

## **Caracterización molecular de pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita diagnosticados en el tamizaje neonatal y sus familiares de primer grado**

Molecular characterization of patients with congenital adrenal hyperplasia diagnosed in neonatal screening and their first-degree relatives

Esp. Yurielas Betancourt Loyola<sup>1\*</sup>

<https://orcid.org/0000-0003-2952-2534>

MSc. Elayne Esther Santana Hernández<sup>2</sup>

<https://orcid.org/0000-0003-0476-9792>

Esp. Annis Almenares Garcés<sup>1</sup>

<https://orcid.org/0000-0002-9625-6777>

Med. Luis Alberto Sánchez Rodríguez<sup>2</sup>

<https://orcid.org/0000-0002-8066-3079>

<sup>1</sup> Hospital Pediátrico Provincial Pedro Agustín Pérez. Guantánamo, Cuba.

<sup>2</sup> Hospital Pediátrico Provincial Octavio de la Concepción de la Pedraja. Holguín, Cuba.

\*Autor para la correspondencia. Correo electrónico: [yurielab@infomed.sld.cu](mailto:yurielab@infomed.sld.cu)

### **RESUMEN**

**Introducción:** la hiperplasia suprarrenal congénita es un trastorno enzimático de las glándulas suprarrenales, con herencia autosómica recesiva. El déficit de la enzima 21-hidroxilasa representa el 95% de los casos diagnosticados, considerado como potencialmente grave y letal, requiere un diagnóstico temprano.

**Objetivo:** caracterizar molecularmente a familiares de primer grado y neonatos diagnosticados por tamizaje con hiperplasia suprarrenal congénita.

**Método:** se realizó estudio descriptivo transversal, tipo serie de casos, en la totalidad de los neonatos diagnosticados con hiperplasia suprarrenal congénita, a través del tamizaje, de la provincia de Holguín, Cuba, en el periodo de enero del 2005 a diciembre del 2012. Se efectuaron estudios moleculares a estos pacientes y sus familiares de primer grado, para conocer las mutaciones causantes.

**Resultados:** se lograron identificar las mutaciones en tres familias, para el 37,5%. Se identificaron tres madres portadoras sanas y una enferma y entre los padres, el 25% presentó mutaciones, uno portador sano y otro enfermo. La mutación más frecuentemente encontrada fue la del intron 2 en el 50% de los familiares de primer grado y varias combinaciones en el gen activo y en el pseudogen.

**Conclusiones:** la identificación de las mutaciones causantes de la enfermedad en estas familias permitió determinar familiares con riesgo genético, así como trazar estrategias en próximos embarazos y brindar la posibilidad de efectuar estudios prenatales que permitan poner tratamiento en los casos positivos.

**Palabras clave:** hiperplasia suprarrenal congénita, características clínicas, enzimas causantes, estudio molecular, tamizaje.

## ABSTRACT

**Introduction:** congenital adrenal hyperplasia is an enzymatic disorder of the adrenal glands, with autosomal recessive inheritance. The 21-hydroxylase enzyme deficit represents 95% of the diagnosed cases; considered potentially serious and lethal, it requires early diagnosis.

**Objective:** molecular characterization of first-degree relatives and neonates, who by screening, are diagnosed with congenital adrenal hyperplasia.

**Method:** a cross-sectional descriptive study, series of cases type, of all infants diagnosed with congenital adrenal hyperplasia through screening, was done in the province of Holguin comprising the period between January 2005 and December 2012. Molecular studies were carried out with these patients and their first-degree relatives to know the causative mutations.

**Results:** the mutations were identified in three families, representing 37.5%.

Three healthy and one sick carrier mothers were identified; and among the fathers, 25% presented mutations, one healthy and one sick carrier. The most frequently found mutation was the one of Intron 2 in 50% of first-degree relatives, and several combinations in the active gene and the pseudogen.

