

Espectro de alterações moleculares detetadas no gene *CYP21A2* associadas a deficiência em 21 hidroxilase

Spectrum of molecular alterations detected in the *CYP21A2* gene associated with 21-hydroxylase deficiency

Susana Gomes¹, Iris Pereira-Caetano¹, Maria Lurdes Lopes², Catarina Limbert², Daniela Amaral², Rosa Pina², Diana Antunes³, Inês Carvalho³, Teresa Kay³, Lurdes Sampaio⁴, Carla Pereira⁴, Oana Moldovan⁵, Ana Berta⁵, Irene Rebelo⁶, Isabel Gaspar⁷, Helena Cardoso⁸, José Cidade Rodrigues⁹, Lina Ramos¹⁰, Fabiana Ramos¹⁰, Isabel Dinis¹¹, Rita Cardoso¹¹, Alice Mirante¹¹, João Gonçalves^{1,12}

joao.goncalves@insa.min-saude

- (1) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.
 (2) Serviço de Endocrinologia Pediátrica. Hospital Dona Estefânia, Centro Hospitalar de Lisboa Central, Lisboa, Portugal.
 (3) Serviço de Genética Médica. Hospital Dona Estefânia, Centro Hospitalar de Lisboa Central, Lisboa, Portugal.
 (4) Serviço de Endocrinologia Pediátrica. Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Lisboa, Portugal.
 (5) Serviço de Genética Médica. Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Lisboa, Portugal.
 (6) Serviço de Pediatria. Hospital São Francisco Xavier, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, Lisboa, Portugal.
 (7) Serviço de Genética Médica. Hospital Egas Moniz, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental Lisboa, Portugal.
 (8) Serviço de Endocrinologia Pediátrica, Hospital de Santo António, Porto, Portugal.
 (9) Serviço de Cirurgia Pediátrica, Hospital de Santo António, Porto, Portugal.
 (10) Serviço de Genética Médica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal.
 (11) Serviço de Endocrinologia Pediátrica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal.
 (12) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal.

Resumo

A maioria dos doentes com hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) apresenta alterações moleculares no gene *CYP21A2*, o qual codifica a enzima 21-hidroxilase (21-OH). Os doentes com a forma clássica de deficiência em 21-OH (21-OHD) apresentam a síntese de cortisol diminuída no córtex adrenal e, os casos mais graves, também apresentam deficiência de aldosterona. As mulheres com 21-OHD grave apresentam excesso de andrógenos desde a sua vida fetal conduzindo à virilização dos órgãos genitais externos. Tanto homens como mulheres com 21-OHD completa não sintetizam a aldosterona e, conseqüentemente, logo após o nascimento, podem desenvolver crises de perda de sal se não forem corretamente diagnosticados e tratados. A 21-OHD não clássica é devida à deficiência parcial em 21-OH, os fenótipos clínicos são menos graves, as mulheres não apresentam virilização dos genitais externos ao nascimento, e geralmente os sinais relativos a excesso de andrógenos podem surgir durante a infância ou até mais tarde (durante ou após a puberdade). Neste trabalho descrevem-se as alterações e os genótipos mais frequentes encontrados em doentes portugueses não adultos com 21-OHD. As alterações mais frequentes encontradas na forma clássica da HSC são c.293-13C>G, diferentes deleções/quimeras/conversões génicas do gene *CYP21A2* e c.518T>A, enquanto na 21-OHD não-clássica a variante c.844G>T é a mais frequente. Estes resultados contribuem para um diagnóstico correto e uma melhor gestão clínica dos doentes, para o seu aconselhamento genético e para oferecer o diagnóstico pré-natal a casais com risco de ter filhos afetados com a forma clássica de 21-OHD.

