



## **Pesquisa de Variantes no Gene *PAPSS2* em pacientes com Hiperandrogenismo Idiopático**

Laiz Luiza Miranda; Lorrutama Evelyn Gonçalves Oliveira; Taís Nitsch Mazzola; Gil Guerra-Júnior; Sofia Helena Valente de Lemos Marini, Maricilda Palandi de Mello; Mara Sanches Guaragna (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas)

### ***RESUMO***

Hiperandrogenismo é uma das condições endócrinas mais comuns em mulheres em idade reprodutiva, afetando aproximadamente 7% desta população <sup>1,2</sup>. Define-se hiperandrogenismo como o conjunto de sinais clínicos e sintomas que resultam de um nível elevado de andrógenos ou é decorrente de um aumento de sensibilidade a estes hormônios nos órgãos em que atuam <sup>3</sup>.

O hiperandrogenismo pode ter diversas etiologias, desde um quadro funcional de desequilíbrio hormonal nos ovários e adrenais (síndrome do ovário policístico e hiperplasia adrenal congênita - forma não clássica) até o câncer de ovários ou adrenais <sup>1,3</sup>. Entretanto, alguns pacientes apresentam sinais clínicos de hiperandrogenismo, (clitoromegalia, pubarca precoce, hirsutismo) mas ausência das alterações bioquímicas sendo então classificados como portadores de hiperandrogenismo idiopático (HI).

O HI é a segunda desordem dos andrógenos mais comum em mulheres, ficando atrás somente para a síndrome do ovário policístico. Desta forma, após fazer o diagnóstico diferencial para ovário policístico, além de outras condições menos frequentes tais como deficiências enzimáticas adrenais não-clássicas, ou ainda tumores adrenais secretores de andrógenos, o diagnóstico é de HI.

Em um estudo realizado com 168 mulheres turcas com hirsutismo <sup>2</sup>, observaram que 17,4% dos pacientes tinham hiperandrogenismo idiopático. No HI, a fonte dos andrógenos em excesso geralmente é mista, podendo ser tanto adrenal quanto gonadal. Neste estudo a ênfase foi para a fonte adrenal.

DHEA é um esteróide C-19 produzido pela conversão de 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona pela ação da enzima CYP-17,20-lias <sup>4</sup>. A conversão de DHEA em DHEAS ocorre pela ação da enzima SULT2A1, que é, por sua vez, secretado na circulação <sup>5</sup>. Para sua atividade catalítica, SULT2A1 requer a ação da 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS), que serve como composto doador universal de sulfonato para todas as reações sulfotransferase <sup>6</sup>.

Em organismos superiores, todas as reações de sulfonação são mediadas pelo doador universal de sulfato 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) <sup>7</sup>. A síntese de PAPS ocorre no citosol, e estudos recentes demonstraram que PAPSS1 pode ocorrer também no núcleo. Mutações inativando a ação de PAPSS2 já foram associadas com vários distúrbios do desenvolvimento esquelético, como displasia espondilometafisiária em humanos e braquimorfismo em camundongos <sup>6,8</sup>.

A síntese de PAPS é mediada pela enzima bifuncional PAPS sintase (PAPSS). Primeiramente, a ATP sulfúrilase combina com ATP e sulfato inorgânico para formar APS. O próximo passo é catalisado pela APS quinase, que adiciona um ATP à APS para formar PAPS <sup>9,10</sup>. Subsequentemente, as sulfotransferases (SULT) transferem sulfato, doados pela PAPS, para um substrato aceptor, no caso DHEA <sup>11</sup>.

Em tecidos humanos e de camundongos, dois genes diferentes, *PAPSS1* (OMIM \*603202) e *PAPSS2* (OMIM \*603005) foram identificados <sup>7,12,6</sup>. O gene *PAPSS1* é expresso de maneira ubíqua enquanto o gene *PAPSS2* codifica uma isoforma expressa principalmente nas adrenais e no fígado, aonde acontece a sulfonação da DHEA. O gene *PAPSS2* contém 13 éxons (NM\_004670.3), encontra-se localizado no cromossomo 10q24 e codifica a proteína PAPS sintase 2 com 614 pb. (NP\_004661.2). A PAPS sintase 2 possui dois domínios funcionais: ATP sulfúrilase e APS quinase.

