferentes para cada mutante y para la secuencia salvaje y cada uno de ellos fue procesado dos veces. Los niveles de proteína de las diferentes construcciones de CYP21A2 se expresaron como la relación entre CYP21A2 y β -actina teniendo en cuenta la actividad β -galactosidasa como control de eficiencia de transfección. Para la cuantificación, se restó la expresión proveniente de las transfecciones con el vector sin inserto (*mock*).

III.3.2 ANÁLISIS DE MUTACIONES EN REGIONES NO CODIFICANTES

III.3.2.1. CONSTRUCCIÓN DE UN MINIGEN PARA LOS ENSAYOS FUNCIONALES

Para el estudio de la mutación c.652-2A>G, se construyó un minigén con un fragmento que abarcaba desde el exón 4 al exón 7 del gen *CYP21A2* (nt 1006 al 1742), clonado en el vector Psved EDV Hho bajo el promotor de α -globina e interrumpiendo el exón 3 del gen de α -globina luego del nucleótido 24 de dicho exón (**Figura 18**).

Para tal fin, luego de la primera ronda de amplificación diferencial el gen, se realizó una PCR anidada a partir del fragmento 3' para amplificar el fragmento a ser clonado en el vector. Se diseñaron cebadores que apareaban en el exón 4 y en el exón 7, sentido y antisentido respectivamente, que contenían además la secuencia consenso de corte para la enzima de restricción BstEII (Exón4-BstEII y Exón7-BstEII, **Tabla 1**).



Figura 18: Esquema representativo del vector Psved EVD Hho

 α -globina. Gb e1, Gb e2 y Gb e3: Exones 1, 2 y 3 de α -globina. El minigén fue clonado bajo el promotor de α -globina, interrumpiendo el exón 3 del gen de α -globina. El sitio de corte se muestra recuadrado.

Reacción de amplificación de la PCR anidada del exón 4 al exón 7

Condiciones por tubo:

H₂O.....csp 25 µl.

Buffer 10X.....2,5 μl (conc. final 1X).

MgCl₂ 50mM.....1µl (conc. final 2mM)

Cebadores 20 μ M.....0,4 μ l x 2 (conc. final de cada uno 0,32 μ M)

dNTPs 10mM.....0,5 µl (conc. final 0,2 mM)

Taq DNA pol 5U/ μ l.....0,15 μ l (conc. final 0,03 U/ μ l)

ADN.....5,5 μl.

El producto de amplificación se chequeó en gel de agarosa 1%. El tamaño del fragmento esperado era de 757 pb.

Digestión con BstEII

El producto amplificado y el plásmido Psved EDV Hho se digirieron por separado con la enzima de restricción BstEII durante 2 horas a 60°C.

Condiciones de la digestión (por tubo de reacción):

H₂O.....csp..100 µl

Buffer 10X.....10 µl (conc. final 1X)

Enzima 10U/µ1.....3 µl (conc. final 0,3U/µl)

ADN......3µl

El producto de digestión se chequeó en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio, luego se purificó y cuantificó como se mencionó en la sección II.1.3.3 de este capítulo.

Adición de grupo fosfato en el vector Psved EDV Hho

Para evitar que el vector digerido se re-ligue, se realizó la adición de grupo fosfato al mismo

utilizando para ello la enzima fosfatasa alcalina (SAP).

Condiciones por tubo de reacción:

Buffer 10X......2µl (conc. final 1x)

Vector digerido....17µl

SAP $1U/\mu l....1\mu l$ (conc. final 0,05U/ μl)

Se incubó 1 hora a 37°C y luego 15 minutos a 80°C.

Reacción de ligación

Se realizó la reacción de ligación con el inserto digerido (aproximadamente 800 pb) y el vector (5000 pb) digerido y tratado con fosfatasa. Se utilizó una relación de masa vector:inserto 1:1 (800/5000=0,16; 75 ng de vector y 12 ng de inserto).

 $H_2O....csp 10 \ \mu l$

Bufer 10X.....1µl (conc. final 1X)

Ligasa $3U/\mu$ l.... 3μ l (conc. final $0.9U/\mu$ l)

ATP 10mM.....1µl (conc. final 1 mM)

Plásmido.....X µl (75 ng)

Inserto..... X μ l (12 ng)

Se incubó a 37°C durante 3 horas.

Con el producto de la ligación se transformaron bacterias *E. coli* DH5a competentes que se obtuvieron de acuerdo al protocolo que se detalla más abajo.

El protocolo de transformación de las bacterias competente es esencialmente igual al que se describió en la sección II.3.1.1 de este capítulo, con la diferencia que las bacterias ya transformadas se crecieron en placas de LB-agar con tetraciclina 10µg/ml. Luego se realizaron mini-preps con el kit *Purelink quick plasmid miniprep kit*, de Invitrogen.

Los plásmidos obtenidos se enviaron a secuenciar para verificar si el inserto clonado correspondía a la secuencia del alelo salvaje o al alelo con la mutación c.652-2A>G. Para tal fin se utilizaron los cebadores AlfaGli1F y pSVcDNA, que se ubican sobre el exón 2 y 3 del gen de α -globina, respectivamente (**Tabla 1**). Dichos plásmidos fueron utilizados luego para ensayos de transfección (sección II.3.2.2.).

Preparación de bacterias competentes

A partir de un stock de bacterias competentes guardadas a -70°C, se realizó un cultivo líquido en 2 ml de LB líquido (Ver ANEXO 4) y se incubó toda la noche a 37°C. Al otro día, se sembraron 100 µl en una placa de LB agar (Ver ANEXO 4). Se incubó la placa durante 16-20 horas a 37°C. Luego, se picó una única colonia bacteriana (2-3 mm de diámetro) y se transfirió la colonia en 25 ml de LB líquido en un matraz de 250 ml. Se incubó el cultivo durante 6-8 horas a 37°C con agitación vigorosa (250-300 rpm). Transcurrido ese tiempo, se utilizó ese cultivo iniciador para inocular tres matraces de 1 litro, que contenían 250 ml de LB cada uno. Al primer matraz se le agregó 10 ml de cultivo iniciador, al segundo 4 ml y al tercero 2 ml. Se incubaron los tres frascos durante toda la noche a 18-22 ° C con agitación moderada.

A la mañana siguiente, se midió la densidad óptica (OD) a 600 nm de los tres cultivos. Se continuó controlando la OD cada 45 minutos. Cuando la OD600 de uno de los cultivos alcanzó 0,55, se transfirió el matraz a hielo durante 10 minutos. Los otros cultivos se desecharon.

Se centrifugaron las células a 2500g durante 10 minutos a 4 ° C. Se descartó el sobrenadante de manera que no quede ni una gota de medio en las paredes del frasco. Se resuspendieron las células suavemente por agitación en 80 ml de buffer de transformación (ver ANEXO 4) enfriado con hielo. Se centrifugaron las células a 2500g durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 2 minutos.

Se resuspendieron las células suavemente en 20 ml de buffer de transformación enfriado. Se agregaron 1,5 ml de DMSO. Se mezcló la suspensión bacteriana y se dejó en hielo 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se alicuotó la suspensión con rapidez y se congeló.

III.3.2.2. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HEK-293, HELA E Y-1

Los plásmidos que contenían el fragmento correspondiente al alelo con la secuencia salvaje en el intrón 5 así como aquellos que contenían el fragmento correspondiente al alelo mutado se transfectaron por separado en células HEK-293 (ATCC[®] CRL-1573 TM) HeLa (ATCC[®] CCL-2 TM) e Y-1 (ATCC[®] CCL-79 TM).

Las 3 líneas celulares se crecieron en frascos T75 en sus medios correspondientes (HEK-293: DMEM alta glucosa con piruvato; HeLa: DMEM alta glucosa; Y-1: HAM-F10) en estufa a 37°C con 5% de CO₂. Cuando las células estaban a un 80-90% de confluencia, se incubaron con tripsina–EDTA 1X (Invitrogen) durante 2 minutos a 37°C. La reacción se inhibió por el

agregado de 2 ml de SFB. Las células se transfirieron a un tubo tipo Falcon de 15 ml, se centrifugaron a 1000 rpm y se resuspendieron en medio de cultivo.

Para las células HEK-293 y HeLa, se sembraron aproximadamente 2 x 10^5 células en una placa de 12 pocillos que contenía medio DMEM con alta glucosa (Invitrogen), con o sin piruvato respectivamente, suplementado con suero fetal bovino (Natocor) al 10% y los antibióticos penicilina-estreptomicina a 10 mg/l. Después de 24 horas, los cultivos de células se transfectaron con 2 µg de ADN (200 ng de la construcción y el resto del plásmido pBlueScript, que fue usado como vehículo) utilizando 3 µl Lipofectamine (Invitrogen) por pocillo. Las células transfectadas se recogieron 48 horas después de la transfección.

Para las células Y-1, se sembraron aproximadamente 5 x 10^4 células en una placa de 24 pocillos que contenía medio HAM-F10 suplementado con 2.5% de suero fetal bovino, 12,5% de suero de caballo (BD) y los antibióticos de penicilina-estreptomicina a 10 mg/l. Después de 48 horas, los cultivos fueron transfectados con Fugene HD Transfection (Roche) en una relación 2 µl/µg de ADN (200 ng del minigen y el resto del plásmido pBlueScript, que fue usado como vehículo). Las células transfectadas se recogieron 48 horas después de la transfección.

III.3.2.3 EXTRACCIÓN DE ARN

Luego de 48 horas con la mezcla de trasnfección, se eliminó el medio de los pocillos de la placa y se agregaron 200 µl de Trizol (Molecular Research Center). Se dejó actuar 5 minutos a temperatura ambiente. Se homogenizó y dicho homogenato se colocó en un eppendorf limpio al que se le agregaron 30 µl de cloroformo. Se mezcló durante 15 segundos y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000g durante 15 minutos a 4°C. Se extrajo la fase acuosa, se transfirió a un tubo limpio y se le agregaron 75 µl de isopropanol 100%. Se dejó actuar 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 10

minutos para que precipite el ARN, se eliminó el sobrenadante y al pellet se le agregaron 150 μ l de etanol 70%. Se centrifugó a 7500g durante 5 minutos. Se dejó secar el pellet durante 10 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 μ l de agua destilada libre de RNAsa, Se incubó a -80°C durante 10 minutos y luego a 60°C durante 10 minutos más.

III.3.2.4. RT-PCR

Para obtener el ADNc a partir del ARN, se prepararon 2 mezclas de reacción en paralelo:

Mezcla 1: Condiciones por tubo

Oligo dT 50ng/µl.....1µl (conc. final 2,5 ng/µl)

dNTPs 10Mm.....1µl (conc. final 0,5mM)

ARN......Χμl (2 μg)

H₂O.....csp 8µl

Se incubó la mezcla 1 durante 5 minutos a 65°C.

Mezcla 2: Condiciones por tubo

Buffer 5X......4µl (conc. final 1X)

Ditiotreitol (DTT) 100Mm......2µl (conc. final 10mM)

Enzíma MMLV-RT ⁴100U/µl......1µl (conc. final 5U/µl)

RNAsa OUT⁵ 40U/ μ l.....1 μ l (conc. final 2U/ μ l)

H₂0......4µl

Se mezclaron las preparaciones 1 y 2 (volumen final 20 $\mu l)$ y se incubaron 1 hora a 37°C $\,$ y

luego 10 minutos a 75°C.

⁴ Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney (Invitrogen).

⁵ Inhibidor de ribonucleasas.
El ADNc se amplificó por PCR usando cebadores que apareaban en las zonas de empalme entre el inserto de *CYP21A2* y el vector de clonado. Los cebadores utilizados fueron CDNAF y CDNAR (**Tabla 1**).

Condición por tubo:

 H_2O16 µl.

Buffer 10X.....2,5 µl (conc. final 1X)

MgCl₂ 50mM......1µl (conc. final 2mM)

Cebadores 20 µM.....0,4 µl x 2 (conc. final de cada uno 0,32µM)

dNTPs 10mM.....0,5 µl (conc. final 0,2mM)

Taq DNA pol 5U/μ1.....0,15 μl (conc. final 0,03U/μl)

 $[\alpha^{32}-P]dCTP$ 0,5 µCi

ADNc......4 µl

Condiciones del ciclado:

a) Desnaturalización: 94°C 40"

b) 94 °C 45
$$\sim$$

68 °C 30 \sim
72 °C 1 \sim
30 ciclos

c) Extensión: 72°C 7'

El producto de PCR se visualizó en un gel de poliacrilamida 6% y se reveló por autorradiografía con soluciones comerciales de Kodak (*Medical x-ray, Fixer y developer*). Para el producto del minigén que hubiera sufrido un *splicing* normal, se esperaba un tamaño aproximado de 419 pb. El tamaño estimado para el fragmento amplificado sin *splicing* era de 773 pb.

Una alícuota del producto de una PCR no radioactiva de cada uno de los minigenes que contienen el fragmento procesado proveniente del alelo mutado o del alelo salvaje, fue enviada al servicio de secuenciación. Para la secuenciación se utilizaron los cebadores CDNAF y CDNAR (**Tabla 1**).

Esta parte del proyecto fue realizada en colaboración con la Lic. Luciana Gómez Acuña, becaria del Dr. Alberto Kornblihtt, DFBMC-IFIBYNE, FCEN, UBA y CONICET.

OBJETIVO 4: Correlacionar el genotipo hallado en los pacientes con el fenotipo que exhiben

III.4.1. ANÁLISIS DE PARÁMETROS FENOTÌPICOS EN PACIENTES NO CLÁSICOS Y SU CORRELACIÓN CON EL GENOTIPO

A diferencia de lo que sucede con los pacientes que presentan la FC de la deficiencia de 21 hidroxilasa, en los pacientes FNC es muy común no llegar a establecer un genotipo con las dos mutaciones del gen *CYP21A2* que determinen que el paciente es efectivamente un individuo afectado de HSC. Por este motivo, para los pacientes de la FNC que fueron estudiados en nuestro laboratorio se decidió correlacionar los valores hormonales y la edad de aparición de la sintomatología con el genotipo hallado.

Se incluyeron 271 pacientes FNC del período comprendido 1998 al 2012 que cumplían con los criterios de inclusión y exclusión mencionados en el apartado II.1.1.1 de este capítulo. Para esta parte del trabajo se excluyeron 3 pacientes clasificados con genotipos inciertos (por ejemplo si no se podía determinar si eran homocigotas para una mutación leve o bien hemicigotas) y aquellos pacientes crípticos por no poseer sintomatología. Los pacientes incluidos se consignan en el ANEXO 3. El estudio de las 10 mutaciones más frecuentes del gen *CYP21A2* y de deleciones, conversiones y duplicaciones se realizó de acuerdo a lo consignado en el apartado III1.3.2 de este capítulo. En todos los casos en que fue posible, se estudiaron muestras de los padres de los pacientes. Para aquellos pacientes en que no se contaba con los ADNs parentales, a excepción de aquellos que poseían mutaciones noveles, y en caso de poseer 2 mutaciones, se asumió que las mismas se ubicaban en *trans*. En el caso de los pacientes con mutaciones noveles, y en caso de no contar con las muestras de los padres, de ser posible se realizaron PCRs alelo específicas para determinar si las mutaciones se encontraban en el mismo alelo o en alelos separados (apartado III1.3.7. de este capítulo).

Los pacientes fueron agrupados de acuerdo a su genotipo en:

1- Mutación leve en ambos alelos (L/L).

2- Mutación leve en un alelo y severa en otro (L/S).

3- Mutación leve en un alelo y ninguna en el otro (L/N).

4- Mutación severa en un alelo y ninguna en el otro (S/N).

5- Sin mutación en ambos alelos (N/N).

Para cada grupo se consignaron los valores hormonales de 17-OHP basal y post ACTH, DHEA-S, T y A. Todos los valores hormonales se consignaron en ng/ml. Por otro lado, se consignó para cada paciente la edad de aparición de la sintomatología.

Asimismo, 121 pacientes (ver ANEXO 3) se agruparon en intervalos de acuerdo a los valores de 17-OHP post ACTH que presentaban. Los intervalos fueron:

17-OHP post ACTH >10ng/ml ≤12,5ng/ml

17-OHP post ACTH >12,5 ng/ml \leq 17 ng/ml

17-OHP post ACTH >17 ng/ml ≤20 ng/ml

17-OHP post ACTH >20 ng/ml

Para cada grupo, se consignó la cantidad de pacientes que poseían ambos alelos mutados, o bien 1 o ninguno.

Análisis estadísticos

Todos los datos se analizaron por el test de Kruskal-Wallis seguido del Test de Dunns mediante el programa GraphPad Prism 6.0. Se consideró una diferencia significativa a una p<0.05.

III.4.2. CORRELACIÓN ENTRE EL FENOTIPO OBSERVADO Y EL ESPERADO DE ACUERDO AL GENOTIPO HALLADO PARA LOS PACIENTES CLÁSICOS Y NO CLÁSICOS DE NUESTRA COHORTE

Con el fin de establecer los fenotipos que presentaban los pacientes de acuerdo al genotipo hallado, se incluyeron 98 pacientes con la FC y 209 de los 271 con la FNC. Los criterios de inclusión y exclusión para cada paciente son iguales a los detallados en el apartado III.1.1.1, pero para esta parte del trabajo se excluyeron los pacientes que habiendo sido diagnosticados como HSC por déficit de 21-hidroxilasa no poseían los 2 alelos mutados, aquellos pacientes clasificados con genotipos inciertos (3 FNC y 3 FC) y aquellos que tuvieran más de 2 mutaciones en los cuales no se pudiera determinar en qué combinatoria se hallan las mismas y los pacientes crípticos por ausencia de sintomatología. Para cada genotipo hallado, se consideró cuantos pacientes presentaban la FNC, VS o PS.

-CAPÍTULO IV-RESULTADOS

Como se consignó anteriormente, en un trabajo previo de nuestro grupo se estimó la frecuencia de las 10 mutaciones más frecuentes del gen, aquellas que derivan del pseudogén, en pacientes afectados por deficiencia de 21-hidroxilasa de nuestra población (Dain *et al.*, 2002).

Para los pacientes en los que restaba determinar al menos un alelo, en este trabajo de tesis nos propusimos en una primera etapa realizar la búsqueda de mutaciones menos frecuentes o noveles en la región codificante del gen *CYP21A2* y en la región promotora basal del mismo.

OBJETIVO 1: Analizar las regiones codificantes, intrónicas y promotoras basales del gen CYP21A2 en pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa en los que restaba determinar al menos un alelo

Para esta parte del estudio se incluyeron 87 pacientes (15 de la FC y 72 FNC, ANEXO 1) con diagnóstico de HSC por déficit de 21-hidroxilasa. De los 15 pacientes de la FC, 9 (60%) eran de la forma perdedora de sal y 6 (40%) de la forma virilizante simple (**Figura 19**).



Figura 19: Pacientes incluidos para su secuenciación

PS: Perdedor de sal; VS: Virilizante simple; NC: No clásico

Luego del estudio de las 10 mutaciones más frecuentes, en 55 de los 87 pacientes (14 FC y 41 FNC) se había identificado la mutación en sólo un alelo, mientras que los 32 pacientes restantes no poseían mutaciones en ninguno de sus 2 alelos (1 FC y 31 FNC). En las muestras

de ADN de estos 87 pacientes, se analizó mediante secuenciación el gen *CYP21A2* en toda su extensión, así como su región promotora.

IV.1.1. SECUENCIACIÓN DEL GEN CYP21A2

Con el fin de secuenciar el gen y su región promotora, se realizó una primera ronda de amplificación diferencial del gen en 2 fragmentos solapados. Cada uno de estos fragmentos se utilizó en una segunda ronda de amplificación para obtener 4 fragmentos, 2 de cada uno de los templados iniciales. Los 4 fragmentos amplificados poseían además regiones que se superponían y se secuenciaron tanto en orientación sentido como antisentido (Materiales y Métodos, apartado III.1.3.1).

El análisis por secuenciación demostró la presencia de 12 mutaciones raras o menos frecuentes previamente descriptas por otros autores en 21 pacientes (8 PS, 5 VS y 8 FNC). Asimismo, se hallaron 10 variantes de secuencias que no fueron descriptas con anterioridad en 12 pacientes (2 PS, 1 VS y 9 FNC).

La **Figura 20** muestra los electroferogramas representativos de las 12 mutaciones menos frecuentes halladas en los pacientes de nuestra cohorte. La **Tabla 5** resume la cantidad de alelos en los cuales se hallaron estas mutaciones, así como con qué forma de presentación de la patología se relacionaría dicho alelo de acuerdo a la actividad residual (AR) de la enzíma mutante según la bibliografía.



Figura 20: Electroferogramas representativos de las 12 mutaciones poco frecuentes halladas en nuestros pacientes

A: g.1A>G (p.M1V); B: g.185A>T (p.H62L); C: g.2012A>G (p.D322G); D: g.2069G>T (p.R341P); E: g.2104G>A (p.R356Q); F: g.2501G>A (p.R426H); G: g.2554C>T (p.R444*); H: g.2660G>T (p.R479L); I: g.2668C>T (p.P482S); J: g.2671T>C (p.R483W); K: g.2672G>A (p.R483Q); L: g.2672delG (p.R483fs). Las flechas señalan el cambio hallado en cada caso. Las mutaciones g.1A>G (p.M1V), g.2660G>T (p.R479L) y g.2668C>T (p.P482S) se observan en homocigosis en los electroferogramas respectivos (A, H e I) dado que los pacientes 374, 233 y 586 (ver ANEXO 1) poseían la mutación Del 8pb (p.G110_Y112delfs) en el alelo homólogo que no amplifica al obtener el fragmento diferencial 3' del gen.

MUTACIÓN	CAMBIO AMINOÁCIDICO	N° DE ALELOS HALLADOS	TIPO DE ALELO	REFERENCIAS
g.1A>G	p. M1V	1	PS	Tardy, 2007
g.185A>T	p. H62L	1	NC	Ezquieta y col., 2002b
g.2012A>G	p.D322G	1	NC	Loidi y col., 2006
g.2069G>T	p.R341P	3	PS	Barbaro y col., 2006
g.2104G>A	p.R356Q	1	VS	Lajic y col., 1997
g.2501G>A	p.R426H	2	VS	Baumgartner-Parzer y col., 2001
g.2554C>T	p.R444*	4	PS	Loidi y col., 2006
g.2660G>T	p.R479L	1	NC	Zeng y col., 2004
g.2668C>T	p.P482S	3	NC	Balsamo y col., 2000
g.2671T>C	p.R483W	1	PS	Kharrat y col.,2004
g.2672G>A	p.R483Q	1	VS	Stikkelbroeck y col., 2003
g.2672delG	p.R483fs	3	PS	White y col., 1994
TOTAL ALELOS		22		

Tabla 5: Cantidad de alelos con mutaciones raras o poco frecuentes hallados y forma clínica para la cual codificarían.

PS: Perdedor de sal; VS: Virilizante simple; NC: No clásico

Por otro lado, de las 10 variantes de secuencia no descriptas previamente en la literatura, 6 se situaban en la región codificante, 2 en la zona promotora y 2 en intrones. La **Figura 21** muestra electroferogramas representativos de las variantes halladas y la **Tabla 6** resume la cantidad de alelos en los que se hallaron cada una de las mismas, así como la manifestación clínica de los pacientes.



Figura 21: Electroferogramas y ensayos de restricción representativos de las variantes noveles halladas en los pacientes de nuestra cohorte

Figura 21, continuación



Del lado izquierdo se presentan electroferogramas representativos de cada una de las mutaciones. Las flechas señalan el cambio hallado en cada caso. Del lado derecho se muestran electroforesis representativas de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (A, B, G, I y J) o geles de poliacrilamida teñidos con nitrato plata (C, D, E, F y H) de las diferentes mutaciones ensayadas por PCR y digeridas con enzimas de restricción. A: g.782C>T (p.R132C); B: g.940C>T (p.R149C); C: g.1695A>G (p.M283V); D: g.2515G>A (p.E431K); E: g.2511_2512delGG (p.L429fs); F: g.2620_2621insC (p.H466fs); G: g.1329A>G (c.652-2A>G); H: g.2202G>A (c.1116-34G>A); I: g.-195T>C; J: g.-283_-284insG. C: Controles; P: Pacientes con cada una de las mutaciones; M: Marcador de peso molecular de 50pb: C S/ER: Muestra control sin enzima de restricción. Nótese que la paciente con la variante g.-283_-284insG (J), presenta la misma en homocigosis.

VARIANTE	REGIÓN	CAMBIO QUE PRODUCE	N• DE ALELOS HALLADOS	FENOTIPO DE LOS PACIENTES
g.782C>T	Exón 3	p.R132C	1	NC
g.940C>T	Exón 4	p.R149C	1	NC
g.1695A>G	Exón 7	p.M283V	3	NC
g.2515G>A	Exón 10	p.E431K	1	NC
g.1329A>G	Sitio acceptor <i>splicing</i> intrón 5	c.652-2A>G	1	VS
g.2202G>A	g.2202G>A Intrón 8		2	NC
g.2511_2512delGG Exón 10		p.L429fs	1	PS
g.2620_2621insC	g.2620_2621insC Exón 10		1	PS
g195T>C Region Promotora			1	NC
g283284insG* Region Promotora			2	NC
TOTAL DE ALELOS			13*	

Tabla 6: Variantes noveles halladas en la muestra de 87 pacientes afectados con deficiencia de 21-hidroxilasa.

PS: Perdedor de sal; VS: Virilizante simple; NC: No clásico. *: La variante g.-283_284insG se hall en un único paciente pero en homocigosis, por tal motivo figuran 2 alelos. A su vez, la misma paciente presenta la variante g.-195T>C, por eso la sumatoria total de alelos es 13 y no 14. Los datos clínicos de dicha paciente, así como los valores hormonales se detallan en el ANEXO 2.

IV.1.2. BÚSQUEDA DE LAS VARIANTES NOVELES EN INDIVIDUOS DE LA POBLACIÓN GENERAL

A los efectos de determinar si las variantes noveles halladas se correspondían o no con cambios frecuentes del gen (potenciales polimorfismos), se analizaron muestras de ADN de 50 individuos de la población general (100 cromosomas).

Para esta parte del trabajo, luego de la primera ronda de amplificación diferencial del gen, la región de interés en la que se ubicaba cada una de las variantes se amplificó por PCR. Los productos obtenidos se digirieron con diferentes enzimas de restricción como se detalló en el capítulo de Materiales y Métodos (apartado III.1.3.4). El tamaño de los fragmentos esperados luego de la digestión enzimática tanto para los alelos salvajes como los mutados se resumen en la **Tabla 3** de Materiales y Métodos (apartado III.1.3.4.).

Capítulo IV- Resultados

En la **Figura 21** se muestran electroforesis en geles representativas de los resultados obtenidos. En todos los casos se incluyó también la muestra del paciente en la que se halló la mutación.

Nuestros resultados señalaron que ningún individuo de la población general presentaba las variantes de las regiones codificantes ni intrónicas (p.R132C, p.R149C, p.M283V, p.E431K, p.L429fs, p.H466fs, c.652-2A>G y c.1116-34G>A, **Figura 21**, A-H). Sin embargo, se hallaron individuos de la población general que presentaban las variantes de la región promotora. La variante g.-195T>C se halló en 3 de los 50 individuos analizados; uno de ellos presentaba la variante en homocigosis (calle 3, **Figura 21** I). Por otro lado, en 3 de 30 individuos analizados (2 de ellos se muestran en las calles 2 y 4 de la **Figura 21**, J) se halló la variante g.-283_284insG.

Teniendo en cuenta estos resultados, las 6 variantes en las secuencias codificantes y las 2 variantes que se ubicaban en intrones fueron *a priori* consideradas mutaciones cuyas implicancias en la patología deberían ser analizadas. Por su parte, las 2 variantes del promotor fueron consideradas, a los efectos de esta tesis, como polimorfismos y no se prosiguió con el estudio de las mismas.

IV.1.3. GENOTIPO, CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS DE LOS PACIENTES CON MUTACIONES NOVELES

La **Tabla 7** resume el fenotipo, genotipo y valores hormonales de los pacientes Clásicos y No Clásicos en los que se hallaron las variantes noveles consideradas *a priori* como mutaciones.

PACIENTE	SEXO	FENOTIPO	GENOTIPO	17-OHP BASAL	17-OHP POST ACTH	A	Т	DHEA-S
402	F	NC	p.R132C /N	3,6	34	ND	ND	ND
144	F	NC	p.V281L/ p.R149C	4	34	5,2	0,5	2860
11	F	NC	p.M283V /c.283- 13A/C>G/	ND	19	6,3	1,4	1600
327	F	NC	p.M283V /N	9,3	ND	ND	ND	640
664	F	NC	p.M283V /5` macroconv	20	ND	ND	ND	ND
149	F	NC	p.V281L/ p.E431K , p.D322G	16	ND	0,9	0,2 4	220
142	F	PS	p.I172N/ p.L429fs	10 ^a	ND	12, 4	1,6 4	1802
266	М	PS	c.283- 13A/C>G,p.Q318*/ p.H466fs [§]	6,6 ^a	ND	ND	ND	ND
28	F	VS	p.R483Q/ c.652- 2A>G	300	ND	25	3,2	1100
269	F	NC	c.1116-34G>A/N	6,6	ND	4,6	ND	ND
524	F	NC	c.1116-34G>A/N	6,8	47,7	ND	ND	ND

Tabla 7: Genotipo, fenotipo y valores hormonales de los pacientes que poseen las mutaciones noveles halladas

Las mutaciones noveles halladas se muestran en negrita. Los valores hormonales se expresan en ng/ml. NC: No clásico; PS: Perdedor de sal; VS: Virilizante simple; N: Alelo normal sin mutación; 5'macroconv: 5'macroconversión (p.P30L, c.283-13A/C>G y Del 8pb (p.G110_Y112delfs)). ND: No determinado §: Este paciente posee uno de sus alelos con el gen duplicado, por lo tanto posee 3 copias del mismo. a: Valores hormonales con tratamiento.

IV.1.3.1 MUTACIONES EN REGIONES CODIFICANTES

MUTACIÓN p.R132C:

La mutación g.782C>T, p.R132C, se halló en una paciente con diagnóstico de deficiencia de 21-hidroxilas FNC (Paciente 402). Los valores hormonales de la paciente se detallan en la **Tabla 7** y los datos clínicos de relevancia se detallan en el ANEXO 2. A pesar de poseer criterios de inclusión compatibles, no se detectó la presencia de ninguna otra mutación adicional en el gen *CYP21A2* en esta paciente.

MUTACIÓN p.R149C:

La mutación g.940C>T, p.R149C, se halló en una paciente de la FNC (Paciente 144) en heterocigosis compuesta con la mutación p.V281L. Los valores hormonales de la paciente se detallan en la **Tabla 7** y los datos clínicos de relevancia se detallan en el ANEXO 2.

A los efectos de determinar si las mutaciones halladas se encontraban en *trans* y dado que no se contaba con muestras de ADN de los padres, se realizaron PCRs alelo específicas utilizando los cebadores LD7 y Val-mut o Val-wt como se detalló en la sección Materiales y Métodos (apartado III.1.3.1). La **Figura 22** muestra los resultados obtenidos.





A: Electroforesis representativa de la PCR alelo específica en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Calles 1-5: Fragmentos amplificados con los cebadores LD7 y Val-mut; 1: Paciente p.V281L/p.V281L; 2: Individuo N/N (N: Normal); 3: Paciente 144. 4: Paciente 552 utilizado como control de mutaciones en *trans*; 5: Blanco de reacción. Calles 6-10: Fragmentos amplificados con los cebadores LD7 y Val-wt; 6: Paciente p.V281L/p.V281L; 7: Individuo N/N; 8: Paciente 144: 9: Paciente 552 utilizado como control de mutaciones en trans; 10: Blanco de reacción. M: Marcador de peso molecular de 250pb. **B:** Electroferograma representativo del ADN de la paciente 144 amplificado con el cebador LD7 y Val- mut, donde se aprecia el triplete CGC (subrayado) que codifica para el residuo aminoacídico R. **C:** Electroferograma representativo del ADN de la paciente 144 amplificado con el cebador LD7 y Val. wt, donde se aprecia el triplete TGC (subrayado)

que codifica para el residuo aminoacídico C. Las flechas indican la presencia de la secuencia salvaje C o mutada T, respectivamente. **D**: Electroferograma representativo del ADN del paciente 552 amplificado con el cebador LD7 y Val- mut, donde se aprecia el triplete ATC (subrayado) que codifica para el residuo aminoacídico I. **E**: Electroferograma representativo del ADN del paciente 552 amplificado con el cebador LD7 y Val- mut, donde se aprecia el triplete ATC (subrayado) que codifica para el residuo aminoacídico I. **E**: Electroferograma representativo del ADN del paciente 552 amplificado con el cebador LD7 y Val. wt, donde se aprecia el triplete AAC (subrayado) que codifica para el residuo aminoacídico N. Las flechas indican la presencia de la secuencia salvaje T o mutada A, respectivamente.

Cuando el ADN de la paciente se amplificó con el cebador LD7 sentido (que se ubica en la región específica para el gen en el exón 3) y el cebador antisentido Val-mut que se aparea con el alelo 281Leu (mutado con p.V281L), el producto resultante contiene a la variante g.940C que codifica para el aminoácido R salvaje (triplete CGC, Figura 22B). En forma inversa, cuando se utilizó el cebador antisentido Val-wt que aparea con la variante 281Val (salvaje, sin la mutación p.V281L), el producto resultante contiene a la variante g.940T que codifica para el aminoácido C mutado (triplete TGC, Figura 22C). Mediante este análisis se determinó, por lo tanto, que ambas mutaciones se encontraban en alelos diferentes. Como control de la reacción se utilizó el ADN de la paciente 552 que posee las mutaciones p.V281L/p.I172N en *trans* (la presencia en *trans* de estas mutaciones fue confirmada a partir del estudio de los ADNs parentales de esta paciente). En la Figura 22D se muestra el electroferograma de la secuenciación del fragmento amplificado de la paciente 552 con los cebadores LD7 y Val-mut, donde se aprecia la presencia del triplete ATC que codifica para el aminoácido Isoleucina (alelo salvaje). Por otro lado, en la Figura 22E se muestra el electroferograma de la secuenciación del fragmento amplificado con los cebadores LD7 y Val-wt, donde se observa la presencia del triplete AAC que codifica para el aminoácido Asparragina (alelo mutado).

MUTACIÓN p.M283V:

La mutación g.1695A>G (p.M283V) en el exón 7 del gen *CYP21A2* se detectó en uno de los alelos en 3 pacientes afectadas de la FNC de la enfermedad (pacientes 11, 327 y 664). El

Capítulo IV- Resultados

genotipo de las 3 pacientes se consigna en la **Tabla 7** así como los valores hormonales de cada una de ellas. Los datos clínicos de relevancia se detallan en el ANEXO 2.

Para la paciente 11, no se contaba con muestras de ADN de los padres. Sin embargo, tampoco fue posible realizar PCRs alelos específicas para determinar la segregación de las mutaciones dado que por la metodología utilizada para la amplificación diferencial de gen, ambas variantes se encontraban en diferentes fragmentos de amplificación: la mutación c.283-13A/C>G en el fragmento 5` y la p.M283V en el 3'. En este caso, por lo tanto, se asumió la presencia de las 2 mutaciones en diferentes alelos.

En la paciente 327, y a pesar de poseer criterios de inclusión compatibles, la mutación p.M283V fue la única mutación hallada.

Para la paciente 664 tampoco se contaba con muestras de ADN de los padres, pero la presencia de ambas mutaciones en *trans* se dedujo teniendo en cuenta la estrategia de amplificación diferencial del gen ya que el alelo homólogo presentaba una 5′ macroconversión (que incluye a la mutación p.G110_Y112delfs). El cebador que se utilizó para amplificar diferencialmente el fragmento 3' se ubica en la región que contiene la secuencia salvaje correspondiente a la deleción de 8pb (p.G110_Y112delfs) (Materiales y Métodos apartado III.1.3.3). Cuando un alelo posee esta mutación no se obtiene producto que lo incluya, pero sí se obtiene producto a partir del alelo homólogo que no la posee. Si el alelo homólogo posee mutación/es, la/s misma/s se observaría/n en aparente homocigosis. Por otro lado, si el alelo que posee la deleción de 8pb (p.G110_Y112delfs) contuviera otra mutación en *cis* en el fragmento 3', la misma no se detectaría. Por otro lado, la mutación p.G110_Y112delfs (o cualquiera que estuviera en *cis* hacia el 5′de la misma), se observa en heterocigosis cuando se amplifica el fragmento F2 a partir del fragmento 5′ inicial (ver Materiales y Métodos apartado III.1.3.3). En este caso, por lo tanto, los datos obtenidos

fueron coincidentes con la presencia de ambas mutaciones en *trans*, ya que la p.M283V se observó en homocigosis en el electroferograma y la p.G110_Y112delfs en heterocigosis (**Figura 23**).

Figura 23: Electroferogramas representativos de las mutaciones halladas en la paciente 664



A la izquierda se muestra la mutación p.M283V en homocigosis. La flecha señala el nucleótido G que genera el triplete GTG (que codifica para el aminoácido V) en lugar de la secuencia salvaje ATG (que codifica para el aminoácido M). A la derecha se observa el corrimiento de la secuencia (se observan dobles pico a partir de un punto determinado del electroferograma) como consecuencia de la del 8pb (p.G110_Y112delfs). En este caso, se muestra el fragmento secuenciado con el cebador antisentido.

