



Hiperplasia suprarrenal congénita forma pierde sal. Dificultad en el diagnóstico molecular.

Autores: Esperanza Lepe Balsalobre, M^a del Mar Vitoria Peñas, Julia Prados Mezcuca⁽¹⁾, Mariagracia Zarate Bertolini, Antonio Moro Ortiz, Rafael Espino Aguilar⁽¹⁾.

Centro de trabajo: UGC de Laboratorio Clínico. ⁽¹⁾UGC de Pediatría. Hospital Universitario de Valme. Sevilla.

Autor para correspondencia: Dra. María del Mar Vitoria Peñas. E-mail: mariadelmarvitoria@yahoo.es

Recibido 10-8-2017 - Aceptado: 8-10-2017

Vox Paediatrica 2017; XXIV (II): páginas 73-75

Resumen: Presentamos el caso de un niño de 4 años que a los 40 días de vida ingresó por irritabilidad y rechazo de las tomas de dos semanas de evolución. El estudio al ingreso fue compatible con hiperplasia suprarrenal congénita forma pierde sal, cursándose un primer estudio genético que se realizó con técnica de reacción en cadena de la polimerasa que resultó negativo para las mutaciones estudiadas. Dada la clínica de paciente y la evolución de los síntomas, a los 4 años de edad, se decidió la repetición del estudio genético por MLPA resultando positivo y confirmando el diagnóstico clínico.

Palabras clave: hiperplasia suprarrenal congénita, diagnóstico molecular.

TITLE: Salt-wasting congenital adrenal hyperplasia. Difficulty in molecular diagnosis

Abstract: We present the case of a 4-year-old boy who at 40 days of age was admitted for irritability and rejection of the two weeks of evolution. The study at the time of admission was compatible with congenital adrenal hyperplasia and lost salt. A first genetic study was carried out using a polymerase chain reaction technique that was negative for the mutations studied. Given the patient's clinic and the evolution of the symptoms, at 4 years of age, it was decided to repeat the genetic study by MLPA, being positive and confirming the clinical diagnosis.

Keywords: Congenital adrenal hyperplasia, molecular diagnosis.

Introducción:

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) es una enfermedad de herencia autosómica recesiva con una frecuencia de aparición de 1:300-1000 nacidos vivos en las formas "no clásicas" o algunas "virilizantes simples" (en infancia, adolescencia o edad adulta) y de 1:10000 en las formas "clásica pierde sal" o "clásicas virilizantes simples" (en el periodo neonatal). En el 90-95% de los casos se debe a un déficit del enzima 21-hidroxilasa por mutaciones en el gen CYP21A2 (lo-

calizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3))¹⁾. Como características fundamentales destaca la insuficiencia suprarrenal y el hiperandrogenismo producido como consecuencia del bloqueo variable de la síntesis de glucocorticoides y mineralocorticoides y producción excesiva de andrógenos^(2,3).

Caso clínico

Presentamos el caso de un niño de 4 años de edad que a los 40 días de su nacimiento ingresa en la uni-

dad de pediatría por presentar irritabilidad, rechazo de las tomas y pérdida de peso de dos semanas de evolución. A la exploración destacaba aspecto de desnutrición con signos de deshidratación (mucosas secas, ojos hundidos y signo del pliegue). La ecografía abdominal mostró hiperplasia de glándulas suprarrenales y la bioquímica hiponatremia (104 mEq/L) y 17OH-progesterona superior a 130 ng/mL, (tabla 1). Ante la sospecha de HSC forma "clásica pierde sal", se curso estudio genético y se inicio tratamiento con hidrocortisona y 9 alfaflorhidrocortisona.

Se realizó estudio genético de las 9 mutaciones más comunes en el gen de la 21-hidroxilasa mediante una reacción en cadena de la polimerasa seguido de una restricción enzimática (RFLP): Pro-30-Leu (P30L), Intrón 2 (A, C3G), Exón 3 (8-bq deletion), Ile-172-Asn (I172N), Val-281-Leu 1 (V281L) + Arg-339-His (R339H), Gln-318-Stop (Q318X), Arg-356-Trp (R358W), Pro-458-Ser (P453S), no detectándose ninguna de las mutaciones estudiadas (certeza diagnóstica 98-99 %).

El paciente fue dado de alta y seguido en consulta de Endocrinología Pediátrica. Dada la clínica y los sucesivos controles hormonales (tabla 1) se decide realizar nuevo estudio genético a los 4 años, mediante secuenciación del gen CYP21A2 por MLPA de las siguientes alteraciones genéticas: c.89C>T,(P.Pro30Leu), c.290-13A/C>G, c.329_336del8 (p.Gly110Valfs*21), c.515T>A (P.Ile172Asn), c.[707T>A;710T>A;716T>A] p.[1236N;V237E;M239K], c.841G>T(p.Val281Leu), c.920dupT (P.Leu307Phfs*6), c.952C>T(P.Gln318*), c.1066C>T(p.Arg356Trp), c.1277G>A (p.Arg426His), c.1357C>T (p.Pro453Ser), determinándose la existencia de delección en los exones 1-6 en heterocigosis del gen CYP21A2, observándose además, una mutación c.290-13A/C>G en heterocigosis. A la vista de estos resultados, se concluyó que se trataba de un heterocigoto compuesto para estas dos alteraciones que se asocia a la forma clásica de la enfermedad.

