

Frecuencia alélica de la mutación asociada a hiperplasia suprarrenal congénita V281L en neonatos con concentraciones elevadas de 17-hidroxiprogesterona

M.L.F. Ruano¹, B. Ezquieta¹, E. Dulín¹, N.L. Lazareno¹, M.D Rodríguez-Arnao², A. Rodríguez²

Resumen

Objetivo: Determinar la frecuencia de la mutación V281L en neonatos con concentraciones de 17-hidroxiprogesterona en sangre superiores al valor discriminante para el cribado neonatal de hiperplasia suprarrenal congénita. Método: Se estudió la presencia de la mutación V281L en ADN obtenido de muestras de sangre seca en las que previamente se había medido la concentración de 17-hidroxiprogesterona. Dichas muestras procedían del Programa de Cribado Neonatal de la Comunidad de Madrid. Resultados: La frecuencia alélica de la mutación V281L en neonatos con concentración de 17-hidroxiprogesterona superior al valor discriminante fue 3,2%. Las concentraciones de 17-hidroxiprogesterona en las muestras extraídas el segundo día tras el nacimiento fueron $35,8 \pm 6,0$ nmol/L para los neonatos portadores de la mutación y $37,2 \pm 7,4$ nmol/L para los no portadores; en la extracción realizada al séptimo día fueron $18,2 \pm 4,1$ nmol/L y $18,3 \pm 5,6$, respectivamente. Conclusiones: La frecuencia alélica de V281L en neonatos con concentraciones de 17-hidroxiprogesterona en sangre por encima del valor discriminante no es superior a la de los neonatos con concentraciones fisiológicas. Además, no hay diferencia en la concentración de 17-hidroxiprogesterona entre los neonatos con la mutación y aquéllos que no la tienen.

Palabras clave: Hiperplasia suprarrenal congénita. Esteroide-21-monoxigenasa. V281L. Cribado Neonatal.

Summary: Allelic frequency of congenital adrenal hyperplasia-related V281L mutation in newborns with high 17-hydroxyprogesterone concentrations

Objective: To determine the allelic frequency of the V281L mutation in newborns with blood 17-hydroxyprogesterone concentrations above the cut-off value for neonatal screening of congenital adrenal hyperplasia. Method: The presence of the V281L mutation was investigated in DNA obtained from dried blood-spot specimens in which 17-hydroxyprogesterone concentration had been previously measured. Specimens were obtained from the Neonatal Screening Program of the Comunidad de Madrid. Results: The allelic frequency for the V281L mutation in newborns with 17-hydroxyprogesterone concentration above the cut-off value was 3.2%. 17-hydroxyprogesterone concentrations in specimens obtained at the second day of life were 35.8 ± 6.0 nmol/L for V281L carriers and 37.2 ± 7.4 nmol/L for non-carriers; for samples drawn at the seventh day, concentrations were 18.2 ± 4.1 nmol/L and 18.3 ± 5.6 , respectively. Conclusions: The allelic frequency of the V281L mutation in newborns with blood 17-hydroxyprogesterone concentrations above the cut-off value is not higher than that in newborns with normal values. Moreover, there is no difference in 17-hydroxyprogesterone concentration between neonates with the mutation and those without it.

Keywords: Adrenal Hyperplasia Congenital. Steroid 21-Hydroxylase. Neonatal screening.

INTRODUCCIÓN

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) es una enfermedad debida a deficiencia de esteroide-21-monoxigenasa (EC 1.14.99.10) en el 95% de los casos. Las formas leves no clásicas constituyen una de las enfermedades recesivas más frecuentes, habiéndose estimado un amplio intervalo de frecuencias (1/100-1/1000) (1), siendo la

mutación V281L la más frecuente encontrada en todas las poblaciones estudiadas hasta el momento (55-60% en España) (2).

En 1990 la detección precoz de HSC se incorporó al Programa de Cribado Neonatal de la Comunidad de Madrid, basada en la medición de la concentración de la 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) en muestras de sangre seca en papel extraídas el segundo día de vida. Para aquellas muestras que superan el valor discriminante se vuelve a realizar la medición en una nueva muestra obtenida varios días después para la detección de la concentración elevada de fenilalanina en sangre dentro del Programa de Cribado Neonatal.