Inicialmente variantes no gene *PAPSS2* foram identificadas em uma família paquistanesa com displasia óssea espondilo-metafisiária do tipo Paquistão (SEMD), atualmente denominada como Braquiolmia do tipo 4 <sup>13,14</sup>; em 2009 variantes patogênicas no gene *PAPSS2* foram identificadas em heterozigose composta em uma menina com pubarca precoce seguida de puberdade espontânea e posterior amenorreia secundária após a idade de 13 anos, níveis de DHEAS muito baixos, e aumento dos níveis de andrógenos <sup>15</sup> e, posteriormente, alguns estudos <sup>13,16</sup> ressaltam a prevalência de HI relacionada a pacientes com Braquiolmia causada por variantes no gene

Embora muito já se tenha avançado no conhecimento das causas genéticas para o hiperandrogenismo, vários pacientes permanecem sem diagnóstico molecular.

O objetivo deste estudo antes da Pandemia do Covid-19 era fazer a triagem molecular do gene *PAPSS2* em pacientes do sexo feminino com clitoromegalia ao nascimento e/ou pubarca precoce. Devido a alteração no calendário foi feita a análise de sequenciamento referente a cinco pacientes previamente sequenciadas por método Sanger.

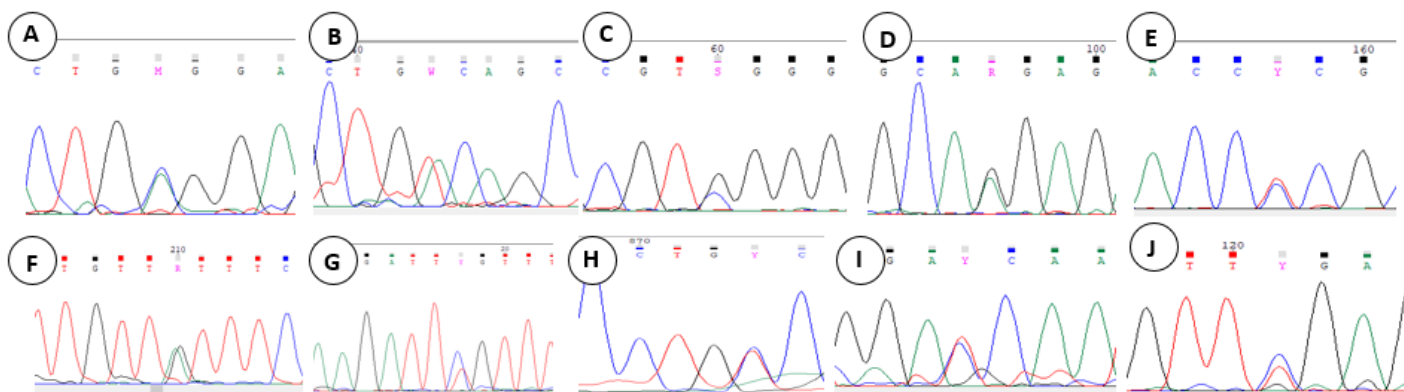
Foram estudadas cinco pacientes do sexo feminino com hiperandrogenismo idiopático encaminhadas pela Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

As seqüências obtidas previamente foram analisadas e comparadas com as seqüências de referência do gene *PAPSS2* (ID: ENSG00000198682) contida no *site* [www.esembl.org](http://www.esembl.org), com o auxílio do programa CLC Sequence Viewer v.8, que é de distribuição gratuita.

