



Novità nella diagnosi genetica di iperplasia surrenale congenita da deficit di 21-idrossilasi

Soara Menabò¹

Accettato: 3 agosto 2020 / Pubblicato online: 22 aprile 2021
© The Author(s) 2021

Sommario La ricerca di varianti patogenetiche del gene *CYP21A2*, responsabili del 90–95% dei casi di iperplasia surrenale congenita, è resa altamente complessa dall'omologia di sequenza con lo pseudogene, dall'elevata frequenza di ricombinazione del locus e dal numero variabile di moduli ripetuti. Tuttavia, grazie alle recenti conoscenze e alle nuove metodiche si sono raggiunti ottimi livelli diagnostici importanti per una corretta diagnosi e una consulenza genetica affidabile, nonché per individuare patologie associate.

Parole chiave Iperplasia surrenale congenita · Deficit di 21-idrossilasi · Gene *CYP21A2*

Introduzione

L'iperplasia surrenale congenita (*Congenital Adrenal Hyperplasia*, CAH) costituisce un gruppo di patologie autosomiche recessive causate da difetti di uno dei 7 enzimi o fattori coinvolti nella biosintesi del cortisolo: 21-idrossilasi (21-OH), 11 β -idrossilasi (11 β -OH), 3 β -idrossisteroideidrogenasi (3 β -HSD), 17 α -idrossilasi;17-20 liasi (17 α -OH;17-20 liasi), P450 ossidoreduttasi (POR), proteina regolatrice acuta steroidea (StAR) e colesterolo desmolasi (P450-SCC) [1]. In base al tipo e alla gravità del difetto il

paziente può manifestare diverse alterazioni nella produzione di mineralcorticoidi, glucocorticoidi e ormoni sessuali sia a livello surrenalico che gonadico.

Il deficit di 21-idrossilasi (21-OHD, MIM 201910) è causa del 90–95% dei casi di CAH ed è la principale causa dei difetti del differenziamento sessuale con cariotipo 46,XX (46,XX DSD).

In base al grado di attività enzimatica residua, il 21-OHD viene convenzionalmente suddiviso in tre fenotipi clinici:

- forma con perdita di sali (*Salt-Wasting*, SW) con attività enzimatica residua inferiore all'1%;
- forma virilizzante semplice (*Simple Virilizing*, SV) con attività enzimatica residua dell'1–2%;
- forma non classica (*Non Classical*, NC) con attività enzimatica residua tra il 20 e il 50%.

I primi due vengono definiti forma classica (CL) e hanno un'incidenza variabile tra 1:9.800 e 1:16.000 in base all'etnia e alla posizione geografica. La prevalenza dei portatori nella maggior parte delle popolazioni è di 1:50–1:60.

La forma non classica ha un'incidenza molto più alta stimata attorno a 1:1.000 nella popolazione caucasica, con una frequenza di portatori eterozigoti di 1:10 [1]. Quest'ultima forma, quindi, superando i 5 casi ogni 10.000 persone non rientra di fatto nella definizione di malattia rara.

L'enzima 21-OH, nella zona glomerulosa del surrene, converte il progesterone in deossicorticosterone (DOC), mentre nella zona fascicolata converte il 17-idrossiprogesterone (17-OHP) in 11-deossicortisolo (11-DF). Nelle forme severe di 21-OHD si ha pertanto una diminuita produzione sia di glucocorticoidi che di mineralcorticoidi con conseguente incremento dei livelli di ACTH, per feedback negativo del cortisolo, che continua a stimolare la corteccia surrenalica con conseguente iperplasia. L'eccesso di 17-OHP, che rappresenta il marker biochimico della patolo-

Proposto da Carla Scaroni.

Informazioni Supplementari La versione online contiene materiale supplementare disponibile su
<https://doi.org/10.1007/s40619-021-00838-z>.

