



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DÉBORA DE PAULA MICHELATTO

“FUNCTIONAL IMPORTANCE OF NOVEL NUCLEOTIDE VARIATIONS
IN THE *CYP21A2* GENE”

“IMPORTÂNCIA FUNCIONAL DE NOVAS VARIAÇÕES
NUCLEOTÍDICAS NO GENE *CYP21A2*”

CAMPINAS

2016

DÉBORA DE PAULA MICHELATTO

**“FUNCTIONAL IMPORTANCE OF NOVEL NUCLEOTIDE VARIATIONS
IN THE *CYP21A2* GENE”**

**“IMPORTÂNCIA FUNCIONAL DE NOVAS VARIAÇÕES
NUCLEOTÍDICAS NO GENE *CYP21A2*”**

Thesis presented to the Institute of Biology at the University of Campinas to fulfillment of the requirements for Doctoral degree in Genetics and Molecular Biology in the area of Animal Genetics and Evolution.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutora em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Animal e Evolução.

ESTE ARQUIVO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA DÉBORA DE PAULA MICHELATTO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARICILDA PALANDI DE MELLO.

Supervisor/Orientador: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello.

Co-supervisors/Co-orientadores: Ass. Profa. Dra. Svetlana Lajic

Dra. Michela Barbaro

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2012/16815-0; FAPESP, 2014/09844-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M582i Michelatto, Débora de Paula, 1987-
Importância funcional de novas variações nucleotídicas no gene *CYP21A2* /
Débora de Paula Michelatto. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Maricilda Palandi de Mello.
Coorientadores: Svetlana Lajic e Michela Barbaro.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Hiperplasia suprarrenal congênita. 2. Proteína CYP21A2 humana. 3.
Esteróide 21-hidroxilase. 4. Mutação. I. Mello, Maricilda Palandi de. II. Lajic,
Svetlana. III. Barbaro, Michela. IV. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Functional importance of novel nucleotide variations in the *CYP21A2* gene

Palavras-chave em inglês:

Adrenal hyperplasia, Congenital

CYP21A2 protein, human

Steroid 21-hydroxylase

Mutation

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Maricilda Palandi de Mello [Orientador]

Tânia Aparecida Sartori Sanchez Bachega

Claudio Elias Kater

Celso Eduardo Benedetti

Andrea Trevas Maciel Guerra

Data de defesa: 24-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 24 de fevereiro de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Profa. Dra. Tânia Aparecida Sartori Sanchez Bachega

Prof. Dr. Claudio Kater

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Profa. Dra. Andrea Trevas Maciel Guerra

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de defesa,
que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

*“Se não puder voar, corra.
Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje.
Mas o que quer que você faça,
você tem que seguir em frente.”*

Martin Luther King

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Vanderlei e Elaine,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Criador do Segredo da Vida por me permitir estudá-lo, me sustentar até aqui e por guardar a minha entrada e a minha saída sempre.

Aos meus amados pais, Vanderlei e Elaine, por primeiramente sonharem com a minha vida e por todas as orações. Dizem que por um filho somos capazes de atravessar oceanos, vocês me provaram que isto é verdade, literalmente e mais de uma vez. Muito obrigada!

A toda minha família, que sempre me incentivou a estudar e a seguir em frente. A minha vó Zoraide por me ensinar o gosto pela leitura. A minha tia Eneida por me apresentar o mundo acadêmico.

Ao Diones e sua família por me acompanharem e incentivarem durante o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Maricilda por me receber em seu laboratório e acreditar no meu trabalho. Cilda, obrigada por me ensinar através do seu exemplo a ser exigente comigo mesma, honesta e a não desistir. Muito obrigada pela amizade que pudemos cultivar durante esses anos de convivência diária.

I would like to thank my co-supervisors. Thank you Svetlana for receiving me so well; sharing your knowledge and laboratory. I will always keep great memories on the amazing moments skiing in Salem. Michela! Thank you for accepting me as your student; keeping me moving forward and for all the funny moments!

A todos os amigos do laboratório de Genética Molecular Humana: Cristiane, Helena, Mara, Reginaldo, Flávia, Adriana, Alessandra, Nadya, Roseane, Fábio, Taciane, Pamela, Natália Z., Natália G., Priscila Z., Priscila J., Luana, Marcela, Bárbara, Taís, Ana Paula, Isabela, Suéllen, Lizandra, Denise, Fernanda, Sueli, Profa.Edi e a todos os outros que de uma forma ou outra passaram pelo laboratório no decorrer destes sete anos.

Em especial aos amigos Cris, Helena, Mara, Regi, Flor e Dri. Obrigada por todo o suporte, ajuda, aprendizado, amizade, carinho, paciência, conversas, risadas e bons momentos. A amizade de vocês tornou os momentos difíceis mais fáceis.

Tomy “Swedish” friends from Karolinska: Ellie, Iullia, Izabel, Andrea, Valentina, João, Leif, Ahmed, Mi, Tao, Jan, Luise, Maryan, Maryana, Britt, Christine, Martin, Susanne,

Juliane, Magda, Malin, Marius, Yoni, Konstantine, Lars, Bettina, Therese, Giulia, Elena, Dr. Soder and all the others, thank you for been my family for one year. Thank you Leif for helping me and being my Swedish teacher; Andrea, Vale, Iullia, Ellie, Izy, Juliane and Magda for all psychological support! Obrigada João por todas as conversas em português. Tack så mycket!

Thank you Martin Ritzén, was a pleasure meet you in person, you showed me that never is too late to keep following a dream.

Aos professores, alunos e funcionários do CBMEG. Em especial a Gabriela, Tânia e Sandra pelo auxílio em todos os momentos.

À Profa. Dra. Sofia e toda sua equipe pela dedicação no atendimento dos pacientes durante estes anos.

À Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito e à Dra. Elisangela Farias Silva por guiarem meus primeiros passos no mundo científico.

Aos pacientes e seus familiares.

Ao CNPq e a FAPESP (processos 2014/09844-0 e 2012/16815-0) por todo o apoio financeiro prestado.

Foi uma aventura incrível e um privilégio indescritível. Coisas que eu sei são coisas que antes eu somente não sabia, agora eu sei! E há muito mais a saber.

RESUMO

A Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC), uma das desordens autossômicas recessivas mais frequentes, é causada pela deficiência de enzimas esteroidogênicas envolvidas na biossíntese do cortisol. Uma consequência disto é o desvio da síntese para a produção de hormônios androgênicos. Na forma clássica da HAC, a exposição pré-natal intrauterina ao excesso de andrógenos durante estágios críticos da diferenciação sexual leva à virilização da genitália externa de fetos 46,XX resultando em uma genitália ambígua ao nascimento, à pseudopuberdade precoce em ambos os sexos e à crises de perda de sal quando a atividade residual enzimática é menor que 1%. Sinais de excesso de andrógeno na forma não clássica podem ser acne, hirsutismo e desordens menstruais em mulheres jovens, contudo podem se manifestar anteriormente no desenvolvimento como: puberdade precoce, crescimento linear acelerado e maturação óssea avançada. Todavia, é bem conhecido que alguns indivíduos com HAC não clássica podem permanecer assintomáticos. Os objetivos deste projeto foram analisar o papel funcional de dez novas mutações (p.Leu12Met; p.Arg16Cys; p.Ser101Asn; p.Ser202Gly; p.Pro267Leu; p.Val358Ile; p.Arg369Gln; p.Asp377Tyr; p.Thr450Met; e p.Leu461Pro), uma nova deleção *in frame* (p.Gln398_Ala391del), duas mutações que foram descritas anteriormente, entretanto sem estudos funcionais (p.Ser113Phe e p.Thr450Pro) e três combinações de mutações *in cis* (p.Ile172Asn+p.Val358Ile; p.Val281Leu+p.Arg369Gln; e p.Asp377Tyr+p.Leu461Pro); e estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo para as mutações investigadas *in vitro*. Além dos métodos clássicos para os estudos moleculares, a metodologia deste estudo incluiu a expressão das proteínas CYP21A2 normal e mutantes para os ensaios de determinação da atividade enzimática e da cinética enzimática, bem como a verificação da expressão proteica por *Western blot*. Estudos *in vitro* demonstraram que uma mutação é uma variante normal do gene *CYP21A2* (p.Leu12Met) apresentando atividade residual próxima de 100%, nove (p.Arg16Cys; p.Ser101Asn; p.Ser202Gly; p.Pro267Leu; p.Val358Ile; p.Arg369Gln; p.Asp377Tyr; p.Thr450Met; e p.Leu461Pro) se associam à forma não clássica leve de HAC com atividades residuais entre 35% e 95% e, três (p.Ser113Phe, p.Gln398_Ala391del e p.Thr450Pro) resultam em HAC forma clássica com atividades residuais abaixo de 4%. As três combinações de mutações *in cis* apresentaram efeito sinérgico na atividade residual enzimática. Este estudo permitiu uma correta correlação genótipo-fenótipo.

ABSTRACT

Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH), one of the most frequent autosomal recessive disorders, is caused by defects in steroidogenic enzymes involved in the cortisol biosynthesis. One consequence is the deviation of the synthesis towards the production of androgenic hormones. In the CAH classical form, intrauterine prenatal exposure to androgen excess in critical stages of sexual differentiation leads to external genitalia virilization of the 46,XX fetus resulting in ambiguous genitalia at birth, pseudopuberty in both sexes and salt wasting crisis when CYP21A2 residual activity is less than 1%. Signs of androgen excess in the non-classic form can be acne, hirsutism and menstrual disorders in young women but they can manifest early in development as precocious pubarche, accelerated linear growth and advanced skeletal maturation. However, it is well known that some individuals with non-classic CAH can remain asymptomatic. The objectives of this project were to analyze the functional role of ten novel *CYP21A2* missense mutations (p.Leu12Met; p.Arg16Cys; p.Ser101Asn; p.Ser202Gly; p.Pro267Leu; p.Val358Ile; p.Arg369Gln; p.Asp377Tyr; p.Thr450Met; and p.Leu461Pro), one novel *in frame* deletion (p.Gln398_Ala391del), two mutations that has previously been identified but lacking functional studies (p.Ser113Phe and p.Thr450Pro) and three combined alleles (p.Ile172Asn+p.Val358Ile; p.Val281Leu+p.Arg369Gln; and p.Asp377Tyr+p.Leu461Pro); and establish a genotype-phenotype correlation for the mutations investigated *in vitro*. Besides all classic methods used in molecular studies, the methodology included the expression of normal and mutant *CYP21A2* proteins for enzymatic activity assays and enzymatic kinetics as well as the verification of protein expression by Western blot. *In vitro* studies showed that one mutation is a normal variant of the *CYP21A2* gene (p.Leu12Met) showing residual activity close to 100%; nine (p.Arg16Cys; p.Ser101Asn; p.Ser202Gly; p.Pro267Leu; p.Val358Ile; p.Arg369Gln; p.Asp377Tyr; p.Thr450Met; and p.Leu461Pro) result in mild non-classic CAH with residual activities varying between 35% and 95% and three result in classic CAH (p.Ser113Phe; p.Gln398_Ala391del and p.Thr450Pro) with residual activities below 4%. Alleles harboring two mutations *in cis* result in a synergistic effect on the enzyme residual activity. This study allowed the correlation between phenotype and genotype.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11DOL - 11-desoxicortisol

17OHP - 17-hidroxiprogesterona

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

c. - posição do nucleotídeo no cDNA

C4 - gene que codifica o quarto componente do complemento

CAH - do inglês *congenital adrenal hyperplasia*

cDNA - DNA codificante

CNV - do inglês *copy number variation*

CRH - hormônio liberador de corticotrofina

CYP11A1 - enzima P450_{ssc}, enzima *cholesterol side-chain clivage*

CYP11B1- enzima 11 β -hidroxilase

CYP17A1- enzima 17 α -hidroxilase/17,20 liase

CYP21A2- enzima 21-hidroxilase

CYP21A2 - gene que codifica a enzima/proteína 21-hidroxilase

CYP21A1P - pseudogene inativo da enzima CYP21A2

DDS - desordens do desenvolvimento sexual

DHEA - desidroepiandrosterona

DHT - diidrotestosterona

DNA - ácido desoxirribonucleico

DOC - desoxicorticosterona

FOXL2- do inglês *Forkhead box L2*

HAC - hiperplasia adrenal congênita

HAM - hormônio anti-Mülleriano

HLA - complexo principal de histocompatibilidade

HSD3B2 - enzima 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2

MLPA -do inglês *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

mRNA - RNA mensageiro

p. - posição do aminoácido na proteína

PCR - reação em cadeia da polimerase

RP - gene que codifica a serina/treonina quinase.

RSPO1- do inglês *R-Spondin 1*

SFI- do inglês *steroidogenicfactor 1*

SNV – do inglês *single nucleotide variation*

SOX9- do inglês *sex determining region Y box 9*

SRY- do inglês *sex-determining gene*

TNXB - gene que codifica a tenascina

V_{\max} - velocidade máxima enzimática

WNT4- do inglês *Wingless Type MMTV integration site family, member 4*

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1) Diferenciação sexual normal.....	15
1.2) Hiperplasia Adrenal Congênita.....	21
1.3) Deficiência da CYP21A2.....	22
1.4) O gene <i>CYP21A2</i>	24
1.5) A enzima CYP21A2 e a superfamília dos citocromos P450.....	25
1.6) Mutações no gene <i>CYP21A2</i>	28
1.7) Estudos funcionais.....	29
1.8) Fenótipo vs. Genótipo.....	32
1.9) Diagnóstico bioquímico.....	33
1.10) Diagnóstico molecular.....	34
1.11) Tratamento.....	35
1.12) Triagem neonatal.....	36
2) OBJETIVOS.....	38
2.1) Objetivos gerais.....	38
2.2) Objetivos específicos.....	39
2.2.1) Artigo 1.....	39
2.2.2) Artigo 2.....	39
2.2.3) Artigo 3.....	39

3. DOCUMENTOS PUBLICADOS E A PUBLICAR.....	40
3.1) Capítulo 1 - Artigo: Functional and structural consequences of nine CYP21A2 mutations ranging from very mild to severe effects.....	41
3.2) Capítulo 2 - Artigo: Four novel CYP21A2 mutations identified in Brazilian and Italian patients with 21-hydroxylase deficiency: a synergistic effect.....	60
3.3) Capítulo 3 - Artigo: Leydig cell tumour in a 46,XX child with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.....	76
4. DISCUSSÃO.....	83
5. CONCLUSÕES.....	91
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
7. ANEXOS.....	106
7.1) Anexo 1: Demais artigos publicados no período.....	107
7.2) Anexo 2: Declaração de biossegurança.....	108
7.3) Anexo 3: Declaração – Direitos autorais.....	109

1) INTRODUÇÃO

As Desordens do Desenvolvimento Sexual (DDS) são condições congênitas onde o desenvolvimento do cromossomo sexual, das gônadas ou da anatomia sexual são atípicos (Lee et al. 2006; Hughes 2008). As DDS são classificadas de acordo com suas causas, podendo ser divididas em três grandes grupos: DDS 46,XX; DDS 46,XY; e DDS associadas a anormalidades cromossômicas (Lee et al. 2006). Dentre as DDSs está a Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC), que pode ser classificada tanto como DDS 46,XY quanto como DDS 46,XX. Esta classificação é dependente de qual das cinco enzimas que catalisam as várias etapas da síntese de esteroides adrenal apresenta atividade deficiente. A deficiência da enzima CYP21A2 é a principal causa da HAC cuja manifestação se reflete principalmente na diferenciação da genitália externa de fetos 46,XX, na pseudopuberdade precoce em ambos os sexos e em crises de perda de sal quando a atividade enzimática é menor que 1%.

1.1) Diferenciação sexual normal

O desenvolvimento embrionário do sexo fetal em humanos pode ser dividido em três etapas: o estágio indiferenciado, quando estruturas sexuais primitivas idênticas se desenvolvem em embriões 46,XX e 46,XY; a diferenciação da gônada bipotente em ovário ou testículo; e a diferenciação da genitália interna e externa, dependente da ação de hormônios testiculares (Rey & Grinspon 2011). Defeitos em qualquer uma dessas etapas podem resultar em uma DDS. A diferenciação sexual normal humana masculina e feminina parte de estruturas indiferenciadas e por volta da terceira semana de gestação, a ação de genes específicos define se as gônadas se diferenciarão em testículos ou ovários e, por volta da sétima semana de gestação, a genitália interna e externa se diferenciará em masculina ou feminina, dependente da concentração de hormônios androgênicos na circulação sanguínea.

O gene *SRY* (*sex-determining gene*), localizado no cromossomo Y, foi o primeiro gene identificado como responsável por iniciar a diferenciação das gônadas em testículos; em seguida, vários outros genes foram identificados na diferenciação sexual masculina (Berta et al. 1990; Sinclair et al. 1990). Os genes *SRY* e *SF1* regulam positivamente a expressão do gene *SOX9*, um fator de transcrição que inicia a expressão de vários genes e a diferenciação das células de Sertoli (Figura 1). No embrião humano

os primórdios dos ductos de Wolf e de Müller desenvolvem próximos um ao outro e por volta da 7^a-8^a semana de gestação, se os testículos forem desenvolvidos, produzirão Hormônio anti-Mülleriano (HAM) pelas células de Sertoli e grandes concentrações de testosterona pelas células de Leydig (Biaison-Lauber & Chaboissier 2015).

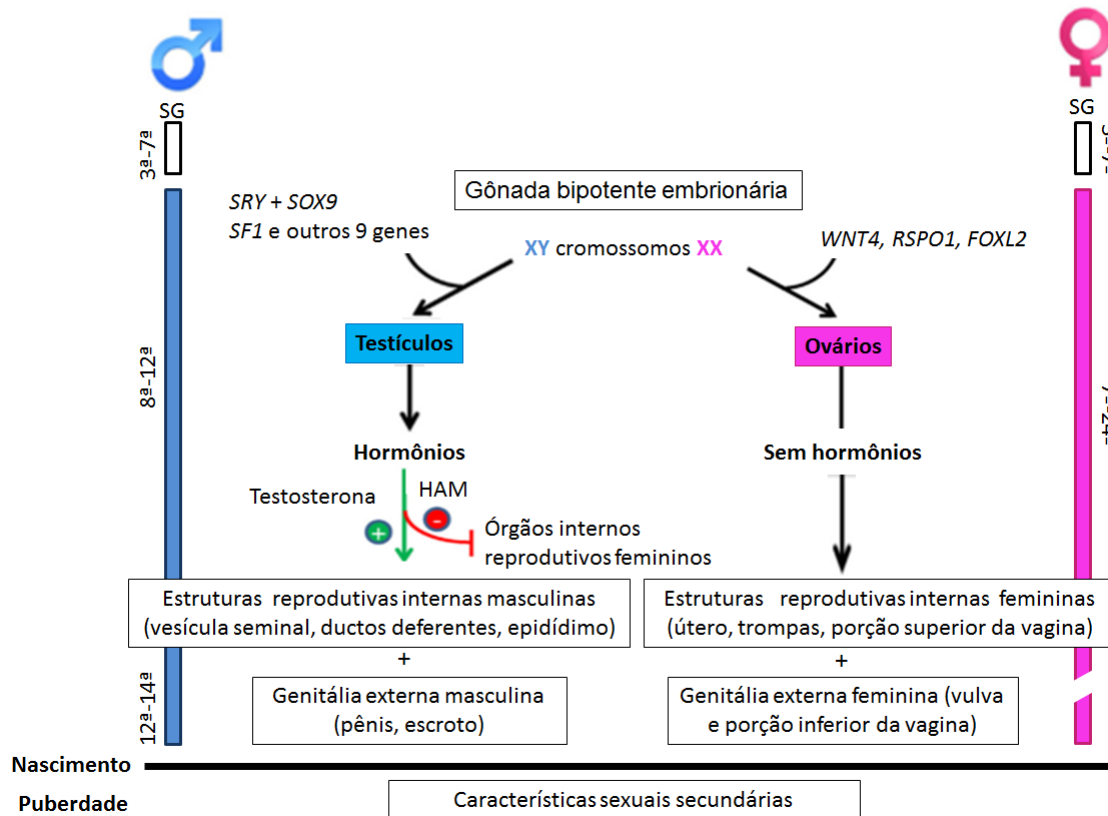


Figura 1: Fisiologia do desenvolvimento sexual. Visão simplificada do desenvolvimento sexual na vida humana desde o desenvolvimento intrauterino até a vida adulta. SG: semana gestacional. São indicados os principais coadjuvantes da diferenciação celular e sexual. *SRY*: Sex Determining Region Y; *SOX9*: *SRY*-box 9; *WNT4*: *Wingless-type MMTV integration site family member 4*; *RSPO1*: *R-spondin 1*. Adaptado de Biaison-Lauber & Chaboissier, 2015.

A ação do HAM e da testosterona sobre os primórdios dos genitais internos é parácrina, ou seja, célula a célula, e resultarão, respectivamente, na regressão dos ductos de Müller (primórdios dos genitais internos femininos) e na diferenciação dos ductos de Wolff em epidídimo, ductos deferente e vesícula seminal (primórdios dos genitais internos masculinos) (Figura 2).

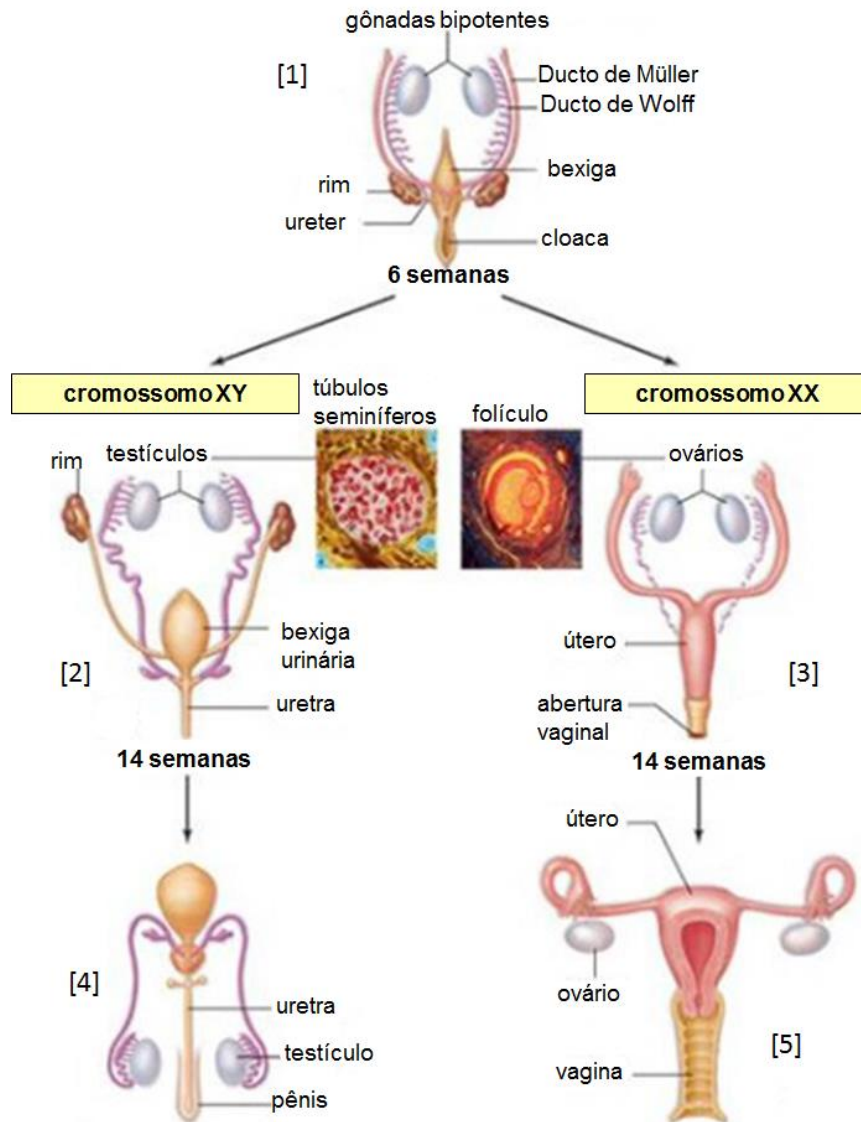


Figura 2: Diferenciação normal da genitália interna humana. A partir do estágio indiferenciado (1), as gônadas bipotentes se diferenciarão em testículos (2) ou ovários (3) dependendo do sexo cromossômico. Os testículos produzirão testosterona e HAM resultando em uma genitália interna masculina completamente desenvolvida (4). A presença dos ovários e, portanto a ausência da testosterona e do HAM, resultará na genitália interna feminina completamente desenvolvida (5). Adaptado de Nillson et al. 1965.

Embora os fatores envolvidos na determinação e diferenciação sexual masculina tenham sido bem estudados e, ao longo dos últimos anos, a compreensão dos genes e mecanismos envolvidos na determinação do sexo tenha evoluído significativamente, as vias que regulam a determinação e diferenciação sexual feminina

não estão completamente definidas. A teoria clássica era de que a ausência do gene *SRY* levaria a uma “não inibição” do programa padrão de diferenciação e por isso, em indivíduos de sexo genético feminino, as gônadas bipotentes se diferenciariam em ovários. Entretanto, estudos em modelos animais e em pacientes com DDS permitiram a descoberta de fatores envolvidos ativamente na determinação e diferenciação dos ovários. Hoje se sabe que os genes *WNT4* (*Wingless Type MMTV integration site family, member 4*), *RSPO1* (*R-Spondin 1*) e *FOXL2* (*Forkhead box L2*) possuem funções importantes na via de determinação ovariana, suprimindo a diferenciação sexual masculina por restringirem a expressão do gene *SOX9*, além de promover o desenvolvimento do sexo feminino sustentando a diferenciação dos dutos de Müller e a integridade dos oócitos (Figura 1) (Biaison-Lauber & Chaboissier 2015; Bashamboo & McElreavey 2015).

Já era conhecido que os ovários não produzem hormônios no período fetal e que a ausência do HAM e da testosterona leva à diferenciação dos ductos de Müller e à falta de desenvolvimento e posterior fragmentação dos ductos de Wolff, resultando em uma genitália interna feminina (Figura 2).

Corroborando esses dados, recentemente Sakashita et al. identificaram conjuntos de genes específicos, masculinos e femininos, expressos em células germinativas primordiais de roedores. Além disto, identificaram também uma complexa rede de expressão gênica envolvida na determinação sexual que leva à diferenciação das células germinativas primordiais em masculina ou feminina, demonstrando que existem diferenças biológicas entre a rede de expressão gênica feminina e masculina das células germinativas primordiais após a migração das mesmas para as cristas genitais, onde estas células terão um destino sexo específico e se diferenciarão em masculinas ou femininas (Sakashita et al. 2015).

A diferenciação normal dos genitais externos depende da concentração de hormônios androgênicos na circulação sanguínea; estes são produzidos pelos testículos e pelas glândulas adrenais, a partir do colesterol por meio de uma série de reações enzimáticas. A diidrotestosterona (DHT), que é o produto da conversão da testosterona pela enzima 5α -redutase tipo 2, apresenta ação sistêmica, determinando a virilização dos genitais externos. Altas concentrações destes andrógenos resultam em genitália externa masculina e, baixas ou nenhuma concentração destes resulta em genitália externa feminina (Figura 3).

