

## **5. DISCUSIÓN**



A partir de la primera referencia bibliográfica en el año 1865<sup>175</sup> documentando un caso de hiperplasia suprarrenal congénita, hasta nuestros días, la casuística de este síndrome no sólo ha ido aumentando de forma vertiginosa, sino que además los avances en el campo de la genética molecular han ayudado a una mejor comprensión de esta compleja enfermedad de origen genético.

Tal como se ha mencionado en la Introducción, la evidente existencia en la actualidad de: una elevada mortalidad de varones recién nacidos con “pérdida salina” no diagnosticados, o diagnosticados tardíamente; un pseudohermafroditismo femenino, que, además de los problemas sociales y psicológicos, obliga a repetidas intervenciones quirúrgicas; y de otras complicaciones, como aceleración de la maduración esquelética con talla corta definitiva, desarrollo precoz de caracteres sexuales secundarios en varones y mayor virilización en niñas, son motivos suficientemente importantes para continuar hoy en día profundizando en la caracterización de esta patología, para facilitar, no solo su diagnóstico, sino también su tratamiento precoz.

Por lo que respecta al análisis hormonal realizado, en este estudio, no se observaron falsos positivos ni falsos negativos en los valores de 17-OHP post estimulación, obtenidos con el test de ACTH practicado, por lo que se puede afirmar que dicho test se confirma, en las edades consideradas, como una herramienta fiable en el diagnóstico clínico inicial de esta patología.

En las formas clásicas del déficit en 21-hidroxilasa (SW y SV), se observa un aumento de las concentraciones séricas basales de 17-OHP tan acusado, que se convierten por sí mismas en diagnósticas. En cambio, en las formas no clásicas, las tasas basales de 17-OHP son muy variables, es decir, más o menos elevadas, o incluso normales, de ahí que sea obligado practicar un test de estimulación corto con ACTH para que el diagnóstico se efectúe, ya que en dichas formas, los valores post estimulación de 17-OHP se sitúan siempre por encima de la normalidad, tal como otros estudios han enunciado<sup>65, 129</sup>.

Por otra parte, tanto en los progenitores como en los hermanos clínicamente no afectados de los pacientes estudio, no se observaron diferencias en los valores de 17-OHP fuera cual fuese el grupo clínico al que pertenecen sus hijos o hermanos afectados, a diferencia de lo que cabría esperar, ya que unos son portadores de mutaciones severas, mientras que los otros son portadores de mutaciones leves, que dan lugar a una pérdida de la actividad enzimática de la 21-hidroxilasa más o menos acusada. Esta discrepancia

descrita también por otros autores<sup>176</sup> puede ser debida quizás, a la existencia de otros factores o genes todavía no identificados que podrían estar implicados en la determinación de dicha actividad enzimática.

Cuando el análisis hormonal, en los pacientes con formas NC y en los progenitores, se realiza teniendo en cuenta además, si la lesión génica se presenta en uno (heterocigotos) o en ambos cromosomas (homocigotos), independientemente del tipo de lesión presente, se constata que los valores de 17-OHP basales y post estímulo hallados en los individuos homocigotos son muy superiores a los que presentaron los individuos heterocigotos, debido a la menor actividad de la 21-hidroxilasa en los primeros.

Teniendo en cuenta que, se entiende por formas crípticas aquellas en las que la única manifestación fenotípica es la de una elevada respuesta de 17-OHP después de la estimulación con ACTH<sup>66</sup>, el análisis de los valores de 17-OHP basales y post estímulo realizado a los 40 hermanos clínicamente no afectados de los pacientes, ha permitido diagnosticar 26 formas crípticas de esta deficiencia que han sido confirmadas mediante el estudio directo del gen de la 21-hidroxilasa, mientras que, los 14 restantes no presentaban alteración alguna, eran pues, individuos *sanos*. Esta situación confirma también, la utilidad del estímulo con ACTH.

Los patrones de respuesta normal de la 17-OHP a la estimulación con ACTH a los 30 ó 60 minutos han sido establecidos por numerosos autores, aunque los más utilizados constituyen el llamado Nomograma de M. I. New<sup>177</sup> en el que existe una relación lineal entre las concentraciones basales y las obtenidas a los 60 minutos de la prueba. Dicho Nomograma, proporciona estándares hormonales, que permiten asignar al paciente al grupo clínico al que pertenece, de ahí el interés en elaborar un Nomograma de referencia de la población estudiada que facilite el diagnóstico de las distintas formas de presentación clínica del déficit.

En el Nomograma de 17-OHP obtenido en este estudio, las parejas de resultados hormonales, se distribuyen en grupos fácilmente diferenciables en una recta de regresión, lo que constata que en estos grupos hay un espectro de déficit enzimático marcado. Resaltar, que en la parte inferior de este, encontramos representados dentro de un mismo rango de valores, cuatro de los grupos de individuos estudiados, que son: las formas crípticas; los progenitores *homocigotos*; los pacientes *heterocigotos* para la forma NC y los progenitores *heterocigotos*, no siendo posible establecer áreas características de cada uno de ellos, por lo que para realizar un correcto diagnóstico,

será necesario una valoración global de estos valores, junto con los datos clínicos obtenidos y el análisis genético molecular del gen 21-hidroxilasa.

Del mismo modo que el Nomograma citado de la Dra. New<sup>177</sup>, el Nomograma obtenido, proporciona un patrón hormonal que permite asignar la forma clínica del déficit en 21-hidroxilasa al paciente en estudio, pudiendo ser utilizado como Nomograma de referencia de esta población.

A la vista de los resultados del análisis hormonal realizado en nuestra población estudio, se puede afirmar que la determinación de las tasas de 17-OHP en condiciones basales o tras estimulación con ACTH, es de gran utilidad en el diagnóstico clínico del déficit en 21-hidroxilasa siempre y cuando se sea muy estricto en las condiciones de la extracción, ya que dichas tasas son muy variables en función de la hora, del estrés en el momento de la toma de sangre o incluso de la fase del ciclo menstrual, por lo que deberá efectuarse a las ocho horas de la mañana y en fase folicular precoz en la mujer. Ahora bien, este test hormonal no es totalmente sensible para identificar los portadores *heterocigotos*, cuando la 17-OHP es utilizada como único marcador.

Se han descrito un gran número de desequilibrios de asociación entre las distintas formas clínicas del déficit en 21-hidroxilasa y ciertos antígenos HLA o haplotipos<sup>67, 178</sup>, observándose que estas asociaciones son muy variables y dependen del grupo étnico analizado<sup>71</sup>.

En la población estudiada, el antígeno A33 se encuentra incrementado en todos los grupos de individuos analizados excepto en los hermanos *sanos*, lo que parece indicar que este antígeno esté asociado a la HSC por déficit en 21-hidroxilasa, aunque no sea un marcador característico de una determinada forma clínica del déficit.

La más significativa asociación descrita para las formas clásicas en diferentes etnias estudiadas, ha sido con el antígeno HLA-Bw47, donde el riesgo relativo para la población caucasiana es de 15,4<sup>178, 179</sup>.

Al mismo tiempo, la revisión de los haplotipos Bw47 positivos en estos pacientes, reveló que este antígeno se encuentra frecuentemente asociado a otros antígenos de clase I y II, dando lugar al haplotipo HLA-A3,Cw6,Bw47,DR7, característicamente observado en la población noreuropea. Según ciertos autores<sup>178, 180</sup>, este haplotipo está asociado con un 10% de las formas perdedoras de sal.

Sin embargo, en este estudio, es importante destacar que este antígeno HLA-Bw47 no se ha presentado en ninguno de los dos grupos de pacientes considerados

(formas clásicas y no clásicas), y consecuentemente el haplotipo anteriormente citado, tampoco, hecho que coincide con otros autores<sup>181</sup>. De ahí, que se considere abierta una nueva línea de investigación futura en estos pacientes con “pérdida salina” no portadores de dicho haplotipo, mediante la secuenciación directa del gen 21-hidroxilasa y genes próximos a este, que aporte mayor información acerca de la exacta función de los genes 21-hidroxilasa (gen funcional y pseudogen), y que ayude a terminar de explicar la variabilidad en la expresión clínica de esta patología.

Ahora bien, en nuestra población, sí que se confirma el desequilibrio de asociación entre HLA-B5(w51) y la forma clásica del déficit, en concreto con la forma virilizante simple, tal y como algunos autores describen en determinados grupos étnicos<sup>182, 178</sup>, convirtiéndose en un buen marcador asociado a dicha forma clínica.

Por lo que se refiere a las formas no clásicas, se detecta el antígeno HLA-B14(64;65) con una frecuencia significativamente incrementada, donde el riesgo relativo para esta población catalana es de 47,8, aumento también observado, tanto en los progenitores como en las formas crípticas, a diferencia del grupo formado por los hermanos *sanos* (ninguno de ellos presentó este antígeno), lo que confirma que dicho antígeno está estrechamente asociado con esta forma del déficit, tal y como ha sido descrito en otras series estudiadas<sup>86, 183</sup>.

Dentro de los antígenos de clase II presentes en nuestra población, el antígeno DR1 se encuentra significativamente aumentado en los pacientes con formas no clásicas, al igual que en los progenitores y formas crípticas, con el consiguiente aumento en estos grupos del antígeno DQw1 debido al desequilibrio de asociación descrito entre ellos.

