

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RAQUEL FERREIRA ARAUJO

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE CYP21A2 DE CRIANÇAS COM
TRIAGEM POSITIVA PARA HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA,
ASSINTOMÁTICAS E COM NÍVEIS PERSISTENTEMENTE
ELEVADOS DE 17-HIDROXIPROGESTERONA**

BELO HORIZONTE

2020

Raquel Ferreira Araujo

Análise molecular do gene CYP21A2 de crianças com triagem positiva para hiperplasia adrenal congênita, assintomáticas e com níveis persistentemente elevados de 17-hidroxiprogesterona

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Profa. Ivani Novato Silva.

Coorientadora: Profa. Isabela Leite Pezzuti.

Belo Horizonte

2020

Araujo, Raquel Ferreira.
AR663a Análise molecular do Gene CYP21A2 de crianças com triagem positiva para Hiperplasia Adrenal Congênita, assintomáticas e com níveis persistentemente elevados de 17-Hidroxiprogesterona [manuscrito]. / Raquel Ferreira Araujo. - - Belo Horizonte: 2020.
55f.: il.
Orientador (a): Ivani Novato Silva.
Coorientador (a): Isabela Leite Pezzuti.
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Triagem Neonatal. 2. Hiperplasia Suprarrenal Congênita. 3. Genótipo. 4. 17-alfa-Hidroxiprogesterona. 5. Dissertação Acadêmica. I. Silva, Ivani Novato. II. Pezzuti, Isabela Leite. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QU 500

VIA DO ALUNO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANÁLISE MOLECULAR DO GENE CYP21A2 DE CRIANÇAS COM TRIAGEM POSITIVA PARA HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA, ASSINTOMÁTICAS E COM NÍVEIS PERSISTENTEMENTE ELEVADOS DE 17-HIDROXIPROGESTERONA

RAQUEL FERREIRA ARAUJO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE - SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE, área de concentração em CIÊNCIAS DA SAÚDE.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Prof.^a Ivani Novato Silva - Orientadora
UFMG

Prof.^a Isabela Leite Pezzuti - Coorientadora
UFMG

Prof.^a Gláucia Manzan Queiroz de Andrade
UFMG

Prof.^a Leticia Ferreira Gontijo Silveira
UFMG

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2020.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora: Prof.a Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Fabio Alves da Silva Junior

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Mário Fernando Montenegro Campos

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Humberto José Alves

Vice-Diretora da Faculdade de Medicina: Prof.a Alamanda Kfoury Pereira

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof.a Eli Iola Gurgel Andrade

Chefe do Departamento de Pediatria: Profa. Mônica Maria de Almeida Vasconcelos

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

da Criança e do Adolescente: Prof.a Roberta Maia de Castro Romanelli

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Saúde da Criança e do Adolescente: Prof.a Débora Marques de Miranda

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da

Criança e do Adolescente:

Prof.a Ana Cristina Simões e Silva

Prof. Eduardo Araújo de Oliveira

Prof. Jorge Andrade Pinto Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira

Prof.a Helena Maria Gonçalves Becker

Prof.a Ana Cristina Côrtes Gama

Prof.a Roberta Maia de Castro Romanelli

Prof.a Luana Caroline dos Santos

Prof.a Juliana Gurgel

Prof.a Ivani Novato Silva

Prof.a Débora Marques de Miranda
Prof. Leandro Fernandes Malloy Diniz
Prof. Sérgio Veloso Brant Pinheiro
Prof. Cássio da Cunha Ibiapina
Prof.a Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana
Prof.a Lêni Márcia Anchieta
Prof.a Ariene Silva do Carmo

AGRADECIMENTOS

À Professora Ivani Novato Silva, por despertar em mim o pensamento crítico de pesquisadora. Agradeço por podermos realizar junto este projeto e por ter disponibilidade sem igual e sabedoria materna para me guiar neste trabalho.