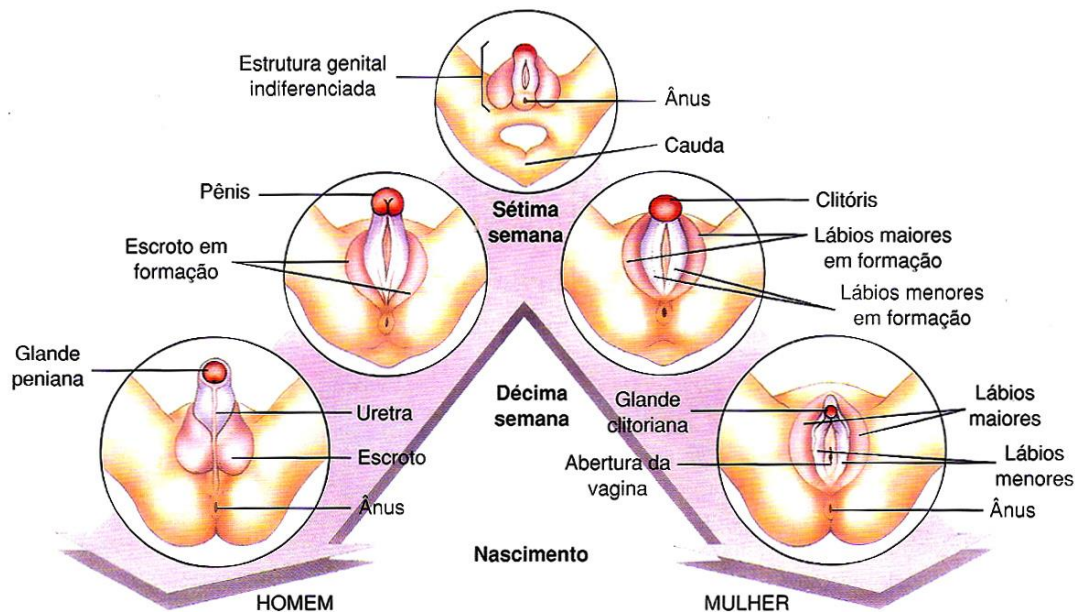


Figura 3: Diferenciação normal da genitália externa humana. A ação sistêmica da diidrotestosterona causa o aumento da distância anogenital, o alargamento do tubérculo genital, a fusão das bordas das pregas uretrais, o alongamento do falo e a fusão das saliências labioescrotais, originando as bolsas escrotais, resultando em uma genitália externa masculina ao nascimento (esquerda). Na ausência de exposição aos andrógenos, a distância anogenital não aumenta, as bordas do sulco uretral não se fundem, originando os pequenos lábios, as saliências labioescrotais se fundem apenas nas extremidades, originando as comissuras labiais anterior e posterior formando assim os grandes lábios e o crescimento do tubérculo genital de detém dando origem ao clitóris, resultando em uma genitália externa feminina ao nascimento (direita). Adaptado de Amabis & Martho 2004.

1.2) Hiperplasia Adrenal Congênita.

A Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC), uma das desordens endócrinas inatas mais frequentes, apresenta padrão de herança autossômico recessivo e é causada pela deficiência de uma das cinco enzimas que participam dos vários passos da síntese dos esteroides adrenais a partir do colesterol (Wilson, Foster, Kronenberg 1998; Nimkarn et al. 2011). A glândula adrenal sintetiza três classes principais de hormônios: os mineralocorticoides, os glicocorticoides e os esteroides sexuais; e as enzimas esteroidogênicas são: P450 *side-chaincleavage* (CYP11A1), 3 β -hidroxiesteroide

desidrogenase tipo 2 (HSD3B2), 21-hidroxilase (CYP21A2), 11 β -hidroxilase (CYP11B1) e 17 α -hidroxilase/17,20-liase (CYP17A1) (Figura 4).

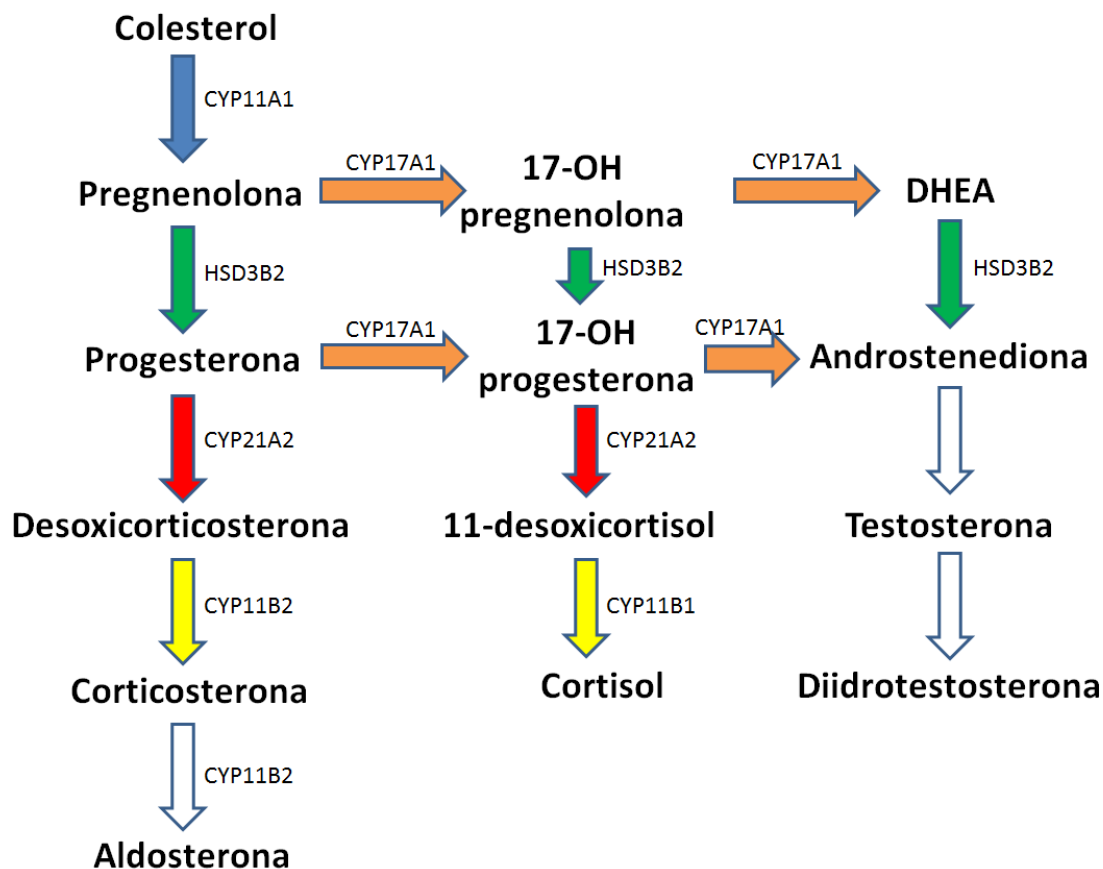


Figura 4: Síntese de esteróides adrenais evidenciando as enzimas envolvidas na Hiperplasia Adrenal Congênita.

Um dos resultados dessas deficiências enzimáticas é a diminuição da produção de cortisol e aldosterona. O cortisol é responsável pelo *feedback* negativo para o eixo hipotálamo-hipófise e o comprometimento de sua produção resulta no aumento da secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pelo hipotálamo e pela hipófise, respectivamente (Figura5). Estes estímulos causam um superestímulo das glândulas adrenais, sua consequente hiperplasia e superprodução de andrógeno (White and Speiser 2000).

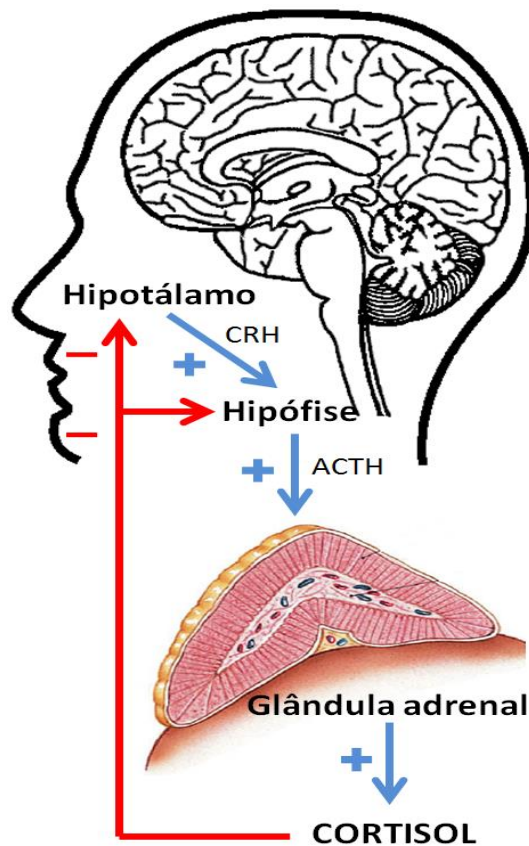


Figura 5: *Feedback* negativo realizado pelo cortisol no eixo hipotálamo-hipófise. Quando ocorre uma deficiência enzimática que resulta em baixas concentrações de cortisol há uma deficiência do *feedback* negativo para o eixo hipotálamo-hipófise, tendo como consequência o aumento de secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e conseqüentemente o aumento do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), superestimulando as glândulas adrenais, causando sua hiperplasia e uma super produção de andrógenos.

O excesso de andrógeno circulante na corrente sanguínea não altera o processo de diferenciação gonadal, sendo assim embriões 46,XY possuirão testículos e embriões 46,XX ovários; entretanto, esta exposição pré-natal intrauterina do embrião a um excesso de andrógenos, em estágios críticos da diferenciação dos genitais externos, leva a uma virilização da genitália externa dos embriões 46,XX, resultando em uma genitália ambígua ao nascimento. Esta ambiguidade genital se manifesta em diferentes graus, desde uma clitoromegalia até a fusão completa das saliências labioescrotais com falô de aspecto peniano bem desenvolvido, sendo classificada de acordo com Prader (Figura 6). Nos fetos 46,XY ocorre a virilização precoce devido a este excesso androgênico no período pós-natal.

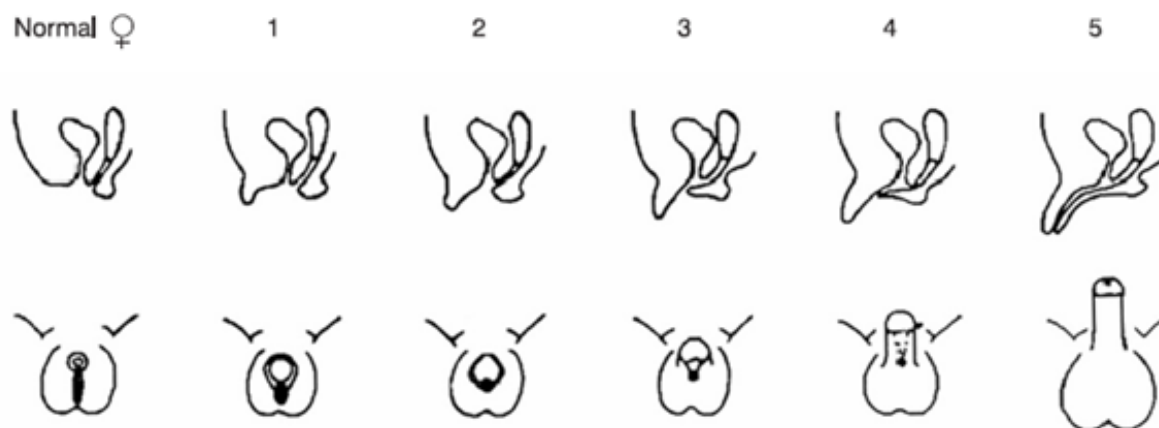


Figura 6: Graus de ambiguidade genital segundo Prader. Na parte superior: corte sagital do espectro contínuo. Na parte inferior: visão perineal dos vários graus de virilização da genitália externa. Grau 1: genitália de aspecto feminino com aumento do falo; Grau 2: maior aumento do falo, associado à fusão posterior das saliências labioescrotales e ausência de seio urogenital; Grau 3: importante aumento do falo, associado à fusão quase completa das saliências labioescrotales e presença de seio urogenital com abertura perineal; Grau 4: falo de aspecto peniano, associado à fusão completa das saliências labioescrotales e presença de seio urogenital com abertura perineal entre a base e a extremidade do falo; Grau 5: falo de aspecto peniano bem desenvolvido, associado à fusão completa das saliências labioescrotales e presença de seio urogenital com abertura balânica. Adaptado de Miller 1991.

1.3) Deficiência da CYP21A2

Aproximadamente 90% dos casos de HAC são decorrentes da deficiência da enzima CYP21A2 (Nimkarn, Lin-Su, and New 2011; Wedell 2011; Speiser et al. 2010). A CYP21A2 faz parte da família dos citocromos P450, é sintetizada no córtex da adrenal; e participa da via metabólica de síntese de cortisol e aldosterona, catalizando a hidroxilação da 17-hidroxiprogesterona (17OHP) a 11-desoxicortisol (11DOL), precursor do cortisol, e convertendo progesterona a desoxicorticoesterona (DOC), precursora da aldosterona (Figuras 4 e 7)(White and Speiser 2000). Sendo assim, essa deficiência acarreta o acúmulo destes precursores que são desviados para a via não afetada dos esteroides sexuais, provocando um excesso de hormônios androgênicos na corrente sanguínea (Nimkarn, Lin-Su, and New 2011; White and Speiser 2000). As manifestações clínicas da HAC por deficiência da CYP21A2 abrangem um grande

espectro de fenótipos, que são classificados em forma clássica e não clássica, dependendo dos sintomas clínicos apresentados pelo indivíduo.

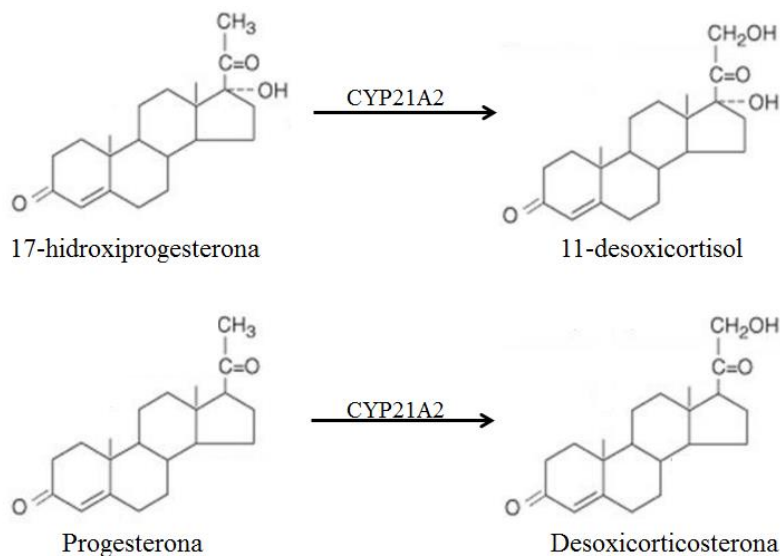


Figura 7: Hidroxilação da 17-hidroxiprogesterona (17OHP) a 11-desoxicortisol (11DOL) pela enzima CYP21A2, precursor do cortisol, e conversão da progesterona a desoxicorticoesterona (DOC) pela enzima CYP21A2, precursora da aldosterona.

A forma mais grave, consequência da deficiência da biossíntese tanto de cortisol como de aldosterona (perdedora de sal), e a forma onde a síntese de aldosterona é aparentemente normal (virilizante simples), juntas compõem a HAC da forma clássica. Nesse caso o embrião é exposto a altos níveis sistêmicos de andrógenos adrenais intra útero, portanto, fetos 46,XX afetados apresentarão genitália externa ambígua ao nascimento. A aldosterona é essencial para a regulação dos íons potássio e sódio no líquido extracelular, sendo responsável pelo equilíbrio homeostático corporal. Recém-nascidos com deficiência de aldosterona apresentam perda de peso, diarreia, vômito, desidratação, hipotensão arterial, perda de sal e acidose metabólica hipercalêmica, progredindo para crise adrenal com colapso vascular, choque e morte quando não tratada (Nimkarn et al. 2011). A diferença fenotípica entre as formas perdedora de sal e virilizante simples se dá pela diferença da atividade da CYP21A2 frente à 17OHP e à progesterona. A taxa de síntese da aldosterona é normalmente de 100 a 1000 vezes menor que a taxa de síntese do cortisol, assim taxas suficientes de síntese da aldosterona ainda ocorrem com uma atividade mínima de 1% da CYP21A2 frente ao precursor progesterona, evitando a perda de sal e resultando no fenótipo virilizante simples (White and Speiser 2000).

A forma menos grave, onde o bloqueio da atividade enzimática é parcial (HAC não clássica), é associada a sinais de excesso androgênico que se manifestam em qualquer período após o nascimento. Mulheres jovens com essa forma de deficiência da CYP21A2 apresentam acne, hirsutismo e distúrbios menstruais; e crianças podem apresentar puberdade precoce, velocidade de crescimento acelerada e maturação esquelética avançada (Nimkarn et al. 2011; White & Speiser 2000; Speiser & White 2003; P. W. Speiser et al. 2010). A variedade de expressão fenotípica da deficiência da CYP21A2 pode ser ainda mais extensa considerando a existência de indivíduos assintomáticos na forma não clássica. Isso pode possivelmente ser justificado devido à idade, ao metabolismo dos esteroides e à sensibilidade individual aos andrógenos (Bidet et al. 2009; Falhammar & Nordenström 2015).

Estudos de triagem indicam que a forma clássica da deficiência da CYP21A2 apresenta uma incidência de 1:10.000 a 1:15.000 em nascidos vivos de todo o mundo (van der Kamp & Wit 2004; Pang & Shook 1997; Therrell 2001). Destes, 75% correspondem à forma perdedora de sal, na qual a CYP21A2 apresenta atividade residual menor que 1%, e os outros 25% correspondem à forma virilizante simples onde a CYP21A2 apresenta atividade residual entre 1 e 5%. Embora ainda não exista um dado único e preciso que reporte a incidência da forma clássica da HAC em todo o Brasil, a triagem neonatal em alguns estados brasileiros indica incidências de: 1:10.325 em Goiás (Silveira et al. 2008); 1:19.927 em Minas Gerais (Pezzuti et al. 2014); 1:11.655 em Santa Catarina (Nascimento et al. 2014); e 1:13.628 no Rio Grande do Sul (Castro et al. 2015).

Já a forma não clássica é muito mais frequente, apresentando uma incidência de 1:500 nascidos vivos em várias populações caucasianas (Trakakis et al. 2009), entretanto a prevalência da forma não clássica depende do grupo étnico avaliado. Judeus Ashkenazi provenientes da Europa Central e Oriental apresentam a maior incidência registrada (1:27), seguidos pela população hispânica (1:40), eslava (1:50) e italiana (1:300) (Speiser et al. 1985).

1.4) O gene *CYP21A2*

Embora o fenótipo associado à HAC tenha sido descrito pela primeira vez em 1865 (Luigi De Crecchio 1865; Delle Piane et al. 2015), apenas em 1984 o gene que codifica a enzima CYP21A2 foi identificado (White, New, and Dupont 1984). O genoma humano contém duas cópias do gene *CYP21*, o gene *CYP21A2* (forma ativa) e

o gene *CYP21A1P*, um pseudogene não funcional (White and Speiser 2000). Embora *CYP21A2* e *CYP21A1P* apresentem alta homologia, com 98% de identidade entre seus éxons e 96% entre seus introns, *CYP21A1P* é considerado um pseudogene por apresentar mutações deletérias (Higashi et al. 1986; White, New, and Dupont 1986).

O gene *CYP21A2* é composto de 10 éxons, cobrindo uma região cromossômica de 2,7 kb e está localizado na região do complexo principal de histocompatibilidade (HLA) classe III no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3). Nessa região existem quatro genes arranjados em tandem (serina/treonina quinase *RP*, complemento *C4*, esteroides 21-hidroxilase *CYP21* e tenascina *TNX*), organizados como uma unidade genética designada como módulo *RCCX* que normalmente aparece duplicado (Figura 8).

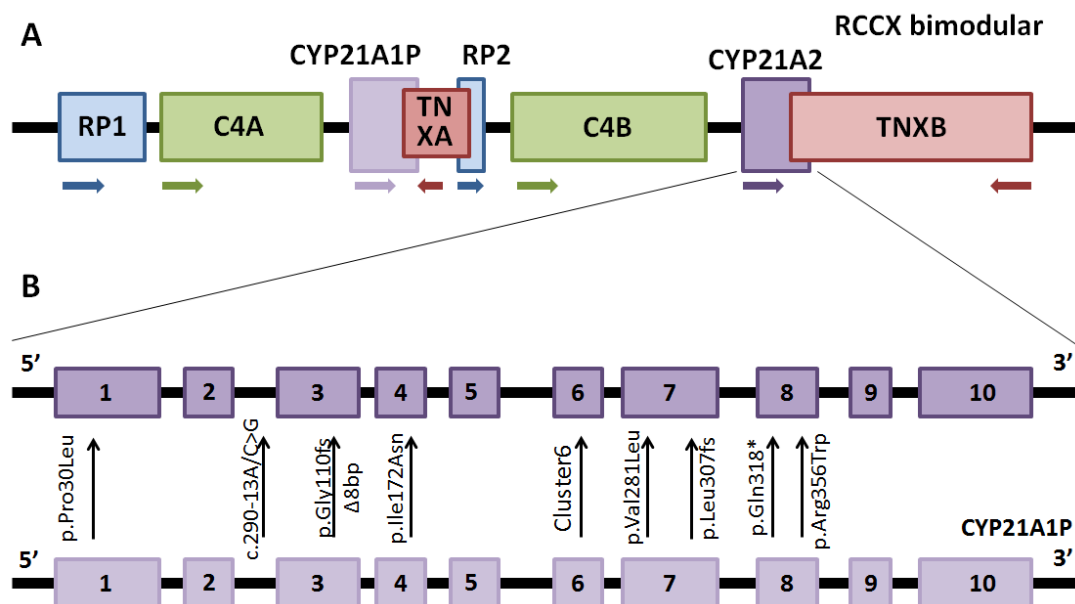


Figura 8: Organização do gene *CYP21A2* na região *RCCX* bimodular. (A) O gene *CYP21A2* e o pseudogene *CYP21A1P* estão arranjados em tandem, intercalados com dois genes *C4* que codificam para o fator 4 do sistema do complemento. Setas coloridas indicam a direção da transcrição. (B) Nove mutações mais comumente encontradas no gene *CYP21A2* que são transferidas por eventos de microconversão entre o gene ativo *CYP21A2* e seu pseudogene *CYP21A1P*. Baseado em Krone & Arlt 2009.

1.5) A enzima *CYP21A2* e a superfamília dos citocromos P450

A enzima *CYP21A2* é parte dos citocromos P450, uma superfamília de enzimas pertencente ao grupo das heme-proteínas, encontradas em todas as classes de

organismos. Nos humanos, estas enzimas estão envolvidas no metabolismo xenobiótico, na biossíntese do colesterol e na esteroidogênese; e em organismos eucarióticos, as proteínas desta família, são encontradas principalmente no retículo endoplasmático e na membrana mitocondrial interna das células (IUPAC 2014). As proteínas do citocromo P450 eucarióticas geralmente são compostas por 480 a 560 aminoácidos e aquelas que são microssomais possuem uma sequência sinal-âncora na porção amino-terminal que, juntamente com outros contatos hidrofóbicos menos definidos, formam um domínio hidrófobo com cerca de 20 a 25 resíduos que ancoram a proteína madura no retículo endoplasmático. A família das CYP21 em humanos é caracterizada por um gene e seu pseudogene, *CYP21A2* e *CYP21A1P* respectivamente, sendo o gene ativo expresso principalmente nas glândulas supra-renais (Danielson 2002).

A enzima CYP21A2 foi purificada pela primeira vez em 1980 a partir de microssomos do córtex adrenal bovino e foi comprovado que esta enzima cataliza as reações de hidroxilação frente aos substratos 17OHP e progesterona (Kominami et al. 1980). Em 1986, a sequência da proteína humana foi elucidada, sendo formada por 494 ou 495 aminoácidos, dependendo da presença ou ausência de uma leucina na posição proteica 10 (Higashi et al. 1986). Foram encontradas dificuldades na cristalização das proteínas P450 de membrana, por isso, as estruturas tridimensionais de P450 solúveis foram cristalizadas. O modelamento da proteína P450 de mamíferos foi deduzido primeiramente a partir de estudos cristalográficos de raios-X de P450cam, hoje denominada CYP101 (cânfora 5-exo-hidroxilase) proveniente da bactéria *Pseudomonas putida* (Poulos 1991). Entretanto, a pouca semelhança de sua estrutura primária com as P450s eucarióticas não contribuiu significativamente para se delinear a estrutura das P450 ligadas à membrana. Posteriormente um modelo trimimensional da proteína P450 humana foi desenvolvido a partir da estrutura cristalizada da proteína bacteriana CYP102A1 (antigamente denominada P450bm-3), na tentativa de se compreender melhor a estrutura proteica e o papel das mutações *missense* identificadas em pacientes afetados pela HAC por deficiência da CYP21A2 (Mornet & Gibrat 2000).

Tendo em mente que era necessário remover a sequência sinal-âncora na porção amino-terminal e substituí-la por uma sequência mais solúvel em água, o que permitiria se obter cristais adequados para a análise, estudos promissores foram desenvolvidos a fim de se resolver a estrutura do citocromo P450 modificado de coelho (CYP2C5) (Williams et al. 2000) e um modelo humano da proteína CYP21A2 foi

descrito baseado na estrutura da CYP2C5 modificada de coelho (Robins et al. 2006). Posteriormente, foi cristalizada a proteína CYP21A2 bovina complexada com duas moléculas do substrato 17OHP, para isso, além da retirada da porção amino-terminal de ancoramento na membrana, foram inseridas duas mutações que não afetam a atividade enzimática (p.Thr241Arg ep.Leu442Ala). A CYP21A2 bovina possui uma identidade de 80% com a proteína humana e um modelo da proteína CYP21A2 humana foi mais uma vez desenvolvido (Haider et al. 2013).

Recentemente a CYP21A2 humana foi por fim cristalizada, agora complexada com a progesterona; para isso a porção N terminal foi substituída por uma sequência que aumentou a solubilidade da enzima (Pallan et al. 2015). A estrutura global da CYP21A2 humana é típica das proteínas P450 (pelo menos 12 α -hélices e uma folha β próxima à região N terminal), sendo formada por 13 α -hélices (B e B' bem como F e F' são consideradas α -hélices independentes) e 9 folhas β (Figura 9). A obtenção da estrutura cristalizada da CYP21A2 humana representa um grande avanço para a compreensão das consequências bioquímicas de mutações no gene *CYP21A2*, uma vez que um modelo fidedigno pôde ser desenvolvido para as análises *in silico*.

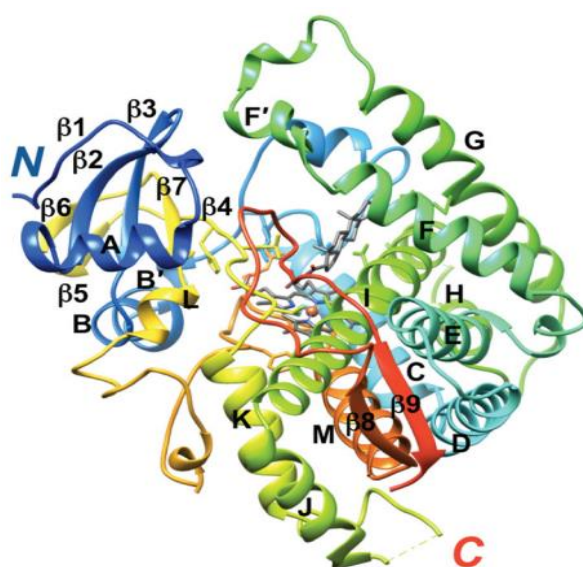


Figura 9: Estrutura terciária da proteína CYP21A2 humana em complexo com a progesterona. Os resíduos que formam as α -hélices de A a M e folhas β de 1 a 9 são: β 1: 32-36; A: 45-56; β 2: 59-64; β 3: 67-72; B: 75-84; B': 86-89; C: 115-131; D: 136-153; E: 161-178; F: 188-202; F': 205-212; G: 224-246; H: 257-264; I: 279-310; J: 312-322; K: 344-356; β 4: 364-368; β 5: 372-374; β 6: 377-379; β 7: 384-387; L: 389-394; M: 432-447; β 8: 450-454; β 9: 479-483. Reproduzido de Pallan et al. 2015.

