

Aportaciones del genotipado de *CYP21A2* al cribado neonatal de la hiperplasia suprarrenal congénita

Contributions of *CYP21A2* genotyping to neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia

Begoña Ezquieta Zubicaray

Laboratorio de Diagnóstico Molecular. Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital Materno Infantil Gregorio Marañón. Madrid

Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. Madrid

Resumen

El análisis genético es una herramienta de confirmación diagnóstica para las enfermedades monogénicas en las que existe una fuerte correlación genotipo/fenotipo. Esta técnica podrá, además, descartar la enfermedad siempre que garantice un alto rendimiento diagnóstico y esté libre de datos de interpretación incierta. Aunque las enfermedades detectadas en el cribado neonatal son primordialmente de base genética, el cribado no incluyó inicialmente metodología de base molecular. Fue la inclusión de la fibrosis quística la que llevó a introducirla, ya que resultaba imprescindible reducir falsos positivos. En la actualidad, el cribado neonatal incluye enfermedades cuyo primer nivel se apoya en el abordaje molecular (inmunodeficiencia congénita grave y atrofia muscular espinal). La hiperplasia suprarrenal congénita, causada en el 95% de los casos por las alteraciones del gen *CYP21A2*, fue incluida en el cribado neonatal antes de que se conociera su base molecular. Sin embargo, la contribución del genotipado de *CYP21A2* experto ha sido clave no sólo en la confirmación, sino también en la clasificación de formas clínicas, imprescindible en esta etapa en la que son crípticas las formas virilizantes simples (VS) de los varones y pueden detectarse formas leves no

clásicas (NC) que no requieren entonces intervención clínica. La aportación del genotipado ha sido clave para descartar los falsos positivos de los inmunoanálisis directos de esteroides que son consecuencia de las interferencias analíticas, ahora bien conocidas y evitables empleando separación cromatográfica/masas. El genotipado de *CYP21A2* seguirá siendo una herramienta diagnóstica valiosa poscribado, dada su independencia de la fisiología suprarrenal (estrés o prematuridad), esencial para detectar las formas VS de varones y aportar el asesoramiento familiar oportuno en cada caso.

Abstract

Genetic analysis may be a useful tool for confirming a monogenic disease with a strong genotype/phenotype relationship. Molecular analysis can also rule out the disease if the interpretation of results is free of variants of uncertain significance, and provided a high diagnostic yield is guaranteed. Neonatal screening did not initially include molecular-based methodology, despite genetic diseases being involved. The inclusion of cystic fibrosis led to its introduction, since it was essential to reduce false positives. Neonatal screening currently includes diseases with a first level supported by molecular approaches (severe congenital immunodeficiency, spinal muscular atrophy). Congenital adrenal hyperplasia, caused by alterations in the *CYP21A2* gene in 95% of cases, was included in neonatal screening before its molecular basis was known. However, the contribution of expert *CYP21A2* genotyping has been crucial for both the confirmation

Correspondencia:

Begoña Ezquieta Zubicaray
Hospital G.U. Gregorio Marañón. Hospital Infantil. Laboratorio de Diagnóstico Molecular. C/ Maiquez 9, planta 1. 28009 Madrid
begona.ezquieta@salud.madrid.org
bezqzubi@gmail.com

and classification of clinical forms, which is needed at this stage, in which simply virilizing forms in boys are cryptic and mild non-classical forms may be detected but do not require clinical intervention. Genotyping has made a valuable contribution to ruling out false positives derived from analytical interferences of direct immunoassays, which are avoidable today using chromatography/mass spectrometry. Nevertheless, *CYP21A2* genotyping will continue to be useful as a post-screening diagnostic tool, given its independence from adrenal physiology (stress, prematurity), and essential in detecting SV forms in males and providing appropriate family counselling in each case.

Introducción

Cuando se incorporó la hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) al cribado neonatal, no se conocía bien su base molecular. Las alteraciones del gen *CYP21A2*—causantes de la deficiencia de esteroide 21-hidroxilasa (HSC-21OHD), causa mayoritaria de la HSC, 95%— se describieron a partir de 1990⁽¹⁾, y se puso de manifiesto que un conjunto de alteraciones permitía caracterizar los alelos deficientes con buena relación genotipo/clínica, lo que pudimos verificar también en nuestra población⁽²⁾.

Frente a la determinación de 17-OH-progesterona (17-OH-P), marcador metabólico de la HSC-21OHD, que en el período neonatal se ve afectada por inmadurez suprarrenal, situaciones de estrés, etc., el genotipo se reconoce como dato analítico que resulta de ayuda en el manejo de los pacientes con HSC⁽³⁾, también en el contexto de la sospecha originada por positivos del cribado neonatal⁽⁴⁻¹¹⁾. Aunque el marcador determinado en el cribado es la 17-OH-P, se han detectado de forma aislada también otros déficits, que afectan a enzimas situadas en la vía metabólica por encima de este metabolito (al menos ocho casos descritos, el más reciente en 2016)⁽¹²⁾. Esta capacidad es ventajosa, porque facilita la detección de otras formas mucho más infrecuentes de HSC, pero no podemos perder de vista que ello está poniendo de manifiesto la existencia de interferencias analíticas, ya que la 17-OH-P no es el esteroide intermediario que se acumula en estos casos. Los falsos positivos en los inmunoanálisis directos son un hecho reconocido en las muestras neonatales⁽¹²⁻¹⁵⁾.

En la Comunidad de Madrid, en la que este cribado se viene realizando de forma continuada desde 1991, se ha llevado a cabo un genotipado de *CYP21A2* sistemático a partir de 2000 en todas las muestras de pacientes positivos y *border-line* que pasaban a la unidad de seguimiento^(16,17).

