

Estudo Multicêntrico de Pacientes Brasileiros Com Deficiência da 21-Hidroxilase: Correlação do Genótipo Com o Fenótipo

artigo original

RESUMO

Analisamos as características clínicas e moleculares de 205 pacientes portadores das diferentes formas clínicas da deficiência da 21-hidroxilase, com diagnóstico hormonal e molecular definidos. As mutações mais frequentes foram a I2 *splice* na forma perdedora de sal, a I172N na forma virilizante simples e a V281L na forma não clássica, com frequências semelhantes às de outros estudos. Obtivemos baixa frequência de deleção do gene da 21-hidroxilase, de forma semelhante ao identificado nas populações argentina e mexicana. Cinco mutações novas foram descritas em nossa população: G424S, H28+C, Ins 1003[^]1004 A, R408C e IVS2-2A>G. A severidade do genótipo também se correlacionou diretamente com níveis mais elevados de 17OH-progesterona e de testosterona. As mutações foram classificadas em três grupos, de acordo com o comprometimento da atividade enzimática observado *in vitro*: Grupo A: atividade de 0-2%; Grupo B: atividade de 3-7% e Grupo C: atividade >20%. Houve forte correlação do grupo A com a forma perdedora de sal, do grupo B com a forma virilizante simples e do grupo C com a forma não clássica. A mutação I2 *splice* (Grupo A) em homo ou hemizigose conferiu o fenótipo de forma clássica, embora tanto a forma perdedora de sal quanto a forma virilizante simples tenham sido identificadas. A boa correlação do genótipo com o fenótipo na HAC-21OH permite sua aplicação na prática clínica, para o aconselhamento genético, diagnóstico e tratamento pré-natal das gestações de risco para a forma clássica da HAC-21OH e para confirmação diagnóstica após *screening* neonatal da HAC-21OH, exceto na presença da mutação I2*splice*. (Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/5:697-704)

Descritores: Deficiência da 21-hidroxilase; Mutações; Genes CYP21A2; Genótipo e fenótipo; Estudo multicêntrico

ABSTRACT

Multicentric Study of Brazilian Patients With 21-Hydroxylase Deficiency: A Genotype-Phenotype Correlation.

We analyzed the clinical and molecular data of 205 patients with the three different clinical forms of 21-hydroxylase deficiency, in whom the clinical and molecular diagnosis were already defined. The most frequent mutations were I2 *splice* in the salt wasting form, I172N in the simple virilizing and V281L in the nonclassical form, presenting similar frequencies as those observed in other populations. We found a lower frequency of 21-hydroxylase gene deletion, similar to that previously identified in Argentinean and Mexican populations. Five new mutations were described in our population: G424S, H28+C, Ins 1003[^]1004 A, R408C and IVS2-2A>G. The genotype was classified in three groups according to the impairment of enzymatic activity observed *in vitro*, Group A: 0-2%, Group B: 3-7% and Group C: >20%. Group A mutations correlated with the salt wasting form, the Group B with simple virilizing form and Group C with the non classical form. The severity of genotype showed a positive cor-

Tânia A.S.S. Bachega
Ana Elisa C. Billerbeck
Érica B. Parente
Sofia H.V. Lemos-Marini
Maria Tereza M. Baptista
Maricilda P. Mello
Gil Guerra Jr.
Hilton Kuperman
Nuvarte Setian
Durval Damiani
Natália Torres
Margaret de Castro
Berenice B. de Mendonça

Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (TASSB, AECB, EBP, BBM) – LIM/42, Disciplina de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas, e Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Instituto da Criança (HK, NS, DD) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo; Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (SHVL-M, MTMB, MPM, GGJ), Departamento de Pediatria, Centro de Investigação em Pediatria e Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas; e Departamento de Clínica Médica (NT, MC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Recebido em 27/08/04
Aceito em 02/09/04

relation with higher 17OH-progesterone and testosterone levels. The I2 splice mutation in homo or hemizygosity confers classical form phenotype with both salt wasting and simple virilizing forms, precluding the prediction of the clinical form through genotype in pre and neonatal diagnosis. The good genotype-phenotype correlation in patients with 21-hydroxylase deficiency shows the usefulness of genotype to predict the clinical form for genetic counseling, prenatal diagnosis and to confirm neonatal screening diagnosis, except in cases with I2 splice mutation. (Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/5:697-704)

Keywords: 21-Hydroxylase deficiency; Mutations; CYP21A2 Gene; Genotype and phenotype; Multi-centric study

A HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA é um dos mais freqüentes erros herdados do metabolismo, sendo a deficiência da enzima 21-hidroxilase (HAC-21OH) responsável por 90% a 95% dos casos (1,2).