Por su parte, en las formas clásicas de nuestra población de estudio, ha sido el antígeno DR4 el que se detecta incrementado juntamente con DQw3, debido al desequilibrio de asociación existente entre ellos. Dicho aumento de DR4, no se observa en el grupo de progenitores, cabe resaltar la ausencia total de este antígeno, tanto en las formas crípticas como en los hermanos *sanos*, pudiéndose considerar como antígeno asociado a formas clásicas del déficit en nuestra población. Ahora bien, como está referenciado desde hace años, el antígeno DR4 está fuertemente asociado a otras patologías, como es la Diabetes Mellitus tipo 1<sup>184</sup>, lo que hace pensar, que este hecho pueda dar lugar a confusiones a la hora de ser utilizado para el diagnóstico de la HSC por déficit en 21-hidroxilasa, por lo que es conveniente continuar el estudio para confirmar este resultado.

No se halló ningún haplotipo HLA en particular asociado a las formas clásicas, a diferencia de lo observado en otras series y comentado anteriormente en este capítulo. Sin embargo, el haplotipo asociado en particular a las formas no clásicas del déficit en esta población ha sido HLA-B14-DR1, que se detectó en el 85,7% de estos pacientes, asociación descrita por otros autores en diferentes grupos étnicos estudiados<sup>178, 181, 183</sup>. Además, todos estos individuos con haplotipo HLA-B14-DR1 presentaban concentraciones elevadas de 17-OHP en respuesta a la estimulación con ACTH.

El hecho de que estos alelos aparezcan juntos en el mismo haplotipo en pacientes con formas no clásicas, sugiere que el segmento del haplotipo HLA-B14-DR1, esté fuertemente asociado con esta forma leve de deficiencia, siendo por lo tanto un buen marcador para el diagnóstico de dicha forma.

Además, el leve aumento observado del haplotipo HLA-B14-DR1 en las formas clásicas, presumiblemente es consecuencia del reducido número de pacientes que componen este grupo, y no debido a la existencia de un desequilibrio entre ellos, aunque algunos autores han descrito también presencia de este haplotipo en pacientes con forma virilizante simple<sup>84, 178, 185</sup>, de ahí el interés en esclarecer esta posible asociación para conocer la utilidad o no, en el diagnóstico de este déficit.

En base a los resultados del tipaje HLA observados en la población catalana, comparados con los descritos en otras poblaciones, resulta evidente que la frecuencia de cada uno de estos antígenos varía según el origen geográfico de los pacientes analizados y que además, es posible presentar cualquiera de las formas clínicas del déficit, sin tener asociado el antígeno HLA esperado en esa población. Debe tenerse precaución al interpretar estos resultados, ya que podrían llevar a incorrectos diagnósticos clínicos, y por lo tanto deben ser utilizados como información complementaria del estudio directo del gen 21-hidroxilasa, para poder establecer realmente el grado de afección de la actividad enzimática y realizar un diagnóstico y tratamiento más preciso.

Actualmente, es posible el análisis directo del gen que codifica la enzima 21-hidroxilasa y la detección de las alteraciones génicas causantes de la enfermedad, pero tal y como demuestran algunos estudios<sup>186</sup> este análisis directo en ocasiones puede proporcionar limitada información, debido a la presencia de complicados reordenamientos entre CYP21A y CYP21B, que hacen difícil determinar si el individuo está afecto o no. Estos casos sugieren que la detección directa de mutaciones debe ser

completada, siempre que sea posible, mediante un análisis indirecto del gen que proporcione información más comprensible para la familia.

En esta serie, el análisis indirecto del gen se ha realizado mediante el estudio de la región HLA en familias con al menos un hijo afecto y la construcción de los haplotipos de cada uno de los miembros de la genealogía. Los resultados obtenidos del análisis de segregación de los haplotipos HLA permiten afirmar que dentro de cada familia, existen unos haplotipos de riesgo a presentar la enfermedad, distintos en cada una de ellas, pero que conociéndolos, gracias a la existencia de un afecto en el seno familiar, pueden ser de gran utilidad en el diagnóstico prenatal. Además, permite identificar los miembros heterocigotos en las familias y diagnosticar las formas crípticas y los hermanos *sanos* de los pacientes, ayudando a realizar un consejo genético completo a la familia. El inconveniente importante, es que este análisis indirecto es de gran utilidad únicamente, cuando en la familia existe por lo menos un hijo afecto de déficit en 21-hidroxilasa. También debe tenerse precaución, en los casos en que ambos padres comparten antígenos HLA, al interpretar los datos obtenidos<sup>187</sup>.

Por consiguiente, el tipaje HLA debe de ser utilizado como marcador en estudios familiares, para la detección de portadores heterocigotos y para aumentar la seguridad del diagnóstico prenatal, sobre todo, cuando con el análisis directo del gen no es posible la caracterización de mutaciones en ambos cromosomas. Este hecho es de indudable interés ya que ha de considerarse que en esta patología existe la posibilidad de tratamiento prenatal<sup>129, 188</sup>, de ahí que todo el aporte de información que posibilite realizar un diagnóstico prenatal adecuado, minimizará el tratamiento innecesario de varones o hembras no afectadas.

Recientemente se han publicado<sup>82, 189</sup>, los resultados del grupo de Estados Unidos de América poniendo de manifiesto la eficacia de un correcto diagnóstico prenatal y tratamiento en esta enfermedad.

A lo largo de estos años, las diferentes metodologías empleadas en el estudio del gen CYP21B, han permitido profundizar en el conocimiento genético de dicha alteración de la esteroidogénesis suprarrenal<sup>82, 90, 190</sup>. Así, se han podido encontrar mutaciones características de algunas poblaciones<sup>191, 192</sup>, incluyendo individuos no afectados<sup>193</sup>. Por lo tanto, el análisis molecular de los defectos en el gen CYP21B, es la llave para comprender la etiología del déficit en 21-hidroxilasa, tanto en ciencia básica como en el diagnóstico clínico.



La estrategia metodológica utilizada en este estudio para el análisis directo del gen 21-hidroxilasa ofrece unos resultados excelentes. Con ella, se ha detectado la mutación causal en el 89,62% de los cromosomas afectos considerados globalmente, convirtiéndose así, en una metodología eficaz.

En particular, en el grupo de pacientes perdedores de sal se caracterizaron el 100% de las mutaciones causantes del déficit severo. Todos ellos, han presentado mutaciones severas en ambos cromosomas, paterno y materno, observándose además, en algunos de ellos varias mutaciones sobre un mismo cromosoma, por lo que el número total de mutaciones detectadas, es superior al de cromosomas no emparentados estudiados. Por esta razón, debemos considerar importantísimo realizar en todos los casos, tanto la detección de grandes reordenamientos en esta región mediante la técnica Southern blot, como el análisis lo más amplio posible de mutaciones por PCR, para poder llegar a establecer un exacto genotipo y llevar a cabo un correcto diagnóstico genético de esta patología.

La mutación puntual más frecuente en las formas SW de la población catalana estudiada, al igual que en otras poblaciones<sup>84, 101, 188, 194</sup>, ha sido el cambio A/C por G en la posición 655 en el intrón 2 (50%). Las deleciones del gen CYP21B se encontraron en el 22,72% y las grandes conversiones en el 9,09% de estas formas, de acuerdo con las frecuencias publicadas para la población caucásica<sup>78, 84, 90, 188</sup>, aunque diferentes a las de otras series<sup>72, 80, 91, 102</sup> que presentan bajas frecuencias. El resto de mutaciones puntuales en estas formas SW, se presentaron en frecuencias de un orden similar al descrito en otras poblaciones, aunque con ciertas salvedades. La mutación severa G318X, típica de formas SW, no se encontró representada en esta serie de pacientes “perdedores de sal”, a diferencia de lo observado en otras poblaciones<sup>195, 196, 197, 198</sup>. Además, la deleción de 8 pares de bases en el exón 3 (9,09%), no es tan infrecuente como describen otros autores<sup>188, 198</sup>.

Por otro lado, decir también, que esta metodología ha permitido la caracterización de todos los pacientes con forma virilizante simple (SV). La frecuencia de mutaciones en estas formas SV ha resultado algo peculiar, ya que la mutación I172N, típica de las formas virilizantes simples, solo se encontró con una frecuencia del 16,66% de estos pacientes, a diferencia de lo observado en otras series<sup>195, 196</sup>, pudiendo ser debido al reducido número de pacientes que forman este grupo. Mientras que la frecuencia de la mutación intrón 2 en estas formas, fue del 50%, muy superior a la

encontrada en otras poblaciones<sup>195, 196, 199</sup>. El hecho de haber pacientes en esta población, homocigotos para esta mutación severa (intrón 2), unos de ellos con forma SW y otros con forma SV, podría ser consecuencia de que en algunos pacientes pueda existir en un cierto grado un procesamiento correcto del RNA mensajero<sup>81</sup>.

A diferencia de lo publicado en otros estudios<sup>195, 200</sup> en los que la mutación P30L fue encontrada con alta frecuencia en pacientes con forma clásica del déficit, en esta población no se encontró en ningún paciente con dicha forma clínica, lo que no es sorprendente, ya que esta mutación está descrita como causante de formas no clásicas.

Por lo que se refiere a los pacientes con la forma no clásica del déficit (NC), el análisis molecular, ha permitido la caracterización de la mutación en el 85,9% de sus cromosomas. Es posible, que el restante 14,1% de los cromosomas de estos pacientes en los que no se halló la mutación causal, presenten mutaciones nuevas que no existan en el pseudogen. De ahí, el interés en realizar nuevos proyectos de estudio, para proseguir el análisis de estos pacientes mediante secuenciación directa del gen, no objetivo de esta tesis, con el fin de detectar la mutación presente en ellos y conseguir su completa caracterización.

Las formas NC presentaron como mutación más frecuente la V281L con el 61,53%, similar a la descrita en otras series<sup>99, 129, 201, 202</sup>, pero diferente a la encontrada en otra población española<sup>188</sup> y otros países<sup>195, 203</sup>. Aunque la elevada frecuencia de las formas NC está establecida, por el momento, en base a datos de tipo hormonal, sí cabe reseñar que, las formas NC de la deficiencia constituyen la patología hereditaria más frecuente en nuestro medio.