**Conclusions:** identifying the mutations that cause the disease in these families, helped to determine family members with genetic risk, design strategies in future pregnancies, and offer the possibility of carrying out prenatal studies which allow for treatment in positive cases.

**Key words:** congenital adrenal hyperplasia, clinical characteristics, causing enzymes, molecular study, screening.

Recibido: 14/10/2019.

Aprobado: 17/10/2019.

## Introducción

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) es una enfermedad genética con herencia autosómica recesiva, en la que la síntesis de cortisol está bloqueada, lo cual provoca un aumento de ACTH (hormona corticotropa hipofisaria) y la síntesis de otras hormonas producidas anteriormente al bloqueo, causado por diferentes mutaciones en una de las enzimas que regulan la esteroidogénesis en la corteza adrenal (cortisol, aldosterona y hormonas sexuales).<sup>(1,2)</sup>

La causa más frecuente es por la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa, debido a la alteración del gen CYP 21A2 (antes denominado CYP 21B), que codifica esta enzima, en estrecha relación con el locus B del complejo mayor de histocompatibilidad del antígeno leucocitario humano (HLA).

Todas las formas clínicas están asociadas a mutaciones en este gen, por lo que en la actualidad todos los pacientes deberían tener un diagnóstico genético que identifique las mutaciones, además del diagnóstico hormonal y clínico; paralelamente, se debe hacer un estudio familiar que permita realizar el diagnóstico de portadores o de formas no clásicas.<sup>(3-5)</sup>

La HSC puede afectar tanto a los niños como a las niñas. Alrededor de 1 de cada 10 000 a 18 000 niños nacen con esta enfermedad. La incidencia de las formas clásicas es de 1:15 000 nacimientos y en las formas no clásicas de 1:500-1:1 000, en población de raza blanca.<sup>(2)</sup>

La detección neonatal sistemática, mediante la impregnación de sangre sobre papel secante, entre el 5to. y el 10mo. días de vida, determina las cifras de 17 hidroxiprogesterona (17OHP), permite diagnosticar la enfermedad y salvar a un número de niños que pueden presentar la forma clínica severa perdedora de sal, los que habrían muerto en ausencia de un diagnóstico correcto. En el tamizaje neonatal no se llega a identificar la totalidad de recién nacidos con formas moderadas de la enfermedad.<sup>(2,6,7)</sup>

El desarrollo de técnicas en biología molecular ha permitido aumentar la fiabilidad del diagnóstico precoz. El estudio molecular es imprescindible para el consejo genético de estas familias, en que, además de los enfermos, pudieran estar otras personas afectadas con forma moderadas con déficit de 21-hidroxilasa, en su forma no clásica con expresividad clínica o sin ella, y pudieran existir portadores sanos que estarían en riesgo de tener otro descendiente enfermo. El estudio molecular permite identificar familias en riesgo y ofrecer asesoramiento genético en el período preconcepcional y en etapa prenatal, lo que posibilitará tener hijos sanos.<sup>(6,8)</sup>

La incidencia en Cuba es de 1:15 931 nacidos vivos y analizando los datos estadísticos en la provincia de Holguín se tiene como resultado una prevalencia en pacientes con HSC de 0,83 por cada 10 mil nacidos vivos. Esta prevalencia, en una enfermedad potencialmente grave o letal, que puede incidir en la morbilidad infantil del territorio holguinero, requiere, además de un diagnóstico temprano, la caracterización de las familias en riesgo, lo que puede lograrse a través del estudio molecular de los enfermos y sus familiares.

En Holguín, la implementación de tamizaje para esta enfermedad comenzó en enero del 2005, cuando se identificaron ocho enfermos. La frecuencia de la dolencia hizo sospechar que pudieran existir otras personas en riesgo en estas familias y de ahí la importancia de caracterizarlas molecularmente.