À Professora Isabela Leite Pezzuti, minha coorientadora, por compartilhar comigo sua sabedoria e experiência de pesquisa e me incentivar.

À Professora Cristina Botelho Barra, ao Mestre Rafael Machado Mantovani, à colega Nathalia Teixeira Palla Brag e ao amigo Rodrigo Rezende Arantes pela dedicação e ajuda na coleta de materiais e dados.

Ao NUPAD/FM/UFMG, que proporcionou o apoio logístico e financeiro que permitiu a realização deste estudo. À equipe do Setor de Apoio Operacional, de coleta e do Laboratório, que não pouparam esforços para me ajudar neste trabalho. Em especial à Doutora Nara de Oliveira Carvalho, que realizou toda a biologia molecular e sempre esteve disponível para ensinar.

Ao Fernando Henrique Pereira, estatístico da Pós-graduação da FM-UFMG, que vem me ajudando desde a época em que eu era residente e que muito colaborou no labirinto das medianas, vieses e desvios-padrão desta empreitada.

Aos funcionários do Ambulatório São Vicente por sempre colaborarem com o nosso trabalho.

Aos professores, colegas e secretárias do curso de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da UFMG, pelo companheirismo e atenção.

A toda a minha família pela compreensão dos momentos de ausência frequentes e pelo apoio incondicional.

Ao meu esposo, Rodrigo, pelo incentivo, paciência e compreensão diante das horas intermináveis de estudo e dedicação.

À minha filha, Bárbara, razão pela qual não desisti no meio do caminho.

A todos os pacientes que participaram deste estudo e seus familiares, pela colaboração sem fim e o aprendizado que me proporcionaram.

“É mais fácil construir crianças fortes do que reparar homens quebrados”.

Frederic Douglas.

RESUMO

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) consiste em um grupo de doenças causadas por deficiência enzimática na biossíntese do cortisol. A deficiência da enzima 21alfa-hidroxilase (21OH) é a mais comum. A análise das mutações do gene CYP21A2 de crianças com triagem positiva para HAC pode elucidar os casos duvidosos, encurtando o tempo de seguimento dessas crianças e diminuindo o estresse familiar. Diante disso, o objetivo do trabalho foi determinar se crianças com triagem positiva para hiperplasia, assintomáticas e com níveis persistentemente elevados de 17OHP apresentavam alterações no gene CYP21A2 que justificassem os achados laboratoriais. Trata-se de estudo transversal, que avaliou, por meio do sequenciamento completo do CYP21A2, o genótipo de 36 crianças assintomáticas que estavam em acompanhamento no ambulatório do programa de triagem neonatal de Minas Gerais (PTN-MG) por apresentarem, há mais de seis meses, níveis elevados de 17OHP. Os pacientes foram agrupados conforme a presença de mutações em: Forma Não-Clássica, Heterozigotos para mutações conhecidas, portadores do polimorfismo N493S isolado e negativo para qualquer mutação. Para possibilitar melhor análise do éxon 10 foi criado um grupo controle constituído por 46 crianças provenientes do PTN-MG, que tiveram triagem neonatal normal para HAC. O estudo foi aprovado pelo COEP da UFMG. Foi possível identificar que 17 dos 36 pacientes (47%) tinham genótipo compatível com a forma não clássica da doença, sendo o V281L/Q318X e o V281L/I2G, os mais frequentes. Nove pacientes (25%) eram heterozigotos e nove (25%) apresentavam o polimorfismo N493S no éxon 10, sem associação com outra mutação. Em apenas um paciente não foi encontrado nenhuma mutação ou polimorfismo. O polimorfismo N493S estava presente em 34 dos 36 pacientes (94,4%), sendo 80% na forma homozigota. Essa alteração também foi encontrada, na mesma proporção, nos pacientes sem elevação dos níveis de 17OHP. A análise molecular do gene CYP21A2 contribuiu para o diagnóstico da forma não clássica da HAC de quase metade das crianças com triagem positiva para a doença, assintomáticas e com aumento persistente da 17OHP. Um percentual bastante elevado. Foi identificado a presença do polimorfismo N493S, já associado à redução da atividade enzimática da

21OH, em 95% dos pacientes. Esse achado precisa ser melhor esclarecido.