Tanto la frecuencia de la mutación P30L como la de la P453S en dichas formas NC fueron parecidas a las encontradas en algunas poblaciones<sup>188, 202</sup>, pero menos frecuentes que las descritas en otras<sup>195</sup>.

Hay que resaltar que en un 15,4% de las formas no clásicas se han encontrado mutaciones severas en heterocigosis, causantes de formas clásicas, que no hubieran sido posibles de detectar sin disponer de estas técnicas moleculares y que además, plantean importantes implicaciones en lo que se refiere al consejo genético en estas familias.

Las deleciones y duplicaciones del pseudogen CYP21A fueron también analizadas en los pacientes y familiares de esta población, observándose frecuencias muy inferiores a las encontradas en la población española<sup>188</sup>. Las deleciones del pseudogen se presentaron únicamente en pacientes con forma NC (2,56%) y sus progenitores, con frecuencias por debajo a las descritas para la población normal (5-

15%)<sup>204</sup>. Este hecho, no apoya la hipótesis de que la alta frecuencia de deleciones del pseudogen en padres portadores, observada en otros estudios, esté relacionada con la predisposición de este tipo de portadores a generar alelos nuevos, portadores de la deficiencia en 21-hidroxilasa<sup>204, 205</sup>. Por su parte, las duplicaciones del pseudogen sólo se encontraron en el 5,12% de los cromosomas de las formas NC, en todos los casos asociadas a la mutación V281L, tal y como describen algunos autores<sup>86</sup>, pero con frecuencia inferior a las descritas por otros<sup>188</sup>, sin conocerse la importancia de este hecho.

Cuando sólo es analizado el DNA del paciente, puede surgir el inconveniente de no poder realizar una correcta caracterización de las mutaciones en éste, ya que no podremos diferenciar heterocigotos compuestos para diferentes mutaciones, ni individuos homocigotos para una mutación de individuos hemizigotos, ni descubrir el falso resultado obtenido como consecuencia de la desigual amplificación por PCR de diferentes alelos, descrita como “allele dropout”, que tiene lugar en algunos casos, ni establecer la frecuencia de mutaciones originadas *de novo* en el gen. Por lo tanto, es obligado siempre que sea posible, el análisis de ambos progenitores para establecer seguidamente la segregación de las mutaciones encontradas en cada uno de los árboles familiares y conocer realmente la fase de las diferentes mutaciones observadas, al mismo tiempo que, detectar los portadores de la deficiencia dentro del núcleo familiar y diagnosticar las denominadas formas crípticas del déficit.

Los resultados obtenidos del estudio genético familiar en esta población, muestran que todos los progenitores estudiados, excepto en dos casos, eran portadores de alteraciones génicas, algunos de ellos con mutaciones severas, por lo menos, en uno de sus dos cromosomas, lo que revela que la correspondiente segregación de las mutaciones ha sido encontrada en cada caso excepto en estos dos, indicando que en ellos la mutación encontrada se ha producido *de novo*, mediante mecanismos de conversión génica<sup>82, 205</sup>.

También, el análisis mutacional de los progenitores y hermanos clínicamente no afectados, ha permitido detectar los portadores de la deficiencia dentro de cada familia, los hermanos clínicamente *sanos* y diagnosticar veintiséis formas crípticas de la deficiencia confirmadas con el estudio bioquímico, siendo todos ellos informados. En las formas crípticas se han implantado controles periódicos, con el fin de detectar precozmente la aparición de síntomas, e instaurar entonces un tratamiento adaptado.

A pesar de que sean necesarios más estudios que amplíen y confirmen los ya realizados<sup>206</sup>, la alta frecuencia de portadores observada en la población general, apunta hacia la posible existencia de alguna ventaja selectiva para estos individuos heterocigotos, no conocida todavía.

El hecho de observar, dentro de una misma familia, hermanos afectos con idéntico genotipo CYP21 pero con diferente forma clínica y formas asintomáticas (crípticos), hace pensar en que otros factores genéticos o ambientales deben de estar implicados en la variabilidad de esta expresión clínica, diferentes de las mutaciones CYP21B, las observaciones de otros estudios<sup>63, 207, 208</sup>, parecen apoyar esta interpretación.

En los quince pacientes con la forma no clásica del déficit en este estudio, en los que no se encontró alteración en el otro cromosoma, no muestran características comunes que puedan facilitar el diagnóstico prenatal en estas familias, de ahí la importancia, tal y como se ha indicado anteriormente, de realizar el análisis indirecto del gen mediante el estudio de los antígenos HLA, permitiéndonos establecer los haplotipos asociados al déficit, e incrementar la precisión del diagnóstico. Al ser únicamente analizadas nueve de las mutaciones puntuales más comunes encontradas en el gen 21-hidroxilasa, estos casos no caracterizados completamente, podrían ser debidos a la presencia de mutaciones raras<sup>209</sup> en el mismo alelo, a mutaciones localizadas en la región promotora del gen o a factores activadores alterados del gen, no detectables mediante la metodología empleada. En estudios futuros, debe ser realizada la secuenciación directa de todo el gen CYP21B de estos pacientes, incluyendo unas -2000 bases para poder detectar también, posibles mutaciones en la región reguladora transcripcional, que ayude a completar su caracterización.

Por otro lado, no se ha encontrado ninguna correlación entre el tipaje HLA y las lesiones severas detectadas en los pacientes con “pérdida salina” y virilizante simple en esta población estudio, a diferencia de lo descrito en otras poblaciones<sup>181, 210</sup>, en las que cerca del 50% de las deleciones del gen CYP21B observadas en la forma “pérdida salina”, están asociadas con el haplotipo HLA-A3;Bw47;DR7. Por el contrario, sí se encontró total desequilibrio de asociación entre el haplotipo HLA-B14(64;65);DR1 y la mutación V281L en los pacientes con la forma no clásica de esta población, al igual que describen otras series<sup>181, 185, 210</sup>.

A la vista de estos resultados, es evidente que no se puede presuponer que cada caso de déficit en 21-hidroxilasa asociado con un antígeno HLA característico, presente la misma mutación.

Finalmente, la concordancia hallada entre el genotipo y el fenotipo, en este estudio, ha sido del 97,2%, por lo que se puede afirmar que existe una muy buena correlación genotipo/fenotipo en todos los casos estudiados, a diferencia de lo publicado en otras poblaciones<sup>195, 200</sup>, probablemente debido a la exhaustiva caracterización clínica realizada de los pacientes y a la metodología empleada. Únicamente en dos pacientes, se encontró discordancia entre la forma clínica diagnosticada y los resultados del análisis molecular del gen. Debemos tener en cuenta, que estas discrepancias entre el genotipo y el fenotipo, asumen gran importancia en el diagnóstico prenatal basado únicamente en el análisis genético molecular del DNA fetal, de ahí, que las predicciones desde el genotipo, han de ser hechas todavía con gran cautela.

Las posibles explicaciones de estas discordancias entre genotipo y fenotipo observadas son múltiples. Ahora bien, la más evidente es que, como se sabe, la severidad de la enfermedad cae sobre un espectro continuo de formas clínicas, de manera que pacientes con severidad cercana a los límites de varias clasificaciones, pueden fácilmente caer en uno u otro lado de estos límites. Algunas mutaciones (intrón 2) y genotipos, parecen estar particularmente asociados con este problema.

Otra posible explicación a tener en cuenta, es la aportada por un estudio<sup>76</sup>, donde se muestra que el pseudogen CYP21A se expresa a nivel transcripcional, contribuyendo posiblemente en esta variación observada del fenotipo dentro de un mismo grupo mutacional. Sin embargo, esto no se conoce realmente, pudiendo ser poco probable ya que el pseudogen es un reservorio de mutaciones, que le convierten en no funcional.

También cabe la posibilidad de que otros factores o genes, todavía no identificados, puedan contribuir en la expresión variable de los fenotipos HSC<sup>210</sup>, que probablemente saldrán a la luz, cuando el genoma humano sea totalmente interpretado.

Cabe reseñar también que, estudios recientes efectuados en otras poblaciones<sup>211</sup> han observado que el 38% de casos con adrenaquia prematura, son heterocigotos para una de las nueve mutaciones más frecuentes del gen CYP21B, será importante buscar explicación a estos hallazgos.

Dicho esto, hay que tener en cuenta en proyectos futuros, el analizar también, los demás genes o factores implicados en el metabolismo de los esteroides adrenales en

estos pacientes, con el objetivo de conocer exactamente qué papel juegan en el desarrollo de las diferentes formas clínicas del déficit en 21-hidroxilasa y valorar la información que estos aportan, para llegar a conseguir un posible tratamiento especial dirigido a cada individuo.

Por todo lo expuesto, queda abierto un gran camino a recorrer en la investigación de esta apasionante patología.