El *locus CYP21A2* incluye un pseudogén en el que preexisten la mayoría de las mutaciones causales, y hay reordenamientos complejos en los alelos normales y mutados. Un análisis dirigido a las alteraciones frecuentes de *CYP21A2* validadas clínicamente aporta la ventaja de evitar la incertidumbre (polimorfismos y variantes raras de interpretación incierta) y facilita descartar la enfermedad. Debe garantizarse la cobertura requerida, especialmente para mutaciones graves y una correcta caracterización de los alelos⁽¹⁸⁻²⁴⁾.

El genotipado como herramienta para descartar/confirmar la enfermedad detectada en el cribado neonatal ha sido reconocido por diversos autores y así fue recogido en la guía de 2010⁽²³⁾. Posteriormente, en la guía de 2018⁽¹⁵⁾ se llamó la atención sobre la inespecificidad de los inmunoanálisis directos de esteroides, acentuando la necesidad de utilizar cromatografía (gases o líquida) acoplada a tándem-masas en su determinación, y se rebajó el interés de los estudios genotípicos, llamando la atención sobre la posibilidad de errores debido a la complejidad del *locus* y la existencia del pseudogén. Probablemente, la rápida incorporación de los estudios masivos al contexto asistencial pudo afectar al diagnóstico molecular de genes que no se prestan a este tipo de abordajes, porque requieren una amplificación gen-específica y estudio de dosis génica, como es el caso de *CYP21A2*. Posteriormente, en la guía de 2021⁽²⁴⁾ se vuelve a recoger el hecho de que el genotipado puede ser útil como herramienta de confirmación, siempre manejado desde la experiencia⁽⁴⁻¹¹⁾.

Se presenta a continuación un resumen de los resultados obtenidos en los estudios moleculares de confirmación poscribado para documentar o, en su caso, descartar los casos detectados en el cribado neonatal de HSC, y detallamos el abordaje molecular que lo ha permitido. La complejidad del *locus* y de algunas de sus alteraciones, también variantes normales, hace imprescindible un abordaje molecular en que la especificidad y la eficiencia de la amplificación del gen *CYP21A2* estén bien controladas, se aborde el estudio de los distintos tipos de alteraciones frecuentes, puntuales y deleciones, y se complete el estudio con la oportuna caracterización complementaria garantizando una interpretación experta de los resultados obtenidos⁽²²⁾.

Materiales y métodos

Se han analizado molecularmente 298 muestras de pacientes que habían sido positivos confirmados del cribado neonatal de HSC procedentes de distintas comunidades autónomas del ámbito nacional, aunque primordialmente provinieron de la Comunidad de Madrid ($n = 252$). Se trata de casos que habían pasado a la unidad de seguimiento clí-

nico, desde la que se nos solicitó el estudio de *CYP21A2*. Eran casos no relacionados, con excepción de 11 parejas de hermanos y una familia con tres casos. El análisis molecular realizado se describe en Ezquieta et al^(19,22). Se extrajo el ADN de las muestras de sangre periférica anticoagulada con ácido etilenodiaminotetracético. El gen *CYP21A2* se amplifica en tres fragmentos solapantes específicos del gen, y las alteraciones recurrentes se detectan mediante hibridación específica de alelo y Southern (hasta 2008) o amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples para la detección de deleciones, grandes conversiones y duplicaciones génicas. El análisis se complementa con el análisis de los microsatélites D6S273 y D6S439 para detectar posibles homocigotos para alteraciones raras^(22,26), en los que se procedía a la secuenciación complementaria, al igual que en los casos en los que el cribado básico había detectado un único alelo alterado. En los casos en que se detectaron alteraciones de ambos alelos se realizó la segregación en los progenitores, y sólo en 10 casos no se dispuso de muestras para este estudio.

La sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos, positivo y negativo, fueron establecidos a partir de los resultados obtenidos en 620 muestras neonatales, de las cuales 255 fueron negativas en el análisis de *CYP21A2*: en 136 sólo la elevación de 17-OH-P había motivado la sospecha ($n = 110$, provenientes del cribado neonatal), y en 119 la clínica de clitoromegalia o hiperpigmentación e hipoglucemia, junto con la elevación de 17-OH-P, habían sido la causa de la solicitud del estudio molecular. Estos resultados se presentaron en comunicación oral en el Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición de 2015⁽²⁵⁾ y se recogen en la [Tabla 1](#) (véase 'Resultados'). Recogemos brevemente en este resumen los resultados en 78 de estos casos (57 varones y 21 niñas) del cribado neonatal de la Comunidad de Madrid⁽¹⁷⁾ genotipados en nuestro laboratorio que fueron seguidos en la sección de endocrinología pediátrica del Hospital Gregorio Marañón, cuyos resultados se recogieron en la publicación mencionada ([Figura 1](#)).

Resultados

En la [Tabla 1](#) se aportan los datos de especificidad, sensibilidad y valores predictivos positivo y negativo obtenidos en la aplicación del estudio molecular realizado en 620 muestras (incluyendo sospechas neonatales clínicas y poscribado neonatal). La [Tabla 2](#) y la [Figura 2](#) forman parte del material suplementario recogido en el editorial dedicado al cribado neonatal de HSC⁽¹⁶⁾. La [Tabla 2](#) recoge los puntos claves del genotipado de *CYP21A2* que nos ha permitido detectar/descartar/clasificar correctamente los pacientes cuyo dato del cribado neonatal

[Tabla 1](#). Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del genotipado de *CYP21A2* en sospechas neonatales. En este contexto neonatal, el genotipado de *CYP21A2* se considera 'positivo' si detecta al menos una alteración grave. Se consideran 'negativos' los estudios que no detectan alteraciones o detectan variantes leves o variantes no asociadas con deficiencia, una vez realizados los estudios complementarios requeridos (véanse [Tabla 2](#) y [Figura 2](#)). Casos analizados: 620 sospechas neonatales de hiperplasia suprarrenal congénita, incluyendo sospechas clínicas y positivos del cribado neonatal que habían pasado a la correspondiente unidad clínica de seguimiento (Comunicación oral del Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición, Madrid, 2015)⁽²⁵⁾.

