

Hiperplasia suprarrenal congénita no clásica o tardía

Milagros Alonso¹, Begoña Ezquieta²

¹Hospital Ramón y Cajal. Madrid. ²Hospital Gregorio Marañón. Madrid

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) es una de las enfermedades más frecuentes en endocrinología pediátrica. Es una familia de trastornos autosómico recesivos, debidos a defectos en uno de los cinco pasos enzimáticos requeridos para la síntesis del cortisol en la glándula suprarrenal. Al secretarse deficiente cantidad de cortisol, los niveles de ACTH se elevan lo que estimula la síntesis hormonal adrenal dando lugar a una hiperplasia del córtex adrenal. El déficit de 21 hidroxilasa supone el 95% de los casos ¹. Los estudios clínicos y genéticos han demostrado la existencia de formas severas y moderadas, en función del grado de afectación de la actividad enzimática ². En las formas severas o clásicas, el déficit es completo e inician sus manifestaciones en la época fetal o neonatal, mientras que en las formas moderadas o no clásicas el déficit es parcial y se manifiestan en la infancia o adolescencia, y pueden pasar desapercibidas hasta la edad adulta o incluso permanecer asintomáticas (formas crípticas).

Aunque se han descrito formas no clásicas por déficit de 11-hidroxilasa ³, la gran mayoría de estas formas moderadas ocurre por déficit de 21-hidroxilasa (P450c21), enzima codificada por el gen CYP21A2, con acúmulo de precursores proximales al bloqueo (progesterona y 17OH progesterona) y derivación hacia la producción de andrógenos (dehidroepiandrosterona y androstendiona).

Frecuencia y base molecular de la deficiencia de 21-hidroxilasa, forma no clásica en población española

La hiperplasia suprarrenal congénita por deficiencia de esteroide 21-hidroxilasa (HSC-21OHD, OMIM 201910) es una entidad recesiva no infrecuente (frecuencia de portadores de mutación grave de 1:50-1:60 en población general) de lo que

se deriva la importancia de realizar un adecuado consejo genético. La frecuencia descrita para las formas no clásicas oscila entre el 0,1% y el 1% ⁴. Los datos para nuestra población, estimados en base a la prevalencia de la mutación p.Val281Leu en muestras del cribado neonatal y, por tanto incluyendo también las que serían formas crípticas, indican una frecuencia del 0,3% ⁵. Las formas no clásicas de deficiencia de 21-hidroxilasa (D21OH-NC), aunque fueron denominadas "parciales", se deben también a mutaciones en ambos alelos (patrón recesivo) pero, en este caso, en al menos uno de ellos, la mutación es de tipo leve. La existencia de una mutación leve ha sido asociada a una actividad enzimática residual del 30-40%.

Las mutaciones puntuales que, por su frecuencia en nuestro medio, se incluyen en la batería de cribado son p.Pro30Leu, p.Val281Leu y p.Pro453Ser, mutaciones puntuales leves propias de formas tardías; p.Ile172Asn y p.Arg426His, de formas virilizantes simples; c.293 A o C>G en intrón 2, delección de 8 pb en exón 3 (c.323-339del), triple mutación en exón 6 [p.Ile236Asn; p.Val237Asp; p.Met239Lys], [p.Val281Leu;c.292+5G>A], c.923 dupT, p.Gln318Stop y p.Arg356Trp, mutaciones severas que en homocigosis ó en heterocigoto compuesta dan lugar a formas pierde-sal, y que en heterocigosis con mutaciones leves, pueden presentarse en formas tardías ¹.

Las delecciones y conversiones grandes del gen son también alteraciones recurrentes, siempre de tipo grave, que también deben ser analizadas. Algunas de las mutaciones puntuales mencionadas pueden encontrarse en alelos que presentan algún tipo de reordenamiento que puede modificar su severidad, por lo que hacen imprescindible que su estudio no se limite exclusivamente a su detección como tal variante puntual como son: la p.Pro30Leu que

cuando asocia la conversión en 5' es un alelo moderadamente severo⁶, la p.Gln318Stop que cuando se encuentra en alelos que presentan duplicación del gen funcional son variantes de la normalidad que raramente encontramos en pacientes pero que no son infrecuentes en cromosomas normales⁷.

El mecanismo especial de producción de mutaciones existente en CYP21A2 explica la elevada frecuencia de esta enfermedad, aunque también existe una diseminación favorecida (efecto fundador) de algunos alelos mutados. Los alelos mutados, una vez que aparecen, son estables y se transmiten por generaciones⁸. En ocasiones (1% de los alelos deficientes) se asiste al momento en que se genera la alteración, mutaciones *de novo*⁹, que frecuentemente se derivan de los mecanismos mencionados y son, por tanto, detectables en el cribado básico.

Un pequeño porcentaje de los alelos deficientes muestran alteraciones heredadas de sus progenitores que son más raras aunque no son individuales. Con frecuencia, especialmente en el caso de las mutaciones de tipo grave, éstas ya han sido descritas y evaluadas en otros pacientes y se encuentran incluidas en bases de datos de consulta (ver apartado de referencias); por lo que en este caso puede ofrecerse una interpretación adecuada en los informes de diagnóstico de pacientes.

En la Tabla 1 se recogen los resultados de frecuencias de los distintos tipos de alelos mutados en las formas leves HSC-21OHD en población española: formas no clásicas, hiperandrogenismos con 17OH progesterona moderadamente elevada y en la población general. Las formas clínicas tardías presentan primordialmente mutaciones de cambio de aminoácido y son frecuentemente homocigotas para p.Val281Leu, más frecuentemente heterocigotas compuestas para dos mutaciones puntuales leves (p.Val281Leu+p.Pro30Leu, p.Val281Leu+p.Pro453Ser), y heterocigotas compuestas con mutación severa en un 41%.

La mutación puntual severa más frecuente es un cambio c.293Aoc>G que afecta al procesamiento del mRNA y se localiza en el intrón 2, constituye una tercera parte de los alelos clásicos y se encuentra en un 4,5% de las no clásicas (Tabla 1). El resto de mutaciones puntuales severas presentan frecuencias menores. Las deleciones y conversiones grandes del gen se encuentran en un 5-6% de estas formas tardías que tienen expresividad clínica. El caso concreto de la heterocigosis compuesta de mutación puntual leve y deleción/conversión (hemizigosis) debe ser especialmente tenido en cuenta ya que en los estudios directos de mutaciones puntuales (secuenciación, hibridación específica de alelo, etc...) esta hemizigosis (ausencia de señal con el alelo normal) es indistinguible de la homocigosis si

no se realizan los estudios complementarios oportunos de segregación parental y/o dosis génica.