Teniendo en cuenta que la mutación p.M283V se encontró en 3 pacientes de nuestra cohorte, quisimos verificar si la misma era producto de un efecto fundador. Para tal fin se realizó la tipificación del *HLA* por la metodología detallada en la sección de Materiales y Métodos (apartado III.1.3.6).

Al comparar la pacientes 327 con la paciente 11, los resultados indicarían que las mutaciones se produjeron por eventos independientes. Sin embargo, al comparar las pacientes 11 y 664 entre sí, se observó que las pacientes compartían 1 alelo del *HLA*-B y otro del *HLA*-DR (el 44 y 04 respectivamente). Lo mismo ocurre al comparar las pacientes 327 y 664, ya que comparten el alelo 49 del *HLA*-B (**Tabla 8**). Estos resultados sugerirían que es posible que esta variante se encuentre en desequilibrio de ligamiento con alguna de los haplotipos de *HLA*. Sin embargo, no poseemos información si algunas de las pacientes están emparentadas entre sí.

	HLA-A	HLA-B	HLA-DR
Paciente 11	29-26	35- <u>44</u>	15- <u>04</u>
Paciente 327	03-33	<u>49</u> -15	03-x
Paciente 664	01-02	<u>44</u> - <u>49</u>	<u>04</u> -11

Tabla 8: Resultados del análisis de HLA para 3 pacientes que poseen la mutación p.M283V

Los alelos compartidos entre las pacientes se muestran en negrita y subrayados.

MUTACIÓN p.E431K:

La mutación g.2515A>G, p.E431K, se detectó en uno de los alelos no determinados de una paciente afectada con la FNC de la enfermedad (Paciente 149). Además, se halló que la paciente presentaba la mutación p.V281L y la mutación poco frecuente ya descripta p.D322G. Los valores hormonales de la paciente se detallan en la **Tabla 7** y los datos clínicos de relevancia se detallan en el ANEXO 2.

A los efectos de determinar cómo segregaban las mutaciones entre sí, y dado que no se contaba con los ADNs de los padres, en este caso se realizaron también PCRs alelo específicas como se detalló en la sección Materiales y Métodos (apartado III.1.3.5). Para ello se utilizaron los cebadores Val-mut y Val-wt sentido y el cebador LD4 antisentido.

La **Figura 24** muestra los resultados obtenidos. Como se observa en la parte B de la figura, cuando el ADN de la paciente se amplificó con el cebador LD4 y el cebador Val-mut que se aparea con el alelo 281L (mutado), el producto resultante contiene a la variante g.2515G que codifica para el aminoácido E salvaje (triplete GAG). En cambio, como se observa en la parte C de la figura, cuando se utilizó el cebador Val-wt que aparea con la variante 281V (salvaje), el producto resultante contiene a la variante g.2515A que codifica para el aminoácido K mutado (triplete AAG). Mediante este análisis se determinó, por lo tanto, que las mutaciones p.V281L y p.E431K se encontraban en alelos diferentes. Como control de la reacción se utilizó el ADN de la paciente 523 que poseía las mutaciones p.V281L/p.P453S en *trans*,

(confirmado por el estudio realizado en sus padres). En la parte D de la **Figura 24** se muestra el electroferograma obtenido de la secuenciación del fragmento amplificado con los cebadores LD4 y Val-mut de la paciente 523, donde se aprecia el triplete CCC que codifica para el aminoácido P (alelo salvaje). Por otro lado, en la parte E de la **Figura 24** se muestra el electroferograma de la secuenciación del fragmento amplificado con los cebadores LD4 y Val-wt, donde se observa el triplete TCC que codifica para el aminoácido S (alelo mutado).





A: Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio de los fragmento obtenidos por PCR alelo específica. Calles 1-5: Fragmentos amplificados con los cebadores LD4 y Val-mut; 1 y 2: Paciente 523 utilizado como control de la amplificación cis-trans; 3 y 4: Paciente 149; 5: Blanco de reacción. Calles 6-10: Fragmentos amplificados con los cebadores LD4 y Val-wt; 6 y 7: Paciente 523 utilizado como control de la amplificación cis-trans; 8 y 9: Paciente 149; 10: Blanco de reacción. M: Marcador de peso molecular de 250pb. Para la secuenciación se escindió la banda de 1112pb del gel de agarosa. B: Electroferograma representativo del ADN de la paciente 149 amplificado con el cebador LD4 y Val-mut, donde se aprecia el triplete GAG (subrayado) que codifica para el residuo aminoacídico E. C: Electroferograma representativo del ADN de la paciente 149 amplificado con el cebador LD4 y Val-wt, donde se aprecia el triplete AAG (subrayado) que codifica para el residuo aminoacídico K. Las flechas indican la presencia de la secuencia salvaje G o mutada A, respectivamente. D: Electroferograma representativo del ADN del paciente 523 amplificado con el cebador LD4 y Val-mut donde se aprecia el triplete CCC (subrayado) que codifica para el residuo aminoacídico P. E: Electroferograma representativo del ADN del paciente 523 amplificado con el cebador LD4 y Val-wt, donde se aprecia el triplete TCC (subrayado) que codifica para el residuo aminoacídico S. Las flechas indican la presencia de la secuencia salvaje C o mutada T, respectivamente.

Melisa Taboas

Capítulo IV- Resultados

Este mismo análisis nos permitió determinar que las mutaciones p.D322G y p.E431K se encontraban en el mismo alelo. La **Figura 25** muestra los electroferogramas de todo el fragmento secuenciado.

Como se observa en la parte A de la **Figura 25**, cuando el ADN se amplificó con el cebador antisentido LD4 y el cebador Val-mut, el producto resultante contenía el nucleótido g.2515G que codifica para el aminoácido E431 salvaje y al nucleótido g.2012A que codifica para el aminoácido D322 salvaje (triplete GAC). En cambio, como se observa en la parte B, cuando se utilizó el cebador Val-wt que aparea con la variante V281 (salvaje), el producto resultante poseía la variante g.2012G, que codifica para el aminoácido G322 mutado (el triplete GGC) junto con la variante g.2512A que codifica el aminoácido K431 mutado (triplete AAG). Se concluyó, por lo tanto, que las mutaciones p.D322G y p.E431K se encontraban en el mismo alelo, y que en el alelo homólogo se hallaba la mutación p.V281L.

Figura 25: Electroferogramas representativos de la secuenciación de la PCR alelo específica para las mutaciones p.D322G y p.E431K amplificadas con los cebadores para L281 o V281.

A:



B:

A: Electroferograma producto de la amplificación con el cebador L281 (mutado para p.V281L). Se señalan subrayados los tripletes GAC y GAG que codifican para los aminoácidos D322 y E431, respectivamente. La flecha indica la base del triplete que se modifica con la mutación. **B:** Electroferograma producto de la amplificación con el cebador V281 (salvaje). Subrayados se señalan los tripletes GGC y AAG que codifican para los aminoácidos G322 y K431, respectivamente. La flecha indica la base del triplete que se modifica con la mutación.

MUTACIÓN p.L429fs:

La mutación g.2511_2512delGG, p.L429fs, se detectó en uno de los alelos no determinados de una paciente afectada con la forma clásica PS de la enfermedad (Paciente 142). En el alelo homólogo se había detectado la mutación p.I172N. Los valores hormonales de la paciente se detallan en la **Tabla 7** y los datos clínicos de relevancia se detallan en el ANEXO 2.

La mutación p.L429fs en el exón 10 implica un corrimiento del marco de lectura hacia el extremo carboxi-terminal de la proteína, con un tracto de 91 residuos diferentes y 26 aminoácidos de más en la proteína resultante.

A los efectos de determinar si las mutaciones halladas se encontraban en *trans*, se analizó mediante secuenciación la presencia de las mutaciones p.I172N y p.L429fs en las muestras de ADN de los padres (**Figura 26**). Mediante este análisis se detectó la presencia de la mutación

p.I172N en el padre y la mutación p.L429fs en la madre, corroborando así que las 2 mutaciones se encontraban en alelos diferentes en la paciente

A pesar de que al poseer la mutación p.I172N se hubiera esperado un fenotipo VS en esta paciente, no se detectó la presencia de ninguna otra mutación adicional en ese alelo del gen *CYP21A2* que pudiera explicar su fenotipo PS.

Figura 26: Electroferogramas representativos de la secuenciación de las muestras de ADN de los padres de la paciente 142.



A: Electroferograma de la secuenciación del ADN paterno, donde se observa la mutación p.1172N. B: Electroferograma de la secuenciación del ADN materno, donde se observa la mutación p.L429fs.

.MUTACIÓN p.H466fs:

La mutación g.2620_2621insC, p.H466fs, se detectó en uno de los alelos no determinados de un paciente afectado con la forma clásica PS de la enfermedad (Paciente 266). Los valores hormonales se muestran en la **Tabla 7** y los datos clínicos de relevancia en el ANEXO 2.

El paciente había sido caracterizado en un principio con las mutaciones c.283-13A/C>G/p.Q318*, ambas pertenecientes al grupo de las 10 mutaciones más frecuentes del gen derivadas del pseudogen. Sin embargo, a partir del estudio de la Dra. Cecilia Fernández de nuestro grupo de trabajo (Fernández C., 2014), se determinó que el paciente presentaba un alelo con el gen duplicado y poseía, por lo tanto, 3 copias del gen *CYP21A2*. A raíz de este hallazgo se secuenció el gen completo y se encontró que el paciente poseía además la mutación p.H466fs. Melisa Taboas

Capítulo IV- Resultados

La mutación p.H466fs en el exón 10 implica un corrimiento del marco de lectura hacia el extremo carboxi-terminal con la aparición de un codón de terminación 26 aminoácidos después y con los últimos 30 aminoácidos diferentes respecto de la proteína salvaje. Se genera, por lo tanto, un tracto de 56 residuos diferentes en la proteína mutante.

En el caso de este paciente, no se tuvo acceso al ADN de sus padres. Sin embargo, varios trabajos de la literatura reportaron la presencia de la mutación p.Q318* y c.283-13A/C>G en alelos con el gen duplicado (Parajes y col., 2008). En estos trabajos, la mutación p.Q318* se encontraba en la copia centromérica del gen *CYP21A2*. A partir del trabajo de la Dra Cecilia Fernández (Fernández C., 2014) se determinó que tanto la mutación p.Q318* como la p.H466fs se encontraban en las copias centroméricas del gen, y que en dichas copias no se detectaba la mutación c.283-13A/C>G. Teniendo en cuenta todos estos resultados, sumado a que el paciente es PS, se asumió que las 3 mutaciones halladas se encontraban en *trans*, y no se realizaron PCRs alelo específicas. Las mutaciones p.Q318* y c.283-13A/C>G se ubicarían en un alelo (p.Q318* en la copia centromérica y c.283-13A/C>G en la telomérica) y la mutación p.H466fs en el otro alelo.

IV.1.3.2. MUTACIONES EN INTRONES

MUTACIÓN c.652-2A>G:

La mutación g1329A>G, c.652-2A>G, se halló en uno de los alelos no determinados de una paciente de la FC VS (Paciente 28). En el otro alelo, la paciente poseía la mutación poco frecuente g.2672G>A, p.R483Q, que se halló también por secuenciación. Los valores hormonales de la paciente se detallan en la **Tabla 7** y los datos clínicos de relevancia se detallan en el ANEXO 2.

Para corroborar que las dos mutaciones halladas estuviesen en diferentes alelos, y como no contábamos con muestras de ADN de los padres de la paciente, realizamos dos PCRs alelo

Melisa Taboas

Capítulo IV- Resultados

específicas. Una de ellas, a la que llamamos PCR-AE1, se realizó con cebadores antisentido que se unieran específicamente al alelo con o sin la mutación p.R483Q (R483Q-mut y R483Q-wt, respectivamente) junto con el cebador sentido LD7 que amplificaban un fragmento de 1991pb. La otra PCR alelo específica, a la que llamamos PCR-AE2, se realizó con cebadores sentido que se unieran específicamente al alelo con o sin la mutación c.652-2A>G (I5-mut e I5-wt, respectivamente), junto con el cebador antisentido LD4. En este caso, el fragmento de amplificación era de 1486pb (Ver Materiales y Métodos apartado III.1.3.5). Los productos de la PCR-AE1 (**Figura 27A**) se digirieron con la enzíma de restricción BtgI que reconoce como sitio de corte la secuencia con la mutación c.652-2A>G. En el alelo con esta mutación se esperaban, además del fragmento de 936 pb, 2 fragmentos de 537 y 434 pb producto del corte del fragmento de 971 que se obtiene del alelo sin esta mutación (Ver Materiales y Métodos apartado III.1.3.4, Tabla 3).

Como se observa en la **Figura 27B**, mediante la digestión de la PCR-AE1 se corroboró que el alelo salvaje R483 poseía la mutación c.652-2A>G (**Figura 27B**, calle 1), mientras que el alelo mutado Q483 no la poseía (**Figura 27B**, calle 2).

Por otro lado, para corroborar que el alelo salvaje c.652-2A tuviera la variante mutada Q483 (codón CAG) y que el alelo con la mutación c.652-2G codificara para el aminoácido salvaje R483 (codón CGG salvaje), los productos de la PCR-AE2 se enviaron a secuenciar. La **Figura 28** muestra los resultados obtenidos.



Figura 27: PCR-AE1 y digestión de los productos de la misma con la enzíma BtgI

A: Gel de agarosa representativo de la corrida electroforética de la PCR-AE1. Calles 1-5: Fragmentos amplificados con los cebadores LD7 y R483Q-wt; 1 y 2: Paciente 28; 3 y 4: Individuos que no poseen la mutación p.R483Q; 5: Blanco de reacción. Calles 6-10: Fragmentos amplificados con los cebadores LD7 y R483Q-mut; 6 y 7: Paciente 28; 8 y 9: Individuos que no poseen la mutación p.R483Q; 10: Blanco de reacción. M: Marcador de peso molecular de 250pb. B: Digestión de los productos de PCR-AE1 con la enzíma BtgI. Calle 1: Digestión del fragmento amplificado con los cebadores LD7 y R483Q-wt (alelo sin la mutación p.R483Q) a partir del ADN de la paciente 28. Se observan los fragmentos de 936, 537 y 434 pb, que corresponden a la presencia de la mutación c.652-2A>G. Calle 2: Digestión del fragmento amplificado con los cebadores LD7 y R483Q-mut (alelo con la mutación p.R483Q) a partir del ADN de la paciente 28. Se observan juntas las bandas de 971 y 936 pb que indican la ausencia de la mutación c.652-2A>G. Calle 3: Digestión del fragmento amplificado con los cebadores LD7 y R483Q-wt a partir del ADN de un individuo que no posee la mutación p.R483Q. Calle 4: fragmento de ADN amplificado sin digerir con la enzíma BtgI, M: Marcador de peso molecular de 250 pb. El fragmento de 84 pb, producto de la digestión, no se visualiza en este gel.

Como se observa en la **Figura 28B**, el alelo amplificado con los cebadores LD4 e I5-wt (que amplifican el alelo que no posee la mutación c.652-2A>G del intrón 5) poseía el codón CAG y, por lo tanto, la mutación Q483. En la **Figura 28C** se observa que el alelo de la paciente amplificado con los cebadores LD4 e I5-mut (que poseía la mutación c.652-2A>G) contenía el codón CGG que codifica para el aminoácido R483 salvaje. Estos resultados indican que las dos mutaciones halladas en la paciente se encuentran en alelos diferentes

Figura 28: Electroforesis en gel de agarosa y electroferogramas representativos representativos de la PCR-AE2



A: Gel de agarosa representativo de la corrida electroforética de la PCR-AE2. Calles 1-3: Fragmentos amplificados con los cebadores LD4 e I5-wt; 1: Paciente 28; 2: Individuo que no posee la mutación c.652-2A>G; 3: Blanco de reacción; Calles 4-6: Fragmentos amplificados con los cebadores LD4 e I5-mut; 4: Paciente 28; 5: Individuo que no posee la mutación c.652-2A>G; 6: Blanco de reacción. M: Marcador de peso molecular de 250pb. B: Secuencia del alelo de la paciente 28 amplificado con los cebadores LD4 y I5-wt (sin la mutación c.652-2A>G). La flecha indica la presencia del codón CAG (aminoácido Q, mutación p.R483Q). C: Secuencia del alelo de la paciente 28 amplificado con los cebadores LD4 y I5-mut (con la mutación c.652-2A>G). La flecha indica la presencia del codón CGG (aminoácido R, salvaje).

MUTACIÓN c.1116-34G>A:

Este cambio se detectó en 2 pacientes con diagnóstico de HSC de la FNC. Los valores hormonales de ambas pacientes se detallan en la **Tabla 7** y los datos clínicos de relevancia se detallan en el ANEXO 2. En ambas pacientes, no se halló ninguna otra mutación.

IV.1.3.3. VARIANTES POLIMÓRFICAS HALLADAS

Además de las variantes noveles y poco frecuentes previamente descriptas, en los 87 pacientes secuenciados hallamos también variantes descriptas con anterioridad como variantes polimórficas del gen *CYP21A2*. La **Tabla 9** muestra, a modo de resumen, las variantes más frecuentes.

POLIMORFISMO	REGIÓN	Nº DE ALELOS	PORCENTAJE	
g4C>T	Promotora	2	1,1	
g281insT	Promotora	65	36,9	
g332insG	Promotora	61	34,7	
g.27insCTG	Codificante	9	5,1	
p.K102R	Codificante	64	36,4	
p.D183E	Codificante	9	5,1	
p.S268T	Codificante	11	6,25	
p.D436E	Codificante	96	54,5	
p.N493S	Codificante	59	33,5	
g.562-568delG	Intrón 2	6	3,4	

Tabla 9: Polimorfismos frecuentes hallados en los pacientes secuenciados

IV1. 4. ANÁLISIS IN SILICO DE LAS MUTACIONES NOVELES

IV.1.4.1. MUTACIONES EN REGIONES CODIFICANTES

A los efectos de realizar un abordaje preliminar y estimar si las mutaciones noveles halladas en regiones codificantes podrían estar relacionadas con la patología, se realizó un alineamiento de secuencia con diferentes proteínas CYP21 de mamíferos mediante el algoritmo ClustalW (<u>http://www.genome.jp/tools/clustalw/</u>) para analizar si los cambios hallados se encontraban en regiones conservadas de las mismas.

En la **Figura 29** se muestran los resultados obtenidos al analizar todas las mutaciones puntuales noveles que se correspondían con cambio de aminoácido: p.R132C, p.R149C, p.M283V y p.E431K.

Figura 29: Alineamiento de ClustalW con la secuencia de la proteína P450c21 de diferentes mamíferos para las 4 mutaciones puntuales de la región codificante.

Homo sapiens Macaca mulatta Sus scrofa Bos taurus Canis lupus familiaris Equus caballus Mus musculus Rattus norvegicus	KLVSRNYPDLSLGDYSLLWKAHKKLTRSALLLGIRDSMEPVVEQLTQEFC KLVSKNYPDLSLGDYSLLWKAHKKLTRSALLLGMRDSMEPVVEQLTQEFC KLASQHCPDISLGDYSLFWKAHKKLTRSALLLGTRSSMEPRVEQLTQEFC KLVSQRCQDISLGDYSLLWKAHKKLTRSALLLGTRSSMEPRVEQLTQEFC KLVSLHHQDLSLGDYSLLWKAHKKLTRSALLLGIRNSMEPLVEQLTQEFC KLVSQRYQDLSLGDYSLLWKAHKKLSRSALMLGMRDSMEPLVEQLTQEFC KMDDLSSLGDYSLWKAHKKLSRSALMLGMRDSMEPLVEQLTQEFC KMNFDLSMGDYSLTWKAHKKLSRSALVLGMRDSMEPLVEQLTQEFC	148 67 148 148 147 148 144 144
Homo sapiens	EMRAQPGTPVAIEEEFSLLTCSIICYLTFGDKIKDDNLMPAYYKCIQEV	198
Macaca mulatta	ERMRAQAGTPVAIEEEFSLLTCSIICHLTFGDKIKEV	104
Sus scroia	EMMRAQAGTPVTIQKEFSVLTCSIICCLTFGDKEDTLVHALHDCVQDL	196
Bos taurus	EMMRVQAGAPVTIQKEFSLLTCSIICYLTFGNKEDTLVHAFHDCVQDL	196
Canis lupus familiaris	ERMRAQAGTPVAIQKEFSLITCALICHLTFGNKEDTLVHTFHDCVQDL	195
Equus caballus		102
Pattus porvogious		105
Rattus noivegitus	**** * * . * . * ** *** *** ******	195
Homo sapiens	LVAGQWRDMMDYMLQGVAQPSMEEGSGQLLEGHVH <mark>M</mark> AAVDLLIGGTET	296
Macaca mulatta	LVAGQWRDMMDYMLQVVAQPSMEEGSGQLLEGHVH <mark>M</mark> AAVDLLIGGTET	202
Sus scrofa	MVAGQWRDMLDYMLQEAGRQRVEEGQGQLLEGHVH <mark>M</mark> SVVDLFIGGTET	294
Bos taurus	MVAGQWRDMTDYMLQGVGRQRVEEGPGQLLEGHVH <mark>M</mark> SVVDLFIGGTET	294
Canis lupus familiaris	MVAGQWRDMTDYMLQRVGRLRAEEGCGQLLEGHVH <mark>M</mark> SVVDLFIGGTET	293
Equus caballus	IVAGRWRDMTDYMLQGLGRPTVEEAPGQLLEGHVH <mark>M</mark> AMVDLFIGGTET	294
Mus musculus	LVAGQWKDMIDYMLQGVEKQRDGKDEERLHEGHVH <mark>M</mark> SVVDLFIGGTET	290
Rattus norvegicus	LVAGQWKDMIDYMLQGVEKQRDARDPGQLHERHVH <mark>M</mark> SVVDLFVGGTET	293
	•***•*********************************	
Homo sapiens	TVWERPHEFWPDRFLEPGKNSRALAFGCGARVCLG <mark>E</mark> PLARLELFVVLTRL	446
Macaca mulatta	MVWERPHEFWPDRFLEPGKNSRALAFGCGARVCLG <mark>E</mark> PLARLELFVVLTRL	352
Sus scrofa	TVWEQPHEFRPDRFLAPGANPSALAFGCGARVCLG <mark>E</mark> PLARLELFVVLVQL	444
Bos taurus	TVWEQPHEFRPDRFLEPGANPSALAFGCGARVCLG <mark>E</mark> SLARLELFVVLLRL	444
Canis lupus familiaris	TVWERPQEFRPDRFLVPGASPRVLAFGCGARVCLG <mark>E</mark> PLARLELLVVLAQL	443
Equus caballus	TIWEQPHEFRPDRFLYPGASPSTLAFGCGARVCLG <mark>E</mark> PLARLELFVVLAQL	444
Mus musculus	MVWELPSKFWPDRFLEPGKNPRTPSFGCGARVCLG <mark>E</mark> PLARLELFVVLARL	437
Rattus norvegicus	MVWELPSKFWPDRFLESGKSPRIPTFGCGARVCLG <mark>E</mark> PLARLELFVVLARL	440

Los residuos en amarillo denotan la posición de los diferentes aminoácidos involucrados en las mutaciones halladas. A: p.R132C, B: p.R149C, C: p.M283V, D: p.E431K.

Como se observa, en todos los casos los residuos involucrados se encuentran altamente conservados a lo largo de diferentes linajes de mamíferos.

Para las mutaciones p.L429fs y p.H466fs, se determinaron los cambios aminoacídicos que se producían en la secuencia de la proteína salvaje a partir del corrimiento en el marco de lectura que se genera en cada caso (**Figura 30**). Para la mutación p.L429fs, el nuevo codón de terminación se encuentra 91 aminoácidos hacia el extremo 3' luego de la mutación y se genera una proteína con 26 aminoácidos más larga y 65 aminoácidos diferentes respecto a la salvaje. Para la p.H466fs, el nuevo codón de terminación se encuentra a 56 residuos después de la mutación y se genera una proteína con 26 aminoácidos de terminación se encuentra a 56 residuos después de la mutación y se genera una proteína 26 aminoácidos más larga que la salvaje con 30 aminoácidos diferentes.

Figura 30: Región carboxi-terminal de las diferentes que resultan de la presencia de las mutaciones p.L429fs y p.H466fs



A: Secuencia proteica parcial de la región carboxi-terminal de la P450c21 humana correspondiente a parte del exón 10 hasta el codón de terminación de la traducción del gen *CYP21A2* humano en su versión salvaje. **B:** Secuencia proteica parcial de la región carboxi-terminal de la P450c21 humana correspondiente a parte del exón 10 del gen *CYP21A2* humano hasta el nuevo codón de terminación de la traducción con la mutación p.L429fs. En verde se resaltan los aminoácidos diferentes producto del corrimiento de marco de lectura. **C:** Secuencia proteica correspondiente a la secuencia parcial del exón 10 del gen *CYP21A2* humano con la mutación p.H466fs. En rojo se resaltan los aminoácidos que se modifican y se adicionan por el corrimiento de marco de lectura.

En la **Figura 31** se muestran los alineamientos de la región carboxi-terminal de la P450c21 involucrada en las 2 mutaciones que producen corrimiento del marco de lectura de varias especies de mamíferos. Como se observa en la figura, los cambios que se producen a partir del corrimiento del marco de lectura afectarían a varios aminoácidos que se encuentran conservados en estas especies.

Figura 31: Alineamiento de ClustalW con la secuencia de la proteína P450c21 de diferentes mamíferos para las regiones involucradas en las mutaciones p.L429fs (A) y p.H466fs (B)

A:

Homo sapiens	SRALAFGCGARVCLGEPLARLELFVVLTRLLQAFTLLPS-GDALP 460
Macaca mulatta	SRALAFGCGARVCLGEPLARLELFVVLTRLLQAFTLLPP-GDALP 366
Sus scrofa	PSALAFGCGARVCLGEPLARLELFVVLVQLLQAFTLLPP-EGALP 458
Bos taurus	PSALAFGCGARVCLGESLARLELFVVLLRLLQAFTLLPPPVGALP 459
Canis lupus familiaris	PRVLAFGCGARVCLGEPLARLELLVVLAQLLRAFTLMPA-AGTLP 457
Equus caballus	PSTLAFGCGARVCLGEPLARLELFVVLAOLLRAFTLLPP-AGALP 458
Mus musculus	PRTPSFGCGARVCLGEPLARLELFVVLARLLOAFTLLPPPDGTLP 452
Rattus novergicus	PRIPTFGCGARVCLGEPLARLELFVVLARLLOTFTLLPPPDGTLP 455
	** **** *** ** *** **
Homo sapiens	SLQPLPHCSVILKMQPFQVRLQPRGMGAHSPG QSQ 495
Macaca mulatta	SLQPLPHCSVILKMQPFQVWLQPRGLGVHSLG QSQ 401
Sus scrofa	SLOPHPHSGINLKVOPFOVRLOPRGGRGEGPG PR 492
Bos taurus	SLOPDPYCGVNLKVOPFOVRLOPRGVEAGAWESAS AQ 496
Canis lupus familiaris	SLRPRARCGVNLSMOPFOVOLOPRGAGVLGRG OHP 492
Equus caballus	SLOPOPHCGVNLTMOPFOVOLOPRGAGTPGLG ERO 493
Mus musculus	SLOPOPYAGINLPIPPFOVRLOPRNLAPODOG ERP 487
Rattus novergicus	SLOPLPYTGINLLIPPFOVRLOPRNLAPODOG OKSSTG 493
2	** * ******
В:	
Homo sapiens	GDALPSLOPLPHCSVILKMOPFOVRLOPRGMGAHSPGOSO 495
Macaca mulatta	GDALPSLOPLPHCSVILKMOPFOVWLOPRGLGVHSLGOSO 401
Sus scrofa	EGALPSLOPHPHSGINLKVOPFOVRLOPRGGRGEGPGPR 492
Bos Taurus	VGALPSLOPDPYCGVNLKVOPFOVRLOPRGVEAGAWESASAO 496
	· ····································

A: En verde se resaltan los aminoácidos que se encuentran afectados por la mutación p.L429fs. **B:** En rojo se resaltan los aminoácidos que se encuentran afectados por la mutación p.H466fs. *: Aminoácidos muy conservados.

AGTLPSLRPRARCGVNLSMQPFQVQLQPRGAGV---LGRGQHP--- 492 AGALPSLQPQPHCGVNLTMQPFQVQLQPRGAGT---PGLGERQ--- 493

DGTLPSLQPQPYAGINLPIPPFQVRLQPRNLAP---QDQGERP--- 487

DGTLPSLQPLPYTGINLLIPPFQVRLQPRNLAP---QDQGQKSSTG 493

**** ****

IV.1.4.2. MUTACIONES EN INTRONES

Canis lupus familiaris

Equus caballus

Rattus novergicus

Mus musculus

Para estimar si las variante c.652-2A>G y c.1116-34G>A (hallados en los intrones 5 y 8, respectivamente) presentaban algún efecto deletéreo sobre el *splicing* del gen *CYP21A2*, se utilizó el programa *Human splicing finder* V.2.4.1 (http://www.umd.be/HSF/). Este programa predice el efecto de mutaciones sobre sitios consenso de *splicing*, así como también analiza la presencia de motivos potencialmente implicados en el mismo en cualquier secuencia de ADN humano.

Capítulo IV- Resultados

MUTACIÓN c.652-2A>G:

Para esta variante se analizó un fragmento de 194 pb desde el nt 1221 en el extremo 3´ del exón 5 hasta el nt 1415 en el exón 6 del gen *CYP21A2*.

Como se observa en la **Figura 32,** en presencia de la mutación c.652-2A>G se predijo una reducción en el valor consenso (Δ VC) de -32,5% que superó el límite de corte estimado del 10% (Materiales y Métodos apartado III.1.4.2.). Por lo tanto, se predice un sitio inactivo de *splicing* en presencia de esta mutación.

Además, se predijeron dos sitios de *splicing* crípticos con valores de VC cercanos al 90%, uno en la mitad del intrón 5 y otro a 16 nt desde el comienzo del exón 6. Ambos sitios superaron el valor del 80% considerado como umbral, y por lo tanto, ambas secuencias pueden ser potenciales sitios de *splicing*.

Figura 32: Diagrama representativo del análisis bioinformático para la región del intrón 5



Cuadrado verde: Sitio consenso aceptor de *splicing* del intrón 5; Cuadrado rojo: Sitio consenso aceptor de *splicing* del intrón 5 alterado por la mutación; Cuadrados grises: Sitios aceptores crípticos posibles, el primero en el intrón 5 y el segundo en el exón 6; Círculo gris: Sitio consenso dador de *splicing*.

MUTACIÓN c.1116-34G>A:

Para esta mutación se analizó un fragmento de 109 pb desde el nt 2145 en el extremo 3´ del exón 8, hasta el nt 2254 del gen en el extremo 5´ del exón 9. Como se observa en la **Figura 33**, este cambio no implicaría ningún efecto biológico sobre el *splicing* del intrón 8. El ΔVC entre la variante salvaje G y la variante A fue cero. Asimismo, el valor consenso de este sitio

fue inferior al 80% tanto en presencia del nt G como del nt A, y no se predijeron otros sitios como potenciales regiones involucradas en el *splicing*.



Figura 33: Diagrama representativo del análisis bioinformático para la región del intrón 8

Estos resultados sugerirían que esta variante no produciría alteraciones en la proteína resultante. Por lo tanto, y a los efectos de esta tesis, se la consideró *a priori* como una variante que no se asocia a la patología y no se prosiguió con su estudio.

En suma, en esta primera parte del trabajo, luego de la secuenciación completa del gen estructural *CYP21A2 y* su región promotora basal en la muestra analizada, del estudio en individuos de la población general, y teniendo en cuenta las predicciones bioinformáticas, todos los pacientes clásicos (n=15) fueron completamente genotipificados. En cambio, para los pacientes no clásicos, solo en 12 de los 72 se completó su genotipificación. Entre los pacientes de la FNC 31 poseían mutaciones en sólo uno de sus alelos y 29 no poseían mutaciones en ninguno de los dos alelos. La **Tabla 10** resume estos resultados.

 Tabla 10: Cantidad de pacientes con 2 alelos mutados, uno o ninguno luego de realizar la secuenciación completa del gen y de su región promotora

PACIENTES	2 ALELOS MUTADOS (%)	1 ALELO MUTADO (%)	NINGÚN ALELO MUTADO (%)	TOTAL
CLÁSICOS	15 (100)	0 (0)	0 (0)	15
NO CLÁSICOS	12 (16,6)	31 (43,1)	29 (40,3)	72
TOTAL	27 (31,1)	31 (35,6)	29 (33,3)	87

Cuadrado verde: Variante salvaje G. Cuadrado rojo: Variante A. Cuadrado gris: Sitio consenso aceptor de *splicing*. Círculo gris: Sitio consenso dador de *splicing*. Se observan superpuestos los cuadrados verde y rojo y por lo tanto un $\Delta VC=0\%$.

OBJETIVO 2: Simular, mediante programas de modelado molecular, las posibles implicancias biológicas de las mutaciones noveles halladas en la región codificante.

Para esta parte del trabajo nos propusimos predecir los posibles efectos deletéreos de las diferentes mutaciones halladas en la región codificante de la proteína utilizando un modelado de la proteína humana.

IV.2.1. MODELADO MOLECULAR

Dado que la proteína P450c21 humana no se encuentra cristalizada, fue necesario en primer lugar generar un modelo aproximado de la misma. Para tal fin, se utilizó el programa Biskit (Grünberg y col., 2007) que utiliza como herramienta de modelado al Modeller9.1. (Materiales y Métodos, apartado III.2.1). Se testearon varios templados cristalográficos (entre 4 y 18) de diferentes CYP. El mejor modelado de la P450c21 humana se obtuvo al incluir 18 templados.

Los diferentes dominios de la proteína modelada se muestran en la Figura 34.

IV.2.2. ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS MUTANTES

Una vez generado el modelo de la proteína P450c21 a partir de las plantillas antes mencionadas, se procedió a generar las proteínas mutantes mediante el programa FoldX (www.foldx.crg.es) que permite además analizar la estabilidad de las mismas (representada por la variación de energía libre que presentan o Δ G). Los valores de las diferentes estabilidades proteicas fueron luego utilizados para predecir los posibles efectos biológicos de las proteínas mutantes. Figura 34: Esquema representativo de los diferentes dominios de la proteína 21-hidroxilasa humana generada con Biskit



Las α -hélices (HA-HN) y las hojas plegadas β (A-B) se muestran como tirabuzones y flechas violetas, respectivamente. Los puntos rojos muestran los residuos de unión a ligandos. El símbolo rojo en forma de U horizontal representa los β -hairpin. β y γ : *loops*.

Con el fin de validar nuestro modelo, se estimaron los cambios en la estabilidad de la proteína ($\Delta\Delta G$) que presentaban 40 mutaciones en el gen *CYP21A2* para las cuales se conocía la actividad residual *in vitro*. Para esta validación, utilizamos tanto el modelo semiautomático generado en este trabajo (programa Biskit) y otro modelo descripto previamente (2GEG, Robins y col., 2006). Los resultados de los diferentes $\Delta\Delta G$ calculados se observan en la **Tabla 11**.

	MUTANTE	ΔΔG		ACTIVIDAD RESIDUAL (%)	REFERENCIA
		2GEG	BISKIT		
	p.P30L	0.85	0.92	60	Tusie-Luna y col., 1991
#	p.P30Q	1.48	1.66	0	Lajic y col., 1999
	р.I77 Т	2.51	2.49	3	Krone y col., 2005
*	p.G90V	7.71	2.90	0	Nunez y col., 1999
	p.P105L	5.27	3.59	60	Nikoshkov y col., 1997
	p.L166P	3.58	5.78	0.3	Robins y col., 2007
	p.I171N	3.00	3.45	0.7	Barbaro y col., 2006
*	p.I172N	0.09	2.10	1	Tusie-Luna y col., 1990
	p.G178A	3.35	3.06	19	Nunez y col., 1999
	p.D183E	-0.24	0.07	100	Higashi y col., 1991
#	p.I236N	3.08	0.81	1	Robins y col., 2005
	p.S268C	-0.02	-0.31	93	Wu y Chang, 1991
	p.S268M	-0.54	-1.74	107	Wu y Chang, 1991
_	p.S268T	-0.11	-0.14	100	Wu y Chang, 1991
	p.V281I	-1.04	-1.13	45	Wu y Chang, 1991
_	p.V281L	-1.18	-1.23	50	Wu y Chang, 1991
	p.V281T	1.36	-0.81	10	Wu y Chang, 1991
*	p.G291S	1.00	-0.61	0.8	Wedell y col., 1992
	p.R339H	0.89	0.04	50	Helmberg y col., 1992
*	p.R341P	1.68	2.17	0.7	Barbaro y col., 2006
*	p.E351D	3.15	0.16	3.4	Krone y col., 2005
*	p.E351I	6.64	5.26	0.9	Krone y col., 2005
*	p.E351K	13.42	11.15	1.1	Krone y col., 2005
	p.R354H	9.17	6.43	0	Nuñez y col., 1999
*	p.R356P	0.29	1.50	0.2	Lajic y col., 1997
*	p.R356Q	-1.26	0.25	1	Lajic y col., 1997
*	p.R356W	-0.63	1.34	0	Chiou y col., 1990
	p.E380D	0.38	-0.71	30	Hsu y col., 1999
-	p.A391T	0.82	0.49	38.7	Robins y col., 2007
*	p.R426H	0.66	-0.37	0.5	Barbaro y col., 2007
*	p.C428S	0.26	0.84	0	Wu y Chang, 1991
*	p.A434V	-0.08	-1.32	14	Krone y col., 2005
ļ	p.L446P	6.26	7.60	0.5	Barbaro y col., 2006
	p.P453S	2.71	2.18	68	Nikoshkov y col., 1997
	p.P463L	0.45	0.48	2.6	Krone y col., 2006

 Tabla 11: Cambios en la estabilidad de 40 mutaciones descriptas en la bibliografía que poseen

 estudios funcionales *in vitro*
	MUTANTE	ΔΔG		ACTIVIDAD RESIDUAL (%)	REFERENCIA
	p.R479L	0.42	-0.25	75.5	Robins y col., 2007
	p.P482S	1.54	0.37	72	Barbaro y col., 2004
*	p.R483P	5.06	-0.69	2	Wedell y col., 1993b
*	p.R483Q	1.85	0.25	1.1	Robins y col., 2007
	p.N493S	0.2	-0.22	100	Rodrigues y col., 1987

 $\Delta\Delta G$ refiere a la diferencia de estabilidad de cada mutante respecto de la secuencia proteica salvaje. *Residuos cercanos al grupo HEMO o involucrados en unión a ligandos u otras proteínas. # Residuos excluidos condicionalmente (ver explicación en el texto).