Abstract

Most of the patients with congenital adrenal hyperplasia (CAH) have molecular alterations in the *CYP21A2* gene, which encodes the enzyme 21-hydroxylase (21-OH). Patients with the classic form of 21-OH deficiency (21-OHD) have the synthesis of cortisol impaired in the adrenal cortex and,

the most severe cases also have aldosterone deficiency. Females with severe 21-OHD, starting their fetal life have excess of androgens leading to external genitalia virilization at birth. Both males and females with complete 21-OHD are not able to synthesize aldosterone, consequently soon after birth may develop salt wasting crises if not correctly diagnosed and treated. Non-classic 21-OHD is due to partial deficiency of 21-OH, the clinical phenotypes are less severe, females don't present ambiguity of the external genitalia at birth, usually signs of androgen excess may be present during childhood or even later in life (during or after puberty). We present here the most frequent alterations and genotypes found in non adult Portuguese patients with 21-OHD. The most frequent alterations found in the classic form of CAH are c.293-13C>G, different *CYP21A2* deletions/quimeras/gene conversions and c.518T>A, while in non-classic 21-OHD the variant c.844G>T is the most frequent. These results contribute to a correct patient diagnosis, to a better clinical care, genetic counseling and to offer pre-natal diagnosis to couples at risk of having affected babies with the classic form of 21-OHD.

Introdução

A hiperplasia suprarrenal congénita (HSC), embora possa ser devida à deficiência de uma entre sete enzimas diferentes implicadas na esteroidogénese, corresponde em 90 a 95% dos casos a deficiência (parcial ou completa) em 21-hidroxilase (D21-OH). A D21-OH tem como causa a existência de alterações patogénicas no gene *CYP21A2*. Clinicamente, de acordo com as manifestações fenotípicas da HSC associada a D21-OH, esta patologia é classificada em duas formas, tra-

dicionalmente designadas por “forma clássica” e “forma não clássica”. Ambas estão diretamente relacionadas tanto com a atividade da 21-OH, como com a consequente ineficiência de biossíntese de cortisol e de aldosterona e com a acumulação de androgénios suprarrenais. A forma clássica, de acordo com a gravidade dos sintomas subdivide-se em “Perdedora de Sal” (PS) e em forma “Simplesmente Virilizante” (SV) (1,2).

A forma PS está predominantemente associada a deficiência completa em cortisol e em aldosterona pelo que os doentes (independentemente do sexo) geralmente manifestam, entre a primeira e quarta semanas de vida, hipercalemia, hiponatremia, hiperrreninemia, hipoglicemia, letargia, recusa alimentar e vômitos, podendo entrar em choque hipovolémico. Os fetos do sexo feminino afetados, devido ao excesso de androgénios suprarrenais que ocorre desde a oitava semana de gestação, apresentam predominantemente virilização dos órgãos genitais externos podendo exibir ambiguidade sexual (com gravidade variável) ou até genitais externos aparentemente similares aos masculinos com criptorquidismo bilateral. Nos recém-nascidos do sexo masculino, dada a ausência de ambiguidade sexual, o diagnóstico poderá ser mais tardio e, caso não seja atempadamente disponibilizada assistência médica, esta deficiência completa em 21-OH poderá, em alguns casos, ser letal.

A forma SV em recém-nascidos 46,XX pode ser diagnosticada após o nascimento até cerca dos dois anos devido essencialmente a ambiguidade sexual ou a virilização dos órgãos genitais externos. A deficiência em 21-hidroxilase é parcial, só afeta a biossíntese de cortisol, pelo que os níveis de aldosterona são normais e consequentemente não ocorre perda de sal. Nas crianças do sexo masculino o diagnóstico geralmente ocorre entre os 2 e 4 anos devido a virilização precoce. Ambos os sexos manifestam idade óssea avançada até final da infância e pubarca precoce. Por seu lado, a forma não clássica (NC) é caracterizada pelos indivíduos do sexo feminino apresentarem androgenização pronunciada durante a puberdade com hirsutismo segundo o padrão masculino, podendo surgir posteriormente amenorreia primária ou secundária e ovários poliquísticos. A acne exuberante é comum a ambos os sexos, assim como a puberdade precoce e a idade óssea avançada culminando em baixa estatura na idade adulta. Nos rapazes

o diagnóstico clínico está dificultado devido aos já elevados níveis de androgénios de origem testicular e algumas mulheres, em que o fenótipo não é tão pronunciado, também podem não chegar a ser diagnosticadas clinicamente (1,3).

