

**HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA POR
DEFICIÊNCIA DA 21-HIDROXILASE, FORMA CLÁSSICA:
ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS ACHADOS EM FAMÍLIAS
ACOMPANHADAS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNICAMP
E OS DADOS DE LITERATURA NACIONAL E INTERNACIONAL.**

RESUMO

A deficiência da 21-hidroxilase corresponde a mais de 90% dos casos de Hiperplasia Adrenal Congênita. Tem herança autossômica recessiva, com o complexo gênico *CYP21* localizado em 6p. Existem as formas clássicas da doença (HAC-C21-OHD) e as não clássicas. Este estudo comparou os achados moleculares de 78 famílias (156 alelos) com HAC-C21-OHD acompanhadas no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do HC-UNICAMP, com os dados de literatura nacional e internacional. As mutações mais frequentes encontradas nesta casuística foram: I2 splice (28,9%), conversão e deleção (18%), I172N (15,5%), R356W (7,8% cada), IVS2, AS,A-G,-2 (6,5%) e Q318X (5,8%). Estes dados quando comparados com outros dois estudos nacionais e com estudos da Argentina, Espanha, Chile, EUA, Portugal, Inglaterra, Suécia, França e Holanda mostraram de uma forma geral diferenças significativas nas frequências das alterações tipo conversão e deleção, I2 splice, I172N, Q318X e R356W, porém em algumas situações com frequências muito parecidas. Estes achados podem estar relacionados à heterogeneidade genética da população brasileira.

INTRODUÇÃO E OBJETIVO

O controle da atividade do córtex adrenal ocorre, primeiramente, pela estimulação da hipófise pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH) secretado pelo hipotálamo. A hipófise, então, secreta o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que age no córtex das adrenais estimulando a esteroidogênese. A relação entre o eixo hipotálamo-hipófise e as adrenais acontece por um mecanismo de retrocontrole negativo em que o cortisol, principal glicocorticóide humano, inibe a liberação de CRH e ACTH¹.

A Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC), um erro inato do metabolismo do cortisol, transmitido geneticamente e de caráter autossômico recessivo, ocorre quando há deficiência de uma das cinco enzimas envolvidas na biossíntese do cortisol¹⁻³.

O cortisol é produzido, a partir do colesterol, por uma série de passagens enzimáticas interligadas. A enzima 21-hidroxilase (21-OH), pertencente ao grupo de enzimas do citocromo P450, atua na via metabólica do cortisol convertendo progesterona em desoxicorticosterona e 17-hidroxiprogesterona em 11-desoxicortisol. A deficiência da 21-OH é a forma mais comum de HAC, sendo responsável por cerca 95% dos casos da forma clássica da doença (HAC-C21-OHD)^{1,2}.

Pesquisas no campo da Biologia Molecular demonstraram que há no braço curto do cromossomo 6 duas cópias do gene da enzima 21-OH, *CYP21A1P* e *CYP21A2*, intercaladas com genes que codificam proteínas do sistema complemento (C4A e C4B)^{4,5}. Apenas o *CYP21A2* é um gene ativo. O *CYP21A1P*, apesar de possuir 97% de homologia dos éxons com o *CYP21A2*, não tem expressão em consequência de mutações deletérias adquiridas, sendo, portanto, considerado um pseudogene^{5,6}. Os quatro genes estão contidos em um segmento de DNA de aproximadamente 60Kb, sendo transcritos na mesma direção. Tal organização sugere que durante a evolução tenha ocorrido duplicação em “tandem” dos genes ancestrais da 21-OH e C4^{1,2,7}.

O alto grau de homologia entre as unidades *C4B+CYP21A2* e *C4A+CYP21A1P* facilita a ocorrência de pareamento desigual na meiose entre os cromossomos homólogos e cromátides irmãs⁷. Deste modo, podem ser formados gametas com organização dos genes *CYP21/C4* alterada.

A deficiência da enzima 21-OH pode ser causada então por uma deleção total ou parcial do gene *CYP21A2*, esta última como resultado de um processo de conversão gênica em larga-escala ou micro-conversões (as mutações pontuais), na qual, possivelmente, enzimas responsáveis pelo reparo pós-duplicação reconhecem o pareamento errado e convertem o gene *CYP21A2* em *CYP21A1P*^{1,2,8,9}.

A doença pode apresentar-se em duas formas clínicas: clássica, subdividida em perdedora de sal (PS) e virilizante simples (VS); e não-clássica, subdividida em críptica e tardia¹⁻³.