✉ S. Menabò
soara.menabo@unibo.it

¹ U. O. Genetica Medica, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna, Italia

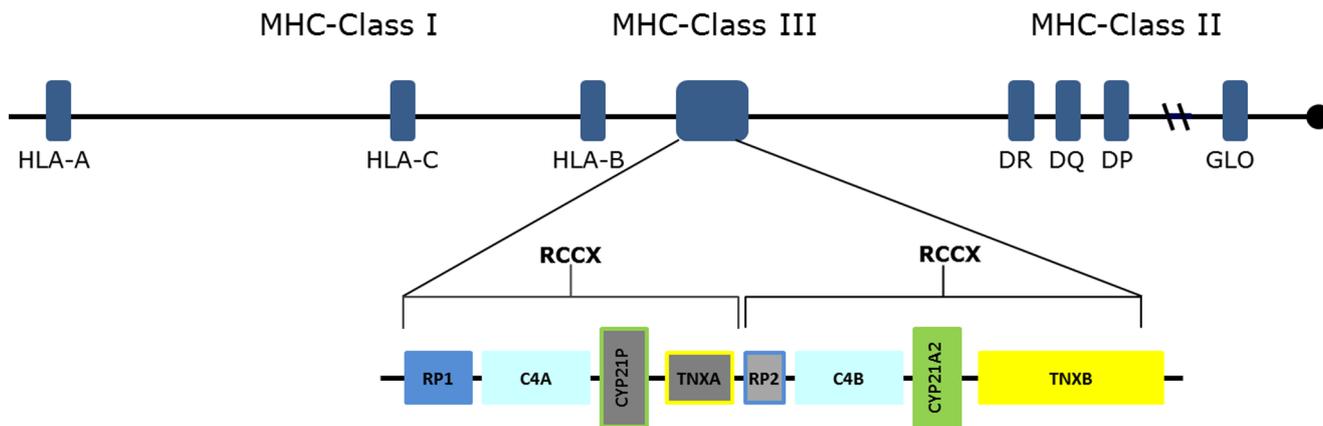


Fig. 1 Rappresentazione grafica della localizzazione del gene *CYP21A2* (*verde*) nella regione del grande complesso di istocompatibilità (MHC) di classe III sul cromosoma 6. In Figura sono descritti due moduli RCCX che costituiscono l'assetto bimodulare più frequente nella popolazione. Ogni modulo RCCX è costituito da 4 geni

attivi o inattivi: *RP* (*RP1* serina/trenina kinasi o *RP2* copia troncata inattiva), *C4* (*C4A* o *C4B* che codificano il componente 4 del complemento), *CYP21* (*CYP21A2*, codificante la 21-OH o *CYP21P* pseudogene) e *TNX* (*TNXB* che codifica la tenascina X, proteina della matrice extracellulare, o *TNXA* copia troncata inattiva)

gia, viene convertito in androgeni quali testosterone (T) e diidrotestosterone (DHT) [1].

In particolare, la virilizzazione prenatale è dovuta alla conversione del 17-OHP in DHT da parte della via alternativa della steroidogenesi (*backdoor pathway*) senza il passaggio attraverso gli intermedi deidroepiandrosterone (DHEA), $\Delta 4$ -androstenedione ($\Delta 4$ -A) e T [2, 3].

Dal punto di vista biochimico, il deficit determina una bassa concentrazione plasmatica di cortisolo e, talvolta, di aldosterone ed elevati livelli di 17-OHP, $\Delta 4$ -A e 21-deossicortisolo (21-DF), uno steroide collaterale presente in quantità insignificanti nella normale steroidogenesi [4].

I livelli di 17-OHP correlano direttamente con la severità del 21-OHD; la maggior parte di pazienti con forma classica mostra livelli basali sopra i 10.000 ng/dL, mentre le forme non classiche hanno livelli basali sopra i 200 ng/dL e livelli post-stimolo > 1000 ng/dL [5].

Lo screening neonatale è in grado di individuare la quasi totalità delle forme classiche e il 30% delle forme non classiche [6].

Il dosaggio di un profilo di steroidi più ampio mediante spettrometria di massa (GC-MS) o cromatografia liquida accoppiata con spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) permette di dosare i singoli steroidi in modo più preciso rispetto al test immunologico e consente di discriminare le forme non classiche con buona sensibilità e specificità senza ricorrere al test da stimolo [7]; inoltre, permette di individuare anche le forme più rare di CAH.

Il gene *CYP21A2*

La reazione di 21-idrossilazione è mediata dal citocromo P450c21 codificato dal gene *CYP21A2*.