Estudio ^a	Afectos	No afectados	
Positivos^b	366	15^c	381
Negativos	1^d	238	239
	367	253	620
Sensibilidad	0,997	Especificidad	0,941
VPP	0,961	VPN	0,996

VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo. ^a Cribado básico: alteraciones puntuales (incluyendo c.332_339del, p.Arg426His, c.292+5G>A) + MLPA + DupGln319X + microsatélites; ^b Uno o dos alelos graves de *CYP21A2* caracterizados; ^c Una alteración grave detectada. La secuencia de *CYP21A2* descarta otras alteraciones patógenas; ^d Paciente heterocigoto compuesto para alteraciones raras.

había desencadenado la sospecha de HSC. En la [Figura 2](#) se muestra el esquema del estudio mediante el que se descartan o, en su caso, detectan las alteraciones, y se documentan y clasifican los genotipos de *CYP21A2*.

El cribado básico tiene un alto valor predictivo negativo (99,6%), ya que sólo pacientes heterocigotos compuestos en que ambos alelos fueran raros no se detectarían. La frecuencia de este evento en la serie conjunta de pacientes con formas graves caracterizados molecularmente en nuestro laboratorio desde 1995 ha sido de 1/468. Es algo menos infrecuente (5/468) el caso de pacientes homocigotos, generalmente por consanguinidad no conocida para alteración rara (no incluida en el cribado básico), y el estudio de microsatélites^(22,26) permite evitar estos potenciales falsos negativos. El valor predictivo positivo es algo menor (96,1%), dado que los portadores de alteración grave (un alelo mutado) serán inicialmente positivos y en ellos hay que plantear de forma inmediata la secuenciación complementaria de *CYP21A2*. Queremos señalar que, de detectarse alguna alteración, ésta debe interpretarse

Tabla 2. Características que debe cumplir una enfermedad para que el análisis molecular de un solo gen pueda ser utilizado no sólo para la confirmación diagnóstica, sino también como herramienta para descartar la enfermedad. (Tabla adaptada de Dulin y Ezquieta 2018⁽¹⁶⁾, material suplementario).

Características		Observaciones
1	Enfermedad monogénica con alta correlación genotipo/fenotipo probada en series amplias de pacientes	Sólo en este caso el análisis de un solo gen puede ser informativo. Podrían analizarse varios genes si la enfermedad puede estar causada por uno u otro gen (base molecular heterogénea), aunque siempre predefinidos y causantes cada uno de ellos de forma aislada. Sólo si el número de variantes inciertas es ínfimo, este análisis podría descartar la enfermedad
2	Base molecular bien conocida: alteraciones validadas clínicamente con amplio poder de caracterización	En el caso de entidades recesivas, una cobertura del 80% garantizaría la caracterización de, al menos, un alelo en el 96% (sólo en el 4% de los casos afectados no se caracterizaría ningún alelo). Siempre que no existiera consanguinidad. Debe incluirse una técnica que detecte los homocigotos para variantes raras (véase 11)
3	Disponibilidad de un abordaje molecular rápido y coste-efectivo que detecte estas alteraciones sin introducir incertidumbre	Análisis dirigido a las alteraciones validadas clínicamente en series de pacientes de distintas poblaciones ('mutaciones frecuentes') con cobertura >80%
De forma específica para CYP21A2 debe garantizarse		Observaciones (véase Fig. 2)
4	Experiencia en el análisis e interpretación de los resultados del análisis de CYP21A2, ya que se trata de un locus complejo (pseudogén duplicado en tándem)	Los alelos mutados e incluso los normales pueden ser complejos. Un análisis incompleto o inexperto puede dar lugar a falsos positivos y negativos ⁽¹⁹⁻²²⁾ (véanse 6 a 9)
5	Discriminar alteraciones graves y leves, estas últimas muy frecuentes	Sólo las alteraciones graves (en ambos alelos) dan lugar a la forma clásica de HSC
6	Detectar no sólo las alteraciones puntuales, sino también las deleciones, conversiones y duplicaciones génicas (funcional)	La detección de deleciones requiere el análisis de dosis génica (importante controlar la calidad y la cantidad de ADN para la técnica de MLPA)
7	Detectar >80% de los alelos causantes de todas formas clásicas o neonatales, no sólo pierde sal, sino también virilizantes simples (véase Fig. 2)	En nuestra población, incluir la alteración c.1280G>A (p.Arg427His) en el estudio básico ⁽¹⁹⁾ . Véanse también los estudios complementarios en 9.
8	Detectar también alteraciones intrónicas	La mutación puntual más frecuente es intrónica, c.293-13C>G ¹ . Una variante intrónica modifica la gravedad de los frecuentes alelos leves p.Val282Leu ⁽²⁰⁾
9	Estudio complementario de las alteraciones puntuales cuyas variantes pueden dar lugar a alelos de mayor o menor gravedad (véase Fig. 2)	p.Pro31Leu o p.Val282Leu pueden ser alelos graves si incluyen alteración adicional ⁽²⁰⁾ ; p.Gln319X en alelos con duplicación génica no es un alelo deficiente ⁽²¹⁾
10	En caso de aplicar la secuenciación del gen como técnica de análisis primario, garantizar una correcta discriminación de polimorfismos, no sólo los frecuentes, sino también variantes polimórficas raras	Gen muy polimórfico, no está todavía disponible la interpretación/validación clínica de todas ellas. Algunas variantes publicadas como causales se han considerado polimorfismos <i>a posteriori</i>
11	Detectar si podría existir homocigosis por consanguinidad; en ese caso no sólo analizar alteraciones frecuentes, sino secuenciar	Necesario para cualquier entidad recesiva en que se utiliza genotipado como segundo nivel. Los polimorfismos de tipo microsatélite de la región HLA son muy informativos ⁽²⁶⁾
12	Si se han detectado dos mutaciones, segregar en progenitores	Si las alteraciones detectadas segregan en el mismo alelo, pero se mantiene la sospecha clínica de forma clásica de HSC, pasar a secuenciar el gen
13	Si sólo se ha detectado un alelo, pero es de tipo grave, hacer secuenciación de CYP21A2 en caso de que se mantenga la 17-OH-P elevada y/o haya clínica de HSC	La positividad para un solo alelo puede corresponder con una situación de portador ⁽²⁷⁾
14	Si el estudio de CYP21A2 ha resultado negativo, pero hay clínica grave de HSC, analizar otros genes: CYP11B1, 3βHSDH y POR	Útil disponer de las determinaciones de los metabolitos marcadores de otros déficits