Palavras-chaves: triagem neonatal; hiperplasia suprarrenal congênita; genótipo; 17-alfa-hidroxiprogesterona.

ABSTRACT

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) consists of a group of diseases caused by enzyme deficiency in cortisol biosynthesis. Deficiency of the 21alpha-hydroxylase enzyme (21OH) is the most common. The analysis of CYP21A2 gene mutations in children with positive screening for CAH can elucidate doubtful cases, shortening the follow-up time for these children and decreasing family stress. Therefore, the objective of the study was to determine whether children with positive screening for hyperplasia, asymptomatic and with persistently high levels of 17OHP, had alterations in the CYP21A2 gene that justified the laboratory findings. This is a cross-sectional study that evaluated, through complete sequencing of CYP21A2, the genotype of 36 asymptomatic children who were being followed up at the outpatient neonatal screening program of Minas Gerais (PTN-MG) for presenting, more than six months, high levels of 17OHP. Patients were grouped according to the presence of mutations in: Non-Classical Form, Heterozygotes for known mutations, carriers of the isolated N493S polymorphism and negative for any mutation. To enable a better analysis of exon 10, a control group was created, consisting of 46 children from PTN-MG, who had normal neonatal screening for CAH. The study was approved by the UFMG COEP. It was possible to identify that 17 of the 36 patients (47%) had a genotype compatible with the non-classical form of the disease, with V281L / Q318X and V281L / I2G being the most frequent. Nine patients (25%) were heterozygous and nine (25%) had the N493S polymorphism in exon 10, with no association with another mutation. No mutations or polymorphisms were found in only one patient. The N493S polymorphism was present in 34 of the 36 patients (94.4%), 80% in the homozygous form. This change was also found, in the same proportion, in patients without elevated levels of 17OHP. Molecular analysis of the CYP21A2 gene contributed to the diagnosis of the non-classic form of CAH in almost half of children with positive screening for the disease, asymptomatic and with a persistent increase in 17OHP. A very high percentage. The presence of the N493S polymorphism, already associated with a reduction in the enzymatic activity of 21OH, was identified in 95% of patients. This finding needs to be further clarified.

Keywords: newborn screening; congenital adrenal hyperplasia; genotype; 17-alpha-hydroxyprogesterone.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esteroidogênese adrenal.....	14
FIGURA 2: Esquema de emparelhamento desigual durante a meiose entre o gene CYP21A2 e CYP21P.....	16
FIGURA 3: Valores de referência da 17-OHP no papel filtro do PTN- MG.....	24
FIGURA 4: Fluxograma do protocolo de tratamento e acompanhamento clínico de crianças com HAC do PTN- MG.....	24
FIGURA 5: Fluxograma da triagem neonatal da hiperplasia adrenal congênita.....	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Valores de referência para a 17OHP, androstenediona e testosterona séricas.....	25
TABELA 2: Caracterização de 36 crianças com 17OHP sérica persistentemente elevada.....	37
TABELA 3: Caracterização de 36 crianças conforme resultado da análise molecular do gene CYP21A2.....	37
TABELA 4: Genótipo de 35 crianças conforme resultado da análise molecular do gene CYP21A2.....	38
TABELA 5: Comparação das medianas da 17OHP, androstenediona e testosterona séricas conforme resultado da análise molecular do gene CYP21A2.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