Il gene *CYP21A2*, composto da 10 esoni e lungo 3,4 Kb, si trova nella regione cromosomica del grande complesso di istocompatibilità (MHC) di classe III in posizione 6p21.3 [8]. Il gene è in tandem con il suo pseudogene *CYP21P*, con il quale condivide un'omologia di sequenza del 98%, e si trovano all'interno di un modulo di circa 30 Kb denominato RCCX dalle iniziali dei 4 geni che lo compongono: RP (*RP1* serina/trenina kinasi o *RP2* copia troncata inattiva), C4 (*C4A* o *C4B* che codificano il componente 4 del complemento), *CYP21* (*CYP21A2*, codificante la 21-OH o *CYP21P* pseudogene inattivo) e *TNX* (*TNXB* che codifica la tenascina X, proteina della matrice extracellulare, o *TNXA* copia troncata inattiva) (Fig. 1). Tale modulo RCCX viene ripetuto come un'unità genetica discreta [8] e ogni cromosoma può contenere un numero variabile di moduli. Nella popolazione caucasica sono stati identificati cromosomi monomodulari, bimodulari e trimodulari; il bimodulare è il più frequente (circa 70%) ed è costituito da un modulo con lo pseudogene *CYP21P* e l'altro con il gene *CYP21A2*. Nel 17% degli aploטיפi si osserva un assetto monomodulare, mentre l'organizzazione trimodulare, che rappresenta circa il 14% dei cromosomi, nella maggior parte dei casi è costituita da 2 copie dello pseudogene *CYP21P* e una del gene *CYP21A2* [9]. Tuttavia, cromosomi trimodulari con 2 copie del gene *CYP21A2* e una copia dello pseudogene *CYP21P* sono stati descritti e possono complicare notevolmente la diagnosi molecolare [10].

Varianti patogenetiche e diagnosi genetica

L'alto grado di omologia tra gene e pseudogene, la ripetizione dei moduli e l'alto tasso di ricombinazione di questa particolare regione del genoma sono causa sia di eventi di

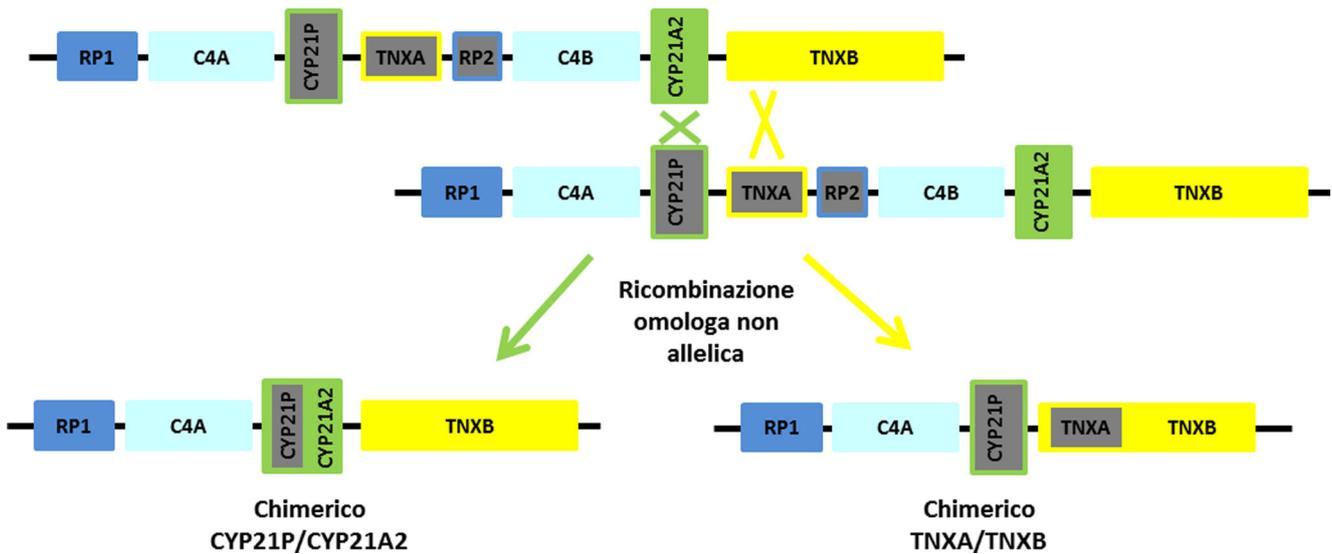


Fig. 2 Meccanismo di formazione delle chimere CYP21P/CYP21A2 e TNXA/TNXB a seguito di ricombinazione per allineamento errato tra i moduli a causa dell'elevata omologia di sequenza. La chimera CYP21A1P/CYP21A2 è quasi sempre associata a CAH-SW. La chi-

mera TNXA/TNXB è associata alla sindrome CAH-X, condizione caratterizzata dalla combinazione di CAH e sindrome di Ehlers-Danlos (EDS) di tipo ipermobile

ricombinazione omologa non allelica (NAHR), che portano a delezione o duplicazione genica, sia di eventi di conversione genica durante la meiosi, che portano al trasferimento di mutazioni deleterie dallo pseudogene al gene attivo (microconversione).