1.6) Mutações no gene *CYP21A2*

Mutações podem ser definidas como uma mudança permanente na sequência de nucleotídeos ou no arranjo do DNA e aquelas que alteram genes individualmente são definidas como mutações gênicas. Estas abrangem desde pequenas mudanças na sequência do DNA do genoma nuclear, como em um único nucleotídeo (*SNVs – single nucleotide variation*), até alterações que podem afetar muitos milhões de pares de bases. Mutações consideradas novas são aquelas nunca identificadas anteriormente na população geral.

A organização genômica em tandem dos genes *CYP21* e *C4* e a alta homologia dos genes *CYP21* favorecem eventos de *crossing-over* desigual nessa região (White and Speiser 2000; Strachan 1991). Sendo assim, a recombinação das unidades mal pareadas durante a meiose I pode levar à formação de gametas com um número variável de unidades completas (Werkmeister et al. 1986). Atualmente este tipo de variação é chamado de *CNV (copy number variation)*. O primeiro defeito molecular identificado no gene *CYP21A2* e que foi relacionado à HAC foi descrito na década de 80 (Rumsby et al. 1986). Tratava-se de uma deleção de 30 kb envolvendo os genes *C4B* e *CYP21A2* (Werkmeister et al. 1986). Em seguida foram descritos eventos de conversão (Harada et al. 1987; Urabe et al. 1990), na qual o gene *C4B* permanecia intacto. Nos dois casos há a formação de um gene híbrido *CYP21A1P/CYP21A2* (Figura 10) (Donohoue et al. 1989).

Recombinações intergênicas são responsáveis por 90 a 95% das mutações associadas à deficiência da *CYP21A2* e o restante corresponde a mutações espontâneas (Werkmeister et al. 1986; Lee 2001). Todavia, dentre as recombinações intergênicas, deleções e conversões correspondem a apenas cerca de 20 a 25% dos casos de deficiência da *CYP21A2* (Speiser et al. 1992; Mornet et al. 1991); pequenas deleções, inserções e trocas pontuais de nucleotídeos são mais frequentes, correspondendo à aproximadamente 75% das recombinações intergênicas, e são consideradas microconversões (Globerman et al. 1988; Higashi et al. 1988; Bacheга et al. 1998).

No Brasil diversos estudos reportam frequências de mutações diferentes das encontradas em outras populações. Deleções e conversões correspondem a cerca de 8 a 12% dos alelos (Bacheга et al. 2004; Bacheга et al. 1999; de-Araujo et al. 1996) sendo que foram identificados 9 haplótipos diferentes nos alelos portadores de deleção (Coeli et al. 2010); pequenas deleções, inserções e trocas pontuais de nucleotídeos

(microconversões) por sua vez correspondem a 73 a 77% dos alelos e em média 15% dos alelos carregam mutações novas ou raras nos casos de deficiência da CYP21A2 (Bachega et al. 1998; Paulino et al. 1999; Torres et al. 2003).

As microconversões transferem material genético do pseudogene *CYP21A1P* para o gene ativo *CYP21A2* e explicam a origem de oito mutações de ponto e uma deleção de 8 pares de base no éxon 3 mais comumente encontradas em indivíduos com HAC por deficiência da CYP21A2 (Krone & Arlt 2009) (Figura 6). Estas microconversões provocam danos com diferentes graus de gravidade à atividade enzimática normal.

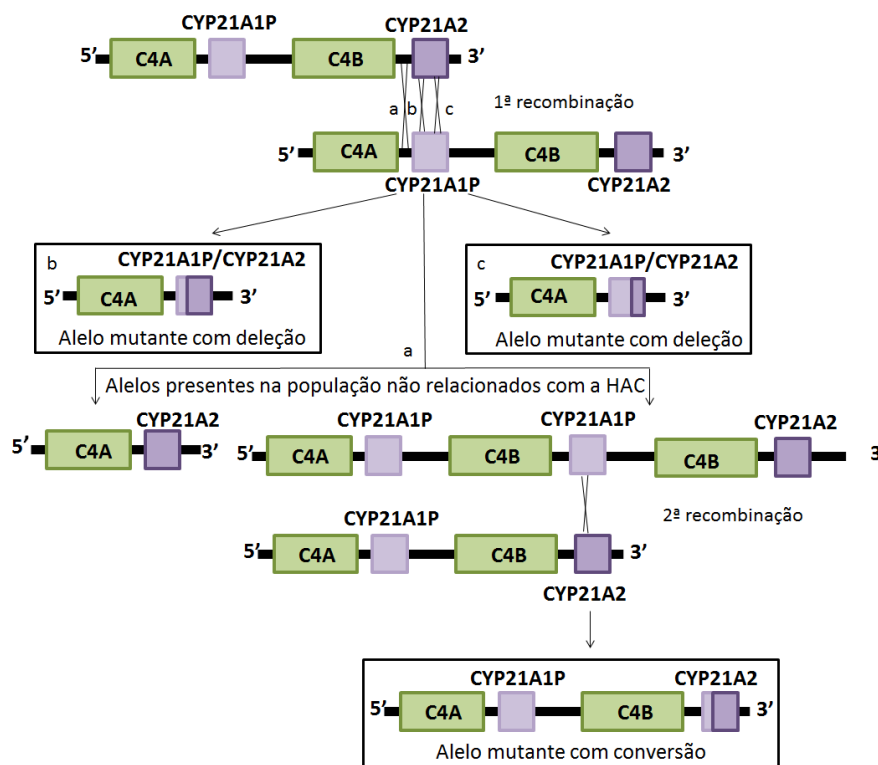


Figura 10: Rearranjos genéticos entre o gene *CYP21A2* e pseudogene *CYP21A1* devido ao *crossing-over* desigual podendo resultar em uma grande deleção ou uma grande conversão após uma segunda recombinação gênica. Baseado em Santos et al. 2010.

1.7) Estudos funcionais

Para o estudo do efeito biológico sobre a expressão e a atividade enzimática de *CYP21A2* exercido por cada microconversão, bem como por mutações não provenientes do pseudogene, investigações *in vitro* têm sido realizadas. Vários sistemas de expressão já foram utilizados, dentre estes podemos citar a transfecção com

plasmídios em células de mamíferos, infecção de células de mamíferos com vírus da vaccinia ou mesmo expressão em bactérias ou leveduras. Em geral, os resultados relativos aos efeitos de uma mutação particular sobre a atividade enzimática não dependem do método usado para a expressão (Higashi et al. 1988; Chiou et al. 1990; Hu & Chung 1990; Tusie-Luna et al. 1990; Higashi & Fujii-Kuriyama 1991; Tusie-Luna et al. 1991; Wu et al. 1991; Wu & Chung 1991; Helmberg et al. 1992; Kohn et al. 1995; Hsu et al. 1996; Hu et al. 1996; Lajic et al. 1997; Nikoshkov et al. 1997; Nikoshkov et al. 1998; Bleicken et al. 2009). A reação de mutagênese sítio dirigida tem sido largamente empregada para se introduzir a alteração de interesse no cDNA *wildtype* do gene *CYP21A2* clonado num vetor apropriado. Embora diversos vetores diferentes de clonagem e expressão tenham sido utilizados, a obtenção de plasmídeos em células bacterianas e a transfecção com os plasmídeos obtidos em células de mamíferos tem sido a metodologia mais amplamente utilizada para o estudo de alterações *missens e* (Amor et al. 1988; Tusie-Luna et al. 1990; Lajic et al. 1997; Nikoshkov et al. 1997; Nunez et al. 1999; Ohlsson et al. 1999; Lajic et al. 2001; Riepe et al. 2008; Concolino et al. 2012; Krone et al. 2005; Robins et al. 2005; Barbaro et al. 2015; Barbaro et al. 2006; Soardi et al. 2008).

Ao longo dos anos um total de 194 mutações foram descritas no gene *CYP21A2* relacionadas à HAC, segundo o “The Human Gene Mutation Database” 2015 de acesso público, e 255 no HGMD Professional de acesso restrito. Cada uma dessas mutações pode alterar de forma distinta a proteína e, conseqüentemente, sua função. Inserções ou deleções de nucleotídeos (mutação *frameshift*) causam uma mudança no quadro de leitura do mRNA, o que resulta em proteínas gravemente alteradas, com códon de parada normalmente diferente do normal e grande comprometimento da atividade enzimática. Mutações do tipo *missense* podem provocar graus variados de atividade enzimática ou mesmo não alterar o aminoácido transcrito. Além disso, algumas alterações no DNA não causam efeito fenotípico (McInnes et al. 2008). Isso pode ser justificado devido à alteração ocorrer em uma região não crítica da proteína, não alterando as suas propriedades funcionais. Alguns polimorfismos sem efeito fenotípico caracterizado no gene *CYP21A2*, guardam uma relação com algumas mutações específicas caracterizando um desequilíbrio de ligação no alelo (Koppens et al. 1992; Paulino et al. 1999).

Substituições nucleotídicas que modificam o aminoácido gerando um *stop códon* prematuro (mutação *nonsense*) resultam em um mRNA alterado que, ao ser traduzido, resulta em uma proteína truncada com sua atividade enzimática prejudicada. Outra possibilidade é este mRNA alterado seguir para o processo de *nonsense mRNA decay* antes mesmo de sua tradução. Geralmente estas mutações não são investigadas quanto ao papel funcional, pois se deduz uma atividade nula da proteína, caso seja produzida, sendo associada ao fenótipo clássico perdedor de sal. No entanto, substituições nucleotídicas que modificam o aminoácido podem dar origem a proteínas com diversos graus de comprometimento de sua atividade enzimática (mutações *missense*). Essa grande variedade do comprometimento da função se dá pelo fato dessas alterações interferirem na estrutura e/ou estabilidade proteica por alterar seus contatos internos, seus sítios de ligação ao substrato, diminuir a velocidade máxima enzimática (V_{max}) e sua interação com outras enzimas e/ou cofatores. Essas mutações podem ser relacionadas ao fenótipo clássico virilizante simples e ao fenótipo não clássico. Por isso, após a identificação de uma nova mutação no gene *CYP21A2* se faz necessário um estudo mais aprofundado sobre as consequências da mesma, tanto na estrutura como na atividade enzimática frente aos dois substratos naturais *in vitro* e como a atividade enzimática residual observada se compara à atividade da proteína normal (Concolino et al. 2012; Oriola et al. 2011; Rubtsov et al. 2011).

Quando uma variante alélica é encontrada em mais de 1% dos cromossomos na população geral ela constitui um polimorfismo genético e as variantes alélicas com frequências menores que 1% são chamadas de variantes raras. Embora muitas variantes raras levem a distúrbios genéticos, não há uma simples correlação entre a frequência do alelo e seu efeito sobre o fenótipo, sendo assim alelos frequentes podem estar associados ao fenótipo apresentado pelo paciente e alelos raros podem não ter efeito sobre o mesmo (McInnes et al. 2008).

Com base nas atividades residuais e por analogia às formas clínicas as mutações no gene *CYP21A2* foram classificadas em: a) perdedoras de sal, quando a atividade enzimática residual relativa é 0 ou $\leq 1\%$; b) virilizante simples, quando a atividade enzimática residual relativa é 1 a 5%; c) não clássica, quando a atividade enzimática residual relativa é acima de 10% (Figura 11).

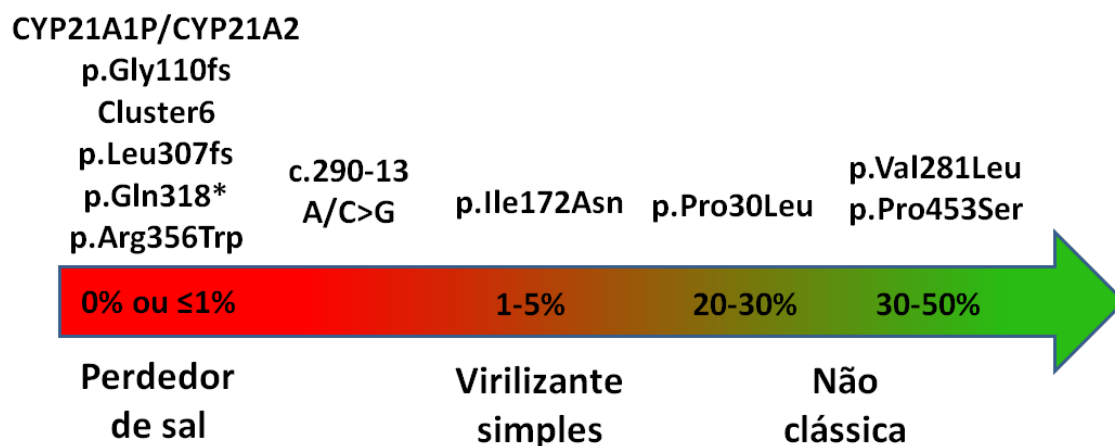


Figura 11: Correlação genótipo-fenótipo em HAC pela deficiência da CYP21A2 baseado na atividade enzimática apresentada *in vitro*. Adaptado de Krone & Arlt 2009.

1.8) Fenótipo vs. Genótipo

O fenótipo na HAC pode ser deduzido pela mutação que determinar menor dano à atividade enzimática quando se tratar de uma heterozigose com duas mutações diferentes. Assim, a combinação de duas mutações graves (atividade enzimática residual ≤1%) resulta na HAC perdedora de sal; a combinação de uma mutação intermediária com uma grave ou duas mutações intermediárias (atividade residual enzimática entre 1 e 5%) resulta na HAC virilizante simples; e a combinação de uma mutação menos grave com uma grave ou intermediária ou duas mutações menos grave (atividade residual enzimática superior a 10%) resulta na HAC não clássica. A associação entre a forma clínica e a classe da mutação patológica discutida na maioria dos trabalhos é geralmente concordante, mas a distinção entre as formas virilizante simples, perdedora de sal e não clássica não é absoluta uma vez que há vários portadores da deficiência da CYP21A2 que não se enquadram neste padrão (Speiser et al. 1992; Krone et al. 2000; Nimkarn and New 2013).

A mutação que, em pacientes homozigotos, apresenta variação fenotípica com mais frequência é a c.290-13A/C>G que cria um sítio alternativo de *splicing* no intron 2, fazendo um deslocamento do quadro de leitura na tradução da proteína (Higashi et al. 1988; Higashi et al. 1991). Entre pacientes com esse genótipo podem ser encontrados o fenótipo virilizante simples e o perdedor de sal. Uma possível explicação é que a troca c.290-13A/C>G deixa o sítio normal inalterado. Portadores dessa alteração

podem produzir também um mRNA processado corretamente, assim seria possível a síntese de uma pequena quantidade de enzima funcional (Kohn et al. 1995).

1.9) Diagnóstico bioquímico

O diagnóstico bioquímico da HAC por deficiência de CYP21A2 é feito por meio da mensuração de seu precursor enzimático, a 17-hidroxiprogesterona (17OHP). Na forma clássica da HAC os indivíduos afetados apresentam concentrações basais da 17OHP claramente elevadas; entretanto, isso não acontece na forma não clássica onde os níveis de 17OHP podem estar ligeiramente alterados ou até mesmo dentro da faixa de normalidade. Sendo assim, para estabelecer o diagnóstico hormonal mais preciso em indivíduos afetados com a forma não clássica, se faz necessário além da dosagem basal o teste de estimulação com análogos sintéticos ao ACTH, como, por exemplo, 250 µg Synacthen, com medição dos níveis de 17OHP 60 minutos após o estímulo. Mostrando essa sobreposição de dosagens nas faixas normal e não clássica, Nimkarn et al. publicaram um gráfico com os valores da dosagem da 17OHP basal e 60 minutos após estímulo de indivíduos geneticamente não afetados, indivíduos heterozigotos e indivíduos heterozigotos compostos, tanto com HAC clássica como não clássica (Figura 12) (Nimkarn et al. 2011). Neste gráfico, quando nos atentamos apenas para as dosagens basais da 17OHP nos indivíduos estudados (eixo X do gráfico), pode se observar a distinção entre os dados obtidos para os pacientes afetados com a forma clássica e a forma não clássica da HAC. Entretanto essa distinção não é clara quando se trata das dosagens basais dos pacientes afetados com a forma não clássica da HAC e os indivíduos heterozigotos. A distinção entre estes pacientes só é possível quando a dosagem da 17OHP é realizada 60 minutos após o estímulo com análogos do ACTH, como pode ser observado no eixo Y do gráfico.

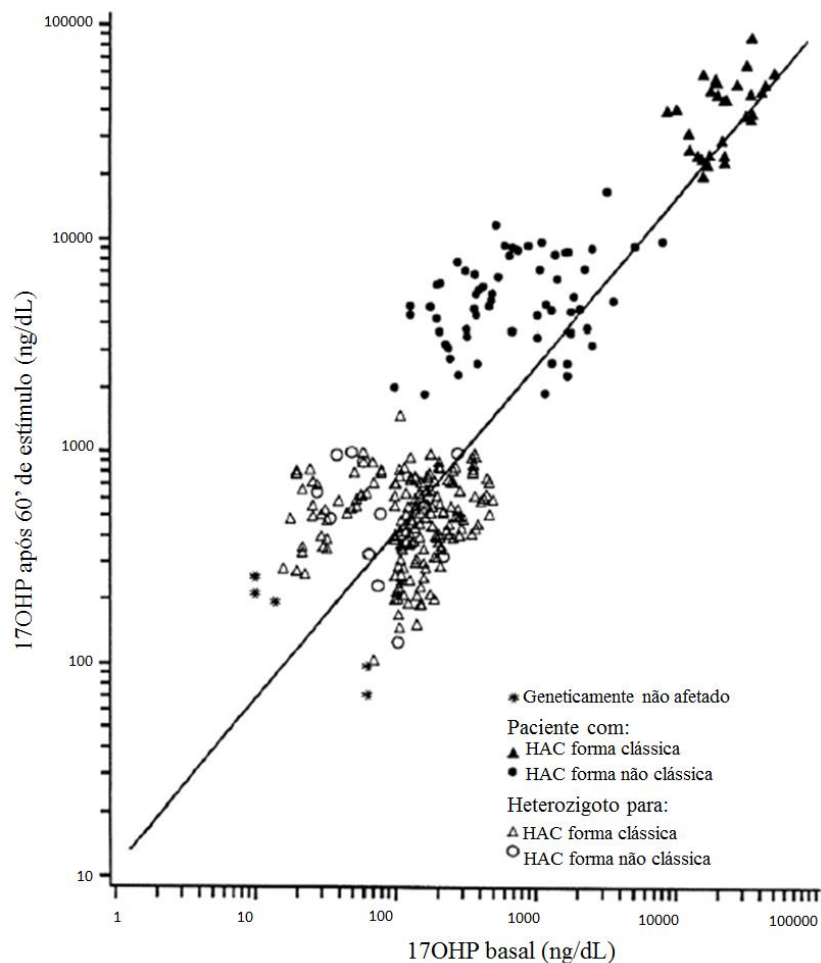


Figura 12: Monograma da dosagem da 17OHP em basal e após 60 minutos de estimulação com corticotropina. Os dados para este monograma foram coletados entre 1982 e 1991 no Departamento de Pediatria, Hospital de Nova Iorque – Centro Médico Cornell, em Nova Iorque, NI. Traduzido de Nimkarn et al. 2011.

1.10) Diagnóstico molecular

O diagnóstico genético da HAC pela deficiência da CYP21A2 se dá pelo rastreamento de mutações no gene *CYP21A2* que possam justificar o fenótipo apresentado pelo paciente. Nos tempos em que o sequenciamento de DNA não era acessível, primeiramente buscava-se definir nos alelos afetados a presença ou ausência de deleção, conversão gênica e 9 mutações pontuais derivadas do pseudogene *CYP21A1P* (microconversões), eventos mutacionais bastante frequentes para esse gene. Para isso eram utilizadas as técnicas de *Southern blot* para se verificar deleções e/ou conversões gênicas e a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) alelo específica e digestões por enzimas de restrições para se verificar as mutações pontuais

(Wilson et al. 1995; Ezquieta et al. 1995). Caso o genótipo não ficasse esclarecido, o gene era sequenciado em busca de novas mutações ou mutações não provenientes do pseudogene.

Atualmente, em nosso laboratório, faz-se diretamente o sequenciamento do gene para se definir haplótipos, uma vez que há variações de um único nucleotídeo (SNVs) que se associam a mutações e que futuramente poderão ser investigadas quanto a diferenças importantes no fenótipo dos indivíduos afetados. No caso de excesso de homozigose ou cuja segregação alélica não se esclareça com o sequenciamento, a variação no número de cópias (CNV) pode ser verificada por *MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)*. Para as variações nucleotídicas novas que porventura sejam identificadas, tanto em éxon quanto em intron, há necessidade de comprovação do efeito biológico para uma descrição adequada da mutação e estabelecimento de uma correlação fenótipo-genótipo.

1.11) Tratamento

A HAC é tratada pela administração de glicocorticoide, dexametasona ou seu equivalente, que visa corrigir a deficiência da secreção do cortisol e suprimir a superprodução de CRH e ACTH. Sendo assim, o tratamento com doses adequadas de glicocorticoides reduz o acúmulo dos precursores da enzima CYP21A2 e o subsequente excesso androgênico na corrente sanguínea dos indivíduos afetados. A dose do glicocorticoide deve ser ajustada de forma a manter os níveis de andrógenos necessários de acordo com a idade e o sexo, e visando normalizar o crescimento em crianças afetadas. Pacientes afetados pela forma clássica perdedora de sal também necessitam de tratamento com esteroides que visam a retenção de sais no organismo (mineralocorticoides). O monitoramento do tratamento deve ser realizado a cada 3 ou 4 meses enquanto as crianças afetadas se encontram em fase de crescimento e menos frequentemente após essa idade. Na fase adulta o acompanhamento a longo prazo é recomendado (Nimkarn et al. 2011; White & Speiser 2000).

Nos fetos 46,XX onde há a ambiguidade da genitália externa, a recomendação geral é que o sexo de criação seja equivalente ao sexo gonadal e genético, visando manter a possibilidade da função reprodutiva. Nestes casos cirurgias corretivas são necessárias, entretanto cada caso deve ser avaliado individualmente.

1.12) Triagem neonatal

A triagem neonatal da HAC é realizada em muitos países e no Brasil ela é bem estabelecida em alguns estados como Minas Gerais, Goiás e mais recentemente no estado de São Paulo. O Ministério da saúde autorizou em 2012 a ampliação do teste do pezinho pelo Sistema Único de Saúde - SUS - incluindo a dosagem da 17OHP para o diagnóstico da HAC.

Essa triagem tem o objetivo de reduzir a morbidade e a mortalidade em recém-nascidos afetados com a forma perdedora de sal, principalmente em recém-nascidos 46,XY, antes que se desenvolvam crises de perda de sal, uma vez que pela ausência da genitália ambígua o diagnóstico pode não ser feito ou ser feito tardiamente. Essa triagem se baseia na determinação dos níveis de 17OHP ao nascimento, entretanto os resultados podem apresentar falsos positivos. Recém-nascidos não afetados possuem concentrações de 17OHP elevadas ao nascimento que decrescem com o passar dos dias, já em recém-nascidos afetados não ocorre essa diminuição, por isso a coleta do sangue deve ser realizada entre o 48-72 horas de vida. Recém-nascidos 46,XX apresentam níveis mais baixos de 17OHP do que os 46,XY. Além disso, recém-nascidos prematuros, doentes, com baixo peso ou estressados tendem a terem níveis mais elevados de 17OHP do que recém-nascidos saudáveis (White 2009). Não existe também um padrão universalmente aceito de nível de 17OHP considerado normal ao nascimento. Caso o resultado desta dosagem seja acentuadamente anormal a criança deve ter seus eletrólitos dosados para determinar a perda ou não de sal e investigações maiores devem ser realizadas. Entretanto há a necessidade de uma segunda dosagem da 17OHP em indivíduos que apresentam valores ao nascimento próximos ao extremo da faixa de normalidade.

O diagnóstico genético destes casos visa evitar o tratamento desnecessário de indivíduos heterozigotos que apresentam 17OHP basal um pouco elevada e promover o acompanhamento de indivíduos afetados com a forma não clássica da HAC nos quais a dosagem da 17OHP tende a se normalizar nos primeiros meses de vida, se elevando posteriormente a qualquer momento após os primeiros meses de vida.

Este trabalho iniciou-se com a triagem de mutações no gene *CYP21A2* em pacientes e suas famílias de origem brasileira, encaminhados por Hiperplasia Adrenal Congênita, que pudessem esclarecer o fenótipo apresentado. Em consequência desta triagem e de triagens anteriores em indivíduos de origem brasileira, sueca, italiana e iraniana foram identificadas: dez novas mutações *missense*; uma nova deleção *in frame*; duas mutações descritas anteriormente, entretanto sem estudos funcionais; e três combinações de mutações no mesmo alelo.

No **artigo 1** descrevemos nove mutações identificadas em pacientes com suspeita clínica para HAC. Destas mutações sete são descritas pela primeira vez. No **artigo 2** descrevemos três combinações de mutações identificadas no mesmo alelo e que apresentaram efeito sinérgico, sendo quatro destas mutações descritas pela primeira vez. No **artigo 3** descrevemos o caso de uma criança diagnosticada clinicamente com HAC por deficiência da *CYP21A2* com virilização e níveis elevados de testosterona devido à presença de um tumor nas células de Leydig. O estudo molecular foi realizado para identificar as mutações no gene *CYP21A2* responsáveis pelo fenótipo apresentado pelo paciente.

2) OBJETIVOS

2.1) Objetivos gerais

Investigar o efeito bioquímico de mutações novas ou raras no gene *CYP21A2* para avaliação de suas patogenicidades.

2.2) Objetivos específicos

2.2.1) Artigo 1

- Investigar a patogenicidade de nove mutações identificadas no gene *CYP21A2* em indivíduos com suspeita clínica de HAC.
- Relacionar o genótipo com o fenótipo desses indivíduos.

2.2.2) Artigo 2

- Investigar a patogenicidade de quatro novas mutações e três combinações de mutações identificadas no gene *CYP21A2* em pacientes diagnosticados com forma clássica e não clássica da HAC por deficiência da *CYP21A2* nas populações brasileira e italiana.
- Relacionar o genótipo com o fenótipo dos pacientes.

2.2.3) Artigo 3

- Analisar o gene *CYP21A2* em um paciente diagnosticado clinicamente com HAC por deficiência da *CYP21A2* e sua família, através do sequenciamento *Sanger*.
- Verificar a segregação na família.
- Relacionar o genótipo com o fenótipo do paciente.

3) DOCUMENTOS PUBLICADOS E A PUBLICAR

3.1) **Capítulo 1 – Artigo:**

**Functional and structural consequences of nine
CYP21A2 mutations ranging from very mild to
severe effects.**

D.P. Michelatto, L. Karlsson, A.L.G. Lusa, C.D.A.M. Silva, L. J. Östberg, B. Persson,
G. Guerra-Júnior, S.H.V. Lemos-Marini, M. Barbaro, M.P. de Mello & S. Lajic.

Functional and Structural Consequences of Nine *CYP21A2* Mutations Ranging from Very Mild to Severe Effects

Short title: Nine *CYP21A2* mutations

D.P. Michelatto^{1,2}, L. Karlsson², A.L.G. Lusa¹, C.D.A.M. Silva³, L. J. Östberg⁴, B. Persson^{4,5}, G. Guerra-Júnior³, S.H.V. Lemos-Marini³, M. Barbaro⁶, M.P. de Mello¹ & S. Lajic².

