

## Identificación de la mutación I172N del gen *CYP21* en pacientes con hiperplasia adrenal congénita

Identification of the I172N mutation of gene *CYP21* in patients with congenital adrenal hyperplasia

Yadira Rosa Meunier Carmenate<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3651-8587>

Adrián de Jesús González Navarro<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0324-8709>

David Reyes Corso<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0642-3771>

Ixchel López Reyes<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3387-2668>

Teresa Collazo Mesa<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3984-9189>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones de la caña de azúcar. La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

\*Autor para la correspondencia: [yadira.meunier@inica.azcuba.cu](mailto:yadira.meunier@inica.azcuba.cu)

### RESUMEN

**Introducción:** La hiperplasia adrenal congénita abarca un conjunto de trastornos de herencia autosómica recesiva, causados por la deficiencia de alguna de las enzimas de la vía esteroideogénica suprarrenal. Más del 90 % de los casos se debe a un déficit de actividad 21-hidroxilasa por mutaciones en el gen *CYP21A2*. En el 75 % de los pacientes estas mutaciones son microconversiones procedentes de un pseudogen homólogo cercano. Una de las más frecuentes es la mutación I172N asociada a formas severas de enfermedad.

**Objetivo:** Detectar la mutación I172N en pacientes con hiperplasia adrenal congénita por déficit de 21 hidroxilasa y calcular su frecuencia alélica para determinar la pertinencia de su introducción en el esquema de estudio molecular de la enfermedad.

**Métodos:** Se procesaron 79 muestras de ADN, procedentes de pacientes no consanguíneos, con diagnóstico clínico de la enfermedad. La estrategia empleada consistió en la amplificación específica del *CYP21A2*, seguida de una PCR-ACRS anidada para la amplificación del *locus* I172N y posterior digestión enzimática.

**Resultados:** Se detectó la mutación I172N en 8 casos: 3 homocigóticos y 5 heterocigóticos. La frecuencia alélica fue de 0,0696. Cuatro de los pacientes con I172N resultaron heterocigóticos compuestos con otras mutaciones previamente estudiadas. Los resultados obtenidos mediante PCR-ACRS/digestión enzimática fueron verificados por secuenciación de ADN en tres casos, para los tres genotipos posibles.

**Conclusiones:** Se considera imprescindible incluir en el estudio molecular de pacientes con hiperplasia adrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa la detección de la mutación I172N, debido a la elevada frecuencia alélica obtenida.

**Palabras clave:** hiperplasia suprarrenal congénita; esteroide 21-Hidroxilasa; frecuencia alélica; mutación.

## ABSTRACT

**Introduction:** Congenital adrenal hyperplasia comprises a number of autosomal recessive inheritance disorders caused by deficiency in any of the enzymes of the suprarenal steroidogenic pathway. Over 90% of the cases are due to a deficit in 21-hydroxylase activity resulting from mutations in the CYP21A2 gene. In 75% of the patients these mutations are microconversions originating in a nearby homologous pseudogene. One of the most common is the I172N mutation associated to severe forms of the disease.

**Objective:** Detect the I172N mutation in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency and estimate its allele frequency so as to determine the relevance of its incorporation into the scheme of molecular study of the disease.

**Methods:** Analysis was conducted of 79 DNA samples from non-consanguineous patients with a clinical diagnosis of the disease. The strategy applied consisted in specific amplification of the CYP21A2 gene followed by nested PCR-ACRS for amplification of locus I172N and eventual enzyme digestion.

**Results:** I172N mutation was detected in 8 cases: 3 homozygous and 5 heterozygous. Allele frequency was 0.0696. Four of the patients with I172N were compound heterozygous with other previously studied mutations. The results obtained by PCR-ACRS / enzyme digestion were verified by DNA sequencing in three cases, for the three possible genotypes.

**Conclusions:** Based on the high allele frequency obtained, it is considered indispensable to incorporate detection of the I172N mutation into the molecular study of patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.

