

Investigation of Exon 6 Cluster Mutation in CYP21A2 Gene in Iranian Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia

Neda Asghari-Kollahi¹, Fahimeh Baghbani-Arani^{1*}, Azadeh Shojaei²

1. Department of Genetics & Biotechnology, School of Biological Science, Varamin-Pishva branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

2. Department of Medical Genetics and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2017/12/5

Accept: 2018/04/17)

Abstract

Background: Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) is an inherited hereditary autosomal recessive heredity, which is often induced by mutation in the CYP21A2 gene. The aim of the present study was to determine the prevalence of cluster exon 6 mutation among patients with CAH deficient in 21-OHD enzyme in Iranian population.

Materials and Methods: In the current descriptive study, blood samples were collected from 25 patients with CAH who referred to Ali Asghar Hospital in Tehran. After extraction of genomic DNA, the region containing the cluster gene exon 6 gene was amplified using PCR and then sequenced. Finally, by analyzing sequences, the frequency of cluster mutation exon 6 was determined in the population studied.

Results: A total of 15 patients (60%) had a cluster mutation of exon 6, so that in all of them, three mutations V236E, I236N, and M238K were observed as heterozygote. This mutation in the healthy parents of these patients was also identified as heterozygote.

Conclusion: It seems that cluster E6 mutation in the heterozygote form alone does not lead to disease, and it is necessary to examine the presence of other mutations in the gene. This mutation may be present as compound heterozygote along with other mutations in the rest of the exons in patients.

Keywords: 21-Hydroxylase deficiency; CAH; Congenital adrenal hyperplasia CYP21A2

* Corresponding Author: Fahimeh Baghbani-arani
Email: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

بررسی فراوانی جهش cluster E6 در ژن CYP21A2 در بیماران مبتلا به هاپرپلازی مادرزادی آدرنال در بیمارستان حضرت علی اصغر(ع)

ندا اصغری^۱، فهیمه باغبانی آرائی^{۱*}، آزاده شجاعی^۲

۱- گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
۲- گروه ژنتیک پزشکی و زیست‌شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱/۲۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۹/۱۴

چکیده:

سابقه و هدف: هاپرپلازی مادرزادی آدرنال (CAH: Congenital Adrenal Hyperplasia) نوعی بیماری ارثی با توارث اتوزم مغلوب است که در اغلب موارد بر اثر جهش در ژن CYP21A2 ایجاد می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی جهش cluster exon 6 در بین بیماران مبتلا به CAH دارای نقص در آنزیم 21-OHD در جمعیت ایرانی است.

مواد و روش‌ها: تحقیق به روش توصیفی انجام شد و از تعداد ۲۵ بیمار مبتلا به CAH مراجعه کننده به بیمارستان حضرت علی اصغر تهران نمونه خون محیطی گرفته شد. پس از استخراج DNA ژنومی، ناحیه حاوی محل رخداد ژن cluster exon 6 با روش PCR تکثیر و سپس توالی‌یابی شدند. در نهایت با آنالیز توالی‌ها، فراوانی حضور جهش cluster exon 6 در جمعیت مورد مطالعه مشخص شد.

یافته‌ها: ۱۵ بیمار (۶۰ درصد) دارای جهش cluster exon 6 است به طوری که در همه آنها سه جهش I236N، V236E و M238K به صورت هتروزیگوت مشاهده شد. این جهش در والدین سالم این بیماران نیز به صورت هتروزیگوت شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد جهش cluster E6 در فرم هتروزیگوت به تنهایی منجر به بیماری نمی‌شود و به طور حتم باید وجود جهش‌های دیگر در ژن را بررسی کرد. احتمال دارد این جهش به صورت هتروزیگوت مرکب به همراه دیگر جهش‌های موجود در سایر اگزون‌ها در بیماران ظاهر پیدا کند.

واژگان کلیدی: هاپرپلازی مادرزادی آدرنال، CAH، CYP21A2، cluster exon 6

مقدمه:

علت آن نقص در ژن CYP21A2 است. ژن CYP21A2 (سیتوکرم p450 خانواده ۲۱ زیرخانواده A عضو ۲) کدکننده آنزیم ۲۱ هیدروکسیلاز (21-OHD) است که این آنزیم در مسیر بیوشیمیایی ذکر شده، در تبدیل پروژسترون به محصول کورتیکوئیدی مربوطه دخالت دارد (۳).