A partir de los cálculos obtenidos, se correlacionó para cada mutante la estabilidad proteica con la actividad residual *in vitro*. Se consideró la actividad residual obtenida con 17-OHP ya que las cristalografías de las diferentes CYP utilizadas como templados fueron obtenidas con este mismo sustrato.

Como se observa en la **Figura 35,** no se halló correlación entre la variación de estabilidad calculada y la actividad enzimática residual de las 40 mutantes. Los resultados fueron similares tanto para el modelo 2GEG como para Biskit.

Sin embargo, es sabido que varias de las 40 mutaciones seleccionadas afectan la actividad de la proteína de manera independiente de la desestabilización de la misma ya que estarían ubicadas en residuos que intervienen en la unión al grupo HEMO, a los sustratos o a otras proteínas como por ejemplo la POR. Por otro lado, el programa FoldX no es confiable respecto a mutaciones cercanas a grupos HEMO. Teniendo esto en consideración, se reanalizó la correlación entre la estabilidad de la proteína y la actividad residual excluyendo aquellas mutaciones (n=15) que afectan este tipo de interacciones.

Los resultados para ambos modelos se muestran en la **Figura 36**. Como se observa, en 18 de las 25 mutantes, se predijo un valor de $\Delta\Delta G$ similar con ambos modelos. Esta concordancia en los resultados sugeriría que las predicciones obtenidas para las mutaciones en estas regiones de la proteína serían confiables. El valor de R^2 obtenido a partir de esta correlación fue de 0,42 para el modelo Biskit y 0,40 para el modelo 2GEG (**Figura 36**). Sin embargo, si las mutaciones p.I236N y p.P30Q son excluidas de este análisis, el R^2 que se obtiene es 0,63 y 0,53 respectivamente, siendo estos últimos valores adecuados para un estudio de modelado molecular.

Figura 35: $\Delta\Delta G$ calculado en función de la actividad residual *in vitro* para 40 mutantes de la proteína P450c21 humana.



Figura 36: $\Delta\Delta G$ estimado en función de la actividad residual de 25 mutantes no involucradas en unión al HEMO, ligandos o sustratos.



Cuadrados blancos: Mutaciones con valor similar de $\Delta\Delta G$ para ambos modelos. Triángulos negros: Mutaciones con valor diferente de $\Delta\Delta G$ para ambos modelos

Capítulo IV- Resultados

El cambio p.I236N no estaría involucrado con el grupo HEMO o con unión a ligandos y/o sustratos. Sin embargo, en trabajos previos se observó que posee un efecto negativo muy marcado sobre la síntesis de la proteína por un mecanismo desconocido (Robins y col., 2005). Este residuo forma parte de las 3 mutaciones del Clu EX6 y cuando se la estudia de forma aislada mediante WB, no se detecta expresión de la proteína. Por otra parte, la mutación p.P30Q se encuentra en una región sin una estructura secundaria predicha, donde ambos modelos pueden no ser lo suficientemente confiables.

Una vez validado nuestro modelo, estudiamos las mutaciones noveles halladas en los pacientes de nuestra cohorte, tanto con Biskit como con 2GEG. La superposición de ambos modelos y los residuos involucrados en las diferentes mutaciones se observan en la **Figura 37**.



Figura 37: Superposición del modelado con Biskit (verde) y 2GEG (naranja)

Los residuos involucrados en las mutaciones nóveles analizadas por modelado molecular, junto con el aminoácido D322 se señalan con flechas.

Los cambios de estabilidad obtenidos en ambos modelos y para cada una de las cuatro mutantes de la región codificante del gen se observan en la **Tabla 12**.

ΜΙΤΑΓΙΟΝ	$\Delta \Delta G$			
MUTACIÓN	BISKIT	2GEG		
p.R132C	0.1±0.06	4.13±0.08		
p.R149C	1.88 ± 0.18	1.68±0.32		
p.M283V	-3.77±0.40	1.69 ± 0.05		
p.E431K	-0.20±0.17	-0.37±0.10		

Tabla 12: Cambios en la estabilidad proteica para las diferentes mutaciones puntuales noveleshalladas en los pacientes de nuestra cohorte

Los cambios en la estabilidad proteica se calcularon como la diferencia entre el ΔG de las diferentes mutantes respecto de la proteína salvaje y fueron evaluados por el programa FoldX tanto para el modelo obtenido por Biskit como para el obtenido por 2GEG. Los valores se expresan como kcal mol-1 con su desvío estándar correspondiente. Valores positivos y superiores a 1,6 kcal mol-1 representan una desestabilización significativa de la proteína mutante respecto a la salvaje.

A continuación se resumen los hallazgos más relevantes para cada una de las mutaciones puntuales teniendo en cuenta su ubicación en la proteína y los cálculos de estabilidad obtenidos.

p.R132C (g.782C>T): La mutación se encuentra en el bucle que conecta las hélices C y D (**Figura 35**) y se encuentra en una región que se sugiere estaría implicada en la interacción redox (Robins y col., 2006). Aunque la estructura tridemensional predicha para esta región fue muy diferente en los dos modelos, en ambos casos la mutante p.R132C interrumpiría interacciones que son normalmente favorables entre los residuos de arginina y otros (R254, A126 y L127 para el modelo 2GEG y P432 para Biskit). Ambos modelos predijeron una desestabilización de la proteína mutante (**Tabla 12**). Sin embargo para el caso de Biskit no se superó el umbral de 1,6 kcal mol-1.

p.R149C (g.940C>T): En ambos modelos se predijo que esta mutación desestabilizaría la proteína. Como se observa en la Figura 38, la C147 se ubicaría cercana a la R149 en la proteína salvaje. Si bien ambos residuos se encontrarían sobre la misma alfa hélice D (Figura 131

34), están orientados en direcciones opuestas y por lo tanto no se espera que se forme un puente disulfuro con la mutación C149. Asimismo, este residuo se encuentra lejano al grupo HEMO. Se infiere, por lo tanto, que el efecto más probable sobre la actividad enzimática sería una desestabilización de la proteína.



Figura 38: Esquema representativo de la alfa hélice D

El residuo C147 con el residuo mutante C149 se muestran en direcciones opuestas

p.M283V (g1695A>G): Esta variante está muy cerca de la mutación p.V281L en la hélice I (Figura 34) y lejos del HEMO. En contraste con lo que se observa para p.V281L (Tabla 11), mientras que para nuestro modelo se predijo que esta mutación puede estabilizar a la proteína, para el modelo 2GEG se predijo una desestabilización de la misma. Estas discordancias podrían estar relacionadas con las diferencias encontradas entre los dos modelos en la estructura prevista para esta región de la proteína, como se observa en la Figura 39.

p.E431K (*g.2515 A>G*): La mutación se encuentra en el comienzo de hélice L (**Figura 34**) y para ambos modelos se predijo que esta variante no desestabilizaría a la proteína, sino que por el contario, la estabilizaría levemente (~ 0,2 kcal/mol) (**Tabla 12**). De todas formas, ninguno de los dos modelos superó el umbral de 1,6 Kcal/mol-1 para considerar una diferencia significativa en la estabilidad con respecto a la proteína salvaje. Sin embargo, analizando la estructura en detalle, este residuo se encontraría expuesto en la superficie de la proteína. En presencia de la mutación se produciría un cambio de un aminoácido de carga

Capítulo IV- Resultados

negativa (ácido glutámico) a uno de carga positiva (lisina). Como se observa en la **Figura 40**, el cambio p.E431K implica un cambio sustancial en la carga de superficie que exhibiría la proteína, afectando potencialmente su interacción con ligandos como por ejemplo la POR. El efecto que esta mutación ejercería sobre la estabilidad de la proteína sería probablemente independiente de la mutación p.D322G que se encontró en el mismo alelo. De acuerdo al modelado, ambas mutaciones se ubicarían lejos en la estructura de la proteína y estarían orientadas en direcciones opuestas (**Figura 37**).

p.L429fs y p.H466fs. Estas mutaciones no pudieron ser evaluadas mediante modelado molecular dado que generan un corrimiento en el marco de lectura con el agregado de muchos aminoácidos en la región carboxi-terminal de la proteína. Ninguna de las cristalografías, por lo tanto, puede ser utilizada como plantilla para incorporar estos aminoácidos al modelo.

Figura 39: Representación de la estructura tridimensional predicha de las regiones cercanas a los residuos V281 y M283 para los modelos Biskit y 2GEG



En verde se muestra el modelado de la región para Biskit y en naranaja el modelado para el 2GEG.



Figura 40: Carga electrostática superficial de la proteína P450c21

Electrostática de la superficie de la proteína de tipo salvaje con el residuo E431 y de la mutante con el residuo K431. Las regiones ácidicas se representan en rojo y las básicas en azul.

OBJETIVO 3: Analizar la expresión *in vitro* de las mutaciones noveles halladas

IV.3.1. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS MUTACIONES EN LA REGIÓN CODIFICANTE

Para evaluar los efectos que producen las mutaciones noveles sobre la actividad residual de la 21-hidroxilasa, se realizaron ensayos funcionales para analizar la expresión y la actividad de las diferentes mutaciones puntuales halladas en la región codificante del gen *CYP21A2*.

Para tal fin, las diferentes mutantes se crearon por mutagénesis dirigida sobre el ADN copia (ADNc) de la proteína salvaje clonado en un vector de expresión (Materiales y Métodos apartado III.3.1.1). Se generaron todas las mutantes puntuales en forma aislada (p.R132C, p.R149C, p.M283V, p.E431K, p.D322G) y para el caso del alelo que poseía 2 mutaciones en *cis* (p.E431K y p.D322G), también se obtuvo la doble mutante. No se incluyeron las 2 mutaciones que generaban cambios en el marco de lectura (p.L429fs y p.H466fs) dado que ambas producían un corrimiento del marco de lectura que conducía a la formación de

proteínas más largas que la secuencia que se encontraba contenida en el vector (Materiales y Métodos, apartado III.3.1.1). Finalmente se creó una mutante adicional, la p.I172N (asociada a la forma VS de la patología), que posee una actividad residual *in vitro* de alrededor del 2% y que se utilizó en los ensayos como control de una mutante con baja actividad enzimática. En todos los casos se secuenció todo el inserto para corroborar que sólo se hubiera generado la mutación deseada. La **Figura 41** muestra electroferogramas representativos de las diferentes mutantes individuales y la **Figura 42** muestra el electroferograma de la mutagénesis obtenida para la doble mutante p.D322G y p.E431K.

Figura 41: Electroferogramas representativos de los diferentes vectores mutagenizados con las variantes en forma aislada



A-F: Vectores con la mutación p.R132C (C>T), p.R149C (C>T), p.M283V (A>G), p.E431K (G>A), p.D322G (A>G) y p.I172N (T>A), respectivamente. Con la flecha se señala la base cambiada y subrayado se muestra el triplete afectado por la mutación.

Figura 42: Electroferograma representativo de la mutagénesis dirigida del vector con las variantes p.D322G y p.E431K



Con las flechas se señalan los nucleótidos mutados, subrayado se muestra el triplete involucrado en cada mutación.

IV.3.1.1. ANALISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las mutantes obtenidas se expresaron transitoriamente en células COS-7. Las actividades enzimáticas se ensayaron mediante cromatografía en placa delgada (TLC) a partir del sobrenadante celular obtenido luego de incubar las células con los dos sustratos naturales para la enzima, progesterona y 17-OHP, marcados radioactivamente. En este sobrenadante celular se estimó la capacidad de conversión de ambos sustratos en sus productos 11-desoxicorticosterona (DOCA) y 11-desoxicortisol, respectivamente (Materiales y Métodos, apartado III.3.1.3). En todos los ensayos, además, se transfectaron células con el vector que no poseía el ADNc (vector vacío o *mock*).

La **Figura 43** y la **Tabla 13** muestran la actividades residuales observadas para cada mutación. Las mismas se expresan relativas a la actividad de la proteína salvaje que se la definió arbitrariamente como 100%. En todos los casos además, las actividades obtenidas se

normalizaron a la actividad de β -galactosidasa obtenida a partir de un vector que se cotransfectó en paralelo (Materiales y Métodos, apartado III.3.1.4).



Figura 43: Porcentaje de actividad enzimática residual de cada mutación

Las diferentes actividades se expresan en comparación con la actividad de la proteína salvaje que se definió arbitrariamente como 100%. Se utilizaron los dos sustratos de la enzíma: 170HP y progesterona. Cada actividad se normalizó a la actividad de β -galactosidasa. Las barras representan el promedio de al menos 3 experimentos para 2 colonias diferentes de cada mutación con su respectivo error estandar. E+D: Doble mutante p.E431K y p.D322G.

	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA			
MUIANIE	17-OHP	PROGESTERONA		
p.R132C	$35,4\% \pm 7,4$	$15,5\% \pm 2,7$		
p.R149C	$35,8\% \pm 14,6$	$47,3\% \pm 12,9$		
p.M283V	$16,2\% \pm 9,3$	$19,0\% \pm 6,8$		
p.E431K	$26,2\% \pm 3,8$	$24,2\% \pm 7,4$		
p.D322G	$41,6\% \pm 8,4$	$32,4\% \pm 16,7$		
E+D	$2,1\% \pm 1,1$	5,63% ± 3,3		

Tabla 13: Actividad enzimática residual de las mutantes puntuales en regiones codificantes

Los valores se expresan como porcentajes y representan el promedio \pm el error estándar de 3 experimentos en los cuales se ensayó cada mutante por duplicado y al menos dos colonias diferentes para cada una. E+D: Doble mutante p.E431K y p.D322G.

Cuando las mutantes fueron ensayadas en forma aislada, en todos los casos se observó una disminución de al menos el 50% en la actividad residual. La mutante p.D322G presentó una actividad residual similar a la hallada en un trabajo previo (Bleicken y col., 2009). De acuerdo a los valores obtenidos, las diferentes mutantes individuales se relacionarían con alelos leves asociados a la FNC de la patología.

Por otro lado, se observó que con la construcción que poseía las mutaciones p.E431K y p.D322G en *cis*, se producía un descenso sinérgico de la actividad enzimática que se asociaría con un alelo moderado relacionado a la forma VS de la patología.

En las condiciones empleadas en este trabajo la mutación p.I172N presentó una actividad residual de $1,2 \pm 0,1\%$.

IV.3.1.2. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

Para determinar si las mutaciones en la región codificante del gen *CYP21A2* afectaban el nivel de expresión de la proteína, se realizaron estudios de *Western blot* (WB) con las proteínas obtenidas a partir de homogenatos de células COS-7 transfectadas con las diferentes construcciones. La **Figura 44** muestra un WB representativo.

Como se observa en la **Figura 44**, se detectó una expresión comparable entre la proteína de tipo salvaje y las mutantes p.R132C, p.R149C y p.M283V. Por otro lado, para las mutaciones p.E431K, p.D322G y p.E431K + p.D322G se observa una menor cantidad de la proteína 21-hidroxilasa.



Figura 44: Análisis de la expresión de las diferentes mutantes por WB.

A: WB representativo de la expresión de la proteína salvaje y de las diferentes construcciones mutagenizadas. **B**: Cuantificación de la expresión por densitometría. Los niveles de proteína de las diferentes construcciones de CYP21A2 se expresaron como la relación entre la densitometría obtenida para CYP21A2 y la β -actina, teniendo en cuenta la actividad de β -galactosidasa como control de eficiencia de transfección. Las barras representan la media \pm el error estándar de 2 extractos diferentes ensayados 2 veces cada uno. E+D: Doble mutante p.E431K y p.D322G.

IV.3.2. ANALISIS FUNCIONAL DE LA MUTACION c.652-2A>G EN LA REGIÓN INTRÓNICA

Como se detalló en el apartado IV.1.4.2 de Resultados, los estudios bioinformáticos predijeron que la mutación c.652-2A>G anularía el sitio aceptor consenso de *splicing*. Asimismo, se predijo la utilización potencial de 2 sitios crípticos, uno ubicado en el medio del intrón 5 y otro ubicado en el exón 6.

Para corroborar estas predicciones, se realizó el estudio funcional de la eficiencia de *splicing* mediante la construcción de un minigén. Este minigén contenía la región desde el exón 4 al 7 del gen *CYP21A2*, salvaje o mutada, clonada en el medio del exón 3 del gen la α -globina y cuya expresión está bajo las órdenes del promotor de la α -globina (Materiales y Métodos apartado III.3.2.1). La identidad de cada inserto se confirmó por secuenciación (**Figura 45**).

Figura 45: Electroferogramas representativos de los insertos salvaje y mutado obtenidos de los alelos de la paciente con la mutación c.652-2A>G



A: Alelo salvaje, B: Alelo mutado. La flecha señala el nucleotido A (salvaje) o G (mutado) en homocigosis.

El minigén así construido se transfectó en células HEK-293, HeLa e Y-1 y la eficiencia de *splicing* se midió por una RT-PCR radioactiva utilizando cebadores que aparean en la región de empalme entre el exón 3 de α -globina y el *CYP21A2*. De esta manera, el producto amplificado sólo correspondía al minigén. Este fragmento de amplificación poseía una longitud de 757 pb si no se producían eventos de *splicing*, mientras que el ADNc salvaje sin intrones presentaría una longitud de 387pb.

Los ensayos funcionales revelaron que en las tres líneas celulares analizadas, tanto la construcción salvaje como la mutada presentaban un solo fragmento producto del *splicing* del minigén. Sin embargo, los mismos eran de diferentes tamaños: la construcción con el minigén mutado presentaba una isoforma de ARNm más corta que la de la construcción salvaje (**Figura 46A**).

A los efectos de verificar la identidad de estos fragmentos, los mismos fueron secuenciados. Este análisis demostró que el producto que se formaba a partir del alelo mutado presentaba una deleción de 16 nucleótidos como consecuencia de la utilización del sitio aceptor críptico de *splicing* dentro del exón 6 (**Figura 46B**). El uso de este sitio provoca que se elimine todo el intrón 5 junto con 16 pb del exón y se produce un corrimiento en el marco de lectura al momento de la traducción de la proteína con la aparición de un codón de terminación prematuro 12 pb rio abajo en la secuencia codificante. La **Figura 46C** resume los eventos mencionados.



Figura 46: Análisis de splicing de los pre-mRNA de tipo salvaje y con la mutación c.652-2A>G

A: Electroforesis representativa en gel de poliacrilamida de los productos radioactivos de la RT-PCR de los mensajeros del minigén salvaje y mutado en 3 tipos celulares diferentes. SVJ: construcción salvaje; MUT: construcción mutante; -T: no transfectado; -RT: sin transcripción reversa; MPM: marcador de peso molecular. **B:** Electroferogramas representativos de los productos de la RT-PCR para la construcción salvaje y mutante. En cada caso se muestra el empalme del exón 5 y 6. Subrayado se muestran los 16 nt del exón 6 presentes en la secuencia de tipo salvaje y ausentes en la mutante. **C:** Diagrama que resume la estrategia utilizada y los resultados obtenidos. Con la cruz se representa el sitio de la mutación. Las letras por encima de la secuencia representan los nuevos aminoácidos que se traducirían por el corrimiento del marco de lectura. La deleción de 16 nt está en cursiva y subrayada. Las flechas rayadas representan los cebadores utilizados en la RT-PCR que abarcan las regiones α -globina y *CYP21A2* en el minigén.

Capítulo IV- Resultados

OBJETIVO 4: Correlacionar el genotipo hallado en los pacientes con el-fenotipo que exhiben.

Como se mencionó anteriormente, mediante la secuenciación del gen *CYP21A2* y luego de realizar las predicciones bioinformáticas y los ensayos funcionales correspondientes, el genotipo se completó en 27 de los 87 pacientes (15 FC y 12 FNC, 100% y 16,6%, respectivamente).

El alto número de alelos que no poseen mutaciones en el gen *CYP21A2* en los pacientes de la FNC señalarían que es probable que los valores de 17-OHP utilizados como límites de corte para su inclusión como afectados estén sobreestimando la prevalencia de la patología.

A los efectos de discriminar si los valores hormonales diferían entre los pacientes FNC totalmente genotipificados y aquellos que no, se compararon los valores de 17-OHP basal y post estimulación con ACTH, así como los de Dehidroepiandrosterona-sulfato (DHEA-S), Testosterona (T) y Androstenediona (A), de 271 pacientes diagnosticados como FNC. Los pacientes fueron agrupados de acuerdo a si poseían los 2 alelos mutados, uno o ninguno luego del estudio de las 10 mutaciones más frecuentes y/o secuenciación. A su vez, los pacientes FNC totalmente genotipificados fueron divididos de acuerdo a si poseían o no un alelo severo, a los efectos de establecer si sus valores hormonales diferían en forma significativa entre sí o con los otros grupos en estudio. En estos grupos de pacientes se analizó también si la edad de aparición de la sintomatología difería.

Asimismo, nos propusimos analizar si los genotipos hallados en los pacientes de nuestra cohorte se correspondían con una o más formas de presentación clínica y si la/s misma/s era/n la/s esperada/s de acuerdo a su genotipo.

La **Tabla 14** resume el número de pacientes incluidos en cada grupo para esta parte del estudio.

	CLÁSI	COS	NO CLÁSICOS				
	PS	VS	L/L	L/S	L/N	S/N	N/N
HOMBRES	25	11	9	9	0	1	0
MUJERES	28	38	83	108	21	11	29
SUBTOTAL	51	47	92	117	21	12	29
TOTAL	98	3			271		

Tabla 14: Pacientes clásicos y no clásicos incluidos para el análisis genotipo-fenotipo

L: alelo leve, S: alelo severo, N: alelo normal, PS: Perdedor de sal, VS: Virilizante simple.

IV.4.1. ANÁLISIS DE PARÁMETROS FENOTÌPICOS EN PACIENTES NO CLÁSICOS Y SU CORRELACIÓN CON EL GENOTIPO

Se analizaron los valores hormonales de 17-OHP basal, 17-OHP post ACTH, A, T y DHEA-S de 271 pacientes de la FNC que tenían las dos mutaciones causantes de la enfermedad luego del estudio de las 10 mutaciones más frecuentes (n=199) o que en su defecto, fueron secuenciados (n=72). Como se mencionó precedentemente, los pacientes fueron agrupados en 5 categorías según la cantidad de alelos mutados y la gravedad de las mutaciones. Para determinar la severidad de cada alelo, se tuvieron en cuenta los datos consignados en la bibliografía o los obtenidos en este trabajo de tesis. Por otro lado, no se incluyeron pacientes con genotipos inciertos, o sea aquellos que por la metodología utilizada en nuestro laboratorio no se hubiera podido determinar si eran homocigotas para una mutación leve o hemicigotas (en este último caso correspondería agruparlos como L/S en lugar de L/L si fueran homocigotas).

Los valores promedio de las hormonas para cada uno de los 5 grupos en estudio se observan en la **Tabla 15**. Las **Figuras 47** y **48** resumen los resultados obtenidos.

GRUPO	17-OHP BASAL	17-OHP POST ACTH	A	Т	DHEA-S
L/L	16,0±1,3	39,2±6,9	4,3±0,5	1,4±0,3	2313,0±306,7
	(94)	(39)	(40)	(44)	(34)
L/S	23,2±1,6	42,3±4,1	5,6±0,3	2,1±0,4	1977,3±203,0
	(108)	(34)	(61)	(56)	(46)
L/N	5,2±0,8	16,0±1,7	3,0±0,5	2,7±2,2	2158,9±291,7
	(21)	(19)	(6)	(7)	(10)
S/N	6,1±0,7	17,3±2,3	2,4±0,7	1,8±0,6	939,9±460,6
	(12)	(10)	(6)	(7)	(5)
N/N	7,5±0,9	18,1±2,4	3,7±0,7	2,8±1,0	1763,6±400,3
	(29)	(19)	(13)	(13)	(13)

Tabla 15: Valores hormonales para cada grupo en estudio

Los valores se expresan como el promedio en ng/ml con su error estándar. L: alelo leve, S: alelo severo, N: alelo normal. 17-OHP: 17-OH Progesterona, A: androstenediona, T: testosterona, DHEA-S: dehidroepiandorstenediona-sulafato. Entre paréntesis se consiga en número de individuos analizados de cada grupo.

Los resultados obtenidos indican que los valores de 17-OHP basal fueron significativamente diferentes entre aquellos pacientes que poseían dos alelos leves (L/L) y aquellos con un alelo leve y uno severo (L/S). Asimismo, se observó que estos 2 grupos de pacientes poseían valores hormonales de 17-OHP basal estadísticamente diferentes a los valores que presentaron tanto los pacientes que poseían un solo alelo mutado, ya sea leve o severo, y los que no poseían mutaciones en ninguna copia del gen (**Figura 47A**).

Al analizar los valores de 17-OHP post ACTH, no se observaron diferencias significativas entre los grupos L/L y L/S, pero si entre ellos y el resto de los grupos en estudio (**Figura 47B**).

Al comparar los valores hormonales de A, T y DHEA-S, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados (**Figura 48**).

Capítulo IV- Resultados

Finalmente, se analizó para los diferentes grupos de genotipos, la edad de aparición de los síntomas. Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 16** y en la **Figura 49**. Como se observa, no se hallaron diferencias significativas para ninguno de los grupos en estudio

Figura 47: Valores de 17-OHP basal o post ACTH para los distintos grupos de genotipos



A: 17-OHP basal (n=264). B: 17-OHP post ACTH (n=121). A la izquierda se grafica la media de los valores hormonales (en ng/ml) de los pacientes con su error estándar. A la derecha se grafican los valores individuales de los pacientes. La barra horizontal representa la media. L: alelo leve, S: alelo severo. N: alelo normal. 17-OHP basal: a vs. b p=0,045; a vs c, p=0,015; b vs. c, p=0,022. 17-OHP post ACTH a vs.b: p=0,03.



Figura 48: Valores hormonales de Androstenediona, Testosterona y DHEA-S para los distintos grupos de genotipos

A: Androstenediona (n=126); B: Testosterona (n=127); C: DHEA-S (n=108). Los valores se expresan en ng/ml. A la derecha se grafica la media de los valores hormonales de los pacientes con el error estándar. A la izquierda se grafican los valores individuales de cada paciente. La barra horizontal representa la media. L: alelo leve, S: alelo severo. N: alelo normal. No se observan diferencias significativas.

GRUPO	N	EDAD
L/L	63	24,2±2,3
L/S	85	20,6±1,3
L/N	19	16,8±2,7
S/N	12	14,7±3,4
N/N	28	20,3±1,5

 Tabla 16: Valores promedios de las edades al momento de la aparición de sintomatología para

 cada grupo en estudio

L: alelo leve, S: alelo severo, N: alelo normal. Los valores de edad se expresan en años como el promedio s con su error estándar. N= número de individuos en cada grupo.

Figura 49: Edades al momento de la aparición de la sintomatología para los distintos grupos de genotipos de los pacientes NC



Los valores se expresan en años. A la izquierda se grafican las medias con los errores estándar para cada grupo en estudio. A la derecha se grafican los valores individuales de cada paciente. La barra horizontal representa la media. L: alelo leve, S: alelo severo, N: alelo normal. No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos estudiados (n=207).

Dado que tanto para 17-OHP basal como post estímulo con ACTH se observaron diferencias significativas entre aquellos pacientes que poseían los dos alelos mutados y aquellos que no, se agruparon a los pacientes de acuerdo a rangos de valores de la hormona a los efectos de analizar cuántos individuos poseían 2, 1 o ningún alelo mutado en cada rango. Utilizamos los datos de 17-OHP post ACTH dado que se postula que estos estudios son menos variables que el dosaje de 17-OHP basal (Street y col., 1997). La prueba de estímulo con ACTH fue

Capítulo IV- Resultados

realizada en 121 de los 271 de la FNC de nuestra cohorte y los pacientes se agruparon en 4 categorías de acuerdo al valor de 17-OHP que presentaron. Los límites superiores de cada intervalo corresponden, en el primer caso, al valor mínimo de 17-OHP en el cual hallamos pacientes con 2 mutaciones. Para los otros intervalos, los valores superiores son relativamente arbitrarios. En el segundo intervalo, el mismo se corresponde a los valores mínimos de 17-OHP post ACTH que se observó en otras poblaciones para los pacientes totalmente genotipificados (Bachega y col., 2000) y el tercer corte se corresponde con los valores hormonales mencionados por otros autores como criterios de inclusión más certeros de la patología (Ezquieta y col., 2002a). La **Tabla 17** y la **Figura 50** resumen los resultados obtenidos.

Como se observa en la **Tabla 17**, a pesar de que los criterios de inclusión de nuestro laboratorio (y de otros a nivel mundial) utilizan un valor de 17-OHP post ACTH mayor a 10 ng/ml, ningún paciente de nuestra cohorte con un valor de 17-OHP post-estímulo menor a 12,5 ng/ml presentaban ambos alelos del gen *CYP21A2* mutados. Más aún, de un total de 22 pacientes que poseían valores de la prueba entre 12,5 y 17 ng/ml, solo 3 poseían las dos mutaciones que explicaban su fenotipo.

Once pacientes presentaron valores entre 17 y 20 ng/ml, de los cuales en 8 de ellos (72,7%) se observaron las dos mutaciones causantes de la enfermedad. Finalmente, 73 pacientes poseían valores de 17-OHP superiores a 20 ng/ml, de los cuales, en 62 (84.9%) se demostró la presencia de 2 mutaciones en el gen *CYP21A2*.

17-OHP POST ACTH (ng/ml)	0-1 MUTACIÓN (N)	2 MUTACIONES (N)	TOTAL	% CON 2 MUTACIONES
≥10<12,5	15	0	15	0
≥12,5<17	19	3	22	13,6
≥17<20	3	8	11	72,7
≥20	11	62	73	84,9
TOTAL	48	73	121	60,3

 Tabla 17: Pacientes de la FNC con 2 mutaciones, 1 o ninguna, agrupados según el rango de valores de 17-OHP post estímulo con ACTH

Figura 50: Representación gráfica de pacientes de la FNC con 2 mutaciones, 1 o ninguna ninguna, según el rango de valores de 17-OHP post estímulo con ACTH



En violeta se muestran los pacientes que poseían sólo uno o ningún alelo *CYP21A2* mutado. En lila se muestran los pacientes con ambos alelos mutados.

IV.4.2. CORRELACIÓN ENTRE EL FENOTIPO OBSERVADO Y EL ESPERADO DE ACUERDO AL GENOTIPO HALLADO EN PACIENTES CLÁSICOS Y NO CLÁSICOS

Con el fin de evaluar si un mismo genotipo puede presentar diferentes fenotipos, se analizaron todos los genotipos que presentaron 98 pacientes C (51 PS y 47 VS) y 209 de los 271 pacientes FNC que presentaban ambos alelos mutados. Entre los pacientes clásicos, no se incluyeron pacientes con genotipos inciertos, o sea aquellos que por la metodología utilizada en nuestro laboratorio no se hubiera podido determinar si eran homocigotas para una mutación o hemicigotas. Para cada caso se consignó el fenotipo esperado teniendo en cuenta los datos de la actividad residual del alelo menos afectado de acuerdo a la literatura, o bien los datos obtenidos en esta tesis. La **Tabla 18** resume los resultados obtenidos cuando se analizaron los fenotipos de aquellos pacientes que presentaban las 10 mutaciones más frecuentes derivadas del pseudogen y la **Tabla 19**, cuando se analizaron los fenotipos de aquellos pacientes o las noveles halladas en este trabajo.

Tabla 18: Genotipos y fenotipos esperados y/o hallados en los pacientes totalmentegenotipificados mediante el estudio de las 10 mutaciones más frecuentes

GENOTIPO	FENOTIPO ESPERADO	FENOTIPO	OBSER	VADO
		PS	VS	NC
p.I172N/p.I172N	VS	0	3	0
p.I172N/p.R356W	VS	1	2	0
p.I172N/p.Q318*	VS	1	3	0
p.I172N/ c.283-13A/C>G	VS	1	14	0
p.I172N/Del o Conv	VS	0	1	0
p.I172N/5´macroconv	VS	0	8	0
p.I172N/Del 8pb	VS	0	2	0
p.I172N/ c.283-13A/C>G - p.Q318*	VS	0	1	0
p.I172N/Clu EX6	VS	0	1	0
p.V281L/p.I172N	NC	0	0	13
p.P30L/p.I172N	NC	0	0	1
p.P453S/p.I172N	NC	0	0	1
p.V281L/p.I172N-p.V281L	NC	0	0	1
c.283-13A/C>G/ c.283- 13A/C>G	PS/VS	7	2	0
p.V281L/c.283-13A/C>G	NC	0	0	32
c.283-13A/C>G /p.R356W	PS/VS	2	1	0
c.283-13A/C>G /Clu EX6	PS/VS	1	0	0
c.283-13A/C>G /Del 8pb	PS/VS	1	0	0
c.283-13A/C>G - p.P453S/Del	PS	1	0	0
c.283-13A/C>G /5´macroconv	PS/VS	4	1	0

GENOTIPO	FENOTIPO ESPERADO	FENOTIPO	OBSER	VADO
c.283-13A/C>G /p.Q318*	PS/VS	3	2	0
c.283-13A/C>G /p.V281L- Clu EX6	PS/VS	1	0	0
c.283-13A/C>G /Del	PS/VS	4	0	0
Clu EX6/Del o Conv	PS	1	0	0
p.Q318*/Del	PS	1	0	0
p.P30L/c.283-13A/C>G	NC	0	0	1
p.V281L/c.283-13A/C>G - p.P30L	NC	0	0	1
p.Q318*/p.Q318*	PS	2	0	0
p.Q318*/p.R356W	PS	2	0	0
p.Q318*/5´macroconv	PS	1	0	0
p.V281L/p.Q318*	NC	0	0	14
p.Q318*/p.R356W-p.P453S	PS	1	0	0
p.Q318*/p.V281L-Ins T EX7	PS	1	0	0
5´macroconv/5´macroconv	PS	2	0	0
5´macroconv/Del	PS	1	0	0
p.V281L/5´macroconv	NC	0	0	12
p.V281L/Del o Conv	NC	0	0	3
p.R356W/Ins T EX7	PS	0	1	0
Del 8pb/Del 8pb	PS	1	0	0
p.V281L/p.R356W	NC	0	0	9
p.P453S/p.R356W	NC	0	0	1
p.V281L/p.R356W-p.P453S	NC	0	0	1
p.V281L/p.V281L	NC	0	0	69
p.V281L/Del 8pb	NC	0	0	6
p.V281L/Clu EX6	NC	0	0	2
p.V281L/Del	NC	0	0	2
p.V281L/p.P30L	NC	0	0	6
p.V281L/p.P453S	NC	0	0	15
p.V281L/p.V281L-Clu EX6	NC	0	0	2
p.V281L/p.V281L,p.V281L	NC	0	0	2
p.V281L/p.V281L,p.Q318*	NC	0	0	1
p.P453S/Del	NC	0	0	1
p.P453S/Del 8pb	NC	0	0	1

5'macroconv: 5'macroconversión; Del 8pb: p.G110_Y112delfs; Clu EX6: p.I236N, p.V237E, p.M239K; Ins T EX7: p.306insT. Para las mutaciones que poseen actividad residual distinta, se consigna primero en el genotipo el alelo con actividad residual más alta. Los números en negrita representan pacientes con genotipo-fenotipo discordante. ¶ Paciente con 3 copias del gen

GENOTIPO	FENOTIPO ESPERADO	FENOTIPO OBSERVADO		RVADO
		PS	VS	NC
p.V281L/ <u>p.R149C</u>	NC	0	0	1
p.V281L/p.R426H	NC	0	0	2
p.V281L/p.D322G, <u>p.E431K</u>	NC	0	0	1
p.V281L/p.R483fs	NC	0	0	1
p.V281L/p.P482S	NC	0	0	2
p.P482S/5´macroconv	NC	0	0	1
p.R479L/5´macroconv	NC	0	0	1
p.M283V /5 macroconv	NC	0	0	1
<u>p.M283V</u> /c.283-13A/C>G	NC	0	0	1
c.283-13A/C>G /p.R341P	PS/VS	1	2	0
p.H62L/c.283-13A/C>G	NC	0	1	0
c.283-13A/C>G /p.R444*	PS/VS	1	0	0
c.283-13A/C>G,p.Q318*/ <u>p.H466fs</u> ¶	PS/VS	1	0	0
p.R356W/p.R483fs	PS	1	0	0
c.283-13A/C>G/p.V281L- p.R483fs	PS/VS	1	0	0
p.R483Q/ <u>c.652-2A>G</u>	VS	0	1	0
p.I172N/ <u>p.L429fs</u>	VS	1	0	0
p.I172N/p.R356Q	VS	0	1	0
p.M1V/Del 8 pb	PS	1	0	0
5´macroconv/p.R444*	PS	1	0	0
p.R444*/p.Q318*	PS	1	0	0
p.R444*/-p.R483W-p.Q318*	PS	1	0	0

 Tabla 19: Genotipos y fenotipos esperados y/o hallados en los pacientes totalmente

 genotipificados que poseían mutaciones menos frecuentes o noveles

Como se observa, el genotipo más frecuente para los pacientes de la FNC fue p.V281L/p.V281L. El mismo estuvo presente en 69 de los 209 pacientes. Asimismo, 130 de los 140 pacientes restantes presentaron al menos un alelo con la mutación p.V281L. Para la forma clásica PS el genotipo más frecuente fue c.283-13A/C>G/c.283-13A/C>G (7/51 pacientes). Por otro lado, 22 de los 44 pacientes restantes presentaron al menos un alelo con la mutación c.283-13A/C>G. Por último, para la forma VS el genotipo más frecuente fue

^{5&#}x27;macroconv: 5'macroconversión; Del 8pb: p.G110_Y112delfs; Clu EX6: p.I236N, p.V237E, p.M239K; Ins T EX7: p.306insT. Las mutaciones noveles se muestran subrayadas. Para las mutaciones que poseen actividad residual distinta, se consigna primero en el genotipo el alelo con actividad residual más alta. Los números en negrita representan pacientes con genotipo-fenotipo discordante. ¶ Paciente con 3 copias del gen

Capítulo IV- Resultados

p.I172N/c.283-13A/C>G (14/47 pacientes) y 40/47 pacientes presentaron al menos un alelo con la mutación p.I172N.