O diagnóstico de HSC, para além de se basear nos sinais e sintomas característicos da doença, deve ser confirmado pelo doseamento matinal (antes das 8 horas da manhã) da 17-hidroprogesterona (17-OHP) basal. Na forma clássica a concentração da 17-OHP é superior a 100 ng/mL e na não clássica varia de 2 a 100 ng/mL. Caso os valores sejam duvidosos/*borderline*, deve ser realizado o teste de estimulação com ACTH, continuando a forma clássica a apresentar valores superiores a 100 ng/mL enquanto que para a forma não clássica podem variar entre 10 e 100 ng/mL, valores inferiores a 9,9 ng/mL correspondem provavelmente a indivíduos não afetados ou a heterozigóticos. Existindo dúvidas quanto à deficiência enzimática associada a HSC é recomendada a determinação do perfil adrenocortical completo a fim de confirmar qual a enzima que está a afetar a esteroidogénese (4).

A caracterização molecular do gene *CYP21A2* em doentes com HSC, para além de contribuir para identificar os genótipos e estabelecer correlações com a gravidade da doença, tem permitido identificar o espectro de alterações e a frequência com que as mesmas ocorrem. Dada a existência do pseudogene *CYP21A1P*, caracterizado por possuir diversas alterações que o tornam não funcional, e por possuir elevada homologia com o gene funcional *CYP21A2* (ambos localizados em 6p21.3) devido a fenómenos de recombinação ilegítima (conversões génicas e *crossing over* desigual), as alterações patogénicas pontuais mais frequentes em *CYP21A2* também existem no pseudogene. Por outro lado, as deleções, quimeras e conversões génicas extensas que afetam o *CYP21A2* tornando-o não funcional são características deste agrupamento génico.

_Objetivo

Apresentar o espectro das alterações moleculares mais frequentes, detetadas no gene *CYP21A2* em doentes portugueses (com idades inferiores a 18 anos) e associadas às três formas da HSC: PS, SV e NC.

_Materiais e métodos

A análise molecular do gene *CYP21A2* foi efetuada usando DNA genómico (obtido a partir de sangue periférico) e compreendeu a minisequenciação para pesquisa direta de alterações conhecidas, amplificação enzimática de DNA (PCR) de longa distância, PCR-nested, restrição enzimática, sequenciação cíclica de Sanger e MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*).

_Resultados e discussão

Atendendo às alterações mais frequentes detetadas no conjunto dos doentes analisados com cada uma das formas de HSC ([tabela 1](#)) verifica-se que, relativamente aos alelos associados a PS, a maioria possui alterações com atividade enzimática nula (66,4%, n=75).

Contudo, a alteração mais frequente, c.293-13C>G, é uma alteração de *splicing* que ocorre no intrão 2 e nem sempre está associada a perda de sal. Esta é também frequente em doentes com a forma SV, tal como demonstram os genótipos relativos aos doentes com PS ou com a forma SV presentes na [tabela 2](#). Esta alteração é particularmente difícil de interpretar em contexto de diagnóstico pré-natal dado que, por vezes, está associada a uma atividade enzimática considerada moderada (~3%), sendo esta suficiente para que a biosíntese da aldosterona não seja significativamente afetada pelo que, nestas condições, não causa perda de sal. No entanto, está sempre associada à forma clássica da doença.

No grupo dos alelos SV predomina a alteração *missense* c.518T>A, p.(Ile173Asn), a qual está presente, em homozigotia ou em heterozigotia composta, na grande maioria dos genótipos ([tabela 2](#)). Esta alteração está sempre associada à forma clássica sem perda de sal, correlação concordante com os dados da literatura internacional.

Quanto ao grupo dos alelos NC, a grande maioria (n=195, 86,7%), tal como seria de esperar, corresponde a alterações suaves. Destaca-se a alteração c.844G>T p.Val282Leu, presente em 81,3% dos alelos, a qual é também a mais frequente noutras populações caucasianas. Por outro lado, neste grupo, verifica-se que 13% dos alelos (n=30) correspondem

a alterações graves, as quais estão representadas nos genótipos mais frequentes dos respetivos doentes ([tabela 2](#)). Ou seja, estes resultados demonstram que um número significativo de doentes que manifestam a forma menos grave da HSC, possuem alelos graves (associados a uma atividade enzimática nula ou moderada) pelo que, caso estes utentes pretendam procriar, o seu cônjuge deverá ser também analisado de forma a determinar o risco do casal ter descendência afetada com a forma clássica da doença (PS ou SV).