## **6. CONCLUSIONES**





Del estudio realizado en la presente tesis, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El amplio espectro de manifestaciones clínicas característico de la Hiperplasia Suprarrenal Congénita por déficit en 21-hidroxilasa, no siempre permite que el especialista asigne *a priori* al paciente la forma clínica correcta de esta patología, siendo necesario realizar exhaustivas pruebas hormonales y genéticas, como las empleadas en este estudio, que han demostrado ser precisas para llevar a cabo un diagnóstico riguroso.
- El test de ACTH se confirma como una herramienta fiable, a estas edades, en el diagnóstico clínico de esta deficiencia, ya que no se observaron falsos positivos ni falsos negativos en los valores obtenidos de 17-hidroxiprogesterona post estimulación.
- Las formas clásicas del déficit presentan unas concentraciones séricas basales de 17-OHP tan elevadas, que son por sí mismas diagnósticas, mientras que, las formas no clásicas precisan de la práctica del test de estimulación corto con ACTH, para que el diagnóstico se realice correctamente.
- El Nomograma de 17-OHP obtenido en la población de la comunidad catalana estudiada, proporciona un patrón hormonal que facilita, en la mayoría de los casos, el diagnóstico de las distintas formas de presentación clínica del déficit.
- El test hormonal no es totalmente sensible para identificar los portadores *heterocigotos* cuando la 17-OHP es utilizada como marcador.
- Una característica especial que se observa en la población estudiada, es la no presencia del antígeno HLA-Bw47 en ninguno de los grupos analizados, a diferencia de otras poblaciones estudiadas.
- Las formas no clásicas en esta población, presentan desequilibrio de asociación muy significativo con el haplotipo HLA-B14-DR1.
- La asociación más significativa observada en las formas clásicas, ha sido con el antígeno HLA-B5(w51), convirtiéndose en un marcador característico de dicha forma clínica del déficit en esta población.
- El análisis de segregación de los haplotipos HLA en familias con al menos un hijo afecto, permite de forma rápida, una primera aproximación diagnóstica y aumenta la precisión del diagnóstico, en los casos en que el análisis directo del gen no posibilita la caracterización de mutaciones en ambos cromosomas afectados.

- La metodología utilizada en este estudio para el análisis molecular directo del gen 21-hidroxilasa, ha permitido detectar la mutación causal en el 89,62% de los cromosomas afectados, evaluados globalmente. Las mutaciones causantes del déficit en los pacientes con la forma clásica, han sido caracterizadas completamente, mientras que en la forma no clásica se caracterizaron las mutaciones en el 85,9% de sus cromosomas. Consolidándose esta metodología como altamente efectiva en el diagnóstico de esta patología.
- Las mutaciones más frecuentes observadas dentro de cada forma clínica estudiada en la población catalana son:
  - Pérdida salina: Intrón 2 (50%).
  - Virilizante simple: Intrón 2 (50%); I172N (16,66%).
  - No clásicas: V281L (61,53%).

Estas son diferentes a las descritas en otras poblaciones.

- Se ha establecido el diagnóstico de portadores de alelos con mutaciones severas tanto en los familiares de las formas clásicas, como en las formas no clásicas, siendo de gran importancia en el consejo genético familiar, en el diagnóstico y tratamiento prenatal, lo cual no hubiera sido posible sin disponer de estas técnicas moleculares.
- En esta compleja patología, el análisis de ambos progenitores junto al caso índice, siempre que sea posible, ayuda a la correcta caracterización de las mutaciones presentes en éste, evitándose incorrectos diagnósticos clínicos.
- El análisis de los pedigreos en este estudio, ha permitido diagnosticar veintiséis formas crípticas de la deficiencia y revelar en dos casos la presencia de mutaciones originadas *de novo*, como consecuencia de mecanismos de conversión génica.
- Las predicciones desde el genotipo han de ser hechas con gran cautela, ya que en la población catalana estudiada se obtuvo una buena, pero no total, correlación entre el defecto molecular detectado y la expresión clínica de esta enfermedad en los casos analizados.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



1. **Addison T.** *On the constitutional and local effects of the suprarenal capsules.* London: Samuel Higley Pub. 1855.
2. **Brow-Séquard GE.** *Recherche expérimentale sur la physiologie et la pathologie des capsules surrénales.* CR Séances Soc Biol. 1856; 43:422-425.
3. **Houssay BA, Lewis JT.** *The relative importance to life of cortex and medulla of the adrenal glands.* Am J Physiol. 1923; 64:513-521.
4. **Benner MC.** *Studies on the involution of the fetal cortex of the adrenal glands.* Am J Pathol. 1940; 16: 787-798.
5. **Davis IJ.** *The fetal adrenal.* En: **Tulchinsky D, Ryan KJ, eds.** *Maternal/fetal endocrinology.* Philadelphia: WB Saunders. 1980; 242-251.
6. **McNulty WP, Novy MJ, Walsh SW.** *Fetal and postnatal development of the adrenal glands in *Macaca mulatta*.* Biol Reprod. 1981; 25:1079-1089.
7. **Hinson JP, Vinson GP, Whitehouse BJ.** *The relationship between perfusion medium flow rate and steroid secretion in the isolated perfused rat adrenal gland in situ.* J Endocrinol. 1986; 111:391-396.
8. **Zajicek G, Ariel I, Arber N.** *The streaming adrenal cortex: direct evidence of centripetal migration of adrenocytes by estimation of cell turnover rate.* J Endocrinol. 1986; 111:477-482.
9. **Reichstein TS, Shoppee CW.** *Hormones of the adrenal cortex.* Vitam Horm. 1943; 1:345-413.
10. **Reiter EO, Fuldauer VG, Root AW.** *Secretion of the adrenal androgen, dehydroepiandrosterone sulfate during normal infancy, childhood and adolescence, in sick infants and in children with endocrinologic abnormalities.* J Pediatr. 1977; 90:766-770.
11. **Pasqualini JR, Sumida C.** *Receptors and mechanism of action of steroid hormones in the foetal compartment.* En: **Pal SB, ed.** *Hormones in normal and abnormal human tissues.* Berlin, New York: Walter de Gruyter. 1981; 251-280.
12. **Borkowski A, Delcroix C, Levin S.** *Metabolism of adrenal cholesterol in man. In vivo studies.* J Clin Invest. 1972; 51:1664-1687.
13. **Boggaram V, Funkenstein B, Waterman NR, Simpson ER.** *Lipoproteins and the regulation of adrenal steroidogenesis.* Endocr Res. 1985; 10:387-409.
14. **Hall PF.** *Cellular organization for steroidogenesis.* Int Rev Cytol. 1983; 86:53-95.

15. **Aupetit B, Accarie C, Emeric N, Vonarx, Legrand J-C.** *The final step of aldosterone biosynthesis requires reducing power it is not a dehydrogenation.* Biochim Biophys Acta. 1983; 752:73-78.
16. **Domingues OV, Valencia SA, Loza AC.** *On the role of steroid sulfates in hormone biosynthesis.* J Steroid Biochem. 1975; 6:301-309.
17. **Hall PF.** *Role of cytochromes P-450 in the biosynthesis of steroid hormones.* Vit Horm. 1984; 42:315-368.
18. **Miller WL.** *Molecular biology of steroid hormone synthesis.* Endocr Rev. 1988; 9:945-993.
19. **Matocha MF, Waterman MR.** *Synthesis and processing of mitochondrial steroid hydroxylases. In vivo maturation of the precursor forms of cytochrome P.450<sub>scc</sub>, cytochrome P.450<sub>11β</sub>, and adrenodoxin.* J Biol Chem. 1985; 260:12259-12265.
20. **Jefcoate CR, McNamara BC, Artemenko I, Yamazaki T.** *Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450<sub>scc</sub> in steroid hormone synthesis.* J Steroid Biochem Mol Biol. 1992; 43: 751-767.
21. **Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM.** *The purification, cloning and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of steroidogenic acute regulatory protein StAR.* J Biol Chem. 1994; 269:38314-38322.
22. **Lin D, Sugawara T, Strauss JF, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL.** *Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis.* Science. 1995; 267:1828-1831.
23. **Labrie F, Simard J, Luu-The V, Pelletier G, Belghmi K, Bélanger A.** *Structure, regulation and role of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase, 17β-hydroxysteroid dehydrogenase and aromatase enzymes in the formation of sex steroids in classical and peripheral intracrine tissues.* Baillière's Clin Endocrinol Metab. 1994; 8:451-474.
24. **Simard J, Rhéaume E, Mebarki F, Sánchez R, New MI, Morel Y, Labrie F.** *Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia due to 3β-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency.* J Steroid Biochem Mol Biol. 1995; 53:127-138.
25. **Hall PF.** *Cytochrome P450 C21<sub>scc</sub>: one enzyme with two actions: hydroxylase and lyase.* J Steroid Biochem Mol Biol. 1991; 40:527-532.

26. **Yanase T, Simpson ER, Waterman MR.** *17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase deficiency: from clinical investigation to molecular definition.* Endocr Rev. 1991; 12:91-108.
27. **Rodrigues NR, Dunham I, Yu CY, Carroll MC, Porter RR, Campbell RD.** *Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia.* EMBO J. 1987; 6:1653-1661.
28. **Higashi Y, Yoshioka H, Yamana M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y.** *Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene.* Proc Natl Acad Sci USA. 1986; 83:2841-2845.
29. **White PC, New MI, Dupont B.** *Structure of the human steroid 21-hydroxylase genes.* Proc Natl Acad Sci USA. 1986; 83:5111-5115.
30. **Levine LS, Zachmann M, New MI, Prader A, Pollack MS, O'Neill GJ, Yang SY, Oberfield SE, Dupont B.** *Genetic mapping of the 21-hydroxylase-deficiency gene within the HLA linkage group.* N Engl J Med. 1978; 299:911-915.
31. **Mellon SH, Miller WL.** *Extra-adrenal steroid 21-hydroxylation is not mediated by P450 c21.* J Clin Invest. 1989; 84:1497-1502.
32. **White PC, Curnow KM, Pascoe L.** *Disorders of steroid 11 $\beta$ -hydroxylase isoenzymes.* Endocr Rev. 1994; 15:421-433.
33. **Pascoe L, Curnow KM, Slutzker L, Rösler A, White PC.** *Mutations in the human CYP11B2 (aldosterone synthase) gene causing corticosterone methyloxidase II deficiency.* Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89:4996-5000.
34. **White PC, Dupont J, New MI, Leiberman E, Hochberg Z, Rösler A.** *A mutation in CYP11B1 (Arg-448 $\rightarrow$ His) associated with steroid 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency in Jews of Moroccan origin.* J Clin Invest. 1991; 87:1664-1667.
35. **Helmberg A, Ausserer B, Kofler R.** *Frameshift by insertion of two base pairs in codon 394 of CYP11B1 causes congenital adrenal hyperplasia due to steroid 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency.* J Clin Endocrinol Metab. 1992; 75:1278-1281.
36. **Pascoe L, Curnow KM, Slutzker L, Rösler A, White PC.** *Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism results from hybrid genes created by unequal crossovers between CYP11B1 and CYP11B2.* Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89:8327-8331.
37. **Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel S, Mendonca BB, Elliston KO, Wilson JD, Russell DW, Andersson S.** *Male pseudohermaphroditism caused*