A HAC-21OH apresenta diferentes manifestações clínicas que incluem uma forma severa (clássica) com virilização pré-natal da genitália externa em fetos femininos e pós-natal em ambos os sexos, com ou sem perda de sal, e uma forma mais leve em que os sintomas se iniciam mais tardiamente (não clássica) através de pubarca precoce, alterações menstruais, hirsutismo, infertilidade ou podendo também ser assintomática (1). Estas diferentes formas clínicas representam um contínuo espectro do comprometimento da atividade da 21-hidroxilase, causado por mutações no gene que codifica a enzima.

O hormônio marcador do diagnóstico da HAC-21OH é a 17OH-progesterona, que na forma clássica geralmente está acima de 60ng/mL. Na forma não clássica, o critério correntemente utilizado é o valor basal da 17OH-progesterona >5ng/mL (3) ou pós-estímulo com ACTH >10ng/mL, definido antes dos estudos moleculares da HAC-21OH (4).

Genética Molecular da Deficiência da 21-Hidroxilase

O gene que codifica a enzima 21-hidroxilase, denominado CYP21A2, está localizado no braço curto do cromossomo 6, juntamente com o seu pseudogene altamente homólogo CYP21A1P e alternam-se em *tandem* com os genes C4A e C4B, que codificam o quarto componente do complemento sérico (5-7). A alta homologia entre os genes CYP21 e a organização dos genes duplicados em cadeia nesta região do cromossomo favorecem o emparelhamento desigual durante a meiose e, conseqüentemente, a ocorrência de eventos de *cross-*

ing over desiguais, podendo gerar alelos duplicados ou deletados. Através do emparelhamento desigual destes genes, também podem ocorrer eventos de conversão gênica, com transferência de seqüências deletórias do pseudogene para o gene ativo (8).

As mutações mais freqüentes na HAC-21OH são as de ponto. Mais de 65 mutações de ponto foram descritas no gene CYP21A2, das quais 15 são mutações também encontradas no pseudogene, que são transferidas para o gene ativo através de processos de micro-conversão gênica, enquanto que as demais representam eventos mutagênicos casuais (9).

Os grandes rearranjos gênicos são geralmente identificados através de metodologias como o *Southern blotting*, seguido de hibridação com sonda específica para o gene CYP21A2. As mutações de ponto, já conhecidas, podem ser identificadas por técnicas tais como a reação de polimerização em cadeia (PCR) alelo-específico ou PCR seguido de hibridação com sondas de oligonucleotídeos específicas (10,11).

Freqüência das Mutações na População Brasileira com HAC-21OH

É importante a determinação da freqüência das mutações em cada população, pois estas podem variar de acordo com o grupo étnico. Analisamos a freqüência destas mutações numa amostra de 205 pacientes brasileiros. Estes pacientes são provenientes da Unidade de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMUSP (n= 104), da Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Instituto da Criança da FMUSP (n= 13), do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (n= 13) e do Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica da Universidade Estadual de Campinas (n= 75). Estes pacientes foram selecionados após a confirmação do diagnóstico hormonal de HAC-21OH e do diagnóstico molecular, isto é, a identificação de mutações em ambos os alelos.

Considerando-se a forma clínica da doença, 89 pacientes são portadores da forma perdedora de sal, sendo 64 do sexo feminino e 25 do sexo masculino, 71 são portadores da forma virilizante simples, sendo 40 do sexo feminino e 31 do sexo masculino, e 45 portadores da forma não clássica, sendo 43 do sexo feminino e 2 do sexo masculino. Como o padrão da herança desta doença é autossômico recessivo, espera-se igual número de afetados entre os sexos. No entanto, o número menor de indivíduos do sexo masculino nesta amostra sugere que os homens não estão sendo diagnosticados no nosso meio, e que meninos com a forma perdedora de sal devam ir a óbito no período neonatal

por crise de perda de sal, pois a incidência da forma perdedora de sal corresponde a 2/3 dos casos da forma clássica em diferentes casuísticas (12).

Os grandes rearranjos gênicos estão presentes em 20 a 33% dos alelos em pacientes de origem caucasiana (12). Observamos que os grandes rearranjos, deleção do *CYP21A2* e grande conversão gênica, foram identificados em apenas 13% dos alelos. Nossos pacientes, de forma semelhante ao que ocorre em pacientes de origem mexicana e argentina (13,14), apresentaram uma frequência mais baixa de deleções do *CYP21A2* (tabela 1). Os demais alelos apresentam mutações de ponto, e 90 a 95% destes alelos apresentam as mutações que normalmente são encontradas no pseudogene (10,15-17).