**Keywords:** congenital suprarenal hyperplasia; steroid 21-Hydroxylase; allele frequency; mutation.

Recibido: 25/02/2019

Aceptado: 17/03/2020

## Introducción

La hiperplasia adrenal congénita (HAC) abarca un conjunto de trastornos de herencia autosómica recesiva causados por la deficiencia de alguna de las enzimas de la vía esteroideogénica suprarrenal.<sup>(1,2)</sup> La prevalencia es de 1/14 000 y la incidencia anual varía de 1/5000 a 1/15 000 nacidos vivos.<sup>(3)</sup> En Cuba se ha estimado a través de la determinación de los niveles de 17-hidroxiprogesterona que su prevalencia es de 1/15245.<sup>(4)</sup>

Más del 90 % de los casos de HAC se debe a un déficit de actividad 21-hidroxilasa (HAC-21OHD).<sup>(5)</sup> Este trastorno presenta tres características clínicas fundamentales: insuficiencia suprarrenal, pérdida de sal e hiperandrogenia.<sup>(6)</sup>

Según la gravedad y el momento de aparición de las manifestaciones clínicas se distinguen tres grupos principales: formas clásicas-severas (déficit enzimático completo, pérdida de sal, virilización en el caso de las hembras e inicio en etapa fetal); formas clásicas-moderadas (déficit enzimático casi completo, virilización simple sin pérdida de sal e inicio fetal) y no clásicas-leves (déficit enzimático parcial, signos de hiperandrogenia e inicio tardío).<sup>(7)</sup> También se han reportado formas crípticas, con un déficit enzimático parcial y sin manifestaciones clínicas.<sup>(8)</sup>

La HAC-21OHD está causada por mutaciones en el gen *CYP21A2*, localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3). Este gen codifica al citocromo P450c21, responsable de la actividad 21-hidroxilasa suprarrenal. El *CYP21A2* tiene una longitud de ~3,4 Kb y consta de 10 exones y 9 intrones. Se encuentra cercano a un pseudogen llamado *CYP21A1P*, con el cual presenta un alto porcentaje de homología de secuencia.<sup>(9)</sup> Esto facilita la ocurrencia de eventos de entrecruzamiento desigual y microconversiones génicas entre ambos *loci*, que originan las mutaciones más frecuentes en el *CYP21A2* causantes de HAC-21OHD.<sup>(1)</sup>

El 75 % de los casos se debe a microconversiones del *CYP21A2*, en su mayoría mutaciones puntuales.<sup>(10)</sup> Una de las más frecuentes es I172N, la cual está asociada a las formas con virilización simple.<sup>(11,12)</sup> El estudio genético molecular de esta mutación es de importancia para el diagnóstico prenatal y el tratamiento intrauterino, que previene la virilización de los genitales en fetos femeninos. Además, contribuye a la identificación de varones virilizantes simples, que de otra forma se diagnosticarían tardíamente. La detección de I172N permitirá completar el diagnóstico molecular de un mayor número de pacientes, lo cual tendrá un impacto positivo sobre el asesoramiento genético en familias con miembros afectados. En este trabajo se describe la detección de la mutación I172N del gen

CYP21A2 como parte del esquema de estudio molecular de HAC-21OHD que se realiza en el Centro Nacional de Genética desde el año 2010.

## Métodos

Se estudiaron 79 muestras de ADN de pacientes cubanos no relacionados, con diagnóstico clínico de HAC-21OHD y estudio molecular previo de cuatro mutaciones (P30L, I2G, del 8pb y Q318X). De ellos, 23 presentaban alguna de estas mutaciones en heterocigosis, 4 presentaban más de 2 mutaciones y 52 no presentaban ninguna de las mutaciones estudiadas. Se incluyó además una muestra del padre de un paciente heterocigótico compuesto, con la finalidad de esclarecer la procedencia de las mutaciones encontradas. La extracción de ADN se realizó mediante la técnica de precipitación salina.<sup>(13)</sup> Las muestras procedieron de pacientes cuyo consentimiento informado fue obtenido previamente para el proyecto de investigación *Estudio Clínico-Molecular de Hiperplasia Adrenal Congénita por déficit de 21-hidroxilasa*, desarrollado en conjunto con el Instituto Nacional de Endocrinología.

La detección de la mutación I172N se realizó mediante la Amplificación con Creación de Sitio de Restricción por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR-ACRS) anidada y digestión enzimática.<sup>(14)</sup> Los cebadores empleados descritos por Oriola y otros<sup>(15)</sup> se muestran a continuación (Tabla 1).