Os resultados apresentados na [tabela 2](#) para os doentes com a forma NC permitem verificar que a correlação genótipo/fenótipo é concordante para 75,7% (n=87) dos doentes/genótipos, ou seja, nestes casos um dos alelos corresponde sempre a uma alteração suave, o que justifica a concordância com o fenótipo. Neste grupo existem ainda 28 doentes heterozigóticos para a alteração c.844G>T, p.Val282Leu, não se tendo detetado no outro alelo qualquer alteração patogénica. Embora nestes casos o genótipo não justifique plenamente o fenótipo (dado que se trata de uma doença autossómica recessiva), sabe-se que a alteração c.844G>T possui um efeito dominante negativo, ou seja, quando presente provavelmente impede que a 21-OH normal (proveniente do alelo sem alterações) atue quantitativamente a níveis normais, refletindo-se esta deficiência parcial nos sinais de androgenização manifestados por algumas mulheres heterozigóticas para a alteração em causa ([5,6](#)). Nestes casos, os doseamentos da 17-OHP geralmente não ultrapassam 9 ng/mL após o teste de estimulação com ACTH.

Evidencia-se ainda que a alteração c.*13G>A, localizada 13 nucleótidos após o codão de terminação, embora no passado não fosse considerada patogénica, estudos *in vitro* recentes revelaram que a mesma está associada a uma atividade enzimática parcialmente diminuída devido a redução da expressão génica, a qual está relacionada com a diminuição da estabilidade do respetivo RNA. Estes estudos estão concordantes com o fenótipo de doentes que possuíam a alteração em causa em heterozigotia composta ou em homozigotia e apresentavam 17-OHP elevada, pubarca prematura, idade óssea avançada, acne e/ou hirsutismo ([7](#)). Assim, a alteração c.*13G>A deve ser considerada patogénica, embora associada a um fenótipo suave da forma NC da HSC.

Tabela 1: ↘ Compilação das oito alterações mais frequentes, com o respetivo número de alelos, detetadas no gene *CYP21A2* em cada uma das formas de HSC.

PS			SV			NC		
Alteração patogénica	Nº de alelos	Natureza da alteração	Alteração patogénica	Nº de alelos	Natureza da alteração	Alteração patogénica	Nº de alelos	Natureza da alteração
c.293-13C>G	38	gm	c.518T>A	33	m	c.844G>T	183	s
c.CDQ	35	g	c.293-13C>G	9	gm	c.293-13C>G	10	g
c.923dupT	12	g	c.923dupT	8	g	c.CDQ	8	g
c.955C>T	12	g	c.CDQ	8	g	c.518T>A	7	g
c.332_339del	6	g	c.955C>T	5	g	c.1360C>T	7	s
c.1069C>T	4	g	c.844G>T	4	s	c.955C>T	5	g
c.518T>A	4	g	c.92C>T	3	s	c.92C>T	3	s
c.844G>T;1069C>T	2	g	c.1273G>A	3	m	c.*13G>A	2	s
	Total 113			Total 73			Total 225	

CDQ = Alelo com atividade enzimática nula com Conversão/Deleção/Quimera envolvendo diversos exões do gene *CYP21A2*. **g** = alteração grave associada à atividade enzimática nula e à forma PS; **gm** = alteração associada à atividade enzimática que pode variar entre grave (<<1%) a moderada (≤3%) tanto pode estar associada à forma PS como à SV; **m** = alteração associada à atividade enzimática moderada (~3%) e à forma SV; **s** = alteração suave predominantemente associada à atividade enzimática ≥10% e <75% e à forma NC. Atividades enzimáticas referidas tendo por substrato a 17OHP, dados disponíveis em: <https://www.pharmvar.org/htdocs/archive/cyp21.htm>; Sequência de referência NCBI: NM_000500.9

Tabela 2: ↘ Genótipos mais frequentes detetados em doentes com HSC relativamente a cada uma das formas da doença.