Como se mencionó en la introducción de esta tesis, en la HSC por déficit de 21-hidroxilasa, el fenotipo del paciente se corresponde con el alelo que presenta mayor actividad de la enzima. En el caso de los pacientes de nuestra cohorte, se observa que existiría una alta correlación entre los fenotipos observados y los esperados de acuerdo al genotipo hallado, tanto para aquellos que poseían las mutaciones más frecuentes como para aquellos que poseían mutaciones poco frecuentes o noveles (**Tablas 18 y 19**). Sólo 7 genotipos de un total de 76 (9,2%) se asociaron con formas de presentación clínicas diferentes a la esperada (no se incluyen en este análisis aquellos genotipos que poseen la mutación c.283-13A/C>G ya que la misma puede asociarse tanto con la forma VS como PS, Wilson y col., 1995; Speiser y White, 1998). Es así que 36 de los 40 pacientes clásicos que poseían la mutación p.1172N presentaron la forma VS, pero 4 eran PS. Por otro lado, si bien la mutación p.R356W y la InsT EX7 se asocian generalmente con la forma PS, un paciente compuesto heterocigota para ambas mutaciones presentó la forma VS.

Asimismo, como se observa en la **Tabla 19 y** de acuerdo a los datos de la literatura, en la paciente que poseía la mutación pH62L en heterocigosis compuesta con la mutación c.283-13A/C>G (paciente 384) se hubiera esperado el fenotipo NC a diferencia del VS observado (ver características clínicas de la paciente en el ANEXO 2).

La presencia de ambas mutaciones, p.H62L y c.283-13A/C>G, en *trans* se dedujo al analizar los electroferogramas correspondientes (**Figura 51**). La paciente presentaba un polimorfismo en el intrón 2 (6 o 7G seguidas) que permitió determinar con qué alelo segregaba cada mutación.



Figura 51: Electroferogramas representativos de la paciente 384

Las mutaciones se señalan con flechas. A: Mutación g.185A>T (p.H62L). B: Electroferograma representativo del fragmento reverso y complementario donde se muestra la presencia deducida de g.185A>T (p.H62L) en el alelo portador del polimorfismo g.562-568delG. C: Mutación c.283-13A/C>G en el alelo homólogo.

La mutación p.H62L se encontraba en el alelo con las 6G, mientras que la c.283-13A/C>G se encontraba en el alelo con las 7G. Por otro lado, se descartó que no se hubiera detectado una mutación adicional en alguna copia del gen por falta de amplificación de un alelo (*drop-out*), ya que la paciente presentaba además los polimorfismos de secuencia p.K102R, p.D183E y p.N493S.

-CAPÍTULO V-DISCUSIÓN

Capítulo V- Discusión

El trabajo aquí presentado tuvo como eje central el estudio del principal gen implicado en la etiología de las Hiperplasias Suprarrenales Congénitas: el gen *CYP21A2*. Este gen es el responsable del déficit de la enzima 21-hidroxilasa y su estudio cobra relevancia si se considera que la deficiencia de 21- hidroxilasa es:

- Una de las enfermedades de origen autosómico recesivo más frecuentes.
- La causa del 60% de genitales ambiguos en niñas recién nacidas.
- Una de las pocas enfermedades genéticas con posibilidades terapéuticas de bajo costo y accesibles a la población general, que garantiza una calidad de vida normal.

La sintomatología clínica del déficit de 21-hidroxilasa comprende un amplio espectro de manifestaciones que van desde formas severas con pérdida salina hasta aquellas con signos leves de hiperandrogenismo. Así, la deficiencia de 21-hidroxilasa puede valorarse clínicamente como severa o clásica y leve o no clásica o de presentación tardía. La forma clásica se manifiesta durante el período perinatal con signos clínicos debidos a la falta de producción de aldosterona y/o cortisol, mientras que la no clásica presenta manifestaciones clínicas menos severas después del nacimiento, en la primera infancia, en la pubertad o en la edad adulta y sus principales signos son debidos al exceso de andrógenos (White y Speiser, 2000).

A partir de la realización de pesquisas neonatales, se estima una incidencia media para la formas clásicas (PS y VS) de 1/15000 (Pang y Clark, 1993; White y Speiser, 2000). En nuestro país, por su parte, los datos obtenidos del Programa de Pesquisa Neonatal de la Ciudad de Buenos Aires en el 2010 estimaron una incidencia de 1/16.650 (Programa de pesquisa Neonatal de la Ciudad de Buenos Aires, Ley 1808, datos del año 2010). Para la FNC se estima una prevalencia de 1/100 a 1/1000, dependiendo del origen étnico de los afectados (Speiser y col., 1985; Dumic y col., 1990). Si bien las manifestaciones clínicas en las mujeres

Capítulo V- Discusión

son evidentes (pubertad precoz, trastornos menstruales, poliquistosis ovárica, hirsutismo o infertilidad), se considera que existe un subdiagnóstico en los varones de la FNC- así como también en los varones con la forma VS- ya que es difícil que lleguen a la consulta por síntomas de hiperandrogenismo. Aquellos afectados que no hayan presentado pubarca temprana probablemente no sean diagnosticados, pues no es una práctica frecuente solicitar dosaje de 17-OHP en los varones que consultan por infertilidad. En los varones nacidos con la forma perdedora de sal de la enfermedad, la situación puede ser aún más grave dado que el niño puede morir con una crisis de deshidratación durante su primer mes de vida sin que previamente se haya sospechado la enfermedad. En estos casos, la pesquisa neonatal es el medio más importante para su detección.

La variabilidad de las formas clínicas es una manifestación del grado de actividad residual que presenta la enzima. La deficiencia enzimática se debe a mutaciones en el gen *CYP21A2* y debido al carácter autosómico recesivo de la patología, ambas copias del gen deben estar alteradas para que la patología se exprese clínicamente. El significado clínico de poseer una mutación en una de las copias del *CYP21A2* aún no ha sido determinado. Si bien no parece ejercer una desventaja reproductiva, podría causar signos de hiperandrogenismo en mujeres adultas (Dolzan y col., 1999; Lajic y col., 2002; Admoni y col., 2006).

Las deleciones de *CYP21A2* y las grandes conversiones, se encuentran fundamentalmente en pacientes con la forma clásica, si bien, la mayor parte de los afectados presentan mutaciones puntuales. Hasta el presente se han descripto más de 240 mutaciones (<u>www.hgmd.ff.ac.uk</u>), siendo las más frecuentes aquellas que derivan del psuedogén *CYP21A1*.

Aproximadamente, un 75% de los individuos con la deficeincia de 21-hidroxilasa son compuestos heterocigotas (Finkielstain y col., 2011; Yoo y col., 2013) por lo que presentarán mutaciones diferentes en ambos alelos del gen. El fenotipo se corresponderá con el alelo que

Capítulo V- Discusión

presenta mayor actividad enzimática, o sea el alelo menos afectado (Speiser y col. 1992; Wedell y col., 1994; Ezquieta y col., 1995; Bachega y col., 1998). En el caso de los pacientes de la FNC, se describió que aproximadamente hasta el 70% poseen en uno de sus alelos una mutación severa asociada a la forma clásica (Witchel y Azziz, 2010; Finkielstain y col., 2011). Es por este motivo, que conocer la actividad residual de las diferentes mutaciones del gen *CYP21A2* es sumamente necesario para poder asesorar de una manera correcta y certera al paciente sobre su clínica y sobre el riesgo a su descendencia. Por otro lado, y teniendo en cuenta que se estimó que la frecuencia de portadores de mutaciones severas en la población general es de 1/60 (Pang y col., 1988), el riesgo de estos pacientes de tener hijos con forma FC (VS o PS) sería de alrededor 1/480 (si se considera una probabilidad *a priori* del 50% de poseer un alelo severo), mucho mayor que 1/15000 esperado en la población general. Asimismo, se estimó que la frecuencia de portadores de mutaciones leves asociados a la FNC es de 1/16. Por lo tanto, estos pacientes tienen un riesgo de aproximadamente 1/32 de tener hijos con FNC a diferencia del riesgo poblacional de 1/1000.

Conocer las mutaciones responsables del cuadro clínico permite reconocer los riesgos, asesorar a los pacientes y tomar las medidas preventivas oportunamente. Más aún, teniendo en cuenta la alta frecuencia de individuos portadores en la población general, actualmente siempre se sugiere el estudio molecular de las parejas de los afectados clásicos, y para los pacientes con FNC, en el caso que posean uno de sus alelos con una mutación severa (Forest, 2004; Alba y col., 2009).

Otro aspecto a considerar en la deficiencia de 21-hidroxilasa, es que los signos clínicos de los pacientes de la FNC se superponen con los que presentan los pacientes con hiperandrogenismo de otro origen. A diferencia de lo que sucede con la deficiencia de 21-hidroxilasa, otros tipos de hiperandrogenismo son en la mayor parte de los casos de causa

Capítulo V- Discusión

multifactorial. Es muy importante, por lo tanto, realizar un diagnóstico certero que permita diferenciar ambas patologías ya que el asesoramiento genético será diferente en cada caso. Un afectado con deficiencia de 21- hidroxilasa posee ambos alelos con alteraciones que podrán variar en su severidad y que podrá trasmitir a su descendencia. Sin embargo, si se excluye que el afectado posea deficiencia de 21-hidroxilasa, el riesgo de trasmitir hiperandrogenismo a la descendencia es menor y dependerá tanto de factores genéticos como ambientales (dieta, estilo de vida, etc.). Por lo tanto, en la actualidad, el análisis molecular es el método diagnóstico definitivo y de elección para confirmar manifestaciones clínico-hormonales dudosas, así como para brindar un correcto asesoramiento genético y estimar el riesgo certero de descendencia con la forma clásica de la enfermedad.

Nuestro grupo de trabajo se abocó al estudio de esta patología en la población de Argentina desde el año 1998. En un trabajo previo se estimó la incidencia de las 10 mutaciones más frecuentes causantes de HSC por déficit de 21-hidroxilasa en nuestra población (Dain y col., 2002). Con este análisis se logró genotipificar completamente al 85% de los pacientes clásicos, caracterizando el 95% de los alelos. Una situación un poco diferente resultó para los pacientes no clásicos, en los cuales se genotipificaron completamente solo el 61% de los pacientes, y alrededor del 70% de los alelos. Por consiguiente era de esperar la presencia de mutaciones menos frecuentes o noveles en la zona del gen estructural o en zonas regulatorias en aquellos pacientes en los que restaba determinar al menos un alelo.

Sin embargo, y en forma no excluyente, era posible que los valores hormonales considerados como límite de corte para la inclusión de pacientes de la forma no clásica, estuvieran sobreestimando la frecuencia de la patología.

Por otro lado, y dado el alto número de alelos sin determinar, no fue posible estimar en los estudios previos realizados, si los genotipos hallados en los pacientes se correlacionaban en

Capítulo V- Discusión

con el fenotipo que exhibían, tal como se observaba en un alto porcentaje en varios trabajos realizados en otras poblaciones.

Por lo tanto, el primer objetivo de este trabajo de tesis fue analizar la presencia de mutaciones noveles o menos frecuentes en pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa en los que restaba determinar al menos un alelo luego de la búsqueda de las 10 mutaciones más frecuentes derivadas del pseudogén. Este estudio se realizó en muestras de ADN de 87 pacientes (72 FNC y 15 FC) en las cuales se analizaron las regiones codificantes, intrónicas y promotoras basales del gen *CYP21A2* por secuenciación.

Mediante este abordaje, hallamos 12 mutaciones poco frecuentes descriptas previamente en la bibliografía en 22 alelos, y 10 cambios no descriptos, 6 de ellos en la región codificante del gen, 2 en la región promotora basal y 2 en los intrones. Como se discutirá más adelante y como se consignó en resultados, las 2 mutaciones en la región promotora y una de las mutaciones halladas en uno de los intrones fueron, *a priori*, consideradas polimorfismos. Considerando que una de las mutaciones noveles fue hallada en 3 pacientes, se hallaron 9 alelos con mutaciones no descriptas previamente. En total se hallaron 19 variantes que no derivan del pesudogén y que se relacionarían con la aparición de la patología en los pacientes de nuestra cohorte.

Si consideramos un total de 375 pacientes de nuestra cohorte (271 FNC y 98 FC que fueron incluidos en este estudio y 3 FC y 3 FNC que habían sido excluidos por genotipo incierto) y que representan 717 alelos no relacionados, la frecuencia hallada de mutaciones poco frecuentes fue de 3,07%. Esta frecuencia es compatible con lo observado en otras poblaciones donde la prevalencia de mutaciones raras varía entre 1,8 y 3,3% (Stikkelbroek y col., 2003; Bas y col., 2009; Finkielstain y col., 2011; Krone y col., 2013). Por su parte, la frecuencia de mutaciones noveles en nuestra muestra de pacientes fue de 1,25 %, similar a lo reportado de

Capítulo V- Discusión

1,6% para la población de EE.UU (Finkielstain y col., 2011) y de 1,7% para la población de Alemania (Krone y col., 2013). En la población brasilera sin embargo, la frecuencia de mutaciones noveles asciende al 4,1% (Bachega y col., 2004).

En cualquier caso, hay que considerar que aquellos pacientes que presentaban las 2 mutaciones más frecuentes derivadas del pseudogén no fueron secuenciados en nuestro grupo de pacientes. Por lo tanto, no se puede descartar que alguno de estos pacientes pueda a su vez presentar una mutación menos frecuente o novel asociada con otra de las mutaciones más frecuentes derivadas del pseudogén y por lo tanto las frecuencias podrían ser algo diferentes.

V.1. CAMBIOS HALLADOS EN REGIONES CODIFICANTES DEL GEN *CYP21A2* V.1.1. MUTACIONES MENOS FRECUENTES YA DESCRIPTAS PREVIAMENTE EN LA LITERATURA

En nuestro grupo de pacientes, las mutaciones poco frecuentes que no derivan del psudogén se hallaron mayoritariamente en la FC de la enfermedad (14 pacientes, 9 PS y 5 VS). En la FNC, 9 pacientes presentaron una mutación poco frecuente.

Mutación p.M1V: Esta mutación fue hallada en una paciente de nuestra cohorte con la forma PS de la patología que presentaba en el alelo homólogo la mutación Del 8pb (p.G110_Y112delfs) que posee una actividad residual nula.

La p.M1V fue descripta por primera vez por Tardy (Tardy y col., 2007) junto con otra mutación en el mismo residuo, p.M1L, y en ambos casos los pacientes presentaban la forma PS. Previamente, en el mismo residuo se había descripto la mutación p.M1I también en una paciente PS (Usui y col., 2003). Los fenotipos de los pacientes, tanto de aquellos descriptos en la literatura como el que exhibía el paciente de nuestra cohorte, es consistente con lo

Capítulo V- Discusión

esperado ya que se prevé que mutaciones en el codón de iniciación generen cambios severos en la actividad enzimática de cualquier proteína.

Mutación p.H62L: Esta es la mutación más frecuente dentro de las mutaciones en el gen *CYP21A2* que no derivan del psudogén. Hasta el presente se hallaron 33 pacientes con esta mutación, la mayoría de ellos con una segunda mutación en el mismo alelo (Ezquieta y col., 2002b; Menassa y col., 2008; Soardi y col., 2008; Nagasaki y col., 2009; Coeli y col., 2010; Chang y col., 2011; Krone y col., 2013).

La mutación p.H62L fue descripta por primera vez por Ezquieta y col. (Ezquieta y col., 2002b). Más tarde los estudios funcionales demostraron que esta mutación en forma aislada se relaciona con la FNC de la enfermedad, con una actividad residual de 44,5 y 20,7% al utilizar 17-OHP o progesterona como sustrato, respectivamente. Si además existe otra mutación leve en *cis*, el alelo se asocia a la forma VS de la enfermedad con actividades residuales de 4,1 y 2,3% de acuerdo al sustrato ensayado (Soardi y col., 2008; Menassa y col., 2008). Sin embargo, como se discutirá más adelante en este capítulo, en nuestro grupo de pacientes la mutación fue hallada en forma aislada y en una mujer con la forma VS. Esta paciente, presentaba en el otro alelo la mutación c.283-13A/C>G, mutación que posee una actividad residual baja relacionada con las formas VS/PS (Higashi y col., 1991).

Mutación p.D322G: Esta mutación fue descripta por primera vez en el año 2006 (Loidi y col., 2006), donde se la asoció a la FNC de la deficiencia. Más tarde, los estudios funcionales corroboraron que la actividad residual de la enzima en presencia de esta mutación era del 18 y del 27% con 17-OHP y progesterona, respectivamente, y por lo tanto se trataba de un alelo leve (Bleicken y col., 2008).

En este trabajo, la mutación se halló en una paciente con la FNC, tal como se describe en la bibliografía, pero que presentaba en *cis* la mutación novel p.E431K y en alelo homólogo la

mutación p.V281L. Como se discutirá más adelante, los ensayos funcionales realizados en este trabajo corroboraron que la mutación p.D322G se asocia en forma aislada con un alelo leve.

Mutación p.R341P: En este trabajo hallamos esta mutación en 3 pacientes de la FC, 1 de ellos PS y los otros 2 VS. Todos ellos presentaron en el alelo homólogo la mutación c.283-13A/C>G. Las diferencias en los fenotipos observados serían esperables, si el fenotipo estuviera determinado por la mutación c.283-13A/C>G, dado que está ampliamente documentado que la misma se asocia con ambas formas clínicas (Wilson y col., 1995; Speiser y White, 1998; Bas y col., 2009; Finkielstain y col., 2011; New y col., 2013).

El grupo de Balsamo y col. (Balsamo y col., 2003) halló la mutación p.R341P en un paciente VS que presentaba en su alelo homólogo la mutación Del 8pb (p.G110_Y112delfs). Más adelante, los estudios funcionales corroboraron la asociación con dicha forma clínica, ya que con los 2 sustratos de la 21-hidroxilasa, la mutante mostró una actividad residual cercana al 1% (Barbaro y col., 2006). Por su parte, el grupo de Pinto y col. (Pinto y col., 2003), halló la presencia de esta mutación en homocigosis en 2 hermanos con un fenotipo intermedio entre la FNC y la VS y Tardy y col. (Tardy y col., 2010) hallaron esta mutación en 8 de sus pacientes, todos ellos VS.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, y aun considerando a la mutación c.283-13A/C>G como severa, en el paciente PS de nuestra cohorte existiría una discrepancia entre el fenotipo esperado y el observado. Esta discrepancia se analizará en detalle más adelante.

En el residuo R341 se ha descripto también la mutación p.R341W en heterocigosis compuesta con la deleción del gen en un paciente con fenotipo FNC (New y col., 2013). Recientemente se han realizado los estudios funcionales de dicha mutación, los cuales revelan que la misma se asocia a la forma VS, con una actividad residual del 4-5% (Barbaro y
Capítulo V- Discusión

cl., 2014). Mediante análisis bioinformáticos se propuso que el residuo R341 interviene en interacciones con la POR (Haider y col., 2013). Al contrario de lo expuesto por Barbaro y col., estos autores proponen que una mutación que dificulta estas interacciones, como es el caso de las mutaciones p.R341P y p.R341W, se asociarían a la FNC de la enfermedad. Sin embargo, los datos de los pacientes reportados en la bibliografía y de los pacientes descriptos en esta tesis con p.R341P, no concuerdan con estas predicciones.

Mutación p.R356Q: Esta mutación fue descripta por Lajic y col. (Lajic y col., 1997) junto con otra mutación en el mismo residuo, la mutación p.R356P. Los autores realizaron también estudios funcionales para ambas mutaciones; la mutación p.R356Q se asoció con la forma VS (actividad cercana al 1%) y la p.R356P con la forma PS (actividad de 0,15% con ambos sustratos). Por otro lado, en este mismo residuo se encuentra la mutación p.R356W que forma parte de las 10 mutaciones más frecuentes derivadas del pseudogén (Chiou y col., 1990). Los estudios funcionales para esta mutación revelaron que no existía actividad enzimática y por lo tanto se la relacionó con la forma PS (Chiou y col., 1990).

La paciente de nuestra cohorte que presentó la mutación p.R356Q, posee en el alelo homólogo la mutación p.I172N y exhibe un fenotipo VS de la enfermedad. Con estos datos, podemos inferir que la mutación p.R356Q en nuestra paciente se relaciona con un alelo clásico, pero no podemos dilucidadr si se asociaría a la forma VS o PS. En discordancia con todo lo mencionado, New y col. (New y col., 2013) hallaron un paciente con la mutación p.R356Q y la mutación c.283-13A/C>G en el alelo homologo, cuyo fenotipo se asociaba a la FNC. También describieron 2 pacientes con el genotipo p.R356P/Del, uno VS y el otro NC. Los 3 pacientes descriptos por estos autores fueron secuenciados y analizados mediante Southern blot y no presentaron ninguna otra mutación ni duplicación del gen. Por lo tanto, la forma clínica a la que se asociaría esta mutación aún no está clara.

Capítulo V- Discusión

Mutación p.R426H: Esta mutación fue descripta en 2 hermanas con la forma PS por lo que se la asoció, en principio, con esta forma clínica de la enfermedad (Baumgartner-Parzer y col., 2001). Sin embargo, los estudios funcionales posteriores reportaron una actividad residual de alrededor del 1% que se asociaría con la forma VS (Barbaro y col., 2006). En nuestro grupo de pacientes, esta mutación se encontró en 2 mujeres de la FNC pero que en el alelo homólogo presentan la mutación p.V281L compatible con el fenotipo que poseen. Por lo tanto, al menos por nuestros pacientes, no es posible discriminar si este alelo se asocia a la forma PS, VS o incluso NC. De cualquier manera, de los datos de bibliografía se puede al menos estimar que se trataría de un alelo severo.

Por otro lado, en el mismo residuo, se describió la mutación p.R426C en una paciente VS con la mutación p.I172N en el alelo homólogo. Estudios funcionales para dicha mutante revelaron una pérdida total de la actividad enzimática, relacionándola con la forma PS (Grischuk y col., 2006). Por otro lado, en el trabajo de Krone y col. (Krone y col., 2013), hallaron pacientes que poseen las mutaciones p.R426H y p.R426C y en ambos casos los clasifican dentro del grupo de alelos nulos. New y col. (New y col., 2013), por su parte, reportaron ambas mutaciones en pacientes PS, pero también reportaron otro paciente con genotipo p.R483P/p.R426H que exhibía un fenotipo FNC aunque ambas mutaciones están relacionadas a la FC.

Mutación p.R444:* Esta mutación fue hallada por Loidi y col. (Loidi y col., 2006) en 7 pacientes clásicos y se la asoció a la forma PS.

En nuestro grupo de pacientes, se detectó la mutación en 4 pacientes con la forma clínica PS, en concordancia con lo reportado en la bibliografía. Evidentemente, es una mutación bastante frecuente dentro de las mutaciones poco frecuentes no derivadas del pseudogén, por lo menos dentro de la población española y de nuestra población. Sin embargo, New y col. (New y col., 2013), hallaron esta mutación sólo en 1 paciente PS luego de analizar 1507 familias. Si bien no se realizaron ensayos funcionales, el hecho que todos los pacientes hasta ahora reportados sean PS, indicaría que la actividad residual de esta enzima mutada debe ser nula.

Mutación p.R479L: Esta mutación fue descripta en un paciente con la FNC de la patología (Zeng y col., 2004). Luego, los estudios funcionales revelaron que la mutante presenta una actividad residual del 76-80% (Robins y col., 2006).

La paciente de nuestra cohorte que presentó esta mutación poseía un fenotipo FNC y en el alelo homólogo una 5´macroconversión. Por lo tanto, de forma consistente con la bibliografía, el alelo con la mutación p.R479L estaría relacionado con un alelo leve que predice una FNC de la patología.

Mutación p.P482S: La mutación fue descripta por primera vez por Balsamo y col. (Balsamo y col., 2000). Los estudios funcionales fueron realizados luego por Barbaro y col. (Barbaro y col., 2004), en donde demostraron que la mutación presentaba una actividad residual de70-72%. En ese trabajo, además, los autores reportan 7 pacientes con la FNC de la enfermedad que presentan la p.P482S y sugirieron que la misma estaría asociada al haplotipo ancestral *HLA*-A*2, B*41, DR*4. Todos los pacientes eran de origen italiano, por lo que se propuso un efecto fundador para la presencia de esta mutación. Recientemente se describió otro paciente con esta mutación y la mutación severa c.283-13A/C>G en el alelo homólogo, con fenotipo FNC (New y col., 2013).

En nuestros pacientes, la mutación p.P482S se encontró en 3 pacientes con la FNC, todos con la mutación p.V281L en el alelo homólogo. Estudios realizados en nuestro grupo de trabajo demostraron, además, que todos los pacientes presentaban una variante novel en una región regulatoria distal del gen *CYP21A2* (Fernández C., 2014) y el haplotipo *HLA*-A*2, B*41. Por lo tanto, estos resultados avalan el posible origen ancestral de la mutación.

Capítulo V- Discusión

Mutaciones p.R483W, p.R483Q y p.R483fs: En la bibliografía, la mutación p.R483W fue descripta por primera vez en homocigosis en una paciente con la forma PS (Kharrat y col., 2004). Sin embargo los estudios funcionales realizados años más tarde reportaron una actividad residual de alrededor del 3 % respecto a la proteína salvaje (Jiang y col., 2012) que la relacionaría a la forma VS de la enfermedad. Sin embargo, recientemente se describió otro paciente con la mutación p.R483W en homocigosis con fenotipo PS (New y col., 2013).

La mutación p.R483Q se describió por primera vez en un niño que presentaba el genotipo p.R483Q/Del que exhibía un fenotipo FNC (Stikkelbrock y col., 2003). Posteriormente, se describieron dos niñas con esta mutación con síntomas clínicos y valores hormonales compatibles con la forma clásica VS (Robins y col., 2006; Ono y col., 2008). Los ensayos funcionales mostraron una actividad del 1,1 y 3,8% respecto a la proteína salvaje al utilizar 17-OHP y progesterona como sustrato, respectivamente (Robins y col., 2006, Ono y col., 2008). Teniendo en cuenta que la distinción entre VS y la FNC es más difícil en los hombres, es posible que mutación p.R483Q se relacione con un alelo moderado más que a uno leve.

La mutación p.R483fs fue descripta asociada a un fenotipo PS (Wedell y col., 1992). La mutación genera un corrimiento en el marco de lectura que da como resultado una proteína mucho más extensa que la salvaje que anularía la actividad de la misma. Krone y col. relacionan a esta mutación con un alelo nulo (Krone y col., 2013) y a su vez, Marino y col. (Marino y col., 2011), hallaron un alto porcentaje (2,9%) de pacientes clásicos de la población de Argentina con la mutación p.R483fs.

En esta tesis, estas mutaciones se hallaron tanto en pacientes clásicos como en pacientes no clásicos. Los genotipos observados fueron: <u>p.R483W</u>,p.R444*/p.Q318* en una paciente PS, <u>p.R483Q</u>/c.652-2A>G en una paciente VS y p.V281L/<u>p.R483fs</u> y c.283-13A/C>G/p.V281L-<u>p.R483fs</u> en 2 pacientes con FNC y PS, respectivamente. Dado que las mutaciones de interés se encuentran con otras mutaciones en *cis* (p.R444*), o presentan en el alelo homólogo una mutación leve (p.V281L), una mutación con variabilidad fenotípica (c.283-13A/C>G) o una mutación novel (c.652-2A>G), es difícil inferir la forma clínica a la que se relacionaría cada mutación en base a los pacientes de nuestra cohorte.

Por otro lado, la frecuencia hallada para la mutación <u>p.R483fs</u> en nuestra cohorte fue de 0.27% (2/717 alelos no relacionados), muy diferente a lo reportado con anterioridad por Marino y col. (Marino y col., 2011). Sin embargo, se debe considerar que para nuestro equipo de trabajo esta mutación no constituye una de las mutaciones que se analiza como parte de las mutaciones más frecuentes, a diferencia de lo que ocurre con el otro grupo. Por lo tanto, no podemos descartar que esta mutación se encuentre también en aquellos pacientes de nuestra cohorte que no fueron secuenciados.

Es de resaltar la gran cantidad de cambios involucrados en el residuo R483. De hecho y además de los mencionados, en la bibliografía también se describe la mutación p.R483P. Si bien ninguno de nuestros pacientes posee esta mutación, los estudios funcionales para esta mutación revelaron una actividad de entre el 1 y el 2 % que se asociarían a una forma VS/PS (Nikoshkov y col., 1998). El grupo de New y col. (New y col., 2013), describe un paciente con el genotipo p.R483P/Del con fenotipo PS y otros 2 pacientes VS. Sin embargo, en el mismo trabajo se describe un paciente NC con el genotipo p.R483P/p.R426H cuyo fenotipo no correlacionaría con su genotipo. El grupo de Krone y col., por su parte, relaciona esta mutación con un alelo moderado, asociado a la forma VS (Krone y col., 2013).

Las diferentes formas clínicas presentes para el residuo R483 se deberían a que la Arg483 se encuentra dentro de un tramo de aminoácidos altamente conservados en mamíferos (Wedell y col., 1993b). A su vez, este residuo se encuentra en el extremo carboxi-terminal involucrado en un puente salino con el residuo D322 de la hélice J (Haider y col., 2013). Tanto el residuo

Capítulo V- Discusión

W como Q y P son aminoácidos polares o no polares, pero sin carga; en cambio el aminoácido R posee carga positiva. Los diferentes residuos (W, Q y P) por los que puede cambiar la R483, alterarían de diferente forma esta interacción y por lo tanto la actividad de la proteína.

IV.1.2. MUTACIONES NOVELES HALLADAS EN LA REGIÓN CODIFICANTE DEL GEN EN PACIENTES DE NUESTRA POBLACIÓN

En este trabajo de tesis se hallaron 6 cambios de secuencia noveles en la región codificante del gen *CYP21A2*. Cuatro de ellos corresponden a cambios puntuales, y 2 se corresponden con inserciones/deleciones de 1 y 2 bases, respectivamente, que dan lugar a un corrimiento del marco de lectura en la proteína resultante.

Los 4 cambios puntuales de la región codificante del gen, p.R132C, p.R149C, p.M283V y p.E431K, se hallaron en 6 pacientes de la FNC de la enfermedad. Por otro lado, los cambios que generan corrimiento del marco de lectura, p.L429fs y p.H466fs, se hallaron en 2 pacientes con la forma PS. En todos los casos que fue posible (excepto para la paciente que poseía la p.R132C y una de las que poseía la p.M283V donde no hay mutaciones en el alelo homólogo, ver más adelante), se corroboró que las mutaciones detectadas estuviesen en *trans*, ya sea mediante secuenciación de los ADNs parentales, mediante PCRs alelo específicas o infiriendo su ubicación en *trans* mediante la metodología utilizada. Solo en los pacientes con genotipo c.283-1313A/C>G/p.M283V y c.283-13A/C>G,p.Q318*/p.H466fs, no fue posible acceder a los ADNs parentales ni realizar PCRs alelo específicas dada la ubicación de las mutaciones en el gen ya que no era posible secuenciar un fragmento que cubra la región con todas las mutaciones. En estos 2 casos, se asumió que las mutaciones se ubicaban en alelos diferentes.

Capítulo V- Discusión

Los estudios realizados en individuos de la población general nos permitieron descartar, en principio, que estos cambios se trataran de polimorfismos comunes, dado no se observó su presencia en los 100 cromosomas analizados.

Históricamente, se considera que un polimorfismo es aquella variante de secuencia que se encuentra en al menos 1 de 100 cromosomas de individuos de la población general. Sin embargo, se sugiere analizar 298 cromosomas para garantizar un 95% de probabilidad de encontrar una variante con una frecuencia del 1% en la población general y asegurarse así que el cambio hallado no se trate de un polimorfismo poblacional (Bell y col., 2008). Por lo tanto, existiría la posibilidad que con nuestro análisis en 100 cromosomas no hubiésemos detectado sujetos de la población general que los posean. De cualquier manera, es poco probable que estas variantes sean polimorfismos comunes en la población, ya que no fueron hallados en los otros pacientes analizados en este estudio, a excepción de la mutación p.M283V. Otras variantes consideradas fehacientemente como polimorfismos del gen como por ejemplo g.-281insT, g.-332insG, p.K102R, p.D436E y p.N493S (www.hgmd.ff.ac.uk), fueron, por el contrario, muy comunes entre la mayor parte de los pacientes analizados (ver capítulo de Resultados, Tabla 9).

Con el objetivo de pre-establecer si las mutaciones halladas pudieran tener efecto deletéreo, se compararon las regiones aminoacídicas implicadas en las mutaciones halladas de 7 CYP21 de diferentes especies de mamíferos. Todas las CYP21 analizadas presentaban entre si una identidad de secuencia superior al 70%, y en algunos casos la identidad de secuencia fue cercana al 94%. Observamos que las 4 mutaciones puntuales se ubicaban en residuos que se hallaban totalmente conservados en las distintas CYP21 analizadas. En forma similar, los 2 cambios que provocan corrimiento del marco de lectura, afectaban a varios residuos altamente conservados en la región carboxi-terminal de la proteína. Este análisis junto con el

Capítulo V- Discusión

de los individuos de la población general, nos llevó a clasificar a los 6 cambios hallados en la región codificante del gen como mutaciones y por lo tanto se esperaba que afecten a la actividad enzimática de la 21-hidroxilasa.

Mutación p.R132C: Esta mutación fue hallada como única mutación en una paciente con manifestaciones clínicas y bioquímicas compatibles con la FNC de la patología. A pesar de que se secuenció todo el gen estructural y las secuencias promotoras mínimas, no se encontraron otras mutaciones. Más aún, las regiones regulatorias del gen también fueron secuenciadas y no se hallaron mutaciones (Fernández C, 2014). Estos resultados, si bien no serían los esperados para una paciente con deficiencia de 21-hidroxilasa, no son sorprendentes dado que existen trabajos previos de la literatura que dan cuenta de la ausencia de mutaciones en pacientes con diagnóstico clínico y bioquímico de la deficiencia (Wilson y col., 1995; Jaaskelainen y col., 1997; Nimkarn y col., 1999; Krone y col., 2000; Bachega y col., 2004, Barbaro y col., 2004; Dolzan y col., 2005, Araujo y col., 2007, Finkeieltein y col., 2011, Krone y col., 2013).

De hecho, y como se describió en la introducción de esta tesis, las características fenotípicas de los pacientes con hiperandrogenismo son en general indistinguibles de aquellos afectados con la FNC de la deficiencia de 21-hidroxilasa. Varios autores sugirieron que la presencia de una mutación en el gen *CYP21A2* predispone al desarrollo de signos de hiperandrogenismo e incluso a exhibir valores de 17-OHP post ACTH similares a los descriptos para pacientes con la FNC de la enfermedad (Dolzan y col., 1999; Admoni y col., 2006). De cualquier manera, los valores de 17-OHP basal y post ACTH en esta paciente (3,6 y 34 ng/ml, respectivamente), superan ampliamente los valores de corte utilizados para el diagnóstico de la FNC de la deficiencia de 21-hidroxilasa, ya sea por nuestro laboratorio como de otros a nivel mundial (Dain y col., 2002; Speiser y col., 2012). De todas formas, Admoni y col. (Admoni y col.,

Capítulo V- Discusión

2006) detectaron portadores de una mutación en el gen *CYP21A2* con signos de hiperandrogenismo y valores de 17-OHP post ACTH de hasta 55 ng/ml. Los autores, sin embargo, no analizaron a estos individuos mediante secuenciación, por lo que no se puede descartar la presencia de otra mutación menos frecuente o novel en el alelo homólogo.