A forma clássica virilizante simples (VS) isolada caracteriza-se por ambigüidade genital em recém-nascidos do sexo feminino e sinais de virilização precoce no sexo masculino, devido ao excesso de andrógenos produzido com o desvio da via metabólica do cortisol, que quando não tratado, em ambos os sexos, acarreta uma virilização pós-natal progressiva, com sinais e sintomas evidentes de pseudo-puberdade precoce (aumento do clitóris, aumento do pênis sem correspondente aumento testicular, pubarca, hirsutismo, acne, engrossamento da voz, avanço da velocidade de crescimento e maturação esquelética). A forma perdedora de sal (PS), sempre associada à forma VS, corresponde a 70% dos casos da forma clássica e torna-se mais grave pela deficiência na produção de mineralocorticóides, o que acarreta dificuldade de manutenção do balanço eletrolítico do organismo. Pode se manifestar desde formas graves com quadro de desidratação hiponatrêmica e hipercalêmica, vômitos, acidose metabólica, choque hipovolêmico e óbito, se não receber tratamento adequado, até quadros mais discretos, onde somente são observados o baixo ganho ponderal e as alterações laboratoriais eletrolíticas, com atividade plasmática da renina aumentada. Nestes casos o risco de desidratação e choque existe quando essas crianças são submetidas a situações de estresse, sem o adequado aumento da reposição glicocorticóide¹⁻³.

Já na forma não-clássica, o bloqueio enzimático é menos intenso, podendo ser assintomática (forma críptica) ou manifestando sinais e sintomas tardiamente (forma tardia), dentre os quais se

destacam a pubarca, o hirsutismo, a acne, o engrossamento da voz, o avanço do crescimento e da maturação esquelética, a irregularidade menstrual, e a infertilidade¹⁻³.

O diagnóstico laboratorial é realizado por meio da dosagem hormonal, sendo que indivíduos com a deficiência de 21-OH apresentam aumento acentuado de 17-OH-progesterona sérica, sem aumento de 11-desoxicortisol, com aumento menos intenso de dehidroepiandrosterona (DHEA), delta 4-androstenediona e testosterona basais na forma clássica, e após teste de estímulo com ACTH na forma não-clássica. Nas formas PS observa-se ainda aumento de atividade da renina plasmática, hiponatremia e hipercalemia¹⁻³.

O tratamento é feito por reposição hormonal glicorticóide contínua com doses fisiológicas, a fim de impedir a produção excessiva de andrógenos e a consequente virilização, e nos casos de PS, também da reposição mineralocorticóide. Havendo alterações na genitália externa, torna-se necessária intervenção cirúrgica, com clitoroplastia e introitoplastia geralmente nos primeiros 12 a 18 meses de vida, tentando minimizar problemas psicossociais que a doença poderá trazer ao indivíduo, além de possibilitá-lo a uma vida sexual normal¹⁻³.

Muitos esforços têm sido feitos no sentido de se desenvolver métodos eficazes de diagnóstico e tratamento pré-natal, com a finalidade de evitar a ambigüidade genital nas meninas afetadas e a pseudo-puberdade precoce nos meninos, assim como todos os consequentes distúrbios psicológicos e sociais. O diagnóstico e tratamento pré-natal evitariam ainda os óbitos nos casos de forma PS, que muitas vezes ocorrem antes mesmo da identificação da doença¹⁻³.

A incidência da HAC-C21-OHD é de aproximadamente 1:15.000 a 1:10.000 nascidos vivos. Estudos mostram que há uma prevalência significativamente maior da forma não clássica em algumas populações como, por exemplo, em judeus Ashkenazi, na população Hispânica, Iugoslava e Italiana, chegando a dados entre 1:1.000 a 1:100¹⁻³.

A HAC-C21-OHD já foi utilizada como marcador de origem e migração de determinadas populações. Como exemplo, há um estudo, feito em Israel, onde foi relatada uma alta incidência da

doença em judeus provenientes do norte da África, por isso foi traçada a história dessas famílias, suas árvores genealógicas, a origem de seus ancestrais e foi descoberto que a mutação causadora da doença nessa população originou-se de tribos judias que viviam na região das montanhas Atlas, e migraram em 70 D.C.¹⁰. Portanto, apesar da alta miscigenação encontrada na população brasileira, o estudo genético-molecular desta doença e sua comparação com dados nacionais e internacionais poderiam nos informar a possível origem das famílias com casos de HAC-C21-OHD acompanhadas no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Clínicas (HC) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

O objetivo deste estudo foi verificar a frequência alélica de cada uma das alterações moleculares (deleção, conversão gênica e principais mutações pontuais) das famílias acompanhadas no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do HC – FCM – UNICAMP e comparar estes achados moleculares com dados de literatura nacional e internacional.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

CASUÍSTICA:

Foram incluídas no estudo todas as famílias acompanhadas no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do HC – FCM – UNICAMP com pelo menos um membro afetado e vivo com diagnóstico clínico e laboratorial de HAC-C21-OHD. O estudo somente foi realizado após autorização do responsável do paciente com assinatura do termo de consentimento pós-informado, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM – UNICAMP com número 130/2004. O sigilo das informações foi preservado mediante a criação de um número para identificação dos pacientes conservando sua privacidade, de acordo com as normas da Declaração de Helsinki.