17-OH-P: 17-OH-progesterona; HSC: hiperplasia suprarrenal congénita; MPLA: amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples.

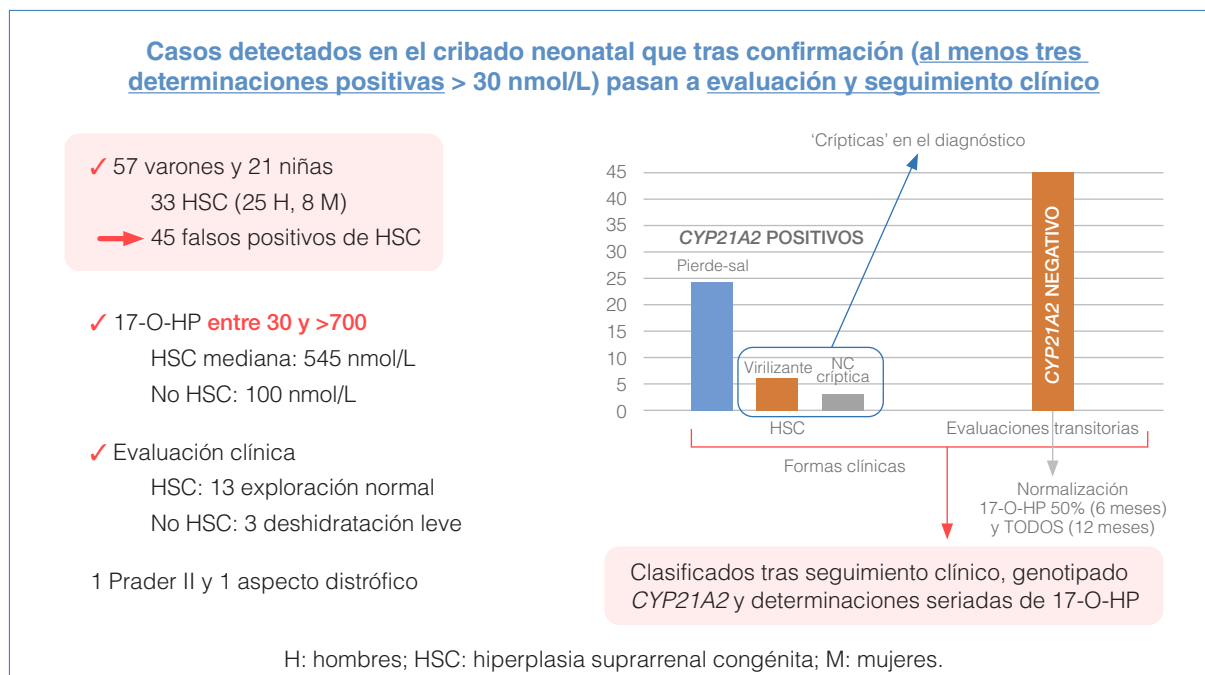


Figura 1. Distribución de 78 casos seguidos durante 12 meses detectados en el cribado neonatal de hiperplasia suprarrenal congénita de la Comunidad de Madrid en los que se realizó el análisis de *CYP21A2* solicitado desde la unidad de seguimiento clínico (Figura adaptada de Huidobro *et al*, 2011)⁽¹⁷⁾.

se cuidadosamente, ya que no es infrecuente que puedan detectarse variantes raras que tan sólo son polimorfismos⁽²⁷⁾.

Los resultados obtenidos en los 298 estudios pos-cribado neonatal fueron los siguientes: 196 muestras fueron negativas para el cribado molecular de *CYP21A2* básico (alteraciones puntuales recurrentes e híbridos de delección con punto de ruptura intragénico seguido de dosis génica para delecciones y grandes conversiones no amplificables, y detección de duplicaciones del gen como estudio complementario), que fue negativo o sólo documentó una alteración leve ($n = 8$) o un alelo con duplicación génica que incluía p.Gln319* ($n = 9$). El estudio complementario de microsatélites no detectó homocigosis en ninguna de las muestras que eran negativas, y se descartó que pudiera existir una variante grave rara en homocigosis por consanguinidad^(22,26). Se detectaron cinco portadores de alteración grave y en cuatro de ellos el estudio complementario de secuenciación no detectó una segunda alteración, por lo que se descartó también la enfermedad. En uno de los casos se detectó una variante incierta cuya segregación familiar sugería que no tenía impacto fenotípico⁽²⁷⁾, y el seguimiento clínico posterior demostró que esta interpretación era correcta.