Por otro lado, algunos autores sugirieron que la pubarca prematura y la aceleración de la edad ósea están siempre presentes en los afectados con FNC, mientras que otros signos de hiperandrogenismo como hirsutismo, acné, irregularidades menstruales, etc., son más frecuentes en los pacientes con hiperandrogenismo portadores de una mutación en el gen *CYP21A2* (Ezquieta y col., 2008). En el caso de nuestra paciente en particular, su motivo de consulta fue hirsutismo y oligomenorrea, por lo que es posible que existan otros factores que contribuyan con las manifestaciones clínicas que presenta.

Alternativamente, no se puede descartar que la paciente posea una segunda mutación en algún otro gen que codifica para alguna de las otras enzimas que participan en la vía de síntesis de cortisol y aldosterona o incluso alguna variante en otros genes que influyan en la modulación de la expresión de los esteroides.

De hecho, la presencia de efectos moduladores del fenotipo fue propuesta por Scott y col. (Scott y col., 2006), quienes reportaron una paciente PS que presentaba una muy leve virilización para su forma clínica que no progresó en más de 10 años de seguimiento. Los autores hallaron que la paciente presentaba la variante p.A287P en la POR en combinación con mutaciones en el gen *CYP21A2* y sugirieron que la deficiencia de la POR afecta a la actividad de 17,20 liasa de P450c17 en un grado mucho mayor que su actividad de 17-hidroxilasa (Fluck y col., 2004; Miller, 2004; Miller, 2005; Huang y col., 2005), de manera que se acumula 17-OHP pero no se acumulan andrógenos.

Capítulo V- Discusión

Por su parte, el grupo de Ezquieta y col. (Ezquieta y col., 2008) describe la presencia de variantes moduladoras de signos de hiperandrogenismo. Los autores evidenciaron que la variante p.M196R del gen *TNFR2* que media la respuesta inflamatoria, sería protectora y evitaría la aparición de sintomatología, dado que fue hallada en muchos pacientes FNC crípticos. Por otro lado, la variante UCSNP44 del gen *CAPN10* involucrado en la insulino-resistencia, estaría relacionada con una mayor presentación de sintomatología dado que fue hallada en portadores sintomáticos.

Si bien Chu y col. (Chu y col., 2013) analizaron los genes CYP11- β 1 y 3 β -HSD en una paciente con la FNC por déficit de 21-hidroxilasa que presentaba una única mutación novel p.R149P en heterocigosis con resultados negativos, otro grupo de investigadores reportaron el caso de una niña con genotipo Del/N con genitales ambiguos, deshidratación y vello púbico, que presentaba la mutación p.V571A del receptor de glucocorticoides (GR) en homocigosis (Mendonca y col., 2002). Los autores especulan que la asociación entre el defecto en el gen *GR* y el gen *CYP21A2* provocaría un exceso de andrógenos y 17-OHP muy marcados en la paciente, si bien afirman que la principal causa de estimulación de la ACTH a largo plazo sería la resistencia a glucocorticoides.

Estas observaciones en conjunto indicarían que otros factores genéticos y/o ambientales contribuirían a modular la actividad de la enzima 21-hidroxilasa *in vivo* y/o la manifestación clínica que exhiben los pacientes.

Mutación p.R149C: La mutación p.R149C fue hallada en una paciente que en su otro alelo presentaba la mutación más frecuente de la FNC, p.V281L, por lo que la gravedad de la mutación novel no podía ser inferida *a priori*. En este caso, los estudios funcionales para determinar si la mutación p.R149C se relaciona con la forma PS, VS o FNC de la enfermedad eran fundamentales.

Como se describió anteriormente, en este mismo residuo se halló otra mutación, la p.R149P (Chu y col., 2013). Los estudios funcionales *in vitro* demostraron que esta mutación está relacionada con la FNC de la enfermedad ya que se obtuvo una actividad enzimática residual de 16,9% y 23,4% al utilizar progesterona o 17-OHP como sustratos, respectivamente. Asimismo, observaron que la enzima mutante presentaba una marcada disminución en la afinidad por ambos sustratos.

Mutación p.M283V: El cambio p.M283V fue hallado en 3 de los 274 pacientes FNC de nuestra cohorte (1,1%), siendo por lo tanto una mutación bastante frecuente para esta presentación clínica.

Dos de los pacientes, presentaban en el otro alelo una mutación grave asociada a la FC de la patología (5´macroconverción y c.283-13A/C>G). Dado el fenotipo que presentaban los pacientes, se infirió *a priori* que la mutación p.M283V codificaría una enzima con una actividad residual leve que se relacionaría con la FNC de la deficiencia de 21-hidroxilasa.

Curiosamente, se describió previamente otra mutación puntual en el mismo residuo, p.M283L, en una paciente con fenotipo FNC (Ezquieta y col., 2002b). Sin embargo, no existen datos sobre su actividad residual y la misma no se puede inferir dado que la paciente presentaba en el otro alelo la mutación leve p.V281L. Si bien los autores proponen que la p.M283L sería una mutación asociada a la FNC, los valores hormonales de la paciente predicen que es posible que se trate de un alelo severo.

La otra paciente de nuestra cohorte con la mutación p.M283V no presentaba ninguna otra mutación en el otro alelo. Al igual que para la paciente con la mutación p.R132C, la presencia de otros factores, entre ellos mutaciones en otros genes, podrían contribuir al desarrollo de su fenotipo. No contamos con los valores de 17-OHP post ACTH para esta

Capítulo V- Discusión

paciente, pero el valor basal de 9,3 ng/ml es superior al límite de corte de 6 ng/ml considerado para su inclusión.

Como se mencionó en la Introducción de esta tesis, exiten evidencias de la correlación entre ciertas variantes del HLA y las formas clínicas de presentación de la deficiencia de 21 hidroxilasa. Además, varios estudios demuestran que determinadas mutaciones y/o haplotipos particulares en el gen CYP21A2, se asocian con haplotipos específico del HLA sugiriendo un efecto fundador para los mismos. Es así que en la población austríaca se analizó el HLA en 32 individuos no relacionados que poseían la mutación p.Q318* y el gen CYP21A2 duplicado. En 22 de ellos se halló el haplotipo HLA-B*50 y HLA-CW*06, por lo que se estima la existencia de una ascendencia común para este haplotipo (Kleinle y col., 2009). Por su parte, un trabajo en la población de Taiwán reportó el hallazgo de 5 pacientes con la mutación c.283+1G>A y 3 con la mutación p.R316*. Basados en los datos de tipificación de HLA, todos los alelos con la mutación c.283+1G>A compartían el haplotipo HLA-B*3909 HLA-DRB1*160201 y los 3 alelos con la mutación p.R316*, el haplotipo HLA-B* 460101 HLA-DRB1* 080302. Estos resultados indican que para cualquiera de las 2 mutaciones analizadas, el haplotipo proviene de un ancestro común (Lee y col., 2009). En la población brasilera, Billerbeck y col. (Billerbeck y col., 1999), reportaron 7 pacientes que poseían n la mutación p.G424S asociada con una deleción en el pseudogen y al haplotipo HLA-DR*17, lo que sugería también un efecto fundador para este haplotipo.

Considerando que la mutación p.M283V se halló en tres pacientes de nuestra cohorte, nos preguntamos si la misma se originó también por un efecto fundador. Con este objetivo, analizamos el CMH de las 3 pacientes portadoras de esta mutación.

Los resultados obtenidos en este trabajo, sin embargo, no nos permitieron establecer un haplotipo de *HLA*-A, *HLA*-B y *HLA*-DR completo común en los 3 pacientes de nuestra

Capítulo V- Discusión

cohorte que presentaban la mutación p.M283V. Sin embargo, las pacientes 11 y 664 (Ver Resultados, Tabla 8) comparten los alelos *HLA*-B*44 y *HLA*-DR*4 y las pacientes 327 y 664 comparten el *HLA*-B*49.

Si se observa la organización del CMH en el brazo corto del cromosoma 6 (Ver Introducción, Figura 9), de telómero a centrómero se ubica primero el *HLAI*-A, luego el *HLAI*-B, luego el gen *CYP21A2* (dentro del *HLA* III) y por último el *HLAII*-DR. Por lo tanto, es posible que las pacientes 11 y 664 posean un haplotipo ancestral común y que las diferencias observadas en el *HLA*-A sean producto de recombinaciones en la región. El mismo mecanismo pudo haber ocurrido para las pacientes 327 y 664. Sin embargo, este alelo sería el producto de 2 eventos de recombinación, lo que implicaría que el haplotipo ancestral, si lo hubiera, sería más antiguo. De hecho, la existencia de posibles recombinaciones en esta región como explicación a las diferencias encontradas en un haplotipo ancestral, fueron sugeridas previamente en un trabajo de Barbaro y col. (Barbaro y col., 2004). Los autores observaron que la mutación p.P482S en el *CYP21A2* se asociaba, como ya se mencionó previamente, con el haplotipo *HLA*-A*2, *HLA*-B*41, *HLA*-DR*4. En los 6 pacientes analizados se observó el *HLA*-DR*4, pero en 5 de ellos se observó el *HLA*-B*41 y en 4 el *HLA*-A*2. Es posible entonces que la mutación se haya originado como un evento único sobre un haplotipo de *HLA*-A*2, B*41, DR*4, seguido de eventos de recombinación en el locus.

De cualquier manera, se debe tener en cuenta que el *HLA*-B*44 está presente en aproximadamente el 10,6% de los individuos en nuestra población, el *HLA*-B*49 en el 3% y el *HLA*-DR*4 en un 19,3%, por lo que son alelos bastante frecuentes en la población general. De hecho, el alelo *HLA*-B*44 es el segundo en frecuencia dentro del *HLA*-B y el *HLA*-DR*4 es el más frecuente dentro del *HLA*-DR (Datos obtenidos del Hospital privado de la Comunidad, Mar del Plata, 2011). Por lo tanto, se puede postular que el hecho de que las

Capítulo V- Discusión

pacientes compartan algunos alelos del *HLA* se deba a que son variantes comunes en nuestra población y no a que estos alelos se encuentren en desequilibrio de ligamiento con la mutación p.M283V. Por otro lado, se debe tener en cuenta que sólo se analizaron 3 muestras con esta mutación, por lo que nuestros resultados serían sugerentes, pero no concluyentes. Para concluir que la mutación p.M283V esté en asociación o no a los alelos *HLA*-B*44 y *HLA*-DR*04, sería necesario analizar más individuos con esta mutación.

La mutación p.M283V fue hallada recientemente también en un paciente en la población de Estados Unidos que poseía ascendencia turca en heterocigosis con la mutación p.I172N (New y col., 2013). Si bien no está claramente especificada la forma de presentación clínica de la paciente, se interpreta que la mutación p.M283V se asociaría a la forma clásica de la patología. Las diferencias entre los fenotipos de las pacientes de nuestra cohorte y la hallada en el trabajo de New y col., indicarían, al igual que para otras mutaciones, que existe una variabilidad interindividual en la expresión clínica de la patología, como se discutirá más adelante.

Mutación p.E431K: Esta mutación fue hallada en una paciente FNC que en el alelo homólogo presentó la p.V281L y además en *cis*, presentó la mutación poco frecuente p.D322G que se la asoció a la FNC de deficiencia de 21-hidroxilasa (Loidi y col., 2006; Bleicken y col., 2009). Al igual que para la mutación p.R149C, no se podía predecir la actividad residual, pero en este caso no sólo por el alelo homólogo, sino porque era posible que la deficiencia este alelo sea consecuencia de la mutación p.D322G de 27% al usar progesterona como sustrato y 18% al usar 17-OHP (Bleicken y col., 2009). En este caso, nuevamente, los ensayos funcionales *in vitro* eran de suma importancia para poder determinar con que forma

Capítulo V- Discusión

clínica se relaciona la mutación novel tanto en forma aislada como con la presencia de la otra mutación en *cis*.

Mutación p.I.429fs: Este cambio fue hallado en una paciente PS en heterocigosis compuesta con la mutación p.I172N. Como consecuencia de la deleción de 2 guaninas en el exón 10 del gen *CYP21A2*, se genera un corrimiento del marco de lectura que provoca la anulación del codón de terminación de la traducción y se produce una proteína con 26 aminoácidos más larga con un tracto de 91 aminoácidos diferentes a la proteína salvaje. Es de esperar que este tracto de aminoácidos diferentes afecte la estructura terciaria de la proteína y, por lo tanto, su función. Por otro lado, esta mutación se encuentra sólo a un codón de la cisteína que coordina al grupo HEMO. Es posible por lo tanto, que este cambio en el carboxi-terminal impida que el HEMO se una correctamente y dé lugar a una proteína no funcional que carece del grupo prostético.

Hasta el momento, se describieron en la bibliografía 15 pequeñas deleciones en el gen *CYP21A2* (White y col., 1994; Barbat y col., 1995; Lee y col., 1998; Ordonez-Sanchez y col., 1998; Nikoshkov y col., 1998; Krone y col., 1999; Ezquieta y col., 2002b; Kayama y col., 2002; Stikkelbroek y col., 2003; Zeng y col., 2004; Kharrat y col., 2005; Baradaran-Heravi y col., 2007; Bidet y col., 2009; Finkielstain y col., 2011), de las cuales sólo 4 se encuentran en el exón 10. En 3 de estos casos, estas deleciones dan lugar a la formación de una proteína más larga que la salvaje (White y col., 1994; Ordonez-Sanchez y col., 1998; Finkielstain y col., 2011) al igual que lo que ocurre con la mutación p.L429fs. Estas deleciones se hallaron en pacientes PS, por lo que se infiere que deben afectar drásticamente a la actividad enzimática de la 21-hidroxilasa. En el caso restante, la mutación estaba presente en un pacientes de la FNC que presentaba en su alelo homólogo la mutación p.V281L y la deleción no causaba corrimiento en el marco de lectura (Bidet y col., 2009). Como en todos los casos de pacientes

Capítulo V- Discusión

con la FNC cuya expresión de la patología está claramente asociada a una mutación conocida que predice un alelo leve, la severidad de una mutación novel no se puede deducir hasta que no se realicen los ensayos funcionales o hasta que no se reporten más pacientes con la misma mutación y otras formas clínicas.

En nuestro caso, la paciente presenta un fenotipo PS. Por lo tanto, es de esperar que el alelo con la mutación p.L429fs codifique para una proteína con actividad enzimática nula. Cabe destacar que si bien la paciente de nuestra cohorte presenta el fenotipo PS, en el alelo homólogo posee la mutación p.I172N que generalmente se asocia con la forma VS de la patología. Sin embargo, se describió que la actividad residual de la enzima que posee esta mutación, aproximadamente 1-2%, no siempre es suficiente para prevenir la pérdida salina en los afectados (Wilson y col., 1995; Speiser y White, 1998).

Mutacion p.H466fs: La mutación p.H466fs fue hallada en una paciente PS de nuestra cohorte. Inicialmente, luego de la búsqueda de las 10 mutaciones más frecuentes se había supuesto un genotipo para esta paciente donde una de las copias del gen poseía la mutación c.283-13A/C>G y la otra la p.Q318* en concordancia con su fenotipo. Sin embargo, la caracterización detallada de la región RCCX realizada en nuestro grupo de trabajo por la Dra. Cecilia Fernández (Fernández C., 2014) posibilitó establecer el genotipo correcto. La paciente presentaba un haplotipo con la duplicación del gen, en el cual ambas mutaciones se encontraban en el mismo alelo. Posteriormente, y mediante secuenciación, se estableció que la copia restante poseía la variante de secuencia novel p.H466fs. La inserción de una citosina en el exón 10 del gen provoca un corrimiento del marco de lectura que genera una proteína más larga que la salvaje, con 26 aminoácidos de más al igual que la mutación p.L429fs. Al igual que para este cambio, se espera una estructura tridimensional totalmente diferente debido a la presencia de la mutación p.H466fs.

Capítulo V- Discusión

En el gen *CYP21A2* se han descripto hasta el momento 12 pequeñas inserciones (Speiser y col., 1992; Lee y col., 1998; Ezquieta y col., 1999; Lau y col., 2001; Billerbeck y col., 2002; Usui y col., 2004; Kharrat y col., 2004; Loidi y col., 2006; Krone y col., 2006; Janner y col., 2006; Dubey y col., 2009; Finkielstain y col., 2011). Diez de ellas generan codones de terminación prematuros por corrimiento del marco de lectura y dan lugar a proteínas más cortas que la salvaje. Otra, es una inserción de 9 pb que produce una proteína con 3 aminoácidos más que la salvaje sin corrimiento del marco de lectura (Dubey y col., 2009). La inserción restante, es de una citosina en el nt 2669 del gen en el exón 10 que al igual que la mutación p.H466fs genera una proteína más larga a causa del corrimiento del marco de lectura. La inserción en el nt 2669 se relacionaría con la forma PS de la enfermedad (Kharrat y col., 2004).

V.1.2. CAMBIOS EN INTRONES DEL GEN CYP21A2

La maduración del ARNm en eucariotas es un proceso muy complejo que incluye el reconocimiento del exón a través de elementos específicos como motivos de ramificación, sitios dadores, aceptores y reguladores de *splicing* presentes tanto en los exones como en los intrones. Las mutaciones pueden afectar a estas señales, ya sea directamente mediante la interrupción de los sitios de *splicing* canónicos o constitutivos o, indirectamente, mediante la creación de sitios crípticos (Desmet y col., 2009). Por lo tanto, es de esperar que cambios en los intrones provoquen efectos deletéreos.

En el presente trabajo se hallaron 2 cambios en intrones del gen *CYP21A*. Uno, el cambio c.652-2A>G, se ubica en el sitio aceptor de *splicing* del intrón 5 y el otro, c.1116-34G>A, se ubica en el intrón 8. Ninguno de estos cambios fue hallado en individuos de la población general.

Capítulo V- Discusión

Mutación c.652-2A>G: El cambio c.652-2A>G en el intrón 5 se halló en una paciente con la forma VS de la enfermedad en heterocigosis compuesta con la mutación poco frecuente p.R483Q (Stikkelbroek y col., 2003). Es destacable, que esta paciente es la única, dentro de los 87 pacientes secuenciados, que no presentaba ninguna mutación luego del estudio de las 10 mutaciones más frecuentes y que mediante la secuenciación completa del gen se detectaron las 2 mutaciones causantes de la enfermedad.

Con el objetivo de pre-establecer su potencial efecto deletéreo, se realizó un análisis *in silico* con el programa *Human Splicing Finder* (HFS). El programa *HFS* fue validado mediante el análisis de 69 mutaciones intrónicas que afectan el sitio canónico de *splicing* y/o generan sitios crípticos y para las cuales se poseía los correspondientes ensayos *in vitro*. La correlación observada fue del 92,3% con los resultados predichos por el programa (Desmet y col., 2009).

Para esta mutación, el *HFS* predijo la anulación del sitio canónico de *splicing*. Además, se predijeron dos sitios crípticos, uno situado en el intrón 5 y otro en el exón 6. Si bien no se describió que estos sitios se utilicen en la secuencia salvaje, la ausencia del sitio canónico aceptor en presencia de la mutación podría forzar el uso de alguno de ellos por la maquinaria de *splicing*. El uso de cualquiera de estos sitios crípticos generaría un corrimiento en el marco de lectura de la proteína resultante, y daría lugar a codones de terminación prematuros de la traducción y, por lo tanto, se vería afectada drásticamente la actividad de la enzima.

El fenotipo VS de nuestra pacientes, *a priori* concuerda con la actividad *in vitro* reportada previamente para la mutación p.R483Q, como se detalló precedentemente (Robins y col., 2006; Ono y col., 2008). Por lo tanto, no se podía predecir si la c.652-2A>G se relacionaría con un alelo de actividad nula o con uno de actividad moderada de la forma VS. Todas estas

observaciones, nos condujeron a realizar estudios *in vitro* para esta mutación cuyos resultados se discutirán más adelante en este capítulo.

Variante c.1116-34G>A: La variante c.1116-34G>A del intrón 8 fue hallada en dos pacientes con la FNC de la enfermedad. Luego de la secuenciación se detectó que ambas pacientes no presentaban ningún otro cambio significativo en el gen *CYP21A2*.

A pesar de que se halló que 2 pacientes poseían la variante c.1116-34G>A, ninguno de los 50 individuos de la población general estudiados poseía esta variante. Sin embargo, el análisis *in silico* reveló que en el sitio del cambio la secuencia salvaje no existiría ningún sitio de *splicing* - ni donor ni aceptor- y que la presencia de la variante no generaría ningún sitio de *splicing* nuevo. Por este motivo y basándonos en los resultados bioinformáticos, se consideró a esta variante *a priori* como una variante no asociada a la patología y se decidió no continuar con los ensayos funcionales de la misma (al menos en el contexto de esta tesis). Sin embargo, no podemos descartar que esta variación provoque algún efecto deletéreo hasta no realizar los ensayos funcionales que validen o no las predicciones bioinformáticas.

V.1.3. CAMBIOS EN REGIONES PROMOTORAS DEL GEN CYP21A2

Es sabido que la región que se ubica a 176 pb inmediatamente río arriba del inicio de la transcripción estaría relacionada con la regulación de la transcripción del gen *CYP21A2* (Chang y col., 1995) y que de las variantes diferentes entre la región promotora del gen *CYP21A2* y el pseudogén *CYP21A1*(g.-126C>T, g.-113G>A, g.-110T>C y g.-103A>G (Higashi y col., 1986, White y col., 1986), las ubicadas a -126 y -113 serían las más importantes. Asimismo, se describió que la mutación p.P30L puede estar asociada en *cis* con ciertas variantes en el promotor. En estos casos, el alelo resultante se relacionaría con la forma VS de la patología, a diferencia de lo que sucede cuando la p.P30L se encuentra

Capítulo V- Discusión

aislada, que se asocia a la FNC de la enfermedad (Araujo y col., 2005). Por lo tanto, el análisis de zonas regulatorias en los pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa debe ser tenido en cuenta.

En los pacientes analizados en este trabajo, no se halló la presencia de las 4 variantes de la región promotora presentes en el pseudogén, si bien en 2 pacientes se halló la variante a g.-4 C>T (Resultados, Tabla 9), uno de ellos la presentó en forma aislada y otro junto con las variantes g.-281insT y g.-332insG. Por otro lado, se hallaron 2 variantes en la región promotora del gen *CYP21A2*, g.-195T>C y g.-283_-284insG. A pesar que los mismos no se encuentran en la región de 176 pb antes mencionada, se encuentran cercanos a ella, y ninguno de estos cambios se describió previamente en la bibliografía. Si bien en trabajos previos se describió la presencia de un cambio A>G en la posición -283 que potencialmente se asociaría a una disminución de la actividad enzimática, el mismo fue analizado en forma combinada con las variantes g.-4C>T, g.-73C>T, g.-281T>G, g.-295T>C y g.-294A>C y no en forma aislada (Bobba y col., 2000; Zhang y col., 2008).

Las variantes noveles del promotor fueron observadas también en individuos de la población general. En nuestro caso en particular, los cambios g.-195T>C y g.-283_-284insG se observaron con una frecuencia estimada del 4% y del 5%, respectivamente. Estos resultados nos condujeron a inferir que probablemente estos cambios no se relacionarían con la patología y que podían tratarse de de polimorfismos.

Como ya se mencionó previamente, se considera polimorfismos a una variante que se halle con una frecuencia mayor al 1% en la población general. Sin embargo, considerar que una variante alélica que se encuentre en al menos el 1% de la población, y que por lo tanto sea frecuente, implique que la misma sea neutra, es una consideración que actualmente está paulatinamente en desuso. De hecho en algunas patologías recesivas, existen mutaciones que

Capítulo V- Discusión

se presentan con una elevada frecuencia dentro de la población. Un ejemplo común es la mutación Δ F508 del gen *CFTR* responsable de la fibrosis quística, cuya frecuencia supera ampliamente el 1%. Sin embargo, esta elevada frecuencia se atribuye a que los individuos portadores de la mutación adquirieron una ventaja adaptativa. Esta ventaja sería la responsable de que una variante deletérea se distribuyera en la población (Schroedern y col., 1995; Alfonso-Sánchez y col., 2010).

Por otro lado, es sabido que los polimorfismos de secuencias pueden tener efecto biológico. Son numerosos los ejemplos en la literatura en que variaciones de secuencias conllevan a variaciones en los niveles de transcripción de los genes, variaciones en la actividad biológica de las proteínas o la unión de factores de transcripción y que implican efectos moduladores o diferentes actividades enzimáticas. Su relación con el riesgo a desarrollar enfermedades multifactoriales en las que intervienen tanto factores genéticos como ambientales, está ampliamente documentada también (Ye y col., 1996; Rutter y col., 1998; Hao y col., 2006; Pearce y col., 2007).

Por todo lo anteriormente dicho, los estudios en individuos controles por si solos no serían suficientes para considerar a estas variantes del promotor como polimorfismos. Serían necesarios ensayos *in vitro* que demuestren que no provocan cambios en la transcripción del gen.

Por otro lado, en este caso particular, se debe destacar que ambos cambios de la región promotora fueron hallados en la misma paciente. A su vez, el cambio g.-283_-284insG se halló en homocigosis. Por lo tanto, el alelo con el cambio g.-195T>C también presenta la otra variante y ningún individuo de la población general analizado presentaba ambos cambios. Por lo tanto, y aunque ambos cambios por separado fueron hallados en individuos de la población

Capítulo V- Discusión

general y fueron considerados polimorfismos, no se puede descartar que ambas variantes juntas produzcan algún efecto sobre la transcripción del gen *CYP21A2*.

De todas formas, y a los efectos de esta tesis, sus potenciales efectos deletéreos no fueron analizados y dada su alta frecuencia en la población general se asumió que existiría una baja probabilidad de que los mismos pudieran estar asociados a la patología. Sin embargo, no podemos descartar que los mismos influyan en la aparición de los signos hiperandrogénicos que presenta la paciente.

Como resumen de todo lo expuesto, de los 10 cambios noveles hallados por secuenciación, consideramos mutaciones a las 6 variantes de la región codificante y al cambio del intrón 5 del gen *CYP21A2*. Teniendo esto en consideración, el genotipo se completó en 12 de los 72 pacientes de la FNC (16,6%) y en todos los pacientes con la FC de la enfermedad. Esto representa un aumento en la caracterización de los pacientes FNC que se elevó al 77,1% y la caracterización del 100% de los pacientes clásicos.

La secuenciación completa del gen *CYP21A2* permitió detectar mutaciones potencialmente causantes de la patología en 27 de los 87 pacientes secuenciados, es decir, el 31% de los pacientes analizados. Sin embargo, es muy notoria la diferencia de los resultados obtenidos según la presentación clínica del paciente. Basándonos en los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, un paciente con la forma clásica de la enfermedad al que no se le detectaran mutaciones con el análisis de las 10 mutaciones más frecuentes, debería certeramente ser secuenciado.

Para el caso de los pacientes de la FNC, aún luego de la secuenciación completa del gen es muy alto el porcentaje de pacientes sin mutaciones. Cabe destacar, que de los 72 pacientes FNC que fueron secuenciados, 41 poseían una mutación detectada previamente por el estudio de las 10 mutaciones más frecuentes y 31 no poseían ninguna mutación. Entre los 31

Capítulo V- Discusión

pacientes sin ninguna mutación, solo en 2 se detectó una mutación (pacientes 327 y 402; genotipos p.M283V/N y p.R132C/N, respectivamente). Por lo tanto estos pacientes resultaron ser portadores. Por otro lado, los 12 pacientes en los que la secuenciación permitió completar el genotipo pertenecían al grupo de 41 pacientes FNC que ya poseían una mutación detectada por el estudio de las 10 mutaciones más frecuentes. Como ya se mencionó precedentemente y como se discutirá más adelante, el alto porcentaje de pacientes de la FNC sin mutaciones o portadores estaría indicando que es posible que los criterios de inclusión no sean los adecuados, o bien que definitivamente no es posible diferenciar en base a la presentación clínica o a sus valores hormonales, los individuos afectados por la deficiencia de aquellos que poseen hiperandrogenismo de otro origen, sino a través del estudio molecular.

V.2. MODELADO MOLECULAR Y ENSAYOS FUNCIONALES DE LAS MUTACIONES NOVELES PUNTUALES DE LA REGIÓN CODIFICANTE

Con la idea de tratar de evitar los ensayos funcionales que suelen ser costosos y consumir mucho tiempo, en los últimos años se han desarrollado varias estrategias para predecir la actividad de proteínas mutante mediante enfoques bioinformáticos a partir de cristalografías de rayos X de las proteínas. El modelado molecular surge, por lo tanto, como una herramienta útil para evaluar cambios en la actividad o estabilidad de las proteínas.

Los citocromos P450 de mamíferos se encuentran generalmente unidos a membranas, por lo que aislarlos para realizar una cristalografía sin que la estructura se vea afectada, es muy difícil. De hecho, las moléculas con porciones altamente hidrofóbicas no pueden ser cristalizadas, aunque en algunos casos, los cristales se pueden obtener en presencia de detergentes. Esto explica la presencia casi nula de porciones transmembrana de proteínas en las bases de datos de proteínas (PDB) (Vázquez-Contreras, 2003). Al momento del inicio de

Capítulo V- Discusión

esta tesis se habían cristalizado seis P450 de mamíferos, 3 de ellas humanas (Williams y col., 2000; Scott y col., 2003; Williams y col., 2003; Williams y col., 2004; Yano y col., 2004; Schoch y col., 2004).

Para el caso particular de la P450c21, no se encuentra cristalizada la proteína humana. Por otro lado, las P450 de mamíferos cristalizadas poseen muchas regiones que varían entre ellas que limitan el modelado por homología y el uso de estas estructuras como templados (Barbaro y col., 2006). Sin embargo, la primera estructura de P450 eucariota resuelta, CYP2C5, es una 21-hidroxilasa de conejo que utiliza progesterona y que se expresa en microsomas (Williams y col., 2000). La comparación de secuencias revela que CYP2C5 es uno de los homólogos evolutivamente más cercanos con la CYP21 humana (Robins y col., 2006), si bien en la actualidad se encuentra disponible el cristal de la P450c21 bovina con un 79% de identidad de secuencia con la proteína humana (Zhao y Waterman, 2012), que al momento de realizar esta tesis no estaba disponible.

El primer modelado de la proteína p450C21 humana lo realizó Lewis y col (Lewis y col., 1998) utilizando como templado la P450 bacteriana CYP102 (*Bacillus megaterium*) de localización microsomal y que posee un 29% de identidad de secuencia. Más tarde, Bojunja y col. (Bojunja y col., 2005) realizaron un modelado por homología utilizando como molde la CYP2C8 microsomal, que posee un 28% de identidad de secuencia con la CYP21 humana. A pesar de tener menos identidad de secuencia con la 21-hidroxilasa humana que la CYP102, la P4502C8 es de origen humano. Con este modelo, los autores predicen los efectos deletéreos de una mutación novel L317V, en la P4520c21. Por su parte, en el año 2005, Krone y col. (Krone y col., 2005) realizaron el primer modelado utilizando la CYP2C5 de conejo. Dicha proteína, como se mencionó anteriormente es una CYP21 y presenta un 31,1% de identidad de secuencia con la humana. Al año siguiente, Robins y col. (Robins y col., 2006)

Capítulo V- Discusión

presentaron el modelo 2GEG usando la CYP2C5 de conejo, al igual que Krone y col., pero a partir de otro cristal de mayor resolución.

En este trabajo de tesis, se realizó también un modelado por homología de la 21-hidroxilasa humana, pero se utilizaron como templados las estructuras de 18 cristales de CYPs disponibles en PDB (ver Materiales y Métodos, Tabla 4) y el algoritmo Biskit (Grünberg y col., 2007). Las plantillas utilizadas se seleccionaron en base a su resolución (menor a 3 Å), a la similitud de secuencia (entre 20 y 31% de identidad de secuencia con la 21-hidroxilasa humana) y a las estructuras secundarias de las mismas. Se testearon diferentes combinatorias utilizando entre 4 y 18 plantillas y el mejor modelo se obtuvo al utilizar todas las plantillas juntas. Dada la cantidad limitada de P450s cristalizadas, el hecho de utilizar varias plantillas brinda un modelado de mejor calidad que el que se obtiene al utilizar cada plantilla por separado, siendo esta una de las principales diferencias entre nuestro modelo y otros publicados previamente en donde se utilizó un solo templado (Lewis y col., 1998; Bojunja y col., 2005; Krone y col., 2005; Robins y col., 2006). Sin embargo, se debe mencionar que recientemente se realizó un modelado por homología a partir de la CYP21 bovina (Haider y col., 2013). En este caso y dada la alta identidad de secuencia con la CYP21 humana, se obtiene un modelo mejor que al usar varios cristales.

Existen estudios anteriores donde se demostró que existiría una correlación entre la predicción de la estabilidad de la proteína y la gravedad de la enfermedad (Robins y col., 2006; Pey y col., 2007). Por lo tanto, en esta tesis y a partir del modelo obtenido, se generaron cuatro de las seis mutantes noveles (p.R132C, p.R149C, p.M283V y p.E431K) halladas en los pacientes de nuestra cohorte mediante el programa FoldX y se calculó la estabilidad de las mismas en comparación con la proteína salvaje. Las 2 mutantes que

Capítulo V- Discusión

provocan cambios en el marco de lectura no fueron modeladas ya que dan como resultado una proteína más largas y con tractos de aminoácidos muy diferentes a la proteína salvaje. Se debe tener en cuenta, que la calidad y la precisión de las predicciones utilizando FoldX dependen principalmente de la disponibilidad de estructuras de alta resolución, por lo general determinadas por cristalografía de rayos X. En el caso de P450c21, contamos con dos limitaciones principales: carecemos de una estructura de alta resolución dado que la proteína humana no ha sido aún cristalizada, y, por otro lado, el programa no evalúa la energía de las mutaciones que afectan a los residuos que interactúan con el grupo HEMO, ligandos, o interacción con membrana. Sin embargo, se pueden realizar predicciones adecuadas con el uso de estructuras aproximadas.

Para el análisis realizado en esta tesis, se incluyó también el modelo generado con 2GEG (Robins y col., 2006) a modo comparativo. Teniendo en cuenta las regiones que poseen una buena conservación en los dos modelos, esperábamos poder evaluar con precisión las mutaciones en un tercio de la proteína, sobre todo aquellas que se ubican en las alfa hélices. En otro tercio de la misma, se esperaba realizar una evaluación aproximada. El tercio restante que está compuesto por residuos que interactúan con el grupo HEMO y regiones con conformaciones divergentes entre los dos modelos, era posible que la predicción no fuera apropiada.

Para validar nuestras predicciones, sobre nuestro modelo y sobre el modelo 2GEG, se generaron 40 mutantes para las cuales se conocía su actividad residual por ensayos *in vitro*, se estimó el cambio en la estabilidad de las proteínas resultantes y se analizó la correlación con su actividad residual. Como se consignó en resultados, en el primer análisis realizado con las 40 mutantes, no se obtuvo correlación entre la estabilidad de la proteína calculada por FoldX y la actividad residual *in vitro* para ninguno de los 2 modelos utilizados. Sin embargo, si se

Capítulo V- Discusión

excluían 15 mutantes para las cuales se propone que la disminución en la actividad enzimática estaría relacionada a que son residuos que se ubican en regiones de unión a HEMO, sustratos u otros ligandos, se observó una buena correlación. De hecho, de las 25 mutantes utilizadas, 18 presentaban valores muy similares de $\Delta\Delta G$ con ambos modelos. En general, se espera que una disminución en la estabilidad de la proteína afecte a la actividad, pero lo opuesto puede no ser cierto. Tal es el caso de la mutación p.V281L (perteneciente al grupo de las 10 mutaciones más frecuentes), por ejemplo, que a pesar que ambos modelos predijeron que la mutación estabilizaría la proteína, los análisis *in vitro* demuestran una disminución de la actividad enzimática (Tusie-Luna y col., 1990). Hay que destacar, sin embargo, que en algunos casos en los que no existe una desestabilización de la proteína, el causante de la enfermedad podría explicarse por cambios en residuos aminoacídicos que afectan a otras funciones, por ejemplo, coordinación con el HEMO, motivos que estén involucrados en modificaciones post-traduccionales o con la interacción con otras proteínas o ligandos.

A pesar que los resultados bioinformáticos pueden ser alentadores para realizar las predicciones de actividad residual de una mutante, los análisis *in vitro* son sumamente necesarios para confirmarlos y estimar las consecuencias funcionales de las mutaciones, más aún cuando no se dispone de la cristalografía de la proteína en estudio. Para la deficiencia de 21-hidroxilasa, son de suma importancia sobre todo en portadores y en compuestos heterocigotas que presentan una mutación leve en el alelo homólogo, dado que es prácticamente la única manera de clasificar la severidad de las mutaciones noveles de manera certera. Por lo tanto, la genotipificación y los análisis funcionales de mutaciones noveles del gen *CYP21A2* son muy relevantes a la hora de realizar un correcto asesoramiento genético y eventualmente indicar o no, un tratamiento durante el embarazo (Barbaro y col., 2006).

Capítulo V- Discusión

Al igual que para el modelado molecular, en este trabajo se analizaron las consecuencias funcionales de las 4 mutaciones puntuales de sustituciones no sinónimas presentes en la región codificante del gen *CYP21A2*. No se analizaron *in vitro* las mutaciones p.L429fs y p.H466fs, dado que el corrimiento del marco de lectura genera una proteína 26 aminoácidos más larga que la salvaje en ambos casos, y nuestro vector de expresión con el ADNc de la 21-hidroxilasa sólo posee 28pb de la región 3⁻ no codificante.