As diferentes mutações do gene *CYP21A2* foram correlacionadas com as formas de apresentação clínica. Mutações que alteram a rede de leitura, que alteram os sítios de *splicing* ou que criam códons de parada de leitura são encontradas em pacientes com a forma perdedora de sal, já as mutações do tipo *mis-sense*, que substituem aminoácidos, dependendo da sua posição na proteína, são encontradas nas diferentes formas clínicas da HAC-21OH.

Na nossa casuística, a mutação mais frequente na forma perdedora de sal foi a I2 *splice* presente em 55% dos alelos, na forma virilizante simples a I172N presente em 42% dos alelos, seguida pela I2 *splice* em 25% dos alelos e a V281L na forma não clássica presente em 70% dos alelos (tabela 1). Obtivemos frequência mais baixa das mutações P30L e P453S, associadas à forma não clássica, do que a descrita na literatura (12). Observamos uma associação significativa da mutação I2 *splice* com a forma perdedora de sal, da mutação I172N com a forma virilizante simples e da mutação V281L com a forma não clássica. Apesar da diversidade étnica da população brasileira, a frequência das mutações de ponto em nossa população foi semelhante à da maioria dos estudos populacionais (10,15-17) (tabela 2).

Observamos a ocorrência de duas ou mais mutações de ponto no mesmo alelo em 7% dos alelos. A identificação de duas mutações no DNA de um

paciente não é suficiente para se concluir o diagnóstico molecular, e para adequada genotipagem é necessário realizar a segregação destas mutações no DNA dos pais do paciente. As combinações de mutações por alelo mais frequentes foram Ins T + Q318X + R356W, Q318X + R356W, I2 *splice* + V281L. As duas primeiras combinações contêm mutações que são adjacentes no pseudogene e provavelmente foram transferidas como um único segmento para o gene ativo. As mutações I2 *splice* + V281L não são contíguas e provavelmente foram transferidas em dois processos independentes de micro-conversão. Assim, observamos que qualquer segmento do pseudogene pode ser transferido para o gene ativo.

O estudo dos grandes rearranjos e das mutações de ponto derivadas do pseudogene identificou mutações em 76 a 93% dos alelos na população brasileira com as formas clássica e não clássica da deficiência da 21 hidroxilase (18-22), indicando que os demais alelos devem conter mutações novas.

O seqüenciamento do gene *CYP21A2* foi realizado em pacientes com genótipo incompleto e identificou mutações novas. A primeira foi a mutação G424S encontrada em 4 pacientes com a forma virilizante simples. Todos os indivíduos portadores desta mutação apresentavam, no mesmo alelo, a deleção dos genes *C4A* e *CYP21A1P*, além da presença do HLA DR17, sugerindo um efeito de gene fundador (23). Posteriormente, foi identificada a mutação H28+C em homozigose em paciente proveniente de casamento consanguíneo, portadora da forma perdedora de sal (24). A inserção deste nucleotídeo no códon 28 altera a rede de leitura e cria um códon de parada de leitura no aminoácido 78. Outras mutações foram descritas como a 1003^1004 Ins A, R408C e IVS2-2A>G, identificadas em 11 pacientes com a forma clássica (25). Os indivíduos portadores das mesmas mutações possuíam os mesmos haplótipos em estudo de microssatélites, sugerindo também que estas três mutações são provenientes de um gene fundador. Quatro das cinco mutações novas identificadas na população brasileira apresentam efeito de gene fundador, e a sua pesquisa em outros grupos étnicos pode traçar a origem da nossa população.

Tabela 1. Frequência (%) das mutações derivadas do pseudogene em pacientes brasileiros com as diferentes formas clínicas da deficiência da 21-hidroxilase.

Alelos (n)	Forma Clínica	G.R.	P30L	I2 sp	Del 8 nt	I172N	Cluster	V281L	Ins T	Q318X	R356W	P453S
178	PS	19	-	55	1,7	-	-	5,6	5,6	14	9,5	-
142	VS	10,5	0,7	25	0,7	42	-	0,7	2,8	11	13,4	-
90	NC	5,5	4,4	6,6	3,3	2,2	-	70	-	-	6,6	4,4

PS: perdedor de sal, VS: virilizante simples, NC: não clássica, G.R.: grande rearranjo, sp: splice, Del: deleção

Tabela 2. Frequência (%) das mutações de ponto de acordo com o número total de alelos em diferentes populações com a forma clássica e não clássica da deficiência da 21-hidroxilase.