El cribado básico de *CYP21A2* fue positivo en 96 de los casos (dos alteraciones segregadas), 70 formas clásicas (18 de ellas formas VS) y 26 formas no clási-

cas. Aunque estas últimas no son objeto del cribado neonatal, ya que no implican la necesidad de atención clínica en ese momento, es importante discriminarlas correctamente. A diferencia de las formas NC, que no requerirán ningún tipo de atención clínica neonatal y en las que no es de esperar una evolución clínica rápida, las VS, aunque no presentarán clínica neonatal en los varones, sí requerirán seguimiento inmediato y, en caso de que se plantee un nuevo embarazo, asesoramiento familiar. De cualquier manera, en las formas no clásicas detectadas que sean heterocigotas compuestas con un alelo grave, deberá aportarse el asesoramiento familiar.

La evolución clínica de 78 de estos pacientes durante 12 meses por la unidad de seguimiento del cribado neonatal de HSC de la Comunidad de Madrid del Hospital Gregorio Marañón se recogió en la publicación de 2011 de Huidobro *et al*⁽¹⁷⁾. Cuarenta y tres casos en los que finalmente se descartó la enfermedad, se etiquetaron como 'elevaciones transitorias de 17-OH-P' en esta publicación y habían resultado negativos en el genotipado de *CYP21A2*. La normalización de las determinaciones de 17-OH-P no se alcanzó hasta los seis meses en un 50%, y en el resto, al año. De los 33 casos en que *CYP21A2* había sido positivo, 24 fueron pacientes con forma clásica, mientras que nueve eran también casos con HSC, aunque 'crípticos' en la etapa neonatal (casos virilizantes en varones y formas no clásicas en ambos sexos); los genotipos habían clasificado correctamente a estos pacientes (Figura 1).

Cribado básico de CYP21A2	Negativo para alteraciones frecuentes ^a	Positivo para alteración/es LEVE/S	Positivo para <u>una o varias</u> alteraciones GRAVE/S		
	Sólo puntuales* el 85% (*incluyendo c.332-339del e híbridos delec/conv con punto de ruptura entre ex3 y ex6 ²²) Con MLPA, 95%				
Imprescindibles para completar estudios NEGATIVOS Y POSITIVOS para algunas LEVES y GRAVES	Descartar consanguinidad	Análisis complementario:	Análisis complementario:	Descarta ^b HSC21OHD	
	Microsatélites ⁽²⁶⁾ HETEROCIGOTO		Gln319* en alelo Dup Gen es VARIANTE NORMAL ⁽²¹⁾		
	Si microsatélites HOM, secuenciar CYP21A2, ¡OJO!, posible homocigoto con alteración rara	c.92C>T (p.Pro31Leu) ¿tiene conversión 5'?	[Conv Prom 5'; c.92C>T (p.Pro31Leu)] es GRAVE		
		c.844G>T (p.Val282Leu) ¿presenta c.292+5G>A?	[c.292+5G>A;p.Val282Leu] es GRAVE ⁽²⁰⁾		
Estudios complementarios	NEGATIVO Descarta ^b HSC	NEGATIVO Descarta ^b HSC clásica	POSITIVO Confirma HSC si:		
		SEGREGAR EN PROGENITORES			
Para completar genotipado y/o asesoramiento		LEVE/LEVE o LEVE/ GRAVE	DOS ALELOS GRAVES	DOS ALELOS GRAVES	
		HSC NO CLÁSICA ^c	UN ALELO GRAVE CYP21A2 +Secuenciación^d de CYP21A2 positiva (alteración grave)		HSC CLÁSICA (pierde sal o virilizante simple^e)
			Secuenciación ^d de CYP21A2 NEGATIVA o variante/s no patogénica/s	UN ALELO GRAVE^f PORTADOR⁽²⁶⁾ (Asesoramiento)	HSC-21OHD NEGATIVO
			Si NEGATIVO, pero hay clínica grave: secuenciar otros genes . Determinar otros esteroides marcadores	DOS ALELOS GRAVES CYP11B1 o 3βHSDH o POR	HSC CLÁSICA (otros déficits)

^a Alteraciones puntuales frecuentes de CYP21A2 que se deben descartar en nuestra población: c.92C>T (p.Pro31Leu), **c.293-13C>G**, **c.332-339del**, **c.518T>A** (p.Ile173Asn), **c.[710T>A;713T>A;719T>A]** (p.[Ile237Asn; Val-238Glu; Met240Lys]), c.844G>T (p.Val282Leu), **c.923dupT** (p.Leu308PhefsX6), **c.955C>T** (p.Gln319*), **c.1069C>T** (p.Arg357Trp), **c.1280G>A** (p.Arg427His) y c.1360C>T (p.Pro454Ser)⁽²²⁾ (en negrita, alteraciones graves). La nomenclatura empleada se refiere a la RefSeq NM_000500.9; ^b El término 'descarta' se refiere a que reduce probabilidad por debajo del 5% (véase texto); ^c La forma no clásica es leve y no es objeto del cribado su detección neonatal, aunque en ocasiones puede detectarse en el cribado. No requiere intervención clínica y sólo se plantearía un seguimiento y, en caso de alteración grave en un alelo, el asesoramiento genético familiar; ^d Imprescindible discriminar polimorfismos y variantes raras sin evidencia clínica de implicación patológica; ^e En varones si uno de los alelos es p.Ile173Asn o p. Arg427His⁽¹⁹⁾ y en algunos homocigotos para la mutación puntual más frecuente c.293-13C>G² puede tratarse de una HSC virilizante clásica (que, en varones, será 'críptica' en el período neonatal); ^f Si sólo se detecta un alelo grave, se tratará de un portador no afecto de la forma clásica de la deficiencia^(22,26).