MÉTODOS:

Trata-se de um estudo primário com análise descritiva de casos. Tanto nos dados coletados das famílias acompanhadas no HC – UNICAMP, como nos dados extraídos da literatura, foram avaliadas as variáveis: forma clínica (VS ou PS) dos indivíduos afetados e as alterações moleculares que confirmaram a HAC-C21-OHD.

Portanto, os dados relacionados às famílias do HC – UNICAMP foram coletados por análise de prontuários, e, quando necessário, com complementação de estudo molecular de algum caso no Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) – UNICAMP onde as técnicas necessárias já estão padronizadas. As amostras de DNA foram obtidas de sangue periférico, digeridas com enzima de restrição *Taq I*, realizada técnica de *Southern blotting* seguida de hibridização¹¹, e as mutações de ponto pesquisadas pela técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR) com sondas alelo-específicas e, sempre que necessário sequenciamento do gene *CYP21A2*¹². Neste caso, os alunos, já com prévio treinamento, ficaram responsáveis pela realização dos exames, com a supervisão de seu orientador.

Os dados de literatura foram obtidos por análise dos bancos de dados nacionais e latino-americanos na base *Scientific Eletronic Library On line* (SciELO)¹³ e internacionais na base PubMed (um serviço da *U.S. National Library of Medicine* que inclui mais de 16 milhões de citações do MEDLINE desde 1950)¹⁴, procurando-se as maiores casuísticas de HAC-C21-OHD com dados moleculares publicados. No entanto, em alguns artigos não foi possível separar os achados das formas clássicas das não-clássicas da deficiência da 21-OH.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foi realizada uma análise descritiva dos dados com construção de tabelas. Para verificar a associação ou não de determinada variável avaliada entre a população de HAC-C21-

OHD da UNICAMP e os dados de literatura nacional ou internacional, foi aplicado o teste de qui-quadrado, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Foram coletados dados de 78 famílias (156 alelos), correspondentes a 88 pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do HC – UNICAMP. Esses dados foram comparados a estudos nacionais e internacionais de Portugal, Argentina, Chile, Espanha, Estados Unidos, Inglaterra, Holanda e Suécia.

Das 78 famílias, 47 (60%) apresentaram a forma PS e 31 (40%) a VS. Dos 88 pacientes, 50 (57%), sendo 29 PS e 21 VS, eram do sexo feminino e 38 (43%), sendo 23 PS e 15 VS, do sexo masculino.

Ao todo foram detectados os grandes rearranjos (compatíveis com a forma PS) e 15 tipos de mutações: I2 splice (cria um splicing anormal no íntron 2 – associada à forma PS), I172N (substituição de isoleucina por asparagina no códon 172 do éxon 4 – forma VS), IVS2AS,A-G,-2 (suprime o splicing normal no íntron 2 – forma PS), R356W (substituição de arginina por triptofano no códon 356 do éxon 7 – forma PS), Q318X (parada de leitura após o aminoácido glutamina no códon 318 do éxon 7 – forma PS), F306insT (inserção de uma timina no códon 306 da fenilalanina no éxon 6 – forma PS), H28insC (inserção de uma citosina no códon 28 da histidina no éxon 1 – forma PS), Delta 8 (deleção de 8 pares de base no éxon 3 – forma PS), S170insA (inserção de uma adenina no códon 170 da serina no éxon 4 – forma PS), L142P (substituição de leucina por prolina no códon 142 do éxon 3 – forma PS), R444X (parada de leitura após o aminoácido arginina no códon 444 do éxon 9 – forma PS), V281L (substituição de valina por leucina no códon 281 do éxon 6 – forma não-clássica), Cluster 6 (várias substituições seqüenciais no éxon 6 – forma PS), L108R (substituição de leucina por arginina no códon 108 do éxon 3 – forma PS ou VS) e G56R

(substituição de glicina por arginina no códon 56 do éxon 1 – forma VS). Também, em alguns alelos foram identificadas algumas associações de mutações (vide Tabela 1).