En la 21OHD se hace imprescindible el establecimiento de la segregación de alelos, y es la documentación de dos mutaciones segregadas en los progenitores o en otros familiares la que dará el diagnóstico. No son infrecuentes (2%, Tabla 1) los alelos con dobles mutaciones puntuales ([c.293Aoc>G; p.Val281Leu], [c.293Aoc>G; p.Pro453Ser], o pequeñas conversiones que afecten a dos mutaciones consecutivas [p.Val281Leu; p.Ile172Asn], [p.Val281Leu; c.923dupT], [p.Gln318Stop; p.Arg356Trp]. En ocasiones, que aunque infrecuentes son de gran trascendencia para el consejo genético, hemos encontrado que el alelo portador de la frecuente mutación leve p.Val281Leu incluye en *cis* una alteración intrónica c.292+5G>A, que se comporta como un alelo de tipo severo. Este alelo en heterocigosis compuesta con mutaciones severas y en hemizigosis con deleciones o conversiones grandes lo hemos encontrado en 9 formas pierdesal en pacientes españoles¹¹ por lo que consideramos esta variante de forma sistemática para mejorar la caracterización de los alelos p.Val281Leu.

El estudio conjunto de deleciones, conversiones y las mutaciones puntuales mencionadas (cribado básico) permite la caracterización del 93% de los alelos en formas clásicas (95% pierde sal y 91% virilizantes simples) y el 85% de los alelos de formas no clásicas en nuestra población. La informatividad del estudio molecular es elevada ya que en un 85% de los pacientes con formas clásicas se caracterizan ambos alelos, en un 14,5% uno sólo de los alelos y en <1% no se caracterizaría ninguno. La homocigosis para las mutaciones raras es generalmente debida a consanguinidad, a veces ancestral y no conocida y puede ser detectada mediante el análisis de marcadores tipo microsatélite⁸. En el caso de las formas no clásicas, se caracterizan ambos alelos en un 72%, y puede no caracterizarse ningún alelo en un 2% de los pacientes aunque, como hemos dicho, el potencial de caracterización del cribado básico para los alelos graves, que son los de mayor interés dentro del consejo genético, supera el 90%.

La caracterización de un único alelo en un paciente con forma no clásica puede corresponder con una caracterización parcial y se puede recurrir a la secuenciación que permite una caracterización complementaria, exhaustiva en las mutaciones severas (<1% quedan sin caracterizar) y más incompleta para los alelos leves (10-13%, sin caracterizar). Algunos alelos leves podrían presentar alteraciones en zonas reguladoras en 5' y 3' del gen que todavía no pueden ser valoradas con precisión, aunque afortunadamente tendrían una trascendencia menor para el consejo genético. A diferencia de

Tabla 1. Formas no clásicas (Grupo I) e hiperandrogenismos con 17OH progesterona en el rango de portadores de 21OHD (Grupo II). Frecuencias de los alelos 21OHD en población española. La 17OH progesterona media en cada uno de los grupos se expresa en ng/mL, entre paréntesis la desviación estándar. Adaptado de Ezquieta *et al. Horm Res* 2009.

	Pacientes pediátricos ^a (n=681)				Portadores en población general ^b (n=326)	
	Grupo I (n=375, 750 alelos) Mujeres=290/Varones=85 17OHP basal 23,1 (32,1) 17OHP tras ACTH 48,9 (33,3)	Frecuencia alélicas (%) ^c	Alelos (n)	Frecuencia alélicas (%)	Alelos (n)	Frecuencia alélicas (%)
Delecciones	27	3,6	6	2% (1)	0	0
Conversiones	17	2,3	6	2% (1)	1	0,3% (0,15)
c.293Aoc>G (655G, i2G)	34	4,5	6	2% (1)	1	0,3% (0,15)
c.332-339del (Del8)	2	0,3	0	0	0	0
p.1le172Asn	27	3,6	2	0,6% (0,3)	0	0
p.[Ile236Asn;Val237Glu;Met239Lys]	1	0,1	0	0	0	0
c.923dupT (306insT)	2	0,3	0	0	0	0
p.Gln318Stop	18	2,4	7	2,2% (1,1)	1	0,3% (0,15)
p.Arg356Trp	8	1,1	2	0,6% (0,3)	0	0
Pro30(Convs')	9	0,6	1	0,3% (0,15)	0	0
p.Val281Leu;c.292+5G>A	1	0,1	0	0	0	0
Dobles mutaciones severas	16	2,1	1	0,4% (0,2)	1	0,3% (0,15)
Stop318Dup (no 21OHDdef)*	0	0	10	3,2% (1,6%)	10	3% (1,5%)
p.Pro30Leu	18	2,4	4	1,4% (0,7)	0	0
p.Val281Leu	344	45,9	102	33,4% (16,7)	32	9,8% (4,9)
p.Pro453Ser	32	4,0	5	1,6% (0,8)	2	0,8% (1,6)
Alteraciones raras (secuenciación)		13 (1,7%)		nd	1 (0,15%)	
Alelos ^d	n	Nº alelos/nºpacientes ^d	n	Frecuencia portadores	n	Frecuencia portadores
SEVEROS	152	41%	30	10%	5	1,5%
LEVES			111	36%	34	11,0%

^a Sólo se incluyen pacientes genotipados. Mutaciones severas y leves, en la parte superior e inferior de la Tabla. Las mutaciones puntuales se incluyen siguiendo el orden en que se encuentran los exones en que se localizan. *La variante que presenta la p.Gln318Stop en alelo portador de duplicación del gen no asocia deficiencia (Ezquieta *et al.*, 2006).

^b Portadores en población general (en cursiva, los individuos analizados como parejas de portadores ó afectados con mutaciones graves por haber solicitado consejo genético [Ezquieta *et al.*, 2006, Ezquieta *et al.*, 2010]).

^c La frecuencia alélicas se refiere al total de alelos (2 x nº pacientes), la frecuencia de portadores se calcula en los grupos I y población general y es igual al doble de la frecuencia alélicas.

^d Se indica el número (n) de alelos leves y severos en cada grupo de pacientes y en la población general. En el grupo I se especifican los pacientes que resultaron heterocigotos compuestos con mutación severa.

las alteraciones incluidas en el cribado básico, no todas las variantes que se detectan en el estudio de secuencia son mutaciones y es imprescindible interpretar correctamente estos hallazgos. La caracterización de un solo alelo en el caso de los hiperandrogenismos que no alcanzan el dintel de las formas no clásicas no requeriría de caracterización complementaria.