Figura 2. Protocolo de genotipado de CYP21A2. Se especifica el cribado básico de las alteraciones frecuentes que ayuda a descartar la HSC-21OHD en estudios solicitados desde la unidad clínica de seguimiento poscribado neonatal a la que son remitidos los pacientes con resultado positivo o *border-line* confirmado. Encuadrados en fondo azul están los que quedan descartados y, en rojo, los positivos, incluyendo los análisis complementarios requeridos para la correcta discriminación de alelos graves y leves, que permite la clasificación de las formas clínica clásica (texto rojo) y no clásica (texto azul) (Figura adaptada de Dulin y Ezquieta 2018⁽¹⁶⁾, material suplementario).

Hemos tenido ocasión de poner de manifiesto otros casos positivos del cribado de varones sin clínica neonatal con formas clásicas VS y también formas no clásicas heterocigotas compuestas con alteración grave. En la **Figura 3** se recoge el pedigrí familiar de uno de estos casos (del cribado de Castilla y León, presentado en el Congreso de la Sociedad Española de Medicina de Laboratorio de 2022)⁽²⁶⁾. El caso índice es un neonato de 19 días con cribado positivo para HSC –17OHP de 13,5 nmol/L a las 48 horas y 140,6 nmol/L a los 12 días (valor de referencia: <11,7 nmol/L) en la prueba del talón-. En el control analítico destacaba una 17-OH-P sérica de 65,25ng/mL (valor de referencia: 0,42-2,91 ng/mL), clínicamente asintomático. En el genotipado de *CYP21A2* detectamos las variantes c.955C>T (p.Gln19*) y c.92C>T (p.Pro31Leu) en heterocigosis compuesta. Ambas variantes requieren estudios complementarios para clasificarlas correctamente.

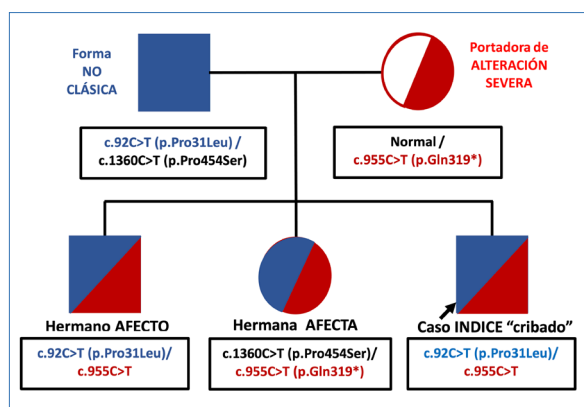


Figura 3. Pedigrí obtenido tras estudio urgente de *CYP21A2* en el caso índice (secuenciación completa) y segregación familiar de las alteraciones detectadas, completado con el cribado básico de alteraciones recurrentes en toda la familia. Caso índice: neonato de 19 días con cribado positivo para hiperplasia suprarrenal congénita –17-OH-progesterona de 13,5 nmol/L a las 48 horas y 140,6 nmol/L a los 12 días (valor de referencia: <11,7 nmol/L) en la prueba del talón-. En el control analítico destacó una 17-OH-progesterona sérica de 65,25 ng/mL (valor de referencia: 0,42-2,91 ng/mL), clínicamente asintomático. El genotipado de *CYP21A2* mediante secuenciación directa detectó las variantes c.955C>T (p.Gln19*) y c.92C>T (p.Pro31Leu) en heterocigosis compuesta. El estudio complementario para detectar/descartar el resto de las alteraciones frecuentes en los alelos no heredados por el caso índice detectó en el padre una segunda alteración puntual de comportamiento leve c.1360C>T (p.Pro454Ser) que había sido heredada por su hija pequeña, y, por lo tanto, ambos presentaban genotipo de forma no clásica, heterocigotos compuestos, el padre con ambos alelos leves y la hija con alelo leve y grave.

Para la variante c.955C>T (p.Gln19*), alteración puntual grave, se descartó el patrón molecular p.Gln19* con duplicación génica^(21,22) que se encuentra en población general y no asocia la deficiencia, y se trata, por tanto, del alelo grave (relacionado con un 0% de actividad enzimática *in vitro*). Para la variante c.92C>T (p.Pro31Leu), variante puntual leve, se descartó la conversión en 5' que incrementaría la gravedad de este alelo⁽²²⁾, y se consideró el alelo leve (un 20-50% de actividad enzimática). La segregación de las alteraciones se estableció en el estudio de progenitores (**Figura 3**). La heterocigosis compuesta de alteraciones leve y grave se asocia con la forma no clásica de HSC. Concomitantemente a la detección del caso índice en el cribado, el hermano de 4 años había presentado pubarquia precoz y aceleración de la edad ósea, con 17-OH-P sérica de 59 ng/mL (valor de referencia: 0,14-1,41 ng/mL). El genotipado de *CYP21A2* reveló que presentaba las alteraciones detectadas en el caso índice y era, por tanto, también una forma no clásica de HSC, heterocigota compuesta con alteración grave. Revisando su cribado neonatal (17-OH-P de 15 nmol/mL), se repitió en tres ocasiones, sin ascenso en sucesivos controles, por lo que se consideró normal.

El padre presentó en el cribado básico complementario de las alteraciones recurrentes una segunda alteración puntual leve, c.1360C>T (p.Pro454Ser) en su segundo alelo (no heredado por el caso índice), por lo que sería una forma no clásica; en este caso, ambas alteraciones eran leves. La hermana más pequeña, una niña sana cuyo cribado neonatal fue normal, presentaba a los dos años una 17-OH-P sérica ligeramente elevada de 3,2 ng/mL (valor de referencia: 0,14-1,41 ng/mL). El análisis molecular reveló que presentaba la alteración grave de la madre c.955C>T (p.Gln19*) y la alteración leve del segundo alelo paterno c.1360C>T (p.Pro454Ser); era, por tanto, también heterocigota compuesta. En la actualidad, aunque ninguno de ellos presenta insuficiencia suprarrenal y se trata de formas no clásicas, su expresividad ha sido más manifiesta con la edad y los tres hermanos se encuentran en seguimiento con el endocrinopediatra.