## **Método**

Se realizó un estudio transversal tipo serie de casos, con un total de ocho enfermos con HSC diagnosticados por tamizaje neonatal desde enero del 2005 a diciembre del 2012 en la provincia de Holguín, Cuba. Del universo, constituido por 97 576 nacidos vivos, la muestra quedó conformada por ocho pacientes. Se solicitó a las ocho familias consentimiento informado, las que aceptaron, lo que permitió efectuar el examen físico de cada enfermo y sus familiares de primer grado, así como la extracción de sangre periférica para estudio de ADN, con el propósito de identificar las mutaciones causantes.

El estudio molecular directo se efectuó para (G318X, P30L, del 8pb, intron 2) las cuatro mutaciones estandarizadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Genética (CNGM) de La Habana, Cuba, donde fueron analizadas las muestras.

Durante esta investigación se respetaron los principios éticos de la Declaración de Helsinki para investigaciones médicas. Estas familias también dieron su aprobación para que se publicaran estos resultados, siempre que fueran en revistas científicas y no se revelara su identidad.

## **Resultados**

Se realizó estudio molecular en siete de ocho enfermos, para el 87,5%, pero se logró determinar mutaciones en solo tres casos, para el 37,5%. En estos tres pacientes se identificó la mutación intron-2, en los otros tres casos no se encontraron ninguna de las cuatro mutaciones estudiadas en el laboratorio CNGM y dos afectados no se estudiaron.

No se lograron estudiar dos enfermos, el primero, el paciente 6, nacido en enero del 2005, falleció antes que llegara el resultado del tamizaje neonatal, un varón que hizo una forma neonatal grave perdedora de sal, con vómitos que lo llevaron a una deshidratación severa irreversible; el otro, el paciente, el 7, aún no se ha podido estudiar por traslado a otra localidad.

Como muestra la (tabla I), la mayoría de los enfermos presentan mutación para el intron 2, descrito como la mutación más importante en la presentación clínica más grave, la forma neonatal perdedora de sal. Esto nos hizo especular que era probable que el neonato que falleció tuviera esta mutación, por lo cual se consideró importante estudiar a los padres y su hermano, que constituyen una familia de riesgo.

Tabla I. Resultado del estudio molecular de pacientes con HSC

Pacientes	Resultado del estudio molecular
Paciente 1	No se encontró ninguna de las cuatro mutaciones
Paciente 2	No se encontró ninguna de las cuatro mutaciones
Paciente 3	Homocigótico G318X y heterocigótico P30L, del 8pb, intron 2
Paciente 4	Homocigótica intron 2
Paciente 5	No se encontró ninguna de las cuatro mutaciones
Paciente 6	No pudo estudiarse
Paciente 7	No se estudió
Paciente 8	Heterocigótica intron 2

Fuente: Informes finales de los estudios moleculares.

Se efectuó análisis de ADN de padres y hermanos de los enfermos: en dos familias, la del paciente 1 y el paciente 5, no se identificó ninguna de las cuatro mutaciones estudiadas, y la familia 7, a la que tampoco se le han estudiado los familiares de primer grado.

En la familia 2, solo la madre presenta una mutación en el intron 2, una paciente sana portadora; en la familia 3, la madre homocigota para la mutación intron 2 en el gen activo y en el seudogen otra mutación P30L; por los estudios hormonales y clínicos se llega al diagnóstico de HSC, fue atendida por infertilidad y logra su único embarazo a los 38 años; el padre, similar a su esposa homocigótico para intron 2 y en el seudogen otra mutación G318X, este matrimonio de la misma región geográfica que, aunque no se reconocen como consanguíneos, no se puede descartar posible consanguinidad.

**Tabla II.** Estudios moleculares de los familiares de primer grado de cada paciente

Familia	Estudio Molecular de la madre	Estudio molecular del padre	Estudio molecular del hermano
Familia del Paciente 1	No mutación	No mutación	No tiene
Familia del Paciente 2	Heterocigótica intron 2	No mutación	No mutación
Familia del Paciente 3	Homocigótico intron 2 y Heterocigótico P30L	Homocigótico intron2 y Heterocigótico G318X	No hermanos
Familia del Paciente 4	Homocigótico intron 2	No mutación	Homocigótico intron 2
Familia del Paciente 5	No mutación	No mutación	No hermanos
Familia del Paciente 6	Heterocigótica intron 2	No se estudió	Heterocigótico del8pb, intron 2, P30L, no tiene G318X
Familia del Paciente 7	No se estudió	No se estudió	No se estudió
Familia del Paciente 8	No mutación	Homocigótico intron 2	No mutación

Fuente: Informes finales de los estudios moleculares.