**Tabla 1 - Cebadores empleados en el estudio**

Cebador	Secuencia (5'→3')	Orientación
P2	GCATCTCCACGATGTGA	Reverso
P3	TTGTCCTTGGGAGACTACTCC	Directo
P4	ACCTCTCGCACCCCAGTATGACT	Reverso
P11	TCTCTCTCCTCACCTGCAGCATCG	Directo

*Nota:* En el caso de P11, se muestra subrayado y en negrita el nucleótido que introduce el cambio A>G, que permite la creación del sitio de restricción para *TaqI* en presencia de la mutación I172N

En la primera amplificación las condiciones fueron: 200 ng de ADN genómico, 1 U de *Hot Start Taq Polimerasa* (QIAGEN), 0,4 μM de cada cebador (P3 y P4); dNTPs 0,3 mM, en un volumen de reacción de 25 μL. El programa de la PCR en el termociclador *MJ Research* fue: desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 min, seguida de 35 ciclos, 94 °C por 30 s, 61 °C por 30 s y 72 °C por 4 min, y extensión final a 72 °C por 5 min. En la segunda amplificación las condiciones de reacción fueron: dNTPs 0,2 mM; 0,32 μM de cebadores (P11 y P2); 1 U de *Hot Start Taq Polimerasa* (QIAGEN), 2 μL de dilución 1/200 de los productos amplificados, en un volumen de reacción de 25 μL. El programa

de la PCR fue: desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 min, seguida de 35 ciclos, 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 1 min y extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos amplificados de la primera y segunda PCR, con tallas de 2220 pb y 416 pb, fueron comprobados mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % y al 2 % respectivamente, con bromuro de etidio y visualizados por luz ultravioleta.

El producto de la segunda amplificación fue digerido con la enzima de restricción TaqI (Roche). La enzima TaqI en presencia de la mutación genera dos fragmentos, de 22 y 394 pb, mientras que en ausencia de la misma no se produce corte y se tiene el fragmento amplificado de 416 pb íntegro. Los productos de digestión se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 3 %, con bromuro de etidio, durante 50 min a 7,3 V/cm y visualizados por luz ultravioleta.

Se verificó por secuenciación de ADN el resultado obtenido para tres de las muestras procesadas, cada una de ellas con uno de los tres genotipos posibles. La reacción de Sanger se realizó en las siguientes condiciones: 8 µL de *DTCS Quick Start Master Mix* (Beckman Coulter), 0,16 µmol/L del cebador P2 y 5 µL de producto de PCR purificado (*QIAquick purification Kit* de QIAGEN,) en 20 µL de volumen final. Los ciclos térmicos desarrollados en termociclador *MJ Research* fueron: 30 ciclos de 96 °C por 20 s, 50 °C por 20 s y 60 °C por 4 min, respectivamente, seguidos de preservación a 4 °C. Los productos de Sanger purificados se corrieron en un sistema de electroforesis capilar (*GenomeLab GeXP Genetic Analysis System*, Beckman Coulter) según recomendaciones del fabricante. Los datos fueron adquiridos y procesados con el software del sistema. El análisis de las secuencias de ADN obtenidas se realizó con el software *DNA Baser v: 3.5.3*. La secuencia de referencia del gen *CYP21A2* se obtuvo del NCBI (NG\_007941.3). Para el cálculo de la frecuencia alélica de I172N se tuvieron en cuenta los resultados de los 79 pacientes no relacionados, según la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia alélica} = \frac{\text{Número de cromosomas mutados}}{\text{Número total de cromosomas}} \times 100$$

Donde:

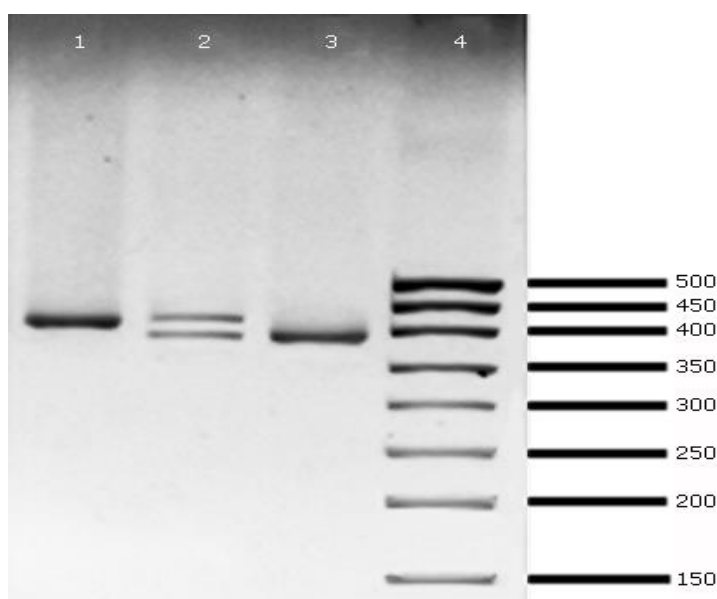
*Número cromosomas mutados*

*= Número de heterocigotos + 2 × Número de homocigotos*

*Número total de cromosomas = 2 × Total de casos estudiados*

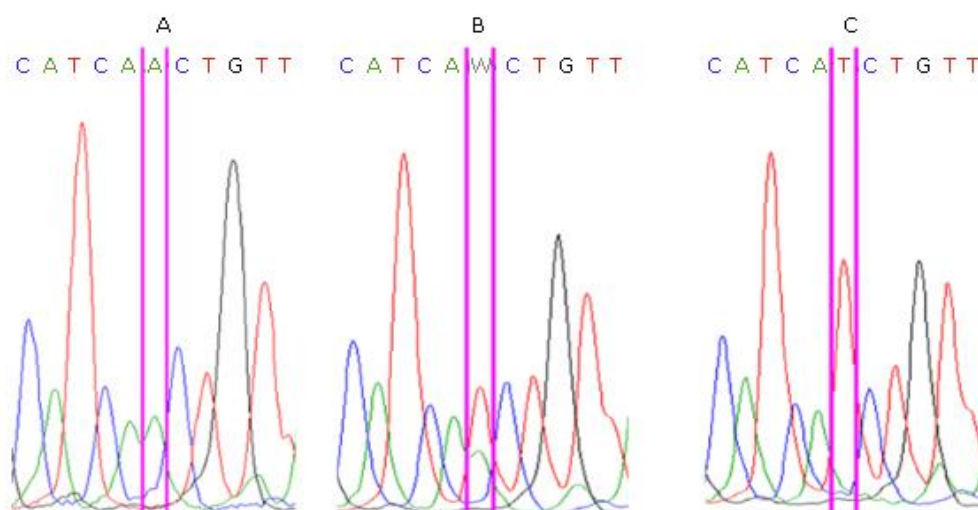
## Resultados

Se obtuvieron los perfiles electroforéticos esperados para los distintos genotipos posibles. En la figura 1 se muestra el resultado de una electroforesis de tres de las muestras estudiadas.



**Fig. 1** - Electroforesis en gel de agarosa (3 %) de productos de digestión con *TaqI*. Carril 1: individuo homocigótico para el alelo normal. Carril 2: individuo heterocigótico. Carril 3: individuo homocigótico para la mutación I172N. Carril 4: Patrón de peso molecular (50 pb DNA Ladder, Invitrogen). El fragmento de 22 pb originado en el alelo mutado no se observa debido a su pequeño tamaño.

Los resultados obtenidos por secuenciación de ADN permitieron confirmar los genotipos hallados mediante PCR-ACRS/digestión enzimática para las tres muestras seleccionadas (Fig. 2).



**Fig. 2** - Electroferogramas obtenidos de la secuenciación de ADN de tres muestras. Se señalan los picos correspondientes al sitio de la mutación I172N. A - Paciente homocigótico para I172N. B - Paciente heterocigótico para I172N. La letra W en la secuencia indica ambigüedad entre T y A. C - Paciente homocigótico para el alelo normal.

En los electroferogramas obtenidos mediante la secuenciación de ADN se pudo visualizar en el caso del paciente homocigótico para I172N, el cambio T>A correspondiente a la mutación I172N (Fig. 2A). En el paciente heterocigótico, se observó una asignación de W (ambigüedad entre A y T) en la posición correspondiente al cambio T>A y la presencia de dos picos superpuestos, uno de T y otro de A, con una intensidad de señal relativa similar (Fig. 2B). Este resultado es esperado para cambios de simple nucleótido en heterocigosis, donde se observa una superposición de señales como la descrita. En este caso, un alelo aportaría la T (alelo normal) y el otro aportaría la A (alelo mutado). En la muestra del paciente homocigótico, para el alelo normal se observó solamente la presencia del pico de T esperado en la posición en que se verificaría el cambio T>A en un alelo mutado. Esto indica la ausencia de la mutación I172N (Fig. 2C).