- by mutations of testicular 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Nature Genetics*. 1994; 7: 34-39.
38. **Russell DW, Wilson JD.** *Steroid 5 $\alpha$ -reductase: Two genes/two enzymes.* *Ann Rev Biochem*. 1994; 63:25-67.
39. **Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CR, Bulun SE.** *Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis.* *Endocr Rev*. 1994; 15:342-355.
40. **Evans MI, Chrousos GP, Mann DW, Larsen JWJ, Green I, Mc-Cluskey J, Loriaux DL, Fletcher JC, Koons G, Overpeck J.** *Pharmacologic suppression of the fetal adrenal gland in utero: attempted prevention of abnormal external genitalia masculinisation in a suspected congenital adrenal hyperplasia.* *J Am Med Assoc*. 1985; 253:1015-1020.
41. **Mountjoy KG, Robbins LJ, Mortrud MT, Cone RD.** *The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptor.* *Science*. 1992; 257:1248-1251.
42. **Lebrethon MC, Naville D, Bégeot M, Saez JM.** *Regulation of corticotropin receptor number and mRNA in cultured human adrenocortical cells by corticotropin and angiotensin-II.* *J Clin Invest*. 1994; 93:1828-1833.
43. **Hall PF.** *Trophic stimulation of steroidogenesis: in search of the elusive trigger.* *Rec Prog Horm Res*. 1985; 41:1-39.
44. **Waterman MR, Simpson ER.** *Regulation of the biosynthesis of cytochromes P-450 involves in steroid hormone synthesis.* *Mol Cell Endocrinol*. 1985; 39:81-89.
45. **James VHT, Tunbridge D, Wilson GA.** *Central control of steroid hormone secretion.* *J Steroid Biochem*. 1978; 9:429-436.
46. **Warne GL, Carter JN, Faiman C, Ryes FI, Winter JSD.** *Hormonal changes in girls with precocious adrenarche; a possible role for estradiol or prolactin.* *J Pediatr*. 1978; 92:743-747.
47. **Winter JSD.** *The adrenal cortex in the fetus and neonate.* En: **Anderson DC, Winter JSD, eds.** *Adrenal cortex*. London: Butterworths. 1985; 32-56.
48. **Byrne GC, Perry YS, Winter JSD.** *Steroid inhibitory effects upon human adrenal 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity.* *J Clin Endocrinol Metab*. 1986; 62:413-418.



49. **Dickerman Z, Grant DR, Faiman C, Winter JSD.** *Intraadrenal steroid concentrations in man: zonal differences and developmental changes.* J Clin Endocrinol Metab. 1984; 59:1031-1036.
50. **McKenna TJ, Island DP.** *ACTH stimulates late steps in cortisol biosynthesis.* Acta Endocrinol. 1979; 90:122-132.
51. **Kramer RK, Gallant S, Brownie AC.** *Actions of angiotensin II on aldosterone biosynthesis on the rat adrenal cortex; effects of cytochrome P-450 enzymes on the early and late pathway.* J Biol Chem. 1980; 255:3442-3447.
52. **Fiselier T, Lijnen P, Monnens L, Van Munster P, Jansen M, Peer P.** *Levels of renin, angiotensin I and II, angiotensin converting enzyme and aldosterone in infancy and childhood.* Eur J Pediatr. 1983; 141:3-7.
53. **Anderson JV, Struthers AD, Payne NN, Slater JDH, Bloom SR.** *Atrial natriuretic peptide inhibits the aldosterone response to angiotensin II in man.* Clin Sci. 1986; 70:507-512.
54. **Sulyok E, Ertl T, Varga L, Bodis J, Csaba IF.** *The effect of metoclopramide administration on electrolyte status and activity of renin-angiotensin-aldosterone system in premature infants.* Pediatr Res. 1985; 19:912-915.
55. **Sen S, Valenzuela R, Smeby RR, Bravo EL, Bumpus FM.** *Localization, purification and biological activity of a new aldosterone stimulating factor.* Hypertension. 1981; 3 suppl I:1-81.
56. **Walters MR.** *Steroid hormone receptors and the nucleus.* Endocr Rev. 1985; 6:512-543.
57. **Onishi S, Miyazawa G, Nishimura Y, Sugiyama S, Yamakawa T, Inagaki H, Katoh T, Itoh S, Isobe K.** *Postnatal development of circadian rhythm in serum cortisol levels in children.* Pediatrics. 1983; 72:399-404.
58. **Perry LA, Al-Dujaili EAS, Edwards CRW.** *A direct radioimmunoassay for 11-deoxycortisol.* Steroids. 1982; 39:115-128.
59. **Schöneshöfer M, Fenner A, Dulce HJ.** *Interferences in the radioimmunological determination of urinary free cortisol.* Clin Chim Acta. 1980; 101:125-134.
60. **Shackleton CHL, Taylor NF, Honour JW.** *An atlas of gas chromatographic profiles of neutral urinary steroids in health and disease.* Delft, The Netherlands: Packard-Becker BV. 1980.

61. **New MI, White PC, Speiser PW.** *Congenital adrenal hyperplasia.* En: **Martínez-Mora J (ed.).** *Intersexual states.* Barcelona: Doyma. 1994:162-187.
62. **Miller WL.** *Genetics, diagnosis and management of 21-hydroxylase deficiency.* J Clin Endocrinol Metab. 1994; 78:241-246.
63. **Speiser PW, Agdere L, Ueshiba H, White PC, New MI.** *Aldosterone synthesis in patients with salt-wasting congenital adrenal hyperplasia and complete absence of adrenal 21-hydroxylase.* N Engl J Med. 1991; 324:145-149.
64. **Prader A, Gurtner HP.** *Das Syndrom des Pseudohermaphroditismus masculinus bei kongenitaler Nebennierenrindenhypertrophie ohne androgenüberproduktion (adrenaler Pseudohermaphroditismus masculinus).* Helv Paediatr Acta. 1955; 10:397-411.
65. **Dewailly D, Vantyghem-Haudiquet MC, Sainsard C, Buvat J, Cappoen JP, Ardaens K, Racadot A, Lefebvre J, Fossati P.** *Clinical and biological phenotypes in late onset 21-hydroxylase deficiency.* J Clin Endocrinol Metab. 1986; 63:418-423.
66. **Levine LS, Dupont B, Lorenzen F, Pang S, Pollack MS.** *Genetic and hormonal characterization of the cryptic 21-hydroxylase deficiency.* J Clin Endocrinol Metab. 1981; 53:1193-1198.
67. **Dupont B, Oberfield SE, Smithwick EM, Lee TD, Levine LS.** *Close genetic linkage between HLA and congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency).* Lancet. 1977; ii:1309-1312.
68. **Levine LS, Zachmann M, New MI, Prader A, Pollack MS, O'Neill GJ, Yang SY, Oberfield SE, Dupont B.** *Genetic mapping of the 21-hydroxylase deficiency gene within the HLA linkage group.* New Engl J Med. 1978; 299:911-915.
69. **Pollack MS, Levine LS, Zachmann M, Prader A, New MI, Oberfield SE, Dupont B.** *Possible genetic linkage disequilibrium between HLA and the 21-hydroxylase deficiency gene (congenital adrenal hyperplasia).* Trans Proc. 1979; 11:1315-1316.
70. **Morel Y, Murena M, Nicolino M, Forest MG.** *Molecular genetics of the congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.* En: **Saez JM, Brownie AC, Capponi A, (eds.).** *Cellular and molecular biology of the adrenal cortex.* Paris: Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. 1992:123-136, vol 222.

71. **Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI.** *High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency.* Am J Hum Gen. 1985; 37:650-667.
72. **Morel Y, André J, Uring-Lambert B, Hauptmann G, Betuel H, Tossi M, Forest MG, David M, Bertrand J, Miller WL.** *Rearrangements and point mutations of P450c21 genes are distinguished by five restriction endonuclease haplotypes identified by a new probing strategy in 57 families with congenital adrenal hyperplasia.* J Clin Invest. 1989; 83:527-536.
73. **Kastelan A, Brkljacic-Surkalovic LJ, Dumic M.** *The HLA associations in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in a Yugoslav population.* In: **New MI, ed.** *Congenital adrenal hyperplasia.* Ann NY Acad Sci. 1985; 458:41-45.
74. **Morel Y, Miller WL.** *Clinical and molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.* Adv Hum Genet. 1991; 20:1-68.
75. **White PC, Chaplin DD, Weis JH, Dupont B, New MI, Seidman JG.** *Two steroid 21-hydroxylase genes are located in the murine S region.* Nature. 1984; 312:465-467.
76. **Bristow J, Gitelman SE, Tee MK, Staels B, Miller WL.** *Abundant adrenal-specific transcription of the human P450c21A «pseudogene».* J Biol Chem. 1993; 268:12919-12924.
77. **Morel Y, Bristow J, Gitelman SE, Miller WL.** *Transcript encoded on the opposite strand of the human 21-hydroxylase/C4 locus.* Proc Natl Acad Sci USA. 1989; 86:6582-6586.
78. **White PC, Vitek A, Dupont B, New MI.** *Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency.* Proc Natl Acad Sci USA. 1988; 85:4436-4440.
79. **Harada F, Kimura A, Iwanaga K, Shinozawa J, Yata Sasazuki.** *Gene conversion-like events cause steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia.* Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 85:8091-8094.
80. **Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Fujii-Kuriyama Y.** *Evidence for frequent gene conversion in the steroid 21-hydroxylase P-450 (C21) gene: implications for steroid 21-hydroxylase deficiency.* Am J Hum Genet. 1988; 42:17-25.