En la familia 4, la madre homocigótica para intron 2 en el seudogen, con estudio hormonal y clínico negativos, portadora sana; su esposo, sin ninguna mutación; sin embargo, su hijo mayor, con la misma mutación que ella en el gen activo, tuvo examen físico positivo para la enfermedad y se le indicó estudio hormonal.

La familia 6 del neonato fallecido, su madre en el gen activo con mutación del intron 2 homocigótica, con estudio hormonal y clínico positivo para HSC, considerada enferma. El padre no se quiso estudiar y su único hermano en el seudogen varias combinaciones heterocigotos para las mutaciones del8pb, intron 2, P30L, con estudio hormonal y clínico negativo, considerado portador sano.

En la familia 8 solo el padre presentó mutación para intron 2 de forma homocigótica en el seudogen, con estudio hormonal y clínico negativo. Estos resultados se pueden valorar en la (tabla II).

Como describe la tabla anterior, la mutación más frecuentemente detectada fue la intron 2 en cuatro madres, para el 50%, y en los padres solo en dos de estos, para el 25%; en los hermanos de los enfermos se mostró de forma similar a los padres, al exhibir combinaciones con el intron 2.

## Discusión

La HSC en más del 95% se ocasiona por déficit de enzima 21-hidroxilasa, el gen correspondiente a esta enzima, conocida también como citocromo P450c21, se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3). En realidad existen dos genes: el gen funcional CYP21B (expresa la 21-hidroxilasa) y un pseudogen no funcional, llamado CYP21A. Ambos genes se encuentran muy cercanos y poseen una alta homología entre sí, tienen una longitud de unos 3,4 kpb y contienen 10 exones y 9 intrones. <sup>(1,3)</sup>

La CYP21, 21-hidroxilasa o P450c21, es una enzima miembro de la superfamilia del citocromo P450, codificada por un gen identificado en 1985. En realidad, existen dos genes CYP21, llamados CYP21A y CYP21B. El gen CYP21A no funcional, codifica una proteína activa truncada sin actividad biológica, mientras que el gen CYP21B codifica la proteína activa. <sup>(2-5)</sup>

La gran mayoría de las mutaciones que causan déficit de 21-hidroxilasa se producen por alguno de estos dos mecanismos: <sup>(4)</sup>

- recombinación asimétrica entre los genes CYP21B y CYP21A durante la meiosis, debido a la alta homología entre ambos,
- o bien por microconversiones génicas que introducen en el gen CYP21B mutaciones puntuales por transferencia desde el pseudogen CYP21A (y viceversa). El pseudogen se comporta como un reservorio de mutaciones. <sup>(6,7)</sup>



Entre las mutaciones que causan déficit de 21-hidroxilasa existen dos grupos: grandes mutaciones (grandes deleciones, conversiones génicas y duplicaciones) y mutaciones puntuales. El primer grupo de mutaciones constituye el 25% de las causantes del déficit de 21-hidroxilasa y se detectan por la técnica de *Southern Blot*, que no está montada en el laboratorio del CNGM. El segundo grupo, las mutaciones puntuales, abarca el 75% restante de las mutaciones causantes del déficit. En el laboratorio del CNGM se realiza el estudio de cuatro de estas mutaciones (P30L, intrón 2, deleción de 8 pb y G318X), mediante RFLP (*restriction fragment length polymorfism*).