Todas las mutantes generadas se ensayaron utilizando ambos sustratos de la enzíma (17-OHP y progesterona) y su actividad y expresión se comparó con la proteína salvaje. Para los ensayos de actividad, la metodología usada en este trabajo consistió en analizar las diferentes mutantes en presencia de concentraciones saturantes de ambos sustratos. Por lo tanto, los resultados obtenidos expresan la cantidad de enzima biológicamente activa. Se analizaron también los efectos funcionales de una de las mutaciones noveles (p.E431K) en combinación con otra ya descripta previamente (p.D322G) que se hallaba en el mismo alelo.

A continuación se discuten, los principales hallazgos obtenidos en el análisis bioinformático y en los ensayos funcionales.

Mutación p.R132C: R132 es parte de un grupo de aminoácidos básicos que se ubican en la superficie de la 21-hidroxilasa humana y participan en la interacción con residuos ácidos de la POR (Robins y col., 2006; Haider y col., 2013). Todo ese grupo de residuos están alineados y cargados positivamente. A pesar que los dos modelos analizados en este trabajo muestran una estructura diferente en esta región, en ambos se predice que el cambio de alguno de estos aminoácidos por otro de distinta carga o sin carga, provocaría que la carga positiva de la región se vea afectada. Se espera, por lo tanto que se altere la interacción con la POR y que la mutación C132 reduzca la actividad biológica de la enzima.

Capítulo V- Discusión

Si bien la magnitud de dicha reducción no se puede predecir, en muchos casos, el fenotipo del paciente en combinación con la naturaleza de la mutación en el cromosoma homólogo, nos orientan hacia la actividad residual que se debería esperar en el alelo con la mutación novel. En el caso concreto de esta paciente, esta posibilidad no se cumple, debido a la ausencia de mutación en el alelo homólogo. Sin embargo, Haider y col (Haider y col., 2013) proponen que la misma se asociaría con la FNC de la enfermedad debido al tipo de interacciones que interrumpiría.

En los ensayos funcionales, la mutación p.R132C presentó una actividad enzimática residual compatible con la actividad que presentan los alelos de la FNC de la enfermedad (alrededor de 35% y 16% al utilizar 17-OHP y progesterona como sustrato, respectivamente). Por otro lado, los ensayos de WB mostraron que la mutación p.R132C no afecta los niveles de la proteína, dado que la cantidad de 21-hidroxilasa observada para la proteína mutante y la salvaje no mostraron diferencias.

Mutación p.R149C: El residuo R149 se encuentra en la hélice D y no estaría implicado en interacciones con otras proteínas conocidas o cofactores. Cuando se analiza la proteína con el residuo 149C, no se desprende que este residuo intervenga en la formación de un puente disulfuro con ninguna otra cisteína cercana en la estructura tridemensional. Teniendo en cuenta estas observaciones, y considerando que para ambos modelos se predice una desestabilización significativa en presencia de la mutación p.R149C (Resultados, Tabla 12), proponemos que este sería el mecanismo responsable de la pérdida de función de la proteína. Nuestros resultados son coincidentes con lo propuesto por Haider y col. (Haider y col., 2013), quienes sugirieron que la presencia de la mutación p.R149C interrumpiría la formación del puente salino que existe entre la hélice D y la hélice E, entre los residuos R149 y E162 y por lo tanto producir una desestabilización localizada de la estructura terciaria de la proteína.

Capítulo V- Discusión

Nuevamente, la presencia de la mutación p.V281L en el alelo homólogo de la paciente no permitía predecir la gravedad de la mutación novel. Los estudios funcionales revelaron una actividad enzimática disminuida relacionada con la forma leve de la patología (FNC). Estos resultados son semejantes a los hallados para la mutación p.R149P, donde los autores describen una actividad residual semejante (23,4 y 16,9% con 17-OHP y progesterona, respectivamente, Chu y col., 2013). Al igual que para la mutación p.R132C, esta mutación no afecta los niveles de proteína.

Mutación p.M283V: El residuo M283 se encuentra en la hélice I, región con una elevada conservación de la secuencia aminoácidíca entre diferentes CYPs. Se sugiere que esta hélice participa tanto en la unión con el grupo HEMO como en la unión y el reconocimiento del sustrato (Robins y col., 2006).

Como ya hemos señalado en el capítulo de resultados (apartado IV.2.2.), los dos modelos describen consecuencias diferentes para la mutación p.M283V. Mientras que al utilizar el modelo desarrollado con 2GEG se observaron diferencias en la energía libre entre la mutante y la proteína de tipo salvaje, nuestro modelo desarrollado con Biskit mostró una diferencia en la estabilización de la proteína mutante. Dada la ausencia de una estructura experimental de la P450C21 humana, estas discordancias sugerirían que ninguno de los modelos resuelve en forma acertada la estructura para esta región en particular.

La p.M283V se encuentra muy próxima a la mutación p.V281L para la cual se propone que existiría una alteración en el reconocimiento de los sustratos, o en la interacción proteínaproteína (White y Speiser, 2000). Por lo tanto, es posible que el mecanismo patogénico de la p.M283V sea similar al de la p.V281L.

Teniendo en cuenta que la actividad *in vitro* de 281L es cercana al 30-50% (Wu y Chung, 1991) y que la actividad enzimática residual de la proteína codificada por el alelo homólogo

Capítulo V- Discusión

de dos de las tres pacientes con FNC en las que se encontró la mutación es casi nula (c.283-13A/C>G y 5' macroconversión), sugerimos que la mutante V283 se asociaría con un alelo leve. De hecho, los estudios funcionales confirmaron estas predicciones, ya que las actividades residuales con 17-OHP y progesterona fueron de aproximadamente 16 y 19 %, respectivamente. Al igual que para las 2 mutaciones anteriores, esta mutante no muestra diferencias en los ensayos de expresión en el WB respecto de la proteína salvaje. Dado que proponemos que por su proximidad con la p.V281L el mecanismo sería semejante, los ensayos funcionales coincidirían con las predicciones bioinformáticas, dado que se afectaría la interacción con los sustratos y no la capacidad de síntesis (o degradación) de la proteína mutante.

Mutación p.E431K: Los resultados obtenidos usando ambos modelos predijeron que p.E431K no causaría una desestabilización de la proteína. Sin embargo, E431 se encuentra dentro de un grupo de residuos básicos localizados en la superficie cercanos al sitio de interacción con la POR (Hlavica y col., 2003). Por lo tanto, es de esperar que el cambio de un residuo básico en lugar de uno ácido en esta mutante afecte el potencial electrostático en esta superficie y en este caso implique una pérdida de interacción con la POR.

La sustitución de un ácido glutámico por una lisina puede afectar la interacción correcta de los ligandos que se produce debida a la carga que posee la P450c21 en su superficie. Alternativamente, al aumentar aún más la carga neta positiva de la superficie, se podría aefctar la disociación del ligando de la enzima. Estas predicciones no concuerdan con las sugeridas por Haider y col. (Haider y col., 2013) quienes proponen que la mutación p.E431K impediría la formación del puente salino existente entre el residuo E431 y el residuo R435, ambos en la hélice L, que desestabilizaría la estructura terciaria local de la proteína. Sin embargo, un análisis detallado de la estabilización global de la proteína en ese trabajo son

Capítulo V- Discusión

coincidentes con nuestras predicciones bioinformáticas ya que se observa un leve aumento (-0,6 kcal mol-1) en la diferencia de energía libre respecto de la proteína salvaje.

La mutación p.E431K se la halló en *cis* con la mutación g.2012A>G (p.D322G) descripta con anterioridad (Loidi y col., 2006). Estudios funcionales *in vitro* demostraron que p.D322G reduce la actividad de la enzima a valores que se asocian con la FNC de la enfermedad (Bleicken y col., 2009). Por lo tanto, y teniendo en cuenta los análisis *in silico*, no se podía descartar que la consecuencia patológica de este alelo se deba a esta mutación. El modelado molecular, por otro lado, predecía que los posibles efectos de ambas mutaciones eran independientes. Por lo tanto, los análisis *in vitro* eran necesarios para aclarar aún más si este alelo representa un alelo severo o uno leve. Más aún, existen varios trabajos que analizaron la consecuencias biológicas de la presencia de 2 mutaciones leves en un mismo alelo ((Nikoshkov y col., 1997; Lajic y col., 2002; Soardi y col., 2008, Tardy y col., 2010). En todos los casos se demostró que las mismas codifican siempre para alelos con baja o nula actividad enzimática.

Los estudios *in vitro* en este trabajo se realizaron para las dos mutaciones en forma aislada así como para la doble mutante. Los ensayos funcionales demostraron que las mutaciones p.E431K y p.D322G en forma aislada se relacionarían con la FNC de deficiencia de 21-hidroxilasa, mientras que las dos mutaciones en *cis*, reducen la actividad enzimática a valores cercanos a aquellas mutaciones relacionadas con la forma VS de la patología.

Los ensayos de WB con homogenatos de células COS-7 transfectadas con p.E431K, p.D322G y la doble mutante p.E431K + p.D322G indicarían, por otro lado, que existe una clara disminución de la cantidad de proteína. Estos resultados sugerirían que en estas mutantes existiría una deficiencia en su síntesis o una mayor degradación de la proteína resultante. Si bien es muy probable que alguno de estos mecanismos sea el responsable de

Capítulo V- Discusión

que se obtengan niveles más bajos de expresión, no se midieron los niveles resultantes del ARNm de cada mutante para descartar la existencia de algún mecanismo que pudiera implicar una menor tasa transcripcional de los vectores o el aumento de la degradación del ARNm. Sin embargo, existen trabajos anteriores en donde se describieron mutaciones puntuales en el gen *CYP21A2* que causan una disminución en la estabilidad de la proteína y por lo tanto en la vida media de la misma. Un ejemplo es el caso de la mutante p.R483P (Nikoshkov y col., 1998). Del mismo modo, y al igual que lo observado en este trabajo de tesis, se describió una reducción en la cantidad de proteína en presencia de la mutación p.D322G sin que se haya modificado la cantidad de ARNm de la misma (Bleicken y col, 2009).

Por lo tanto, la reducción en la actividad de la enzíma que se observó en las células transfectadas con p.E431K y p.D322G en forma independiente podría explicarse por una disminución de la expresión de la proteína. Por el contrario, no se observó un efecto sinérgico en la disminución de la cantidad de proteína en presencia de las 2 mutaciones en la misma construcción, ya que los ensayos de WB tanto para p.D322G como para p.E431K o la doble mutante, muestran que la cantidad de proteína es semejante. Estas observaciones sugerirían que existiría un efecto adicional en la conversión de sustrato que probablemente resulte de una conformación tridimensional diferente de la doble mutante.

Por otra parte, los resultados de análisis de WB para p.E431K contrastan con la predicción *in silico* que sugerían que esta mutación aislada estabiliza a la proteína. Dado que la mutación introduce una lisina, una posible explicación podría ser la generación de un nuevo sitio ubiquitinación. Sin embargo no hallamos sitios potenciales de ubiquitinación en esta región.

Por lo tanto, y al igual que lo reportado por otros autores, la presencia de más de una mutación leve en un mismo alelo, predice un alelo severo. En el caso de la paciente de

nuestra cohorte, por lo tanto, el fenotipo NC se debe a la presencia de la mutación p.V281L. Sin embargo, esta paciente es portadora de un alelo de riesgo en la descendencia de un niño potencialmente afectado de la forma VS. En este caso, así como en todos los casos de pacientes compuestos heterocigotas con un alelo severo, es importante recomendar el estudio de la pareja para un correcto asesoramiento de los riesgos en la descendencia.

V.3. ANÁLISIS IN VITRO DE LA MUTACIÓN c.652-2A>G

En este trabajo de tesis hallamos una mutación c.652-2A>G en el sitio aceptor de *splicing* del intrón 5 del gen. Para analizar sus consecuencias biológicas, se utilizó la expresión transitoria de minigenes reporteros de *splicing* que se transfectaron en células de origen humano HEK-293 y HeLa, así como en la línea celular adrenal Y-1 de origen murino.

Los ensayos realizados de RT-PCR y posterior secuenciación del ADNc del minigén en estudio, mostraron que el alelo con la mutación c.652-2A>G suprime completamente el uso del sitio canónico de *splicing* tal como se había predicho mediante el análisis bioinformático con el programa *HSF*. Los ensayos bioinformáticos predecían además, la presencia potencial de 2 sitios crípticos de *splicing*. Sin embargo, en las tres líneas celulares analizadas, los estudios *in vitro* demostraron que en lugar del sitio canónico de *splicing* se utilizaba el sitio críptico en el exón 6 dando lugar a un ARNm que poseía una deleción de 16 nt que predice la aparición de un codón de terminación de la traducción prematuro 12 nt rio abajo.

Hasta este momento, se describieron en la literatura sólo 12 mutaciones en los intrones del gen *CYP21A2* (Higashy y col., 1988; Wedell y col., 1993a; Lajic y ol., 1996; Lee y col., 1998; Ordonez-Sanchez y col., 1998; Billerbeck y col., 2002; Friaes y col., 2006; Rothberg y col., 2000; Katsumata y col., 2010; Finkielstain y col., 2011; Rubtsov y col., 2011), y 5 de ellas se encuentran en el intrón 2. Casi en su totalidad, las mutaciones se asociaron con la

Capítulo V- Discusión

forma PS de la enfermedad, pero sólo en 3 de ellas se realizaron estudios funcionales (Lee y Chang, 2001; Katsumata y col., 2010; Rubtsov y col., 2011).

De manera similar a nuestro hallazgo, Lee y col. (Lee y col., 1998) hallaron una mutación en un sitio donor de *splicing* del intrón 2 del gen (c.390+1G>A). En un trabajo posterior, los autores demostraron que la mutación estudiada inhibía completamente el uso del sitio canónico y que en su lugar se utilizaba un sitio críptico de *splicing* (Lee y Chang, 2001). A diferencia de la mutación hallada en este trabajo, los autores describen la presencia de dos tipos de transcriptos del gen *CYP21A2* mutante. El 70% de los transcriptos correspondían a un ARNm en el que se eliminaba todo del intron 1, el exón 2 y el intrón 2. Sin embargo, el 30% restante de los transcriptos conservaba 19 pb del intrón 2 debido a la utilización de un sitio aceptor críptico de *splicing*.

Por su parte, Katsumata y col. (Katsumata y col., 2010) describieron una mutación, c.1221-9C>A, en el intrón 9 del gen. Mediante estudios funcionales demostraron que este cambio genera un sitio aceptor de *splicing* aberrante en el intrón 9 que anula por completo el sitio canónico con la adición de 7 bases en el ARNm resultante y ausencia de la proteína CYP21. Por su parte, Rubtsov y col. (Rubtsov y col., 2011) describen que el cambio c.290-7C>G en el intrón 2 del gen impide el uso del sitio aceptor canónico del intrón 2.

Existirían dos mecanismos posibles que explicarían las consecuencias patogénicas *in vivo* de la mutación c.652-2A>G hallada en este trabajo que no son mutuamente excluyentes: a- la formación de una proteína trunca, inestable y sin actividad enzimática, y/o b- la degradación del ARNm debido a un mecanismo de degradación mediada por codones sin sentido (conocida como NMD por sus siglas en inglés para n*on sense mediated decay*). Sin embargo, la metodología empleada en este trabajo se basa en la sobreexpresión de ARNm *in vitro* a partir de un promotor fuerte. Por lo tanto, no es posible analizar si se produce o no NMD ni

Capítulo V- Discusión

predecir si este mecanismo pudiera actuar *in vivo*. No obstante, e independientemente del mecanismo subyacente, en ambos casos se predice un alelo severo debida a la sustitución del sitio aceptor de *splicing* que produciría una proteína sin actividad enzimática.

A modo de resumen de estos dos últimos apartados, podemos señalar que para las 4 mutaciones noveles puntuales no sinónimas halladas en la región codificante del gen en los pacientes de nuestra cohorte, el modelado molecular reveló cambios en la estabilidad, estructura y/o carga de la superficie de la proteína que podrían estar relacionados con la manifestación clínica que se observa en los pacientes. Por su parte, los estudios funcionales *in vitro* demostraron que todas las mutantes en forma aislada provocan una disminución de la actividad enzimática entre el 15 y el 50% que se relacionarían con la FNC de la enfermedad. La doble mutante, en cambio, se asociaría a la forma VS.

El análisis de WB reveló que la cantidad de proteína para las mutaciones p.R132C, p.R149C y p.M283V era comparable a la del tipo salvaje, lo que sugiere que la reducción de la actividad enzimática no se debe a una disminución significativa en la cantidad de 21-hidroxilasa, sino a la funcionalidad de la misma. Esto es concordante con los estudios realizados *in silico* para estas 3 mutantes que predicen modificaciones electrostáticas o desestabilización de las proteínas.

Por otra parte, la presencia de una segunda mutación en el mismo alelo, característica muy común en la deficiencia de 21-hidroxilasa, no suele ser analizada en las predicciones *in silico*. De hecho, los estudios funcionales realizados en este trabajo y en muchos otros (Nikoshkov y col., 1997; Menassa y col, 2008; Soardi y col., 2008; Tardy y col., 2010) revelaron actividades enzimáticas más bajas para alelos con dos mutaciones leves en *cis*, a diferencia de los resultados que se obtiene cuando ambas mutaciones se estudian por separado.
Capítulo V- Discusión

Para la mutación en el sitio aceptor de *splicing*, los ensayos funcionales demostraron que en presencia de la mutación c.652-2A>G se anula el uso del sitio canónico de *splicing* y que en su lugar se utiliza un sitio críptico dentro del exón 6 que daría lugar a la aparición de un codón de terminación de la traducción prematuro.

Es necesario considerar que a pesar de que los estudios *in vitro* son sumamente necesarios y colaboran para el asesoramiento genético, tienen limitaciones ya que no necesariamente lo que se observa *in vitro* va a coincidir con lo que ocurre *in vivo*. Como ya se mencionará, existen pacientes con fenotipos discordantes de acuerdo a su genotipo y pacientes crípticos a pesar de tener las 2 mutaciones que provocarían la aparición de sintomatología. Por lo tanto y excepto para el caso de la mutación p.M283V donde observamos 3 pacientes que la poseen, sería necesario el hallazgo de más pacientes con estas mutaciones noveles para definir con total certeza a que forma de la enfermedad se asocia cada una de ellas.

V.4. ANÁLISIS DE PARÁMETROS FENOTÌPICOS EN LOS PACIENTES DE NUESTRA COHORTE Y SU CORRELACIÓN CON EL GENOTIPO

Como se mencionó anteriormente, el estudio de las 10 mutaciones más frecuentes en los pacientes de nuestra cohorte posibilitó la caracterización del 95% de los alelos provenientes de pacientes PS, un 91% entre los VS y alrededor del 70% de los alelos de los pacientes de la FNC (Dain y col., 2002).

A partir del estudio realizado en esta tesis, se logró establecer el genotipo en todos los pacientes clásico de nuestra cohorte, pero sólo en el 16,6% de los pacientes FNC secuenciados. Por lo tanto, aún luego del estudio de las 10 mutaciones más frecuentes y la secuenciación completa del gen *CYP21A2*, resta un alto porcentaje de alelos FNC sin caracterizar.

Capítulo V- Discusión

Del total de 274 pacientes de la FNC de nuestra cohorte, en 202 (73,4%) se completó su genotipo mediante el estudio de las 10 mutaciones más frecuentes, 72 fueron secuenciados y de ellos 12 presentaron las dos mutaciones causantes de la enfermedad. Por lo tanto, luego del análisis de las 10 mutaciones más frecuentes y la secuenciación completa del gen *CYP21A2*, 214 pacientes (78,1%) se correspondieron fehacientemente con individuos que presentaban la FNC de la deficiencia de 21-hidroxilasa. El resto de los pacientes de la FNC que poseen sólo un alelo mutado (29/274; 10,6%) en el gen *CYP21A2* o bien ninguno (33/274; 12,0%), corresponderían a individuos hiperandrogénicos para quienes es posible que existan otros factores genéticos y/o ambientales que contribuyan con la manifestación clínica que presentan.

La alta frecuencia de portadores hallada en nuestro grupo de pacientes es concordante con lo reportado en la bibliografía. Es de destacar, sin embargo, que nuestro estudio presenta una muestra muy enriquecida en pacientes FNC con un número mayor de individuos analizados que en otros trabajos anteriores y en otras poblaciones.

Para la población de Estados Unidos, por ejemplo, se observó una frecuencia de portadores del 10,4%, al analizar 47 pacientes con la FNC (Finkielstain y col., 2011). Por su parte, Marino y col. (Marino y col., 2011) al analizar 217 pacientes con diagnóstico de FNC en nuestra población, hallaron una frecuencia de alelos sin mutaciones del 19%. En la población brasilera, la frecuencia de alelos que no poseen mutaciones en el gen *CYP21A2* es también elevada, ya que si bien el estudio de 17 mutaciones permitió la genotipificación completa del 69% de los alelos provenientes de los pacientes FNC (Bachega y col., 2000), la secuenciación posterior de los alelos sin determinar, demostró que el 88% de los mismos no presentaban mutaciones (Bachega y col., 2004) en forma semejante a lo hallado en este estudio. Sin

Capítulo V- Discusión

embargo, en un trabajo reciente en la población alemana donde analizan 34 pacientes de la FNC, se observó una frecuencia de portadores del 4,6% (Krone y col., 2013).

Nuestros datos, junto con los datos de otros trabajos (Hall, 1991; Bachega y col., 2000; Ezquieta y col., 2002a; Rodriguez y col., 2006; Arukwe, 2008) apoyan el concepto que es probable que un valor 17-OHP post ACTH de 10 ng/ml podría sobrestimar el diagnóstico de la FNC de la enfermedad. De hecho, Finkielstain y col. (Finkielstain y col., 2011) no hallaron pacientes con las dos mutaciones causantes de la enfermedad con un valor de 17-OHP post ACTH inferior a 13,6 ng/ml. Por su parte, Bachega y col. (Bachega y col., 2004), lograron caracterizar las 2 mutaciones causantes de la patología en pacientes con 17-OHP post ACTH superior a 17 ng/ml, similar al valor de 16,9 ng/ml reportado por Deneux y col. (Deneux y col., 2001). En un estudio realizado por Ezquieta y col. (Ezquieta y col., 2002a), después del análisis exhaustivo del gen con secuenciación, la presencia de las 2 mutaciones en el gen *CYP21A2* se observaba en pacientes que poseían 17-OHP en respuesta al test de ACTH igual o mayor a 20 ng/ml. En todos los trabajos antes mencionados, el gen *CYP21A2* se analizó por secuenciación en aquellos pacientes que no poseían los 2 alelos con las mutaciones más frecuentes.

Asimismo, se reportó con anterioridad que los portadores de una sola mutación en el gen *CYP21A2* pueden presentar sintomatología y valores hormonales similares a los afectados de la FNC de la deficiencia (Krone y col., 2000; Admoni y col., 2006). Sin embargo, Knochenhauer y col. (Knochenhauer y col., 1997) luego de analizar 38 portadores obligados del gen *CYP21A2* y 22 controles, observaron que no hay diferencias en los niveles de A, ni de DHEA ni de 17-OHP basal, pero si en los niveles de esta hormona luego del estímulo con post ACTH. Los autores concluyen además, que ser portador de mutaciones en el gen *CYP21A2* no aumenta el riesgo de tener hiperandrogenismo. Estos autores, junto con otros

Capítulo V- Discusión

grupos, sostienen que poseer mutaciones en un alelo del gen no es suficiente para justificar el exceso de andrógenos y anormalidades en la esteroidogénesis, dado que los signos de hiperandrogenismo e incluso los valores aumentados de 17-OHP también se observaban en la población general (Knochenhauer y col., 1997; Rumsby y col., 1998; Witchel y Lee, 1998). Sin embargo es de destacar que en estos trabajos no se secuenció el gen *CYP21A2* en aquellos individuos que no poseían algún alelo con las mutaciones más frecuentes derivadas del pseudogén.

Por su parte, Escobar-Morreale y col. (Escobar-Morreale y col., 1999) analizaron 40 mujeres con hirsutismo y 13 controles. Las pacientes fueron divididas en 3 grupos, según si el hiperandrogenísmo era idiopático, ovárico o adrenal. En todos los casos analizaron el perfil hormonal de las pacientes y controles, así como las 10 mutaciones más frecuentes del gen *CYP21A2*. Los niveles de 17-OHP basal o post estímulo con ACTH, fueron similares en todos los grupos analizados y al analizar las mutaciones del gen *CYP21A2*, observaron 9 portadores: 3 del grupo adrenal, 3 idiopáticos, 2 del grupo ovárico y 1 control. A su vez, algunos eran portadores de una mutación leve y otros de una severa. Con estos resultados, los autores concluyen que no hay una relación entre el genotipo de portadores de mutaciones del gen *CYP21A2* y el exceso de andrógenos.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, es notorio que no haya una postura definida si el hecho de ser portador de mutaciones en el gen *CYP21A2* aumenta o no el riesgo de ser hiperandrogénico. De todas formas, además de los portadores hallados en nuestra muestra de pacientes, es llamativo que observemos también individuos con valores elevados de 17-OHP pero sin mutaciones en ningún alelo.

Capítulo V- Discusión

Por lo tanto, y considerando todas estas observaciones, decidimos analizar los valores hormonales y la edad de aparición de la sintomatología de los pacientes de la FNC en diferentes grupos según si poseían 2 mutaciones, 1 o ninguna.

Luego de analizar los valores de A, T y DHEA-S para todos los grupos en estudio, no se obtuvieron diferencias significativas entre ellos. Por lo tanto, los valores de estas hormonas no serían informativos a la hora de decidir la inclusión o no de un paciente al estudio de diagnóstico molecular, al menos en nuestra población. Por otro lado, tampoco observamos diferencias en la edad de aparición de la sintomatología.

Por el contrario, al analizar los valores de 17-OHP basal y post estímulo con ACTH, se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos con dos mutaciones y los que presentaban una o ninguna. Sin embargo, si se analizan los valores individuales de los pacientes, observamos que existe superposición entre todos los grupos, si bien claramente se observa que ningún paciente con las 2 mutaciones poseía un valor de 17-OHP menor a 12,5 ng/ml (Resultados, apartado IV.4.1., Figura 50 y Tabla 17).

A partir de estas observaciones iniciales, agrupamos los valores de 17-OHP post estímulo con ACTH en diferentes rangos para estimar la probabilidad de que un paciente posea ambos alelos del gen mutado. Mediante este análisis, observamos, como se consignó más arriba, que a pesar que el valor de 17-OHP post ACTH utilizado como valor de corte para la inclusión de pacientes en nuestro laboratorio es de 10 ng/ml, ninguno de los pacientes que poseía valores entre 10 y 12,5 ng/ml, presentaba las dos mutaciones causantes de la enfermedad. Por su parte, solamente el 4,1% de los pacientes con 2 mutaciones presenta valores de 17-OHP entre 12,5 y 17 ng/ml (todos ellos pertenecen al grupo de 2 alelos leves), mientras que alrededor del 73% presentaba valores entre 17 y 20 ng/ml. Llamativamente, el 15% de los pacientes que poseen valores de 17-OHP post ACTH mayores a 20 ng/ml, no presentan ambos alelos

Capítulo V- Discusión

mutados. Estos resultados claramente estrían indicando que si bien según el nomograma clásico de New (New y col., 1983) los valores de 17OHP post-ACTH iguales o superiores a 10 ng/ml eran diagnósticos del déficit de 21-hidroxilasa para las FNC, los estudios moleculares demuestran un panorama diferente.

De cualquier manera es necesario aclarar que para el caso de nuestros pacientes, si bien mayoritariamente fueron derivados del Hospital Durand y del Hospital Italiano de Buenos Aires, muchas de ellos provienen de distintos centros del país y por lo tanto los estudios hormonales se realizaron en diferentes laboratorios y por diferentes metodologías. Por esta razón, no establecimos a partir de este estudio un valor predictivo positivo o negativo para los valores de 17-OHP post ACTH. De hecho, Van der Kamp y col. (Van der Kamp y col., 2004) y Ballerini y col. (Ballerini y col., 2014) observaron diferencias al analizar el valor de 17-OHP por diferentes métodos tanto en los valores de corte que se utilizarían así como en la cantidad de falsos positivos y negativos.

Los valores predictivos (positivo y negativo) miden la eficacia real de una prueba diagnóstica. Diversos grupos de trabajo calcularon valores predictivos positivos para los dosajes de 17-OHP basal y post ACTH que permitan encontrar pacientes con las 2 mutaciones del gen *CYP21A2*, pero en todos los casos el dosaje se realizó por un único método (Hayashi y col., 2011; Barra y col., 2012). El grupo de Ezquieta y col. (Ezquieta y col., 2002b) calculó el valor predictivo de 17-OHP post ACTH para predecir la presencia de un alelo severo en pacientes FNC. Los autores reportaron que pueden predecir el riesgo de mutaciones severas en heterocigosis compuesta con una sensibilidad del 93% y una especificidad del 83% a partir de valores de 50 ng/ml para la prueba de post ACTH.

En el caso de la 17-OHP basal, a partir del análisis realizado en este trabajo, se observaron también diferencias significativas entre los grupos que poseían 2 mutaciones leves o bien una

205

Capítulo V- Discusión

leve y otra severa. Estos resultados son coincidentes con otros trabajos que observaron las mismas diferencias en la 17-OHP basal, si bien también también observan diferencias en el valor de esta hormona post estimulación con ACTH (Weintrob y col., 1996; Deneux y col., 2001; Bachega y col., 2004, Moura-Massari y col., 2013). Por su parte, Speiser y col. (Speiser y col., 2000) en un estudio multicéntrico analizaron también las características de los pacientes con 2 mutaciones leves o una leve y otra severa. Si bien los autores no observaron diferencias en la 17-OHP basal, observaron diferencias en la prueba post estímulo con ACTH, a diferencia de lo hallado en esta tesis. A su vez, en numerosos trabajos se describió que además de la diferencia en los niveles de 17-OHP post ACTH entre individuos con 2 mutaciones leves o una leve y otra severa, también se detectaban diferencias en los niveles de andrógenos y en la edad de aparición de la sintomatología (Wu y Chung, 1991; Bachega y col., 2000; Weintrob y col., 2000; Deneux y col., 2001). Sin embargo, otros grupos no hallaron diferencias significativas en la cantidad de signos clínicos que presentaban los pacientes FNC con 2 mutaciones leves o una leve y una severa, así como tampoco en la edad de aparición de los mismos, ni en los valores de testosterona y androstenediona (Ezquieta y col., 2002b; Bidet y col. 2009; Moura-Massari y col., 2013). Otros autores, sin embargo, no hallan diferencias en los niveles de andrógenos, pero si en la severidad de los signos clínicos según si los pacientes poseen 2 alelos leves o uno leve y el otro severo (Speiser y col, 2000). En nuestro caso, no observamos diferencias en los valores promedio de 17-OHP post ACTH de acuerdo a si los pacientes presentaban 2 alelos leves o uno leve y el otro severo. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el número de pacientes en los que se contaba con el valor de la 17-OHP poste ACTH era bastante inferior a los que contaban con valores basales, ya que si los pacientes poseían valores superiores a 6 ng/ml, a muchos de ellos no se les solicitaba la prueba. Nuevamente otra explicaión posible, puede ser la diferencia en la

Capítulo V- Discusión

metodología de ensayo utilizada en cada caso. De cualquier manera es de destacar que ningún paciente con un alelo leve y el otro severo presentó valores de la prueba menores a 17 ng/ml. En resumen, al igual que para la mayoría de los autores, en el presente trabajo no hallamos diferencias entre los grupos en estudio ni en los niveles de andrógenos ni en la edad de aparición de los síntomas. Por otro lado, las diferencias observadas en los valores de 17-OHP basal entre aquellos pacientes que poseen un alelo severo, sugeriría que si bien los niveles de 17-OHP se verían afectados por la presencia de una mutación severa, estas diferencias no se verían reflejadas en una presentación clínica diferente.

V.4.1. CORRELACIÓN ENTRE EL FENOTIPO OBSERVADO Y EL ESPERADO DE ACUERDO AL GENOTIPO HALLADO EN PACIENTES CLÁSICOS Y NO CLÁSICOS TOTALMENTE GENOTIPIFICADOS

Analizando todos los genotipos encontrados en nuestros pacientes, ya sea mediante secuenciación o mediante el estudio de las 10 mutaciones más frecuentes, observamos que el genotipo más frecuente para la FC PS fue c.283-13A/C>G/c.283-13A/C>G en el 13,7% de estos pacientes. Para los pacientes FC VS, el genotipo que se presentó con mayor frecuencia fue p.I172N/c.283-13A/C>G en el 29,8% de los casos y para los pacientes de la FNC, el genotipo de mayor frecuencia fue p.V281L/p.V281L en el 33% de los casos.

Para la FC PS, los datos bibliográficos muestran que el genotipo más frecuentes en otras poblaciones es el mismo que el hallado en los pacientes de nuestra cohorte, con frecuencias de 23,6% en Estados Unidos (New y col., 2013), 11,5-32,1% en Turquía (Bas y col., 2009; Toraman y col., 2013), 15,7-30,3% en Brasil (Witchel y col., 2000; Bachega y col., 2004) y 28% en Eslovenia (Dolzan y col., 2005). Asimismo, en otro trabajo realizado en individuos de nuestra población, se describe una frecuencia de 15,5% para el genotipo c.283-

Capítulo V- Discusión

13A/C>G/c.283-13A/C>G para esta forma clínica de la enfermedad (Marino y col., 2011). Sin embargo, el genotipo más frecuente para los individuos PS en Noruega fue Del/Del (Nermoen y col., 2012), y en un estudio realizado en la población de Holanda, el 13,8% de los afectados PS presentaba el genotipo c.283-13A/C>G/Del (Stikkelbroek y col., 2003), al igual que en la población de Portugal en el 17,7% de los pacientes (Friaes y col., 2006).

Para la FNC, el genotipo mayoritario en otras poblaciones es el mismo que en nuestro grupo de pacientes. Los datos reportados en la bibliografía muestran que el genotipo p.V281L/p.V281L se halló en el 25% en Francia (Bidet y col., 2009), 38,5% en Estados Unidos (New y col., 2013), 40% en Brasil (Bachega y col., 2004) y 44,6% en España (Ezquieta y col., 2002b). En forma concordante, Marino y col (Marino y col., 2011) describen una frecuencia del 31.3% para genotipo p.V281L/p.V281L en afectados de la Argentina. En Eslovenia, sin embargo, el genotipo más frecuente para la FNC fue p.V281L/Del hallado en 6 de 35 pacientes con esta forma clínica (17,1%), mientras que el genotipo p.V281L/p.V281L se encontró en solo 1 paciente (Dolzan y col., 2005). El mismo genotipo (p.V281L/Del) fue el más frecuente en la población de Portugal, en el 57,7% de los casos (Friaes y col., 2006).

Para la FC VS, el panorama es diferente. El genotipo más frecuente observado en la población turca fue c.283-13A/C>G/c.283-13A/C>G en el 20-33% de los pacientes (Bas y col., 2009; Toreman y col., 2013), seguido por p.I172N/Del 8pb (p.G110_Y112delfs) en el 10% de los casos (Bas y col., 2009). Por otro lado, New y col. (New y col., 2013) observaron en un grupo heterogéneo de pacientes, que para la forma VS de la enfermedad, el genotipo de mayor frecuencia fue p.I172N/Del en el 28,3% de los casos. Este mismo genotipo es el que se observó con mayor frecuencia (38,5% de los casos) para la forma VS en la población holandesa (Stikkelbroek y col., 2003). Otros grupos, sin embargo, describieron que entre sus pacientes VS, los genotipos más frecuentes eran los mismo que los observados en los

Capítulo V- Discusión

pacientes de nuestra cohorte, con una frecuencia que varía de entre el 17 y el 40% (Bachega y col., 2004; Dolzan y col., 2005; Marino y col., 2011; Nermoen y col., 2012).

Al analizar si los genotipos hallados entre los pacientes de nuestra cohorte se correspondían con el fenotipo observado, se evidenció una alta correlación fenotipo-genotipo. Según nuestros datos, el 97,7% de los pacientes analizados en esta sección (300/307 pacientes) mostraron que el fenotipo observado era el esperado de acuerdo al genotipo hallado. Nuestros resultados son concordantes con la mayoría de los trabajos reportados, donde se observa una correlación que varía entre el 80 y el 95%. (Mornet y col., 1991; Speiser y col., 1992; Wedell y col., 1994; Wedell, 1998; Krone y col, 2000; Wilson y col., 2007; Finkielstain y col., 2011). Sin embargo, en otros estudios se describe una correlación inferior al 50% (Krone y col., 2000; New y col., 2013).

En los 7 pacientes de nuestra cohorte en los que no se observó una buena correlación, no se incluyeron aquellos genotipos que poseen la mutación c.283-13A/C>G ya que la misma puede asociarse tanto con la forma VS como PS (Wilson y col., 1995; Speiser y White, 1998). Es sabido que esta mutación genera un nuevo sitio de *splicing* en el intrón 2 del gen *CYP21A2* 13pb antes del sitio canónico, lo que produce un corrimiento en el marco de lectura que anularía totalmente la actividad de la enzíma. Sin embargo, se propone que un cierto número de alelos al azar produciría un *splicing* normal y esto sería suficiente para que la actividad enzimática pueda sintetizar una pequeña cantidad de aldosterona y por lo tanto los pacientes presentar el fenotipo VS (Wilson y col., 1995; Speiser y White, 1998).