¹ Laboratório de Genética Molecular Humana, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Av. Cândido Rondon 400, 13083-875, Campinas, SP, Brazil.

² Department of Women's and Children's Health, Karolinska Institutet, Pediatric Endocrinology Unit (Q2:08), Karolinska University Hospital, S-171 76, Stockholm, Sweden.

³ Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Rua Tessália Vieira de Camargo 126, 13083-887, Campinas, SP, Brazil.

⁴ Science for Life Laboratory, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, 171 77 Stockholm, Sweden.

⁵ Science for Life Laboratory, Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, 751 24 Uppsala, Sweden.

⁶ Department of Molecular Medicine and Surgery, Karolinska Institutet and Center for Inherited Metabolic Diseases (CMMS L7:05) Karolinska University Hospital, S-171 76, Stockholm, Sweden.

Corresponding author:

Dr Svetlana Lajic (Svetlana.Lajic@ki.se), Department of Women's and Children's Health, Pediatric Endocrinology Unit (Q2:08), Karolinska University Hospital, S-171 76, Stockholm, Sweden.

Keywords: 21-hydroxylase; functional studies; congenital adrenal hyperplasia; *CYP21A2*.

Word count: 2.996.

Abstract

Objectives:

21-hydroxylase deficiency is the main cause of CAH. Novel mutations in the *CYP21A2* gene comprise around 5% of all disease causing alleles. Functional and structural effects of seven novel *CYP21A2* mutations (p.Leu12Met, p.Arg16Cys, p.Ser101Asn, p.Ser202Gly, p.Pro267Leu, p.Gln389_Ala391del and p.Thr450Met) and two previously reported but now functionally studied (p.Ser113Phe and p.Thr450Pro) were investigated. Functional analyses were complemented with *in silico* prediction of mutation pathogenicity based on the recently crystallized human CYP21 structure.

Methods:

Mutated proteins were transiently expressed in COS-1 cells and enzyme activities towards 17-hydroxyprogesterone and progesterone were determined. The three-dimensional structure of human CYP21 was used as starting point to evaluate the effect of the novel mutations on protein structure.

Results:

High levels of residual activities were obtained for p.Arg16Cys, p.Ser101Asn, p.Ser202Gly, p.Pro267Leu and p.Thr450Met, as for the non-classic mutations p.Pro453Ser and p.Pro482Ser. The variant p.Leu12Met exhibited normal enzyme function. The novel mutations p.Ser113Phe, p.Gln389_Ala391del and p.Thr450Pro resulted in almost completely abolished enzyme function similar to the common p.Ile172Asn mutation. The K_m for all novel variants was in the same order of magnitude as for wild type protein except for p.The450Met. The maximum velocity (V_{max}) was decreased for all mutants except for p.Leu12Met.

Conclusions:

We conclude that p.Leu12Met is a normal variant, five mutations (p.Arg16Cys, p.Ser101Asn, p.Ser202Gly, p.Pro267Leu and p.Thr450Met) result in mild non classic CAH, and three mutations (p.Ser113Phe, p.Gln389_Ala391del and p.Thr450Pro) are associated with the classic CAH phenotype. This study confirmed and for some mutations established the correlation between genotype and phenotype. Furthermore, the *in silico* predictions of mutation pathogenicity complemented the functional findings.

Introduction

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is caused by defects in one of the steroidogenic enzymes involved in the adrenal steroid biosynthesis from cholesterol to cortisol. Approximately 95% of CAH cases are caused by 21-hydroxylase deficiency (21OHD). In the classic form children present with salt loss (salt wasting form) or not (simple virilizing form) during the neonatal period and affected girls are born with virilized external genitalia. In the non-classic form signs of androgen excess can be observed such as acne, hirsutism and menstrual irregularities in young women. Children present with precocious pubarche, accelerated growth velocity and advanced skeletal maturation¹. The worldwide incidence of classic 21OH deficiency is 1:10.000 to 1:15.000 live births, while non-classic 21OH deficiency is much more prevalent at 1:500 live births in Caucasian populations²⁻⁵.

The *CYP21A2* gene coding for the 21-hydroxylase protein consists of 10 exons and is located on the short arm of chromosome 6^{6,7} in tandem with a non-functional pseudogene *CYP21A1P* (98% identity)⁸⁻¹⁰. There are 10 common *CYP21A2* mutations identified in more than 95% of all CAH patients and in general the genotype correlates well with the phenotype, where the less severe mutation determines the phenotype¹¹. Furthermore, there is a good correlation between estimations of residual enzyme function determined with *in vitro* studies and *in vivo* disease severity^{12,13}. Therefore, *in vitro* analysis is proposed as a complement in disease classification, especially for novel or rare mutations, where large groups of patients are not available for clinical investigation, thereby improving genetic counselling and clinical management^{14,15}.

In this report, we describe a detailed genotype-phenotype evaluation by functional analysis of seven novel mutations in the *CYP21A2* protein (p.Leu12Met, p.Arg16Cys, p.Ser101Asn, , p.Ser202Gly, p.Pro267Leu, p.Gln389_Ala391del and p.Thr450Met) and two previously reported but not previously functionally studied mutations (p.Ser113Phe and p.Thr450Pro). The mutations were identified in individuals investigated for CAH. The aim of the study was to investigate the pathogenicity of the novel/rare mutations *in vitro* and to correlate the genotype with the phenotype. In parallel, we also expressed four mutations of different severity and known to cause CAH (p.Ile172Asn, p.Val281Leu, p.Pro453Ser and p.Pro482Ser) as well as a normal variant of the *CYP21A2* gene (p.Ala15Thr) allowing a better phenotype prediction. Furthermore we complemented the analysis with *in silico* prediction of mutation

pathogenicity and effects on protein structure based on the recently crystallized human CYP21A2 structure¹⁶.

Material and methods

Genotyping

Genotyping of the *CYP21A2* gene was performed at Universidade Estadual de Campinas, Brazil and at Karolinska University Hospital, Sweden. The study was approved by the Ethics Committee of Universidade Estadual de Campinas and the Regional ethics committee of Karolinska Institutet.

Genomic DNA was obtained from peripheral blood by phenol/chloroform extraction¹⁷. The *CYP21A2* gene was specifically amplified in two or four fragments, depending on the presence or absence of the intron 2 variant c.290-13A/C>G¹⁸. Electropherograms were analyzed against the reference sequence M12792.1. Segregation analysis was performed in all subjects by sequencing of parental samples, except for Subject 3. Clinical and molecular data of the subjects are summarized in Table 1.

Subjects

Subject no. 1, a girl, presented with premature pubarche and accelerated growth velocity at the age of 4 years. She had clitoral enlargement since birth but no labioscrotal fusion (Prader I). Due to advancement of bone age (8.7 y at 6.4 y chronological age) she was subjected to a 250 µg Synachten test and exhibited an elevated 17OHP level (13 nM basal, >154 nM at 60 min). The child was diagnosed with NC CAH and genotyping of *CYP21A2* revealed a complex genotype with a novel mutation p.Leu12Met on the same allele as p.Gln318Stop and the common NC mutation p.Val281Leu on the other allele.

Subject no. 2, came to medical attention after the diagnosis of her daughter and subsequent segregation analysis. She did not exhibit any symptoms of androgen excess and stimulation with Synachten only raised 17OHP just above the cut off level at 60 min (6 nM to 31 nM), Table 1. Genotyping of *CYP21A2* revealed a novel mutation p.Ser101Asn in compound heterozygosity with p.Val281Leu. Mild/asymptomatic NC CAH was thus suspected.

Table 1. Genotype and phenotype of CAH patients carrying the mutations that were expressed *in vitro*.

Subject No.	Sex	Age at diagnosis	Symptoms	17OHP (nmol/liter)* basal/stimulated	Genotype	Phenotype	Country of origin	Publication
1	F	4 years	Prader I, premature pubarche, accelerated growth.	13 / >154	p.Leu12Met +p.Gln318X / p.Val281Leu	NC	Brazil	Present study
2	F	Adult	Asymptomatic.	6 / 31	p.Ser101Asn / p.Val281Leu	NC	Brazil	Present study
3	F	Adult	Menstrual irregularities and hirsutism	NA	p.Ser113Phe / p.Val281Leu	NC	Brazil	³¹ ***
4	F	At birth	Positive neonatal screening, 17OHP 106 nM**.	5 / 21 Cortisol 360 / 1118	p.Ser202Gly / p.Gln318Stop	NC	Sweden	Present study
5	F	1 mth'	Prader I, screening value 17OHP 23 nM.	NA	p.Ser202Gly / normal	Healthy	Brazil	Present study
6	M	9 years	Premature pubarche, advanced BA (12.1 y at 9.5 y).	4 / 11	p.Ser202Gly /normal	Healthy	Brazil	Present study
7	F	At birth	Prader IV, Na (129 mM).	73 / NA	p.(Gln389_Ala391del) / deletion or conversion	SW	Brazil	Present study
8	F	1 month	Prader V. Adrenal crisis day 33: Na (117 mM), K (8.3 mM), hypoglycemia (2.3 mM).	247 / NA	p.Thr450Pro / p.Thr450Pro	SW	Iran	(Baradaran-Heravi et al. 2007)
9	M	5 years	Suspicion of penile growth.	1.5 / NA	p.Arg16Cys / normal	Healthy	Brazil	Present study
10	F	4 years	Premature pubarche, BA 8.10 yrs at 6.5 yrs of age.	2 / 7	p.Pro267Leu / normal	Healthy	Brazil	Present study
11	F	Adult	Acne. Mother of a child with clinical indication of CAH.	1.3 / 9	p.Thr450Met / normal	Healthy	Brazil	Present study

* Reference value/cut-off level 17-OHP: 6 and 30 nM, basal and 60 min, 250µg Synacthen test.

** Neonatal reference value/cut-off level 100 nM.*** Haider et al. 2013, mutation is reported but no patient phenotype description.

NA, not available; SW, salt wasting; NC, non-classic; BA, bone age.

Subject no. 3, a female, presented with menstrual irregularities, hirsutism and a clinical suspicion of CAH when she was 26 years old. She was found to be heterozygous for p.Val281Leu and the novel mutation p.Ser113Phe. Mild NC CAH was thus suspected.

Subject no. 4, a girl, was born AGA at GW36 and diagnosed via the neonatal screening program. The screening value of 17OHP (106 nM) was just above the cut-off (100 nM) and the value at second tier was also slightly elevated (66 nM, cut-off 60 nM, GW37+2). She had no signs of virilization and electrolyte levels were normal. At 6 months of age, a 250 µg Synacten test was performed with normal results, Table 1. Due to the history of two pathological screening values the child was genotyped. A novel mutation, p.Ser202Gly, was detected in *trans* with p.Gln318Stop. Very mild NC CAH could not be ruled out. The novel mutation p.Ser202Gly was also identified in heterozygous form in subject no. 5 and no. 6 at the age of 1 month and 9 years, respectively. Both children were investigated initially at a primary center due to suspicion of androgen excess. Analysis of 17OHP and genotyping could however not confirm the diagnosis of CAH.

Subject no. 7, a girl, was born AGA at term with ambiguous genitalia (Prader IV). At day 7 she was hospitalized due to hyponatremia (129 nM) and SW CAH was confirmed with elevated levels of 17OHP (73 nM) and subsequent genotyping. She was compound heterozygous for the novel mutation p.Gln389_Ala319del and a deletion or conversion on her other allele.

The clinical presentation of subject no. 8 has been previously described¹⁹. For summary, see Table 1.

Subject no. 9, 10 and 11 presented with different signs of androgen excess and a clinical suspicion of CAH, for summary see Table 1. Upon testing, 17OHP levels were however normal. Genotyping revealed three novel mutations - p.Arg16Cys, p.Pro267Leu and p.Thr450Met respectively. Since the functional consequences of these novel amino acid substitutions were unknown they were included in the present study.

Functional studies

The general description for construction of vectors for expression studies of mutated CYP21A2 protein in COS-1 cells has been previously described^{12,20}.

Expression of mutant and wild type CYP21A2 protein and assays of 21OH activity were performed as previously described^{21,22}. Enzyme activities were expressed

as a percentage of conversion, taking the apparent specific activity of the wild type *CYP21A2* as 100%. Assays were performed after 40 min incubation time.

Apparent kinetics constants were determined 24h post transfection. Intact cells were incubated as previously described²¹ together with 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, or 6.0 μ M of unlabeled 17-hydroxyprogesterone (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) as substrate. After incubation at 37°C for 20 minutes, steroids were extracted and analyzed as previously described²¹. Apparent kinetic constants were calculated after linear regression of the data derived from determinations of enzymatic activity at each of the five different substrate concentrations.

Western blot

To ascertain similar amount of *CYP21A2* protein expression in transfected cells, Western blot analysis was performed using rabbit polyclonal antibodies against human CYP21A2 as primary antibody (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) and anti-rabbit IgG (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Germany) as the secondary antibody, see Robins et al for details²¹.

Structural evaluation

The three-dimensional structure of human CYP21, pdb id: 4y8w¹⁶, was used as a starting point to evaluate the effect of the novel mutations on the structure of protein. The ICM molecular modelling software (version 3.8-1, Molsoft LLC, La Jolla, CA) was used to perform structural calculations of the structures of each mutation, expanding on the strategy previously described²³. First, all missing intra-structural loops were added to the 4y8w structure and the structure was optimized using energy minimization. A model of each mutation was then generated by modifying the corresponding amino acid residue, followed by multiple steps of energy minimization. The energy minimization was initially performed with strong backbone restraints, which were gradually relaxed and finally a global minimization without backbone restraints was performed. Each mutation was then evaluated based on energy and distances to the steroid and heme, as well as using the ICM built-in function for evaluating stability changes from mutations by calculating the free energy changes.

The BLAST web interface²⁴ was used to identify mammalian proteins similar to the human CYP21A2 protein. The search was performed on the Nov 2015 release of the Refseq database and resulted in CYP21 protein sequences from 81

mammals. The sequences with the highest similarity to the human CYP21A2 protein, one sequence per species, were retrieved from the database. The retrieved sequences were aligned using the Linsi approach of MAFFT²⁵, and for each position the sequence identity was calculated, counting a gap as a mismatch.

Results

By *in vitro* functional studies, we have determined the residual activities of nine novel/rare CYP21A2 missense mutations and of five well known reference mutations (p.Ala15Thr, p.Ile172Asn, p.Val281Leu, p.Pro453Ser and p.Pro482Ser). The results are summarized in Table 2 and Figure 1. For six novel amino acids variants with sufficient residual enzyme activity (p.Leu12Met; p.Arg16Cys; p.Ser101Asn; p.Ser202Gly; p.Pro267Leu; and p.Thr450Met) kinetic constants, using 17-hydroxyprogesterone as substrate, have been calculated to unravel the molecular mechanism responsible for reduced enzyme function and to better differentiate between a very mild mutation and a neutral amino acid change (Table 3). The K_m (substrate binding capacity) for all variants was in the same order of magnitude as for wild type protein except for the p.The450Met mutation. The maximum velocity (V_{max}) was decreased for all mutants, except for p.Leu12Met and the reference mutation p.Arg15Thr (Table 3).

Equal protein expressions of mutant and wild type proteins have been confirmed by Western blot (data not shown).

The putative effects on protein structure for all novel mutants and structural calculations of Ser101Asn, Ser113Phe, Ser202Gly and Pro267Leu are summarized in Table 2 and Figure 2. The p.Pro267Leu mutation has no effect on protein structure, whereas p.Ser101Asn, p.Ser202Gly and p.Thr450Met are predicted to have a minor effect, and p.Ser113Phe a severe effect since it interferes with the alfa helices comprising the active site. The p.Thr450Pro mutation and the deletion (c.1165_1173delCAAGGCGCC) are predicted to have more deleterious effects on the structure of CYP21A2.

Table 2. Enzyme activities and final prediction of phenotype.

Mutation (cDNA)	Protein change	Location in the protein	Putative effects	Enzyme activity		Phenotype
				17OHP	Prog	Prediction
c.43G>A	p.Ala15Thr	First hydrophobic domain	N.D.	100 (0)	96 (6)	Normal variant
c.34C>A	p.Leu12Met	First hydrophobic domain	N.D.	99 (1)	100 (1)	Normal variant
c.800C>T	p.Pro267Leu	Loop between α -helix H and I	No effect	97 (1)	87 (7)	Very mild NC
c.46C>T	p.Arg16Cys	First hydrophobic domain	N.D.	95 (3)	81 (3)	Very mild NC
c.301_302TC>AA	p.Ser101Asn	Loop between α -helix B' and C	Minor effect	94 (3)	74 (2)	Very mild NC
c.1444C>T	p.Pro482Ser	β-sheet β9	N.D.	91 (6)	61 (6)	Very mild NC
c.604A>G	p.Ser202Gly	Loop between α -helix F and F'	Minor effect	85 (2)	81 (3)	Mild NC
c.1349C>T	p.Thr450Met	β -sheet β 8	Minor effect	78 (6)	43 (5)	Mild NC
c.1357C>T	p.Pro453Ser	β-sheet β8	N.D.	73 (8)	34 (10)	NC
c.841G>T	p.Val281Leu	α-helix I	N.D.	57 (8)	29 (5)	NC
c.338C>T	p.Ser113Phe	Loop between α -helix B' and C	Severe effect; interferes with active site helices	4 (1)	4 (2)	CL
c.1348A>C	p.Thr450Pro	β -sheet β 8	Very severe effect	< 1	< 1	CL
c.515T>A	p.Ile172Asn	α-helix E	N.D.	< 1	< 1	CL
c.1165_1173delCAAG GCGCC	p.Qln389_Ala391del	α -helix L	Deleterious	0	< 1	CL

Enzyme activity is expressed in % of wild type activity, with values presented as mean (1 SD) of at least four independent experiments. N.D. not determined. Mutations are ordered according to the residual enzyme activity with the reference mutations in bold.

Table 3. Apparent kinetic constants using 17-hydroxyprogesterone as substrate.

	V_{max} (pmol/mgprotein per min)	K_m (μ M)
Wild type	519 (93)	12.5 (1.3)
p.Leu12Met	618 (207)	17.7 (5.2)
p.Arg15Thr	671 (145)	16.9 (6.5)
p.Arg16Cys	181 (31)	5.0 (1.1)
p.Ser101Asn	326 (67)	9.7 (2.0)
p.Ser202Gly	244 (47)	8.0 (1.5)
p.Pro267Leu	320 (93)	8.4 (1.9)
p.Thr450Met	43 (5)	1.2 (0.1)

Values are present as the mean (1 SD) of at least four experiments. In bold the known normal variant of *CYP21A2* gene.

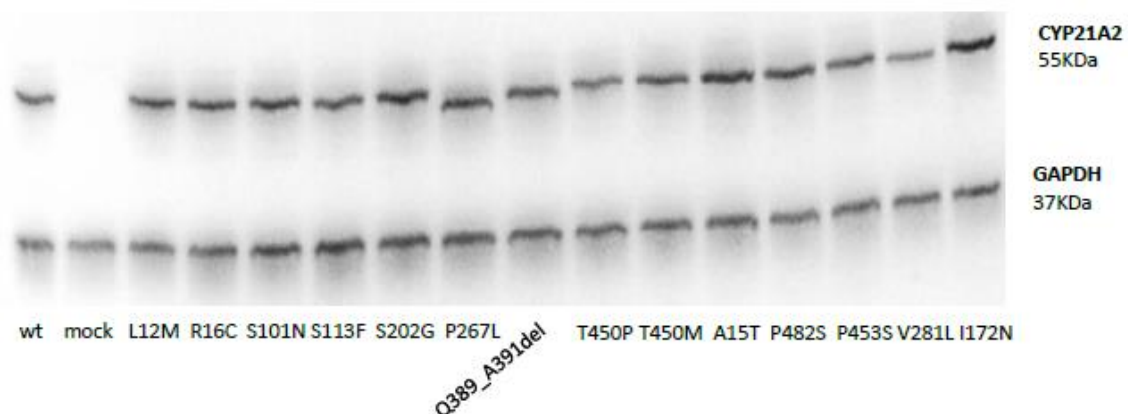


Figure 1: Western blot of CYP21A2 proteins expressed in COS-1 cells.

Proteins were collected directly from the culture plate well by lysis buffer the loaded and size separated on an SDS-PAGE gel. Normal and mutant proteins were revealed in immunoblottings by using CYP21 rabbit polyclonal antibodies and GAPDH goat polyclonal antibodies.

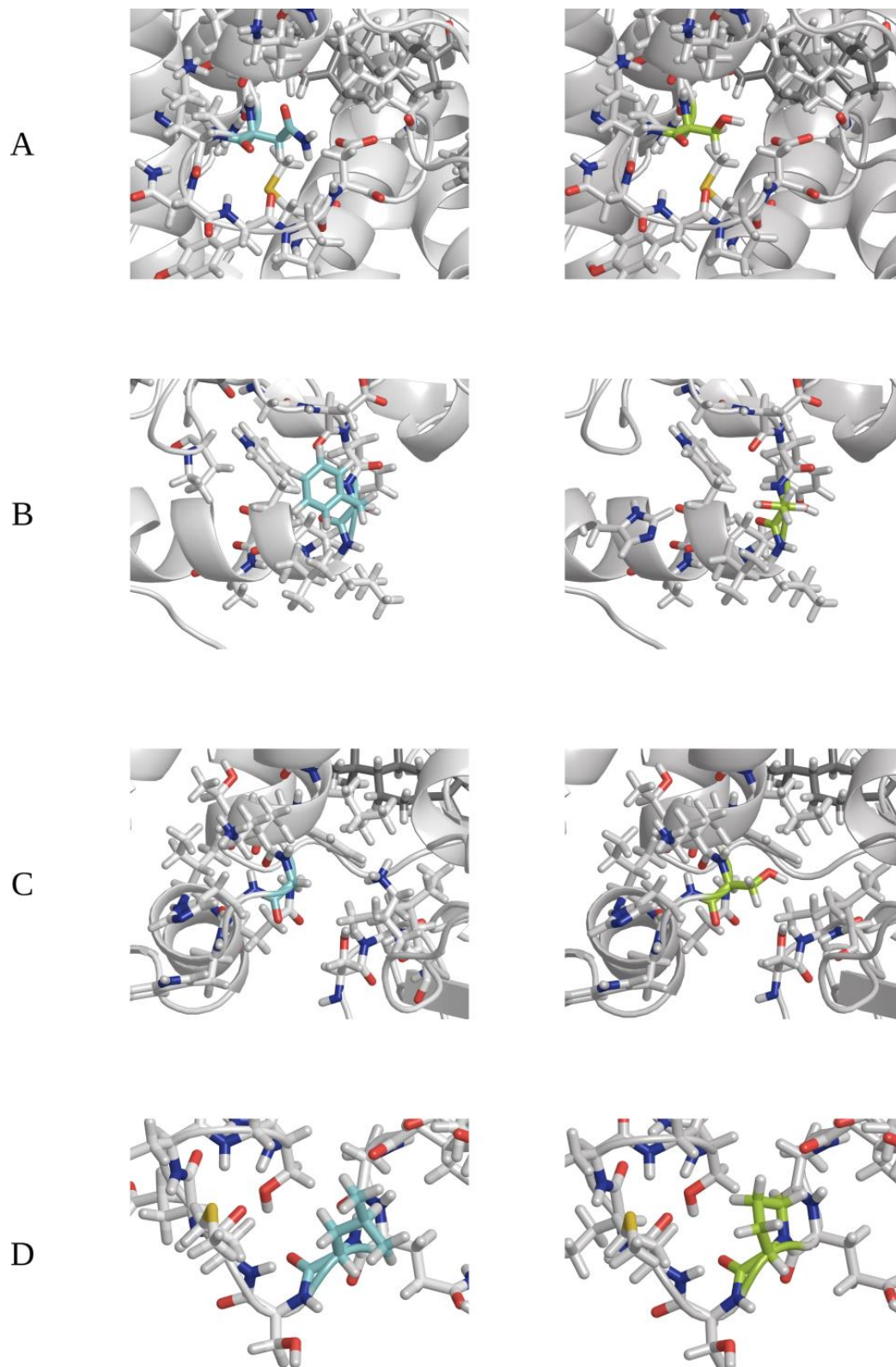


Figure 2. Structural changes. Visualization of the structural changes caused by four mutations; left: mutation, right: wildtype; A: Ser101Asn, B: Ser113Phe, C: Ser202Gly, D: Pro267Leu.

Discussion

Nine novel/rare mutations, identified in individuals genotyped for CAH, have been expressed *in vitro* and compared with the wild type protein. Five other well-known reference mutations were included in the assay. The reference mutations represent a gradient of different residual activity and thus of associated phenotype. The p.Ile172Asn is a classic mutation in most cases leading to a SV CAH²⁶, with a very low residual enzyme activity. The mutations p.Val281Leu, p.Pro453Ser and p.Pro482Ser are three NC CAH mutations where p.Pro482Ser is the mildest variant²⁷ and p.Val281Leu is the most common mutation in NC CAH with a residual activity of approximately 50%²⁸. At last, p.Ala15Thr is considered a normal variant²⁷. Expressing these well characterized mutations at the same time as the novel mutations allows a better inter-comparison of the mutants, and thus a better prediction of the possible associated phenotype.

Two of the novel mutations, p.Leu12Met and p.Arg16Cys, are located in the first hydrophobic domain of the protein. This region is a membrane targeting, anchoring domain and important for *in vitro* stability^{19,29}, making it unsuitable for computational protein structure analysis. Furthermore the domain is missing from the published crystal structures^{16,30}. Leu12 is highly conserved among mammalian species (88%). Arg16 is also well conserved (69%) and the corresponding amino acid residue in bovine is histidine, indicating conservation of a positively charged, polar residue. Interestingly, another mutation within this region, p.Ala15Thr, is a normal variant²⁷.

The mutation p.Leu12Met has been identified in *cis* with the p.Gln318Stop, thus on a null allele, while the p.Arg16Cys has been identified in a healthy subject. It is impossible to predict the pathogenicity of these mutations based on the genotype and phenotype of the subjects. Thus *in vitro* studies are the only way to evaluate these mutations. The mutant p.Leu12Met demonstrated no significant difference in enzymatic activity or kinetic constants compared with wild type and p.Ala15Thr proteins and can be considered a normal variant. Mutant p.Arg16Cys demonstrated a very mild reduction in enzyme activity, similar to p.Pro482Ser (Table 2) in addition to a clear reduction in apparent V_{max} . This mutation may be associated with a very mild NC CAH phenotype.

Mutation p.Ser101Asn was identified in the mother of a Brazilian CAH patient (Table 1), in compound heterozygosity with the NC mutation p.Val281Leu that her daughter inherited. The findings lead to a clinical investigation of the woman and she was diagnosed with NC CAH. Ser101 is conserved among mammalian species

(74%) and is located between two amino acid residues that are part of the channel for product passage³⁰. However, the structural calculations implied only a minor effect of the mutation on protein structure. In fact, *in vitro* studies confirm a very mild effect with a reduction of activity to 94% and 74% toward 17OHP and progesterone, respectively. A reduced V_{\max} was also shown (Table 3). This mutation is expected to result in very mild NC CAH.

Based on the structural calculations for the model of human CYP21A2, the mutation p.Ser113Phe may disturb an adjacent α -helix. It is located in the vicinity of Ser109, Leu110, and Trp117, that form part of the proximal substrate binding pocket and the heme-binding region³⁰. This change may therefore interfere with the recognition and binding of the substrate and consequently affect enzyme activity. The *in silico* prediction is confirmed by the *in vitro* studies where a minimal activity of 4% toward both substrates was shown (Table 2) and p.Ser113Phe can be associated to a classic SV CAH phenotype. The patient carrying this mutation presented a NC CAH phenotype as she carried the p.Val281Leu on the other allele. The mutation has been previously reported by Haider et al.³¹ as a NC mutation although no patient description was presented.