Otras dos mutaciones (I172N y P453S) no están en estudio, debido a la falta de reactivos.<sup>(8-10)</sup>

En esta enfermedad autosómica recesiva pueden ocurrir en un mismo cromosoma más de una mutación, debido a los dos mecanismos explicados anteriormente. Estos individuos no son enfermos, puesto que su otro cromosoma es normal (funcional).<sup>(11,12)</sup>

Los mecanismos de daño génico responsables del defecto son principalmente la conversión génica y la deleción parcial o total del gen. La conversión génica es la causa más frecuente y se estima que es responsable de más del 80% de los casos con deficiencia de 21-hidroxilasa. La conversión génica conduce a la inactivación del gen CYP21, al incorporarse a estas secuencias normalmente presentes en el pseudogen inactivo y altamente homólogo, denominado CYP21P. De esta forma el traspaso de secuencias de un gen inactivo al activo conduce a la síntesis de una enzima con una reducida o nula actividad, que determina la caída en las concentraciones de cortisol y aldosterona.<sup>(13-15)</sup>

Se conoce que la mutación más importante aparece en el gen activo, que en la mayoría de los casos apareció la mutación del intrón 2, que se sabe que es una zona de *I2 splice*: cambio de A a G en el intrón-2, que crea un sitio de *splicing* aberrante.<sup>(16)</sup>

A diferencia de otras enfermedades recesivas, donde es frecuente presentar la misma mutación en los dos alelos, en el déficit de 21-hidroxilasa los enfermos son frecuentemente heterocigotos compuestos o dobles heterocigotos: es decir tienen diferentes mutaciones génicas en cada alelo.

La mayoría de las mutaciones de la 21-hidroxilasa es consecuencia de recombinaciones entre el gen CYP21B y el pseudogen CYP21A, que originan mutaciones puntuales, deleciones y conversiones que afectan la actividad de la enzima. Los pacientes con déficit de 21-hidroxilasa tienen gran frecuencia de HLA BW47 y menor frecuencia de HLA BW51, BW53, BW60 y DR7. Ambos genes se encuentran adyacentes a los genes C4A y C4B, que codifican para el cuarto componente del complemento; el orden de los genes es C4A-CYP21A-C4B-CYP21B. <sup>(17,18)</sup>

Por estudios de caracterización molecular en pacientes con diferentes tipos de deficiencia de 21-hidroxilasa se identificaron varias mutaciones: <sup>(18,19)</sup>

- a) deleciones en estado homocigoto del gen CYP21B en la forma clásica perdedora de sal.
- b) pequeños intercambios de secuencia entre los genes CYP21A y CYP21B, fenómeno denominado "conversión génica", que conduce a la transferencia de una de las mutaciones del pseudogen al gen funcional; además se han identificado varios polimorfismos normales en el gen CYP21B, los cuales no afectan la actividad de 21-hidroxilasa. <sup>(20)</sup>

La observación de que el gen de la 21-hidroxilasa se segrega junto con los determinantes antigénicos del complejo HLA-B, sugirió el estudio de haplotipos de CMH en familias afectadas con la deficiencia de 21-hidroxilasa, lo que ha permitido establecer que cualquier miembro de una familia que comparta haplotipos con el sujeto afectado es portador del gen del defecto enzimático. <sup>(20, 21)</sup>

Debido a la importancia del diagnóstico precoz de la HSC, principalmente la variedad con pérdida salina, se ha decidido en muchos países y en Cuba establecer el tamizaje neonatal para HSC, al realizar un diagnóstico precoz, para lograr un tratamiento oportuno en estos pacientes, por lo que ha disminuido la mortalidad infantil por esta causa.

En Cuba, con la posibilidad de que el Centro de Inmunoensayo ha desarrollado kit diagnóstico de UMELISA (traducido al español, ensayo inmunoenzimático ligado a la enzima) 17OH progesterona NEONATAL, utilizado en todo el país, en los laboratorios con la tecnología de Sistema Ultramicro Analítico (SUMA),

se inició el Programa de Diagnóstico Precoz de HSC en el 2005 y años posteriores se comienzan los estudios moleculares que permiten la tipificación de las 4 mutaciones más frecuentemente descritas para esta enzima, que complementan el diagnóstico con el estudio clínico-hormonal y justifican su realización en los pacientes diagnosticados con HSC.