Discusión

El diagnóstico de la hiperplasia suprarrenal congénita se basa en la conjunción de hallazgos clínicos y bioquímicos siendo fundamental la confirmación genética en base a un futuro consejo genético.

La negatividad de hallazgos en el estudio molecular no excluye el diagnóstico clínico como en el caso que presentamos.

El análisis de la mutación CY21A2 es problemática, ya que se considera uno de los genes más polimórficos debido, sobretudo, a la presencia de un pseudogen (CYP21P) altamente homólogo (98 % en exones y 96 % en intrones) que interfiere con la amplificación del gen. Esto conduce a conversiones y deleciones del gen por recombinación homóloga que lo inactivan. Por ello, dado el gran número de mutaciones posibles, conversiones y deleciones es importante analizar que método molecular diagnóstico es adecuado para su identificación⁽⁴⁾.

Así, los reordenamientos genéticos del gen CYP21A2 han sido tradicionalmente detectados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de una restricción enzimática (RFLP). Sin embargo, la identificación de posibles mutaciones no es sencilla debido la alta homología existente entre el gen CYP21 y el pseudogen. Esta dificultad diagnóstica radica principalmente en el diseño de los cebadores empleados que deben reconocer secuencias presentes en el gen pero ausentes en el pseudogen. Hasta la fecha, por este motivo, se han detectado dos regiones en las que el gen CYP21 difiere del pseudogen: una secuencia de 8pb del exón 3 (presente en CYP21 y suprimida en el pseudogen) y la diferencia de 4 nucleótidos en el exón 6⁽⁵⁾.

Por este motivo, el uso diagnóstico de la PCR seguida de RFLP en la HSC debe tener siempre en cuenta la incapacidad para amplificar los alelos del intrón 2 (donde presentaba la mutación nuestro paciente)⁽⁶⁾.

Por tanto, la técnica anterior debería complementarse con nuevas técnicas diagnósticas como la amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA) capaces de identificar deleciones, conversiones y duplicaciones descritas en el gen CYP21A2. Artículos recientes^(4,5) demuestran que la técnica MLPA es capaz de detectar las mutaciones conocidas del gen CYP21, aunque con el inconveniente de la posibilidad de falsos positivos por cercanía de las mutaciones/polimorfismos a las regiones de unión de la sonda.

La técnica MLPA es un método más sensible para

EDAD	V N	40 d	3 m	8 m	1 ½ a	2 ½ a	4 a
Sodio	135-145 mEq/L	104	138	138	138	140	139
Potasio	3,5-5 mEq/L	7,2	5,4	4,5	5	5,5	5
17OH-progesterona	0,2-0,9 ng/mL	>130	>130	20	20	22	3,38
DHEA-S	0.1-0.6 ng/mL	4,57	-	0,1	0,6	1,3	2,2
Delta 4-androstendiona	23-89 ng/mL	-	0,1	0,87		5,19	<0,1
Testosterona	0,0-0,03 ng/mL	2,5	0,05	0,26	74	1,1	0,03
Cortisol	6-23 µg/dL	6,4	4,6	6,9	-	-	-
ACTH	9 a 52 pg/mL	-	142	117,9	-	-	-

Tabla 1. Evolución de los parámetros bioquímicos y hormonales

la detección de mutaciones en el gen CYP21 con respecto a la PCR-RFLP y debería ser considerada en aquellos casos en que la primera arroje resultados no concluyentes y sospecha clínica importante, como en nuestro paciente.

Como demuestra este caso, la clínica es fundamental en la práctica habitual, prevaleciendo su valor sobre pruebas complementarias que, en ocasiones, no tiene la suficiente especificidad para la detección de ciertos casos, lo que obliga el uso de otras pruebas con mayor capacidad diagnóstica.

Bibliografía

1. Labarta JI, Arriba A, Fernández A. Hiperplasia suprarrenal congénita. *Protoc diagn ter pediatri* 2011; 1:117-28.
2. Rica I, Grau G, Vela A. Insuficiencia suprarrenal. *Protoc diagn ter pediatri* 2011; 1:166-76.
3. Rodríguez A, Ezquieta B, Labarta JI, Clemente M, Espino R, Rodríguez A, Escribano A. Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de pacientes con formas clásicas de hiperplasia suprarrenal congénita con déficit de 21-hidroxilasa. *An Pediatr* 2017; 87 (2): 116.e1-116.e10.
4. Hong G, Park HD, Choi R, Jin DK, Kim JH, Ki CS, Lee SY, Song J, Kim JW. CYP21A2 Mutation Analysis in Korean Patients With Congenital Adrenal Hyperplasia Using Complementary Methods: Sequencing After Long-Range PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis With Multiple Ligation-Dependent Probe Amplification Assay. *Ann Lab Med* 2015; 35:535-9.
5. Megan C, Killeen A. An Overview of Molecular Diagnosis of Steroid 21-Hydroxylase Deficiency. *J Mol Diagn* 2001; 3:49-54.