País (n)	Alelos	P30L	I2 sp	Del 8 nt	I172N	Cluster	V281L	Ins T	Q318X	R356W	P453S	Referências
Suécia	186	1,6	30,5	1,2	20,8	1,1	7	0,5	3,2	4,3	0,5	11
França	182	*	20	7	4	11	15	1	*	*	*	15
EUA	158	2,5	26	10	15,8	6,3	8,9	2,5	5,7	7,6	*	10
Espanha	76	2,6	25	4	1,3	0	18,4	1,3	4	4	*	16
Argentina	72	*	18	2,7	15,3	0	*	*	13,8	5,5	*	14
Itália	146	8,2	29,4	1,4	9,6	0	15,8	0,7	10,3	0,7	*	17
México	94	8,5	47	2,1	11,7	0	8,5	1,1	4,3	7,4	2,1	38
Brasil	410	1	34	1,7	14	0	18	3	7,3	11	1	Presente Estudo

*: mutação não pesquisada, sp: splice, Del: deleção

A técnica de seqüenciamento permitiu identificar mutações em 100% dos alelos da forma clássica, enquanto que a forma não clássica permanece com 88% dos alelos sem mutações identificadas. Este último fato também é observado em outros estudos populacionais que incluíram em sua amostra número significativo de pacientes com a forma não clássica (15,16,26).

Correlação do Genótipo com o Fenótipo

A alta frequência de pacientes com a HAC-21OH permite correlacionar as diferentes manifestações clínicas da doença com a atividade enzimática conferida por cada mutação observada em estudos de mutagenese e expressão *in vitro* (tabela 3). Speiser e cols. (10) dividiram as mutações em grupos de acordo com o comprometimento da atividade enzimática. O grupo A incluiu as mutações que abolem a atividade enzimática, subgrupo A1: grandes rearranjos, deleção de 8 nucleotídeos no éxon 3, *cluster*, Ins T, R356W, Q318X e subgrupo A2: a mutação I2 *splice* que confere <2% de atividade *in vitro*. O grupo B incluiu a mutação I172N que confere 3 a 7% de atividade enzimática. O grupo C incluiu as mutações V281L e P30L, que conferem mais que 20% de atividade enzimática. Os autores observaram que indivíduos homocigotos para mutações do grupo A apresentaram principalmente a forma perdedora de sal, homocigotos para a mutação do grupo B ou em heterocigose composta com as mutações do grupo A apresentaram a forma virilizante simples, e os homocigotos para mutações do grupo C ou em heterocigose composta com as anteriores apresentaram a forma não clássica. Foi observado que a forma clínica em um indivíduo heterocigoto composto, isto é, mutações diferentes entre os alelos, é definida pelo alelo que apresenta maior atividade enzimática.

Analisando a nossa amostra de pacientes com genótipo definido, observamos que 39% eram homocigotos para uma determinada mutação e os

demais heterocigotos compostos. Cento e dez pacientes apresentaram genótipo do grupo A (35 subgrupo A1 e 75 subgrupo A2), 46 do grupo B e 49 do grupo C. Os genótipos mais frequentes estão descritos na tabela 4. Entre os pacientes com genótipo do subgrupo A1/A1, 23 apresentaram a forma perdedora de sal e 12 a forma virilizante simples e no subgrupo A2, 62 pacientes apresentaram a forma perdedora de sal e 13 a forma virilizante simples. A forma virilizante simples em pacientes com genótipo do grupo A esteve relacionada principalmente com a presença das mutações R356W e I2 *splice*.

Todos os pacientes com o genótipo do grupo B, exceto um (genótipo I172N/V281L), apresentaram a forma virilizante simples, de forma semelhante ao observado em outros estudos populacionais (10,15-17). Em trabalho de origem finlandesa (27), este genótipo foi também associado à forma perdedora de sal, embora os mecanismos que justificassem esta associação não tenham sido esclarecidos.

Os pacientes com genótipo do grupo C, exceto quatro, apresentaram a forma não clássica. Destes quatro pacientes, três apresentavam a forma perdedora de sal e um a forma virilizante simples, e os seus genótipos continham um alelo com mutação do grupo A e o outro alelo com a mutação V281L do grupo C. Entretanto, como o DNA destes pacientes não foi seqüenciado, não podemos afastar a existência de uma segunda mutação no alelo que contem a mutação V281L. Casos com genótipos e fenótipos semelhantes a estes 4 pacientes foram descritos previamente (28), e o posterior seqüenciamento do DNA identificou uma nova mutação em todos os casos no alelo contendo a mutação V281L (dados não publicados).