81. **White PC, New MI.** *Genetic basis of endocrine disease 2: congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.* J Clin Endocrinol Metab. 1992; 74:6-11.
82. **Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, Lesser M, New MI, White PC.** *Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.* J Clin Invest. 1992; 90:584-595.
83. **Wedell A, Ritzen ME, Haglund-Stengler B, Luthman H.** *Steroid 21-hydroxylase deficiency: three new mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations.* Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89:7232-7236.
84. **Mornet E, Créte P, Kuttan F, Rauw Demay MC, Boué J, White PC, Boué A.** *Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency.* Am J Hum Genet. 1991; 48:79-88.
85. **Haglund-Stengler B, Ritzén EM, Luthman H.** *21-hydroxylase deficiency: disease-causing mutations categorized by densitometry of 21-hydroxylase-specific deoxyribonucleic acid fragments.* J Clin Endocrinol Metab. 1990; 70:43-48.
86. **Speiser PW, New MI, White PC.** *Molecular genetic analysis of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14, DR1.* N Engl J Med. 1988; 319:19-23.
87. **Urabe K, Kimura A, Harada F, Iwanaga T, Sasazuki T.** *Gene conversion in steroid 21-hydroxylase genes.* Am J Hum Genet. 1990; 46:1178-1186.
88. **Sinnott PJ, Livieri C, Sampietro M, Marconi M, Harris R, Severi F, Strachan T.** *CYP21/C4 gene organisation in Italian 21-hydroxylase deficiency families.* Hum Genet. 1992; 88:545-551.
89. **Tusie-Luna MT, Speiser PW, Dunic M, New MI, White PC.** *A mutation (Pro30-Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele.* Mol Endocrinol. 1991; 5:685-692.
90. **Owerbach D, Crawford YM, Draznin MB.** *Direct analysis of CYP21B genes in 21-hydroxylase deficiency using polymerase chain reaction amplification.* Mol Endocrinol. 1990; 4:125-131.
91. **Higashi Y, Hiromasa T, Tanae A, Miki T, Nakura J, Kondo T, Ohura T, Ogawa E, Nakayama K, Fuyii-Kuriyama Y.** *Effects of individual mutations in the*

- P-450(c21) pseudogene on the P-450(c21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency.* J Biochem (Tokyo).1991; 109:638-644.
92. **Amor M, Parker KL, Globerman H, New MI, White PC.** *A mutation in the CYP21B gene (Ile-172 to Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency.* Proc Natl Acad Sci USA. 1988; 85:1600-1604.
93. **Chiou SH, Hu MC, Chung BC.** *A missence mutation at Ile-172-Asn or Arg-356-Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency.* J Biol Chem. 1990; 265:3549-3552.
94. **Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Hiromasa T, Fujii-Kuriyama Y.** *Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase (P450C21) deficiency in humans: possible gene conversion products.* Proc Natl Acad Sci USA. 1988; 85:7486-7490.
95. **Tusie-Luna MT, Traktman P, White PC.** *Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene CYP21 using recombinant vaccinia virus.* J Biol Chem. 1990; 265:20916-20922.
96. **Globerman H, Amor M, Parker KL, New MI, White PC.** *A nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency.* J Clin Invest.1988; 82:139-144.
97. **Helmberg A, Tusie-Luna MT, Tabarelli M, Kofler B, White PC.** *R339H and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid deficiency that are not apparent gene conversion.* Mol Endocrinol. 1992; 6:1318-1322.
98. **Wedell A, Luthman H.** *Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations.* Hum Mol Genet. 1993; 2:459-504.
99. **Owerbach D, Sherman L, Ballard AL, Azziz R.** *Pro-453 to Ser mutation in CYP21 is associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency.* Mol Endocrinol. 1992; 6:1211-1215.
100. **Wedell A.** *Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency): Implications for diagnosis, prognosis and treatment.* Acta Paediatr. 1998; 87:159-164.
101. **Wedell A, Thilén A, Ritzen EM, Stengler B, Luthman H.** *Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation.* J Clin Endocrinol Metab. 1994; 78:1145-1152.

102. **Tajima T, Fujieda K, Nakayama K, Fujii-Kuriyama Y.** *Molecular analysis of patients and carriers genes with congenital steroid 21-hydroxylase deficiency by using polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism.* J Clin Invest. 1993; 92:2182-2190.
103. **Morel Y, Mebarki F, Portrat S.** *Les apports médicaux de la biologie moléculaire des hyperplasies congénitales des surrénales. En: Chaussain JL, Roger M (eds.). La surrénale de l'enfant.* Paris: SEPE. 1994: 155-182.
104. **Levo A, Partanen J.** *Mutation-haplotype analysis of steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency in Finland. Implications for the population history of defective alleles.* Hum Genet. 1997; 99:488-497.
105. **Wedell A, Stengler B, Luthman H.** *Characterization of mutations on the rare duplicated C4/CYP21 haplotype.* Hum Genet. 1994; 94:50-54.
106. **Pang S, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon ICT, Dobbind RH, Kling S, Fujieda K, Suwa S.** *Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.* Pediatrics. 1988; 81:866-874.
107. **Sherman SL, Aston CE, Morton NE, Speiser PW, New MI.** *A segregation and linkage study of classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency.* Am J Hum Genet. 1988; 42:830-838.
108. **Dumic M, Brkljacic L, Speiser PW, Wood E, Crawford C, Plavsic V, Baniceviac M, Radmanovic S, Radica A, Kasteian A, New MI.** *An update on the frequency of nonclassic deficiency of adrenal 21-hydroxylase in the Yugoslav population.* Acta Endocrinol. 1990; 122:703-710.
109. **Forest MG.** *Secretory patterns of adrenal androgens in puberty.* En: **Pombo M, Rosenfeld RG (eds.). Two decades of experience in growth.** Serono Symposia Publications; vol 100. New York: Raven Press. 1993: 97-116.
110. **Morris AH, Reiter EO, Geffner ME.** *Absence of non classical congenital adrenal hyperplasia in patients with precocious adrenarche.* J Clin Endocrinol Metab. 1989; 69:709-715.
111. **Forest MG, De Peretti E, David M.** *Late onset 21-OH deficiency (21-OHD) can be misdiagnosed as "typical premature pubarche" in childhood.* Pediatr Res. 1985; 79:624.

112. **Siegel SF, Finegold DN, Urban MD.** *Premature pubarche: etiological heterogeneity.* J Clin Endocrinol Metab. 1992; 74:239-247.
113. **Temek JW, Pang S, Nelson C.** *Genetic defects of steroidogenesis in premature pubarche.* J Clin Endocrinol Metab. 1987; 64:609-617.
114. **Killeen AA, Hanson NQ, Eklund R, Cairl CJ, Eckfeldt JH.** *Prevalence of nonclassical congenital adrenal hyperplasia among women self-referred for electrolytic treatment of hirsutism.* Am J Med Genet. 1992; 42:197-200.
115. **Lee MM, Rajagopalan L, Berg GJ, Moshang T Jr.** *Serum adrenal steroid concentrations in premature infants.* J Clin Endocrinol Metab. 1989; 69:1133-1136.
116. **Solyom J, Hosszu E, Gacs G.** *Blood-Spot 17-hydroxyprogesterone daily profiles in infants with congenital adrenal hyperplasia.* Exp Clin Endocrinol. 1990; 96:52-56.
117. **Zerah M, Pang S, New MI.** *Morning salivary 17 hydroxyprogesterone is a useful screening test for nonclassical 21-hydroxylase deficiency.* J Clin Endocrinol Metab. 1987; 65:227-232.
118. **Chetkowski RJ, DeFazio J, Shamonki I, Judd HL, Chang RJ.** *The incidence of the late-onset congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency among hirsute women.* J Clin Endocrinol Metab. 1984; 58:595-598.
119. **Chetkowski RJ, DeFazio J, Shamonki I, Judd HL, Chang RJ.** *Late-onset congenital adrenal hyperplasia.* N Engl J Med. 1986; 314:450.
120. **Rappaport R, Forest MG, Bayard F.** *Plasma androgens and LH in scoliotic patients with premature adrenarche.* J Clin Endocrinol Metab. 1974; 38:401-406.
121. **Granoff A, Chasalow FI, Blethen SL.** *17-hydroxyprogesterone responses to adrenocorticotropin in children with premature adrenarche.* J Clin Endocrinol Metab. 1985; 60:409-412.
122. **Kutten F, Couillin P, Girard F, Billaud L, Vincens M, Boucekkine C, Thalabard JC, Maudelonde T, Spritzer P, Mowszowicz I, Boué A, Mauvais-Jarvis P.** *Late-onset adrenal hyperplasia in hirsutism.* N Engl J Med. 1985; 313:222-231.
123. **Azziz R, Zacur HA.** *21-hydroxylase deficiency in female hyperandrogenism: screening and diagnosis.* J Clin Endocrinol Metab. 1989; 69:577-584.
124. **Petersen KE, Svejaard A, Nielsen MD, Dissing J.** *Heterozygotes and cryptic patients in families of patients with congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase*