ژن CYP21 با طولی به اندازه 3500 bp، به همراه ژن کاذب آن (Pseudogene) CYP21P در بازوی کوتاه کروموزوم ۶ (۶p۲۱.۳) در لوکوس (major MHC histocompatibility complex) در کنار ژن‌های (The human leukocyte antigen) قرار دارند (۳). CYP21 و CYP21P هرکدام ۱۰ اگزون دارند و در ۹۸ درصد در اگزون‌ها و ۹۶ درصد در اینترون‌ها با یکدیگر

هایپرپلازی مادرزادی آدرنال (CAH) خانواده‌ای از بیماری‌های ژنتیکی هستند که در اثر نقص آنزیم‌هایی که در مراحل بیوشیمیایی تولید کورتیزول و آلدسترون از کلسترول نقش دارند، ایجاد می‌شود (۱). هر نقص آنزیمی سبب تغییرهای اختصاصی در نسبت پیش‌سازهای هورمونی به محصول نهایی می‌شود و این نبود تعادل هورمونی، علائم کلینیکی متفاوت از جمله ابهام تناسلی، اختلال در هموستاز سدیم و پتاسیم، هیپرتانسیون، بلوغ زودرس، هیپرسوتیسم و آموره را منجر می‌شود (۲). این بیماری الگوی توارث اتوزومال مغلوب دارد و در بیش از ۹۵ درصد موارد،

نویسنده مسئول: فهیمه باغبانی آرائی

پست الکترونیک: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir & Baghbani.f@gmail.com

درجه سانتی گراد، سپس سه برنامه دمایی زیر در ۳۵ چرخه تکرار شد: دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه. در چرخه نهایی مخلوط واکنش ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد ثابت نگه داشته شد تا سنتز رشته‌ها به طور کامل انجام شود. در نهایت محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ آمیزی شده با Green Viewer و با استفاده از اشعه ماورایفوق بنفش مشاهده شد.

پس از اطمینان از تکثیر موفق قطعه موردنظر و کیفیت باندها، محصولات PCR برای توالی‌یابی به شرکت MACROGENE کره جنوبی ارسال شدند. توالی‌های به دست آمده از توالی‌یابی به روش فوق توسط نرم‌افزار choromas و Sequence Scanner v1.0 و با کمک سایت NCBI.ENSEMBLE و Mutation Tester بررسی شدند. با این روش توالی به دست آمده از هر بیمار با توالی مرجع مقایسه شد و بیماران دارای جهش cluster E6 مشخص شدند.

برای بررسی بیماری‌ها بودن جهش موردنظر والدین بیمارانی که این جهش را به صورت هتروزیگوت داشتند نیز بررسی و تمامی مراحل ذکر شده در بالا برای آنها نیز انجام شد.

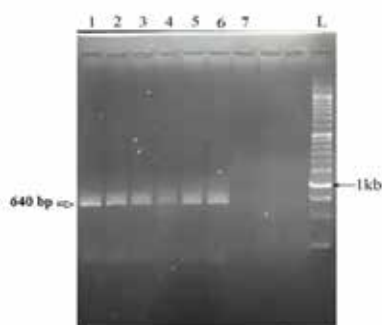
توالی پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر ناحیه حاوی جهش cluster exon 6 در ژن CYP21A2

DNA region amplified	primer	Primer sequence (5' 3')	Size of PCR product (bp)	Reference
CYP21A2/ exon 6&7	CYP-F6 CYP-R7	5'-TGTGGACGTGATTCCTTTTC-3' 5'-AGTGCTCAGAGCTGAGTGAGG-3'	640	(9)

نتایج:

شیوع جهش و نوع آن در نمونه‌ها تعیین و میزان واقعی آن در جامعه برآورد شد. تحقیق روی ۲۵ بیمار مبتلا به CAH متشکل از ۱۹ مرد (۷۶ درصد) و ۶ زن (۲۴ درصد) در محدوده سنی ۶ ماه تا ۲۱ سال (میانگین سنی ۹/۵ سال و انحراف از معیار ۲/۷) انجام شد و پس از تکثیر قطعه مورد نظر و انجام موفق توالی‌یابی آنالیز توالی‌ها نشان دادند که ۱۵ تا از ۲۵ بیمار دارای جهش cluster E6 هستند و ۱۰ بیمار دیگر در اگزون ۶ تغییری را نشان ندادند، به این ترتیب فراوانی جهش در ۶۰ درصد موجود است، میزان واقعی (C.I) برآورد شد. همه ۱۵ بیمار ذکر شده جهش را به صورت هتروزیگوت داشتند و در هیچ بیماری این جهش در فرم هموزیگوت دیده نشد. از ۱۵ بیمار دارای جهش ۱۰ نفر مذکر و ۵ نفر مونث بودند. شکل ۲ گراف مربوط به نتایج ۱ بیمار که در cluster E6 جهش هتروزیگوت دارد را نشان می‌دهد.