Foram identificadas algumas variantes frequentes na população em geral (Tabela 1 e Figura 1). Nas pacientes 1 e 2, foram identificadas as variantes raras c.866-51C>T, no íntron 7 e c.1491+259C>T, no íntron 11, respectivamente, ambas em heterozigose (Tabela 1 e Figura 1). A frequência do alelo raro (do inglês, “minor allele frequency” – MAF) depositada nos bancos de dados gnomAD\_latino, e nos bancos brasileiros ABraOM (<http://abraom.ib.usp.br>) e BIPMed (<http://bipmed.iqm.unicamp.br/genes>) estão apresentadas na (tabela 1). A patogenicidade das variantes foi consultada no programa *on-line* de livre acesso Varsome (<https://varsome.com>), que realiza predições *in silico* de acordo com os critérios do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) e as variantes raras c.866-51C>T e c.1491+259C>T foram classificadas como “de significado incerto”.

		PAPSS2									
		PAPSS2 - Transcrito: ENST00000456849.2 /NM_001015880.2									
Paciente	5'UTR	5'UTR	Intron 1	Intron 1	Intron 1	Intron 7	Intron 7	Intron 9	Exon 10	Intron 11	
	c.-760A>C	c.-751T>A	c.27+108C>G	c.27+145A>G	c.27+206C>T	C.865+17G>A	C.866-51C>T	c.1086+354C>T	C.1167C>T	c.1491+259C>T	
	rs2145819	rs2145818	rs2255682	rs2255683	rs2255684	rs2302405	rs925178594	rs7921017	rs145242127	rs768129191	
gnomAD_latino	0.5284	0.5296	0.2827	0.5143	0.2813	0.06617	0.000	0.5929	0.0001411	ND	
ABraOM	0.618702	0.618702	0.343723	0.597353	0.334757	0.093083	ND	0.470111	ND	ND	
bipmED	ND	ND	0.362	ND	ND	0.094	ND	ND	0.004717	ND	
Varsome	Benigna	Benigna	Benigna	Benigna	Benigna	Benigna	Significado incerto	Benigna	Benigna	Significado incerto	
1	A/A	T/T	C/G	G/A	C/T	G/G	C/T	C/C	C/C	C/C	
2	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	G/G	C/C	C/C	C/T	C/T	
3	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	
4	A/C	T/A	C/C	G/G	C/C	G/A	C/C	C/C	C/C	C/C	
5	A/A	T/T	C/C	G/G	C/C	G/G	C/C	C/T	C/C	C/C	

**Tabela 1.** Variantes identificadas. ND: Não descrito



**Figura 1.** Eletroferograma das variantes identificadas. **A:** 5'UTR, rs2145819, c.-760A>C, (Paciente 4); **B:** 5'UTR, rs2145818, c.-751T>A, (Paciente 4); **C:** intron 1, rs2255682, c.27+108C>G, (Paciente 1); **D:** intron 1, rs2255683, c.27+145A>G, (Paciente 1); **E:** intron 1, rs2255684, c.27+206C>T, (Paciente 1); **F:** intron 7, rs2302405, c.865+17G>A, (Paciente 4); **G:** intron 7, rs925178594, c.866-51C>T, (Paciente 1); **H:** intron 9, rs7921017, c.1086+354C>T, (Paciente 5); **I:** exon 10, rs145242127, C.1167C>T, (Paciente 2) e **J:** intron 9, rs7921017, c.1086+354C>T, (Paciente 5).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AZZIZ, R.; SANCHEZ, L. A.; KNOCHENHAUER, E. S.; MORAN, C.; LAZENBY, J.; STEPHENS, K. C.; TAYLOR, K.; BOOTS, L. R. Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 2, p. 453–62, fev. 2004.
2. UNLUHIZARCI, K.; GOKCE, C.; ATMACA, H.; BAYRAM, F.; KELESTIMUR, F. A detailed investigation of hirsutism in a Turkish population: idiopathic hyperandrogenemia as a perplexing issue. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association**, v. 112, n. 9, p. 504–9, out. 2004.
3. GOODMAN, N. F.; BLEDSOE, M. B.; COBIN, R. H.; FUTTERWEIT, W.; GOLDZIEHER, J. W.; PETAK, S. M.; SMITH, K. D.; STEINBERGER, E. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for the clinical practice for the diagnosis and treatment of hyperandrogenic disorders. **Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists**, v. 7, n. 2, p. 120–34, jan. 2001.
4. RAINEY, W. E.; CARR, B. R.; SASANO, H.; SUZUKI, T.; MASON, J. I. Dissecting human adrenal androgen production. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 13, n. 6, p. 234–9, ago. 2002.
5. ECHCHGADDA, I.; SONG, C. S.; ROY, A. K.; CHATTERJEE, B. Dehydroepiandrosterone sulfotransferase is a target for transcriptional induction by the vitamin D receptor. **Molecular pharmacology**, v. 65, n. 3, p. 720–9, mar. 2004.
6. VENKATACHALAM, K. V; AKITA, H.; STROTT, C. A. Molecular cloning, expression, and characterization of human bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-