Establecer el diagnóstico de HSC es importante para el asesoramiento genético de las familias en riesgos, donde la consanguinidad entre los matrimonios aumenta la probabilidad de que aparezcan más descendientes enfermos y efectuar el estudio molecular permite conocer el estado de homocigótico y heterocigótico, además de posibilitar la realización de un adecuado asesoramiento a los portadores sanos, que constituyan parejas de riesgo genético, con probabilidad de presentarse en su descendencia enfermos en el 25% de los casos.

## Conclusiones

La identificación de las mutaciones causantes de la enfermedad en estas familias permitió determinar familiares con riesgo genético, así como posibilitará trazar estrategias en próximos embarazos y brindará la posibilidad de efectuar estudios prenatales que permitan poner tratamiento en los casos positivos.

## Referencias Bibliográficas

1. Espinosa Reyes TM. Diagnóstico prenatal de la hiperplasia adrenal congénita, una realidad. Rev Cubana Endocrinol.2014 [citado 12 mar 2019]; 25(3):141-148. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-29532014000300002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532014000300002)
2. González EC, Carvajal F, Frómeta A, Arteaga LA, Castells EM, Espinosa T, *et al.* Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Cuba: Six years of experience. Clin Chim Acta.

2013 [citado 12 mar 2019]; 421:73–78. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898113000752>

3. Miller WL. Clinical review 54: Genetics, diagnosis and management of 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 1994[citado 12 mar 2019]; 78(2) 241-6. Disponible en: <https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/78/2/241/2655378?redirectedFrom=fulltext>

4. Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii Kuriyama Y. Complete sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: A pseudogene and a genuine gene. Proc Natl Acad Sci USA. 1986 [citado 12 mar 2019]; 83(9): 2841-2845. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC323402/>

5. Morikawa S, Nakamura A, Fujikura K, Fukushi M, Hotsubo T, Miyata J, *et al.* Results from 28 years of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Sapporo. Clin Pediatr Endocrinol. 2014 [citado 12 mar 2019]; 23(2):35-43. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4004996/>

6. Barrueta Ordóñez T, Collazo Mesa T, Lantigua Cruz P, González Navarro A, Espinosa Reyes T. Detección de la mutación I172N en pacientes cubanos con hiperplasia suprarrenal congénita por insuficiencia de 21 hidroxilasa. Rev Finlay. 2019 [citado 12 sep 2019]; 9(1). Disponible en: <http://revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/685>

7. Santana Hernández EE, Collazo Mesa T, Tamayo Chang VJ, Motes Velásquez M, Betancourt Loyola Y. Correlación fenotipo genotipo en pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita diagnosticados por tamizaje neonatal. Rev Cienc Méd. 2015[citado 12 mar 2019]; 19 (5). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-31942015000500008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942015000500008)

8. Flück CE, Pandey AV. Steroidogenesis of the testis - new genes and pathways. Ann Endocrinol. 2014 [citado 12 mar 2019]; 75(2):40-47. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003426614000213>