آنالیز اگزون ۶ ژن CYP21A2 در والدین این بیماران نیز نشان داد که همگی والدین برخلاف سالم بودن این جهش خوشه‌ای را به فرم هتروزیگوت دارند.



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR با اندازه kb DNA Ladder ۱. ۶۴۰ bp. شماره ۱ تا ۶ نمونه بیمار و شماره ۷ کنترل منفی واکنش است.

تشابه دارند، نزدیک بودن و تشابه این دو ژن احتمال بروز کراسینگ اور نامساوی را افزایش می‌دهد و از سوی دیگر بررسی ژنتیکی نقص‌های آنزیم ۲۱-هیدروکسیلاز را مشکل می‌کند. اکثریت موتاسیون‌های این ژن به صورت حذف و تبدیل شدن (conversion) است (۴). یک جهش خوش‌های در اگزون ۶ ژن CYP21A2، شامل سه تغییر V237E، I236N و M239K شناسایی شده است. هر یک از این جهش‌های جایگزینی به وسیله تبدیل T به A در موقعیت نوکلئوتیدی T1391A و T1385A و T1382A ایجاد می‌شود که باعث کاهش فعالیت آنزیم ۲۱-هیدروکسیلاز می‌شود (۵).

این بیماری از نظر بالینی به دو نوع کلاسیک و غیرکلاسیک (NC) تقسیم می‌شود (۶). در نوع کلاسیک نقص آنزیمی شدیدتر است و باعث بروز علائم بیماری مانند مردانه شدن دستگاه تناسلی خارجی در دختران در بدو تولد می‌شود، در شدیدترین فرم بیماری که با اتلاف نمک همراه است (SW یا Salt Wasting) کمبود هر دو هورمون کورتیزول و آلدوسترون دیده می‌شود (۷). در بیمارانی که شدت ابتلا مختصری کمتر است، سنتز آلدوسترون به مقدار کافی انجام می‌شود اما آندروژن‌های آدرنال افزایش می‌یابد که این اختلال (Simple virilizing یا SV) نامیده می‌شود (۸). نقص آنزیم ۲۱-هیدروکسیلاز در مبتلایان به نوع غیرکلاسیک خفیف‌تر است و این افراد بعد از تولد با علائم بیماری همچون افزایش فعالیت آندروژن‌ها روبه‌رو می‌شوند.

شیوع فرم کلاسیک این بیماری در جمعیت قفقازی یک در ۱۰ هزار تا یک در ۱۵ هزار نفر است (۴)، در حالی که میزان شیوع فرم غیرکلاسیک CAH به میزان قابل توجهی بیشتر و یک در ۱۰۰۰ تا یک در ۲۰۰۰ نفر است (۵).

از آنجا که جهش cluster E6 تنها جهش

خوشه‌ای در این ژن است و حضور آن به کاهش عملکرد آنزیم ۲۱-OHD و عمدتاً فرم کلاسیک بیماری منجر می‌شود، بنابراین بررسی فراوانی آن در هر جمعیت برای کاربرد در مشاوره ژنتیک بیماران مبتلا به CAH حائز اهمیت است. براین اساس این مطالعه برای اولین بار به بررسی این جهش در ژن CYP21A2 در بیماران ایرانی پرداخته است.

مواد و روش‌ها:

مطالعه توصیفی حاضر برای بررسی جهش cluster E6 در ژن CYP21A2 با استفاده از نمونه خون محیطی تعداد ۲۵ بیمار مبتلا به CAH که طی سال‌های ۹۵ تا ۹۶ به بیمارستان علی اصغر تهران مراجعه کرده بودند و بیماری آن‌ها توسط متخصص مربوطه تایید شده بود، انجام شد. پس از ارجاع توسط پزشک متخصص، اطلاعات فردی مثل سن، جنس، ازدواج فامیلی والدین بیمار و سابقه بیماری در خانواده ثبت شد. پس از ارائه توضیحات کافی مربوط به پژوهش حاضر، رضایتنامه کتبی از بیماران یا والدین آن‌ها گرفته شد. برای جمع‌آوری خون به مقدار ۵ سی‌سی از لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA استفاده شد و استخراج DNA از خون توسط کیت یکتا تجهیز آزما (YTA) ساخت کشور ایران انجام شد. برای اندازه‌گیری مقدار، خلوص و غلظت DNAهای استخراج شده، از دستگاه نانودراپ (NanoDrop, USA) استفاده شد. نسبت A260/A280 بین ۱/۸ تا ۲ به دست آمد که نشانه خلوص قابل قبول DNA است. کیفیت DNA ژنومی استخراج شده با استفاده از ژل آگارز نیز بررسی شد.

در این مطالعه از روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی مرارز (PCR) و توالی‌یابی خودکار که استاندارد طلایی بررسی جهش‌ها است، استفاده شد. مطابق جدول زیر (۹-۱۱). برای تکثیر قطعه حاوی اگزون ۶ در واکنش PCR از دو پرایمر CYP-F6 و CYP-R6 استفاده شد که قادر است محصولی با طول ۶۴۰ bp ایجاد کند. در نهایت واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر، با استفاده از Master Mix (Amplicon with 1/5 Mm MgCl2, German) به مقدار ۱۲/۵ میکرولیتر، ۴۰ نانوگرم از DNA الگو و ۱۰ پیکومول از هر پرایمر انجام شد. تکثیر DNA با شرایط دناتوراسیون اولیه به مدت زمان سه دقیقه و دمای ۹۴

مشابه مطالعه‌های قبلی در برزیل، مکزیک و پرتغال هستند. میزان فراوانی جهش هموزیگوت cluster E6 در مطالعه‌های قبلی در ایران، ترکیه و سربیا به ترتیب ۲/۲۷، ۲/۲ و ۰/۹ درصد است که نشان‌دهنده وقوع کم این جهش در فرم هموزیگوت است که با نتیجه این تحقیق همخوانی دارد (۶، ۷، ۱۱-۱۴). اگرچه در مطالعه‌های قبلی هیچ گزارشی مبنی بر بیماری‌زا بودن جهش cluster E6 در فرم هتروزیگوت دیده نشده است اما از آنجا که ۵۶ درصد تا ۷۵ درصد جهش‌ها در ژن CYP21A2 به صورت هتروزیگوت مرکب منجر به بیماری CAH می‌شوند (۱۵، ۱۶) و در این مطالعه ۶۰ درصد افراد دارای این جهش به فرم هتروزیگوت بودند، احتمال جهش‌های دیگر در اگزون‌های دیگر این ژن وجود دارد. به عبارتی دلیل فراوانی بالای این جهش در جامعه ایرانی به احتمال وجود جهش‌های دیگر در ژن است که در نهایت به صورت هتروزیگوت مرکب همراه با جهش cluster E6 توانستند CAH را ایجاد کنند. بنابراین برای بررسی جهش‌های این ژن چه به صورت هتروزیگوت مرکب و چه به صورت هموزیگوت لازم است کل ژن توالی یابی شود.

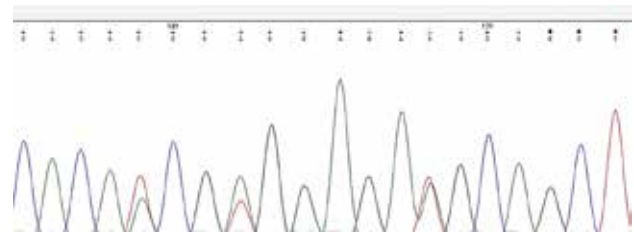
در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ توسط Finkelstein و همکارانش در آمریکا انجام شد، نشان داده شد که وجود سه جهش بیماری‌زای شناخته شده در ژن cluster E6/V281L/I172N (CYP21A2) به صورت هتروزیگوت مرکب منجر به بیماری‌زایی در دو فرد از نوع SW می‌شود (۱۷) و همچنین در مطالعه دیگر در ترکیه توسط Bas و همکاران نشان می‌دهد که وجود همزمان دو جهش هتروزیگوت مرکب c.1382T>A، c.1385T>A، cluster E6 و c.1391T>A و V281L (c.841G>T) در فرد دیگری به نقص در آنزیم ۲۱ هیدروکسیلاز و I172N (c.515T>A) در فرد دیگری به نقص در آنزیم ۲۱ هیدروکسیلاز منجر می‌شود (۳). در سال ۲۰۰۹ در سربیا Milacic و همکارانش در بررسی مشابهی که انجام دادند هیچ جهش هموزیگوت cluster E6 را مشاهده نکردند اما در یک نفر (۱۶ درصد) جهش هتروزیگوت cluster E6 دیده شد که به صورت هتروزیگوت مرکب با جهش c.1357C>T (p.453S) وجود داشت (۹) با توجه به نتیجه این بررسی و تشابه نتایج آن با مطالعه حاضر لزوم بررسی قسمت‌های دیگر ژن برای تعیین هتروزیگوت‌های مرکب احتمالی یادآور می‌شود.