Teniendo en cuenta la elevada prevalencia de las formas no clásicas de HSC y la alta frecuencia de la mutación V281L en dichas formas, nuestro grupo se planteó estudiar la presencia de

¹Servicio de Bioquímica Clínica

²Servicio de Endocrinología Pediátrica

Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid)

esta mutación en neonatos que presentaban concentraciones de 17-hidroxiprogesterona por encima del valor discriminante en la muestra obtenida para el cribado neonatal de HSC, pero que se normalizaban en la muestra obtenida posteriormente (a los 7 días).

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Para la realización del trabajo, el Laboratorio de Cribado Neonatal de la Comunidad Autónoma de Madrid nos facilitó un total de 118 muestras de sangre seca en papel de neonatos a término extraídas a las 48 horas de vida, previamente utilizadas para la detección precoz de HSC, y cuyo uso fue previamente aprobado por el Comité de Ética de nuestro hospital. Se utilizó un diseño experimental a doble ciego, de forma que cuando se procedió a la extracción del ADN y a la búsqueda de la mutación V281L el único dato que se conocía de ellas era la concentración de 17-OHP. El criterio de selección de las muestras fue tener una concentración de 17-OHP superior a 30 nmol/L (valor discriminante establecido para descartar HSC), y que dicho valor se normalizara en la muestra obtenida posteriormente. De las 118 muestras seleccionadas hubo 41 en las que no se logró un rendimiento adecuado en la amplificación de la región de ADN objeto de estudio que permitiera obtener resultado en la hibridación específica de alelo, quedando sólo 77 muestras incluidas finalmente en el estudio.

Instrumentación

La concentración de 17-OHP se midió en un analizador Auto-DELTA[®] de fluorescencia a tiempo retardado (Perkin-Elmer Life Sciences, Finland). La amplificación de gen CYP21A2 se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA), y las incubaciones para el procedimiento de hibridación se realizaron en un horno de hibridación giratorio Micro-4 (Hybaid Ltd., UK).

Reactivos

Los reactivos para la medida de la concentración de 17-OHP fueron suministrados por Perkin-Elmer Life Sciences (Turku, Finland). La resina (Chelex[®]100) empleada para la extracción de ADN fue de Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Los productos utilizados en la PCR y las membranas de hibridación fueron de Roche Diagnostics GmbH (Steinheim, Germany). Los reactivos para la preparación de tampones empleados en la hibridación para la detección de la mutación V281L fueron suministrados por Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany) y por Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Procedimiento

La concentración de 17-OHP se midió mediante inmunoanálisis de fluorescencia a tiempo retardado. La extracción de ADN se llevó a cabo en base al protocolo descrito por Fitness y cols. en un estudio similar (3): un disco de 4,5 mm de diámetro del papel que contiene la muestra de sangre seca y se sometió a dos incubaciones de 40 min a temperatura ambiente con agitación en 500 mL de tampón Tris/HCl 20 mM pH 8,0, EDTA 1 µM; tras centrifugar y eliminar el sobrenadante, se añadieron 100 µL de suspensión de Chelex[®]100 6% y se realizaron tres incubaciones a 37°C (15 min), 56°C (10 min) y a ebullición (10 min); finalmente, el contenido del tubo se

centrifugó durante 2 minutos y se guardó el sobrenadante que contenía el ADN.

La detección de la mutación V281L se realizó mediante una PCR anidada de la región que abarca los exones 4 al 8 del gen CYP21A2, seguida de una hibridación específica de alelo tal como se ha descrito por Ezquieta et al (4).

Tratamiento estadístico

La comparación de la frecuencia alélica obtenida para la mutación V281L en nuestro estudio con respecto a otras investigaciones se realizó mediante la prueba Chi cuadrado de Pearson, o con la prueba exacta de Fisher en caso de que no se cumplieran los criterios de aplicación de la anterior.

RESULTADOS

Entre las 77 muestras válidas se detectaron 5 alelos con la mutación V281L correspondientes a 5 individuos heterocigotos, lo que supone una frecuencia alélica de 3,2% (5 alelos de un total de 154). Al aplicar la prueba Chi cuadrado de Pearson ($P=0,762$), dicha frecuencia no difiere de la estimada por nuestro grupo para una muestra de 306 neonatos seleccionada al azar (3,8%) (5). Por otra parte, la prueba exacta de Fisher sí halló una diferencia significativa ($P=0,035$) entre la frecuencia alélica de nuestro estudio y el 1,0% obtenido para la misma mutación a partir de 603 muestras neonatales también seleccionadas al azar en Nueva Zelanda (6).