Patofisiología de la D21OH-NC

Por el déficit de 21-OH existe una conversión defectuosa de la 17-OHP en 11-deoxicortisol y por ello de cortisol y, como consecuencia, aumento de la secreción de ACTH. Esta estimulación adrenal aumenta la producción de andrógenos. La gravedad de la enfermedad está en relación con la mutación que determina la actividad de la enzima. En pacientes, con la forma no clásica, esa actividad está reducida pero es suficiente para mantener una secreción normal de glucocorticoide y de mineralocorticoide, a expensas de la excesiva producción de andrógenos.

Los pacientes con D21OH-NC son hiperandrogénicos (primariamente con exceso de producción de androstendiona) e hiperprogesterogénicos (elevación de 17-OHP y P4), aunque los mecanismos subyacentes al exceso de secreción hormonal son complejos y variados. Lo más frecuente es que los síntomas del D21OH-NC empiecen en etapa peripuberal. En ese periodo se producen alteraciones fisiológicas en la esteroidogénesis adrenocortical lo que deriva en un aumento de la secreción de andrógenos adrenales característico de la adrenarquia. En los pacientes con D21OH-NC este hecho fisiológico se exagera desarrollándose el hiperandrogenismo adrenal.

Presentación clínica

Los individuos afectados por una HSC clásica presentan desde el periodo neonatal o en los primeros meses de vida insuficiencia suprarrenal con o sin pérdida salina y más tarde virilización. Los fetos femeninos se virilizan y nacen con genitales ambiguos.

Las formas no clásicas nacen con genitales normales apareciendo los signos de exceso de andrógenos más tardíamente, en la infancia, la pubertad o la vida adulta.

Los signos clínicos en la infancia incluyen pubarquia prematura, aceleración de la edad ósea y del crecimiento y acné. Las adolescentes y las mujeres adultas presentan acné, hirsutismo, irregularidades menstruales e hipofertilidad.

La presentación clínica es extremadamente variable con uno o más signos hiperandrogénicos.

Todos los pacientes con D21OH-NC confirmada por estudio genético molecular desarrollan con el tiempo uno o más signos de hiperandrogenismo, incluso aquellos que fueron inicialmente asintomáticos⁽¹²⁾.

Niños

Los niños con D21OH-NC pueden presentar después de los primeros años de edad signos de hiperandrogenismo, sin insuficiencia suprarrenal. Estos pueden incluir:

- Pubarquia prematura (PP): ésta aparece tanto en niños como en niñas a edad tan temprana como a los 6 meses¹³. La PP está presente entre 79 y el 92% de los casos con D21OH-NC^{6,14}. La existencia de PP obliga a realizar el despistaje de la D21OH-NC dado que entre el 4 y el 20% de los niños con PP la presentan¹⁵⁻¹⁷.
- Acné quístico resistente a tratamiento con antibióticos o retinol.
- Aceleración del crecimiento con talla alta en la infancia y avance de la edad ósea.
- Pubertad temprana con cierre precoz de las epífisis llevando a talla baja o inferior a su talla genética, aunque la talla baja no es un dato constante. Estos pacientes son altos de niños pero bajos de adultos. La talla adulta espontánea se sitúa cercana a -1 SDS aunque adecuada a su talla genética⁽¹⁷⁾; no obstante, existen casos que no alcanzan su potencial genético. La identificación temprana en estos pacientes muy sintomáticos con aceleración importante de la EO y predicción de talla final baja más otros signos de hiperandrogenismo obliga a considerar terapia sustitutiva para controlar los síntomas debidos al exceso de andrógenos.

En la Tabla 3 se muestran los signos clínicos de 239 pacientes pediátricos españoles genotipados que presentaban formas no clásicas de 21OHD de la serie de Ezquieta⁽¹⁰⁾.

Pubarquia prematura: cómo distinguir el D21OH-NC de la adrenarquia

La pubarquia prematura (PP) se define por el comienzo del vello púbico antes de los 8 años en la niña o antes de los 9 años en el varón. La PP es consecuencia de la adrenarquia prematura (AP) o secreción precoz no patológica de los andrógenos adrenales. La adrenarquia es un término que se refiere a la maduración aumentada de la producción de andrógenos suprarrenales, que empieza a los 6 años en las niñas y a los 7 años en los niños y se caracteriza por un aumento de 17OH pregnenolona y de DHEA y DHEAS plasmáticas. Cuando la adrenarquia es prematura los niveles de dichas hormonas están elevados para la edad y los de la androstendiona y testosterona en el límite superior de la normalidad para la edad prepuberal. La PP

Tabla 3. Signos clínicos en pacientes pediátricos y adolescentes genotipados, formas no clásicas e hiperandrogenismos con 17OH progesterona tras ACTH en rango de portadores. Datos clínicos y bioquímicos. Adaptado de Ezquieta *et al. Horm Res* 2009.

	Signos clínicos (% pacientes ^a)				
	Formas no clásicas (n=239)		valor p	Portadores con hiperandrogenismo (n=111)	
	pacientes ^b	%		pacientes ^b	%
Pubarquia prematura	189	79%	0.8	86	77%
Aceleración de la edad ósea	155	65%	0.022	57	51%
Talla alta	13	5%	0.63	4	4%
Axilarquia	8	3%	0.097	9	8%
Telarquia prematura	7	2%	0.4	6	5%
Clitoromegalia/ Macrogenitosomía	20	8%	0.59	12	11%
Olor corporal	3	1%	0.57	0	0
Hirsutismo	28	12%	0.23	19	17%
Acné	6	3%	0.98	2	2%
Reglas irregulares	10	4%	0.19	1	1%
Pubertad precoz	23	10%	0.79	9	8%
Edad ^c (años) min-max	5.92	(0.5-10)	0.068	6.54	(0.5-10)
Sexo, chicos (%)	55	23%	0.02	13	11.7%
Número de signos al diagnóstico (SD)	2.03	(1.12)	0.24	1,9	(0.32)
^a Sólo se han incluido los pacientes completamente genotipados para los que se disponía de información clínica. ^b Número de pacientes para los que el endocrinólogo había reportado la existencia de dicho signo. ^c La edad se recoge con una precisión de 0,5 años.					

ocurre después de los 4-5 años pero puede ocurrir a los 2 años. La PP en estos últimos se debe, probablemente, a la persistencia de la zona fetal de la glándula adrenal, a hipersensibilidad de los folículos pilosos o a ambos. Tienen aumento de DHEAS y androstendiona en relación a la edad.

La PP idiopática por adrenaquia prematura se precede, a menudo, de aumento de la sudoración apocrina, seborrea y acné leve. No se acompaña de avance de EO, ni de velocidad de crecimiento, ni otros signos de pubertad. El vello aumenta lentamente y la EO en paralelo a la velocidad de crecimiento.