The mutation c.604A>G leading to p.Ser202Gly has been identified in three independent subjects from two different continents making it particularly important to study as it is more likely to occur again. The two Brazilian carriers were genotyped because CAH was suspected but no other mutation was identified on the second allele. The Swedish patient was identified by neonatal screening and carries the null mutation p.Gln318Stop on the other allele. So far, during her first year of life, no signs of virilization could be observed, thus she has a NC CAH phenotype. Functional studies show a reduction in enzyme activity to the level of the NC mutation p.Pro482Ser and a reduced V_{\max} (Table 2 and 3). The structural calculations implied that this mutation only has a minor effect on protein structure since both serine and glycine are small amino acid residues and Ser202 is located in a loop close to the surface of the protein.

The mutation p.Pro267Leu was identified in a healthy subject. Pro267 is weakly conserved among mammalian species (51%) and is located in a loop between two α -helices. The structural calculations did not show any notable structural changes. Functional studies performed to evaluate whether this change has an impact on CYP21A2 activity showed a minor effect on enzyme activity similar if not milder than

for p.Pro482Ser. However, kinetic studies showed a reduction in V_{\max} and K_m and clearly exclude p.Pro267Leu as a normal variant (Table 3).

The nine nucleotide deletion c.1165_1173delCAAGGCGCC in exon 9 leads to an *in frame* deletion of three amino acids (p.Gln389_Ala391del). In frame deletions can have quite different effects depending on the location in the protein. Based on the phenotype of the patient (SW CAH, Table 1) we could already predict a drastic effect. The three deleted amino acids (Glu, Gly and Ala) are highly conserved among mammalian species (83%, 94%, and 94%, respectively). Based on the structural analysis of human CYP21A2, these amino acids are located inside an α -helix just before a His that has been shown to interact with the EXXR structural motif, important for the tertiary structure of the CYP21A2 protein (Zhao et al. 2012). The deletion by itself may be deleterious to the structure or function of the protein. *In vitro* studies confirm the loss of enzyme activity. No reduction in protein level was seen by Western blot analysis, although specific stability studies have not been performed.

The novel mutation p.Thr450Met has been identified in a healthy control in the Brazilian population. Another mutation affecting the same amino acid, p.Thr450Pro, has been previously reported in a homozygous state in an Iranian girl with SW CAH (Table 1).

Thr450 is highly conserved (89%) among mammalian species and is located inside a short β sheet, which is disturbed by the Thr450Pro mutation. The β sheet is not central to the protein, but the structural calculations imply that the mutation cause a severe effect on the rest of the protein. The Thr450Met substitution does not disturb the β sheet to the same extent. Both amino acid changes have been expressed *in vitro*, where a different effect on enzyme impairment has been confirmed. The p.Thr450Pro mutation has a drastic effect, similar to the classic reference mutation p.Ile172Asn. The p.Thr450Met mutant has a milder reduction in activity to the level of NC mutations (Table 2) but with a more severe impact on apparent kinetic constants (Table 3).

Conclusions

We studied nine novel/rare mutations lacking functional *in vitro* studies. We conclude that one mutation (p.Leu12Met) is a normal variant, five mutations (p.Arg16Cys, p.Ser101Asn, p.Ser202Gly, p.Pro267Leu and p.Thr450Met) result in mild non classic CAH, and three mutations (p.Ser113Phe, p.Gln389_Ala391del and p.Thr450Pro) are associated with the classic CAH phenotype. The study confirmed and

for some mutations established the correlation between genotype and phenotype. Furthermore, the putative effects on protein structure based on *in silico* predictions using the recently crystallized human CYP21A2 structure confirmed the pathogenicity of the mutations and the results were in line with the functional studies.

Declaration of interest: The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the editorial.

Funding: This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) grant#2011/51808-2, IFCAH/ESPE, Marianne and Marcus Wallenberg Foundation, Stockholm county council (ALF-SLL), Stiftelsen Frimurare barnhuset, Stiftelsen Samariten, Jerringfonden, Stiftelsen Wera Ekström and Sällskapet Barnavård. D.P.M. was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) grant#2014/09844-0 and grant#2012/16815-0.

Acknowledgements

We thank Cristiane dos Santos Cruz Piveta for technical support.

References

1. Speiser P, Azziz R, Baskin 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):4133–60.
2. Trakakis E, Loghis C & Kassanos D. Congenital adrenal hyperplasia because of 21-hydroxylase deficiency. A genetic disorder of interest to obstetricians and gynecologists. *Obstet Gynecol Surv* [Internet]. 2009 Mar [cited 2015 Sep 24];64(3):177–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228439>
3. Wedell A. Molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Dev* [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 Sep 18];20:80–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21164261>
4. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, et al. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1985;37(4):650–67.
5. Wilson C, Nimkarn S, Domic M, et al. Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase

- deficiency. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2007 Apr [cited 2015 Oct 1];90(4):414–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1885892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
6. White P, Grossberger D, Onufer B, et al. Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(4):1089–93.
 7. White P & Speiser P. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev*. 2000;21(3):245–91.
 8. Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, et al. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(9):2841–5.
 9. White P, New M & Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1986 Jul [cited 2015 Aug 24];83(14):5111–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=323900&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 10. Nimkarn S, Lin-Su K & New M. Steroid 21 Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia. *Pediatr Clin North Am* [Internet]. Elsevier Inc; 2011;58(5):1282–300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2011.07.012>
 11. Wedell A, Stengler B & Luthman H. Characterization of mutations on the rare duplicated C4/CYP21 haplotype in steroid 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet*. 1994;94(1):50–4.
 12. Nikoshkov A, Lajic S, Holst M, et al. Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21- hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(1):194–9.
 13. Lajic S, Robins T, Krone N, et al. CYP21 mutations in simple virilizing congenital adrenal hyperplasia. *J Mol Med*. 2001;79(10):581–6.
 14. Krone N, Riepe F, Partsch C, et al. Three novel point mutations of the CYP21 gene detected in classical forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2006;114(3):111–7.
 15. Barbaro M, Baldazzi L, Balsamo A, et al. Functional studies of two novel and two rare mutations in the 21-hydroxylase gene. *J Mol Med*. 2006;84(6):521–8.

16. Pallan P, Wang C, Lei L, et al. Human Cytochrome P450 21A2, the Major Steroid 21-Hydroxylase. *J Biol Chem* [Internet]. 2015;290(21):13128–43. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M115.646307>
17. Sambrook J, Fritsch E & Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory; 1989. 3vol p.
18. Lau I, Soardi F, Lemos-Marini S, et al. H28+C insertion in the CYP21 gene: A novel frameshift mutation in a Brazilian patient with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(12):5877–80.
19. Baradaran-Heravi A, Vakili R, Robins T, et al. Three novel CYP21A2 mutations and their protein modelling in patients with classical 21-hydroxylase deficiency from northeastern Iran. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;67(3):335–41.
20. Lajic S, Levo A, Nikoshkov A, et al. A cluster of missense mutations at Arg356 of human steroid 21-hydroxylase may impair redox partner interaction. *Hum Genet*. 1997;99(6):704–9.
21. Robins T, Barbaro M, Lajic S, et al. 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.
22. Soardi F, Barbaro M, Lau I, et al. Inhibition of CYP21A2 enzyme activity caused by novel missense mutations identified in brazilian and scandinavian patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(6):2416–20.
23. Robins T, Carlsson J, Sunnerhagen M, et al. Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia. *Mol Endocrinol*. 2006;20(January):2946–64.
24. NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2015;43(D1):D6–17. Available from: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gku1130>
25. Katoh K & Standley D. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2013;30(4):772–80. Available from: <http://mbe.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/molbev/mst010>
26. Amor M, Parker K, Globerman H, et al. Mutation in the CYP21B gene (Ile-172->Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(5):1600–4.

27. Barbaro M, Lajic S, Baldazzi L, et al. Functional analysis of two recurrent amino acid substitutions in the CYP21 gene from Italian patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(5):2402–7.
28. 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* [Internet]. 1990 Dec 5 [cited 2015 Sep 22];265(34):20916–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2249999>
29. Lajic S, Nikoshkov A, Holst M, et al. Effects of missense mutations and deletions on membrane anchoring and enzyme function of human steroid 21-hydroxylase (P450c21). *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1999 Apr 13 [cited 2015 Sep 22];257(2):384–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10198222>
30. Zhao B, Lei L, Kagawa N, et al. Three-dimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. *J Biol Chem*. 2012;287(13):10613–22.
31. Haider S, Islam B, D'Atri V, et al. Structure-phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013;110(7):2605–10. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3574933&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

3.2) **Capítulo 2 – Artigo:**

**Four novel *CYP21A2* mutations identified in
Brazilian and Italian patients with 21-
hydroxylase deficiency: a synergistic effect.**

D.P. Michelatto*, L. Karlsson*, M. Barbaro, A.L.G. Lusa, C.D.A.M. Silva, L. Östberg,
B. Persson, G. Guerra-Júnior, S.H.V. Lemos-Marini, L. Baldazzi, A. Balsamo, N.
Greggio, M.P. de Mello and S. Lajic.

* Contributed equally, shared first authorship.

FOUR NOVEL *CYP21A2* MUTATIONS IDENTIFIED IN BRAZILIAN AND ITALIAN PATIENTS WITH 21-HYDROXYLASE DEFICIENCY: A SYNERGISTIC EFFECT.

D.P. Michelatto^{1,2*}, L. Karlsson^{2*}, M. Barbaro³, A.L.G. Lusa¹, C.D.A.M. Silva⁴, L. Östberg⁵, B. Persson⁶, G. Guerra-Júnior⁴, S.H.V. Lemos-Marini⁴, L. Baldazzi⁷, A. Balsamo⁷, N. Greggio⁷, M.P. de Mello¹ and S. Lajic².

* Contributed equally, shared first authorship

¹Laboratório de Genética Molecular Humana, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Av. Cândido Rondon 400, 13083-875, Campinas, SP, Brazil.

²Department of Women's and Children's Health, Pediatric Endocrinology Unit (Q2:08), Karolinska University Hospital, S-171 76, Stockholm, Sweden.

³Department of Molecular Medicine and Surgery, Karolinska Institutet and Center for Inherited Metabolic Diseases (CMMS L7:05) Karolinska University Hospital, S-171 76, Stockholm, Sweden.

⁴Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Rua Tessália Vieira de Camargo 126, 13083-887, Campinas, SP, Brazil.

⁵Science for Life Laboratory and SeRC (Swedish eScience Research Centre), Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, 171 77 Stockholm, Sweden.

⁶Science for Life Laboratory, Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, 751 24 Uppsala, Sweden.

⁷University of Bologna, Bologna, Italy.

Abbreviated title: Four novel *CYP21A2* mutations

Keywords: 21-hydroxylase, functional studies, congenital adrenal hyperplasia.

Corresponding author: Dr Svetlana Lajic (Svetlana.Lajic@ki.se), Department of Women's and Children's Health, Pediatric Endocrinology Unit (Q2:08), Karolinska University Hospital, S-171 76, Stockholm, Sweden.

Abstract

Background:

Congenital Adrenal Hyperplasia is a common disorder of sex development and more than 90% of cases are due 21-hydroxylase deficiency. Over the years more than 251 mutations were described in *CYP21A2* gene of which around 5% comprises novel mutations.

Objectives:

Functional and structural effects of four novel *CYP21A2* mutations (p.Val358Ile, p.Arg369Gln, p.Asp377Tyr and p.Leu461Pro) and three combination of mutations (p.Ile172Asn+ p.Val358Ile, p.Val281Leu+ p.Arg369Gln and p.Asp377Tyr and p.Leu461Pro) were investigated. In addition, the functional effects of three known *CYP21A2* variants were determined in parallel in order to improve phenotype prediction. Functional analyses were complemented with *in silico* prediction of mutation pathogenicity based on the recently crystallized human CYP21 structure.

Methods:

The four amino acid substitutions and the associations of mutations were reconstructed by *in vitro site directed mutagenesis*, the proteins were transiently expressed in COS-1 cells and enzyme activity towards the two natural substrates (17-hydroxyprogesterone and progesterone) was determined.

Results:

Novel mutations p.Val358Ile, p.Arg369Gln, p.Asp377Tyr and p.Leu461Pro are reported for the first time and exhibited residual enzymatic activity within the range of non-classic CAH mutations. A synergistic effect was observed for the alleles bearing the associations of mutations; those exhibited a significant reduction in the enzyme activity and are also reported for the first time.

Conclusions:

By *CYP21A2* gene analyzes we identified four novel mutations and three associations of mutations in nine patients clinically diagnosed with CAH in Brazilian and Italian populations. Associations of mutations in *CYP21A2* gene are rare and were reported only few times in previous literature.

INTRODUCTION

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is one of the most frequent autosomal recessive disorders, refers to syndromes caused by inherited defects in cortisol biosynthesis and more than 90% of all CAH cases are due to deficiency of the 21-hydroxylase (21OH) enzyme (1–3). The clinical manifestations of CAH include a large spectrum of phenotypes. The most severe form, a consequence of cortisol and aldosterone biosynthesis deficiency (salting-wasting form) and a form with apparently normal aldosterone biosynthesis (simple virilizing form) are together named as classic form. Affected girls are exposed to high systemic levels of adrenal androgens *in utero* and are born with virilized external genitalia. The mild form, non-classic (NC) CAH, is associated with signs of androgen excess from late childhood but can escape diagnosis until adult age when women are seeking medical attention due to hirsutism and menstrual irregularities (1,4,5). The worldwide incidence of classic 21OH deficiency is 1:10.000 to 1:15.000 live births, while non-classic 21OH deficiency is much more prevalent at 1:500 live births in some populations (2,6,7)

The human genome contains two copies of the *CYP21* gene, the *CYP21A2* that comprises 10 exons and the *CYP21A1P*, a nonfunctional pseudogene. They are located in the short arm of chromosome 6 within the major histocompatibility locus (4,8). The large spectrum of phenotypes observed in CAH is a consequence of how different mutations in the *CYP21A2* gene affect the function of the protein. The less severe mutation of the two alleles typically dictates the phenotype. There is a good correlation between *in vitro* studies with mutated enzymes and *in vivo* disease severity (9–11). The *in vitro* analysis is proposed as a complement in disease classification, especially for novel or rare mutations, where large groups of patients are not available for clinical investigation, thereby improving genetic counselling and clinical management (14,15).

In this report, we describe a detailed genotype-phenotype evaluation by functional analysis of four novel amino acid substitutions in the CYP21A2 protein (p.Val358Ile, p.Arg369Gln, p.Asp377Tyr and p.Leu461Pro) and three associations of mutations as identified in our patients (p.Ile172Asn+p.Val358Ile, p.Val281Leu+p.Arg369Gln and p.Asp377Tyr+p.Leu461Pro). The aim of this study was to investigate the pathogenicity of the novel amino acid substitutions *per se* and of the plausible additive or synergistic effects of the combined alleles, clarifying the genotype-phenotype correlations. In addition, we complemented the analysis with *in silico*

prediction of mutation pathogenicity based on the recently crystallized human CYP21A2 structure (16).

MATERIAL AND METHODS

Genotyping

Genotyping of the *CYP21A2* gene was performed in Brazil at Universidade Estadual de Campinas and in Italy at the University of Bologna. The study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Campinas (São Paulo, Brazil), and Karolinska Institutet.

Genomic DNA was obtained from peripheral blood by phenol/chloroform extraction (17). The *CYP21A2* gene was specifically amplified in two or four fragments, depending on the presence or absence of the intron 2 variant c.290-13A/C>G (18). Electropherograms were analyzed against the reference sequence M12792.1. Segregation analysis was performed in all patients by sequencing of parental samples, except for Patient 4. Clinical and molecular data of the subjects are summarized in Table 1.

Patients

Patient no.1, a boy, was born AGA and during the first months of life presented with failure to thrive and vomiting. At 3.5 months of age he was admitted to hospital due to severe dehydration with hyponatremia and metabolic acidosis. He had normal male genitalia with palpable testes. Salt wasting CAH due to 21OH deficiency was diagnosed clinically and confirmed with elevated levels of 17OHP. Screening analysis of *CYP21A2* revealed a complex genotype with a novel mutation p.Val358Ile on the same allele as p.Ile172Asn and the common splice mutation c.290-13A/C>G on the second allele.

Patient no. 2, a girl, was born AGA at GW 42. She presented with precocious pubarche, axillary hair and advanced bone age. Upon stimulation with 250 µg Synachten, 17OHP increased from 7,7 to 54 nM after 60 minutes. The child was diagnosed with NC CAH and genotyping of *CYP21A2* revealed a novel mutation p.Val358Ile *in cis* with p.Ile172Asn and the mutation c.*13G>A (3'UTR) on the other allele.

Table 1: Clinical symptoms, age at diagnosis, genotype and phenotype of CAH patients carrying the novel mutations that were expressed *in vitro* (marked in bold).

Patient No.	Sex	Age at diagnosis	Symptoms	17OHP (nmol/l)* basal/stimulated	Genotype	Phenotype	Country of origin
1	M	3 months	Severe dehydration, hyponatremia and metabolic acidosis (Na: 112 mM, K: 7.7 mM).	>900 / NA	p.Ile172Asn+p. Val358Ile / c.290-13A/C>G	SW	Brazil
2	F	5 years	Precocious pubarche, axillary hair and advanced BA (7.6 years at 6.5 years).	7.7 / 54	p.Ile172Asn+p. Val358Ile / c.*13G>A (3'UTR)	NC	Italy
3	F	At birth	Ambiguous genitalia, elevated 17OHP and mild hyponatremia and hypercalcemia.	NA	p.Ile172Asn+p. Val358Ile / p.Leu480frameshift	SW	Italy
4	F	Adult	Asymptomatic.	NA	p.Val358Ile /p.Arg356Trp	NC	Brazil
5**	F	15 years	Primary amenorrhea, short stature, breast atrophy, very mild clitoral hypertrophy, advanced BA (17 years at 15.7 years).	84 / 333	p.Ile172Asn / p.Val281Leu+p. Arg369Gln	NC	Italy
6**	M	9 years	Advanced bone age (13 years at 9.9 years).	141 / 269	p.Ile172Asn / p.Val281Leu+p. Arg369Gln	NC	Italy
7	F	At birth	Diagnosis at neonatal screening. Advanced BA (5 years at 3.6 years) and menstrual irregularities at 11 years.	67 / 273	p.Ile172Asn / p.Val281Leu+p. Arg369Gln	NC	Italy
8	F	5 years	Precocious puberty, accelerated growth and advanced BA (8.6 years at 6.3 years).	14 / >154	p.Asp377Tyr+p.Leu461Pro / p.Val281Leu	NC	Brazil

*Reference value/cut-off level 17-OHP: 6 and 30 nM, basal and 60 min, 250µg Synacthen test.

**Patients no. 6 and 7 are siblings.

NA, not available; SW, salt wasting; NC, non-classic; BA, bone age.

Patient no. 3, a girl, was born with ambiguous genitalia, elevated 17OHP and mild hyponatremia and hypercalcemia. Presented menarchy at 12,3 years with overweight, acne and menstrual irregularities. She was diagnosed with SW CAH and genotyping revealed a novel mutation p.Val358Ile in the same allele that p.Ile172Asn and the classic mutation p.Leu480frameshift on the other allele.

Patient no. 4 came to medical attention after the diagnosis of her daughter and subsequent segregation analysis. Genotyping of *CYP21A2* revealed a novel mutation p.Val358Ile in compound heterozygosity with the classic mutation p.Arg356Trp. She denied any symptoms of androgen excess and mild/asymptomatic NC CAH was suspected.

Patient no. 5, a girl, came to medical attention at the age of 15,8 years due to primary amenorrhea, short stature, breast atrophy and very mild clitoral hypertrophy. Her bone age was advanced and upon stimulation with 250 µg Synacten, 17OHP increased from 84 to 333 nM after 60 minutes. She was diagnosed with NC CAH and genotyping revealed a novel mutation p.Arg369Gln in the same allele that p.Val281Leu and the common classic mutation p.Ile172Asn on the other allele.

Patient no. 6, a boy, came to medical attention after his sister (patient no. 5) was diagnosed with NC CAH. At the age of 9,9 years his only symptom was advanced bone age. Upon stimulation with 250 µg Synacten, 17OHP increased from 141 to 269 nM after 60 minutes and the genotyping confirmed the diagnosis of NC CAH (see Table 1).

Patient no. 7, a girl, was diagnosed at neonatal screening. She presented advanced bone age, onset of puberty at about 9 years and menstrual irregularities at 11.3 years. Upon stimulation with 250 µg Synacten at 3,5 years old, 17OHP increased from 66,57 to 272,62 nM after 60 minutes. She was diagnosed with NC CAH and genotyping revealed a novel mutation p.Arg369Gln *in cis* with p.Val281Leu and the common classic mutation p.Ile172Asn on the other allele.

Patient no. 8, a girl, came to medical attention at the age of 5 years due to central precocious puberty and advanced bone age (8.6y vs 6.3y chronological age). Upon stimulation with 250 µg Synacten, 17OHP increased from 14 to >154 nM after 60 minutes. The child was diagnosed with NC CAH and genotyping revealed the common non-classic mutation p.Val281Leu in *trans* with two novel mutations, p.Asp377Tyr and p.Leu461Pro.

Functional studies

The general description for construction of vectors for expression studies of mutated CYP21A2 protein in COS-1 cells has been previously described (9,19).

Expression of mutant and wild type *CYP21A2* protein and assays of 21OH activity were performed as previously described (20,21). Enzyme activities were expressed as a percentage of conversion, taking the apparent specific activity of the wild type *CYP21A2* as 100%. Assays were performed after 40 min incubation time.

Western blot

To ascertain similar amount of *CYP21A2* protein expression in transfected cells, Western blot analysis was performed using rabbit polyclonal antibodies against human CYP21A2 as primary antibody (Sigma-Aldrich) and anti-rabbit IgG (GE Healthcare Life Sciences) as the secondary antibody, see Robins et al for details (20).

Structural evaluation

The three-dimensional structure of human CYP21, pdb id: 4y8w(16), was used as a starting point to evaluate the effect of the novel mutations on the structure of protein. The ICM molecular modelling software (version 3.8-1, Molsoft LLC, La Jolla, CA) was used to perform structural calculations of the structures of each mutation, expanding on the strategy previously described (22). First, all missing intra-structural loops were added to the 4y8w structure and the structure was optimized using energy minimization. A model of each mutation was then generated by modifying the corresponding amino acid residue, followed by multiple steps of energy minimization. The energy minimization was initially performed with strong backbone restraints, which were gradually relaxed and finally a global minimization without backbone restraints was performed. Each mutation was then evaluated based on energy and distances to the steroid and heme, as well as using the ICM built-in function for evaluating stability changes from mutations by calculating the free energy changes.

The BLAST web interface (23) was used to identify mammalian proteins similar to the human CYP21A2 protein. The search was performed on the Nov 2015 release of the Refseq database and resulted in CYP21 protein sequences from 81 mammals. The sequences with the highest similarity to the human CYP21A2 protein, one sequence per species, were retrieved from the database. The retrieved sequences

were aligned using the linsi approach of MAFFT (24), and for each position the sequence identity was calculated, counting a gap as a mismatch.

RESULTS

By *in vitro* functional studies, we have determined residual activities of four novel *CYP21A2* missense mutations (p.Val358Ile, p.Arg369Gln, p.Asp377Tyr and p.Leu461Pro), of three combined alleles (p.Ile172Asn+p.Val358Ile; p.Val281Leu+p.Arg369Gln; p.Asp377Tyr+p.Leu461Pro) and of three well known reference mutations (p.Ile172Asn, p.Val281Leu and p.Pro482Ser). The results are summarized in Table 2. All mutants presented a residual enzymatic activity at the same order of magnitude as the NC control p.Pro482Ser. When combined alleles were expressed, residual enzymatic activities were reduced, indicating a synergistic effect when mutations are found *in cis*.

Equal protein expression of the mutant and wild type proteins were confirmed by Western blot (Figure 1).

Table 2: Enzyme activities and final prediction of phenotype

Mutation	cDNA position	Location	Enzyme activity in %		
			17OHP	Prog	Final prediction of phenotype
p.Pro482Ser	c.1444C>T	β -sheet β 9	82 (10)	54 (7)	Mild NC
p.Arg369Gln	c.1106G>A	Loop between β -sheet β 4 and β 5	82 (6)	63 (4)	Mild NC
p.Asp377Tyr	c.1129G>T	β -sheet β 6	81 (6)	58 (4)	Mild NC
p.Val358Ile	c.1072G>A	Loop between α -helix K and β -sheet β 4	72 (7)	34 (3)	Mild NC
p.Leu461Pro	c.1382T>C	Loop between β -sheet β 8 and β 9	55 (8)	40 (2)	Mild NC
p.Val281Leu	c.841G>T	α -helix I	33 (8)	26 (3)	NC
p.Asp377Tyr+p.Leu461Pro	-	-	17 (4)	10 (2)	NC
p.Val281Leu+p.Arg369Gln	-	-	10 (2)	9 (1)	NC
p.Ile172Asn	c.515T>A	α -helix E	< 1	< 1	CL
p.Ile172Asn+p.Val358Ile	-	-	< 1	< 1	CL

Values are expressed as mean (1 SD) of at least four independent experiments. NC: non-classic; CL: classic.

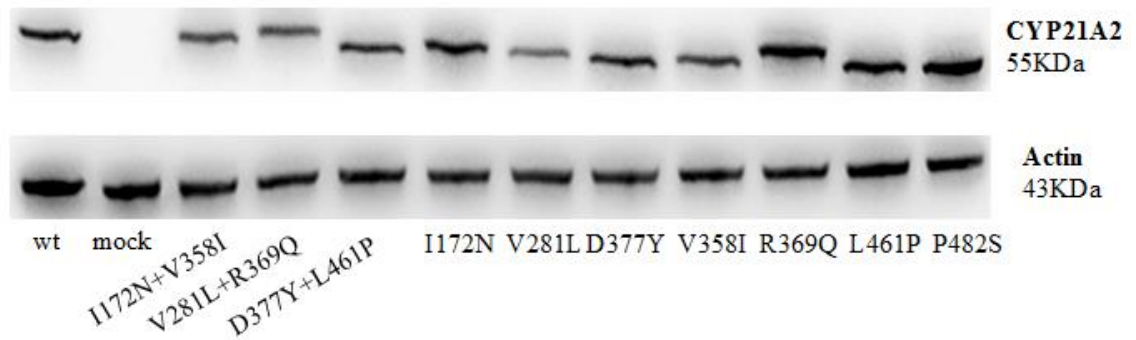


Figure 1. Western blot

Western blot of CYP21A2 proteins expressed in COS-1 cells. Normal and mutant proteins were detected using CYP21A2 rabbit polyclonal antibodies. Loading control, GADPH was revealed with goat polyclonal antibodies.

DISCUSSION

Four novel mutations and three novel associations of mutations identified in patients with CAH due to 21OH deficiency have been expressed *in vitro* and compared with the wild type protein. We expressed three well-known reference mutations at the same time as the novel mutations. A classic mutation, in most cases leading to a SV CAH (25), with a very low residual enzyme activity (p.Ile172Asn) and two NC CAH mutations, the p.Pro482Ser that is associated to the mildest NC phenotype (26) and the p.Val281Leu, the most common mutation in NC CAH with a residual activity of approximately 50% (27). This allows a better inter-comparison of the mutants, and thus a better prediction of the possible associated phenotype. The p.Val358Ile has been identified *in cis* with the p.Ile172Asn mutation in three unrelated patients and *in trans* in one patient. Functional studies show a reduction in enzyme activity to the level of the NC mutation p.Pro482Ser. The Val381 amino acid in *CYP21* enzyme is highly conserved among mammalian species. Based on the crystal structure of bovine *CYP21A2*, it is located after α -helix K, close to the proximal substrate-binding pocket (25). A mutation in this region can impair the interaction between the enzyme and its substrate. When tested *in cis*, p.Ile172Asn+p.Val358Ile reported <1% of residual activity for both natural substrates. Mutation p.Ile172Asn was found *in cis* with the mild NC p.Pro453Ser mutation before (26) however no functional study where performed.