A Tabela 1 apresenta os dados das alterações moleculares encontradas nas 78 famílias do HC – UNICAMP divididas de acordo com a forma clínica observada. Os grandes rearranjos (conversão e deleção) corresponderam a 18% dos alelos. Na forma PS, as mutações mais frequentes observadas foram I2 splice, IVS2AS,A-G,-2, R356W e Q318X. Na forma VS, foram I172N, I2 splice e R356W. No total dos casos, foram I2 splice, I172N, R356W, IVS2AS,A-G,-2 e Q318X.

Tabela 1: Alterações moleculares no gene *CYP21A2* encontradas nos pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do HC – UNICAMP, divididas de acordo com as formas clínicas.

	VS	PS	Total	
	n	n	n	%
Conversão	7	7	14	9,0
Deleção	5	9	14	9,0
I2 splice	16	29	45	28,9

I172N	20	4	24	15,5
IVS2AS,A-G,-2	1	9	10	6,5
R356W	4	8	12	7,8
Q318X	2	7	9	5,8
F306insT	1	2	3	1,9
H28insC	0	2	2	1,3
Delta 8	1	1	2	1,3
S170insA	0	1	1	0,6
L142P	0	1	1	0,6
R444X	0	1	1	0,6
V281L	1	0	1	0,6
Cluster 6	0	1	1	0,6
L108R	1	0	1	0,6
G56R	1	0	1	0,6
F306insT+Q318X+R356W	1	4	5	3,2
I2 splice + V281L	0	3	3	1,9
Conversão + V281L	0	2	2	1,3
I172L + V281L	1	0	1	0,6
Q318X + Conversão	0	1	1	0,6
I2 splice + Delta 8	0	1	1	0,6
IVS2DS,G-A,+5 + V281L	0	1	1	0,6
Total	62	94	156	100

PS = perdedor de sal; VS = virilizante simples; n = número de alelos

A Tabela 2 apresenta os dados das principais alterações encontradas no presente estudo em comparação com os dados das maiores casuísticas nacionais e internacionais publicadas de HAC-C21-OHD, enquanto que a Tabela 3 apresenta dados internacionais de casuísticas das formas clássica e não-clássica da deficiência da 21-OH.

Tabela 2: Frequência (%) das alterações moleculares no gene *CYP2A21* encontradas em casuísticas nacionais e internacionais da forma clássica da deficiência da 21-hidroxilase.

Estudo	1	2	3	4	5	6	7	8
Total alelos	156	142	562	72	126	180	284	112
Alelos HAC-C21-OHD	156	140	334	72	126	158	284	92
Conversão^a	9,0	8,6	6,6	11,0	22,9	29,1	45	28,2
Deleção^b	9,0		4,2	7,0				
I2 splice^c	28,9	26,4	35,3	18,0	19,0	26,6	30,3	10,6
I172N^d	15,5	7,9	14,4	15,3	7,1	13,9	7,0	10,8
R356W^e	7,8	7,9	10,8	5,5	12,7	5,1	9,8	2,1
Q318X^f	5,8	9,3	13,8	13,8	10,5	3,8	0,0	7,6
Delta 8	1,3	5,0	2,1	2,7	0,0	10,1	0,0	3,2
F306insT	1,9	<0,1	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,3
Cluster 6	0,6	0,0	2,1	0,0	2,4	1,3	0,0	0,0
V281L	0,6	2,1	3,9	0,0	0,0	1,9	0,0	20,6
P30L	0,0	<0,1	1,8	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0
Associação	8,8	24,3	8,0	NR	0,0	6,3	0,0	0,0
Sem alterações	0,0	5,7	11	7,8	25,4	0,0	7,8	0,0

n = número de alelos com alterações moleculares; 1 = HC-UNICAMP;

2 = Instituto da Criança da USP¹⁵; 3 = Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da FM-USP¹⁶; 4 = Argentina¹⁷; 5 = Chile¹⁸; 6 = EUA¹⁹; 7 = Inglaterra²⁰; 8 = Portugal²¹; ^{a+b} $\chi^2_{(7)} = 129,89$; p = 0,0000001; ^c $\chi^2_{(7)} = 32,13$; p = 0,00004; ^d $\chi^2_{(7)} = 16,83$; p = 0,02; ^e $\chi^2_{(7)} = 13,75$; p = 0,06; ^f $\chi^2_{(7)} = 51,20$; p = 0,0000001

Tabela 3: Frequência (%) das alterações moleculares no gene *CYP21A2* encontradas em casuísticas nacionais e internacionais em que não foi possível separar as formas clássica da não-clássica da 21-hidroxilase.