La causa precisa de la adrenaquia prematura es desconocida pero los estudios retrospectivos sugieren que muchas chicas evaluadas inicialmente por PP tienen síntomas de SOP en la adolescencia¹⁹. El desarrollo de la PP ha sido asociado a hiperinsulinismo y resistencia insulínica. Algunas de esas niñas tienen aumento del IMC, factor importante en la regulación de la adrenaquia²⁰.

Desde el punto de vista clínico no siempre es fácil distinguir si la PP es debida a una D21OH-NC o a una adrenaquia. Algunos estudios han mostrado que en el caso de la D21OH-NC los niños son más altos, con mayor IMC y con aceleración de la edad ósea²¹. Sin embargo, un estudio reciente⁽¹⁵⁾ realizado en 238 pacientes pediátricos con PP y de los que el 4% eran formas no clásicas de HSC no encuentra diferencia clínica alguna entre ambos grupos cuando son valorados en la primera consulta, siendo la edad similar (6,6 años). Es posible que los distintos resultados reportados se deban a que los pacientes en ellos incluidos fueran de mayor edad.

Adolescentes y mujeres jóvenes

En las adolescentes y mujeres hiperandrogénicas se estima que entre el 1-10 % el hiperandrogenismo puede ser debido una D21OH-NC²²⁻²⁵. La incidencia exacta varía según el grupo étnico y la región geográfica; en una publicación francesa se estimó en el 6%, en un estudio americano más re-

ciente sólo en el 1,6%; y es del 2,2% en las mujeres hiperandrogénicas españolas.

La presentación clínica del D21OH-NC en mujeres, a menudo, es indistinguible de otros trastornos hiperandrogénicos como el síndrome de ovario poliquístico (SOP) ²⁵. Las mujeres con D21OH-NC rara vez están más virilizadas que en otras causas de hiperandrogenismo ovárico y otras veces son diagnosticadas por su acné siendo eumenorreicas.

En la población femenina con D21OH-NC el hirsutismo es el signo más frecuente, con mucho. Sin embargo, la gravedad del hirsutismo y la edad de la paciente en la primera consulta son muy variables para el mismo genotipo y dentro de una misma familia e incluso entre pacientes con genotipos homocigotos de formas leves en comparación con aquellos con un alelo de forma severa ²⁶. El estudio familiar de miembros afectados de D21OH-NC dentro de una misma familia subraya la expresión clínica variable de la misma, lo que sugiere que factores modificadores pueden modular la expresión fenotípica.

Los trastornos menstruales como la oligomenorrea, anovulación, amenorrea e infertilidad son frecuentes debidos a la disfunción ovárica. Según sugieren algunos estudios estas irregularidades pueden ser debidas a la conversión del exceso de andrógenos adrenales en estrógenos lo que provocaría alteración en la secreción cíclica de gonadotropinas.

La clitoromegalia, el hábito masculino y la recesión temporal del pelo son infrecuentes. La presencia de la clitoromegalia, al menos en parte, está en relación con la gravedad de la disfunción adrenocortical.

En un estudio multicéntrico reciente con 220 mujeres con D21OH-NC, de las que 25 eran menores de 10 años, la presentación clínica variaba con la edad de la paciente sugiriendo la naturaleza progresiva del trastorno ¹⁴:

- Casi todas las pacientes menores de 10 años se presentaban con PP; tenían clitoromegalia y acné el 20%.
- En adolescentes y mujeres los signos clínicos de presentación fueron: hirsutismo en el 59%, oligomenorrea en el 54%, acné en el 33%, infertilidad en el 13%, clitoromegalia en el 10%, alopecia en el 8% y amenorrea primaria en el 4%. La prevalencia de hirsutismo, que no la severidad, en las pacientes mayores de 10 años, aumentaba significativamente con la edad, desde un 70% en adolescentes hasta un 90% en mujeres de 40 a 49 años. La prevalencia del resto de los signos no tenía clara relación con la edad.

La presentación clínica en algunas mujeres con D21OH-NC es con un síndrome de ovario poliquístico. El SOP según los criterios diagnósticos del consenso del 2003 se define por la presencia de 2 de los 3 hallazgos siguientes: ovarios poliquísticos por ecografía clínica o bioquímica de hiperandrogenismo y alteraciones menstruales o anovulación. Dado que la D21OH-NC puede presentarse con esas anomalías, ante un SOP siempre hay que descartar el déficit de 21 hidroxilasa. Ante este diagnóstico, aunque el tratamiento más conveniente sea el mismo para ambas situaciones -anticonceptivos y antiandrogénicos- es necesario el estudio molecular para descartar la presencia de una mutación severa en cuyo caso se realizará consejo genético cuando sea el momento. También se señalan casos de mujeres asintomáticas con D21OH-NC que fueron diagnosticadas por estudios familiares y que tienen el mismo perfil hormonal que las mujeres sintomáticas con D21OH-NC. Serían las denominadas formas crípticas. No obstante, el no consultar por hirsutismo no quiere decir que no exista o que no vaya a existir ulteriormente.

Hay pocos datos acerca de los varones con D21OH-NC. En la infancia se presentan con pubarquia, talla alta y aceleración de la edad ósea y en la adolescencia con talla inferior a su talla diana y estancamiento de crecimiento. En la edad adulta pueden tener manifestaciones del exceso androgénico con calvicie, oligospermia y disminución de la fertilidad, situación en la que se puede valorar tratamiento corticoideo.

Screening de la D21OH-NC: marcadores clínico-bioquímicos.

Diagnóstico: 17OHP tras estimulación con ACTH

La 17OH progesterona es el marcador bioquímico de la deficiencia de 21-hidroxilasa, responsable del 90-95% de las HSC tanto clásicas como no clásicas.

El diagnóstico de D21OH-NC se establece por una 17OHP plasmática basal superior a 5 ng/ml o por una respuesta exagerada de 17OHP plasmática tras el test de ACTH. Un pico de respuesta superior a 10 ng/ml ²⁷ es sugestivo de déficit de 21-hidroxilasa. El diagnóstico es definitivo si el pico es superior a 15 ng/ml ²². En población española Ezquieta lo ha establecido en 11,95 ng/ml (Tabla 2) ⁶.

Este test requiere la estancia en una unidad de día siendo costoso y molesto para el paciente. Dada la baja incidencia de la D21OH-NC en la población pediátrica con PP o en adolescentes y mujeres hiperandrogénicas el test de ACTH no debería ser utilizado de rutina. Se hace necesario identificar marcadores o predictores clínicos/ bioquímicos de la D21OH-NC.

Tabla 2. Niveles del metabolito marcador de la deficiencia 21OHD (17OH progesterona basal y tras ACTH) en formas no clásicas 21OHD, portadores 21OHD con hiperandrogenismo y familiares portadores y no portadores sin clínica (Ezquieta *et al Horm Res* 2009).