Tra le alterazioni che si ritrovano nei pazienti, le microconversioni rappresentano il 70–75% e le delezioni il 20–25% circa.

Le mutazioni ricorrenti da microconversione, che storicamente vengono ricercate con i test di screening genetici, sono dieci [11] e sono riportate in Tabella 1; sono distribuite lungo tutto il gene anche se solo quelle fino al settimo esone sono solitamente riscontrabili nello pseudogene.

La nomenclatura delle varianti è cambiata nel corso degli anni; in Tabella 1 è riportata la corrispondenza tra la nomenclatura precedente o triviale delle varianti ricorrenti e la nomenclatura attuale. Il cambio del numero degli aminoacidi è dovuto all'uso della sequenza di riferimento più comune che contiene 5 leucine nel primo esone invece di 4 (come era nella prima sequenza pubblicata [12]).

Il fenotipo è determinato dal grado di attività enzimatica residua che dipende dall'allele con mutazioni meno severe. La correlazione genotipo-fenotipo è solitamente molto buona con alcune eccezioni ben note: la variante c.293-13C>G causa solitamente la forma SW ma in alcuni casi si manifesta con fenotipo più lieve SV; la variante p.Ile173Asn è comunemente associata a forma SV ma in alcuni casi determina un fenotipo più grave SW [13]; la variante p.Pro31Leu causa generalmente forma NC ma se all'interno di una microconversione che include anche il promotore è associata a forma SV [14].

Tra le mutazioni associate a forma NC, la p.Val282Leu è la più frequente in tutte le popolazioni [11].

Oltre alle dieci mutazioni ricorrenti, fino ad oggi sono state riportate altre 300 mutazioni rare non di origine pseudogenica. Varianti patogenetiche sono state identificate sia nelle regioni codificanti che non codificanti del gene (promotore, introni e 3'UTR) [15].

Nella nostra casistica di oltre 3000 alleli tali mutazioni rare o uniche sono presenti nel 7% dei casi. La maggior parte dei pazienti è eterozigote composto, cioè presenta mutazioni diverse sui due alleli. Nelle forme classiche entrambi gli alleli avranno una variante grave (associata a forma classica), mentre per le NC un allele avrà una variante lieve (associata a forma NC) mentre il secondo potrà avere una variante lieve oppure grave.

Il riscontro di più di una mutazione (ricorrente/rara o unica), sullo stesso allele è abbastanza frequente (6% nella nostra casistica); pertanto, la ricerca delle sole mutazioni ricorrenti potrebbe non essere esaustiva per la correlazione con il fenotipo o inaffidabile nel caso di diagnosi pre-concezionale o prenatale. Inoltre, se più mutazioni sono presenti sullo stesso allele, è necessario investigare il numero di copie geniche presenti sullo stesso per stabilire la distribuzione delle mutazioni (stesso gene o più geni).

Le larghe conversioni e delezioni risultano solitamente nella formazione di un gene chimerico non funzionante CYP21P/CYP21A2 (Fig. 2). In base al diverso punto di rottura (*breakpoint*) si originano diversi tipi di chimera: sono tutte associate a completa perdita di funzione, eccetto quelle che, partendo dal promotore, si estendono solo al primo esone (è il caso descritto prima per la variante p.Pro31Leu).

Tabella 1 Descrizione delle 10 varianti patogenetiche ricorrenti: localizzazione nel gene, nomenclatura precedente o triviale, nomenclatura attuale e fenotipo associato. Il cambio di nomenclatura è dovuto non solo all'adeguamento alle norme della Human Genome Variation Society (HGVS) ma anche all'utilizzo di una sequenza di riferimento diversa rispetto alla prima pubblicata nel 1986 [12]. La sequenza di riferimento attuale (NM_000500), conteggia 5 leucine (da Leu6 a Leu10)