Estudo	1	2	3	4	5
Total alelos	156	182	186	76	370
Conversão^a	9,0	18,0	29,8	20,0	31,9
Deleção^b	9,0			13,0	
I2 splice^c	28,9	20,0	27,7	25,0	28,1
I172N^d	15,5	4,0	20,8	1,3	12,4
R356W^e	7,8	0,0	3,8	4,0	8,4
Q318X^f	5,8	0,0	3,5	4,0	3,5
Delta 8	1,3	7,0	0,5	4,0	4,3
F306insT	1,9	1,0	0,0	1,3	0,3
Cluster 6	0,6	11,0	0,5	0,0	3,0
V281L	0,6	15,0	5,4	18,4	2,2
P30L	0,0	0,0	1,6	2,6	0,3
Associação	8,8	NR	4,3	NR	1,9
Sem alterações	0,0	NR	12,5	6,4	0,0

n = número de alelos com alterações moleculares; NR = dados não relatados no artigo publicado;

1 = HC-UNICAMP; 2 = França²²; 3 = Suécia²³; 4 = Espanha²⁴; 5 = Holanda²⁵
^{a+b} $\chi^2_{(4)} = 20,30$; p = 0,0004; ^c $\chi^2_{(4)} = 4,98$; p = 0,29; ^d $\chi^2_{(4)} = 35,44$; p = 0,0000001;
^e $\chi^2_{(4)} = 19,48$; p = 0,0006; ^f $\chi^2_{(4)} = 9,73$; p = 0,04

Portanto, de uma forma geral, como observado nas Tabelas 2 e 3, as frequências das alterações moleculares no gene *CYP21A2* encontradas nos pacientes com a HAC-C21-OHD do HC-UNICAMP e de outros estudos nacionais e internacionais diferem significativamente, ou seja, não existe associação entre as mesmas.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No presente estudo foram avaliados dados clínicos e moleculares da segunda maior série latinoamericana de pacientes com HAC-C21-OHD e uma das maiores da literatura internacional, o que permitiu a comparação de dados.

Observou-se que a forma PS correspondeu a 60% das famílias avaliadas. Esta frequência é menor que a referida na literatura, 70 a 75%²⁶, o que pode indicar que, em nosso meio, os pacientes com esta forma clínica estejam morrendo por falta de diagnóstico correto e precoce. Também foram observadas frequências baixas em outros estudos nacionais, como 52% na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da FM-USP¹⁶ e 44% na Divisão de Endocrinologia da FM-USP-RP²⁷. Por se tratar de uma doença autossômica recessiva, deveria ocorrer igual frequência de afetados entre os sexos, no entanto, no presente estudo, observou-se um predomínio de 57% do sexo feminino, fato este que também pode ser justificado pela morte dos casos PS em meninos pela falta de diagnóstico precoce e preciso, o que geralmente não ocorre nas meninas, pois estas apresentam ambigüidade genital ao nascimento. Estes dados são semelhantes aos do Serviço de Endocrinologia Pediátrica do Instituto da Criança da FM-USP, 58% de sexo feminino¹⁵ e, diferentes dos observados na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da FM-USP, 70% do sexo feminino¹⁶.

A elevada morbidade e mortalidade na ausência do diagnóstico na HAC-C21-OHD, especialmente na forma PS, assim como a utilização de métodos diagnósticos simples e sem custo elevado, a tornam uma doença de eleição para inclusão na triagem neonatal. Por esta razão, em

países nos quais a triagem neonatal já está bem implantada, a forma PS apresenta frequência elevada (entre 70 e 75%) e há equiparação da proporção entre os sexos^{2,3,26}.

Na maioria das casuísticas, os grandes rearranjos, deleção do gene *CYP21A2* e grande conversão, ocorrem entre 20 a 25% dos alelos da HAC-C21-OHD²⁸. No presente estudo, observaram-se 18% (9% de deleção e 9% de conversão), dado semelhante aos encontrados nos estudos da Argentina com 18%¹⁷ e da França com 18%²², porém maiores que do Instituto da Criança da FM-USP com 8,6%¹⁵ e da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da FM-USP com 10,8%¹⁶ e menores que os do Chile com 22,9%¹⁸, Portugal com 28,2%²¹, EUA com 29,1%¹⁹, Suécia com 29,8%²³, Holanda com 31,9%²⁵, Espanha com 33%²⁴ e Inglaterra com 45%²⁰. As frequências observadas destes grandes rearranjos nestes diversos estudos foram significativamente diferentes.

Até o momento, mais de 100 mutações de ponto já foram descritas na HAC-C21-OHD, porém quatro delas (I2 splice, I172N, Q318X e R356W) são as mais frequentes nas diversas populações^{2,3,28} e são as que, também, estão normalmente presentes no pseudogene, sugerindo que foram transferidas para o gene ativo por meio de processos de microconversão gênica. Pode ser importante determinar a frequência das mutações em cada população, pois podem variar de acordo com o grupo étnico.