Genótipos mais frequentes associados à forma PS	Natureza da alteração	Nº doentes com PS (n=32)	Genótipo mais frequentes associados à forma SV	Natureza da alteração	Nº doentes com SV (n=28)	Genótipo mais frequentes associados à forma NC	Natureza da alteração	Nº doentes com NC (n=115)
c.[293-13C>G];[293-13C>G]	gm/gm	8	c.[518T>A];[923dupT]	m/g	7	c.[844G>T];[844G>T]	s/s	60
c.[293-13C>G];[CDQ]	gm/g	7	c.[518T>A];[518T>A]	m/m	6	c.[844G>T];[=]	s/n	28
c.[293-13C>G];[955C>T]	gm/g	5	c.[293-13C>G];[518T>A]	gm/m	5	c.[293-13C>G];[844G>T]	gm/s	7
c.[CDQ];[CDQ]	g/g	4	c.[518T>A];[844G>T]	m/s	2	c.[518T>A];[844G>T]	m/s	6
c.[293-13C>G];[844G>T;1069C>T]	gm/g	2	c.[293-13C>G];[293-13C>G]	gm/gm	2	c.[844G>T];[CDQ]	s/g	4
c.[293-13C>G];[DQ.Ex1_3]	gm/g	2	c.[518T>A];[955C>T]	m/g	2	c.[844G>T];[955C>T]	s/g	4
c.[923dupT];[923dupT]	g/g	2	c.[518T>A];[CDQ]	m/g	2	c.[844G>T];[1360C>T]	s/s	3
c.[955C>T];[CDQ]	g/g	2	c.[955C>T];[CDQ]	g/g	2	c.[1360C>T];[=]	s/n	3

CDQ = Alelo com atividade enzimática nula com Conversão/Deleção/Quimera envolvendo diversos exões do gene *CYP21A2*. **g** = alteração grave associada à atividade enzimática nula e à forma PS; **gm** = alteração associada à atividade enzimática que pode variar entre grave (<<1%) a moderada (≤3%) tanto pode estar associada à forma PS como à SV; **m** = alteração associada à atividade enzimática moderada (~3%) e à forma SV; **s** = alteração suave predominantemente associada à atividade enzimática ≥10% e <75% e à forma NC. Atividades enzimáticas referidas tendo por substrato a 17OHP, dados disponíveis em: <https://www.pharmvar.org/htdocs/archive/cyp21.htm>; Sequência de referência NCBI: NM_000500.9

_Conclusões

No contexto do diagnóstico molecular, para que este se reflita na sua plenitude em benefício dos doentes, os dados clínicos/fenotípicos e hormonais são indispensáveis para a interpretação das alterações/genótipos encontrados.

A deficiência em 21-OH está frequentemente associada a alelos com mais do que uma alteração patogénica em fase, ou a alelos mais complexos, nomeadamente, conversões génicas e deleções/quimeras. Dado que este tipo de alterações estão predominantemente associados a atividades enzimáticas nulas, a sua completa caracterização é indispensável para o aconselhamento genético e requer geralmente o estudo dos progenitores dos casos índice.

Os resultados obtidos, em particular a natureza das alterações identificadas, assim como a caracterização dos genótipos dos doentes, para além de confirmarem o diagnóstico, proporcionam dados indispensáveis para que se ofereça aos doentes, respetivos familiares e aos casais em risco um aconselhamento genético correto.

Referências bibliográficas:

- (1) White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev.* 2000;21(3):245-91.
- (2) Gonçalves J, Friães A, Moura L. Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency. *Expert Rev Mol Med.* 2007;9(11):1-23.
- (3) New MI. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(11):4205-14.
- (4) Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, et al. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(11):4043-88.
- (5) Bacheega TA, Brenha EM, Billerbeck AE, et al. 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 Feb;87(2):786-90.
- (6) Félix-López X, Riba L, Ordóñez-Sánchez ML, et al. Steroid 21-hydroxylase (P450c21) naturally occurring mutants I172N, V281L and I236N/V237E/M239K exert a dominant negative effect on enzymatic activity when co-expressed with the wild-type protein. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2003;16(7):1017-24.
- (7) Menabò S, Balsamo A, Baldazzi L, et al. A sequence variation in 3'UTR of CYP21A2 gene correlates with a mild form of congenital adrenal hyperplasia. *J Endocrinol Invest.* 2012;35(3):298-305. Epub 2011 Apr 26.