17OHP -	17 alfa hidroxiprogesterona
21OH -	21 alfa hidroxilase
21OHD -	Deficiência da 21alfa hidroxilase
ACTH -	Hormônio adrenocorticotrófico
DHT -	5 α -dihidrotestosterona
DNA-	Ácido desoxirribonucleico
HAC -	Hiperplasia Adrenal Congênita
HC-	Hospital das Clínicas
HLA-	lócus do complexo de histocompatibilidade
NUPAD -	Núcleo de Pesquisa e Ações em Apoio Diagnóstico
IC -	Intervalo de confiança
ICMA-	Ensaio imunoquimiluminométrico
LC-MS/MS -	Cromatografia líquida - espectrometria de massa em tandem
MLPA-	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
NCBI -	<i>National Center for biotechnology information</i>
NC-HAC -	Hiperplasia de supra renal forma não clássica
PTN-MG -	Programa de Triagem Neonatal do Estado de Minas Gerais
PS -	Perdedora de sal
RN-	Recém-Nascido
SNPs -	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
SPSS -	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCLE -	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFMG-	Universidade Federal de Minas Gerais
VS -	Virilizante simples

SUMÁRIO¹

1 REVISÃO DA LITERATURA	13
1.1 Hiperplasia adrenal congênita	13
1.2 HAC por deficiência da 21OH.....	14
1.3 Triagem neonatal para HAC por 21OHD.....	16
1.3.1 Dificuldades da triagem neonatal para HAC.....	17
1.3.2 Análise molecular do gene CYP21A2.....	18
1.3.3 Polimorfismo N493S.....	20
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 PACIENTES E MÉTODOS	22
3.1 Desenho do estudo e casuística.....	22
3.1.1 Protocolo atual da triagem para HAC do PTN-MG	22
3.1.2 Avaliação clínico-laboratorial.....	26
3.1.3 Avaliação genética	26
3.2 Análise estatística	27
3.3 Aspectos éticos.....	28
REFERÊNCIAS.....	29

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2011. As referências foram normatizadas pelo estilo Vancouver.

4 RESULTADOS.....	32
4.1 Artigo.....	32
APÊNDICES	46
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	47
APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Grupo Controle	49
ANEXOS	51
ANEXO A – Declaração de apoio institucional	52
ANEXO B – Parecer de aprovação do COEP	53
ANEXO C – Folha de aprovação	54

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Hiperplasia adrenal congênita

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) consiste em um grupo de doenças causadas por deficiência enzimática na biossíntese do cortisol nas glândulas adrenais e consequente estímulo do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), produzido na hipófise, por mecanismo de retroalimentação em alça (*feedback*). Além da deficiência de cortisol, está presente aumento, ou diminuição, em razão da deficiência enzimática, da produção de mineralocorticoides e esteroides sexuais (PANG *et al.*, 1982).

Embora cada complexo enzimático envolvido na síntese do cortisol no córtex adrenal possa sofrer algum comprometimento e levar à hiperplasia glandular e acúmulo de precursores esteroides, em aproximadamente 95% dos casos, a hiperplasia adrenal é causada pela deficiência da 21 α -hidroxilase (21OH) (PANG *et al.*, 1982). Esta forma de hiperplasia adrenal está relacionada às alterações do gene CYP21A2, que codifica a enzima 21OH, com consequente deficiência de aldosterona e cortisol e aumento de andrógenos.

A deficiência de 21OH é monogênica, resulta de herança autossômica recessiva e a maior parte dos pacientes é heterozigota composta. Há um espectro bioquímico e fenotípico da doença, que varia desde formas leves, sem clínica evidente, a formas graves. A manifestação clínica é definida pelo alelo que resulta em maior função enzimática. Na maior parte dos casos há uma boa correlação genótipo-fenótipo (SPEISER *et al.*, 2010).

A incidência da HAC por deficiência da 21OH na forma clássica, no Brasil e no estado de Minas Gerais (PEZZUTI *et al.*, 2014), segue a referência mundial de 1:10.000 a 1:20.000 nascimentos, geralmente em torno de 1:15.000 (PANG *et al.*, 1982). Há uma variação substancial na incidência de acordo com a etnia e o background genético. A taxa de portadores heterozigotos é em torno de 1:60. A HAC forma não clássica é, claramente, mais comum e sua incidência nos caucasianos é de 1:1.000, chegando a 1:27 nos judeus Ashkenazi (PEZZUTI *et al.*, 2014).