Analisamos, nesta amostra, outros dados clínicos e laboratoriais dos diferentes genótipos. A média dos valores basais de 17-hidroxiprogesterona e da testosterona nos diferentes grupos genotípicos correlacionou-se com a severidade do comprometimento da

Tabela 3. Mutações mais freqüentes encontradas na deficiência da 21-hidroxilase agrupadas de acordo com o comprometimento da atividade enzimática observado in vitro.

Grupo	Comprometimento Enzimático	Mutação	Atividade in vitro
A1	Completo	Deleção CYP21A2	0
	Completo	Grande conversão	0
	Completo	Del 8 nt E3	0
	Completo	Ins T E7	0
	Completo	Q318X	0
	Completo	Cluster E6	0
A2	Quase completo	R356W	detectável
	Quase completo	I2 splice	<2%
B	Severo	I172N	3-7%
C	Moderado	V281L	>20%
	Moderado	P30L	25-50%
	Moderado	P453S	66%

E: exon. Atividade in vitro retirada das referências Tusie-Luna e cols. (39), Higashi e cols. (40) e Helmborg e cols. (41).

Tabela 4. Genótipos mais freqüentes identificados na população brasileira com HAC-21OH e suas manifestações clínicas.

Grupos Genotípicos	n	Sexo		Forma			IC Diagnóstico	Prader (variação)
		F	M	PS	VS	NC		
Grupo A								
GR/GR	7	4	3	4	3		15 d	III a IV
GR/ I2 splice	19	15	4	15	4		49 d	II a V
I2 splice/ I2 splice	32	17	15	27	5		38 d	III a V
I172N/I172N	15	6	9	0	15		5 a	II a III
I172N/I2 splice	13	9	4	1	12		5,5 a	III a IV
V281L/V281L	18	18	0	0	0	18	17 a	-
V281L°/GR	8	7	1	2	1	5	4,6 a	III*

GR: grande rearranjo, d: dias, a: anos, *: identificada virilização da genitália externa apenas na forma clássica, °: o DNA destes indivíduos não foi seqüenciado e não pode ser afastada a presença de uma mutação severa no alelo contendo a mutação V281L

atividade do genótipo. A média dos níveis da 17OH-progesterona no grupo A foi de 230 ± 119 ng/mL, no grupo B foi de 176 ± 95 ng/mL e no grupo C foi de 16 ± 16 ng/mL ($p < 0,05$). A média dos níveis de testosterona no grupo A foi de 242 ± 157 ng/mL, no grupo B foi de 142 ± 75 ng/mL e no grupo C foi de 61 ± 38 ng/mL ($p < 0,05$). A média do grau de virilização da genitália externa no grupo A foi Prader III, variando de Prader II a V e no grupo B foi Prader III, variando de I a V. Pacientes com genótipo do grupo A apresentaram maior grau de virilização da genitália externa, porém houve uma grande sobreposição com o grau de virilização das pacientes com genótipo do grupo B. Isto se deve provavelmente a variações individuais na sensibilidade dos tecidos aos andrógenos.

Houve uma boa correlação do genótipo com o fenótipo. Todos os pacientes com genótipo do grupo A apresentaram a forma clássica, este genótipo esteve correlacionado com a forma perdedora de sal em 77% dos casos. O genótipo do grupo B esteve correlacionado

com a forma virilizante simples em 98% dos casos e o do grupo C com a forma não clássica em 92% dos casos.

Apesar da boa correlação do genótipo com o fenótipo, algumas divergências foram observadas, principalmente com a mutação I2 *splice*. Indivíduos homocigotos ou hemizigotos (I2 *splice*/deleção CYP21A2 ou grande rearranjo) apresentam principalmente a forma perdedora de sal, mas também são descritos indivíduos portadores da forma virilizante simples (10). Verificamos, nesta série, que não houve diferença na manifestação clínica entre pacientes homocigotos ou hemizigotos para esta mutação, 15/18 dos pacientes homocigotos e 15/19 dos hemizigotos apresentaram a forma perdedora de sal, e não observamos diferenças nos valores de sódio ou na época de manifestação da desidratação entre os dois grupos. Os demais casos apresentaram a forma virilizante simples e isto pode ser justificado pelo fato do maquinário celular reconhecer o sítio normal de *splicing* em uma pequena proporção, mas produzindo

quantidade de aldosterona suficiente para evitar a crise de perda de sal. Witchel e cols. (29) avaliaram 38 indivíduos portadores da mutação I2 *splice* em homozigose ou hemizigose e também verificaram que as manifestações clínicas variaram da forma perdedora de sal à assintomática. Na nossa amostra, nenhum indivíduo portador de um destes genótipos foi assintomático. Acreditamos que o genótipo destes últimos casos relatados na literatura deve ser conseqüente de um artefato na realização da PCR, onde neste *locus* é freqüente a falha da amplificação do alelo normal, fenômeno conhecido como *allelic drop out* (30).