En general, las discordancias fenotípicas observadas entre los pacientes de nuestro estudio se relacionan a la presencia de la mutación p.I172N. Si bien inicialmente se describió que esta mutación se asociaría a la forma VS de la patología con una actividad residual *in vitro* del 1-2% (Tusie-Luna y col., 1990), se propone que en algunos casos la actividad de la enzima con

Capítulo V- Discusión

esta mutación no sería suficiente para prevenir la crisis salina (Wilson y col., 1995). De hecho, en la bibliografía existen varios trabajos en donde se observan pacientes PS y VS que presentan esta mutación (Wilson y col., 1995; Speiser y White, 1998; Bas y col., 2009; Finkielstain y col., 2011; New y col., 2013). Estas discordancias se hallaron en hermanos con el mismo genotipo, lo que sugiere, la participación de modificadores que actuarían en la transcripción, traducción o en la acción de la 21-hidroxilasa (Chin y Speiser, 1998; New y col., 2013). De hecho, 2 hermanos de nuestra cohorte con el genotpo p.I172N/c.283-13A/C>G, presentaban fenotipos diferentes, uno era PS y el otro VS (Anexo 3, pacientes 811 y 812).

En nuestro grupo de pacientes, 4 individuos con la mutación p.I172N en un alelo y otra mutación severa p.Q318*, p.R356W, p.L429fs o c.283-13A/C>G en el alelo homólogo, presentaron un fenotipo PS. Tres de ellos fueron secuenciados (los que poseían las mutaciones p.Q318*, p.R356W y p.L429fs) y no se detectó ninguna otra mutación que pudiera generar un fenotipo más severo. El paciente con genotipo p.I172N/c.283-13A/C>G no pudo ser analizado mediante secuenciación. Sin embargo, se analizó por esta metodología a su hermano que presentaba el mismo genotipo pero exhibía un fenotipo VS. Por lo tanto, existe una probabilidad que el paciente PS, presente una mutación *de novo* que pudiera explicar su fenotipo.

Para el caso del paciente que posee la mutación p.I172N en heterocigosis compuesta con la mutación novel p.L429fs, más allá de las razones antes mencionadas, una explicación alternativa posible es que la proteína mutante que posee la región carboxi-terminal alterada pueda actuar como dominante negativa. Esta mutación, como ya se mencionara, produce una proteína 26 aminoácidos más larga y un tracto de 91 minoácidos diferentes. Es decir, el plegamiento alterado de la proteína mutante podría secuestrar ligandos o cofactores de la 21-

Capítulo V- Discusión

hidroxilasa de manera tal que el funcionamiento de la proteína generada por el alelo homólogo se vea afectada. Para confirmar esta hipótesis, se deberían realizar estudios *in vitro* que incluyan la co-expresión de vectores con ambas mutaciones, uno que posea la pI172N y otro con la mutación p.L429fs.

Es interesante destacar que se describieron pacientes con la FNC que eran compuesto heterocigotas con dos mutaciones moderadas o severas. Finkielstain y col. reportaron un paciente p.I172N/c.283-13A/C>G y otro p.I172N/p.I172N (Finkielstain y col., 2011). Asimismo, New y col. publicaron un paciente p.I172N/Del con el mismo fenotipo (New y col., 2013). Dado que este paciente no fue estudiado por Southern Blot, los autores proponen que el fenotipo observado se explicaría si el paciente posee el gen *CYP21A2* duplicado con una mutación leve menos frecuente (New y col., 2013). Por su parte, Stikkelbroek y col. (Stikkelbroek y col., 2003) reportaron en la población holandesa pacientes FNC con genotipo es p.I172N/p.I172N. En nuestro grupo de pacientes, sin embargo, no se observó ningún paciente que presente 2 mutaciones moderadas y exhiba FNC (ver ANEXO 3).

Por otro lado, se describió que la mutación p.R356W se asocia fundamentalmente a la forma PS de la enfermedad. Sin embargo, hay un trabajo en la bibliografía donde se describen dos hijas de un matrimonio cosanguíneo, ambas con el genotipo p.R356W/p.R356W, que presentaban un fenotipo VS (Bas y col., 2009). En esta tesis se muestra una paciente con el genotipo p.306insT/p.R356W (Resultados, Tabla 18) donde el fenotipo esperado era también PS, y sin embargo la paciente presento una FC VS. Mediante el estudio de los ADNs parentales se determinó que ambas mutaciones se encontraban en *trans* y los estudios de Southern Blot realizados por la Dra. Cecilia Fernández en nuestro laboratorio, determinaron que la paciente no presentaba el gen duplicado. Considerando que algunos autores reportaron que variantes en los genes *CYP2C19* o *CYP34A* contibuyen a modular el balance salino y

Capítulo V- Discusión

evitar las crisis salina en pacientes PS (Gomes y col., 2009), sería necesario analizar la presencia de algunas variantes en estos genes con el fin de establecer si las misma se relacionarían con el fenotipo que presenta.

Dentro del grupo de mutaciones menos frecuentes, en esta tesis se describe una paciente que presentaba el genotipo p.H62L/c.283-13A/C>G con fenotipo VS a diferencia de la FNC que era la forma de presentación clínica esperada (Resultados, Tabla 19).

Como ya se consignó precedentemente, el cambio p.H62L es una de las mutaciones raras más frecuentes del gen *CYP21A2* (Menassa y col., 2008) y se describieron sólo 12 pacientes (7 de la población de Taiwán) que no poseen mutaciones adicionales en *cis* (Ezquieta y col., 2002b; Menassa y col., 2008; Nagasaki y col., 2009; Chang y Lee, 2011). Los análisis *in silico* recientes predicen que la sustitución de histidina por leucina impediría la formación de un puente de hidrógeno entre el residuo H62 y el residuo G35, que provocaría una reducción de la actividad enzimática, si bien la misma no sería total (Haider y col., 2013). Mientras que los ensayos funcionales también sugirieron que p.H62L es una mutación leve asociada a la FNC de la enfermedad, la presencia de otra mutación en el mismo alelo produce un efecto sinérgico en la reducción de la actividad enzimática (Menassa y col., 2008; Soardi y col., 2008), tal como ocurre con las mutaciones p.D322G y p.E431K descriptas en esta tesis.

La paciente de nuestra cohorte presentó la mutación p.H62L aislada en un alelo y la mutación clásica c.283-13A/C>T en el otro. A diferencia del fenotipo leve encontrado en los pacientes descriptos anteriormente con la mutación p.H62L aislada en heterocigosis compuesta con una mutación severa, las manifestaciones clínicas y el perfil hormonal de esta paciente son compatibles con la forma VS de la enfermedad. El gen *CYP21A2* fue secuenciado en su totalidad incluyendo las regiones promotoras cercanas y las regiones regulatorias distales del mismo (Fernández C, 2014) y no se encontraron mutaciones adicionales. Sin embargo, en

Capítulo V- Discusión

2009 se reportó en Japón una paciente que presentó la mutación p.H62L aislada en un alelo y la mutación severa del cluster del exón 6 (p.I236M, p.V237E, p.M239K) en el otro, que presentaba un tamaño de clítoris en el límite superior de los niveles normales y los valores de 17-OHP se correspondían con valores intermedios entre las formas VS y NC (Nagasaki col., 2009). Todas estas observaciones en conjunto sugieren que a pesar de que los estudios *in vitro* relacionan a p.H62L con una mutación leve, la presencia de otros factores genéticos o ambientales contribuirían a modular la actividad de la enzima *in vivo*. El estudio de la correlación genotipo-fenotipo en otros pacientes que presentan esta mutación contribuiría a definir las manifestaciones clínicas con las que se asocia esta variante. Mientras tanto, se debe tener en cuenta la posibilidad que la mutación p.H62L en forma aislada se asocie con una forma clínica más grave de la enfermedad.

El último paciente con fenotipo discordante es un varón cuyo genotipo es p.R341P/c.283-13A/C>G. La mutación p.R341P es una de las mutaciones poco frecuentes discutidas al principio de este capítulo. Fue descripta por Balsamo y col. (Balsamo y col., 2003) y se asocia a la forma VS de presentación clínica, a diferencia del fenotipo PS que presentó el paciente de nuestra cohorte. El gen de este paciente fue secuenciado en su totalidad, incluyendo las regiones promotoras y regulatorias y no se hallaron otras mutaciones. Al igual que para los otros pacientes, otros factores genéticos y/o ambientales estarían contribuyendo a la expresión clínica más severa en este paciente.

En el presente trabajo, excepto para la paciente con la mutación p.H62L antes mencionada, todos los genotipos relacionados a la FNC de la enfermedad se correlacionaron con el fenotipo observado en los pacientes. Sin embargo, en la literatura se ha descripto un paciente con genotipo p.V281L/p.V281L, p.I172N y fenotipo VS (Finkielstain y col., 2011). New y col. por su parte reportaron 9 pacientes con la mutación p.V281L en un alelo y fenotipo

213

Capítulo V- Discusión

clásico (New y col., 2013). Situaciones similares se reportaron para la mutación p.P30L, que se asocia a la FNC de la enfermedad (Tusie-Luna y col., 1991). Sin embargo, New y col (New y col., 2013) describieron un 30% de pacientes con esta mutación que exhibían una FC de la patología. Otros autores también asociaron a la mutación p.P30L a la FC VS e incluso PS (Araujo y col., 2005; Dolzan y col., 2005). Araujo y col. (Araujo y col., 2005) hallaron 3 pacientes VS que poseían la mutación p.P30L, y presentaban también las variantes del promotor. Por su parte, Dolzan y col. (Dolzan y col., 2005) hallaron la mutación p.P30L en el 16,3% de los pacientes VS, la mitad de ellos presentaban la conversión del promotor en el mismo alelo, pero la mitad restante no la poseía. De hecho, los autores también describen 3 pacientes PS con esta mutación y en sólo 2 de ellos hallaron las mutaciones de la zona promotora (Dolzan y col., 2005). Finalmente, Marumudi y col. (Marumudi y col., 2012), describieron a la mutación p.P30L como la segunda mutación más frecuente (46%) entre los paciwentes cláscios en la población de India para los pacientes con la FC. Sin embargo, los autores no analizaron el gen por secuenciación, por que no se puede descartar que algunos de los pacientes con p.P30L tengan otras mutaciones en el mismo alelo, como por ejemplo las variantes del promotor antes mencionadas.

V.5. CONCLUSIONES FINALES

Del estudio realizado en la presente tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se describieron 7 mutaciones noveles en regiones codificantes e intrónicas del gen *CYP21A2:* p.R132C, p.R149C, p.M283V, p.E431K, p.L429fs, p.H466fs y c.652-2A>G. Se descartó que las mismas correspondieran a polimorfismos poblacionales dado que no fueron detectadas en individuos de la población general. Aquellas mutaciones que se encuentran en la región codificante, afectan a aminoácidos altamente conservados en la P450c21 de diferentes especies de mamíferos. Por otro lado, los análisis bioinformáticos predijeron que el cambio c.652-2A>G anularía el sitio aceptor canónico de *splicing* y potencialmente se utilizarían 2 posibles sitios crípticos.
- Se hallaron 2 polimorfismos en la región promotora cercana del gen *CYP21A2* que no estaban descriptos en la bibliografía (g.-195T>C y g.-283_-284insG). A su vez se detectó un posible polimorfismo en el intrón 8 del gen (c.1116-34G>A).
- 3. Se hallaron 12 mutaciones poco fecuentes, previamente descriptas, que junto con las mutaciones noveles encontradas, permitieron completar el genotipo en 12 pacientes con la FNC y en 15 pacientes con la FC de la deficiencia de 21hidroxilasa.
- 4. Se analizó mediante modelado molecular para cada mutación novel puntual presente en la región codificante del gen, los efectos que las mismas producían en la estabilidad de la enzima. En todos los casos se hallaron diferencias en la estabilidad de la proteína y/o carga electrostática que, afectarían el funcionamiento de la enzíma.

- 5. Se determinó mediante ensayos *in vitro*, que las 4 mutaciones puntuales noveles de la región codificante producen proteínas con menor actividad enzimática. Se concluye, por lo tanto que estas mutaciones son causantes de la patología en los pacientes estudiados. De acuerdo a los valores de actividad residual hallados, estas mutaciones se relacionarían con la FNC de la enfermedad. Para el caso de la mutación p.E431K, se detectó que la presencia de la mutación p.D322G en el mismo alelo produce un efecto de sinergismo en la disminución de la actividad enzimática. Se concluyó que la doble mutante, p.E431K y p.D322G, se relacionaría con la FC de la misma. Si bien no fue posible realizar el análisis *in vitro* para las mutaciones p.L429fs y p.H466fs, la clínica de los pacientes sugerirían que ambas mutaciones se asociarían con alelos severos.
- 6. Se determinó mediante ensayos *in vitro* que la mutación en el intrón 5 produce un ARNm con un deleción de 16 nt producto del uso de un sitio críptico dentro del exón 6. La predicción que este ARNm daría lugar a la aparición de un codón de terminación de la traducción prematuro como consecuencia del corrimiento del marco de lectura, establece que el alelo portador de esta mutación se correspondería con un alelo grave sin actividad enzimática.
- Se determinó en nuestra población un nuevo valor de corte de 17-OHP post ACTH de 12,5 ng/ml para la inclusión de pacientes con la FNC de la patología.
- Se observaron diferencias significativas en los valores hormonales de 17-OHP basal y post ACTH entre aquellos pacientes con la FNC que presentan ambos alelos con mutación y aquellos que no fueron completamente genotipificados.

- Se observaron diferencias significativas en los valores hormonales de 17-OHP basal entre aquellos pacientes con la FNC que presentan 2 alelos leves y aquellos que poseen un alelo leve y el otro severo.
- No se observaron pacientes FNC con un alelo severo con valores de 17-OHP post ACTH menores a 17 ng/ml.
- 11. Se halló una alta correlación entre los fenotipos observados y los esperados de acuerdo al genotipo hallado. Sin embargo algunos pacientes presentaron discordancias, especialmente aquellos que poseen la mutación p.I172N.
- 12. Se describe una paciente con la mutación p.H62L asociada al FNC de la enfermedad en una paciente VS, un paciente con la mutación p.R356W y fenotipo VS. Por último, se describe un paciente PS con la mutación p.R341P.

-CAPÍTULO VI-BIBLIOGRAFÍA

Admoni O, Israel S, Lavi I, Gur M, Tenenbaum-Rakover Y. (2006). Hyperandrogenism in carriers of CYP21 mutations: the role of genotype. Clin Endocrinol (Oxf); 64:645-51.

Akhtar MK, Kelly SL, Kaderbhai MA. (2005). Cytochrome b(5) modulation of 17{alpha} hydroxylase and 17-20 lyase (CYP17) activities in steroidogenesis. J Endocrinol; 18:267-74.

Alba L, Buzzalino N, Minutolo c, Fernández C, Belli S, et al. (2007). Molecular characterization of 21-hydroxilase deficient patients in Argentine population. 3rd international conference on Birth Defects and Disabilities in the Developing World Rio de Janeiro.

Alba L, Colombi L, de Cross G, Leiderman S, Pasquallini T. (2009). Mesa 3 Hiperplasia Adrenal Congenita en Adolescentes y Adultos. Rev. Argent. Endocrinol. Metab; 46: 71-4.

Alfonso-Sanchez MA, Perez-Miranda AM, Garcia-Obregon S, Pena JA. (2010). An evolutionary approach to the high frequency of the Delta F508 CFTR mutation in European populations. Med Hypotheses; 74: 989-92.

Alonso M, Ezquieta B. (2012). Hiperplasia suprarrenal congénita no clásica o tardía. Rev Esp Endocrinol Pediatr; 3: 61-73.

Araujo RS, Billerbeck AE, Madureira G, Mendonca BB, Bachega TA. (2005). Substitutions in the CYP21A2 promoter explain the simple-virilizing form of 21-hydroxylase deficiency in patients harbouring a P30L mutation. Clin Endocrinol (Oxf); 62:132-6.

Araujo RS, Mendonca BB, Barbosa AS, Lin CJ, Marcondes JA, et al. (2007). Microconversion between CYP21A2 and CYP21A1P promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab; 92:4028-34.

Arlt W, Stewart PM. (2005). Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism, and action. Endocrinol Metab Clin North Am; 34:293-313.

Arukwe A. (2008). Steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and cholesterol sidechain cleavage (P450scc)-regulated steroidogenesis as an organ-specific molecular and cellular target for endocrine disrupting chemicals in fish. Cell Biol Toxicol; 24:527-40.

Azziz R, Zacur HA. (1989). 21-Hydroxylase deficiency in female hyperandrogenism: screening and diagnosis. J Clin Endocrinol Metab; 69:577-84.

Azziz R, Dewailly D, Owerbach D. (1994). Nonclassical adrenal hiperplasia: current concepts. J Clin Endocrinol Metab; 78:810-5.

Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, et al. (1998). Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab; 83:4416-9.

Bachega T.A., Billerbeck A.E., Marcondes J.A., Madureira G. Arnhold IJ, et al. (2000). Influence of different genotypes on 17-hydroxyprogesterone levels in patients with

nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Clin Endocrinol; 52:601-7.

Balsamo A, Cacciari E, Baldazzi L, Tartaglia L, Cassio A, et al. (2000). CYP21 analysis and phenotype/genotype relationship in the screened population of the Italian Emilia-Romagna region. Clin Endocrinol (Oxf); 53: 117-25.

Ballerini MG, Chiesa A, Morelli C, Frusti M, Ropelato MG. (2014). Serum Concentration of 17α -Hydroxyprogesterone in Children from Birth to Adolescence. Horm Res Paediatr; 81:118-25.

Balsamo A, Cicognani A, Baldazzi L, Barbaro M, Baronio F, et al. (2003). CYP21 genotype, adult height, and pubertal development in 55 patients treated for 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab; 88:5680-8.

Baradaran-Heravi A, Vakili R, Robins T, Carlsson J, Ghaemi N, et al. (2007). Three novel CYP21A2 mutations and their protein modelling in patients with classical 21-hydroxylase deficiency from northeastern Iran. Clin Endocrinol (Oxf); 67:335-41.

Barbaro M, Lajic S, Baldazzi L, Balsamo A, Pirazzoli P, et al. (2004). Functional analysis of two recurrent amino acid substitutions in the CYP21 gene from Italian patients with congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab; 89:2402-7.

Barbaro M, Baldazzi L, Balsamo A, Lajic S, Robins T, et al. (2006). Functional studies of two novel and two rare mutations in the 21-hydroxylase gene. J Mol Med; 84:521-8.

Barbaro M, Soardi FC, Ostberg LJ, Persson B, de Mello MP, et al. (2014). In vitro functional studies of rare CYP21A2 mutations and establishment of an activity gradient for nonclassic mutations improve phenotype predictions in congenital adrenal hyperplasia. Clin Endocrinol; 0:1–8.

Barbat B, Bogyo A, Raux-Demay MC, Kuttenn F, Boué J, et al. (1995). Screening of CYP21 gene mutations in 129 French patients affected by steroid 21-hydroxylase deficiency. Hum Mutat; 5:126-30.

Barra CB, Silva IN, Pezzuti IL, Januário JN. (2012). Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. Rev Assoc Med Bras; 58:459-64.

Bas F, Kayserili H, Darendeliler F, Uyguner O, Günöz H, et al. (2009). CYP21A2 Gene Mutations in Congenital Adrenal Hyperplasia: Genotype-phenotype correlation in Turkish children. J Clin Res Ped Endo; 1:116–28.

Baumgartner-Parzer S, Schulze ME, Waldhausl W, Pauschenwein S, Rondot S, et al. (2001). Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Austria: identification of a novel missense mutation. J Clin Endocrinol Metab; 86:4771-5.

Bell J, Bodmer D, Sisterman E, Ramsden SC. (2008). Practice guidelines for the Interpretation and Reporting of Unclassified Variants (UVs) in Clinical Molecular Genetics. CMGS/VGKL.

Bidet M, Bellanne-Chantelot C, Galand-Portier MB, Tardy V, Billaud L, et al. (2009). Clinical and molecular characterization of a cohort of 161 unrelated women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency and 330 family members.J Clin Endocrinol Metab; 94:1570-8.

Billerbeck AE, Bachega TA, Frazatto ET, Nishi MY, Goldberg AC, et al. (1999). A novel missense mutation, GLY424SER, in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab; 84:2870-2.

Billerbeck AE, Mendonca BB, Pinto EM, Madureira G, Arnhold IJ, et al. (2002). Three novel mutations in CYP21 gene in Brazilian patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency due to a founder effect. J Clin Endocrinol Metab; 87:4314-7.

Blanche H, Vexiau P, Clauin S, Le Gall I, Fiet J, et al. (1997). Exhaustive screening of 21-hydroxylase gene in a population of hyperandrogenic women. Hum Genet; 101:56–60.

Bleicken C, Loidi L, Dhir V, Parajes S, Quinteiro C, et al. (2009). Functional characterization of three CYP21A2 sequence variants (p.A265V, p.W302S, p.D322G) employing a yeast co-expression system. Hum Mutat; 30:443-50.

Blumberg-Tick J, Boudou P, Nahoul K, Schaison G. (1991). Testicular tumors in congenital adrenal hyperplasia: steroid measurements from adrenal and spermatic veins. J Clin Endocrinol Metab; 73:1129-33.

Bobba A, Marra E, Lattanzio P, Iolascon A, Giannattasio S. (2000). Characterization of the CYP21 gene 5' flanking region in patients affected by 21-OH deficiency. Hum Mutat; 15:481.

Bojunga J, Welsch C, Antes I, Albrecht M, Lengauer T, et al. (2005). Structural and functional analysis of a novel mutation of CYP21B in a heterozygote carrier of 21-hydroxylase deficiency. Hum Genet; 117:558-64.

Bonaccorsi AC, Adler I, Figueiredo JG. (1987). Male infertility due to congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and therapeutic results in three patients. Fertil Steril; 47:664-70.

Bristol JA, Furie BC, Furie B. (1993). Propeptide processing during factor IX biosynthesis. Effect of point mutations adjacent to the propeptide cleavage site. J Biol Chem; 268:7577-84.

Brosnan CA, Brosnan PG. (2000). Methodological issues in newborn screening evaluation with special reference to congenital adrenal hyperplasia. J Pediatr Endocrinol Metab; 13:1555-62.

Brosnan CA, Brosnan PG, Swint JM. (2001). Analyzing the cost of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. Pediatrics; 107:1238.

Buzzalino ND, Fernández CS, Taboas M, Minutolo C, Belli S, et al. (2012). Caracterización molecular de pacientes con Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC) por

deficiencia de 21-Hidroxilasa. IV Encuentro Nacional de Pesquisa Neonatal; Buenos Aires.

Cabrera MS, Vogiatzi MG, New MI. (2001). Long term outcome in adult males with classic congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab; 86:3070-8.

Carmina E, Rosato F, Janni A, Rizzo M, Longo RA. (2006). Extensive clinical experience: relative prevalence of different androgen excess disorders in 950 women referred because of clinical hyperandrogenism. J Clin Endocrinol Metab; 91:2-6.

Chang SF, Chung BC. (1995). Difference in transcriptional activity of two homologous CYP21A genes. Mol Endocrinol; 9:1330-6.

Chang SF, Lee HH. (2011). Analysis of the CYP21A2 gene with intergenic recombination and multiple gene deletions in the RCCX module. Genetic Test Molec Biomark; 15:35-42.

Chin KK, Chang SF. (1998). The -104G nucleotide of the human CYP21 gene is important for CYP21 transcription activity and protein interaction. Nucleic Acids Res; 26:1959-64.

Chin D, Speiser PW, Imperato-McGinley J, Dixit N, Uli N, et al. (1998). Study of a kindred with classic congenital adrenal hyperplasia: diagnostic challenge due to phenotypic variance. J Clin Endocrinol Metab; 83:1940-5.

Chiou SH, Hu MC, Chung BC. (1990). A missense mutation at Ile172-Asn or Arg356-Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. J Biol Chem; 265:3549-52.

Christiansen P, Molgaard C, Muller J. (2004). Normal bone mineral content in young adults with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Horm Res; 61:133-6.

Chu X, Ding H, Cui G, Xu Y, Wen Wang D, et al. (2013). Functional consequences of a novel point mutation in the CYP21A2 gene identified in a Chinese Han patient with nonclassic 21-hydroxylase deficiency. Clinical Endocrinol; 80: 927-8.

Coeli FB, Soardi FC, Bernardi RD, de Araujo M, Paulino LC, et al. (2012). Novel deletion alleles carrying *CYP21A1P/A2* chimeric genes in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. BMCMedical Genetics; 11:1-4.

Collier S, Tassabehji M, Sinnott P, Strachan T. (1993). A de novo pathological point mutation at the 21-hydroxylase locus: implications for gene conversion in the human genome. Nat Genet; 3:260-5.

Combes-Moukhovsky ME, Kottler ML, Valensi P, Boudou P, Sibony M, et al. (1994). Gonadal and adrenal catheterization during adrenal suppression and gonadal stimulation in a patient with bilateral testicular tumors and congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab; 79:1390-4. Cutfield RG, Bateman JM, Odell WD. (1983). Infertility caused by bilateral testicular masses secondary to congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency. Fertil Steril; 40:809-14.

Dain L, Buzzalino N, Onetto A, Belli S, Stivel M, et al. (2002). Classic and Nonclassic 21-Hydroxylase Deficiency: A Molecular Study of Argentine Patients. Clin Endocrinol; 56: 239-45.

Deneux C, Tardy V, Dib A, Mornet E, Billaud L, et al. (2001). Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metabol; 86:207–13.

Desmet FO, Hamroum D, Lalande M, Collod-Béroud C, Claustres M, et al. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. Nucleic Acids Research; 37:1-14.

Dewailly D, Vantyghem-Haudiquet MC, Sainsard C, Buvat J, Cappoen JP, Ardaens K, et al. (1986). Clinical and biological phenotypes in late-onset 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab; 63:418-23.

DiMartino-Nardi J, Stoner E, O'Connell A, New MI. (1986). The effect of treatment of final height in classical congenital adrenal hyperplasia (CAH). Acta Endocrinol Suppl; 279:305-14.

Dolzan V, Prezelj J, Vidan-Jeras B, Breskvar K. (1999). Adrenal 21-hydroxylase gene mutations in Slovenian hyperandrogenic women: evaluation of corticotrophin stimulation and HLA polymorphisms in screening for carrier status. Eur J Endocrinol; 141:132-9.

Dolzan V, Solyom J, Fekete G, Kovacs J, Rakosnikova V, et al. (2005). Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. Eur J Endocrinol; 153:99-106.

Dorn A, Benoist C, Mathis D. (1898). New B-lymphocyte-specific enhancer-binding protein. Mol Cell Biol; 9:312-20.

Dubey S, Idicula-Thomas S, Anwaruddin M, Saravanan C, Varma RR et al. (2009). A novel 9-bp insertion detected in steroid 21-hydroxylase gene (CYP21A2): prediction of its structural and functional implications by computational methods. J Biomed Sci; 16:3.

Dumic M, Brkljacic L, Speiser PW, Wood E, Crawford C, et al. (1990). An update on the frecuency of nonclassic deficiency af adrenal 21-hydroxilase in the Yugoslav population. Acta Endocrinol; 122:703-10.

Dupont B, Oberfield SE, Smithwick EM, Lee TD, Levine LS. (1977). Close genetic linkage between HLA and congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). Lancet; 2:1309-12.

Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. (2008). Cross-talk between adrenal medulla and adrenal cortex in stress. Ann N Y Acad Sci; 1148:112-7.

Escobar-Morreale HF, San Millán JL, Smith RR, Sancho J, Witchel SF. (1999). The presence of the 21-hydroxylase deficiency carrier status in hirsute women phenotype-genotype correlations. Fertility and Sterility; 72:629-38.

Escobar-Morreale HF, Sanchon R, San Millan JL. (2007). A prospective study of the prevalence of nonclassical congenital adrenal hyperplasia among women presenting with hyperandrogenic symptoms and signs. J Clin Endocrinol Metab; 93:527-33.

Estadísticas Vitales, Programa Nacional de Estadísticas de Salud: www.deis.gov.ar, Ministerio de Salud de la Nación; www.msal.gov.ar.

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

Ezquieta B, Oyarzábal M, Jariego CM, Varela JM, Chueca M. (1999). A novel frameshift mutation in the first exon of the 21-OH gene found in homozygosity in an apparently nonconsanguineous family. Horm Res; 51:135-41.

Ezquieta B, Cueva E, Varela CJM, CJ. (2001). Aportaciones del analisis molecular en la hiperplasia suprarrenal congenita. Acta Pediatrica; 59:479-96.

Ezquieta B, Gonzalez-Diaz JP, Labarta JI. (2002a). Guias diagnóstico-terapéuticas en endocrinología pediátrica. Sociedad española de endocrinilogía pediátrica; 17:1-17.

Ezquieta B, Cueva E, Oyarzabal M, Oliver A, Varela JM, et al. (2002b). Gene conversion (655G splicing mutation) and the founder effect (Gln318Stop) contribute to the most frequent severe point mutations in congenital adrenal hyperplasia (21- hydroxylase deficiency) in the Spanish population. Clin Genet; 62:181-8.

Ezquieta B. (2006). Hiperplasia suprarrenal congenita. Correlacion genotipo/fenotipo. An Esp Pediatr; 64:77-84.

Ezquieta B, Oyarzabal M, Barrio R, Luzuriaga C, Hermoso F, et al. (2009). Monogenic and polygenic models detected in steroid 21-hydroxylase deficiencyrelated paediatric hyperandrogenism. Horm Res; 71:28-37.

Fernández C. Caracterización molecular del módulo RCCX y de regiones regulatorias de la transcripción del gen CYP21A2 en pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa de la población argentina. Tesis doctoral 2014; Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Finkielstain GP, Chen W, Mehta SP, Fujimura FK, Hanna RM, et al. (2011). Comprehensive Genetic Analysis of 182 Unrelated Families with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. J Clin Endocrinol Metab; 96:161-72.

Fluck CE, Tajima T, Pandey AV, Arlt W, Okuhara K, et al. (2004). Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. Nat Genet; 36:228–30.

Forest MG. (2014). Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Hum Reprod Update; 10:469-85.

Fraser R. (1992). Biosynthesis of adrenocortical steroids. VHT J, editor. The Adrenal Gland. New York: Raven Press; 191-207.

Frasier SD, Thorneycroft IH, Weiss BA, Horton R. (1975). Elevated amniotic fluid concentration of 17 alpha-hydroxyprogesterone in congenital adrenal hyperplasia. J Pediatr; 86:310-2.

Friães A, Rêgo AT, Aragüés JM, Moura LF, Mirante A, et al. (2006). CYP21A2 mutations in Portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia: identification of two novel mutations and characterization of four different partial gene conversions. Mol Genet Metab; 88:58-65.

Garlepp MJ, Wilton AN, Dawkins RL, White PC. (1986). Rearrangement of 21hydroxylase genes in diseaseassociated MHC supratypes. Immunogenetics; 23:100-5.

Ghayee HK, Rege J, Watumull LM, Nwariaku FE, Carrick KS, et al. (2011). Clinical, Biochemical, and Molecular Characterization of Macronodular Adrenocortical Hyperplasia of the Zona Reticularis: A New Syndrome. J Clin Endocrinol Metab; 96:243–50.

Gomes LG, Huang N, Agrawal V, Mendonca BB, Bachega TA, et al. (2008). The common P450 oxidoreductase variant A503V is not a modifier gene for 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab; 93:2913-6.

Gomes LG, Huang N, Agrawal V, Mendonca BB, Bachega TA, et al. (2009). Extraadrenal 21-hydroxylation by CYP2C19 and CYP3A4: effect on 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab; 94:89–95.

Graham SE, Peterson JA. (1999). How similar are P450s and what can their differences teach us? Arch Biochem Biophys; 369:24-9.

Grischuk Y, Rubtsov P, Riepe FG, Grötzinger J, Beljelarskaia S, et al. (2006). Four novel missense mutations in the CYP21A2 gene detected in Russian patients suffering from the classical form of congenital adrenal hyperplasia: identification, functional characterization, and structural analysis. J Clin Endocrinol Metab; 91:4976-80.

Groisman B, Menazzi S, FILIJ, Bidondo MP, Barbero P, et al. (2012). Reporte anual, Registro Nacional de Anomalías Congénitas de la Argentina (RENAC), Ministerio de Salud de la Nación.

Grosse SD, Vliet GV. (2007). How many deaths can be prevented by newborn screening for congenital adrenal hyperplasia?. Horm Res; 67:284-91.

Grünberg R, Nilges M, Leckner J. (2007). Biskit, A software platform for structural bioinformatics: Bioinformatics; 23:769–70.

Grunieiro-Papendieck L, Chiesa A, Mendez V, Prieto L. (2008). Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia: experience and results in Argentina. J Pediatr Endocrinol Metab; 21:73-8.

Gunn SK, Sherman LD, Therrell BL, Owerbach DI. (1993). Molecular Genetics of 21-Hydroxylase Deficient Late-Onset Adrenal Hyperplasia. Sem Reprod Endocrinol; 11:347-52.

Gwynne JT, Strauss JF. (1982). The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. Endocr Rev; 3:299-329.

Haider S, Islam B, D'Atri V, Sgobba M, Poojari C, Sun L, et al. (2013). Structure– phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia. Proc Natl Acad Sci U S A; 110:2605-10.

Hall PF. (1991). Cytochrome P-450 C21scc: one enzyme with two actions: hydroxylase and lyase. J Steroid Biochem Mol Biol; 40:527-32.

Hao B, Miao X, Li Y, Zhang X, Sun T, et al. (2006). A novel T-77C polymorphism in DNA repair gene XRCC1 contributes to diminished promoter activity and increased risk of non-small cell lung cancer. Oncogene; 25:3613-20.

Harada F, Kimura A, Iwanaga T, Shimozawa K, Yata J, et al. (1987). Gene conversionlike events cause steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. Proc Natl Acad Sci U S A.; 84:8091-4.

Hargitai G, Solyom J, Battelino T, Lebl J, Pribilincova Z, et al. (2001). Growth patterns and final height in congenital adrenal hyperplasia due to classical 21-hydroxylase deficiency. Results of a multicenter study. Horm Res; 55:161-71.

Harris R, Reid M. (1997). Medical genetic services in 31 countries: an overview. Eur J Hum Genet; 5:3-21.

Hayashi G, Faure C, Brondi MF, Vallejos C, Soares D, et al. (2011). Weight-adjusted neonatal 17OH progesterone cutoff levels improve the efficiency of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. Arq Bras Endocrinol Metabol; 55:632-7.

Helmberg A, Tusie-Luna MT, Tabarelli M, Kofler R, White PC. (1992). R339H and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. Mol Endocrinol; 6:1318-22.

Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y. (1986). Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. Proc Natl Acad Sci U S A; 83:2841-5.

Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Hiromasa T, Fujii-Kuriyama Y. (1988). Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P-450(C21)] deficiency in humans: possible gene conversion products. Proc Natl Acad Sci U S A; 85:7486-90.

Higashi Y, Hiromasa T, Tanae A, Miki T, Nakura J, et al. (1991). Effects of individual mutations in the P-450(C21) pseudogene on the P-450(C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. J Biochem; 109:638-44.

Hlavica P, Schulze J, Lewis DF. (2003). Functional interaction of cytochrome P450 with its redox partners: a critical assessment and update of the topology of predicted contact regions. J Inorg Biochem; 96:279-97.

Holmes-Walker DJ, Conway GS, Honour JW, Rumsby G, et al. (1995). Menstrual disturbance and hypersecretion of progesterone in women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Clin Endocrinol (Oxf);43:291-6.

Honour JW, Torresani T. (2001). Evaluation of neonatal screening for congenital Adre al hyperplasia. Horm Res; 55:206-11.

Hospital privado la comunidad. (2011). Frecuencias de antígenos de HLA en la población de Mar del Plata y la zona concurrentes al Hospital Privado de Comunidad. Mar del plata.

Hsu NC, Guzov VM, Hsu LC, Chung BC. (1999). Characterization of the consequence of a novel Glu-380 to Asp mutation by expression of functional P450c21in Escherichia coli. Biochim Biophys Acta; 1430: 95-102.

Huang N, Pandey AV, Agrawal V, Reardon W, Lapunzina PD, et al. (2005). Diversity and function of mutations in P450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis. Am J Hum Genet; 76:729-49.

Jaaskelainen J, Levo A, Voutilainen R, Partanen J. (1997). Population-wide evaluation of disease manifestation in relation to molecular genotype in steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency: good correlation in a well defined population. J Clin Endocrinol Metab; 82:3293-7.

Janner M, Pandey AV, Mullis PE, Flück CE. (2006). Clinical and biochemical description of a novel CYP21A2 gene mutation 962_963insA using a new 3D model for the P450c21 protein. Eur J Endocrinol; 155:143-51.

Janzen N, Peter M, Sander S, Steuerwald U, Terhardt M, et al. (2007). Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: additional steroid profile using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Clin Endocrinol Metab; 92:2581-9.

John ME, John MC, Boggaram V, Simpson ER, Waterman MR. (1986). Transcriptional regulation of steroidhydroxylase genes by corticotropin. Proc Natl Acad Sci U S A; 83:4715-9.

Jiang L, Song LL, Wang H, Wang JL, Wang PP, et al. (2012). Identification and functional characterization of a novel mutation P459H and a rare mutation R483W in the CYP21A2 gene in two Chinese patients with simple virilizing form of congenital adrenal hyperplasia. J Endocrinol Invest; 35:485-9.