1.2 HAC por deficiência da 21OH

Como resultado da disfunção da 21OH, há diminuição na síntese de glicocorticoides e mineralocorticoides e acúmulo dos precursores esteroides anteriores ao bloqueio, com desvio para a formação de andrógenos potentes, como a testosterona e a 5 α -dihidrotestosterona (DHT), já que não há bloqueio na via de produção dos andrógenos adrenais (FIGURA 1). O principal precursor acumulado, que é o marcador da HAC, é a 17 α -hidroxiprogesterona (17OHP). Ele é usado tanto no diagnóstico quanto na monitorização do tratamento (ORDOÑEZ-SÁNCHEZ *et al.*,1998).

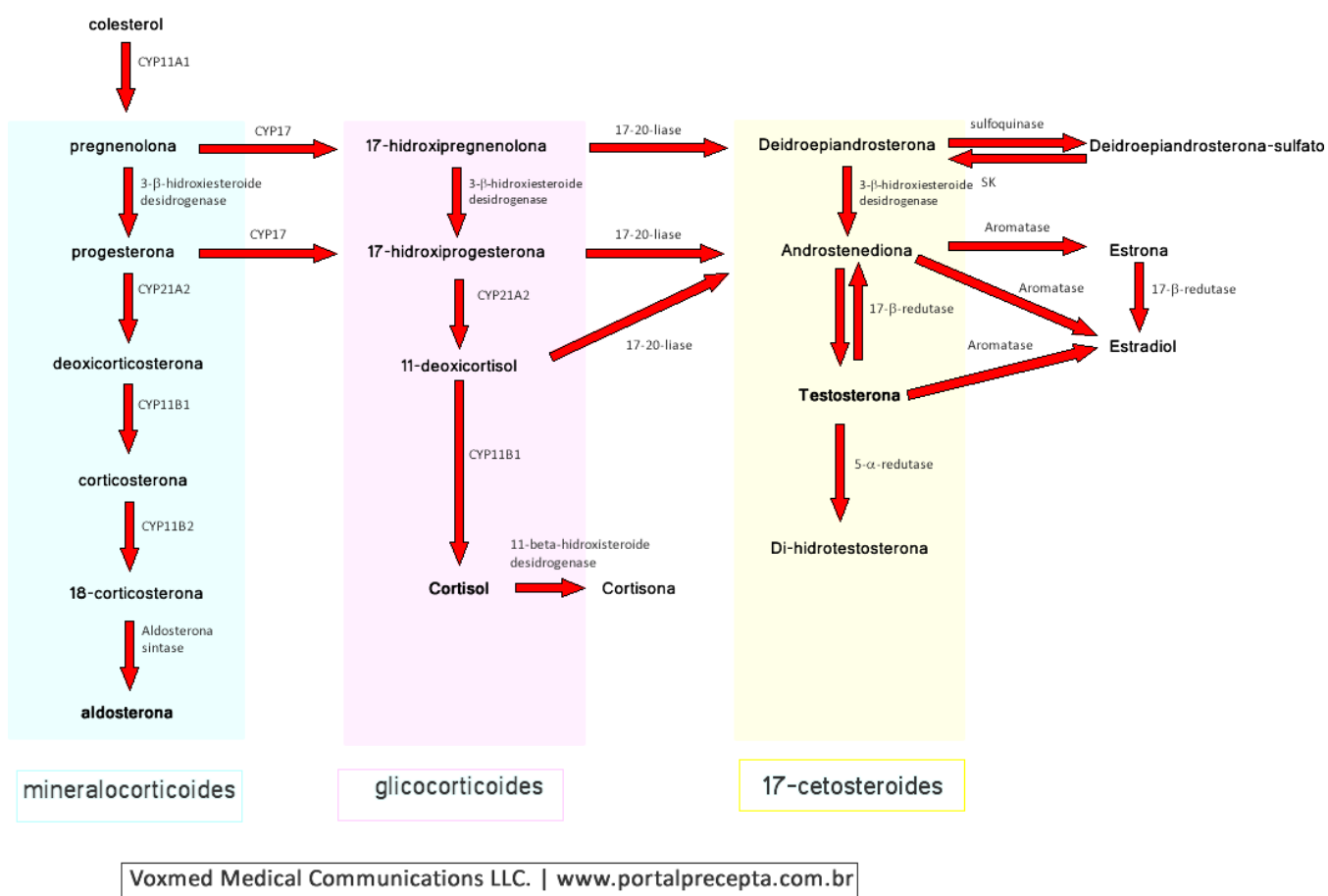


FIGURA 1: Esteroidogênese adrenal.

Fonte: Hi7. http://saude.hi7.co/fisiologia-endocrina-_tipos-de-hormonios--esteroides-561f2f001a7fb.html

A deficiência da 21OH (21OHD) é dicotomizada nas formas clássica e não clássica, de acordo com o grau de deficiência enzimática. A forma clássica é, então, subdividida nas formas perdedora de sal e virilizante simples. Aproximadamente 65-75% dos pacientes com a forma clássica têm a forma perdedora de sal e os 25% restantes apresentam a forma virilizante simples (BARRA *et al.*, 2012).

A HAC na forma perdedora de sal (PS) é causada por mutações que inativam completamente o CYP21A2, reduzindo tanto a síntese de cortisol quanto de aldosterona. As meninas com este transtorno são frequentemente diagnosticadas ao nascimento devido à virilização da genitália externa. Já os meninos não apresentam alteração da genitália ao nascimento. Se o diagnóstico não for feito precocemente pela clínica, ou por meio de testes de triagem neonatal, a crise de perda de sal se desenvolve geralmente após a segunda semana de vida, resultando em