Outra divergência observada foi nos pacientes portadores dos grandes rearranjos em homozigose, 3/7 indivíduos apresentaram a forma virilizante simples. Classicamente, o alelo resultante de deleção do *CYP21A2* ou de conversão gênica é um gene híbrido que apresenta na sua porção 5' seqüências do pseudo-gene e na porção 3' seqüências do gene ativo. Em 92% dos genes híbridos, o ponto de fusão do gene híbrido ocorre após o éxon 3 (31), tendo, portanto, este gene, a mutação del 8 nt do exon 3 que leva à perda total da atividade da enzima. Um dos 7 pacientes teve seu gene híbrido estudado e confirmou a presença da mutação Del 8 nt. Speiser e cols. (32) identificaram uma paciente com a forma perdedora de sal, homozigota para a deleção do *CYP21A2*; o interessante é que esta paciente na idade adulta, após interromper as medicações, não desidratou. A explicação postulada para estes pacientes é na provável existência de uma 21-hidroxição extra-adrenal (33).

Forma não Clássica da HAC-21OH

Os indivíduos com a forma não clássica apresentam mutações do grupo C (V281L, P453S ou P30L) em homozigose ou em heterozigose, composta com as mutações dos grupos A ou B. Como o fenótipo na HAC-21OH é conferido pelo alelo com maior atividade enzimática, verificamos se estes dois genótipos apresentaram diferenças fenotípicas. Não houve diferença na idade de início de apresentação dos sintomas entre os dois grupos, a pubarca precoce foi identificada em igual freqüência em ambos grupos. A severidade das manifestações hiperandrogênicas deve depender de outras variáveis, tais como a atividade do receptor de andrógenos e a atividade da 5 α -reductase na pele (34). Entretanto, houve uma diferença significativa entre os valores da 17OH-progesterona basal e após ACTH. A média da 17-OH progesterona basal foi de 9 ± 6 ng/mL e de 22 ± 20 ng/mL nos grupos C/C e A/C, respectivamente. A média da 17-OH progesterona após ACTH foi de 45 ± 32 ng/mL e de 82 ± 27 ng/mL nos grupos C/C e

A/C, respectivamente. Estes dados mostram uma influência do alelo A na severidade do fenótipo. Mas como houve uma grande sobreposição dos valores da 17OH-progesterona pós-ACTH entre os dois grupos genotípicos, não foi possível a discriminação entre homozigotos e heterozigotos compostos utilizando-se apenas os valores hormonais. A importância da discriminação de indivíduos com a forma não clássica e heterozigotos compostos para mutações severas é que estes podem gerar filhos com a forma clássica da deficiência da 21-hidroxiase, se o outro cônjuge for heterozigoto para uma mutação severa, cuja freqüência na população é da ordem de 1:60 (12).

Um outro fato que merece discussão é o critério diagnóstico hormonal da forma não clássica, definido por valores da 17OH-progesterona após ACTH > 10 ng/mL (4), antes dos estudos do gene *CYP21A2*. Analisamos, nesta amostra de pacientes com a forma não clássica e com genótipo definido, os valores basais da 17OH-progesterona e verificamos que os valores estiveram > 5 ng/mL em 80% dos pacientes, entre 2 e 5 ng/mL em 9% e > 2 ng/mL em 11% dos pacientes. O menor valor da 17OH-progesterona após ACTH foi de 17 ng/mL. Azziz e cols. (35), ao analisarem pacientes com forma não clássica, observaram que a maioria apresentava valores da 17OH-progesterona após ACTH > 15 ng/mL. Em nosso estudo anterior (26) e em estudo realizado por Deneaux e cols. (36), observou-se que o menor valor da 17OH-progesterona após ACTH é de 17 ng/mL em paciente com genótipo definido. Por outro lado, em trabalho prévio, foram identificados 2/59 indivíduos heterozigotos obrigatórios para a deficiência da 21-hidroxiase, com valores da 17OH-progesterona pós-ACTH de 11 e de 15 ng/mL (37). O seqüenciamento do gene *CYP21A2* destes indivíduos não identificou outras mutações, confirmando o estado de heterozigose. Portanto, estes dados indicam que os valores da 17OH-progesterona após ACTH entre 10 e 17 ng/mL podem ocorrer em indivíduos heterozigotos e com forma não clássica da deficiência da 21-hidroxiase, sendo o estudo molecular do gene *CYP21A2* útil nesta diferenciação.