		17OHP (ng/ml)	
		basal	post- ACTH ^c
		media (DS)	media (DS)
		mínimo-máximo	mínimo-máximo
Pacientes pediátricos^a M =79; F=389	Formas no-clásicas 21OHD genotipadas n=246 pacientes	23,1 (32,1)	48,9 (33,3)
		2,7-118	14,2-153
	Portadores 21OHD con hiperandrogenismo n=222 pacientes	2,2 (1,4)	7,3 (2,7)
		0,2-6,2	2,4-13,2
Hermano/as^b (familias con INDICE 21OHD)	No portadores		2,1 (0,95) 0,4-3,6
	Portadores		7,15 (2,4) 4,7-13,2

^aSólo se consideraron en este análisis los pacientes con datos bioquímicos disponibles que habían sido completamente genotipados (ambos alelos 21OHD caracterizados).

^b Los puntos de corte para portadores y no portadores habían sido definidos en Ezquieta *et al*, 2002.

Desde el punto de vista clínico, como ya se ha indicado, la sintomatología puede no ser muy diferente en aquellos pacientes con D21OH-NC respecto a los que presentan PP idiopática, datos, sin embargo, no corroborados por todos ^{12,15}. Tampoco los signos de hiperandrogenismo en adolescentes y mujeres son distintos de los debidos a otras causas como el hiperandrogenismo ovárico.

Como *screening* bioquímico para la D21OH-NC se utiliza la 17-OHP basal plasmática, extraída entre 8 y 9 de la mañana -para minimizar los falsos negativos debidos al ritmo circadiano- y en fase folicular si se trata de mujeres postmenarquia. No deben haber sido tratados con corticoides previamente al test de ACTH.

El punto de corte de 2 ng/ml para la 17OHP basal ofrece más del 95% de sensibilidad y más de 90% de especificidad para predecir la D21OH-NC tanto en pacientes pediátricos con PP ¹⁵ como en mujeres hiperandrogénicas ²⁸.

Hay que señalar, no obstante, que con el punto de corte de 2 ng/ml para la 17OHP basal puede existir hasta un 8% de falsos negativos ^{14,26}. En la amplia serie de Ezquieta de 484 pacientes con formas no clásicas genotipadas sólo 5 de ellos tuvieron 17OHP basal inferior a 2 ng/ml y en sólo 3 (0,5%) fue inferior a 1 ng/ml. Ibáñez aconseja hacer el test de ACTH para confirmar la D21OH-NC ante unos niveles basales de 17OHP plasmática por encima de la media +2DS (1 ng/ml) para pacientes prepuberales y por encima de 2 ng/ml para adolescentes postmenárquicas ²⁹. De lo dicho se infiere que un valor de la

17OHP basal de 1 ng/ml en la edad prepuberal se puede utilizar para el *screening* de la D21OH-NC.

En un estudio con población pediátrica con PP se han identificado 3 predictores plasmáticos basales fuertemente asociados a D21OH-NC: un valor de 17OHP superior a 2 ng/ml, de androstendiona superior a 0,95 ng/ml y de testosterona por encima de 0,15 ng/ml (el valor predictivo de los 2 últimos no ha sido determinado estadísticamente) ¹⁵.

Niveles de 17 OH progesterona en pacientes y portadores genotipados en la población española

Población "normal": familiares portadores y no portadores

Al igual que en otras entidades recesivas frecuentes, el elevado número de portadores en la población general hace que se deba recurrir a los datos en familiares para disponer de "verdaderos" portadores y no portadores. Por tanto, se seleccionaron familias que habían sido completamente caracterizadas y para las que se disponía de datos de 17OHP y mutaciones segregadas en progenitores y hermanos que, a su vez habían sido evaluados por su pediatra endocrinólogo, para conocer los valores de referencia en la población normal y portadora ⁽⁶⁾. En la Tabla 3 se recogen los datos de 17OHP en los grupos control de familiares portadores y no portadores y en pacientes genotipados, formas no clásicas y portadores con hiperandrogenismo.

El punto de corte diagnóstico de la D21OH-NC para la 17OH progesterona, en ng/ml, tras estimulación con ACTH, para el 95% de la población española

de portadores genotipados ($7,15 + 2 \times 2,4 = 11,95$) es similar al obtenido al multiplicar por 3 el límite superior de la normalidad ($2,1 + 0,95 \times 2 = 4$), siguiendo la indicación de Azziz *et al* (21) Tabla 3.

Formas no clásicas: homo- y heterocigotos compuestos para alteración/es leves vs heterocigotos compuestos leve/severa

En estas formas bialélicas los niveles de 17OHP, tanto basales como tras ACTH son significativamente superiores en los heterocigotos compuestos con mutación severa (Tablas 4 y 5). Las curvas ROC muestran áreas bajo la curva significativas, aunque siempre sólo predictivas; ya que sólo será concluyente la documentación de la mutación severa por análisis genotípico.⁶ La expresividad clínica de las formas heterocigotas compuestas es superior como recoge New en su revisión¹² y han mostrado estudios de otros grupos³⁰. En la serie pediátrica de Ezquieta *et al.*⁶, de las formas no clásicas genotipadas, el número de signos al diagnóstico en los heterocigotos compuestos con alteración leve/severa (recogidos en la solicitud del estudio molecular) no es significativamente superior. Debemos considerar que quizás puede existir un sesgo involuntario al reportar con mayor precisión los signos de los pacientes para los que la sospecha diagnóstica está menos fundamentada por los datos del marcador bioquímico de la deficiencia.

En las Tablas 4 y 5 se muestran los valores de 17OHP y su comparación entre los grupos más específicos de distintos genotipos concretos. Resalta el hecho de que la heterocigosis compuesta para p.Pro453Ser y p.Val281Leu muestra los valores más bajos dentro de los pacientes genotipados.

Tratamiento de la HSC forma no clásica

Hay dos modos de tratar el hiperandrogenismo: o disminuyendo la producción excesiva de andrógenos por la adrenal con glucocorticoides o bloqueando los efectos de los andrógenos en los receptores con antiandrógenos.

El fundamento del tratamiento con glucocorticoides es suprimir el exceso de andrógenos y de precursores esteroideos que se producen como consecuencia del déficit enzimático de la 21 hidroxilasa con un objetivo: en la edad pediátrica evitando la aceleración de la edad ósea y así conseguir una talla adulta adecuada a su talla genética y en la adolescencia y edad adulta reducir los signos y consecuencias del hiperandrogenismo como son el hirsutismo y la hipofertilidad.