در بخش دوم این مطالعه برای تعیین نقش احتمالی این جهش در بیماری‌زایی، والدین بیمارانی که جهش cluster E6 را در حالت هتروزیگوت داشتند نیز بررسی و مشخص شد این جهش در والدین سالم هم به صورت هتروزیگوت هستند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که جهش cluster E6 در فرم هتروزیگوت به تنهایی به بیماری منجر نمی‌شود و به طور حتم باید وجود جهش‌های دیگر در ژن را بررسی کرد. بنابراین لازم است مشاوران ژنتیک در بررسی بیماران CAH این نکته را در نظر بگیرند.

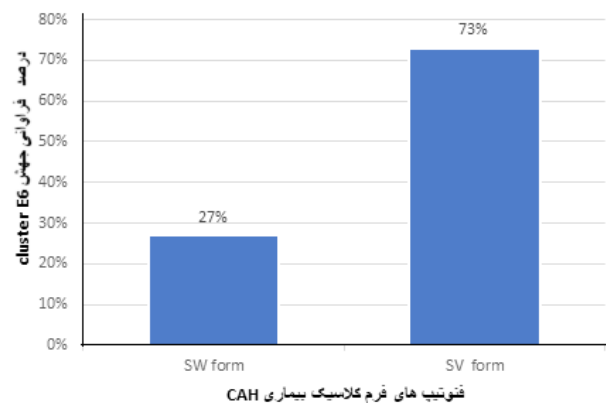
نتیجه‌گیری:

به نظر می‌رسد که فرم هتروزیگوت جهش cluster E6 در بیماران CAH ایرانی نمی‌تواند به ایجاد بیماری منجر شود در حالی که فرم هموزیگوت هر سه تا جهش این خوشه بنا بر مطالعه‌های پیشین بیماری‌زاست. البته از آنجا که ممکن است این جهش به صورت هتروزیگوت مرکب در بیماران ظاهر پیدا کند، بنابراین ما بررسی کامل جهش‌های ژن CYP21A2 را در تمامی نمونه‌های بیمار مورد مطالعه پیشنهاد می‌کنیم.

نمودار ۱. نیز میزان رخداد این جهش را به تفکیک نوع فنوتیپ بیماری نشان می‌دهد به طوری که از بین بیماران دارای فرم هتروزیگوت cluster E6، ۷۳ درصد به فرم SV-CAH و ۲۷ درصد به فرم SW-CAH مبتلا بودند.



شکل ۲: جهش cluster E6 واقع در اگزون ۶: در هر سه جایگاه نشان داده شده مربوط به این جهش فرم هتروزیگوت مشاهده می‌شود.



نمودار ۱: توزیع جهش هتروزیگوت cluster E6 در دو نوع فنوتیپ فرم کلاسیک (CAH SV و SW)

در ژن CYP21A2 جهشی با سه تغییر بدمعنی در آمینو اسیدهای شماره V237E (c.1385T>A)، I236N (c.1382T>A) و M239K (c.1391T>A) به نام cluster E6 وجود دارد که مطالعه‌های پیشین نشان داده‌اند جهش M239K به عنوان یک جهش ایجادکننده بیماری در این خوشه است اما هیچ تاثیری بر فعالیت آنزیم ندارد. این در حالی است که جهش V237E عملکرد آنزیم را

مختل می‌کند و در مورد I236N فعالیت بسیار پایین اما قابل اندازه‌گیری آنزیم باقی می‌ماند (۱۰). در هیچ مطالعه‌ای تاکنون در ایران وجود این جهش خوشه‌ای به تنهایی و ارتباط آن در فرم هتروزیگوت یا هموزیگوت با بیماری CAH گزارش نشده است که جنبه مهم این تحقیق در نظر گرفته می‌شود و با وجود محدودیت‌های تحقیق از قبیل مشکلات جمع‌آوری نمونه و تشخیص دقیق و تخصصی بیماران و همین‌طور دسترسی به شجره‌نامه و گاهی خونگیری از افراد خانواده بیمار، این هدف تحقق یافت.