CONCLUSÕES

As mutações mais freqüentes na população brasileira com deficiência da 21-hidroxiase são também as derivadas do pseudogene *CYP21A1P*, podendo ser pesquisadas por técnicas como o PCR alelo-específico. O seqüenciamento do gene *CYP21A2* deve ser reali-

zado nos casos com genótipo não definido para identificar mutações mais raras.

Os genótipos A, B e C corresponderam às formas perdedora de sal, virilizante simples e não clássica, respectivamente. A mutação I2 *splice* do grupo A, a mais freqüente mutação na HAC-21OH, foi associada principalmente à forma perdedora de sal, mas também à forma virilizante simples.

A boa correlação do genótipo com o fenótipo na HAC-21OH permite sua aplicação na prática clínica para o aconselhamento genético e no diagnóstico e tratamento pré-natal das gestações de risco para a forma clássica da HAC-21OH, e após *screening* neonatal da HAC-21OH.

REFERÊNCIAS

1. New MI, White PC, Pang S, Dupont B, Speiser PW. The adrenal hyperplasias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly S, Valle D, eds. **The metabolic basis of inherited disease**. New York: McGraw-Hill Inc, 1989. p.1881-918.
2. Morel Y, Miller WL. Clinical and molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. In: Harris H, Hirschhorn K, eds. **Adv Hum Genet** 1991;20:1-68.
3. Dewailly D, Vantyghem-Haudiquet MC, Buvat J, Cappoen JP, Ardaens K, Racadot A, et al. Clinical and biological phenotypes in late-onset 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1989;63:418-23.
4. New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollock MS, et al. Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. **J Clin Endocrinol Metab** 1983;57:320-6.
5. Carroll MC, Campbell RD, Porter RR. Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. **Proc Natl Acad Sci USA** 1985;82:521-5.
6. White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986;83:5111-5.
7. Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. **Proc Natl Acad Sci USA** 1986;83:2841-5.
8. Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Fujii-Kuriyama Y. Evidence for frequent gene conversions in the steroid 21-hydroxylase (P-450c21) gene: implications for steroid 21-hydroxylase deficiency. **Am J Hum Genet** 1988;42:17-25.
9. Lee H. CYP21 mutations and congenital adrenal hyperplasia. **Clin Genet** 2001;59:293-301.
10. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusié-Luna MT, et al. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Invest** 1992;90:584-95.
11. Wedell A, Thilén A, Ritzén EM, Stengler B. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. **J Clin Endocrinol Metab** 1994;78:1145-52.
12. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **Endocr Rev** 2000;21:245-91.
13. Tusié-Luna MT, Ramírez-Jiménez S, Ordóñez-Sánchez ML, Cabello-Villegas J, Altamirano-Bustamante N, Calzada-León R, et al. Low frequency of deletion alleles in patients with steroid 21-hydroxylase deficiency in a Mexican population. **Human Genet** 1996;98:376-9.
14. Dardis A, Bergada I, Bergada C, Rivarola M, Belgorosky A. Mutations of the steroid 21-hydroxylase gene in an Argentinian population of 36 patients with classical congenital adrenal hyperplasia. **J Pediatr Endocrinol Metab** 1997;10: 55-61.
15. Mornet E, Créte P, Kuffenn F, Raux-Demay M-C, Boué J, White PC, et al. Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. **Am J Hum Genet** 1991;48:79-88.
16. Ezquieta B, Oliver A, Gracia R, Gancedo PG. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. **Hum Genet** 1995;6:198-204.
17. Carrera P, Bordone L, Azzani T, Brunelli V, Garancini MP, Chiumello G, et al. Point mutations in Italian patients with classic, non-classic, and cryptic forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. **Hum Genet** 1996;98:662-5.
18. Araújo M, Sanches MR, Suzuki LA, Guerra Jr 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** 1996;29:1-13.
19. Paulino LC, Araujo M, Guerra Jr G, Marini SHVL, Mello MP. Mutation distribution and CYP21/C4 locus variability in Brazilian families with the classical form of the 21-hydroxylase deficiency. **Acta Paediatr** 1999;88:275-83.
20. Bachega TASS, Billerbeck AEC, Madureira G, Marcondes JAM, Longui CA, Leite MV, et al. 21-Hydroxylase in Brazil. **Braz J Med Biol Res** 2000;33:1211-6.
21. Witchel SF, Smith R, Crivellaro CE, Manna TD, Dichtchekian V, Setian N, et al. CYP21 mutations in Brazilians patients with 21-hydroxylase deficiency. **Hum Genet** 2000;106:414-9.
22. Torres N, Mello MP, Germano CMR, Elias LLK, Moreira AC, Castro M. Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the CYP21A1P to the CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. **Braz J Med Biol Res** 2003;36:1311-8.
23. Billerbeck AEC, Bachega TASS, Frazzatto ET, Nishi MY, Goldberg AC, Marin ML, et al. A novel missense mutation, Gly424Ser, in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:2870-2.
24. Lau IF, Soardi FC, Lemos-Marini SH, Guerra Jr G, Baptista MT, de Mello MP. 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;86:5877-80.