- deficiency): *HLA and glyoxalase I typing and hormonal studies*. *Horm Res*. 1982; 16:151-159.
125. **Lee PA, Rosenwaks A, Urban MD, Migeon CJ, Bias WD**. *Attenuated forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982; 55:866-871.
126. **Gutai JP, Kowarski AA, Migeon CJ**. *The detection of the heterozygous carrier for congenital virilizing adrenal hyperplasia*. *J Pediatr*. 1977; 90:924-929.
127. **New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS, Dupont B, Stoner E, Levy DJ, Pang S, Levine LS**. *Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983; 57:320-326.
128. **Rosenfield RL, Halke J, Lucky AW**. *Dexamethasone preparation does not alter corticoid and androgen responses to adrenocorticotropin*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985; 60:585-589.
129. **Azziz R, Dewailly D, Owerbach D**. *Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 78:810-815.
130. **Fiet J, Gueux B, Gourmelen M, Kuttenn F, Vexiau P, Couillin P, Pham HTM, Villette JM, Raux-Demay MC, Galons H**. *Comparison of basal and adrenocorticotropin-stimulated plasma 21-deoxycortisol and 17-hydroxyprogesterone values as biological markers of late-onset adrenal hyperplasia*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988; 66:659-667.
131. **Fiet J, Gueux B, Raux-Demay MC, Kuttenn F, Vexiau P, Brerault JL, Couillin P, Galons H, Villette JM, Julien R, Dreux C**. *Increased plasma 21-deoxycorticosterone levels in late-onset adrenal 21-hydroxylase deficiency suggest a mild defect of the mineralocorticoid pathway*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989; 68:542-547.
132. **Solish SB, Goldsmith MA, Voultainen R, Miller WL**. *Molecular characterization of a Leyding cell tumor presenting as congenital adrenal hyperplasia*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989; 69:1148-1152.
133. **Cara JF, Moshang T, Bongiovanni AM, Marx BS**. *Elevated 17-hydroxyprogesterone and testosterone in a newborn with 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency*. *N Engl J Med*. 1985; 313:618-621.



134. **Wilkins L, Lewis RA, Klein R, Gardner LI, Crigler JF, Rosemberg E, Migeon CJ.** *Treatment of congenital adrenal hyperplasia with cortisone.* J Clin Endocrinol Metab. 1951; 11:1-25.
135. **Bartter FC, Albright F, Forbes AP, Leaf A, Dempsey E, Carroll E.** *The effects of adrenocorticotropic hormone and cortisone in adrenogenital syndrome associated with congenital adrenal hyperplasia: an attempt to explain and correct its disordered hormonal pattern.* J Clin Invest. 1951; 30:237-351.
136. **Urban MD, Lee PA, Migeon CJ.** *Adult height and fertility in man with congenital virilizing adrenal hyperplasia.* N Eng J Med. 1978; 299:1392-1396.
137. **Hughes IA.** *Management of congenital adrenal hyperplasia.* Arch Dis Child. 1988; 63:1399-1404.
138. **Lee PA, Plotnick LP, Kowarski AA, Migeon CJ, eds.** *Congenital adrenal hyperplasia.* Baltimore: University Park Press.1997.
139. **Linder BL, Feuillan P, Chrousos GP.** *Alternate day prednisone therapy in congenital adrenal hyperplasia: adrenal androgen suppression and normal growth.* J Clin Endocrinol Metab. 1989; 69:191-195.
140. **New MI, White P, Pang S, Dupont B, Speiser P.** *The adrenal hyperplasias.* En: **Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D (eds.).** *The metabolic basis of inherited disease.* New York. McGraw-Hill. 1989:1881-1917.
141. **Linder BL, Esteban NV, Yergey AL, Winterer JC, Loriaux L, Cassorla F.** *Cortisol production rate in childhood and adolescence.* J Pediatr. 1990; 117:892-896.
142. **Kerrigan JR, Veldhuis JD, Leyo SA, Iranmanesh A, Rogol AD.** *Estimation of daily cortisol production and clearance rates in normal pubertal males by deconvolution analysis.* J Clin Endocrinol Metab. 1993; 76:1505-1510.
143. **Guest R, Rappaport R, Phioippe F.** *Survenue de vergetures graves chez des adolescents atteints d'hyperplasie surrénale congénitale par défaut de 21-hydroxylation et traités par la dexaméthasone.* Arch Fr Pediat. 1983; 40: 453-456.
144. **Morel Y, Bertrand J, Rappaport R.** *Disorders of hormonesynthesis.* En: **Bertrand J, Rappaport R, Sizonenko PC (eds.).** *Pediatric endocrinology, 2<sup>nd</sup> ed.* Baltimore: Williams and Wilkins. 1993: 305-322.
145. **Young MC, Hughes IA.** *Response of congenital adrenal hyperplasia in infancy.* Arch Dis Child. 1990; 65:441-444.

146. **Rittmaster RS.** *Evaluation and treatment of hirsutism.* Infertil Reproductive Med Clin North Am. 1991; 2:511-529.
147. **Srikanth MS, West BR, Ishitani M, Isaacs H Jr, Applebaum H, Costin G.** *Benign testicular tumors in children with congenital adrenal hyperplasia.* J Ped Surg. 1992; 27:639-641.
148. **Cunnah D, Perry L, Dacie JA, Grant DB, Lowe DG, Savage MO.** *Bilateral testicular tumours in congenital adrenal hyperplasia: a continuing diagnostic and therapeutic dilemma.* Clin Endocrinol. 1989; 30:141-147.
149. **Davis JM, Woodroof J, Sadasivan R, Stephens R.** *Case report: congenital adrenal hyperplasia and malignant Leydig cell tumor.* Am J Med Sci. 1995; 309:63-65.
150. **Mulaikal RM, Migeon CJ, Rick JA.** *Fertility rates in female patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.* N Engl J Med. 1987; 316:178-182.
151. **Kuhnle U, M B, Schwarz HP.** *Partnership and sexuality in adult female patients with congenital adrenal hyperplasia. First results of cross-sectional quality-of-life evaluation.* J Steroid Biochem Molec Biol. 1993; 45:123-126.
152. **Bonaccordi AC, Adler I, Figueiredo JG.** *Male fertility due to congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and therapeutic results in three patients.* Fertil Steril. 1987; 47:664-670.
153. **Federman DD.** *Psychosexual adjustment in congenital adrenal hyperplasia.* N Engl J Med. 1987; 316:209-211.
154. **Frasier SD, Thorneycroft IH, Weiss BA, Horton R.** *Elevated amniotic fluid concentration of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone in congenital adrenal hyperplasia.* J Pediatr. 1975; 86:310-314.
155. **Pan SY, Clark A.** *Newborn screening, prenatal diagnosis, and prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.* Trends Endocrinol Metab. 1990; 1:300-307.
156. **Forest MG, David M, Morel Y.** *Prenatal diagnosis and treatment of 21-hydroxylase deficiency.* J Steroid Biochem Mol Biol. 1993; 45:75-82.
157. **Rhoads GG, Jackson LG, Schlesselman SE, de la Cruz FF, Desnick RJ, Golbus MS, Ledbetter DH, Lubs HA, Mahoney MJ, Pergament E.** *The safety*

- and efficacy of chorionic villous sampling for early prenatal diagnosis of cytogenetic abnormalities.* N Engl J Med. 1989; 320:609-617.
158. **Mornet E, Boué J, Raux-Demay M, Couillin P, Oury J, Dumez Y, Dausset J, Cohen D, Boué A.** *First trimester prenatal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency by linkage analysis to HLA-DNA probes and by 17-hydroxyprogesterone determination.* Hum Genet. 1986; 73:358-364.
159. **Forest MG, Bétuel H, David M.** *Prenatal treatment in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: update 88 of the French multicentric study.* Endocrine Res. 1989; 15:277-301.
160. **David M, Forest MG.** *Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia resulting from 21-hydroxylase deficiency.* J Pediat. 1984; 105:799-803.
161. **Pang S, Clark AT, Freeman LC, Dolan LM, Immken L, Mueller OT, Stiff D, Shulman DI.** *Maternal side effects of prenatal dexamethasone therapy for fetal congenital hyperplasia.* J Clin Endocrinol Metab. 1992; 75:249-253.
162. **Karaviti LP, Mercado AB, Mercado MB, Speiser PW, Buegeleisen M, Crawford C.** *Prenatal diagnosis/treatment in families at risk for infants with steroid 21-hydroxylase deficiency (congenital adrenal hyperplasia).* J Steroid Biochem Mol Biol. 1992; 41:445-451.
163. **Dörr HG, Sippel WG, Bidlingmaier F.** *Experience with intrauterine therapy of congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency.* The Endocrine Society 70<sup>th</sup> Annual Meeting. New Orleans. 1988; Abst 3.
164. **Wilkins L.** *Adrenal disorders II. Congenital virilizing adrenal hyperplasia.* Arch Dis Child. 1962; 37:231-241.
165. **Therrell BI (ed.).** *Advances in neonatal screening.* Amsterdam: Excerpta Medica Intl Cong Series. Elsevier. 1987.
166. **Terasaki PI.** *Microdroplet assay for human blood lymphotoxins.* En: *Histocompatibility Testing.* National Academy of Sciences. Washington DC. 1965: 171.
167. **Vives J.** *B-lymphocyte typing.* En: *Eight International Histocompatibility Workshop Newsletter.* 1978; 5:15.
168. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.* Nucleic Acids Res. 1988; 16:1215.