نتایج این بررسی نشان داد که ۶۰ درصد (۱۵ نفر) از بیماران مورد بررسی دارای جهش هتروزیگوت cluster E6 بودند. این در حالی است که در هیچ یک از ۲۵ بیمار مورد مطالعه این جهش در فرم هموزیگوت یافت نشد که این نتیجه

- Bas F, Kayserili H, Darendeliler F, Uyguner O, Gunoz H, Yuksel Apak M, et al. CYP21A2 gene mutations in congenital adrenal hyperplasia: genotype-phenotype correlation in Turkish children. J Clin Res Pediatr Endocrinol. 2009;1(3):116-28.
- Concolino P, Mello E, Toscano V, Ameglio F, Zuppi C, Capoluongo E. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

منابع:

- PW. Bs. Congenital adrenal hyperplasia. In: Brook CGD. Clinical Pediatric Endocrinology: Oxford: Rockwell Seince; 1997.
- White PC, New MI, Dupont B. Congenital Adrenal Hyperplasia. New England Journal of Medicine. 1987;316(24):1519-24.

assay for the detection of CYP21A2 gene deletions/duplications in congenital adrenal hyperplasia: first technical report. *Clin Chim Acta*. 2009;402(1-2):164-70.

5. Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Hiromasa T, Fujii-Kuriyama Y. Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P-450(C21)] deficiency in humans: possible gene conversion products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(20):7486-90.

6. Ramazani A, Kahrizi K, Razaghiazar M, Mahdih N, Koppens P. The frequency of eight common point mutations in CYP21 gene in Iranian patients with congenital adrenal hyperplasia. *Iran Biomed J*. 2008;12(1):49-53.

7. Sharaf S, Hafez M, ElAbd D, Ismail A, Thabet G, Elsharkawy M. High frequency of splice site mutation in 21-hydroxylase deficiency children. *J Endocrinol Invest*. 2015;38(5):505-11.

8. Kirac D, Guney AI, Akcay T, Guran T, Ulucan K, Turan S, et al. The frequency and the effects of 21-hydroxylase gene defects in congenital adrenal hyperplasia patients. *Ann Hum Genet*. 2014;78(6):399-409.

9. Milacic I, Barac M, Milenkovic T, Ugrin M, Klaassen K, Skakic A, et al. Molecular genetic study of congenital adrenal hyperplasia in Serbia: novel p.Leu129Pro and p.Ser165Pro CYP21A2 gene mutations. *J Endocrinol Invest*. 2015;38(11):1199-210.

10. Robins T, Barbaro M, Lajic S, Wedell A. Not all amino acid substitutions of the common cluster E6 mutation in CYP21 cause congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(4):2148-53.

11. Rabbani B, Mahdih N, Haghi Ashtiani MT, Akbari MT, Rabbani A. Molecular Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia in Iran: Focusing on CYP21A2 Gene. *Iran J Pediatr*. 2011;21(2):139-50.

12. Silveira EL, dos Santos EP, Bachega TA, van der Linden Nader I, Gross JL, Elnecave RH. The actual incidence of congenital adrenal hyperplasia in Brazil may not be as high as inferred--an estimate based on a public neonatal screening program in the state of Goias. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2008;21(5):455-60.

13. Ordóñez-Sánchez ML, Ramírez-Jiménez S, López-Gutiérrez AU, Riba L, Gamboa-Cardiel S, Cerrillo-Hinojosa M, et al. Molecular genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population: identification of possible new mutations and high prevalence of apparent germ-line mutations. *Hum Genet*. 1998;102(2):170-7.

14. Wilson RC, Nimkarn S, Dumic M, Obeid J, Azar MR, Najmabadi H, et al. Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2007;90(4):414-21.

15. Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(3):1059-65.

16. Pinto G, Tardy V, Trivin C, Thalassinos C, Lortat-Jacob S, Nihoul-Fekete C, et al. Follow-up of 68 children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: relevance of genotype for management. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(6):2624-33.

17. Finkelstein GP, Chen W, Mehta SP, Fujimura FK, Hanna RM, Van Ryzin C, et al. Comprehensive genetic analysis of 182 unrelated families with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(1):E161-72.