Kagawa N, Waterman MR. (1990). cAMP-dependent transcription of the human CYP21B (P-450C21) gene requires a cis-regulatory element distinct from the consensus cAMP-regulatory element. J Biol Chem; 265:11299-305.

Kagawa N, Waterman MR. (1991). Evidence that an adrenal-specific nuclear protein regulates the Camp responsiveness of the human CYP21B (P450C21) gene. J Biol Chem; 266:11199-204.

Kagawa N, Waterman MR. (1992). Purification and characterization of a transcription factor which appears to regulate cAMP responsiveness of the human CYP21B gene. J Biol Chem; 267:25213-9.

Kamel N, Tonyukuk V, Emral R, Corapcioglu D, Bastemir M, et al. (2003). The prevalence of late onset congenital adrenal hyperplasia in hirsute women from Central Anatolia. Endocr J; 50:815-23.

Katsumata N, Shinagawa T, Horikawa R, Fujikura K. (2010). Novel intronic CYP21A2 mutation in a Japanese patient with classic salt-wasting steroid 21-hydroxylase deficiency. Metabolism; 59:1628-32.

Kharrat M, Tardy V, M'Rad R, Maazoul F, Jemaa LB, et al. (2004). Molecular genetic analysis of Tunisian patients with a classic form of 21-hydroxylase deficiency: identification of four novel mutations and high prevalence of Q318X mutation. J Clin Endocrinol Metab; 89:368-74.

Kharrat M, Tardy V, M'rad R, Maazoul F, Morel Y, et al. (2005). A novel 13-bp deletion in exon 1 of CYP21 gene causing severe congenital adrenal hyperplasia. Diagn Mol Pathol; 14:250-2.

Kharrat M, Loidi L, Quinteiro C, Parajes S, Barreiro J, et al. (2006). High variability in CYP21A2 mutated alleles in Spanish 21-hydroxylase deficiency patients, six novel mutations and a founder effect. Clin Endocrinol; 64:330-6.

Kim YC, Ariyoshi N, Artemenko I, Elliott ME, Bhattacharyya KK, et al. (1997). Control of cholesterol access to cytochrome P450scc in rat adrenal cells mediated by regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. Steroids; 62:10-20.

Kleinle S, Lang R, Fischer GF, Vierhapper H, Waldhauser F, et al. (2009). Duplications of the functional CYP21A2 gene are primarily restricted to Q318X alleles: evidence for a founder effect. J Clin Endocrinol Metab; 94:3954-8.

Knochenhauer ES, Cortet-Rudelli C, Cunningham RD, Conway-Myers BA, Dewailly D, et al. (1997). Carriers of 21-hydroxylase deficiency are not at increased risk for hyperandrogenism. J Clin Endocrinol Metab; 82:479-85.

Koppens PF, Hoogenboezem T, Drop SL, de Muinck-Keizer-Schrama SM, Degenhart HJ. (1998). Aldosterone production despite absence or defectiveness of the CYP21 genes in two patients with salt-losing congenital adrenal hyperplasia caused by steroid 21-hydroxylase deficiency. Clin Endocrinol (Oxf); 49:815-22.

Koppens PF, Hoogenboezem T, Degenhart HJ. (2002). Duplication of the CYP21A2 gene complicates mutation analysis of steroid 21- hydroxylase deficiency: characteristics of three unusual haplotypes. Hum Genet; 111:405–10.

Koppens PF. (2002). Molecular genetics and epidemiology of steroid 21-hydroxylase deficiency. Origin of diseasecausing mutations. Tesis PhD. Erasmus Universiteit Rotterdam.

Kovanen PT, Basu SK, Goldstein JL, Brown MS. (1979). Low density lipoprotein receptors in bovine adrenal cortex. II. Low density lipoprotein binding to membranes prepared from fresh tissue. Endocrinology; 104:610-6.

Koyama S, Toyoura T, Saisho S, Shimozawa K, Yata J. (2002). Genetic analysis of Japanese patients with 21-hydroxylase deficiency: identification of a patient with a new mutation of a homozygous deletion of adenine at codon 246 and patients without demonstrable mutations within the structural gene for CYP21. J Clin Endocrinol Metab; 87:2668-73.

Krone N, Roscher AA, Schwarz HP, Braun A. (1988). Comprehensive analytical strategy for mutation screening in 21-hydroxylase deficiency Clin Chem; 44:2075-82.

Krone N, Braun A, Roscher AA, Schwarz HP. (1999). A novel frameshift mutation (141delT) in exon 1 of the 21-hydroxylase gene (CYP21) in a patient with the salt wasting form of congenital adrenal hyperplasia. Mutation in brief no. 255. Online. Hum Mutat; 14: 90-1.

Krone N Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP. (2000). Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. J Clin Endocrinol Metab; 85:1059-65.

Krone N, Braun A, Weinert S, Peter M, Roscher AA, et al. (2002). Multiplex minisequencing of the 21-hydroxylase gene as a rapid strategy to confirm congenital adrenal hyperplasia. Clin Chem; 48:818-25.

Krone N, Riepe FG, Grötzinger J, Partsch CJ, Sippell WG. (2005). Functional characterization of two novel point mutations in the CYP21 gene causing simple virilizing forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab; 90:445-54.

Krone N, Riepe FG, Partsch CJ, Vorhoff W, Brämswig J, et al. (2006). Three novel point mutations of the CYP21 gene detected in classical forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Exp Clin Endocrinol Diabetes; 114:111-7.

Krone N, Dhir V, Ivison HE, Arlt W. (2007). Congenital adrenal hyperplasia and P450 oxidoreductase deficiency. Clin Endocrinol (Oxf); 66:162-72.

Krone N, Rose IT, Willis DS, Hodson J, Wild SH, et al. (2013). Genotype-Phenotype Correlation in 153 Adult Patients With Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency: Analysis of the United Kingdom Congenital Adrenal Hyperplasia Adult Study Executive (CaHASE) Cohort. J Clin Endocrinol Metab; 98:346-54.

Kuttenn F, Couillin P, Girard F, Billaud L, Vincens M, et al. (1985). Late-onset adrenal hyperplasia in hirsutism. N Engl J Med; 313:224-31.

Lajic S, Wedell A. (1996). An intron 1 splice mutation and a nonsense mutation (W23X) in CYP21 causing severe congenital adrenal hyperplasia. Hum Genet; 98:182-4.

Lajic S, Levo A, Nikoshkov A, Lundberg Y, Partanen J, et al. (1997). A cluster of missense mutations at Arg356 of human steroid 21-hydroxylase may impair redox partner interaction. Hum Genet; 99:704-9.

Lajic S, Nikoshkov A, Holst M, Wedell A. (1999). Effects of missense mutations and deletions on membrane anchoring and enzyme function of human steroid 21-hydroxylase (P450c21). Biochem Bophys Res Commun; 268:14682-6.

Lajic S, Clauin S, Robins T, Vexiau P, Blanche H, et al. (2002). Novel mutations in CYP21 detected in individuals with hyperandrogenism. J Clin Endocrinol Metab; 87:2824-9.

Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Baity LA, Meade JC, et al. (1995). A cell-specific nuclear receptor regulates the steroid hydroxylases. Steroids; 60:10-4.

Lander ES, Linton LM, Birren B. (2001). International Human Genome Sequencing. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature; 409:860-921.

Laron Z, Pollack MS, Zamir R, Roitman A, Dickerman Z, et al. (1980). Late onset 21hydroxylase deficiency and HLA in the Ashkenazi population: a new allele at the 21hydroxylase locus. Hum Immunol; 1:55-66.

Lau IF, Soardi FC, Lemos-Marini SH, Guerra Jr G Jr, Baptista MT, et al. (2001). H28+C insertion in the CYP21 gene: a novel frameshift mutation in a Brazilian patient with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab; 86:5877-80.

Lee HH, Chao HT, Lee YJ, Shu SG, Chao MC, et al. (1998). Identification of four novel mutations in the CYP21 gene in congenital adrenal hyperplasia in the Chinese. Hum Genet; 103:304-10.

Lee HH, de Wijs IJ, Sistermans EA. (2000). Use of TaqI digestion may lead to incorrect molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Mol Genet Metab; 70:322-4.

Lee HH, Chang SF. (2001). Multiple transcripts of the CYP21 gene are generated by the mutation of the splicing donor site in intron 2 from GT to AT in 21-hydroxylase deficiency. J Endocrinol; 171:397-402.

Lee HH. (2004). The chimeric CYP21P/CYP21 gene and 21-hydroxylase deficiency. J Hum Genet; 49:65-72.

Lee HH, Lee YJ, Wang YM, Chao HT, Niu DM, et al. (2008). Low frequency of the CYP21A2 deletion in ethnic Chinese (Taiwanese) patients with 21-hydroxylase deficiency. Mol Genet Metab; 93:450-7.

Lee YJ, Tsai LP, Niu DM, Shu SG, Chao MC, et al. (2009). The gene founder effect of two spontaneous mutations in ethnic Chinese (Taiwanese) CAH patients with 21-hydroxylase deficiency. Mol Genet Metab; 97:75-9.

Lehoux JG, Fleury A, Ducharme L. (1998). The acute and chronic effects of adrenocorticotropin on the levels of messenger ribonucleic acid and protein of steroidogenic enzymes in rat adrenal in vivo. Endocrinology, 139:3913-22.

Lewis DF, Lee-Robichaud P. (1998). Molecular modelling of steroidogenic cytochromes P450 from families CYP11, CYP17, CYP19 and CYP21 based on the CYP102 crystal structure. J Steroid Biochem Mol Biol; 66:217-33.

Li Y, Lau LF. (1997). Adrenocorticotropic hormone regulates the activities of the orphan nuclear receptor Nur77 through modulation of phosphorylation. Endocrinology; 138: 4138-46.

Lin-Su K, Nimkarn S, New MI. (2008). Congenital adrenal hyperplasia in adolescents: diagnosis and management. Ann N Y Acad Sci; 1135:95-8.

Linder BL, Esteban NV, Yergey AL, Winterer JC, Loriaux DL, et al. (1990). Cortisol production rate in childhood and adolescence. J Pediatr; 117:892-6.

Liu PS, Lin MK, Hsieh HL. (1996). Dehydroepiandrosterone sulfate inhibition of catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. Neurosci Lett; 204:181-4.

Loidi L, Quinteiro C, Parajes S, Barreiro J, Lestón DG, et al. (2006). High variability in CYP21A2 mutated alleles in Spanish 21-hydroxylase deficiency patients, six novel mutations and a founder effect. Clin Endocrinol (Oxf); 64:330-6.

Lopez-Calderon A, Calderon MD, Tresguerres JAF. (2009). Medula suprarrenal. En: Pombo M, Audi L, Bueno M, Calzada R, Cassorla F, Dieguez C, et al., editores. Tratado de endocrinologia pediatrica. Madrid; 694-702.

Luczay A, Torok D, Ferenczi A, Majnik j, Solyom J, et al. (2006). Potential advantage of N363S glucocorticoid receptor polymorphism in 21-hydroxylase deficiency. Europ J Endocrinol; 154:859-64.

Lundqvist J, Wikvall K, Norlin M. (2012). Vitamin D-mediated regulation of CYP21A2 transcription - a novel mechanism for vitamin D action. Biochim Biophys Acta; 1820: 1553-9.

Marumudi E, Sharma A, Kulshreshtha B, Khadgawat R, Khurana ML, et al. (2012). Molecular genetic analysis of CYP21A2 gene in patients with congenital adrenal hyperplasia. Indian J Endocrinol Metabol; 16:384-8.

Marino R, Ramirez P, Galeano J, Perez Garrido N, Rocco C, et al. (2011). Steroid 21hydroxylase gene mutational spectrum in 454 Argentinean patients: genotype–phenotype correlation in a large cohort of patients with congenital adrenal hyperplasia. Clinical Endocrinol; 75:427-35.

Martin AI, Millan S, Lopez-Calderon A. (2000). Estructura y funcion de la corteza suprarrenal. Mineralcorticoides. In: Tresguerres JAF, Aguilar E, Devesa J, Moreno B, editors. Tratado de endocrinologia basica y clinica; 951-76.

Menassa R, Tardy V, Despert F, Bouvattier-Morel C, Brossier JP, et al. (2008). p.H62L, a Rare Mutation of the CYP21 Gene Identified in Two Forms of 21-Hydroxylase Deficiency. J Clin Endocrinol Metab; 93:1901-8.

Mendonca BB, Leite MV, De Castro M, Kino T, Elias LK, et al. (2002). Female Pseudohermaphroditism Caused by a Novel Homozygous Missense Mutation of the GR Gene. J Clin Endocrinol Metab; 87:1805-9.

Merke DP. (2008). Approach to the adult with congenital adrenal hyperplasia due to 21hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab; 93:653-60.

Miller WL. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. Endocr Rev; 9:295-318.

Miller WL. (2004). P450 oxidoreductase deficiency. A new disorder of steroidogenesis with multiple clinical manifestations. Trends Endocrinol Metab; 15:311-5.

Miller WL. (2005). Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. Endocrinology;146:2544-50.

Miller WL. (2007). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. Biochim Biophys Acta; 1771:663-76.

Milner CM, Campbell RD. (2001). Genetic organization of the human MHC class III region. Front Biosci; 6:D914-26.

Miretti MM, Walsh EC, Ke X, Delgado M, Griffiths M, et al. (2005). A high-resolution linkage-disequilibrium map of the human major histocompatibility complex and first generation of tag single-nucleotide polymorphisms. Am J Hum Genet; 76: 634-46.

Moran C, Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Fruzzetti F, et al. (2000). 21-Hydroxylasedeficient nonclassic adrenal hyperplasia is a progressive disorder: a multicenter study. Am J Obstet Gynecol; 183:1468-74.

Moreira RPP, Gomes LG, Mendonca BB, Bachega TA. (2012). Impact of Glucocorticoid Receptor Gene Polymorphisms on the Metabolic Profile of Adult Patients with the Classical Form of 21-Hydroxylase Deficiency. Plos one; 7: e44893.

Morel Y, David M, Forest MG, Betuel H, Hauptman G, et al. (1989). Gene conversions and rearrangements cause discordance between inheritance of forms of 21-hydroxylase deficiency and HLA types. J Clin Endocrinol Metab; 68:592-9.

Mornet E, Dupont J, Vitek A, White PC. (1989). Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta). J Biol Chem; 264:20961-7.

Mornet E, Crété P, Kuttenn F, Raux-Demay MC, Boué J, et al. (1991). Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. Am J Hum Genet; 48:79-88.

Mornet E, Gibrat JF. (2000). A 3D model of human P450c21: study of the putative effects of steroid 21-hydroxylase gene mutations. Hum Genet; 106:3309-39.

Moura-Massari VO, Bugano DDG, Marcondes JAM, L. G. Gomes LG, Mendonca BB, et al. (2013). *CYP21A2* Genotypes do not Predict the Severity of Hyperandrogenic Manifestations in the Nonclassical Form of Congenital Adrenal Hyperplasia. Horm Metab Res; 45: 301-7.

Muller J, Oertle M. (1993). Separate induction of the two isozymes of cytochrome P-450(11) beta in rat adrenal zona glomerulosa cells. J Steroid Biochem Mol Biol; 47:213-21.

Nadeau JH. (2001). Modifier genes in mice and humans. Nat Rev Genet; 2:165-74.

Nagasaki K, Usui T, Asami T, Ogawa Y, Kikuchi T, et al. (2009). H62L mutation of CYP21A2 identified in the non-classical form of 21-hydroxylase deficiency. Clin Pediatr Endocrinol; 18:111-13.

Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, et al. (2004). Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. Pharmacogenetics; 14:1-18.

Nermoen I, Bronstad I, Fougner KJ, Svartberg J, Oksnes M, et al. (2012). Genetic, anthropometric and metabolic features of adult Norwegian patients with 21-hydroxylase deficiency. Eur J Endocrinol; 167:507-16.

New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, et al. (1983). Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. J Clin Endocrinol Metab; 57:320-6.

New MI, Gertner JM, Speiser PW, del Balzo P. (1988). Growth and final height in classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency. Acta Paediatr Jpn; 30:79-88.

New MI, Carlson A, Obeid J, Marshall I, Cabrera MS, et al. (2001). Prenatal diagnosis for congenital adrenal hyperplasia in 532 pregnancies. J Clin Endocrinol Metab; 86: 5651-7.

New MI. (2006). Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab; 91:4205-14.

New MI, Abraham M, Gonzalez B, Dumic M, Razzaghy-Azar M, et al. (2013). Genotype–phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. Proc Natl Acad Sci USA; 110:2611-6.

Nikoshkov A, Lajic S, Holst M, Wedell A, Luthman H. (1997). Synergistic Effect of Partially Inactivating Mutations in Steroid 21-Hydroxylase Deficiency. J Clin Endocrinol Metab; 82:194-9.

Nikoshkov A., Lajic S., Vlamis-Gardikas A, Tranebjaerg L, Holst M, et al. (1998). Naturally occurring mutants of human steroid 21-hydroxylase (P450c21) pinpoint residues important for enzyme activity and stability. J Biol Chem; 273:6163-5.

Nimkarn S, Cerame BI, Wei JQ, Dumic M, Zunec R, et al. (1999). Congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) without demonstrable genetic mutations. J Clin Endocrinol; 84:378-81.

Nimkarn S, New MI. (2007). Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. Nat Clin Pract Endocrinol Metab; 3:405-13.

Nimkarn S, Lin-Su K, Berglind N, Wilson RC, New MI. (2007). Aldosterone-torenin ratio as a marker for disease severity in 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab; 92:137-42.

Nunez BS, Lobato MN, White PC, et al. (1999). Meseguer A. Functional análisis of four CYP21 mutations from Spanish patients with congenital adrenal hyperplasia. Biochem Biophys Res Commun; 262:635-7.

Okamoto M, Nonaka Y, Takemori H, Doi J. (2005). Molecular identity and gene expression of aldosterone synthase cytochrome P450. Biochem Biophys Res Commun; 338:325-30.

Oliver A, Ezquieta B, Gussinye M. (2000). Hiperplasia suprarrenal congenita. Argente J, Carrascosa A, Gracia R, Rodriguez Hierro. Tratado de Endocrinologia Pediatrica y de la Adolescencia, Barcelona: Doyma; 945-1042.

Ono, M., Kashimada, K., Miyai, K. Onishi T, Takagi M, et al. (2008). In Vitro Enzyme Assay of CYP21A2 Mutation (R483Q) by A Novel Method Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS). ClinPediat Endocrinol; 17:49-56.

Ordoñez-Sánchez ML, Ramírez-Jiménez S, López-Gutierrez AU, Riba L, Gamboa-Cardiel S, et al. (1998). Molecular genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population: identification of possible new mutations and high prevalence of apparent germ-line mutations. Hum Genet; 102:170-7.

Owerbach D, Ballard L, Draznin MB. (1992). Salt-wasting congenital adrenal hyperplasia: detection and characterization of mutations in the steroid 21- hydroxylase gene, CYP21, using the polymerase chain reaction. J Clin Endocrinol Metab; 74:553-8.

Pandey AV, Fluck CE, Huang N, Tajima T, Fujieda K, et al. (2004). P450 oxidoreductase deficiency: a new disorder of steroidogenesis affecting all microsomal P450 enzymes. Endocr Res; 30:881-8.

Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, et al. (1988). Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Pediatrics; 81:866-74.

Pang S, Clark A. (1990). Newborn screening, prenatal diagnosis, and prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Trends Endocrinol Metab; 1:300-7.

Pang S, Clark AT, Freeman LC, Dolan LM, Immken L, et al. (1992). Maternal side effects of prenatal dexamethasone therapy for fetal congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab; 75:249-53.

Pang S, Clark A. (1993). Congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency; newborn screening and its relationship to the diagnosis and treatment of the disorder. Screening; 2:105-39.

Parajes S, Quinteiro C, Dominguez F, Loidi L. (2008). High frequency of copy number variations and sequence variants at CYP21A2 locus: implication for the genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. PLoS One; 3:e2138.

Pasqualini T, Alonso G, Tomasini R, Galich AM, Buzzalino N, et al. (2007). Congenital adrenal hyperplasia clinical characteristics and genotype in newborn, childhood and adolescence. Medicina (B Aires); 67:253-61.

Peach MJ. (1977). Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. Physiol Rev; 57:313-70.

Pearce EG, Laxton RC, Pereira AC, Ye. S. (2007). Haplotype effects on matrix metalloproteinase-1 gene promoter activity in cancer cells. Mol Cancer Res; 5:221-7.

Pey AL, Stricher F, Serrano L, Martinez A. (2007). Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. Am J Hum Genet; 81:1006-24.

Picado-Leonard J, Miller WL. (1998). Homologous sequences in steroidogenic enzymes, steroid receptors and a steroid binding protein suggest a consensus steroid-binding sequence. Mol Endocrinol; 2:1145-50.

Pinto G, Tardy V, Trivin C, Thalassinos C, Lortat-Jacob S, et al. (2003). Follow-up of 68 children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: relevance of genotype for management. J Clin Endocrinol Metab; 88:2624-33.

Pollack MS, Levine LS, O'Neill GJ, Pang S, Lorenzen F, et al. (1981). HLA linkage and B14, DR1, BfS haplotype association with the genes for late onset and cryptic 21-hydroxylase deficiency. Am J Hum Genet; 33:540-50.

Pombo M, Audí L. (2009). Capítulo: VIII: Corteza Suprarenal. Tratado de endocrinología pediátrica, Madrid, McGraw-Hill.
Prader A. (1954). Genital findings in the female pseudo-hermaphroditism of the congenital adrenogenital syndrome; morphology, frequency, development and heredity of the different genital forms] Helv Paediatr Acta; 9:231-48.

Premawardhana LD, Hughes IA, Read GF, Scanlon MF. (1997). Longer term outcome in females with congenital adrenal hyperplasia (CAH): the Cardiff experience. Clin Endocrinol (Oxf); 46:327-32.

Programa de pesquisa Neonatal de la Ciudad de Buenos Aires. (2010). Ley 1808.

Reunión Conjunta. (1999). Servicios para la prevención y tratamiento de los trastornos genéticos y los defectos congénitos en los países en desarrollo. La Haya, (WHO/HGN/GL/WAOPBD/99.1).

Ravichandran KG, Boddupalli SS, Hasermann CA, Peterson JA, Deisenhofer J. (1993). Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. Science; 261:731-6.

Rice DA, Kronenberg MS, Mouw AR, Aitken LD, Franklin A, et al. (1990). Multiple regulatory elements determine adrenocortical expression of steroid 21-hydroxylase. J Biol Chem; 265:8052-8.

Riepe FG, Sippell WG. (2007). Recent advances in diagnosis, treatment, and outcome of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Rev Endocr Metab Disord; 8:349-63.

Rodriguez-Agudo D, Ren S, Wong E, Marques D, Redford K, et al. (2008). Intracellular cholesterol transporter StarD4 binds free cholesterol and increases cholesteryl ester formation. J Lipid Res; 49:1409-19.

Robins T, Barbaro M, Lajic S, Wedell A. (2005). Not all amino acid substitutions of the common cluster E6 mutation in CYP21 cause congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab; 90:2148-53.

Robins, T., Carlsson, J., Sunnerhagen, M. Wedell A, Persson B. (2006). Molecular Model of Human CYP21 Based on Mammalian CYP2C5: Structural Features Correlate with Clinical Severity of Mutations Causing Congenital Adrenal Hyperplasia. Molecular Endocrinology; 20:2946-64.

Robins T, Bellanne-Chantelot C, Barbaro M, Cabrol S, Wedell A, et al. (2007). Characterization of novel missense mutations in CYP21 causing congenital adrenal hyperplasia. Journal of Mol Med; 85:247-55.

Rodrigues NR, Dunham I, Yu CY, Carroll MC, Porter RR, et al. (1987). Molecular characterization of the HLA-lined steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. EMBO J; 6:1653-61.

Rodriguez MD, Rodriguez A, Badillo K, Velasco A, Dulin E, et al. (2006). Deficit de 21hidroxilasa: aspectos actuales. Endocr Nutr; 53:124-36. Rothberg PG, Schwartz ID, Khalili DS, Bradley JF. (2000). Human Gene Mutation. Gene symbol: CYP21A2. Disease: Adrenal Hyperplasia. Hum Genet; 107:536.

Rubtsov PM, Igudin EL, Pichugina MIu, Spirin PV, Prasolov VS, et al. (2011). Characterization of new splicing mutation in steroid 21-hydroxylase gene. Bioorg Khim; 37:815-20.

Rumsby G, Avey CJ, Conway GS, Honour JW. (1998). Genotype-phenotype analysis in late onset 21-hydroxylase deficiency in comparison to the classical forms. Clin Endocrinol (Oxf); 48:707-11.

Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, et al. (1998). A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. Cancer Res; 58:5321-5.

Schoch GA, Yano JK, Wester MR, Griffin KJ, Stout CD, et al. (2004). Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8. Evidence for a peripheral fatty acid binding site. J Biol Chem; 279:9497-503.

Schroeder SA, Gaughan DM, Swift M. (1995). Protection against bronchial asthma by CFTR delta F508 mutation: a heterozygote advantage in cystic fibrosis. Nat Med; 1:703-5.

Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F, et al. (2005). The FoldX web server: an online force field. Nucleic Acids Res; 33:382-8.

Scott EE, He YA, Wester MR, White MA, Chin CC, et al. (2003). An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6-A resolution. Proc Natl Acad Sci USA; 100:13196–201.

Scott RR, Gomes LG, Huang N, Van Vliet G, Miller WL. (2007). Apparent Manifesting Heterozygosity in P450 Oxidoreductase Deficiency and Its Effect on Coexisting 21-Hydroxylase Deficiency. J Clin Endocrinol Metab; 92:2318-22.

Scott RR, Miller WL. (2008). Genetic and clinical features of p450 oxidoreductase deficiency. Horm Res; 69:266-75.

Shannon MF, Pell LM, Lenardo MJ, Kuczek ES, Occhiodoro FS, et al. (1990). A novel tumor necrosis factor-responsive transcription factor which recognizes a regulatory element in hemopoietic growth factor genes. Mol Cell Biol; 10:2950-9.

Sherman SL, Aston CE, Morton NE, Speiser PW, New MI. (1988). A segregation and linkage study of classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency. Am J Hum Genet; 42:830-8.

Shima S, Mitsunaga M, Nakao T. (1972). Effect of ACTH on cholesterol dynamics in rat adrenal tissue. Endocrinology; 90:808-14.

Soardi FC, Barbaro M, Lau IF, Lemos-Marini SH, Baptista MT, et al. (2008). Inhibition of CYP21A2 enzyme activity caused by novel missense mutations identified in Brazilian and Scandinavian patients. J Clin Endocrinol Metab; 93:2416-20.

Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, et al. (1985). High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. Am J Hum Genet; 37:650-67.

Speiser PW, Agdere L, Ueshiba H, White PC, New MI. (1991). Aldosterone synthesis in salt-wasting congenital adrenal hyperplasia with complete absence of adrenal 21-hydroxylase. N Engl J Med; 324:145-9.

Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, et al. (1992). Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Invest; 90:584-95.

Speiser PW, White PC. (1998). Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. Clin Endocrinol; 49:411-7.

Speiser PW, Knochenhauer ES, Dewailly D, Fruzzetti F, Marcondes JAM, et al. (2000). A Multicenter Study of Women with Nonclassical Congenital Adrenal Hyperplasia: Relationship between Genotype and Phenotype. Molecular Genetics and Metabolism; 71:527-34.

Speiser PW, White PC. (2003). Congenital adrenal hyperplasia. N Engl J Med; 349:776-88.

Speiser PW. (2009). Nonclassic adrenal hyperplasia. Rev Endocr Metab Disord; 10:77-82.

Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, et al. (2012). Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab; 95:4133-60.

Stewart PM, Krone NP. (2011). En: Melmed, S. y R. H. Williams. Capitulo: XV. Williams textbook of endocrinology.Philadelphia; Elsevier/Saunders.

Stikkelbroeck NM, Hoefsloot LH, de Wijs IJ, Otten BJ, Hermus AR, et al. (2003). CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in The Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations. J Clin Endocrinol Metab; 88:3852-9.

Stocco DM, Clark BJ. (1996). Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. Endocr Rev; 17:221-44.

Street ME, Weber A, Camacho-Hiibner C, Perry LA, Brain CE, et al. (1997). Girls with virilisation in childhood: a diagnostic protocol for investigation. J Clin Pathol; 50:379-83.

Szklarz GD, Halpert JR. (1997). Use of homology modeling in conjunction with sitedirected mutagenesis for analysisof structure-function relationships of mammalian cytochromes P450. Life Sci; 61:2507-20. Szklarz GD, Halpert JR. (1997). Molecular modeling of cytochrome P450 3A4. J Comput Aided Mol Des; 11:265-72.

Tardy V. (2007). Gene Symbol: CYP21A2. Hum Genet; 121:293-4.

Tardy V, Menassa R, Sulmont V, et al. (2010). Phenotype-genotype correlations of 13 rare CYP21A2 mutations detected in 46 patients affected with 21-hydroxylase deficiency and in one carrier. J Clin Endocrinol Metab; 95:1288-300.

Tee MK, Babalola GO, Aza-Blanc P, Speek M, Gitelman SE, et al. (1995). A promoter within intron 35 of the human C4A gene initiates abundant adrenal-specific transcription of a 1 kb RNA: location of a cryptic CYP21 promoter element? Hum Mol Genet; 4:2109-16.

Toraman B, Okten A, Kalay E, Karaguzel G, Dincer T, et al. (2013). Investigation of CYP21A2 mutations in Turkish patients with 21-hydroxylase deficiency and a novel founder mutation. Gene; 513:202-8.

Trakakis E, Basios G, Trompoukis P, Labos G, Grammatikakis I, et al. (2009). An update to 21-hydroxylase deficient congenital adrenal hyperplasia. Gynecol Endocrinol; 26:63-71.

Tusie-Luna MT, Traktman P, White PC. (1990). Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. J Biol Chem; 265:20916-22.

Tusie-Luna MT, Speiser PW, Dumic M, New MI, White PC. (1991). A mutation (Pro30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. Mol Endocrinol; 5:685-92.

Usui T, Nishisho K, Kaji M, Ikuno N, Yorifuji T, et al. (2004). Three novel mutations in Japanese patients with 21-hydroxylase deficiency. Horm Res; 61:126-32.

Urabe K, Kimura A, Harada F, Iwanaga T, Sasazuki T. (1990). Gene conversion in steroid 21-hydroxylase genes. Am J Hum Genet; 46:1178-86.

Val P, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiere G, Martinez A. (2003). SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. Nucl Recept; 1:8.

Van der Kamp HJ, Wit JM. (2004). Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. Eur J Endocrinol; 3:71-5.

Van der Kamp HJ, Oudshoorn CG, Elvers BH, van Baarle M, Otten BJ, et al. (2005). Cutoff levels of 17-alpha-hydroxyprogesterone in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia should be based on gestational age rather than on birth weight. J Clin Endocrinol Metab; 90:3904-7.

Watanabe N, Kitazume M, Fujisawa J, Yoshida M, Fujii-Kuriyama Y. (1993). A novel cAMP-dependent regulatory region including a sequence like the cAMP-responsive element, far upstream of the human CYP21A2 gene. Eur J Biochem; 214:521-31.

Wedell A, Ritzén ME, Haglund-Stengler B, Luthman H. (1992). Steroid 21-hidroxylase deficiency: three additional mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations. Proc Natl Acad Sci USA; 89:7232-6.

Wedell A, Luthman H. (1993a). Steroid 21-hydroxilase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. Hum Mol Genet; 2:499-504.

Wedell A, Luthman H. (1993b). Steroid 21-hydroxilase (P450c21): a new allele and spread of mutations through the pseudogene. Hum Genet; 91:236-40.

Wedell A, Thilen A, Ritzen EM, Stengler B, Luthman H. (1994). Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. J Clin Endocrinol Metab; 78:1145-52.

Wedell A. (1998). An update on the molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia. Diagnostic and therapeutic aspects. J Pediatr Endocrinol Metab; 11:581-9.

Weintrob N, Brautbar C, Pertzelan A, Josefsberg Z, Dickerman Z, et al. (2000). Genotype-phenotype associations in non-classical steroid 21-hydroxylase deficiency. Eur J Endocrinol; 143:397-403.

Werkmeister JW, New MI, Dupont B, White PC. (1986). Frequent deletion and duplication of the steroid 21-hydroxylase genes. Am J Hum Genet; 39:461-9.

Wilson TE, Mouw AR, Weaver CA, Milbrandt J, Parker KL. (1993). The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. Mol Cell Biol; 13:861-8.

Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC, New MI. (1995). Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. J Clin Endocrinol Metab;80:2322-9.

Wilson RC, Nimkarn S, Dumic M, Obeid J, Azar M, et al. (2007). Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. Mol Genet Metabol; 90:414-21.

White PC, Chaplin DD, Weis JH, Dupont B, New MI, et al. (1984a). Two steroid 21hydroxylase genes are located in the murine S region. Nature; 312:465-7.

White PC, New MI, Dupont B. (1984b). Cloning and expression of cDNA encoding a bovine adrenal cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. Proc Natl Acad Sci U S A; 81:1986-90.

White PC, New MI, Dupont B. (1986). Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. Proc Natl Acad Sci U S A; 83:5111-5.

White PC. (1987). Genetics of steroid 21-hydroxylase deficiency. Recent Prog Horm Res; 43:305-36.

White PC, Tusie-Luna MT, New MI, Speiser PW. (1994). Mutations in steroid 21-hydroxylase (CYP21). Hum Mutat; 3:373-8.

White PC, Speiser PW. (2000). Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Endocrine Reviews; 21:245-91.

White PC, Speiser PW. (2002). Long-term consequences of childhood-onset congenital adrenal hyperplasia. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab; 16:273-88.

Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, McRee DE. (2000). Microsomal cytochrome P450 2C5: comparison to microbial P450s and unique features. J Inorg Biochem; 81:183-90.

Williams PA, Cosme J, Ward A, Angove HC, MatakVinkovic D, et al. (2003). Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. Nature; 424:464-8.

Williams PA, Cosme J, Vinkovic DM, Ward A, Angove HC, et al. (2004). Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. Science; 305:683-6.

Wilson RC, Nimkarn S, Dumic M, Obeid J, Azar MR, et al. (2007). Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. Mol Genet Metab; 90:414-21.

Witchel SF, Lee PA, Suda-Hartman M, Hoffman EP. (1997). Hyperandrogenism and manifesting heterozygotes for 21-hydroxylase deficiency. Biochem Mol Med; 62:151-8.

Witchel SF, Lee PA. (1998). Identification of heterozygotic carriers of 21-hydroxylase deficiency: sensitivity of ACTH stimulation tests. Am J Med Genet; 76:337-42.

Witchel SF, Smith R, Crivellaro CA, Manna TD, Dichtchekenian V, et al. (2000). CYP21 mutations in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. Hum Genet; 106:414-9.

Witchel SF, Azziz R. (2010). Nonclassic Congenital Adrenal Hyperplasia. Int J Pediatr Endocrinol; 1-11.

Wu DA, Chung BC. (1991). Mutations of P450c21 (steroid 21-hydroxylase) ar Cys428, Val281, and Ser268 result in complete, partial, or no loss of enzymatic activity, respectively. J Clin Invest; 88:519-23.

Yang Z, Mendoza AR, Welch TR, Zipf WB, Yu CY. (1999). Modular variations of the human major histocompatibility complex class III genes for serine/threonine kinase RP, complement component C4, steroid 21-hydroxylase CYP21, and tenascin TNX (the RCCX module). A mechanism for gene deletions and disease associations. J Biol Chem; 274:12147-56.

Yano JK, Wester MR, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD, et al. (2004). The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-A resolution. J Biol Chem; 279:38091-4.

Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, et al. (1996). Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human

stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. J Biol Chem; 271:13055-60.

Yoo Y, Chang MS, Lee J, Cho SY, Park SW, et al. (2013). Genotype-phenotype correlation in 27 pediatric patients in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in a single center. Ann Pediatr Endocrinol Metab; 18:128-34.

Zhang HJ, Yang J, Zhang MN, Zhang W, Liu JM, et al. (2009). Variations in the promoter of CYP21A2 gene identified in a Chinese patient with simple virilizing form of 21-hydroxylase deficiency. Clin Endocrinol (Oxf); 70:201-7.

Zhao B, Lei L, Kagawa N, Sundaramoorthy M, Banerjee S, et al. (2012). Threedimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. J Biol Chem; 287:10613-22.

Zeng X, Witchel SF, Dobrowolski SF, Moulder PV, Jarvik JW et al. (2004). Detection and assignment of CYP21 mutations using peptide mass signature genotyping. Mol Genet Metab; 82:38-47.

ANEXOS



Para acceder a las Funciones Auxiliares y Principales por favor comuníquese con la Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires (<u>http://digital.bl.fcen.uba.ar</u>) email: digital@bl.fcen.uba.ar

To access the Main and Auxiliary Functions, please contact us at Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales -Universidad de Buenos Aires (<u>http://digital.bl.fcen.uba.ar</u>) email: digital@bl.fcen.uba.ar



Para la consulta de este anexo por favor comuníquese con la Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales -Universidad de Buenos Aires (<u>http://digital.bl.fcen.uba.ar</u>) email: digital@bl.fcen.uba.ar

In order to see appendices to this document, please contact us at Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales -Universidad de Buenos Aires (<u>http://digital.bl.fcen.uba.ar</u>) email: digital@bl.fcen.uba.ar