169. **Southern EM.** *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.* J. Mol. Biol. 1975; 98:503-517.
170. **Feinberg AP, Vogelstein B.** *A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.* Anal Biochem. 1983; 132:6-13.
171. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Sharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Erlich HA.** *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.* Science. 1988; 239:487-491.
172. **Oriola J, Plensa I, Machuca I, Pavía C, Rivera-Fillat F.** *Rapid screening method for detecting mutations in the 21-hydroxylase gene.* Clin Chem. 1997; 43:557-561.
173. **Domenech Massons JM.** *Bioestadística. Métodos estadísticos para investigadores.* Ed. Herder. Barcelona. 1977.
174. **Woolf B.** *On estimating the relation between blood group and disease.* Ann Hum. Genet. 1955; 19:251-253.
175. **Crecchio L.** *Sopra un caso di apparenze virili in una donna.* Morgagni. 1865; 7: 151-183.
176. **Bachega TA, Brenha EM, Billerbeck AE, Marcondes JA, Madureira G, Arnhold IJ, Mendonca BB.** *Variable ACTH-stimulated 17-hydroxyprogesterone values in 21-hydroxylase deficiency carriers are not related to the different CYP21 gene mutations.* J Clin Endocrinol Metab. 2002; 87:786-790.
177. **White PC, New MI, Dupont B.** *Congenital adrenal hyperplasia: part I.* N Engl J Med. 1987; 316:1519-1524.
178. **Dupont B, Viridis R, Lerner AJ, Nelson L, Pollack MS, New MI.** *Distinct HLA-B antigen associations for the salt-wasting and simple virilizing forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.* En: *Histocompatibility Testing 1984*, edited by **Terasaki PI**, Heidelberg, Springer-Verlag. 1984: 660.
179. **Dupont B, Pollack MS, Levine LS, O'Neill GJ, Hawkins BR, New MI.** *Congenital adrenal hyperplasia.* En: **Terasaki PI** (ed) *Histocompatibility testing 1980.* UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles. 1980: 693-706
180. **Donohoue PA, Van Dop C, Migeon CJ, Mc Lean RH, Bias WB.** *Coupling of HLA-A3,Cw6,Bw47,DR7 and a normal CA21HB steroid 21-hydroxylase gene in the old order Amish.* J Clin Endocrinol Metab. 1987; 65:980-986.

181. **Werkmeister JW, New MI, Dupont B, White PC.** *Frequent deletion and duplication of the steroid 21-hydroxylase genes.* Am J Hum Genet. 1986; 39:461-469.
182. **Holler W, Scholz S, Knorr D, Bidlingmaier F, Keller E, Ekkehard DA.** *Genetic differences between the salt-wasting, simple virilizing and nonclassical types of congenital adrenal hyperplasia.* J Clin Endocrinol Metab. 1985; 60:757-763.
183. **Pollack MS, Levine LS, O'Neill GJ, Pang S, Lorenzen F, Kohn B, Rondanini GF, Chiumello G, New MI, Dupont B.** *HLA linkage and B14,DR1,BfS haplotype association with the genes for late-onset and cryptic 21-hydroxylase deficiency.* Am J Hum Genet. 1981; 33:540-550.
184. **Bodmer WF.** *The HLA system 1984.* En: *Histocompatibility Testing 1984.* Editado por Albert E, Baur MP. Mayr Hunksgaard Copenhagen. 1984: 11-22.
185. **Morel Y, David M, Forest MG, Betuel H, Hauptman G, Andre J, Bertrand J, Miller WL.** *Gene conversions and rearrangements cause discordance between inheritance of forms of 21-hydroxylase deficiency and HLA types.* J Clin Endocrinol Metab. 1989; 68:592-599.
186. **Mao R, Nelson L, Kates R, Miller CE, Donaldson DL, Tang W, Ward K.** *Prenatal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency caused by gene conversion and rearrangements: pitfalls and molecular diagnostic solutions.* Prenat Diagn. 2002; 22: 1171-1176.
187. **Pollack MS, Levine LS, Pang S, Owen RP, Nitowsky HM, Maurer D, New MI, Duchon M, Merkatz IR, Sachs G, Dupont B.** *Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) by HLA typing.* Lancet. 1979; 1:1107-1108.
188. **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.
189. **Mercado AB, Wilson RC, Cheng KC, Wei JQ, New MI.** *Prenatal treatment and diagnosis of congenital adrenal hyperplasia owing to steroid 21-hydroxylase deficiency.* J Clin Endocrinol Metab. 1995; 80:2014-2020.

190. **Mornet E, Boué J, Crète P, Raux-Demey MC, Kутten F, Boué A.** *Données récentes sur la biologie moléculaire du déficit en 21-hydroxylase.* Arch Fr Pédiatr. 1992; 49:57-62.
191. **Speiser PW, New MI, Tannin GM, Pickering D, Young Yang S, White PC.** *Genotype of Yupik Eskimos with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.* Hum Genet. 1992; 88:647-648.
192. **Vadimovich O, Vladimirovich A, Genrikhoua I, Anatolevich V.** *Preliminary investigation of mutations in 21-hydroxylase gene in patients with congenital adrenal hyperplasia in Russia.* Hum Mut. 1995; 5:131-136.
193. **Wedell A, Chun X, Luthman H.** *A steroid 21-hydroxylase allele concomitantly carrying four disease-causing mutations is not uncommon in the Swedish population.* Hum Genet. 1994; 93:204-206.
194. **Owerbach D, Ballard AL, Draznin MB.** *Salt wasting congenital hyperplasia: detection and characterization of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene, CYP21, using the polymerase chain reaction.* J Clin Endocrinol Metab. 1992; 74:553-558.
195. **Dracopoulou-Vabouli M, Maniati-Christidi M, Dacou-Voutetakis C.** *The spectrum of molecular defects of the CYP21 gene in the Hellenic population: variable concordance between genotype and phenotype in the different forms of congenital adrenal hyperplasia.* J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86:2845-2848.
196. **Mathur R, Menon PS, Kabra M, Goyal RK, Verma IC.** *Molecular characterization of mutations in Indian children with congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency.* J Pediatr Endocrinol Metab. 2001; 14:27-35.
197. **Lobato MN, Ordoñez-Sánchez ML, Tusie-Luna MT, Meseguer A.** *Mutation analysis in patients with congenital adrenal hyperplasia in the Spanish population: identification of putative novel steroid 21-hydroxylase deficiency alleles associated with the classic form of the disease.* Hum Hered. 1999; 49:169-175.
198. **Ezquieta B, Cueva E, Oyarzabal M, Oliver A, Varela JM, Jariego C.** *Gene conversion (655G splicing mutation) and the founder effect (Gln318Stop) contribute to the most frequent severe point mutations in congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in the Spanish population.* Clin Genet. 2002; 62: 181-188.

199. **Baumgartner-Parzer SM, Schulze E, Waldhausl W, Pauschenwein S, Rondot S, Nowotny P, Meyer K, Frisch H, Waldhauser F, Vierhapper H.** *Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Austria: identification of a novel missense mutation.* J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86:4771-4775.
200. **Grigorescu-Sido A, Schulze E, Grigorescu-Sido P, Heinrich U, Nistor T, Duncea I.** *Mutational analysis and genotype-phenotype correlation in patients with classic 21-hydroxylase deficiency from transylvania (north-west Romania).* J Pediatr Endocrinol Metab. 2002; 15:1505-1514.
201. **Deneux C, Tardy V, Dib A, Mornet E, Billaud L, Charron D, Morel Y, Kuttann F.** *Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.* J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86:207-213.
202. **Ezquieta B, Cueva E, Varela J, Oliver A, Fernandez J, Jariego C.** *Non-classical 21-hydroxylase deficiency in children: association of adrenocorticotrophic hormone-stimulated 17-hydroxyprogesterone with the risk of compound heterozygosity with severe mutations.* Acta Paediatr. 2002; 91:892-898.
203. **Dain LB, Buzzalino ND, Oneto A, Belli S, Stivel M, Pasqualini T, Minutolo C, Charreau EH, Alba LG.** *Classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency: a molecular study of Argentine patients.* Clin Endocrinol. 2002; 56:239-245.
204. **Helmberg A.** *Twin genes and endocrine disease: CYP21 and CYP11B genes.* Acta Endocrinologica. 1993; 129:97-108.
205. **Collier S, Mayada T, Strachan T.** *A de novo pathological point mutation at the 21-hydroxylase locus: implications for gene conversions in the human genome.* Nature Genetics. 1993; 3:260-264.
206. **Fitness J, Dixit N, Webster D, Torresani T, Pergolizzi R, Speiser PW, Day DJ.** *Genotyping of CYP21, linked chromosome 6p markers, and a sex-specific gene in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia.* J Clin Endocrinol Metab. 1999; 84:960-966.
207. **Stoner E, Dimartino-Nardi J, Kuhnle U, Levine LS, Oberfield SE, New MI.** *Is salt-wasting in congenital adrenal hyperplasia due to the same gene as the fasciculata defect?* Clin Endocrinol. 1986; 24:9-20.
208. **Winkel CA, Casey ML, Worley RJ, Madden JD, Mac Donald PC.** *Extraadrenal steroid 21-hydroxylase activity in a woman with congenital adrenal*

- hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab.* 1983; 56:104-107.
209. **Strachan T.** *Molecular pathology of 21-hydroxylase deficiency. J Inher Metab Dis.* 1994; 17:430-441.
210. **Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC, New MI.** *Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80:2322-2329.
211. **Dacou-Voutetakis C, Dracopoulou M.** *High incidence of molecular defects of the CYP21 gene in patients with premature adrenarche. J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:1570-1574.