Discusión

Se considera que, en una enfermedad recesiva, el genotipo permitirá descartar la enfermedad en >95% de los casos siempre que el estudio molecular aplicado detecte no menos del 80% de las alteraciones causales en esa población. Ello se debe a que, de no detectarse la alteración, al ser dos los alelos que hay que caracterizar, se multiplican las probabilidades de no detectarlo (20% × 20%), y la probabilidad conjunta de no detectarlo es del 4% y, por tanto, menores del 5% los falsos negativos del

genotipado. No debe olvidarse que se detectarán portadores que, no siendo afectados, serán positivos para este planteamiento, y se requerirá un análisis secundario del gen completo. Éste fue el planteamiento seguido en la implementación del cribado de la fibrosis quística. En comparación con el genotipado CFTR incluido en el propio cribado neonatal de la fibrosis quística, *CYP21A2* tiene la ventaja de que la batería limitada de alteraciones frecuentes (puntuales y deleciones) que se aplica garantiza una cobertura superior (>90%), por lo que la probabilidad de falso negativo genotípico es todavía menor (<1%) y, además, es algo menor la frecuencia de portadores en la población general. *CYP21A2* tiene en contra la complejidad del *locus* que se debe analizar, una mala adaptabilidad a las técnicas de alto rendimiento y la necesidad de contar con experiencia en este *locus* concreto^(4-11,15,16,19-22). Existe un segundo factor, que no siempre se contempla, que también tiene importancia como falso negativo genotípico, que es el caso de los individuos homocigotos para una alteración rara, que escapan a este cálculo y que pueden ser detectados si se aplica un análisis de polimorfismos informativos de tipo microsatélite^(22,26), que reduce todavía más la probabilidad de que el cribado básico de *CYP21A2* no detecte a los pacientes afectados. Al detectar individuos homocigotos que podrían presentar una misma alteración rara en ambos alelos, se procede a su secuenciación complementaria.

Dirigir el estudio exclusivamente a las alteraciones recurrentes no sólo facilita el abordaje que se debe aplicar en estudios por series cuyo coste puede ajustarse al máximo, sino que también permite evitar la detección de variantes inciertas, que en su gran mayoría corresponden a polimorfismos inocuos o variantes funcionales muy leves sin trascendencia clínica y que no requieren ningún tipo de intervención clínica. En contextos asistenciales en que no se ha desarrollado la enfermedad (como es el cribado neonatal), estas variantes resultan especialmente 'engorrosas', porque generan una incertidumbre adicional.

En el conjunto de estudios de *CYP21A2* poscribado neonatal realizados desde 2000, hemos podido descartar la enfermedad en el 68% de los casos que habían sido positivos confirmados del cribado y en cuyo seguimiento por parte de las unidades clínicas se mantenían valores elevados de 17-OH-P y se solicitó su análisis molecular. Por otro lado, hemos podido confirmar y clasificar la HSC en el resto de los casos cuyo estudio se nos solicitó. La utilidad del análisis de *CYP21A2* en nuestra población se documentó⁽¹⁷⁾ en el seguimiento de 78 casos positivos del cribado neonatal de HSC de la Comunidad de Madrid.

El genotipo de *CYP21A2* es notablemente informativo para la HSC y puede utilizarse en los casos positivos del cribado neonatal (con o sin clínica) para descartar, confirmar y clasificar la enfermedad; sin embargo, es imprescindible disponer de un análisis y una interpretación expertos, dadas las especiales características del *locus*. El genotipado de *CYP21A2* ha permitido, aun en ausencia de un segundo nivel bioquímico adecuado (cromatografía-masas), unos resultados informativos que han permitido evitar la ansiedad de las familias y clasificar clínicamente a los pacientes garantizando una atención inmediata o un seguimiento acorde (formas graves frente a formas leves). Se han podido descartar tempranamente los casos no afectados (en que todavía se mantenía la elevación de la 17-OH-P) y discriminar las formas que no son objeto del cribado, pero que en ocasiones se detectan y que no requieren atención neonatal, como las no clásicas. Por otro lado, en los casos con formas graves, aunque estuvieran ya perfectamente definidos, el dato genotípico de *CYP21A2* abre la posibilidad del asesoramiento familiar si existen alteraciones graves; y, lo que es más importante todavía, en las formas VS de los varones (crípticas todavía en esta etapa neonatal) permite su diagnóstico y así garantiza un seguimiento adecuado, ya que una rápida evolución clínica puede dificultar una intervención adecuada⁽¹¹⁾.

Considerando que en la actualidad la HSC se encuentra ya en la cartera básica del Sistema Nacional de Salud, debería ofrecerse el genotipado experto de *CYP21A2* a todas las unidades de cribado que puedan requerirlo (para clasificar la forma clínica y en positivos sin clínica neonatal las formas VS en varones y NC en ambos sexos). *CYP21A2* es un *locus* complejo que requiere experiencia (no se dispone de equipamiento/*kit* comercial específicos, a diferencia de otras enfermedades detectadas en el cribado). El genotipo de *CYP21A2* seguirá requiriéndose para confirmar/descartar la enfermedad cuando la elevación de la 17-OH-P sea real, pero derivada de una situación de estrés o inmadurez suprarrenal por prematuridad.