Del total de casos analizados se detectó la mutación I172N en 8 individuos. De ellos 3 resultaron homocigóticos, 5 heterocigóticos y 71 casos restantes no presentaron la mutación, para una frecuencia alélica en el conjunto de pacientes estudiados de 0,0696 (6,96 %). Cuatro de los casos positivos para I172N presentaron además otras mutaciones en heterocigosis: dos Q318X, uno I2G y el restante una combinación de P30L/I2G/del8pb (Tabla 2).

**Tabla 2** - Genotipo de las muestras positivas para la mutación I172N que presentaron otras mutaciones previamente estudiadas

Muestras	Mutaciones	
	(P30L, del8 pb, I2G, Q318X)	I172N
M1	+/- (Q318X)	+/-
M25	+/- (I2G)	+/-
M40	+/- (P30L), +/- (I2G), +/- (del8pb)	+/+
M59	+/- (Q318X)	+/-

Heterocigóticos: +/-; homocigóticos: +/+

## Discusión

La mutación I172N es una de las microconversiones más frecuentes del gen *CYP21A2*. Consiste en un cambio T>A en el exón 4 que modifica un codón ATC (correspondiente al aminoácido no polar isoleucina) a AAC (correspondiente al aminoácido polar asparagina).<sup>(16)</sup> La actividad 21-hidroxilasa residual del citocromo mutado es de un 2-11 % respecto a la actividad salvaje.<sup>(17)</sup> El residuo Ile172 está evolutivamente conservado y se plantea que su sustitución por asparagina (Asn) puede estar relacionada con una desestabilización de la unión del citocromo P450c21 a la membrana del retículo endoplasmático liso. Esta mutación es la de aparición más frecuente en pacientes con virilización simple.<sup>(11)</sup>

Los reportes de estudios de diferentes regiones ubican a I172N como una de las mutaciones más frecuentes en pacientes con HAC21-OHD. En algunas poblaciones I172N se encuentra en tercer lugar después de I2G y de la delección de 30 kb del *CYP21A2* (u otros grandes reordenamientos del *RCCX* en conjunto). En otras poblaciones se encuentra en segundo lugar luego de alguna de las dos mutaciones mencionadas.<sup>(12)</sup> La frecuencia obtenida en el presente estudio es similar a la encontrada en regiones como Argentina (5,5 %)<sup>(12)</sup> y Reino Unido (7 %).<sup>(15)</sup> En otras poblaciones se reportan frecuencias mayores o menores, como en Brasil (14 %) y España (4,16 %).<sup>(12)</sup>

### Recombinación y conversión génica entre gen y pseudogen

Hasta la fecha se han reportado más de 200 variantes alélicas del *CYP21A2*.<sup>(10)</sup> Alrededor del 95 % de los alelos con mutaciones causantes de HAC-21OHD se originan por mecanismos de recombinación meiótica asimétrica y conversión génica.<sup>(1)</sup>

La conversión génica es el mecanismo por el cual se realiza una copia no recíproca de una porción de secuencia de un cromosoma a su homólogo,



principalmente durante la mitosis.<sup>(18,19)</sup> Puede abarcar varios cientos de pares de bases (macroconversión) o tan solo unos pocos pares de bases (microconversión).<sup>(19)</sup> La alta homología entre los *loci* *CYP21A2* y *CYP21A1P* favorece la ocurrencia de este tipo de eventos, de modo que entre el 70-75 % de los casos de HAC-21OHD se debe a mutaciones, en su mayoría puntuales, transferidas desde el pseudogen al gen por microconversión.<sup>(10)</sup>