Localizzazione	Nomenclatura precedente / triviale	Nomenclatura corrente (HGVS-RefSeq NM_000500.9)	Fenotipo
Esone 1	p.P30L	p.Pro31Leu	NC*
Introne 2	g.655 A/C>G, IVS2-13A/C>G / I2 Splice	c.293-13C>G	SW ^s
Esone 3	p.G110fs / del 8 bp E3, Δ8	c.332_339delGAGACTAC (p.Gly111Valfs)	SW
Esone 4	p.I172N	p.Ile173Asn	SV [#]
Esone 6	p. [I236N, V237F, M239K] / Cluster E6	p.[Ile237Asn, Val238Gln, Met240Lys]	SW
Esone 7	p.V281L	p.Val282Leu	NC
Esone 7	p.L307fs / InsT E7	c.923dupT (p.Leu308Phefs)	SW
Esone 8	p.Q318X	p.Gln319Ter	SW
Esone 8	p.R356W	p.Arg357Trp	SW
Esone 10	p.P453S	p.Pro454Ser	NC

invece di 4 (da Leu6 a Leu9) pertanto la numerazione dei successivi aminoacidi è aumentata di uno. * generalmente associata a forma NC ma se all'interno di una micro-conversione che include anche il promotore è associata a forma SV [14]; ^s causa solitamente forma SW ma in alcuni soggetti si manifesta con fenotipo più lieve SV [13]; [#] comunemente associata a forma SV ma in alcuni casi determina un fenotipo più grave SW [13]

La metodica ad oggi più utilizzata per l'identificazione di queste delezioni è la *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) che utilizza sonde specifiche per determinare il numero di copie del gene *CYP21A2*, dello pseudogene e del gene *TNXB* mediante un kit commerciale (P050-MLPA kit, MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).

Circa il 10% dei pazienti con forma severa SW hanno la delezione in omozigosi che si estende anche al gene *TNXB* (Fig. 2) (con formazione del gene chimerico *TNXA/TNXB*) risultando in una sindrome da geni contigui che consiste in CAH e nella forma severa recessiva della sindrome di Ehlers-Danlos (EDS). I genitori eterozigoti sono per lo più asintomatici o manifestano una forma lieve di EDS, detta di tipo ipermobile, caratterizzata da articolazioni ipermobili, dolorose e soggette a frequenti dislocazioni. Tra gli eterozigoti per questa delezione contigua, è stato osservato che i soggetti affetti da CAH (quindi con l'altro allele con mutazione diversa da delezione contigua) manifestano un fenotipo EDS più severo rispetto agli eterozigoti non affetti da

CAH (quindi con l'altro allele normale, come i genitori ad esempio). Si usa il termine CAH-X per definire quei pazienti CAH che presentano fenotipo EDS dovuto alla presenza monoallelica della delezione contigua. Ad oggi sono noti tre tipi di chimerico *TNXA/TNXB* responsabili di questa sindrome: CH-1, CH-2 e CH-3 [16]; solo il primo è identificabile con l'attuale kit MLPA in commercio.

Tramite MLPA è possibile identificare anche le duplicazioni del gene *CYP21A2* che possono complicare molto la diagnosi genetica [10]:

- più mutazioni in cis (stesso allele) possono essere distribuite su geni diversi e quindi determinare un'attività enzimatica residua diversa;
- una duplicazione può mascherare la presenza di una delezione di identiche dimensioni sull'altro allele;
- una duplicazione in cis con una variante patogenetica annulla l'effetto di quest'ultima se la seconda copia del gene è normale; è il caso ricorrente della variante p.Gln319Ter.

Una frazione significativa dei cromosomi con mutazione p.Gln319Ter, presenta anche una seconda copia normale del

gene che ne garantisce una normale attività enzimatica [17]. In questi casi, un approccio diagnostico basato solo su PCR e sequenziamento del gene fallirebbe nell'individuare la seconda copia normale del gene e porterebbe a diagnosticare erroneamente questo allele come patologico, quando invece manifesta una normale attività enzimatica. Questo allele presenta, inoltre, un particolare aplotipo utile a sospettare la presenza di duplicazione [18].

Ad oggi il *gold standard* per la diagnosi molecolare di 21-OHD è il sequenziamento dell'intero gene seguito dall'analisi di segregazione nei genitori e dalla valutazione del numero di copie mediante MLPA [19].

Diagnosi pre-concezionale e prenatale

La genotipizzazione del gene *CYP21A2* è fortemente raccomandata soprattutto nelle coppie che intendono programmare una gravidanza sia per confermare la diagnosi nell'affetto sia per valutare correttamente il rischio in corso di consulenza genetica.