The p.Arg369Gln was identified *in cis* with the p.Val281Leu mutation in three patients. Functional studies show a reduction in enzyme activity to the level of the NC mutation p.Pro482Ser. The corresponding amino acid in other mammalian *CYP21A2* is a lysine dictating the conservation of a positively charged, polar residue. Based on the crystal

structure of bovine *CYP21A2*, it is located after β -sheet 1-3 and is part of the NADPH reductase-binding region (25). A mutation in this region can cause CAH due to the inability to interact correctly with the redox partner. *In vitro* activity data revealed a synergistic effect of p.Val281Leu+p.Arg369Gln, resulting in 10% and 9% of residual activity toward 17OHP and progesterone, respectively, but still retaining sufficient activity to lead to NC CAH. Mutation p.Val281Leu was found *in cis* twice before (27,28); first associated with the mutation p.Leu353Arg in homozygosis, in a patient with SW HAC (27) and a second time associated with a NC mutation (p.Ile230Thr) in a patient with severe NC HAC (28). Although the first case is lacking functional studies, a more severely impaired activity was observed in the second case (p.Ile230Thr+p.Val281Leu) when mutations were expressed associated, as we observe here for the mutations p.Val281Leu+p.Arg369Gln. Thus, our results do support the notion that two non-classic mutations *in cis* have a synergistic effect in *CYP21A2* protein.

The two novel mutations p.Asp377Tyr and p.Pro461Leu were identified *in cis* in one patient. Functional studies show a reduction in enzyme activity to the level of NC references for both novel mutations. The Asp377 amino acid in *CYP21* enzyme is highly conserved among mammalian species and based on the crystal structure of bovine *CYP21A2*, it is located on a β -hairpin loop between β 1-3 and β 1-4 and is part of an important region which conserves close contacts between the N-terminal loop and the β -hairpin loop (β 1-3 and β 1-4) (25). This region stabilizes the secondary structure of *CYP21A2* protein so mutations in this region may cause CAH by destabilizing the protein structure.

The Pro461 amino acid in *CYP21* enzyme is highly conserved among mammalian species and based on the crystal structure of bovine *CYP21A2*, it is located on a β -hairpin loop between β 2-1 and β 2-2 (25). Although Pro461 is not directly related to any vital region in *CYP21A2* protein and both amino acids (proline and leucine) are non-polar, this mutation can damage for the enzyme activity by the difference of their structure. Proline is the only amino acid where the side chain is connected to the protein backbone twice, forming a five-membered ring. For this reason, proline is often found in very tight turns in proteins (29). The leucine side chain is branched, providing great flexibility to the protein structure (29). Furthermore, Pro461 is situated next to the residues Cys467 and Gly468 that are part of the distal region of substrate binding 17-hydroxyprogesterone (25). Thus, this change may interfere with the recognition and binding of the substrate and consequently with enzymatic activity. Mutations p.Asp377Tyr+p.Leu461Pro when expressed in combination, presented a synergistic effect, resulting in 17% and 10% of residual activity toward 17OHP and progesterone, respectively and giving rise to NC CAH.

CONCLUSIONS

We studied four novel mutations *per se* and *in cis* as identified in our patients. We conclude that the four mutations are associated with the mild non classic CAH phenotype when found in homo- or hemizygoty. When two mild mutations are found in *cis* they act synergistically and reduce enzyme function even more drastic. This information is important to consider regarding the clinical evaluation and prediction of phenotype. This study established the correlation between genotype and phenotype. Furthermore we confirmed and complemented the *in silico* prediction of mutation pathogenicity based on the recently crystallized human CYP21A2 structure.

Acknowledgements

We thank Cristiane dos Santos Cruz Piveta for technical support.

This study was supported by:

São Paulo Research Foundation (FAPESP) grant#2011/51808-2, IFCAH/ESPE, Marianne and Marcus Wallenberg Foundation, Stockholm county council (ALF-SLL), Stiftelsen Frimurare barnhuset, Samariten, Jerringfonden, Wera Ekström foundation, Sällskapet Barnavård. D.P.M. was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) grant#2014/09844-0 and grant#2012/16815-0.

Disclosure statement

The authors have nothing to disclose.

REFERENCES

1. **Nimkarn S, Lin-Su K, New M.** Steroid 21 Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia. *Pediatr. Clin. North Am.* 2011;58(5):1282–1300.
2. **Wedell A.** Congenital adrenal hyperplasia. *Clin. Biochem.* 2011;44(7):505–506.
3. **Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, Meyer-Bahlburg HFL, Miller WL, Montori VM, Oberfield SE, Ritzen M, White PC.** Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010;95(9):4133–60.
4. **White P, Speiser P.** Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr. Rev.* 2000;21(3):245–291.

5. **Speiser P, White P.** Congenital Adrenal Hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* 2003;349:776–88.
6. **Speiser P, New M.** Genetics of steroid 21-hydroxylase deficiency. 1985;(October):275–78.
7. **van der Kamp HJ, Wit JM.** Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur. J. Endocrinol.* 2004;151 Suppl :U71–5.
8. **Wilson, Foster, Kronenberg L.** *Williams textbook of Endocrinology.* 9th ed. Saunders; 1998.
9. **Nikoshkov A, Lajic S, Holst M, Wedell A, Luthman H.** Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21- hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997;82(1):194–199.
10. **Lajic S, Robins T, Krone N, Schwarz H, Wedell A.** CYP21 mutations in simple virilizing congenital adrenal hyperplasia. *J. Mol. Med.* 2001;79(10):581–586.
11. **Jääskeläinen J, Levo A, Voutilainen R, Partanen J.** Population-wide evaluation of disease manifestation in relation to molecular genotype in steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency: Good correlation in a well defined population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997;82(10):3293–3297.
12. **Stikkelbroeck NMML, Hoefsloot LH, De Wijs IJ, Otten BJ, Hermus a. RMM, Sistermans E a.** CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in the Netherlands: Six novel mutations and a specific cluster of four mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88(8):3852–3859.
13. **New MI, Abraham M, Gonzalez B, Dunic M, Razzaghy-Azar M, Chitayat D, Sun L, Zaidi M, Wilson RC, Yuen T.** Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;110(7):2611–6.
14. **Krone N, Riepe F, Partsch C, Vorhoff W, Brämwig J, Sippell W.** Three novel point mutations of the CYP21 gene detected in classical forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2006;114(3):111–117.
15. **Barbaro M, Baldazzi L, Balsamo A, Lajic S, Robins T, Barp L, Pirazzoli P, Cacciari E, Cicognani A, Wedell A.** Functional studies of two novel and two rare mutations in the 21-hydroxylase gene. *J. Mol. Med.* 2006;84(6):521–528.
16. **Pallan P, Wang C, Lei L, Yoshimoto F, Auchus R, Waterman M, Guengerich F, Egli M.** Human Cytochrome P450 21A2, the Major Steroid 21-Hydroxylase. *J. Biol.*

- Chem.* 2015;290(21):13128–13143.
17. **Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
 18. **Lau I, Soardi F, Lemos-Marini S, Guerra G, Baptista M, de Mello M.** H28+C insertion in the CYP21 gene: A novel frameshift mutation in a Brazilian patient with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86(12):5877–5880.
 19. **Lajic S, Levo A, Nikoshkov A, Lundberg Y, Partanen J, Wedell A.** A cluster of missense mutations at Arg356 of human steroid 21-hydroxylase may impair redox partner interaction. *Hum. Genet.* 1997;99(6):704–709.
 20. **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):2148–2153.
 21. **Soardi F, Barbaro M, Lau I, Lemos-Marini S, Baptista M, Guerra G, Wedell A, Lajic S, De Mello M.** Inhibition of CYP21A2 enzyme activity caused by novel missense mutations identified in Brazilian and Scandinavian patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008;93(6):2416–2420.
 22. **Robins T, Carlsson J, Sunnerhagen M, Wedell A, Persson B.** Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia. *Mol. Endocrinol.* 2006;20(January):2946–2964.
 23. **NCBI Resource Coordinators.** Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(D1):D6–D17.
 24. **Katoh K, Standley D.** MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30(4):772–780.
 25. **Zhao B, Lei L, Kagawa N, Sundaramoorthy M, Banerjee S, Nagy LD, Guengerich FP, Waterman MR.** Three-dimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. *J. Biol. Chem.* 2012;287(13):10613–10622.
 26. **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(4):488–497.
 27. **Abid F, Tardy V, Gaouzi A, El Hessni A, Morel Y, Chabraoui L.** CYP21A2 gene mutation analysis in Moroccan patients with classic form of 21-hydroxylase deficiency:

- high regional prevalence of p.Q318X mutation and identification of a novel p.L353R mutation. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2008;46(12):1707–13.
28. **Tardy V, Menassa R, Sulmont V, Lienhardt-Roussie a, Lecointre C, Brauner R, David M, Morel Y.** Phenotype-genotype correlations of 13 rare CYP21A2 mutations detected in 46 patients affected with 21-hydroxylase deficiency and in one carrier. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010;95(3):1288–300.
29. **Betts MJ, Russell RB.** Amino-Acid Properties and Consequences of Substitutions. *Bioinforma. Genet. A Bioinforma. Prim. Anal. Genet. Data Second Ed.* 2007;4:311–342.

3.3) **Capítulo 3 - Artigo:**

**Leydig cell tumour in a 46,XX child with Congenital
Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase
deficiency**

Ana Paula Pires Lázaro, Adriano Machado de Lacerda, Juraci Ghiaroni, Luiz Carlos Duarte de Miranda, Ana Paula Aguiar Vidal, Paulo Ferrez Collett-Solberg, **Débora de Paula Michelatto**, Maricilda Palandi Mello, Marília Martins Guimarães.

Leydig Cell Tumour in a 46,XX Child with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency

Ana Paula Pires Lázaro^a Adriano Machado de Lacerda^a Juraci Ghiaroni^b
Luiz Carlos Duarte de Miranda^c Ana Paula Aguiar Vidal^d
Paulo Ferrez Collett-Solberg^e Débora de Paula Michelatto^f
Maricilda Palandi Mello^f Marília Martins Guimarães^a

Departments of ^aEndocrinology, ^bGynaecology, ^cUrology and ^dPathology, Clementino Fraga Filho University Hospital, Federal University of Rio de Janeiro, and ^eDepartment of Endocrinology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, and ^fCenter for Molecular Biology and Genetic Engineering, University of Campinas, São Paulo, Brazil

Established Facts

- Congenital adrenal hyperplasia leads to virilisation, and treatment with glucocorticoids normalises testosterone. Leydig cell tumours are rare in females and children.

Novel Insights

- In a child with congenital adrenal hyperplasia, virilisation and elevated testosterone was not due to inappropriate treatment (adequate glucocorticoid therapy) but to the presence of a Leydig cell tumour.

Key Words

Congenital adrenal hyperplasia · Leydig cell tumour · Female · Child

Abstract

Case Report: A 10-year-old male was referred to our institution due to short stature and bilateral cryptorchidism and reported pubic hair development and acne since the age of 4 years. Laboratory and molecular genetic tests indicated congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase defi-

ciency. After treatment with prednisone, adrenal hormones normalised but testosterone remained elevated. Magnetic resonance imaging of the abdomen due to cryptorchidism revealed uterus and adnexal attachments, a prostate and poorly defined nodules on the iliac chains. Upon exploratory laparotomy, a hysterectomy, bilateral oophorectomy and resection of a peri-adnexal nodular lesion on the patient's right side were performed. Histopathology of the nodule mass was compatible with a Leydig cell tumour with a low proliferation rate according to Ki67. Copyright © 2013 S. Karger AG, Basel

KARGER

© 2013 S. Karger AG, Basel
1663–2818/13/0793–0179\$38.00/0

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/hrp

Marília Martins Guimarães
Rua Humberto de Campos, n° 974, Apt. 1504
Rio de Janeiro 22430.190 (Brazil)
E-Mail manguimaraes@hucff.ufrj.br

Introduction

We present the case of a phenotypically male adolescent with bilateral cryptorchidism and short stature who developed premature secondary sexual characteristics. His clinical and laboratory evaluation confirmed the diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency. We report here the unexpected outcome revealed during his follow-up. The patient and his mother signed the agreement for publication.

Case Report

A phenotypically male patient, 10 years and 10 months of age, was referred due to short stature and accelerated sexual development. His mother reported the presence of pubic hair and acne on the patient since the age of 4 years. Since then, he has sought medical care, and treatment with 125 mg of cyproterone acetate was maintained until 10 years of age. Medroxyprogesterone acetate (Provera®) had also been prescribed between 4 and 8 years of age. When he was first seen at our clinic, he was not using any medication. However, his mother observed worsening acne and a slowing growth rate after the medication was suspended. Laboratory analysis revealed normal prepubertal gonadotropin levels for his age (table 1), a testosterone level in an adult range and a diminished cortisol concentration. In addition, DHEA-S, DHEA, 17-hydroxyprogesterone and androstenedione levels were increased when compared with the normal range for young adult males. These results were compatible with CAH due to the 21-hydroxylase deficiency. Diagnostic imaging showed normal results for abdominal ultrasonography and computed tomography of the sella turcica. The patient's bone age was 17 years by the Greulich-Pyle method. The first cytogenetic analysis indicated a 46,XY karyotype.

The patient is the first child of non-consanguineous parents and was born by forceps delivery. There was no suspicion of genital ambiguity at birth. His psychomotor development was appropriate. He has experienced several episodes of infectious disease since 3 months of age that required hospitalisation. He has one healthy half-sister and one healthy brother, both of whom are of normal height. His mother is healthy, and paternity was not declared. There is no family history of short stature, endocrine or genetic diseases.

Physical examination revealed a height of 137 cm (Z score = -0.88), body weight of 46.4 kg, normal blood pressure, atypical facies, rough voice, thick and curly body hair, acne lesions on the face and trunk and external male genitalia. The patient had a pubic hair Tanner score of 5, with a phallus measuring 6 cm and no palpable testes. Pelvic ultrasound showed a hypoechoic image with regular contours of 19 × 0.9 mm suggesting testicular parenchyma on the left, but no testicular parenchyma on the right. Abdominal ultrasound was normal.

Treatment with prednisone 5 mg daily was initiated, and after one month of treatment, laboratory analysis showed decreased androstenedione levels, but testosterone levels remained quite elevated

(table 1). Magnetic resonance imaging (MRI) of the sella turcica did not show any abnormality.

MRI of the abdomen and pelvis was requested to further investigate cryptorchidism. Images showed a blind-ended uterus measuring approximately 5.0 × 2.0 × 2.0 cm with a visible endometrial cavity and a thickness of approximately 0.3 cm; the prostate was in usual topography, measuring 2.6 × 2.0 × 3.3 cm (L × AP × T), but no seminal vesicles were visualised. Nodules were also located in the topography of the bilateral iliac chains. No abnormalities were noticed on the adrenal glands (fig. 1). Blood levels of beta-chorionic gonadotropin, alpha-fetoprotein and lactate dehydrogenase were within the normal range.

A second cytogenetic evaluation was requested. After an analysis of 50 metaphases, the karyotype was 46,XX, which is compatible with a genetically female individual. A molecular search for Y-chromosome sequences such as the *SRY* gene, the *TSPY* gene and the *DYZ3* centromeric marker was negative. A molecular study was carried out and found that *CYP21A2* gene mutations were the cause of the 21-hydroxylase deficiency. His mother and half sister have also been analysed to understand the segregation of the mutations. *CYP21A2* gene sequencing revealed compound heterozygosity for IVS2-13A/C>G and p.R408C mutations. The mother and half sister were heterozygous for IVS2-13A/C>G; therefore, the p.R408C was presumed to be inherited from the father.

After the decision was made for the patient to have a male gender, the patient was referred for surgical exploratory laparotomy. The mother and patient were informed about the probability of malignancy and removal of his gonads and that the implantation of testicular prostheses would occur. The procedure was carried out by a joint group in urology and gynaecology and identified a uterus with rudimentary aspect, fallopian tubes and ovaries (fig. 2). A brownish nodular peri-adnexal lesion measuring approximately 2.0 × 1.8 × 1.5 cm was observed on the right (fig. 2). Hysterectomy and bilateral adnexectomy and removal of the lesion on the right side were performed. Bilateral testicular prostheses were placed with the consent of the patient and his family. No nodular lesions or lymph nodes in the pelvic cavity on the left were identified.

Histological examination of the uterus and appendages was consistent with bilateral Leydig cell tumour of the ovarian hilum. Histopathological analysis of the lesion on the right was also compatible with a Leydig cell tumour. A proliferation of cells with moderate to marked pleomorphism, which are cells with bizarre and multinucleated nuclei with frequent absence of mitoses, necrosis, capsular infiltration and angiolymphatic embolism, was observed. Immunohistochemistry showed a low cell proliferation rate (<5%) according to Ki67.

In the post-surgery period, the patient experienced significant improvement of oily skin and acne on the face and trunk. Laboratory tests conducted 2 months after surgery showed androgen levels, including testosterone, within the normal adult range (table 1).

MRI was performed 6 months after surgery, and the prostate gland was identified in its usual topography. Nodular formations in the bilateral iliac chains were no longer identified. In addition, lymphadenomegaly was not detected.

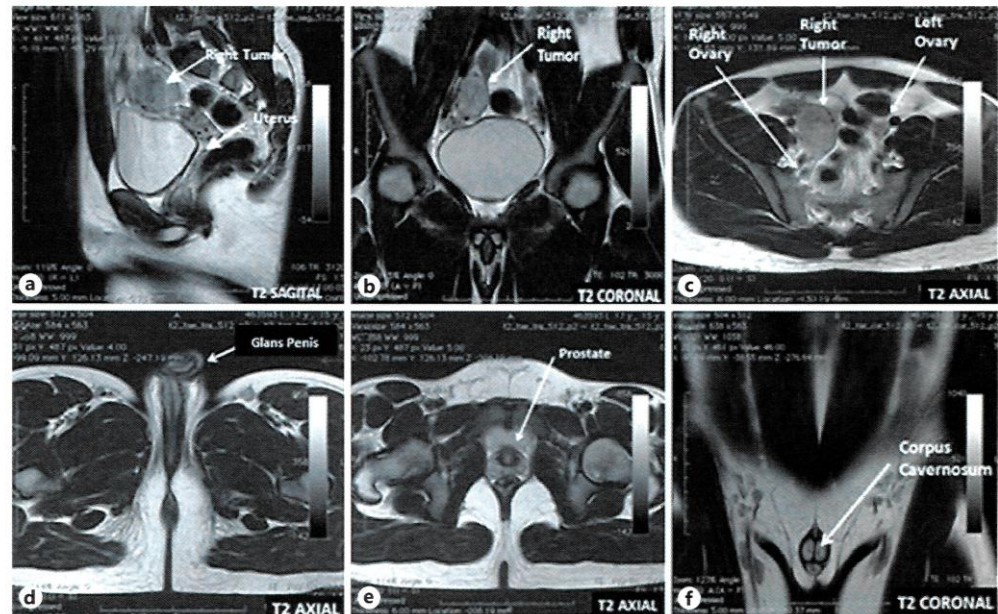


Fig. 1. The uterus in a blind bottom measuring approximately $5.0 \times 2.0 \times 2.0$ cm, with a visible endometrial cavity measuring approximately 0.3 cm thick. The prostate has usual topography, measuring $2.6 \times 2.0 \times 3.3$ cm (L \times AP \times T), with differentiation between the peripheral zone and the inner gland; seminal vesicles were not visualised. Nodules were also identified with a hyposignal in T1, a hyperintense signal in T2 and heterogeneous intense impregnation by the contrast medium, located in the topography of bilateral iliac chains. On the left, there was a single lesion measuring approximately 1.5×1.5 cm. On the right, the lesions extended inferiorly to the right internal iliac chain and then to the bladder, with the largest measuring 4.0×2.5 cm. The adrenal gland is not shown in this image, but based on other images was reported as normal without details.

Table 1. Laboratory analysis

	Before corticoid therapy	After prednisone before surgery	After prednisone after surgery
17-Hydroxyprogesterone, ng/dl	53.7 (R: 0.05–1.97)	15.3 (R: 0.05–1.97)	0.35 (R: 0.59–3.44)
Androstenedione, ng/dl	43.10 (R: 0.5–2.65)	18.46 (R: 0.5–2.65)	<0.3 (R: 0.3–3.3)
Total testosterone, ng/dl	–	21,994 (R: 2,410–8,270)	23 (R: 20–1,200)
Free testosterone	41 (R: 0.3–25)	–	–
DHEA-S, μ g/dl	4,046 (R: 50–1,806)	3,199 (R: 50–1,806)	0.3 (R: 70.2–492)
FSH, mUI/ml	0.12	–	7.6 (R: 1.4–18.1)
LH, mUI/ml	0.08	–	16.1 (R: 1.5–9.3)
Estradiol, pg/ml	40 (\leq 35)	–	–
Cortisol (8 h), μ g/dl	2.18 (R: 5–25)	–	–
Sodium, mEq/l	138 (R: 135–145)	–	–
Potassium, mEq/l	4.1 (R: 3.5–4.5)	–	4.2 (R: 3.5–4.5)

R = Normal ranges for adult males; FSH = follicle-stimulating hormone; LH = luteinising hormone.



Fig. 2. Macroscopic image on the left: a uterus with rudimentary aspect, fallopian tubes and ovaries. In the centre: a brownish nodular peri-adnexal lesion was observed on the right measuring approximately $2.0 \times 1.8 \times 1.5$ cm. On the right side: histopathologic analysis of the lesion on the right was also compatible with Leydig

cell tumours, and a proliferation of cells with moderate to marked pleomorphism, which are cells with bizarre nuclei and multinucleate with frequent absence of mitoses, necrosis, capsular infiltration and angiolymphatic embolism, was observed. Immunohistochemistry showed a low cell proliferation rate (<5%) according to Ki67.

Discussion

The patient described here was born with Prader grade 5 genitalia and was declared undoubtedly male. An appropriate neonatal screening could have changed the clinical prognosis, increased his final height and probably would have changed the patient's sex determination, but his hometown is small with poor medical resources, which hampered further diagnosis. Despite the lack of specialised support, the patient overcame several infectious diseases during childhood without corticotherapy.

Biochemical results for adrenal metabolites indicated the diagnosis of CAH due to the 21-hydroxylase deficiency. Sequencing analysis of the *CYP21A2* gene disclosed compound heterozygosis for IVS2-13A/C>G and p.R408C mutations. The maternally inherited IVS2-13A/C>G is the most frequent pseudogene-derived mutation identified in the *CYP21A2* gene in every ethnic group reported to date. The paternally inherited p.R408C mutation is rare and is not derived from the pseudogene. This mutation has been identified in Brazilian patients, and the enzymatic activity is completely abolished when tested in vitro [1, 2]. The phenotype associated with the combination of these two mutations in trans always results in the classical salt-wasting form of CAH due to 21-hydroxylase deficiency [1, 2].

The persistence of high levels of testosterone after the control of the adrenal hyperplasia was intriguing. The main concern was the risk of gonadoblastoma in intra-abdominal testes, as the patient was thought to be a 46,XY male until the age of 10 years. Abdominal MRI imaging in the presurgical period unexpectedly showed the presence of a uterus, ovaries and lymph node enlargement. At this time, a new karyotype was requested that was compatible with 46,XX. This karyotype would explain the fe-

male framework but not the high testosterone levels, thus increasing the possibility of the patient having a true hermaphroditic framework. Another surprise found during surgery demonstrated the presence of a Leydig cell tumour, which could explain these findings.

In females, Leydig cell tumours can be subdivided into the two subtypes hilar and non-hilar or are 'not otherwise specified'. The non-hilar type generally originates from ovarian stroma cells and has an intra-ovarian location. The hilar type tumour has predominance over the non-hilar type and is considered by definition to be a neoplasm derived from steroidogenic cells of the ovarian hilus [3, 4]. The hilar type accounts for less than 0.1% of all ovarian tumours but represents 20% of steroid-producing ovarian tumours [5]. All aspects of its structure and function are identical to testicular Leydig cell tumours and the two are therefore very difficult to differentiate morphologically. The hilar type tumours are typically very small with an average diameter of 3 to 5 cm, are often unilateral and mostly benign [5, 6]. This kind of tumour may occur at any age but is most often diagnosed in women in the perimenopausal or postmenopausal period at a mean age of 58 years [3-7]. In children, such tumours may manifest with precocious puberty [8]. The association with adenocarcinoma has also been reported [9]. These tumours are believed to be derived from embryonic remnants of the primitive gonad marrow located in the ovarian hilum, through which testicular differentiation would occur if the embryo were genetically male. These remnants may eventually result in virilising ovarian tumours.

Examination of the histopathological aspect of these tumours shows large cells; moreover, they are polyhedral with eosinophilic granular cytoplasm, which may be vacuolated and contain lipofuscin pigments. The nuclei are

round and monomorphic, containing a small nucleolus and exhibiting mild atypical and rare mitotic figures [5, 6]. The presence of Reinke crystals is characteristic of this tumour but is found in less than 60% of cases and usually indicates benignity [4–6]. In our case, these crystals were not found. In these tumours, the course of laboratory analysis demonstrates a 2.5-fold increase in testosterone levels. The levels of DHEA-S, 17-hydroxyprogesterone and androstenedione are often normal or may be slightly increased [5].

The diagnosis of these tumours by conventional imaging can often pose a diagnostic challenge because they often have very small dimensions. In some cases, a stimulation test with chorionic gonadotropin may be requested to confirm the ovarian production of androgens [10]. When the provocative test is inconclusive, in some cases, it may be necessary to require catheterisation of the ovarian veins to confirm the site of androgen production [5, 6, 11]. The literature also describes the use of F-18 fluoro-D-glucose-positron emission tomography-computed tomography (FDG-PET/CT) for the location of these tumours [12, 13].

The treatment of this tumour consists of total hysterectomy with associated bilateral abdominal adnexectomy. The extent of surgery and the need for additional treatment with chemotherapy depends on the degree of suspicion of malignancy [6]. Young women with a desire to become pregnant who have an indolent tumour may opt for a conservative surgery with preservation of fertility.

The therapeutic use of gonadotropin-releasing hormone analogues has been described in cases of androgen-producing ovarian tumours, especially when surgical therapy is not possible [5, 14–16]. Nevertheless, there are no studies showing the safety or benefits of use of this medicine in the long term.

In our patient, based on clinical evidence of an indolent tumour and low rates of cell proliferation according to Ki67, coupled with a lack of lymphatic and capsular invasion, we opted for a conservative clinical approach with frequent monitoring of testosterone levels and periodic imaging. To date, there is no evidence of tumour recurrence, and the testosterone levels are holding steady. The patient is taking 5 mg of prednisone per day to control adrenal disease.

In cases of disorder of sex differentiation (DSD), the performance of a trained multidisciplinary team becomes important. In defining sexual identity in patients with DSD, one should consider not only the karyotype and anatomical structures but also the social, cultural, intra-

uterine exposure to androgens and the possibility of fertility [17]. Lee and Houk [18] studied phenotypic male CAH patients with the 46,XX karyotype and concluded that these patients had appropriate levels of social and sexual satisfaction. Our patient presented behaviour consistent with the gender of rearing, with no doubts regarding his sexuality.