Observou-se nesta amostra que as mutações de ponto mais frequentes em ordem decrescente foram a I2 splice (28,9%), a I172N (15,5%), a R356W (7,8%), a IVS2AS,A-G,-2 (6,5%) e a Q318X (5,8%).

A I2 splice (28,9%) apresentou frequência semelhante aos estudos do Instituto da Criança da FM-USP com 26,4%¹⁵, EUA com 26,6%¹⁹, Suécia com 27,7%²³, Holanda com 28,1%²⁵ e Inglaterra com 30,3%²⁰, porém maior que Portugal com 10,6%²¹, Argentina com 18%¹⁷, Chile com 19%¹⁸, França com 20%²² e Espanha com 25%²⁴ e menor que na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da FM-USP com 35,3%¹⁶. As frequências observadas desta mutação nestes

diversos estudos foram significativamente diferentes quando comparadas aos estudos exclusivos de HAC-C21-OHD, mas não apresentaram diferenças significativas em relação aos estudos internacionais que agrupam as formas clássica e não-clássica da deficiência da 21-OH.

A I172N (15,5%) apresentou frequência semelhante aos estudos dos EUA com 13,9%¹⁹, Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da FM-USP com 14,4%¹⁶ e Argentina com 15,3%¹⁷, porém maior que Espanha com 1,3%²⁴, França com 4,0%²², Inglaterra com 7,0%²⁰, Chile com 7,1%¹⁸, Instituto da Criança da FM-USP com 7,9%¹⁵, Portugal com 10,8%²¹ e Holanda com 12,4%²⁵, e menor que Suécia com 20,8%²³. As frequências observadas desta mutação nestes diversos estudos foram significativamente diferentes.

A R356W (7,8%) apresentou frequência semelhante somente ao estudo do Instituto da Criança da FM-USP com 7,9%¹⁵ e Holanda com 8,4%²⁵, porém maior que França com 0,0%²², Portugal com 2,1%²¹, Suécia com 3,8%²³, Espanha com 4,0%²⁴, EUA com 5,1%¹⁹ e Argentina com 5,5%¹⁷, e menor que Inglaterra com 9,8%²⁰, Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da FM-USP com 10,8%¹⁶ e Chile com 12,7%¹⁸. As frequências observadas desta mutação nestes diversos estudos não foram significativamente diferentes em relação aos estudos nacionais e internacionais exclusivos para HAC-C21-OHD, mas foram significativamente diferentes em relação aos estudos internacionais que não separam as formas clássica e não-clássica da deficiência da 21-OH.

A Q318X (5,8%) não apresentou frequência semelhante a nenhum estudo, mas sua frequência foi maior que a encontrada nos estudos da França com 0,0%²², Inglaterra com 0,0%²⁰, Holanda com 3,5%²², Suécia com 3,5%²³, EUA com 3,8%¹⁹ e Espanha com 4,0%²⁴ e menor que Portugal com 7,6%²¹, Instituto da Criança da FM-USP com 9,3%¹⁵, Chile com 10,5%¹⁸, Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da FM-USP com 13,8%¹⁶ e Argentina com 13,8%¹⁷. As frequências observadas desta mutação nestes diversos estudos foram significativamente diferentes.

Outras mutações, como a Delta 8, o Cluster 6 e a F306insT, presentes em frequências que variam de 0,0 a 10,1%, de 0,0 a 6%, e de 0,0 a 11%, respectivamente¹⁵⁻²⁵, foram muito pouco frequentes no presente estudo. A mutação IVS2AS,A-G,-2 presente com alta frequência no presente estudo, é rara na literatura e foi descrita pela primeira vez em 3 pacientes não relacionados da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da FM-USP²⁹.

O estudo holandês²⁵ comparou seus dados com outros estudos do oeste Europeu (Suécia, Finlândia, Dinamarca, Inglaterra, Alemanha, Áustria, França, Itália e Espanha) e encontrou, de uma forma geral, alta concordância entre a frequência das alterações moleculares das formas clássica e não-clássica da deficiência da 21-OH. Portanto, os dados encontrados nos pacientes do HC-UNICAMP semelhantes ao estudo holandês, também devem apresentar a mesma concordância.