Anche se la correlazione genotipo-fenotipo è buona, come detto prima, l'interpretazione del genotipo può essere complicata. Questo è vero anche per i partner non affetti, quindi normali o potenziali portatori, in cui le duplicazioni e i riarrangiamenti complessi sono ancora più frequenti. Per questo è importante che i pazienti in età riproduttiva ricevano le informazioni corrette per poter intraprendere un percorso di consulenza genetica con il dovuto anticipo rispetto alla gravidanza.

Solitamente l'indagine pre-concezionale è rivolta alle coppie a rischio di avere un figlio con forma classica, quindi a tutti coloro che sono portatori di un allele severo.

Il trattamento prenatale con desametasone (dexa) per prevenire la virilizzazione nei feti femmina è tuttora considerata una procedura sperimentale da eseguire solo all'interno di protocolli di ricerca approvati. Si raccomanda, inoltre, la determinazione precoce del sesso fetale per evitare il trattamento inutile dei feti maschi [5]. Tramite diagnosi non invasiva (NIPD) da cellule libere fetali nel sangue materno è possibile sia determinare il sesso in una fase precoce della gravidanza [20] sia genotipizzare il gene *CYP21A2* [21, 22]. Quest'ultima procedura però è complessa, con tempistiche ben definite e la necessità di personale dedicato, perciò ancora non utilizzata nel percorso diagnostico standard. La diagnosi prenatale standard si esegue invece da prelievo di villi coriali o amniocentesi, quindi in epoca gestazionale più avanzata, utile eventualmente per l'interruzione della terapia intrapresa. Permanendo le stesse difficoltà diagnostiche citate prima, l'analisi prenatale si potrà eseguire con maggiore sicurezza e velocità se i genitori sono stati correttamente genotipizzati in precedenza.

Conclusioni

L'iperplasia surrenale congenita da deficit di 21-idrossilasi rappresenta una patologia importante sia per il grave impatto clinico delle forme classiche sia per l'elevata prevalenza delle forme non classiche. La complessità genetica di questa patologia è nota da moltissimi anni ed è presa ad esempio dalla maggior parte dei manuali di genetica umana.

L'evoluzione delle conoscenze sul locus del gene *CYP21A2* e le nuove metodiche disponibili hanno permesso di migliorare notevolmente la diagnostica molecolare tramite *step* fondamentali quali il sequenziamento dell'intero gene, la verifica della segregazione delle varianti e la valutazione del numero di copie geniche. Un corretto genotipo correla solitamente molto bene con il fenotipo clinico e biochimico del paziente, per questo la collaborazione tra clinica e laboratorio sono fondamentali per far emergere possibili errori dovuti a riarrangiamenti complessi o al mancato riconoscimento di forme rare di CAH.

Le duplicazioni geniche, causa principale di errore diagnostico, sono maggiormente frequenti nei soggetti non affetti, rendendo l'indagine molecolare più rischiosa, lunga e costosa; per questo è importante che la diagnosi sia prima confermata mediante il dosaggio del 17-OHP basale e/o dopo stimolo (a seconda dei casi).

Nell'inquadramento del paziente è importante anche valutare segni di iper-lasità dei legamenti. L'analisi genetica ha fatto emergere infatti, in una piccola percentuale di pazienti, la presenza di una sindrome da geni contigui che si manifesta con la contemporanea presenza di fenotipo da 21-OHD e forma ipermobile di EDS (pazienti con SW possono invece manifestare la forma completa e grave di EDS).

Una diagnosi genetica precisa e affidabile è importante soprattutto per i giovani adulti in epoca pre-concezionale per una valutazione corretta del rischio riproduttivo e delle eventuali possibilità diagnostiche e terapeutiche da intraprendere.

Ringraziamenti Soara Meanbò ringrazia la Dottoressa Lilia Baldazzi per la revisione critica della rassegna.

Funding Note Open access funding provided by Alma Mater Studiorum - Università di Bologna within the CRUI-CARE Agreement.

Conflitto di interesse L'autrice Soara Menabò dichiara di non avere conflitti di interesse.

Consenso informato Lo studio presentato in questo articolo non ha richiesto sperimentazione umana.

Studi sugli animali L'autrice di questo articolo non ha eseguito studi sugli animali.