The presence of prostatic tissue in 46,XX patients with the classical form of CAH has been reported [19, 20]. It is believed that the development of this tissue arises from the androgen stimulus, through the dihydrotestosterone on the Skene's paraurethral glands. These glands are present in all girls and have the same histological and enzymatic characteristics as the male prostate [21]. Paulino et al. [20] demonstrated the presence of a prostate in 15.6% of girls with the classic form of CAH, with the use of magnetic resonance as the gold standard. The presence of prostate tissue in girls with CAH was observed in patients with poorly controlled disease.

In this case, it is interesting to highlight the diagnostic difficulties presented. During the medical follow-up, two ultrasound exams of the pelvic region showed a small mass on the left, which was believed to be the undescended testicle. In fact, this mass was a tumour, with an unknown first appearance, which probably aggravated the framework of virilisation and the patient's short stature. In addition, the first karyotype was incorrect. We believe that an inadequate blood sample and the analysis of only 3 metaphases were the causes of this mistake.

Leydig cell tumours in females generally present as benign tumours and have an excellent prognosis without recurrence of metastasis or signs of regression of virilisation after surgery. Eventually, these tumours can mimic or coexist in frames of congenital adrenal hyperplasia [10, 22]. There are published reports showing the association of ovarian tumours with subclinical Cushing's syndrome and multiple endocrine neoplasia [23].

Therefore, the diagnosis of steroid-producing ovarian tumours should be considered in cases where the progression of virilisation or androgen levels are not compatible with the patient's underlying disease.

Disclosure Statement

The authors have no financial relationships to disclose relevant to this article.

References

- 1 Billerbeck AEC, Mendonca BB, Pinto EM, Madureira G, Arnhold IJ, Bacheга TA: Three novel mutations in CYP21 gene in Brazilian patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency due to a founder effect. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4314–4317.
- 2 Soardi FC, Barbaro M, Lau IF, Lemos-Marini SH, Baptista MT, Guerra-Junior G, Wedell A, Lajic S, de Mello MP: Inhibition of CYP21A2 enzyme activity caused by novel missense mutations identified in Brazilian and Scandinavian patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2416–2420.
- 3 Prat J, Path FRC: Steroid cell tumors; in Prat J (ed): *Pathology of the Ovary*. 1st ed. Saunders, 2004, pp 231–239.
- 4 Tavassoli FA, Mooney E, Gersell DJ: Sex cord-stromal tumors; in Tavassoli FA, Devilu P (eds): *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs*. 1st ed. Lyon, IARC Press-WHO, 2003, pp 141–161.
- 5 Picón MJ, Lara JJ, Sarasa JL, Recasens JD, Clouet R, Gonzalo MA, Rovira A: Use of a long-acting gonadotropin-releasing hormone analogue in postmenopausal woman with hyperandrogenism due to a hilus cell tumor. *Eur J Endocrinol* 2000;142:619–622.
- 6 Marcelino M, Nobre E, Conceição J, Lopes L, Vilar H, França Martins M, Carvalho A, André S, Horta A, De Castro JJ: A rare case of hyperandrogenism: bilateral Leydig cell tumor of the ovary. *Acta Med Port* 2010;23:113–118.
- 7 Baiocchi G, Mancini N, Angeletti G, Celleno R, Fratini D, Gilardi G: Pure Leydig cell tumour (hilus cell) of the ovary: a rare cause of virilization after menopause. *Gynecol Obstet Invest* 1997;44:141–144.
- 8 Paula LC, Zen VL, Czepielewski MA: Granulosa-stromal tumor of the ovary: a case of mixed germ cell-cord stromal tumor of the ovary with endocrinological considerations. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005;49:776–783.
- 9 Ross LD: Hilus cell tumor of the ovary with an associated endometrial carcinoma, presenting with male pattern baldness and postmenopausal bleeding. Case report. *Br J Obstet Gynaecol* 1984;91:1266–1268.
- 10 Luton JP, Clerc J, Paoli V, Bonnin A, Dumez Y, Vacher-Lavenu MC: Bilateral Leydig cell tumor of the ovary in a woman with congenital adrenal hyperplasia. The first reported case. *Presse Med* 1991;20:109–112.
- 11 Levens ED, Whitcomb BW, Csokmay JM, Nieman LK: Selective venous sampling for androgen-producing ovarian pathology. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;70:606–614.
- 12 Matuszczyk A, Petersenn S, Lahner H, Haude M, Veit P, Becker JU, Kimmig R, Bockisch A, Mann K: Leydig cell tumor as a cause of hirsutism in a postmenopausal woman. *Med Klin (Munich)* 2007;102:259–262.
- 13 McCarthy-Keith DM, Hill M, Norian JM, Millo C, McKeeby J, Armstrong AY: Use of F 18-fluoro-D-glucose-positron emission tomography-computed tomography to localize a hilar cell tumor of the ovary. *Fertil Steril* 2010;94:753.e11–753.e14.
- 14 Emons G, Ortmann O, Pahwa GS, Löhns U, Wetterling T, Dilling H, Oberheuser F, Knuppen R: In vivo and in vitro effects of GnRH analogues on an ovarian Leydig cell tumor. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1992;52:487–493.
- 15 Marcondes JA, Nery M, Mendonça BB, Hayashida SA, Halbe HW, Carvalho FM, Wajchenberg BL: A virilizing Leydig cell tumor of the ovary associated with stromal hyperplasia under gonadotropin control. *J Endocrinol Invest* 1997;20:685–689.
- 16 Pascale MM, Pugeat M, Roberts M, Rousset H, Déchaud H, Dutrieux-Berger N, Tourniaire J: Androgen suppressive effect of GnRH agonist in ovarian hyperthecosis and virilizing tumors. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994;41:571–576.
- 17 Houk CP, Lee PA: Approach to assigning gender in 46,XX congenital adrenal hyperplasia with male external genitalia: replacing dogmatism with pragmatism. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4501–4508.
- 18 Lee PA, Houk CP: Review of outcome information in 46,XX patients with congenital adrenal hyperplasia assigned/reared male: what does it say about gender assignment? *Int J Pediatr Endocrinol*. 2010;2010:982025.
- 19 Gomes LG, Mendonça BB, Bacheга TA: Prostate development in girls with congenital adrenal hyperplasia: effect of androgens intrauterus or inappropriate postnatal hormonal control? *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009;53:695–697.
- 20 Paulino Mda C, Steinmetz L, Menezes Filho HC, Kuperman H, Della Manna T, Vieira JG, Blasbalg R, Baroni R, Setian N, Damiani D. Search of prostatic tissue in 46,XX congenital adrenal hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009;53:716–720.
- 21 Tepper SL, Jagirdar J, Heath D, Geller SA: Homology between the female paraurethral (Skene's) glands and the prostate. *Arch Pathol Lab Med* 1984;108:423–425.
- 22 Baş F, Saka N, Darendeliler F, Tuzlali S, Ilhan R, Bundak R, Günöz H: Bilateral ovarian steroid cell tumor in congenital adrenal hyperplasia due to classic 11beta-hydroxylase deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13:663–667.
- 23 Diab DL, Faiman C, Siperstein AE, et al: Virilizing ovarian Leydig cell tumor in a woman with subclinical Cushing syndrome. *Endocr Pract* 2008;14:358–361.

4) DISCUSSÃO

O sequenciamento do gene *CYP21A2* foi realizado buscando-se identificar mutações novas ou raras.

Com a utilização do sequenciamento como método de análise de mutações no gene *CYP21A2*, novas mutações são constantemente identificadas em todos os continentes. Para essas novas mutações os estudos funcionais são necessários, pois nos permite determinar como essas mutações alteram a atividade enzimática e então estabelecer uma relação entre o genótipo e o fenótipo; auxiliando no diagnóstico genético e em um aconselhamento genético preciso. Este tema está longe de ser esgotado e certamente tem encontrado um espaço importante para divulgação científica, como se verifican a literatura recente onde há vários trabalhos que reportam novas mutações bem como seus estudos funcionais (Barbaro et al. 2015; Kawashima et al. 2015; Concolino et al. 2012; Concolino et al. 2009; Riepe et al. 2008; Soardi et al. 2008; Barbaro et al. 2006; Krone et al. 2005; Robins et al. 2005). Além disso, recentemente a proteína *CYP21A2* humana foi cristalizada (Pallan et al. 2015), o que permitiu o desenvolvimento de um modelo fidedigno para as análises *in silico*.

Foram incluídas nos estudos funcionais e estruturais 13 mutações novas ou raras e 3 combinações de mutações identificadas no gene *CYP21A2* cujos efeitos na atividade enzimática não eram conhecidos. A localização na estrutura proteica de cada uma das mutações aqui estudadas está indicada na Figura 13.

O artigo 1 descreve a análise funcional de oito mutações *missense* e de uma deleção *in frame* de 9 pares de base identificadas no gene *CYP21A2*. A atividade enzimática residual foi estudada frente aos dois substratos naturais da *CYP21A2*, são eles 17OHP e progesterona. Para efeitos de comparação e criação de um gradiente de atividades que nos permite uma melhor associação genótipo-fenótipo, foram utilizadas quatro mutações bem conhecidas como referências. A mutação p.Pro482Ser como referência não clássica muito leve, a p.Pro453Ser como não clássica leve, a p.Val281Leu como não clássica e a p.Ile172Asn como referência clássica.

Para as mutações que apresentaram atividade residual enzimática acima de 10% foram realizados os estudos da cinética enzimática utilizando-se como substrato a 17OHP para se investigar o mecanismo molecular responsável pela redução da função enzimática. A expressão proteica de todas as construções gênicas contendo as mutações descritas neste artigo foi confirmada e comparada à do controle *wildtype* através de experimentos de *Western*

blot. Os resultados dos ensaios enzimáticos foram complementados pela predição *in silico* da patogenicidade de cada mutação baseada na recente estrutura cristalizada da CYP21A2 humana (Pallan et al. 2015).

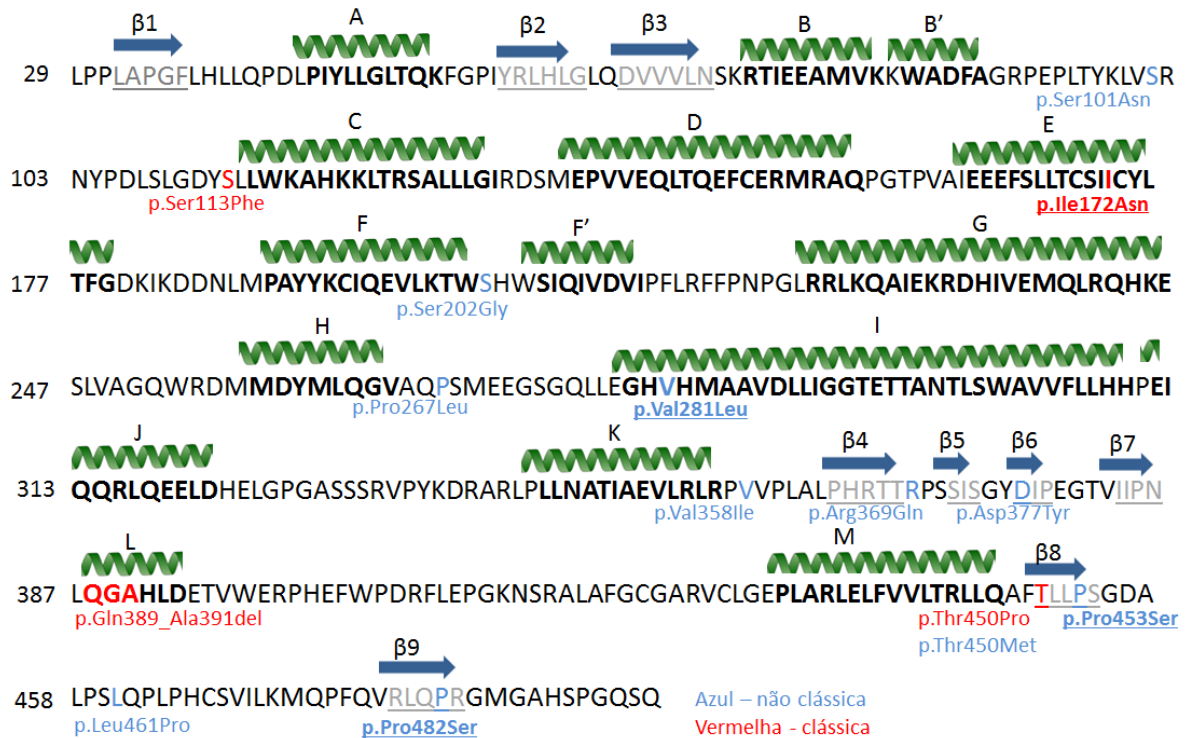


Figura 13: Sequência dos aminoácidos que constituem a enzima CYP21A2 que foi cristalizada (Pallan et al. 2015). Os primeiros 28 aminoácidos foram removidos para permitir a cristalização, por isso as mutações p.Leu12Met e p.Arg16Cys não estão representadas. As demais onze mutações estudadas estão indicadas na sequência nas cores vermelha e azul que representam, respectivamente, as formas clínicas clássica e não clássica. As mutações evidenciadas em negrito e sublinhadas representam as mutações já descritas no gene *CYP21A2* utilizadas como controles. A estrutura secundária está indicada acima da sequência e são evidenciadas em negrito as α -hélices e em cinza sublinhado as folhas β .

A mutação p.Leu12Met que havia sido identificada no mesmo alelo que a mutação p.Gln318*, não foi estudada em combinação com esta uma vez que já é bem conhecido que a mutação p.Gln318* resulta em uma atividade residual enzimática nula (Globerman et al. 1988), portanto a um alelo portador desta mutação, independentemente de ser portador ou não de outra mutação, corresponderá sempre a atividade enzimática nula. No entanto, visto tratar-se de uma nova mutação que eventualmente possa ocorrer em diferentes indivíduos de forma isolada, foi considerado adequado o estudo da p.Leu12Met por se

encontrar em uma região importante para a estabilidade proteica e na região de ancoramento da proteína à membrana (Baradaran-Heravi et al. 2007; Lajic et al. 1999). No entanto, a mutação p.Leu12Met apresentou atividade residual enzimática similar ao controle *wildtype* e à variante normal p.Ala15Thr. Frente a esse resultado, o estudo da cinética enzimática se fez necessário e mais uma vez apontou para uma variante normal, pois não alterou significativamente a velocidade de conversão do substrato nem a ligação do mesmo à proteína. O modelo estrutural da CYP21A2 humana não foi adequado para o estudo *in silico* desta mutação uma vez que os 28 primeiros resíduos referentes à região de ancoramento à membrana foram substituídos para permitir a cristalização da proteína, o mesmo é válido para a mutação p.Arg16Cys discutida a seguir.

As mutações p.Arg16Cys, p.Ser101Gly e p.Pro267Leu apresentaram valores para as atividades residuais enzimáticas entre o do controle *wildtype* e da mutação p.Pro482Ser, que foi utilizada como referência de mutação associada ao fenótipo não clássico muito leve da HAC por deficiência da CYP21A2. As atividades residuais enzimáticas destas três mutações foram estatisticamente diferentes da atividade do controle *wildtype* (p.Arg16Cys: 95% e 81%; p.Ser101Gly: 94% e 74%; e p.Pro267Leu: 97% e 87%, frente à 17OHP e a progesterona respectivamente), mas não suficiente para associá-las a um fenótipo. O estudo de cinética enzimática foi realizado e se constatou que estas mutações não interferem no mecanismo de ligação do substrato à proteína, entretanto, as velocidades de conversão foram alteradas (*Student's t test*: p.Arg16Cys: $P = 0,56 \times 10^{-4}$; p.Ser101Gly e p.Pro267Leu: $P = 0,01$). As predições *in silico* para a mutação p.Ser101Gly indicaram um efeito mínimo na estrutura/função enzimática, já para a mutação p.Pro267Leu indicaram que não afeta a estrutura/função enzimática.

As mutações p.Ser202Gly e p.Thr450Met apresentaram atividades residuais enzimáticas próximas às da mutação p.Pro453Ser, referência de mutação associada ao fenótipo não clássico leve da HAC por deficiência da CYP21A2. As atividades residuais enzimáticas encontradas foram de 85% e 81% para a mutação p.Ser202Gly e de 78% e 43% para a mutação p.Thr450Met, frente à 17OHP e à progesterona respectivamente. Para estas mutações também foi realizado o estudo da cinética enzimática e constatou-se que estas mutações não interferem no mecanismo de ligação do substrato à proteína, entretanto as velocidades de conversão foram alteradas (*Student's t test*: p.Ser202Gly: $P = 0,35 \times 10^{-3}$; e p.Thr450Met: $P = 0,20 \times 10^{-4}$). As predições *in silico* de ambas as mutações indicaram um efeito mínimo na estrutura/função enzimática.

Os resultados da cinética enzimática das novas mutações que resultam em fenótipo não clássico leve, p.Arg16Cys, p.Ser101Gly, p.Pro267Leu, e fenótipo não clássico, p.Ser202Gly e p.Thr450Met, indicam que as enzimas com essas mutações reconhecem o substrato de maneira eficaz entretanto necessitam de maior tempo para convertê-lo em produto. Uma possível explicação para isso é que, devido ao aumento da afinidade destas enzimas pelo substrato, indicado pela diminuição do K_m quando comparado com os valores obtidos para a enzima *wildtype*, o tempo de *turnover* enzimático se elevou, causando conseqüentemente um decréscimo na velocidade de reação.

As mutações p.Ser113Phe, p.Gln389_Ala391del e p.Thr450Pro apresentaram atividades residuais enzimáticas próximas a da mutação p.Ile172Asn, utilizada como referência de mutação associada ao fenótipo clássico da HAC por deficiência da CYP21A2. As atividades residuais enzimáticas encontradas foram de 4% para a mutação p.Ser113Phe frente aos dois substratos, 0% e <1% para a mutação p.Qln389_Ala391del frente à 17OHP e a progesterona, e <1% para a mutação p.Thr450Pro frente aos dois substratos. Devido à baixa atividade residual enzimática não foram realizados estudos da cinética enzimática. As predições *in silico* destas as mutações indicaram um efeito grave, muito grave e deletério para estrutura/função enzimática, o que concorda com as atividades residuais enzimáticas encontradas.

O genótipo e o fenótipo dos indivíduos que carregam as mutações novas estudadas no artigo 1 são apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Genótipo e fenótipo dos indivíduos que apresentaram novas mutações.

Ind. n°	Genótipo	Fenótipo
1	p.Leu12Met +p.Gln318X / p.Val281Leu	Não clássico
2	p.Ser101Asn / p.Val281Leu	Não clássico
3	p.Ser113Phe / p.Val281Leu	Não clássico
4	p.Ser202Gly / p.Gln318Stop	Não clássico
5	p.Ser202Gly / normal	Normal para HAC
6	p.Ser202Gly /normal	Normal para HAC
7	p.(Gln389_Ala391del) / deleçãoouconversão	Clássico(PS)
8	p.Thr450Pro / p.Thr450Pro	Clássico(PS)
9	p.Arg16Cys / normal	Normal para HAC
10	p.Pro267Leu / normal	Normal para HAC
11	p.Thr450Met / normal	Normal para HAC

Em negrito estão destacadas as mutações novas ou raras.

No artigo 2 descrevemos a análise funcional de três combinações de mutações e de quatro mutações *missense*. Estas mutações foram identificadas em pacientes diagnosticados clinicamente com HAC forma clássica perdedora de sal e com HAC forma não clássica. A atividade enzimática residual foi estudada frente aos dois substratos naturais da enzima CYP21A2, 17OHP e progesterona. Novamente para efeitos de comparação e criação de um gradiente de atividades que nos permite uma melhor associação genótipo-fenótipo, foram utilizadas três mutações bem conhecidas como referências. A mutação p.Pro482Ser como referência não clássica leve, a p.Val281Leu como não clássico e a p.Ile172Asn como referência clássica.

Mais uma vez os experimentos de *Western blot* auxiliaram a avaliar expressão proteica de todas as construções contendo as mutações e combinações de mutações por comparação à expressão do controle *wildtype*.

A mutação p.Val358Ile foi identificada no mesmo alelo que a mutação p.Ile172Asn em 3 pacientes não relacionados e isoladamente em um paciente. A mutação p.Ile172Asn é derivada do pseudogene e é associada à forma clássica não perdedora de sal da HAC (Tusie-Luna, Traktman e White 1990). A mutação p.Val358Ile apresentou atividade residual enzimática de 72% e 34% frente à 17OHP e a progesterona respectivamente, quando estudada isoladamente. Resultados estes um pouco abaixo aos da mutação p.Pro482Ser, usada aqui como referência de mutação associada ao fenótipo não clássico leve da HAC por deficiência da CYP21A2. Quando expressa em combinação com a mutação p.Ile172Asn a atividade residual enzimática foi <1% frente aos dois substratos naturais, resultado similar ao da mutação p.Ile172Asn isolada, usada como referência de mutações associadas ao fenótipo clássico da HAC por deficiência da CYP21A2. Esse resultado indica que, apesar da mutação p.Val358Ile apresentar atividade compatível com a forma não clássica da HAC essa atividade não foi suficiente para manter uma atividade enzimática mínima quando associada à mutação p.Ile172Asn, resultando em um efeito sinérgico.

A mutação p.Arg369Gln foi identificada no mesmo alelo que a mutação p.Val281Leu, derivada do pseudogene e associada à forma não clássica da HAC (Tusie-Luna, Traktman e White 1990) em uma paciente. A atividade residual enzimática da mutação p.Arg369Gln quando estudada isoladamente foi de 82% e 54% frente à 17OHP e a progesterona respectivamente, resultados similares aos da mutação p.Pro482Ser. No entanto, quando o estudo de expressão foi conduzido com a combinação das mutações p.Val281Leu+p.Arg369Gln observou-se um efeito sinérgico, sendo a atividade residual enzimática de 10% e 9% frente à 17OHP e à progesterona respectivamente. Embora a

combinação destas mutações comprometa em maior grau a atividade enzimática, o efeito residual é ainda suficiente para se associar à forma não clássica da HAC.

As mutações p.Asp377Tyr e p.Leu461Pro foram identificadas no mesmo alelo de um paciente diagnosticado clinicamente com a forma não clássica da HAC. Este alelo é bastante interessante visto que nenhuma destas duas mutações são derivadas do pseudogene e também nenhuma das duas havia sido reportada anteriormente. Devido ao fato do paciente ser heterozigoto composto deste alelo com duas mutações (p.Asp377Tyr+p.Leu461Pro) e de um alelo portador da mutação p.Val281Leu associada à forma não clássica de HAC, o fenótipo resultante desse genótipo é o de forma não clássica “ditado” pela p.Val281Leu. Dessa forma, não era possível se fazer uma predição quanto ao dano sobre a atividade enzimática que estas novas mutações estariam provocando sem se realizar os estudos *in vitro*.

Quando avaliadas isoladamente, ambas as mutações apresentaram atividades residuais enzimáticas compatíveis com a forma não clássica da HAC por comparação com as das mutações p.Pro482Ser e p.Val281Leu, usadas como referências de mutações associadas ao fenótipo não clássico da HAC por deficiência da CYP21A2. A mutação p.Asp377Tyr apresentou atividade residual enzimática de 81% e 58% enquanto a mutação p.Leu461Pro apresentou 55% e 40% de atividade frente à 17OHP e a progesterona, respectivamente. Quando expressas em combinação, p.Asp377Tyr+p.Leu461Pro apresentou atividade residual enzimática de 17% e 10% frente à 17OHP e a progesterona respectivamente, indicando um efeito sinérgico desta combinação de mutações, porém mantendo um nível de atividade suficiente para resultar na forma não clássica da HAC.

A análise funcional será complementada pela predição *in silico* da patogenicidade destas mutações baseado na recente estrutura cristalizada da CYP21A2 humana (Pallan et al. 2015), tanto isoladamente como em combinação. Estes resultados poderão auxiliar no entendimento do motivo pelo qual mutações *in cis* no gene *CYP21A2* apresentam efeitos sinérgicos na atividade residual enzimática, podendo estar relacionado tanto com a localização destas mutações na proteína como com os contatos internos estabelecidos/perdidos.

O genótipo e o fenótipo dos indivíduos que carregam as mutações novas estudadas no artigo 2 são apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Genótipo e fenótipo dos pacientes que apresentaram novas mutações.

Ind. nº	Genótipo	Fenótipo apresentado
1	p.Ile172Asn+p.Val358Ile / c.290-13A/C>G	Clássico(PS)
2	p.Ile172Asn+p.Val358Ile / c.*13G>A (3'UTR)	Não clássico
3	p.Ile172Asn+p.Val358Ile / p.Leu480frameshift	Clássico(PS)
4	p.Val358Ile/p.Arg356Trp	Não clássico
5**	p.Ile172Asn / p.Val281Leu+p.Arg369Gln	Não clássico
6**	p.Ile172Asn / p.Val281Leu+p.Arg369Gln	Não clássico
7	p.Ile172Asn / p.Val281Leu+p.Arg369Gln	Não clássico
8	p.Asp377Tyr+p.Leu461Pro / p.Val281Leu	Não clássico

*Pacientes 5 e 6 são irmãos. Em negrito estão destacadas as mutações novas.

No artigo 3 descrevemos o genótipo de uma criança com diagnóstico clínico de HAC por deficiência da CYP21A2 da forma virilizante simples. Através da análise molecular da família foi possível identificar a heterozigose composta das mutações c.290-13A/C>G no intron 2 e p.Arg408Cys. Sua mãe e sua meia irmã também foram analisadas as quais são heterozigotas para a mutação c.290-13A/C>G, comprovando a herança materna desta mutação. Deduziu-se que a mutação p.Arg408Cys é de herança paterna, uma vez que não se dispunha de amostras do DNA do pai.

A mutação c.290-13A/C>G no intron 2 do gene *CYP21A2* é derivada do pseudogene *CYP21A1P* e é bastante frequente em todas as populações (Higashi et al. 1991; Forest et al. 2005). Está associada principalmente à forma perdedora de sal, mas pode se associar em alguns casos à forma virilizante simples (Kohn et al. 1995; Speiser et al. 1992). Isso se dá pelo fato desta mutação criar um sítio de *splicing* alternativo sem alterar a região de *splicing* original do gene *CYP21A2*. Sendo assim, teoricamente, portadores dessa alteração podem produzir também um mRNA processado corretamente e, se a quantidade de enzima funcional produzida for minimamente suficiente para manter ativa a síntese de aldosterona, o indivíduo apresentará o fenótipo virilizante simples.

A mutação p.Arg408Cys não é derivada do pseudogene e, embora seja uma mutação rara, já foi identificada anteriormente em pacientes brasileiros (Billerbeck et al. 2002; Soardi et al. 2008). Esta mutação foi estudada anteriormente quanto seu efeito funcional e apresentou atividade enzimática residual nula (Soardi et al. 2008). Considerou-se também que esta mutação desestabiliza a estrutura proteica e, por ambos os motivos foi associada à forma clássica perdedora de sal da HAC. Acreditando-se que no caso estudado o alelo portador da mutação c.290-13A/C>G esteja produzindo alguma atividade enzimática através da produção da enzima normal via sítio natural de *splicing*, foi considerada uma correlação positiva entre o genótipo e o fenótipo apresentado pelo paciente.

Mutações que causam danos à atividade enzimática da CYP21A2 podem ser encontradas em éxons, introns, região 5' regulatória e região 3'UTR do gene *CYP21A2* (Figura 12). Sendo assim o sequenciamento completo deste gene é muito importante devido ao grande número de mutações descritas e à ausência de um *hotspot* de mutações no gene *CYP21A2*. Além disso, na literatura, poucos casos de combinações de mutações no gene *CYP21A2* estão descritos, sendo que nenhum caso de combinação de duas mutações novas foi descrito antes. Portanto, as análises funcionais destas mutações, separadamente e em combinação, são de extrema importância uma vez que, combinações de mutações no gene *CYP21A2* apresentaram efeitos sinérgicos e podem agravar o fenótipo esperado em seus portadores. O sequenciamento do gene *CYP21A2* permitiu estabelecer-se uma correlação entre o genótipo e o fenótipo dos indivíduos analisados e, a investigação *in vitro* das mutações novas e raras (entretanto sem estudos funcionais) identificadas nos permitiu elucidar o papel das mesmas na HAC.