As mutações H28insC, S170insA, L142P, L108R e G56R foram descritas pela primeira vez neste grupo de pacientes do HC-UNICAMP. A mutação H28insC foi descrita em homozigose numa família com a forma PS³⁰, sugerindo que cause uma deficiência enzimática muito grave (0% de atividade enzimática). A mutação S170insA foi observada em uma família em heterozigose composta com a mutação R356W e que apresentou também a forma PS, sugerindo que também cause uma deficiência enzimática muito grave (0% de atividade enzimática). Também, a mutação L142P foi observada em uma família em heterozigose composta com a mutação I172N e que apresentou a forma PS, sendo possível afirmar que a deficiência enzimática causada pela L108R seja muito grave (0% de atividade enzimática). Ainda, a mutação L108R foi observada em uma família em heterozigose composta com a mutação I172N e que apresentou a forma VS, não sendo possível afirmar que a deficiência enzimática causada pela L108R seja muito grave (0% de atividade enzimática) ou grave (cerca de 1 a 2% de atividade enzimática). Finalmente, a mutação G56R foi observada em uma família em heterozigose composta com a mutação I2 splice e que apresentou a forma VS, sendo possível afirmar que a deficiência enzimática causada pela G56R seja apenas grave (1 a 2% de atividade enzimática).

As técnicas utilizadas na identificação dos casos de HAC-C21-OHD do HC-UNICAMP foram eficazes para encontrar as alterações moleculares em 100% dos casos, o que nem sempre ocorre, mas também foi verificada nos estudos realizados nos EUA¹⁹, Portugal²¹ e Holanda²⁵. Na população brasileira, a pesquisa dos grandes rearranjos (conversão e deleção) e das quatro principais mutações (I2 splice, I172N, R356W e Q318X) identifica mais de 70% dos casos de HAC-C21-OHD^{15,16}, como mostrado no presente estudo, com 76% dos casos. Tal dado é fundamental para a criação de programas de triagem neonatal no país para a doença.

As associações de alterações moleculares no mesmo alelo são pouco relatadas na literatura. Foram descritas com frequências semelhantes aos do HC-UNICAMP nos estudos realizados na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da FM-USP com 8,0%¹⁶ e EUA com 6,3%¹⁹, sendo maior que os estudos da Holanda com 1,9%²⁵ e Suécia com 4,3%²³ e menor que no Instituto da Criança da FM-USP com 24,3%¹⁵. A presença de combinações de mutações em um mesmo alelo, quando sabidamente adjacentes no pseudogene, como, por exemplo, S170insT+Q318X+R356W ou Cluster 6+V281L, pode indicar que a transferência para o gene ativo ocorreu conjuntamente (como uma única fita de DNA) ou separadamente, como, por exemplo, no caso da associação I2 splice+V281L²³. De qualquer forma, a alta frequência destas combinações, em especial na população brasileira, exige um cuidado ainda maior na análise molecular do complexo *CYP21*.

Os dados analisados não permitiram estabelecer uma associação entre as alterações moleculares encontradas nos pacientes do HC-UNICAMP com as alterações encontradas nos diversos estudos nacionais e internacionais, porém algumas frequências são muito parecidas. Estes achados podem estar relacionados à heterogeneidade genética da população brasileira. Estudo realizado por Wilson e col³¹ com 716 pacientes (iranianos, croatas, italianos, esquimós Yupik, tailandeses e norte-americanos de diversas etnias) portadores das formas clássica e não-clássica de deficiência da 21-OH mostrou associação da deleção com anglo-saxões, da V281L com judeus

Ashkenazi, da R356W com croatas, da Q318X com índios do leste americano e a I2 splice com iranianos e esquimós Yupik. É importante salientar que tal estudo também discute as diferenças encontradas nas diversas mutações conforme a região do país estudada.

Portanto, com este estudo pode-se concluir que o tamanho da casuística de pacientes com HAC-C21-OHD do Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do HC-UNICAMP com estudo molecular do gene *CYP21* é comparável às maiores casuísticas descritas no Brasil e no exterior, e, portanto, permitiu a comparação entre os mesmos, e, as principais alterações moleculares no gene *CYP21* observadas nestes pacientes são também as mais frequentes encontradas na maioria destes estudos nacionais e internacionais, porém algumas com diferenças significativas quando comparadas em relação às respectivas frequências.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. New MI. An update of Congenital Adrenal Hyperplasia. *Ann NY Med Acad Sci* 1038: 14-43, 2004.
2. Forest MG. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Reprod Update* 10: 469-85, 2004.
3. Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 365: 2125-36, 2005.
4. Carroll MC, Campbell RD, Porter RR. Mapping the Steroid 21- Hydroxylase adjacent complement C4 genes in HLA Major Histocompatibility Complex in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 521-5, 1985.
5. White PC, New MI, Dupont B. Medical Progress: Congenital Adrenal Hyperplasia. *N Engl J Med* 316: 1519-24, 1987.
6. Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fuji-Kuriyama Y. Complete nucleotide sequence of 2 steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2841-5, 1986.
7. Strachan T. Molecular pathology of Congenital Adrenal Hyperplasia. *Clin Endocrinol* 32: 373-93, 1990.
8. Donohoue PA, Van Dop C, McLean RH, White PC, Jospe N, Migeon JC. Gene conversion in salt-losing Congenital Adrenal Hyperplasia with absent complement C4 protein. *J Clin. Endocrinol Metab* 62: 995-1002, 1986.
9. Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Hirosama T, Fuji-Kuriyama Y. Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P450(C21)] deficiency in humans: possible gene conversion products. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7486-90, 1988.