Nota della casa editrice Springer Nature rimane neutrale in riguardo alle rivendicazioni giurisdizionali nelle mappe pubblicate e nelle affiliazioni istituzionali.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Bibliografia

1. Baranowski ES, Arlt W, Idkowiak J (2018) Monogenic disorders of adrenal steroidogenesis. *Horm Res Paediatr* 89:292–310
2. O'Shaughnessy PJ, Antignac JP, Le Bizec B et al (2019) Alternative (backdoor) androgen production and masculinization in the human fetus. *PLoS Biol* 17(2):e3000002
3. Kamrath C, Hochberg Z, Hartmann MF et al (2012) Increased activation of the alternative “backdoor” pathway in patients with 21-hydroxylase deficiency: evidence from urinary steroid hormone analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E367–E375
4. Costa-Barbosa FA, Tonetto-Fernandes VF, Carvalho VM et al (2010) Discriminating value of ACTH-stimulated serum 21-deoxycortisol in identifying heterozygote carriers for 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol* 73(6):700–706
5. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ et al (2018) Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 103:4043–4088
6. White PC (2009) Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Nat Rev Endocrinol* 5(9):490–498
7. Turcu AF, El-Maouche D, Zhao L et al (2020) Androgen excess and diagnostic steroid biomarkers for nonclassic 21-hydroxylase deficiency without cosyntropin stimulation. *Eur J Endocrinol* 183:63–71
8. Yang Z, Mendoza AR, Welch TR et al (1999) Modular variations of the human major histocompatibility complex class III genes for serine/threonine kinase RP, complement component C4, steroid 21-hydroxylase CYP21, and tenascin TNX (the RCCX module). A mechanism for gene deletions and disease associations. *J Biol Chem* 274(17):12147–12156
9. Blanchong CA, Zhou B, Rupert KL et al (2000) Deficiencies of human complement component C4A and C4B and heterozygosity in length variants of RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules in Caucasians. The load of RCCX genetic diversity on major histocompatibility complex-associated disease. *J Exp Med* 191(12):2183–2196
10. Koppens PF, Hoogenboezem T, Degenhart HJ (2002) Duplication of the CYP21A2 gene complicates mutation analysis of steroid 21-hydroxylase deficiency: characteristics of three unusual haplotypes. *Hum Genet* 111:405–410
11. Hannah-Shmouni F, Chen W, Merke DP (2017) Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin N Am* 46(2):435–458
12. White PC, New MI, Dupont B (1986) Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(14):5111–5115
13. Parsa AA, New MI (2017) Steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 165(Pt A):2–11
14. Araujo RS, Billerbeck AE, Madureira G et al (2005) Substitutions in the CYP21A2 promoter explain the simple-virilizing form of 21-hydroxylase deficiency in patients harbouring a P30L mutation. *Clin Endocrinol* 62(2):132–136
15. Simonetti L, Bruque CD, Fernández CS et al (2018) CYP21A2 mutation update: comprehensive analysis of databases and published genetic variants. *Human Mutat* 39:5–22
16. Miller WL, Merke DP (2018) Tenascin-X, congenital adrenal hyperplasia, and the CAH-X syndrome. *Horm Res Paediatr* 89:352–361
17. Parajes S, Quinteiro C, Domínguez F et al (2008) High frequency of copy number variations and sequence variants at CYP21A2 locus: implication for the genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. *PLoS ONE* 3(5):e2138
18. Doleschall M, Luczay A, Koncz K et al (2017) A unique haplotype of RCCX copy number variation: from the clinics of congenital adrenal hyperplasia to evolutionary genetics. *Eur J Hum Genet* 25(6):702–710
19. Pignatelli D, Carvalho BL, Palmeiro A et al (2019) The complexities in genotyping of congenital adrenal hyperplasia: 21-hydroxylase deficiency. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10:432
20. Zargari M, Sadeghi MR, Shahhosseiny MH et al (2011) Fetal sex determination using non-invasive method of cell-free fetal DNA in maternal plasma of pregnant women during 6(th)–10(th) weeks of gestation. *Avicenna J Med Biotechnol* 3:201–206
21. New MI, Tong YK, Yuen T et al (2014) Noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 99:E1022–E1030
22. Ma D, Yuan Y, Luo C et al (2017) Noninvasive prenatal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency using target capture sequencing of maternal plasma DNA. *Sci Rep* 7:7427