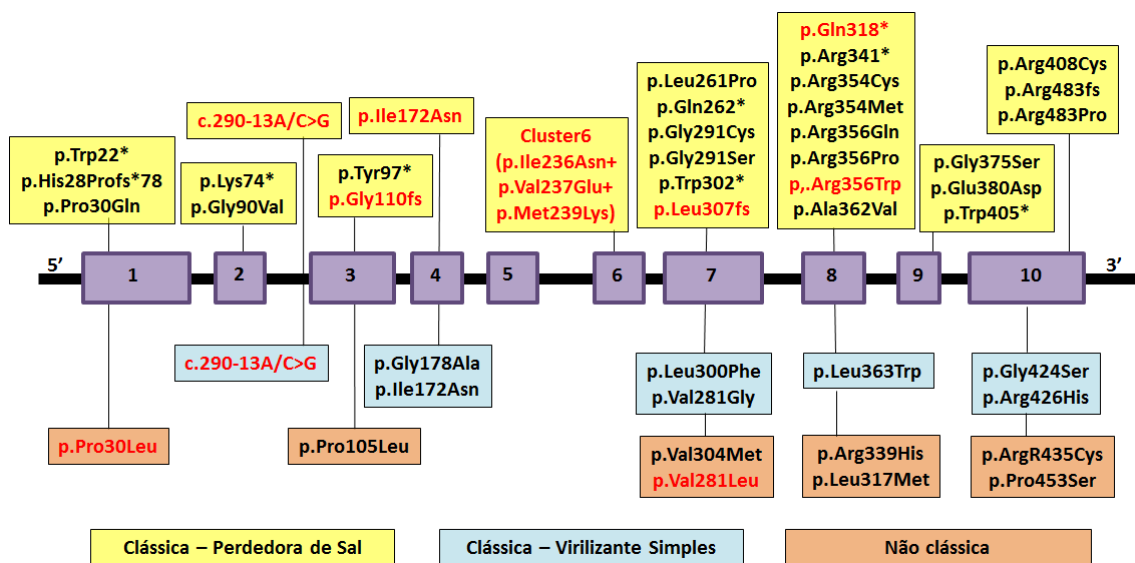


Figura 12: Representação de algumas mutações descritas no gene *CYP21A2*, evidenciando a ausência de um *hotspot* de mutações. As mutações derivadas do pseudogene estão destacadas em vermelho.

5) CONCLUSÕES

- A análise por sequenciamento direto do gene *CYP21A2* propiciou a identificação de mutações novas ou raras, incluído combinações inéditas de mutações em um mesmo alelo.
- As mutações p.Leu12Met, p.Arg16Cys, p.Ser101Asn, p.Arg369Gln, p.Asp377Tyr, p.Gln389_Ala391del, p.Thr450Met ep.Leu461Pro foram descritas pela primeira vez neste trabalho.
- A mutação p.Leu12Met é uma variante normal do gene *CYP21A2*, não alterando a função da enzima CYP21A2.
- As atividades residuais obtidas para as mutações p.Arg16Cys, p.Ser101Asn, p.Ser202Gly, p.Pro267Leu, p.Val358Ile, p.Arg369Gln, p.Asp377Tyr, p.Thr450Met ep.Leu461Pro indicaram uma associação à forma não clássica da Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da enzima CYP21A2 quando encontradas em homo- ou hemizigose ou ainda em heterozigose composta com outra mutação.
- As atividades residuais obtidas para as mutações p.Ser113Phe, p.Gln389_Ala391del e p.Thr450Pro indicaram uma associação à forma clássica da Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da enzima CYP21A2 quando encontradas em homo- ou hemizigose ou ainda em heterozigose composta com outra mutação.
- Mutações identificadas no mesmo alelo do gene *CYP21A2* (combinações de mutações) resultam em efeito sinérgico e reduzem a atividade residual da enzima CYP21A2. Esta informação é importante de se considerar durante a avaliação clínica e predição do fenótipo dos pacientes com Hiperplasia Adrenal Congênita.
- Os estudos funcionais permitiram a correlação entre o fenótipo e genótipo de todos os indivíduos analisados.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abid, F. et al., 2008. CYP21A2 gene mutation analysis in Moroccan patients with classic form of 21-hydroxylase deficiency: high regional prevalence of p.Q318X mutation and identification of a novel p.L353R mutation. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, 46(12), pp.1707–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18973462>.
- Amabis, J. & Martho, G., 2004. *Biologia das células - vol. 1* 2a. ed. Moderna, ed.,
- Amor, M. et al., 1988. Mutation in the CYP21B gene (Ile-172->Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(5), pp.1600–1604.
- Anon, The Human Gene Mutation Database. Available at: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> [Accessed September 22, 2015].
- Bachega, T. et al., 2004. Estudo multicêntrico de pacientes brasileiros com deficiência da 21-hidroxilase: correlação do genótipo com o fenótipo. *Arq. bras. endocrinol. ...*, 48, pp.3–7. Available at: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=393726&indexSearch=ID>.
- Bachega, T. a S.S. et al., 1998. Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(12), pp.4416–4419.
- Bachega, T.A. et al., 1999. Low frequency of CYP2B deletions in Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Human heredity*, 49(1), pp.9–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10189236> [Accessed March 2, 2016].
- Baradaran-Heravi, A. et al., 2007. Three novel CYP21A2 mutations and their protein modelling in patients with classical 21-hydroxylase deficiency from northeastern Iran. *Clinical Endocrinology*, 67(3), pp.335–341.
- Barbaro, M. et al., 2004. Functional analysis of two recurrent amino acid substitutions in the CYP21 gene from Italian patients with congenital adrenal hyperplasia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 89(5), pp.2402–2407.
- Barbaro, M. et al., 2006. Functional studies of two novel and two rare mutations in the 21-

- hydroxylase gene. *Journal of Molecular Medicine*, 84(6), pp.521–528.
- Barbaro, M. et al., 2015. In vitro functional studies of rare CYP21A2 mutations and establishment of an activity gradient for nonclassic mutations improve phenotype predictions in congenital adrenal hyperplasia. *Clinical Endocrinology*, 82(1), pp.37–44. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/cen.12526>.
- Bashamboo, A. & McElreavey, K., 2015. Human sex-determination and disorders of sex-development (DSD). *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 45, pp.77–83. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952115002281>.
- Berta, P. et al., 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, 348(6300), pp.448–450. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2247149> [Accessed September 23, 2015].
- Betts, M.J. & Russell, R.B., 2007. Amino-Acid Properties and Consequences of Substitutions. *Bioinformatics for Geneticists: A Bioinformatics Primer for the Analysis of Genetic Data: Second Edition*, 4, pp.311–342.
- Biason-Lauber, A. & Chaboissier, M.-C., 2015. Ovarian development and disease: The known and the unexpected. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 45, pp.59–67. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952115002189>.
- Bidet, M. et al., 2009. Clinical and molecular characterization of a cohort of 161 unrelated women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency and 330 family members. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(5), pp.1570–1578.
- Billerbeck, A.E.C. et al., 2002. Three novel mutations in CYP21 gene in brazilian patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency due to a founder effect. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(9), pp.4314–4317.
- Bleicken, C. et al., 2009. Functional characterization of three CYP21A2 sequence variants (p.A265V, p.W302S, p.D322G) employing a yeast co-expression system. *Human mutation*, 30(2), pp.443–450.
- Castro, S. et al., 2015. First Year After Congenital Adrenal Hyperplasia Neonatal Screening in a Public Health Program in Southern Brazil. In *BOOK OF ABSTRACTS - X Latin American Congress of Inborn Errors of Metabolism and Neonatal Screening - Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening*. pp. 89–90. Available at:

<http://iem.sagepub.com/content/3/2326409815613261.full>.

- Chiou, S.H., Hu, M.C. & Chung, B.C., 1990. A missense mutation at Ile172----Asn or Arg356----Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of biological chemistry*, 265(6), pp.3549–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2303461> [Accessed September 22, 2015].
- Coeli, F.B. et al., 2010. Novel deletion alleles carrying CYP21A1P/A2 chimeric genes in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *BMC medical genetics*, 11, p.104.
- Concolino, P. et al., 2012. P.H282N and p.Y191H: 2 novel CYP21A2 mutations in Italian congenital adrenal hyperplasia patients. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 61(4), pp.519–524. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2011.08.008>.
- Concolino, P. et al., 2009. Two novel CYP21A2 missense mutations in Italian patients with 21-hydroxylase deficiency: Identification and functional characterisation. *IUBMB Life*, 61(3), pp.229–235.
- Danielson, P., 2002. The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. *Current Drug Metabolism*, 3(6), pp.561–597. Available at: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2002&volume=3&issue=6&spage=561>.
- de-Araujo, M. et al., 1996. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, 29(1), pp.1–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8731325> [Accessed March 23, 2016].
- Delle Piane, L., Rinaudo, P. & Miller, W., 2015. 150 Years of Congenital Adrenal Hyperplasia: Translation and Commentary of De Crecchio's Classic Paper from 1865. *Endocrinology*, 156(4), pp.1210–1217. Available at: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/en.2014-1879>.
- Donohoue, P. a et al., 1989. Two distinct areas of unequal crossingover within the steroid 21-hydroxylase genes produce absence of CYP21B. *Genomics*, 5(3), pp.397–406.
- Ezquieta, B. et al., 1995. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Human genetics*, 96(2), pp.198–204. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7635470> [Accessed January 14, 2016].

- Falhammar, H. & Nordenström, A., 2015. Nonclassic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: clinical presentation, diagnosis, treatment, and outcome. *Endocrine*, pp.32–50. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s12020-015-0656-0>.
- Forest, M. et al., 2005. 21-hydroxylase deficiency: an exemplary model of the contribution of molecular biology in the understanding and management of the disease. *Ann. Jendocrinol.*, 66(3), pp.225–232.
- Globerman, H. et al., 1988. Nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of clinical investigation*, 82(1), pp.139–144.
- Haider, S. et al., 2013. Structure-phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(7), pp.2605–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3574933&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Harada, F. et al., 1987. Gene conversion-like events cause steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(22), pp.8091–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=299484&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 24, 2015].
- Helmberg, A. et al., 1992. R339H and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 6(8), pp.1318–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1406709> [Accessed September 22, 2015].
- Higashi, Y. et al., 1988. Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P-450(C21)] deficiency in humans: possible gene conversion products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(20), pp.7486–7490.
- Higashi, Y. et al., 1986. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(9), pp.2841–2845.
- Higashi, Y. et al., 1991. 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. *Journal of biochemistry*, 109(4), pp.638–644.
- Higashi, Y. & Fujii-Kuriyama, Y., 1991. Functional analysis of mutant P450(C21) genes in COS cell expression system. *Methods in enzymology*, 206, pp.166–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1784206> [Accessed September 22, 2015].
- Hsu, L.C. et al., 1996. The common I172N mutation causes conformational change of cytochrome P450c21 revealed by systematic mutation, kinetic, and structural studies. *The Journal of biological chemistry*, 271(6), pp.3306–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621735> [Accessed September 22, 2015].
- Hu, M.C. et al., 1996. Function and membrane topology of wild-type and mutated cytochrome P-450c21. *The Biochemical journal*, 316 (Pt 1, pp.325–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1217342&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 22, 2015].
- Hu, M.C. & Chung, B.C., 1990. Expression of human 21-hydroxylase (P450c21) in bacterial and mammalian cells: a system to characterize normal and mutant enzymes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 4(6), pp.893–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2233746> [Accessed September 22, 2015].
- Hughes, I. a, 2008. Disorders of sex development: a new definition and classification. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 22(1), pp.119–134.
- IUPAC, 2014. *Compendium of Chemical Terminology* 2nd ed., Oxford: Blackwell Scientific Publications. Available at: <http://goldbook.iupac.org>.
- Jääskeläinen, J. et al., 1997. Population-wide evaluation of disease manifestation in relation to molecular genotype in steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency: Good correlation in a well defined population. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(10), pp.3293–3297.
- van der Kamp, H.J. & Wit, J.M., 2004. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 151 Suppl , pp.U71–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15554889> [Accessed September 17, 2015].
- Katoh, K. & Standley, D., 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), pp.772–780. Available at:

<http://mbe.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/molbev/mst010>.

- Kawashima, Y. et al., 2015. A rare *CYP 21* mutation (p.E431K) induced deactivation of CYP 21A2 and resulted in congenital adrenal hyperplasia. *Endocrine Journal*, 62(1), pp.101–106. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25319875> [Accessed September 22, 2015].
- Kohn, B. et al., 1995. Splicing mutation in CYP21 associated with delayed presentation of salt-wasting congenital adrenal hyperplasia. *American journal of medical genetics*, 57(3), pp.450–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7677150> [Accessed September 22, 2015].
- Kominami, S. et al., 1980. Studies on the Steroid Hydroxylation System in Adrenal Cortex.
- Koppens, P.F. et al., 1992. Family studies of the steroid 21-hydroxylase and complement C4 genes define 11 haplotypes in classical congenital adrenal hyperplasia in The Netherlands. *European journal of pediatrics*, 151(12), pp.885–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1473541> [Accessed September 28, 2015].
- Krone, N. et al., 2005. Functional characterization of two novel point mutations in the CYP21 gene causing simple virilizing forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(1), pp.445–454.
- Krone, N. et al., 2000. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(3), pp.1059–1065.
- Krone, N. et al., 2006. Three novel point mutations of the CYP21 gene detected in classical forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 114(3), pp.111–117.
- Krone, N. & Arlt, W., 2009. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 23(2), pp.181–192. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2008.10.014>.
- Lajic, S. et al., 1997. A cluster of missense mutations at Arg356 of human steroid 21-hydroxylase may impair redox partner interaction. *Human Genetics*, 99(6), pp.704–709.
- Lajic, S. et al., 2001. CYP21 mutations in simple virilizing congenital adrenal hyperplasia. *Journal of Molecular Medicine*, 79(10), pp.581–586.

- Lajic, S. et al., 1999. Effects of missense mutations and deletions on membrane anchoring and enzyme function of human steroid 21-hydroxylase (P450c21). *Biochemical and biophysical research communications*, 257(2), pp.384–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10198222> [Accessed September 22, 2015].
- Lau, I. et al., 2001. H28+C insertion in the CYP21 gene: A novel frameshift mutation in a Brazilian patient with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(12), pp.5877–5880.
- Lee, H., 2001. CYP21 mutations and congenital adrenal hyperplasia. *Clinical genetics*, 59(5), pp.293–301. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359457> [Accessed September 25, 2015].
- Lee, P. et al., 2006. Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. *Pediatrics*, 118(2), pp.e488–e500.
- Levo, A. & Partanen, J., 1997. Mutation-haplotype analysis of steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency in Finland. Implications for the population history of defective alleles. *Human Genetics*, 99(4), pp.488–497.
- Luigi De Crecchio, 1865. Sopra un caso di apparenze virili in una donna. *Il Morgagni*, 7, pp.151–189.
- McInnes, R., Nussbaum, R. & Willard, H., 2008. *Thompson & Thompson Genética Médica* 7th ed., Elsevier.
- Miller, W.L., 1991. Congenital adrenal hyperplasias. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 20(4), pp.721–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1778175> [Accessed September 28, 2015].
- Mornet, E. et al., 1991. Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *American journal of human genetics*, 48(1), pp.79–88. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1682755&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 25, 2015].
- Mornet, E. & Gibrat, J.F., 2000. A 3D model of human P450c21: Study of the putative effects of steroid 21-hydroxylase gene mutations. *Human Genetics*, 106, pp.330–339.
- Nascimento, M.L. et al., 2014. Ten-year evaluation of a Neonatal Screening Program for congenital adrenal hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 58(7), pp.765–771.

- NCBI Resource Coordinators, 2015. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), pp.D6–D17. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gku1130>.
- Nikoshkov, A. et al., 1998. Naturally occurring mutants of human steroid 21-hydroxylase (P450c21) pinpoint residues important for enzyme activity and stability. *Journal of Biological Chemistry*, 273(11), pp.6163–6165.
- Nikoshkov, A. et al., 1997. Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(1), pp.194–199.
- Nilsson, L., Ingelman-Sundberg, A. & Wirsén, C., 1965. *A child is born : the drama of life before birth in unprecedented photographs : a practical guide for the expectant mother* 1st ed., New York: Delacorte Press.
- Nimkarn, S., Lin-Su, K. & New, M., 2011. Steroid 21 Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia. *Pediatric Clinics of North America*, 58(5), pp.1282–1300. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2011.07.012>.
- Nimkarn, S. & New, M.I., 2013. 21-Hydroxylase-Deficient Congenital Adrenal Hyperplasia. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1171/> [Accessed September 18, 2015].
- Nunez, B.S. et al., 1999. Functional analysis of four CYP21 mutations from spanish patients with congenital adrenal hyperplasia. *Biochemical and biophysical research communications*, 262(3), pp.635–637.
- Ohlsson, G. et al., 1999. Steroid 21-hydroxylase deficiency: Mutational spectrum in Denmark, three novel mutations, and in vitro expression analysis. *Human Mutation*, 13(6), pp.482–486.
- Oriola, J. et al., 2011. Association of p.His38Leu, a rare CYP21A2 mutation, with the classical simple virilizing phenotype of 21-hydroxylase deficiency in a 6-year-old boy. *Hormone Research in Paediatrics*, 76(3), pp.214–217.
- Pallan, P. et al., 2015. Human Cytochrome P450 21A2, the Major Steroid 21-Hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 290(21), pp.13128–13143. Available at: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M115.646307>.
- Pang, S. & Shook, M.K., 1997. Current status of neonatal screening for congenital adrenal

- hyperplasia. *Current opinion in pediatrics*, 9(4), pp.419–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9300201> [Accessed September 24, 2015].
- Paulino, L.C. et al., 1999. Mutation distribution and CYP21/C4 locus variability in Brazilian families with the classical form of the 21-hydroxylase deficiency. *Acta paediatrica*, 88(3), pp.275–283.
- Pezzuti, I.L. et al., 2014. A three-year follow-up of congenital adrenal hyperplasia newborn screening. *Jornal de Pediatria*, 90(3), pp.300–307. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2013.09.007>.
- Poulos, T.L., 1991. Modeling of mammalian P450s on basis of P450cam X-ray structure. *Methods in enzymology*, 206, pp.11–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1784202> [Accessed January 13, 2016].
- Rey, R. a & Grinspon, R.P., 2011. Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 25(2), pp.221–238. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.013>.
- Riepe, F.G. et al., 2008. Functional and structural consequences of a novel point mutation in the CYP21A2 gene causing congenital adrenal hyperplasia: Potential relevance of helix C for P450 oxidoreductase-21-hydroxylase interaction. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(7), pp.2891–2895.
- Robins, T. et al., 2006. Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20(January), pp.2946–2964.
- Robins, T. et al., 2005. Not all amino acid substitutions of the common cluster E6 mutation in CYP21 cause congenital adrenal hyperplasia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(4), pp.2148–2153.
- Rubtsov, P.M. et al., 2011. [Characterization of new splicing mutation in steroid 21-hydroxylase gene]. *Bioorganicheskaiia khimiia*, 37(6), pp.815–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22497080> [Accessed September 22, 2015].
- Rumsby, G. et al., 1986. Deletion of the steroid 21-hydroxylase and complement C4 genes in congenital adrenal hyperplasia. *Journal of medical genetics*, 23(3), pp.204–9. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1049628&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 24, 2015].

Sakashita, A. et al., 2015. Sex Specification and Heterogeneity of Primordial Germ Cells in Mice. *Plos One*, 10(12), p.e0144836. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0144836>.

Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory.

Santos, C. et al., 2010. Hiperplasia Adrenal Congênita. In A. Maciel-Guerra & G. Guerra-Junior, eds. *Menino ou Menina? Distúrbios da Diferenciação do Sexo*. Rio de Janeiro: Editora Rubio, p. 577.

Silveira, E.L. et al., 2008. 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 Goiás. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*, 21(5), pp.455–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18655527> [Accessed March 2, 2016].

Sinclair, A.H. et al., 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346(6281), pp.240–244. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1695712> [Accessed September 23, 2015].

Soardi, F. et al., 2008. Inhibition of CYP21A2 enzyme activity caused by novel missense mutations identified in brazilian and scandinavian patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(6), pp.2416–2420.

Speiser, P. et al., 2010. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95(9), pp.4133–4160.

Speiser, P. et al., 1992. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of clinical investigation*, 90(2), pp.584–95. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=443137&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 25, 2015].

Speiser, P. & New, M., 1985. Genetics of steroid 21-hydroxylase deficiency. , (October),

pp.275–78.

- Speiser, P. & White, P., 2003. Congenital Adrenal Hyperplasia. *The new england journal of medicine*, 349, pp.776–88. Available at:
<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra021561>.
- Speiser, P.W. et al., 2010. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95(9), pp.4133–60. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2936060&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 3, 2015].
- Speiser, P.W. et al., 1985. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *American journal of human genetics*, 37(4), pp.650–667.
- Strachan, T.O.M., 1991. CYP21B-C4B and CYP21A-C4A units unequal pairing between homologous chromosomes (and between sister chromatids) is facilitated in this region [7 , 8]. If the homologous chromosome undergo unequal pairing at meiosis then the probability of production. *New York*, 40(4), pp.537–543.
- Tardy, V. et al., 2010. Phenotype-genotype correlations of 13 rare CYP21A2 mutations detected in 46 patients affected with 21-hydroxylase deficiency and in one carrier. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95(3), pp.1288–300. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080860>.
- Therrell, B.L., 2001. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 30(1), pp.15–30. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11344933> [Accessed August 24, 2015].
- Torres, N. et al., 2003. Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the CYP21A1P to the CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(10), pp.1311–1318.
- Trakakis, E., Loghis, C. & Kassanos, D., 2009. Congenital adrenal hyperplasia because of 21-hydroxylase deficiency. A genetic disorder of interest to obstetricians and gynecologists. *Obstetrical & gynecological survey*, 64(3), pp.177–89. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228439> [Accessed September 24, 2015].
- Tusie-Luna, M.T. et al., 1991. A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Molecular endocrinology*

- (*Baltimore, Md.*), 5(5), pp.685–92. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2072928> [Accessed September 22, 2015].
- Tusie-Luna, M.T., Traktman, P. & White, P.C., 1990. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *The Journal of biological chemistry*, 265(34), pp.20916–22. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2249999> [Accessed September 22, 2015].
- Urabe, K. et al., 1990. Gene conversion in steroid 21-hydroxylase genes. *American journal of human genetics*, 46(6), pp.1178–86. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1683832&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 24, 2015].
- Wedell, A., 2011a. Congenital adrenal hyperplasia. *Clinical Biochemistry*, 44(7), pp.505–506. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.02.026>.
- Wedell, A., 2011b. Molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine development*, 20, pp.80–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21164261> [Accessed September 18, 2015].
- Wedell, A., Stengler, B. & Luthman, H., 1994. Characterization of mutations on the rare duplicated C4/CYP21 haplotype in steroid 21-hydroxylase deficiency. *Human Genetics*, 94(1), pp.50–54.
- Werkmeister, J.W. et al., 1986. Frequent deletion and duplication of the steroid 21-hydroxylase genes. *American journal of human genetics*, 39(4), pp.461–469.
- White, P. et al., 1985. Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(4), pp.1089–1093.
- White, P., New, M. & Dupont, B., 1986. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(14), pp.5111–5. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=323900&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 24, 2015].
- White, P. & Speiser, P., 2000. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine Reviews*, 21(3), pp.245–291.
- White, P.C., 2009. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Nature reviews*.

Endocrinology, 5(9), pp.490–498. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2009.148>.

- White, P.C., New, M.I. & Dupont, B., 1984. HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(23), pp.7505–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=392175&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 17, 2015].
- Williams, P.A. et al., 2000. Microsomal cytochrome P450 2C5: comparison to microbial P450s and unique features. *Journal of inorganic biochemistry*, 81(3), pp.183–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11051563> [Accessed January 13, 2016].
- Wilson, C. et al., 2007. Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 90(4), pp.414–421. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1885892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 1, 2015].
- Wilson, R.C. et al., 1995. Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 80(5), pp.1635–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7745011> [Accessed January 14, 2016].
- Wilson, Foster, Kronenberg, L., 1998. *Williams textbook of Endocrinology* 9th ed., Saunders.
- Wu, D.A. & Chung, B.C., 1991. Mutations of P450c21 (steroid 21-hydroxylase) at Cys428, Val281, and Ser268 result in complete, partial, or no loss of enzymatic activity, respectively. *The Journal of clinical investigation*, 88(2), pp.519–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=295377&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 22, 2015].
- Wu, D.A., Hu, M.C. & Chung, B.C., 1991. Expression and functional study of wild-type and mutant human cytochrome P450c21 in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA and cell biology*, 10(3), pp.201–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1707279> [Accessed September 22, 2015].
- Zhao, B. et al., 2012. Three-dimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome

P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13), pp.10613–10622.

7) ANEXOS

7.1) Anexo 1 – Demais artigos publicados no período.

- **A *de novo* mutation in *CYP21A2* gene in a case of in vitro fertilization.**

Roseane Lopes da Silva-Grecco*, **Débora de Paula Michelatto***, Carolina Rodrigues Lincoln-de-Carvalho, Pamela Pontes Henrique, Heloísa Marcelina da Cunha, Maricilda Palandi-de-Mello.

*Contributed equally, shared first authorship.

Molecular Genetics and Metabolism Reports 5 (2015) 98-102.

- **Prevalence of genital abnormalities in neonates**

Isabella L. Monlleó, Susane V. Zanotti, Bárbara Priscila B. de Araújo, Erisvaldo F. Cavalcante Júnior, Paula D. Pereira, Paulo M. de Barros, Maria Deysiane P. Araújo, Ana Thaysa V. S. de Mendonça, Catarina R. S. Santos, Ylana R. dos Santos, **Débora de Paula Michelatto**, Maricilda P. de Mello, Andrea T. Maciel-Guerra, Gil Guerra-Júnior.

Jornal de Pediatria (Rio J) 2012;88(6):489-95, pela Sociedade Brasileira de Pediatria.

7.2) Anexo 2: Declaração de Biossegurança



Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
12 de janeiro de 2016.

CIBio: 06/2015

Identificação:

Doutorado: Débora de Paula Michelatto, CPG-GBM UNICAMP

Projeto: ANÁLISE FUNCIONAL DE NOVAS VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS NO GENE *CYP21A2* IDENTIFICADAS EM PACIENTES COM HIPERPLASIA DA ADRENAL CONGÊNITA.

Novo título: IMPORTÂNCIA FUNCIONAL DE NOVAS VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS NO GENE *CYP21A2*.

Parecer:

Projeto aprovado pela CIBio/CBMEG sob número 10/2003

Coordenador: Profa. Dra. Maricilda Palandí de Mello

Observação: Apenas o título foi alterado, não influenciando na execução do projeto.


Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato
Presidente da CIBio/CBMEG - UNICAMP

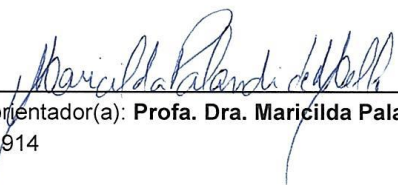
7.3) Declaração – Direitos autorais

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Importância funcional de novas variações nucleotídicas no gene CYP21A2**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 11 de janeiro de 2016

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Débora de Paula Michelatto**
RG n.º 43.713.791-0

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello**
RG n.º 6.703.914