10. Rosler A, Leiberman E, Cohen T. High frequency of congenital adrenal hyperplasia (classic 11 beta-hydroxylase deficiency) among Jews from Morocco. *Am J Med Genet* 42: 827-34, 1992.
11. Araújo M, Sanches MR, Suzuki LA, Guerra-Junior G, Farah SB, De Mello MP. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res* 29: 1-3, 1996.
12. Paulino LC, Araújo M, Guerra-Júnior G, Lemos-Marini SHV, De Mello MP. Mutation distribution and CYP21/C4 locus variability in Brazilian families with the classical form of the 21-hydroxylase deficiency. *Acta Paediatr* 88: 275-83, 1999.
13. Scientific Eletronic Library on line – SCIELO. www.scielo.com.br
14. PubMed. www.pubmed.gov
15. Witchel SF, Smith R, Crivellaro CE, Manna TD, Dichtchekian V, Setian N, Damiani D. CYP21 mutations in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet* 106: 414-9, 2000.
16. Bacheга TASS. Diagnóstico da hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase: do fenótipo ao genótipo. Tese de Livre-Docência. Faculdade de Medicina – USP, 2006. p. 122
17. Dardis A, Bergada I, Bergada C, Rivarola M, Belgorosky A. Mutations of the steroid 21-hydroxylase gene in na Argentinian population of 36 patients with classical congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab* 10: 55-61, 1997.
18. Fardella CE, Poggi H, Pineda P, Soto J, Torrealba I, Cattani A, Oestreicher E, Foradori A. Salt-wasting congenital adrenal hyperplasia: detection of mutations in CYP21B gene in Chilean population. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 3357-60, 1998.

19. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, Lesser M, New MI, White PC. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 90: 584-95, 1992.
20. Lako M, Ramsden S, Campbell RD, Strachan T. Mutation screening in British 21-hydroxylase deficiency families and development of novel microsatellite based approaches to prenatal diagnosis. *J Med Genet* 36: 119-24, 1999.
21. Friães A, Rêgo AT, Aragüés JM, Moura LF, Mirante A, Mascarenhas MR, Kay TT, Lopes LA, Rodrigues JC, Guerra S, Dias T, Teles AG, Gonçalves J. CYP21A2 mutations in Portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia: identification of two novel mutations and characterization of four different partial gene conversions. *Mol Genet Metab* 88: 58-65, 2006.
22. Mornet E, Créte P, Kuttan F, Raux-Dernay MC, Boué J, White PC, Boué A. Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21A2 genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 48: 79-88, 1991.
23. Wedell A, Thilén A, Ritzén EM, Stengler B, Luthman H. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 1145-52, 1994.
24. Ezquieta B, Oliveira B, Garcia R, Gancedo PG. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Hum Genet* 96: 198-204, 1995.
25. Stikkelbroeck NMML, Hoefsloot LH, De Wijs IJ, Otten BJ, Hermus ARMM, Sistermans EA. CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in the Netherlands: six novel mutations and specific cluster of four mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3852-9, 2003.
26. Pang S, Wallace M, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon ICT, Dobbins RH, Kling S, Fujieda K, Suwa S. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 81: 866-74, 1988.

27. Torres N, De Mello MP, Germano CMR, Elias LLK, Moreira AC, Castro M. Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the CYP21A1P to CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. *Braz J Med Biol Res* 36: 1311-8, 2003.
28. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 21: 245-91, 2000.
29. Billerbeck AE, Mendonça BB, Pinto EM, Madureira G, Arnhold IJP, Bachega TASS. 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* 87: 4314-7, 2002.
30. Lau IF, Soardi FC, Lemos-Marini SHV, Guerra-Junior G, Baptista MTM, De Mello MP. H28+C insertion in CYP21 gene: a novel mutation frameshift mutation in a Brazilian patient with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5877-80, 2001.
31. Wilson RC, Nimkarn S, Domic M, Obeid J, Azar M, Najmabadi H, Saffari F, New MI. Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 90: 414-21, 2007.