La tabla I muestra las concentraciones medias de 17-OHP obtenidas para las muestras portadoras o no de la mutación V281L. El hecho de tener o no dicha mutación no afectó de manera significativa a la concentración de 17-OHP tanto en la muestra extraída a los dos días del nacimiento como en la extraída al séptimo día. La media fue incluso menor en los neonatos heterocigotos que en los que no tenían la mutación.

Tabla I. Concentración media de 17-OHP ($\pm s$) y presencia de la mutación V281L en muestras obtenidas los días dos y siete

	Normal (n = 72)	Heterocigotos (n = 5)	Total (n = 77)
Día dos (nmol/L)	37,2 \pm 7,4	35,8 \pm 6,0	37,1 \pm 7,3
Día siete (nmol/L)	18,3 \pm 5,6	18,2 \pm 4,1	18,3 \pm 5,5

17-OHP: 17-hidroxiprogesterona

DISCUSIÓN

Los resultados muestran que la mutación V281L no es más frecuente en la muestra poblacional seleccionada que en una muestra poblacional de recién nacidos obtenida al azar (5). Sí se ha hallado una diferencia significativa al realizar la comparación con los resultados obtenidos para una muestra de neonatos neozelandeses. Esta diferencia se podría deber a que las formas no clásicas asociadas a deficiencia de esteroide-21-monooxigenasa son más prevalentes en población mediterránea que en otras poblaciones caucásicas (6).

En cuanto a la concentración basal de 17-OHP, ésta no es mayor en neonatos con la mutación V281L que en aquéllos que no son portadores. Esto se podría explicar por el hecho de que la enzima expresada a partir del alelo L281 conserva un 20-50% de la actividad hidroxilasa de la forma nativa (7,8), lo que unido a la presencia de un alelo normal no parece ser suficiente para inducir una deficiencia detectable de la actividad esteroide-21-monooxigenasa que provoque una acumulación del marcador metabólico. En este sentido, se ha observado que tanto pacientes adultos como pediátricos portadores de mutaciones leves o graves, si bien pueden presentar incrementos de 17-OHP en sangre tras estimulación con ACTH, poseen valores basales fisiológicos (2).

En conclusión, la presencia de la mutación V281L no está relacionada con concentraciones altas de 17-OHP en la extracción a las 48 horas del nacimiento. No obstante se podría investigar la posible presencia en estas muestras de otras mutaciones asociadas a la enfermedad.

Agradecimientos

Agradecemos a José M. Bellón la ayuda prestada en el análisis estadístico. Este estudio se ha realizado con cargo al proyecto FIS 01/0165 del Fondo de Investigaciones Sanitarias.

BIBLIOGRAFÍA

1. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000; 21: 245-91.
2. Ezquieta B, Cueva E, Varela J, Oliver A, Fernandez J, Jariego C. Non-classical 21-hydroxylase deficiency in children: association of adrenocorticotrophic hormone-stimulated 17-hydroxyprogesterone with the risk of compound heterozygosity with severe mutations. *Acta Paediatr* 2002; 91: 892-8.
3. Fitness J, Dixit N, Webster D, Torresani T, Pergolizzi R, Speiser PW, et al. Genotyping of CYP21, linked chromosome 6p markers, and a sex-specific gene in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 960-6.
4. Ezquieta B, Varela JM, Jariego C, Oliver A, Gracia R. Nonisotopic detection of point mutations in CYP21B gene in steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Chem* 1996; 42: 1108-10.
5. Ezquieta B, Ruano MLF, Dulin E, Arnao DR, Rodríguez A. Estimación de la prevalencia de enfermedades recesivas frecuentes en población española mediante análisis de ADN en muestras del cribado neonatal. *Med Clin (Barc.)* 2005; 125: 493-5.
6. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37: 650-67.
7. Tusie-Luna MT, Traktman P, White PC. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *J Biol Chem* 1990; 265: 20916-22.
8. Wu DA, Chung BC. Mutations of P450c21 (steroid 21-hydroxylase) at Cys428, Val281, and Ser268 result in complete, partial, or no loss of enzymatic activity, respectively. *J Clin Invest* 1991; 88: 519-23.

Correspondencia

Miguel L. Fernández Ruano
Servicio de Bioquímica Clínica
Hospital General Universitario Gregorio Marañón
C/Dr. Esquerdo, 46
28007-Madrid
mfernandezru.hgugm@salud.madrid.org