- phosphosulfate synthase and its functional domains. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 30, p. 19311–20, 24 jul. 1998.
7. SCHWARTZ, N. B.; LYLE, S.; OZERAN, J. D.; LI, H.; DEYRUP, A.; NG, K.; WESTLEY, J. Sulfate activation and transport in mammals: system components and mechanisms. **Chemico-biological interactions**, v. 109, n. 1–3, p. 143–51, 20 fev. 1998.
  8. FAIYAZ UL HAQUE, M. *et al.* Mutations in orthologous genes in human spondyloepimetaphyseal dysplasia and the brachymorphic mouse. **Nature genetics**, v. 20, n. 2, p. 157–62, out. 1998.
  9. KLAASSEN, C. D.; BOLES, J. W. Sulfation and sulfotransferases 5: the importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 11, n. 6, p. 404–18, maio 1997.
  10. LYLE, S.; STANCZAK, J.; NG, K.; SCHWARTZ, N. B. Rat chondrosarcoma ATP sulfurylase and adenosine 5'-phosphosulfate kinase reside on a single bifunctional protein. **Biochemistry**, v. 33, n. 19, p. 5920–5, 17 maio 1994.
  11. FALANY, C. N. Sulfation and sulfotransferases. Introduction: changing view of sulfation and the cytosolic sulfotransferases. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 11, n. 1, p. 1–2, jan. 1997.
  12. KURIMA, K.; WARMAN, M. L.; KRISHNAN, S.; DOMOWICZ, M.; KRUEGER, R. C.; DEYRUP, A.; SCHWARTZ, N. B. A member of a family of sulfate-activating enzymes causes murine brachymorphism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 15, p. 8681–5, 21 jul. 1998.
  13. TUYSUZ, Beyhan; *et. al*, 2013. Spondyloepimetaphyseal dysplasia pakistani type: Expansion of the phenotype. *Am J Med Genet Part A* 161 A: 1300-1308.
  14. HANDA, Atsuhiko; *et.al*. Autosomal recessive brachyolmia: early radiological findings. **Skeletal Radiol**, nov; 45(11):1557-60. doi:10.1007/s00256-016-2458-8. Epub 2016 Aug. 21. PMID:27544198.
  15. NOORDAM, C.; DHIR, V.; MCNELIS, J. C.; SCHLERETH, F.; HANLEY, N. A.; KRONE, N.; SMEITINK, J. A.; SMEETS, R.; SWEEP, F. C. G. J.; CLAAHSEN-VAN DER GRINTEN, H. L.; ARLT, W. Inactivating PAPSS2 mutations in a patient with premature pubarche. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 22, p. 2310–8, 28 maio 2009.
  16. IIDA, Aritoshi.; *et. al*. Clinical and radiographic features oh the autosomal recessive form of brachyolmia caused by PAPSS2 mutations. **Human Mutation**, v. 34, n.10, p. 1381-1386, 2013.