9. Kawano A, Kohno H, Miyako K. A Retrospective Analysis of the Growth Pattern in Patients with Salt-wasting 21-Hydroxylase Deficiency. Clin Pediatr Endocrinol. 2014 [citado 12 mar 2019]; 23(2):27-34. Disponible en: [https://www.istage.jst.go.jp/article/cpe/23/2/23\\_9975/article/-char/en](https://www.istage.jst.go.jp/article/cpe/23/2/23_9975/article/-char/en)
10. Juan L, Huamei M, Zhe S, Yanhong L, Hongshan C, Qiuli C, *et al.* Near-final height in 82 Chinese patients with congenital adrenal hyperplasia due to classic 21-hydroxylase deficiency: a single-center study from China. J Pediatr Endocrinol Metab. 2016[citado 12 may 2019]; 29(7):841-848. Disponible en: <https://www.degruyter.com/view/j/jpem.2016.29.issue-7/jpem-2015-0406/jpem-2015-0406.xml>
11. Pijnenburg Kleizen KJ, Thomas CMG, Otten BJ, Roeleveld N, Claahsen van der Grinten HL. Long-term follow-up of children with classic congenital adrenal hyperplasia: suggestions for age dependent treatment in childhood and puberty. J Pediatr Endocrinol Metab. 2019 [citado 30 oct 2019];32(10):1055-1063. Disponible en: <https://www.degruyter.com/view/j/jpem.2019.32.issue-10/jpem-2019-0006/jpem-2019-0006.xml?format=INT>
12. Arteaga E, Valenzuela F, Lagos CF, Lagos M, Martinez A, Baudrand R, *et al.* Detection of a novel severe mutation affecting the CYP21A2 gene in a Chilean male with salt wasting congenital adrenal hyperplasia. Endocrine. 2019 [citado 12 mar 2019]. Disponible en: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs12020-019-02097-3.pdf>
13. Zheng R, Hu Z, Yang J, Zhang Y, Wang Y, Yuan Q, *et al.* Analysis of CYP17A1 gene variants in 5 patients with 17-hydroxylase deficiency. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2019 [citado 12 mar 2019]; 36(9):877-881. Disponible en: <https://europepmc.org/abstract/med/31515780>
14. Concolino P, Costella A. Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) due to 21-Hydroxylase Deficiency: A Comprehensive Focus on 233 Pathogenic Variants of CYP21A2 Gene. Mol Diagn Ther. 2018 [citado 12 mar 2019]; 22(3):261-280. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40291-018-0319-y>

15. Doleschall M, Török D, Mészáros K, Luczay A, Halász Z, Németh K, *et al.* Steroid 21-hydroxylase deficiency, the most frequent cause of congenital adrenal hyperplasia. *Orv Hetil.* 2018 [citado 12 mar 2019]; 159(7):269-277. Disponible en: <https://akademai.com/doi/abs/10.1556/650.2018.30986>
16. Dulín Iñiguez E, Ezquieta Zubicaray B. Cribado neonatal de hiperplasia suprarrenal congénita. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2018 [citado 12 mar 2019];65(1):1-4. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S253001641730263X>
17. Alswailem MM, Alzahrani OS, Alhomaiah DS, Alasmari R, Qasem E, Murugan AK, *et al.* Mutational analysis of rare subtypes of congenital adrenal hyperplasia in a highly inbred population. *Mol Cell Endocrinol.* 2018 [citado 12 mar 2019]; 461:105-111. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0303720717304665>
18. Concolino P, Rizza R, Costella A, Carrozza C, Zuppi C, Capoluongo E. CYP21A2 intronic variants causing 21-hydroxylase deficiency. *Metabolism.* 2017 [citado 12 mar 2019]; 71:46-51. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026049517300835>
19. Zhang B, Lu L, Lu Z. Molecular diagnosis of Chinese patients with 21-hydroxylase deficiency and analysis of genotype-phenotype correlations. *J Int Med Res.* 2017 [citado 12 mar 2019]; 45(2):481-492. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5536680/>
20. Grubic Z, Maskalan M, Stingl Jankovic K, Zvecic S, Dumic Kubat K, Krnic N, *et al.* Association of HLA alleles and haplotypes with CYP21A2 gene p. V282L mutation in the Croatian population. *HLA.* 2016 [citado 12 mar 2019]; 88(5):239-244. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tan.12907>

21. Kolahehdouz M, Mohammadi Z, Kolahehdouz P, Tajamolian M, Khanahmad H. Pitfalls in molecular diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. Adv Biomed Res. 2015 [citado 12 mar 2019]; 4:189. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4617158/>