Como término medio, la talla adulta de los pacientes no tratados es adecuada a su talla genética con excepción de los casos muy sintomáticos¹⁸. Por otra parte, la talla adulta de las formas clásicas se

sitúa en -1 DS para su talla genética a pesar de un adecuado tratamiento y buen control hormonal³¹ que no siempre es posible sobre todo en el periodo peripuberal³¹, momento de difícil ajuste terapéutico. En las formas no clásicas algún estudio apoya el tratamiento con glucocorticoides basándose en la mejoría de la talla final sobre todo si el tratamiento se ha instaurado antes de la pubertad^{33,34} pero no hay datos concluyentes.

Por lo anterior y además debido a la escasez de estudios sobre la talla final de los pacientes con D21OH-NC tratados *versus* no tratados, creemos que no hay evidencia científica que avale el tratamiento de forma sistemática con corticoides en la forma no clásica de déficit de 21-hidroxilasa. Se reservarán para las formas muy sintomáticas:

1. En la edad pediátrica si la pubarquia es rápidamente evolutiva y se acompaña de aceleración importante de la edad ósea con pronóstico de talla final baja. Frecuentemente, cuando estos niños se ven por primera vez en la consulta tienen un adelanto de la edad ósea de 2 años. Si la talla final pudiera resultar comprometida, y siempre que la edad ósea sea inferior a 12 años, el tratamiento con HGH y análogos de LHRH puede resultar beneficioso.
2. En las adolescentes para el hirsutismo y el acné grave. En ellas los antiandrógenos son tan efectivos o más, sólo o asociados a anti-conceptivos³⁵.
3. En la edad adulta pueden ser necesarios en casos de hipofertilidad en tratamientos limitados en el tiempo.

A mayor abundamiento, las recomendaciones del grupo de expertos de *The Endocrine Society* de 2010 son³⁶:

1. Sugerir tratamiento en aquellos niños con D21OH-NC con comienzo inapropiadamente precoz de la pubarquia y en progresión rápida así como avance de la edad ósea y en adolescentes con virilización manifiesta.
2. Recomiendan no tratar a individuos asintomáticos con D21OH-NC
3. Sugieren que antes de instaurar tratamiento se de la opción de suspenderlo cuando los síntomas se han resuelto. En el caso de iniciar tratamiento en la edad pediátrica se hará con hidrocortisona a dosis bajas, generalmente a mitad de la dosis de la forma clásica, a 8-10 mg/m²/día, en 2-3 dosis al día. La prednisona y la dexametasona solo se emplearán una vez finalizado el crecimiento y si la frenación con hidrocortisona no es la correcta. Si el signo clínico más evidente es el hirsutismo o el acné, un antiandrógeno, incluida la ciproterona con o sin anticonceptivo puede ser más eficaz.

Genotipos	Pacientes ^a	Signos clínicos al diagnóstico ^b						17OH progesterona ^c (ng/mL)		
		PP	AEO	Ppub	H	Clitorio Macrog	Otros ^d	basal	postACTH	
Val281Leu/Val281Leu	28(24)	18(75)	16(67)	4(17)	3(12)	1(4)	1(4)	18,0 (20,1); 2,4-75 (n=23)	46,4 (21,8) ; 21,0-116 (n=22)	
Val281Leu /Pro453Ser	6(5)	3(60)	3(60)	0	1(20)	1(20)	0	6,9 (2,4) ; 4,0-11,0 (n=6)	28,5 (9,7) ; 18,7-47 (n=6)	
Val281Leu /DelB o Val281Leu /ConvB	12(10)	9(90)	8(80)	0	3(30)	0	0	23,7 (12,5); 9,9-45 (n=12)	75,3 (28,3) ; 33,4-123(n=7)	
Val281Leu /655G	4(4)	3(75)	4(100)	0	0	0	0	40,5 (10,2); 26,4-48,9 (n=4)	nd	
Val281Leu /doble micro- conversión	5(3)	3(100)	1(33)	0	0	0	0	29,1 (14,9); 6,8-48,8 (n=5)	72,9 (19,3) ; 54-92,5 (n=3)	
Val281Leu /Gln318Stop	3(3)	2(66)	3(100)	0	0	2(66)	0	47 (9,5) ; 3,6-56 (n=3)	103 (43,6); 72-134 (n=3)	
Pro30Leu/Ile172Asn	2(1)	1(100)	1(100)	0	1(100)	1(50)	0	nd	73,7 (n=1)	

^a Número de pacientes (entre paréntesis el número con datos clínicos disponibles) * El resto de pacientes con otros genotipos, Val281Leu/Val283Leu (paciente 105), Val281Leu/Pro30Leu (paciente 110) en el primer grupo, y His 61Leu/Del (paciente 17), Val281Leu/Arg356Trp (paciente 75) y His61Leu/Gln318Stop (paciente 79) en el segundo, no se incluyen en esta Tabla debido al bajo número de pacientes. ^b PP, pubarquia prematura; AEO, aceleración de la edad ósea; Clitor, clitoromegalia, H, hirsutismo; Ppub, pubertad precoz. Número y porcentaje (%) de pacientes con el genotipo que mostraron dicho signo al diagnóstico. ^c 17OH progesterona basal y estimulada (media [desviación estándar] y rangos, en paréntesis el número de pacientes. ^d Acné, axilarquia

Tabla 4. Signos clínicos y niveles de 17OH progesterona en pacientes pediátricos adaptada de Ezquieta *et al. Acta Paed.* 2002. En la Tabla nº 5 se muestran los datos de 17OH progesterona para grupos de pacientes más amplios, disponibles en 2012, incluyendo intervalos de confianza 95%.

Tabla 5. Niveles de 17OH progesterona en pacientes pediátricos con diversos genotipos de forma no clásica 21OHD .

Genotipos	Pacientes ^a	17 OH progesterona (ng/mL)			
		basal	Intervalo confianza (95%)	postACTH	Intervalo confianza (95%)
p.Val281Leu/ p.Val281Leu	192/122	14,3 (12,3)	12,5-16,0	46,1 (27,4)	41,2-51,0
p.Val281Leu /p.Pro453Ser	19/19	10,2 (8,0)	6,3-14,1	25,5 (9,1)	21,1-29,9
p.Val281Leu /Delección p.Val281Leu /Conversión	51/28	24,0 (18,2)	18,6-29,4	53,3 (33,9)	39,9-66,1
Val281Leu /c.293-13A>G (i2G, 655G)	28/16	29,7 (35,0)	16,1-43,3	62,2 (42,0)	39,8-84,6
p.Val281Leu /p.Gln318Stop ^c	20/13	36,9 (24,8)	25,3-48,5	79,9 (37,1)	57,5-102,3
Leve/leve	211/141	13,9 (12,0)	12,3-15,5	43,3 (26,6)	38,9-47,7
Severa/leve	99/57	27,3 (24,8)	22,3-32,3	61,9 (37,9)	51,8-71,9
Valor "p" Leve/leve vs Severa/Leve		<0,00001		<0,0001	

^a Número de pacientes con datos bioquímicos disponibles, basal/postACTH. Los datos reportados como "superior" a zona lineal de detección no pudieron incluirse en este análisis. ^b 17OH progesterona basal y estimulada: media (desviación estándar); máximo y mínimo. ^c Sólo se consideraron los pacientes en que la mutación se había documentado como severa (ausencia de duplicación del gen).