Bibliografía

1. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev.* 2000;21:245-91.
2. Ezquieta B, Oliver A, Gracia R, Gancedo PG. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Hum Genet.* 1995;96:198-204.
3. Forest M. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum*

- Reprod Update . 2004 Nov-Dec; 10(6):469-85. doi: 10.1093/humupd/dmh047. Review
4. Nordenström A, Thilén A, Hagenfeldt L, Larsson A, Wedell A. Genotyping is a valuable diagnostic complement to neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:1505-9.
 5. Fitness J, Dixit N, Webster D, 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(3):960-966.
 6. Therrell BL. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North.* 2001;30:15-30.
 7. Kösel S, Burggraf S, Fingerhut R, Dörr HG, Roscher AA, Olgemöller B. Rapid second-tier molecular genetic analysis for congenital adrenal hyperplasia attributable to steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Chem.* 2005;51(2):298-304.
 8. Németh S, Riedl S, Kriegshäuser G, et al. Reverse-hybridization assay for rapid detection of common CYP21A2 mutations in dried blood spots from newborns with elevated 17-OH progesterone. *Clin Chim Acta.* 2012;414:211-214.
 9. Silveira EL, Elnecave RH, dos Santos EP, et al. Molecular analysis of CYP21A2 can optimize the follow-up of positive results in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Clin Genet.* 2009;76(6):503-510.
 10. Marino S, Perez Garrido N, Ramírez P, et al. Molecular analysis of the CYP21A2 gene in dried blood spot samples. *Medicina (B Aires).* 2020;80(3):197-202.
 11. Nordenstrom A and Falhammar H Congenital adrenal hyperplasia in the Nordic countries-aa potential base for long-term outcome studies. *Lacet Reg Health* 2023; 28: 100616.
 12. Levy-Shraga Y, Pinhas-Hamiel O. High 17-hydroxyprogesterone level in newborn screening test for congenital adrenal hyperplasia. *BMJ Case Rep.* 2016, published online Feb 24 2016.
 13. 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.
 14. Honour JW. 17-Hydroxyprogesterone in children, adolescents and adults. *Ann Clin Biochem.* 2014;51:424-40.
 15. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, Meyer-Bahlburg HFL, Miller WL, Murad MH, Oberfield SE, White PC. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018 Nov 1;103(11):4043-4088.
 16. Dulín E and Ezquieta B. Cribado neonatal de hiperplasia suprarrenal congénita. *Endocrinol Diabetes Nutr.* 2018;65(1):1-4. Editorial
 17. Huidobro Fernández B, Echeverría Fernández M, Dulin Iniguez ~ E, Ezquieta Zubicaray B, Roldán Martín MB, Rodríguez Arnao MD, et al. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia: Transitory elevation of 17-hydroxyprogesterone. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2011;24:155-62.
 18. Kolahdouz M, Mohammadi Z, Kolahdouz P, Tajamolian M, Khanahmad H. Pitfalls in molecular diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *Adv Biomed Res.* 2015;4:189-98.
 19. Santomé Collazo JL, Cirujano Segura A, Ferreira Fernández B, Casado Fúnez C, Muñoz-Pacheco ~ R, Ezquieta Zubicaray B. [Simple virilizing forms of congenital adrenal hyperplasia: adaptation and prospective validation of the molecular screening]. *Med Clin (Barc).* 2010;135:195-201.
 20. Ezquieta B, Santomé L, Barrio R, Barrionuevo JL, López-Siguero JP, Oliver A, et al. Carrier detection and prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia must identify 'apparently mild' CYP21A2 alleles which associate neonatal salt-wasting disease. *Prenat Diagn.* 2010;30:758-63.
 21. Ezquieta B, Beneyto M, Muñoz-Pacheco ~ R, Barrio R, Oyarzabal M, Lechuga JL, et al. Gene duplications in 21-hydroxylase deficiency: The importance of accurate molecular diagnosis in carrier detection and prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2006;26:1172-8.
 22. Arriba M and Ezquieta B. Molecular Diagnosis of Steroid 21-Hydroxylase deficiency: A Practical Approach. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022 Mar 29;13:834549. Review.
 23. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, et al. Congenital adrenal

- hyperplasia due to steroid 21- hydroxylase deficiency: An Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:4133-60.
24. Claahsen-van der Grinten HL, Speiser PW, Ahmed SF, Arlt W, Auchus RJ, Falhammar H, Flück CE, Guasti L, Huebner A, Kortmann BBM, Krone N, Merke DP, Miller WL, Nordenström A, Reisch N, Sandberg DE, Stikkelbroeck NMML, Touraine P, Utari A, Wudy SA, White PC. Congenital Adrenal Hyperplasia. Current Insights in Pathophysiology, Diagnostics, and Management. *Endocr Rev.* 2022 Feb; 43(1): 91-159.
25. Ezquieta B, Suárez J, Casado C, García D. Aportaciones del genotipado CYP21A2 al diagnóstico de la HSC-21OH deficiencia: sospechas neonatales forma clásica y definición del dintel diagnóstico de 17OHprogesterona en la forma no clásica. 57 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición 2015. Madrid. Comunicación Oral. Libro de Abstract.
26. Ezquieta B, Oyarzábal M, Jariago CM, Varela JM, Chueca M. A novel frameshift mutation in the first exon of the 21-OH gene found in homozygosity in an apparently nonconsanguineous family. *Horm Res.* 1999;51:135-41.
27. Soriano Guillén L, Velázquez de Cuellar Paracchi M, Ezquieta B. [Usefulness of molecular analysis in the differential diagnosis of congenital 21-hydroxylase deficiency detected in neonatal screening]. *Med Clin (Barc).* 2011;136: 313-4.
28. Guillén J, Bravo A, Martínez-Figueras L, Arriba M, Quiroga R, Ezquieta B. Genotipado CYP21A2 como herramienta de confirmación y clasificación. Distintas presentaciones clínicas en una familia con sospecha de hiperplasia suprarrenal congénita. XVI Congreso del Laboratorio Clínico 2022. Libro de comunicaciones 88-89. https://www.labclin2022.es/images/site/Lab_Clin2022.pdf (acceso 12 enero 2024)