En el caso del paciente M1 que resultó heterocigótico para I172N y para Q318X, fue posible realizar un análisis parcial de segregación mediante el estudio del padre (muestra que se incluyó solo para esclarecer la procedencia de la mutación pero no para el cálculo de frecuencia). Del estudio anterior de este paciente, se conocía que era negativo para Q318X y además resultó negativo para I172N. Esto sugiere que el individuo M1 probablemente es portador de un alelo con I172N y Q318X en *cis*, heredado por vía materna (muestra no disponible). En la literatura existen variantes alélicas similares como la que informó New y otros.<sup>(20)</sup> Se ha reportado una variante denominada *CYP21A2\*20L* que incluye, además de I172N y Q318X, otras mutaciones no estudiadas en el presente trabajo: Clúster Ex6, V281L, F306ΔL307insT y R356W.<sup>(21)</sup> Otra variante alélica se encontró en un estudio de HAC con fetos en Vietnam.<sup>(22)</sup> Esa variante procedía de un feto heterocigótico con cinco mutaciones (I172N; Clúster Ex6; V281L; F306ΔL307insT; R356W) en un alelo. Las mutaciones que se encontraron en él, con la excepción de Q318X, coinciden en su mayoría con las presentes en *CYP21A2\*20L*. Esta variante no se encuentra informada en la base de datos CYPAlleles, pero es un ejemplo de la existencia de I172N en conjunto con las restantes mutaciones presentes en el alelo, producto de un gran reordenamiento génico. En el caso del paciente M1 las mutaciones identificadas pudieran estar o no acompañadas de mutaciones adicionales, cuya detección requeriría un estudio más extenso por secuenciación de ADN. Aunque otros mecanismos han sido descritos como disomía uniparental y mutaciones de *novo*.<sup>(23)</sup>

Para el resto de los casos no fue posible contar con muestras de los progenitores para el análisis de segregación. En consecuencia, los pacientes M25 (heterocigótico para I2G e I172N) y M59 (heterocigótico para I172N y Q318X) podrían presentar ambas mutaciones en el mismo o en distintos alelos. En la literatura existen reportes de heterocigóticos compuestos que presentan la mutación I172N en combinación con I2G o con Q318X, tanto en *cis* como en *trans*.<sup>(21,24)</sup> En el caso de las mutaciones I2G e I172N se conoce una variante alélica definida por la presencia exclusiva de ambas (*CYP21A2\*20N*).<sup>(25)</sup>

En el caso del individuo M40 (homocigótico para I172N y heterocigótico para P30L, I2G y del8p), podría presentar un alelo con I172N y el otro con una combinación de P30L/I2G/del8p/I172N. *Al-Obaidi* y otros, en un estudio de 62 pacientes iraquíes con HAC, reportaron dos casos con una conversión génica de gran longitud que incluía estas cuatro mutaciones.<sup>(26)</sup> No obstante, para comprobar la presencia de un alelo con características similares en el caso del paciente M40, sería necesario el análisis de segregación mediante el estudio de los progenitores y el empleo de técnicas como *Southern blotting* o MLPA (Amplificación Múltiple de Sondas dependiente de Ligamiento, del Inglés *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), utilizadas para la detección de grandes reordenamientos en el *RCCX*.<sup>(27)</sup>

### Conclusiones

Se pudo detectar la mutación I172N en pacientes con HAC-21OHD, tanto aislada como combinada con otras mutaciones previamente conocidas. La frecuencia alélica obtenida para esta mutación fue elevada, por lo que constituye una de las mutaciones más frecuentes. Por estos motivos es recomendable su pesquijaje en los restantes pacientes con HAC-21OHD no incluidos en este estudio.

### Referencias bibliográficas

1. Falhammar H, Wedell A, Nordenstro A. Biochemical and genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. *Endocr.* 2015;50:306-14.
2. Concolino P, Costella A. Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency: a comprehensive focus on 233 pathogenic variants of CYP21A2 gene *Mol Diag Ther.* 2018;(22):261-80.
3. The portal for rare diseases and orphan drugs (Orphanet) [Internet]. Última fecha de actualización: 18-10-2012. [acceso 12/09/2019]. Disponible en: <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin>
4. Coto R, Varona J, Borrego J, Formoso LE. Resultados de la pesquisa de hiperplasia adrenal congénita en recién nacidos. *Rev Cubana Endocrinol.* 2011;37(2):136-46.
5. Burdea L, Mendez MD. 21 Hydroxylase Deficiency. In *StatPearls*. U.S. StatPearls Publishing; 2019 Feb;11(1):41-5.
6. Witchel SF. Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2017;30(5):520-34.
7. Simonetti L, Bruque CD, Fernández CS, Benavides-Mori B, Delea M, Kolomenski JE, *et al.* CYP21A2 mutation update: comprehensive analysis of databases and published genetic variants. *Hum Mutat.* 2018;39(1):5-22.