Complicaciones potenciales de la D21OH-NC

La mayor parte de los pacientes, en contraste con la forma clásica, no demuestran insuficiencia de cortisol. Tras estímulo con CRF, el cortisol y la ACTH basales y estimuladas suelen ser normales. Sin embargo, en algún paciente la respuesta del cortisol es deficiente sobre todo tras estímulo prolongado con ACTH.

Por otra parte, aquellos casos de D21OH-NC que reciben tratamiento corticoideo pueden tener suprimido el eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal por lo que precisan el uso de dosis de estrés en caso de enfermedad.

Consejo genético en la D21OH-NC

Es requerido cuando se ha documentado que existe un alelo con alteración grave y se debe extender a los familiares en primeros y segundo grado³⁷. El estudio de los familiares resulta, además, conveniente porque permite establecer la segregación de alelos y documentar mejor los genotipos y su severidad. Se debe aportar cuando el/la paciente está próximo a tomar decisiones reproductivas.

Aunque obviamente puede haberse conocido antes, en la etapa pediátrica (diagnóstico de una forma no clásica o en un estudio familiar) o incluso en la neonatal (elevación transitoria o forma no clásica eventualmente detectada en cribado neonatal o incluso determinación 17OHP asociada a signos inespecíficos que han llevado a la realización de un estudio molecular).

El estudio genético es imprescindible para el consejo genético de estos pacientes ya que permite documentar las mutaciones graves que se encuentran en el 40% de los pacientes D21OH-NC con expresividad clínica. Algunos autores reportan porcentajes superiores como el 60%³⁷. Debemos recordar que la frecuencia de portadores de mutación grave en población general es del 1:50-1:60 y las parejas de pacientes heterocigotas compuestas con alelo severo pueden solicitar este consejo para el que hacemos secuenciación CYP21A2 para descartar portadores. En el contexto de la reproducción asistida, la HSC-21OHD no debe ser olvidada ya que puede asociar infertilidad y la frecuencia de portadores en población general³⁸.

Como aspectos claves del estudio genético en la D21OH-NC señalaremos que debe:

- Discriminarse la homo/hemizigosis para las mutaciones leves. Esta situación es extraordinariamente frecuente en el caso de p.Val281Leu que se presenta con ausencia de señal para alelo normal en los estudios de secuenciación, ASO, SNaPshot, etc.... La homocigosis (mutación leve p.Val281Leu en ambos alelos) es el genotipo predominante pero la hemizigosis al corresponder con una heterocigosis compuesta para mutación leve y severa (deleción/conversión en el segundo alelo) debe ser detectada para el consejo genético. Puede llevarse a cabo mediante:
 - Segregación parental
 - » Dosis génica (Southern, MLPA)
- Identificar variantes leves que asociadas con otras alteraciones en *cis* (en el mismo cromosoma) son alelos graves:
 - p.Pro30Leu en conversiones que incluyen región promotora 5´
 - p.Val281Leu y p.Pro453Ser en dobles microconversiones con 655G, i2G (c.293-13A>C>G)
 - p.Val281Leu en conversiones que incluyen varias mutaciones puntuales recurrentes severas, p.Val281Leu con la nueva variante intrónica c.292+5G>A. Ambos se comportan como alelos severos y sus frecuencias en las formas clásicas son del 6% y 1,5%, respectivamente ¹¹. Más infrecuentes (<1%) han sido los alelos que portan p.Val281Leu y una mutación grave rara, 2/510 alelos de formas graves ¹¹.
- Interpretación adecuada de las alteraciones no conocidas detectadas por secuenciación en los pacientes no completamente caracterizados en el cribado básico. Detectar alelos portadores de mutaciones raras en aquellos casos con 17OH progesterona en rango de heterocigotos compuestos con mutación rara en que sólo se ha caracterizado la variante leve en el cribado básico ^{6,39}.

A diferencia de la D21OH-NC, los hiperandrogenismos con 17OHP en rango de portadores 21OHD nunca presentan mutaciones en ambos alelos y se documentan como portadores (siempre en un solo alelo) con mayor frecuencia que la población general (Tabla 1). Si la alteración detectada es de tipo grave debe aportarse consejo genético. Es muy importante:

- Discriminar alelo portador p.Gln318Stop de variante Gln318Stop en alelos que presentan duplicación del gen y no asocian deficiencia, no son infrecuentes en cromosomas normales 2-3% ⁷.

- En los frecuentes alelos p.Val281Leu detectados, descartar la variante p.Val281Leu; c.292+5G>C recientemente descrita por Ezquieta *et al.*(2010) que, aunque es rara, se asocia con formas pierde sal y modificaría el consejo genético a realizar.
- Controlar la eficiencia de la amplificación de la variante normal i2C (c.293-13C) donde se localiza la frecuente mutación severa i2G (c.293-12A>C>G) que en el pasado dio lugar a pacientes portadores informados como falsos homocigotos i2G.
- No olvidar descartar portadores de deleciones/conversiones ya que resultan normales en el estudio de mutaciones puntuales.
- Si se realiza estudio de secuenciación garantizar una adecuada interpretación de las variantes nuevas cuyo efecto fenotípico no está documentado.