25. Billerbeck AEC, 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** 2002;87:4314-7.
26. Bachega TASS, Billerbeck AEC, Marcondes JAM, Madureira G, Arnhold IJP, Mendonça BB. Influence of different genotypes on 17-hydroxyprogesterone levels in patients with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **Clin Endocrinol** 2000;52:601-7.
27. 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;82:3293-7.
28. Bachega TASS, Billerbeck AEC, Madureira G, Marcondes JAM, Longui CA, Leite MV. Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83:4416-9.
29. Witchel SF, Bhamidipati DK, Hoffman EP, Cohen JB. Phenotypic heterogeneity associated with the splicing mutation in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1996;81:4081-8.
30. Day DJ, Speiser PW, Schulze E, Bettendorf M, Fitness J, Barany F, et al. Identification of non-amplifying CYP21 genes when using PCR-based diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia (CAH) affected pedigree. **Hum Mol Genet** 1996;5:2039-48.
31. Bachega TASS, Billerbeck AEC, Madureira G, Arnhold IJP, Medeiros MA, Marcondes JAM, et al. Low frequency of CYP21B deletions in Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **Hum Hered** 1999;49:9-14.
32. Speiser PW, Agdere L, Ueshiba H, White PC, New MI. Aldosterone synthesis in salt wasting congenital adrenal hyperplasia with complete absence of adrenal 21-hydroxylase. **N Engl J Med** 1991;324:145-9.
33. Winkel CA, Casey ML, Worley RJ, Madden JD, MacDonald PC. Extraadrenal steroid 21-hydroxylase activity in woman with congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 1983;56:104-7.
34. Vottero A, Stratakis CA, Ghizzoni L, Longui CA, Karl M, Chrousos GP. Androgen receptor-mediated hypersensitivity to androgens in women with nonhyperandrogenic hirsutism: skewing of X-chromosome inactivation. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:1091-5.
35. Azziz R, Dewailly D, Owerbach D. Clinical review 56: non-classical adrenal hyperplasia current concepts. **J Clin Endocrinol Metab** 1994;78:810-5.
36. Deneuve C, Tardy V, Dib A, Mornet E, Billaud L, Charran D, et al. Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86(1):207-13.
37. Bachega TASS, Brenha EML, Billerbeck AEC, Marcondes JAM, Madureira G, Arnhold IJP, et al. Variable ACTH-stimulated 17-hydroxyprogesterone values in 21-hydroxylase deficiency carriers are not related to the different CYP21 gene mutations. **J Clin Endocrinol Metab** 2002;87:786-90.
38. Ordóñez-Sánchez ML, Ramírez-Jiménez S, López-Gutiérrez AU, Riba L, Gamboa-Cardiel S, Cerrillo-Hinojosa M, et al. Molecular genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population: identification of possible new mutations and high prevalence of apparent germ-line mutations. **Hum Genet** 1998;102:170-7.
39. Tusie-Luna MT, Speiser PW, Dumic M, New MI, White PC. A mutation (P-30L to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency allele. **Mol Endocrinol** 1991;5:685-92.
40. Higashi Y, Hiromasa T, Tanae A, Miki T, Nakura J, Kondo T, et al. 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. **J Biochem** 1991;109:638-44.
41. Helmberg A, Tusie-Luna MT, Tabarelli M, Kofler R, White PC. R339H e P453S: CYP21 mutations associated with nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. **Mol Endocrinol** 1992;6:1318-22.

Endereço para correspondência:

Tânia A.S.S. Bachega
Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 155,
Prédio dos Ambulatórios, 2º andar, Bloco 6
05403-900 São Paulo, SP
e-mail: tbachega@usp.br