8. Santos-Silva R, Cardoso R, Lopes L, Fonseca M, Espada F, Sampaio L, *et al.* CYP21A2 Gene Pathogenic Variants: A Multicenter Study on Genotype-Phenotype Correlation from a Portuguese Pediatric Cohort. *Horm Res Paediatr.* 2019;91(1):33-45.
9. Falhammar H, Wedell A, Nordenstrom A. Biochemical and genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine.* 2015 Nov;50(2):306-14.
10. Choi JH, Kim GH, Yoo HW. Recent advances in biochemical and molecular analysis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2016;21:1-6.
11. Fonseca D, Gutiérrez A, Silva C, Coll M, Malo G, Orjuela C, *et al.* Identificación de mutaciones puntuales del gen de la 21-hidroxilasa en pacientes afectados con hiperplasia suprarrenal congénita. *Biomed (Bogotá).* 2005;25(2):220-30.
12. Baş F, Kayserili H, Darendeliler F, Uyguner O, Günöz H, Apak MY *et al.* CYP21A2 Gene Mutations in Congenital Adrenal Hyperplasia: Genotype-phenotype correlation in Turkish children. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2009;1(3):116-28.
13. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
14. Plensa MI. La hiperplasia suprarrenal congénita por defecto en la enzima 21-hidroxilasa: caracterización por el sistema HLA y aportación de la biología molecular. Universitat de Barcelona, España: Facultat de Biologia, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular; 2003.
15. Oriola J, Plensa I, Machuca I, Pavia C, Rivera-Fillat F. Rapid screening method for detecting mutations in the 21-hydroxylase gene. *Clin Chem.* 1997;43:557-61.
16. Chiou SH, Hu MC y Chung BC. A missence mutation at Ile-172-Asn or Arg-356- Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biol Chem.* 1990;265:3549-52.
17. Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:1059-65.
18. Tusie-Luna MT y White PC. Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:10796-800.
19. Chen JM, Cooper DN, Chuzhanova N, Férec C y Patrinos GP. Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease. *Nat Rev Genet.* 2007;8(10):762-75.

20. New MI, Abraham M, Gonzalez B, Domic M, Razzaghy-Azar M, Chitayat D, *et al.* Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America.* 2013;110:2611-6.
21. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database. CYP21A2 allele nomenclature. Última fecha de actualización: 21-03-2011. [acceso 08/04/2017]. Disponible en: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp21.htm>
22. Mai Thi Phuong Nguyen y Mai Nguyen. Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Ann Transl Med.* 2017;5(Suppl 2):AB044.
23. New MI, Lekarev O, Mancenido D, Parsa A, Yuen T. Genetic Steroid Disorders: Chapter 3A. Congenital Adrenal Hyperplasia Owing to 21-Hydroxylase Deficiency. Netherlands: Elsevier Inc. Chapters; 2014.
24. Khajuria R, Walia R, Bhansali A. Data on the 21-Hydroxylase deficient CAH patients and the identification of known/novel mutations in CYP21A2 gene. *Data in Brief.* 2017;10:406-12.
25. Finkelstein GP, Chen W, Mehta SP, Fujimura FK, Hanna RM, Van Ryzin C, *et al.* Comprehensive Genetic Analysis of 182 Unrelated Families with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(1):161-72.
26. Al-Obaidi RG, Al-Musawi BM, Al-Zubaidi MA, Oberkanins C, Németh S, Al-Obaidi YG. Molecular Analysis of CYP21A2 Gene Mutations among Iraqi Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia. *Enzyme Res.* 2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/9040616>
27. Dubey S, Tardy V, Chowdhury MR, *et al.* Prenatal diagnosis of steroid 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia: Experience from a tertiary care centre in India. *Indian J Med Res.* 2017;145(2):194-202. DOI: [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_329\\_16](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_329_16)

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

### Contribución de los autores

*Yadira Rosa Meunier Carmenate*: Trabajo de campo, revisión bibliográfica, procesamiento estadístico y redacción del documento.

*Adrián de Jesús González Navarro*: Trabajo de campo, procesamiento estadístico y redacción del documento.

*David Reyes Corso*: Trabajo de campo.

*Ixchel López Reyes*: Revisión, corrección y aprobación final del manuscrito.

*Teresa Collazo Mesa*: Revisión, corrección y aprobación final del manuscrito.

**Institución que auspicia la investigación**

Centro Nacional de Genética Médica. Ave. 31 Esq.146 No 3102, Rpto. Cubanacán.

CP. 11400, Playa, La Habana, Cuba.