Páginas web con bases de datos genotípicos HSC-21OHD

HGMD, Human gene mutation database, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
 Base específica de alelos CYP, <http://www.cypalleles.ki.se>
 Orphanet, <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php?lng=ES>

Bibliografía

1. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia. *Endocr Rev* 2000;21:245-291.
2. Speiser PW, DuPont J, Zhu D *et al.* Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 1992;90:584-595.
3. Parajes S, Loidi L, Reisch N *et al.* Functional consequences of seven novel mutations in the CYP11B1 gene: four mutations associated with non classical and three mutations causing classical 11-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:779-788.
4. Speiser PW, DuPont J, Rubinstein P *et al.* High frequency of non classical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am Hum Genet* 1985; 37:650-67.
5. Ezquieta B, Ruano MF, Dulin E, Arnao DR, Rodríguez A. Prevalence of frequent recessive diseases in the spanish population through DNA analyses on samples from the neonatal screening. *MedClin* 2005; 125:493-5.
6. Ezquieta B, Cueva E, Varela J, Oliver A, Fernández 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.
7. Ezquieta B, M Beneyto, R Muñoz-Pacheco, R Barrio, M Oyarzábal, JL Lechuga, C Luzuriaga, F Hermoso, S Quinteiro, S Martínez. Gene duplications in 21-hydroxylase deficiency: the importance of accurate molecular diagnosis in carrier detection and prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2006; 26:1172-8.
8. Ezquieta B, Oyarzábal M, Jariego CM, Varela JM, Chueca M. A novel frameshift in the first exon of the 21-OH gene found in homozygosity in an apparently nonconsanguineous family. *Horm Res* 1999;51: 135-141.
9. Díez López I, Rodríguez Estevez A, González Molina E, Ezquieta Zubicaray B. De novo I172N mutation in a patient with 21-hydroxylase deficiency. *J Med Clin (Barc).* 2010;135: 189-91.
10. Ezquieta B, Oyarzábal M, Barrio R, Luzuriaga C, Hermoso F, Lechuga JL, Quinteiro S, Rodríguez A, Labarta JI, Gutiérrez Macías A, Gallego M, Bellón JM. Monogenic and Polygenic Models Detected in Steroid 21-Hydroxylase Deficiency-Related Paediatric Hyperandrogenism. *Horm Res.* 2009; 71:28-37.
11. Ezquieta B, Santomé L, Barrio R, Barrionuevo JL, López-Siguero JP, Oliver A, Ramírez J, Rodríguez I, Muñoz-Pacheco R. Carrier detection and prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia must identify "apparently mild" CYP21A2 alleles which associate neonatal salt-wasting disease. *Prenat Diagn.* 2010;30:758-763.
12. New M. Nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:4205-4214.
13. Kohn B, Levine LS, Pollack MS *et al.* Late-onset steroid 21-hydroxylase deficiency : a variant of classical congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 55:817-827.
14. Morán C, Azziz R, Carmina E *et al.* 21-Hydroxylase- deficient non classical adrenal hyperplasia is a progressive disorder: a multicenter study. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1468-74.
15. Armengaud JB, Charcaluk ML, Trivin C *et al.* Precocious pubarche: distinguishing late-onset congenital adrenal hyperplasia from premature adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, 94(8):2835-2840.
16. Forrest MG. Adrenal diseases and steroids. *Curr Opin Pediatr* 1990;2:775-785.
17. Leite MV, Mendonça BB, Arnhold IJ *et al.* Identification of nonclassical 21-hydroxylase deficiency in girls with precocious pubarche. *J Endocrinol Invest* 1991; 14:11-15.
18. New M, Gertner JM, Speiser PW *et al.* Growth and final height in classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Endocrinol Invest* 1989;12:91-95.
19. Ibañez L, Potau N, Virdis R *et al.* Postpubertal outcome in girls diagnosed of premature pubarche during childhood: increased frequency of functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76(6):1599-1603.
20. Remer T, Manz F. Role of nutritional status in the regulation of adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(11):3936-3944.
21. Siegel SF, Finegold DN, Urban MD *et al.* Premature pubarche: etiological heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:239-247.
22. Azziz R, Dewailly D, Owebach D. Clinical review 56: nonclassic adrenal hyperplasia: current Concepts. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78(4):810-815.
23. Kutteenn F, Couillin P, Girard F *et al.* Late-onset adrenal hyperplasia in hirsutism. *N Engl J Med* 1985; 313: 224-231.
24. Azziz R, Woods KS, Reyna R *et al.* The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2745-9.
25. Escobar-Morreale H, Sanchón R, San Millán J. A prospective study of the prevalence of non classical congenital adrenal hyperplasia (NCAH) among women presenting with hyperandrogenic symptoms and signs. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:527-533.
26. Bidet M, Bellanné-Chantelot C, Galand-Portier MB *et al.* Clinical and molecular characterization of a cohort of 161 unrelated women with no classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency and 330 family members. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, 94(5): 1570-1578.
27. New MI, Lorencen F, Lerner AJ *et al.* Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57:320-326.
28. Azziz R, Hincapie L, Knochenhauer E *et al.* Screening for 21-hydroxylase deficient non classical adrenal hyperplasia among hyperandrogenic women: a prospective study. *Fertil and Steril* 1999; 72:915-925.

29. Ibáñez L. Adrenarquia. *En: Dieguez C, Yturriaga R (eds): Glándulas suprarrenales 2ª edición.* McGraw-Hill. Madrid 2008; pp: 121-130.
30. Einaudi S, Napolitano E, Restivo F *et al.* Genotype, phenotype and hormonal levels correlation in non-classical adrenal hyperplasia. *J Endocrinol Invest* 2011; 34:660-64.
31. Muthusamy K, Elamin M, Smishkin G *et al.* Adult height in patients with congenital adrenal hyperplasia: a systematic review and metanalysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:4161-4172.
32. Charmandari E, Brook C, Hindmarsch. Congenital adrenal hyperplasia and puberty. *Eur J Endocrinol* 2004; 151:U77-U82.
33. Weintrob N, Dickerman Z, Sprecher F *et al.* Non-classical 21-hydroxylase deficiency in infancy and childhood: the effect of time of initiation of therapy on puberty and final height. *Eur J Endocrinol* 1997; 136: 188-95.
34. Oliver A, Ezquieta B, Valera JM *et al.* Estudio auxológico, bioquímico, clínico y puberal en las formas no clásicas de déficit de 21-hidroxilasa. *Rev Horm Fact Crecim* 1999; 4:1-8.
35. Frank-Raue K, Junga G, Raue F *et al.* Therapy of hirsutism in females with adrenal enzyme defects of steroid hormone biosynthesis: comparison of dexamethasone with cyproterone acetate. *Klin Wochenschr* 1990; 68:597-601.
36. Speiser P, Azziz R, Bassin L *et al.* Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(9):4133-4160.
37. Young J, Tardy V, B de la Perrière A *et al.* Detection and management of late-onset 21-hydroxylase deficiency in women with hyperandrogenism. *Ann Endocrinol* 2010; 71:14-18.
38. Ezquieta B, Alonso M, Alvarez E, Arnao DR, Siguero JPL. Should 21-hydroxylase deficiency be genotyped in assisted reproductive technology?. *Fertil Steril* 2007;88:1437, e5-11.
39. Bernal C, Fernández C, Martínez S, Ezquieta B. Premature androgenetic alopecia in adult male with nonclassic 21-OH deficiency. A novel nonsense CYP21A2 mutation (Y336X) in 2 affected siblings. *Med Clin (Barc)*. 2006; 127(16):617-21.