hiponatremia, hipercalemia, acidose, hipotensão, choque e colapso cardiovascular, podendo resultar na morte do recém-nascido não tratado. Na forma virilizante simples (VS) os pacientes mantêm 1-2% de função da enzima 21OH e a produção mínima de aldosterona previne o recém-nascido da crise de perda de sal (PANG *et al.*, 1982).

Na forma VS, a exposição fetal ao excesso de andrógenos também leva à virilização da genitália externa nas meninas. Em contrapartida, na ausência de triagem neonatal, os meninos serão diagnosticados, mais comumente, entre 3 e 7 anos, com sinais de hiperandrogenismo como pubarca precoce, acne e crescimento peniano. Em ambos os sexos, quando não é iniciado o tratamento, há um crescimento acelerado, associado a um avanço desproporcional da idade óssea, de modo que a altura final é comprometida (SPEISER *et al.*, 2010).

Na forma não clássica o paciente mantém de 20% a 50% da atividade da 21OH e a grande maioria é assintomática, não tendo insuficiência adrenal, mas podendo apresentar deficiência parcial de glicocorticoide (EI-MAOUCHE *et al.*, 2017). Pode haver apenas uma resposta aumentada da 17OHP plasmática ao teste com ACTH, ou sinais de hiperandrogenismo como pubarca precoce, hirsutismo leve, acne, irregularidade menstrual e diminuição da fertilidade em mulheres adultas.

O gene que codifica a enzima 21OH, o CYP21A2, está localizado no braço curto do cromossomo 6, especificamente dentro do lócus do complexo de histocompatibilidade (HLA) classe III. Este gene e um pseudogene homólogo, o CYP21A1P, se estendem sobre uma região de 30kb. Eventos de recombinação durante a meiose são comuns nessa região do genoma devido ao alto grau de

homologia entre os genes duplicados (HAN *et al.*, 2013; EL-MAOUCHE *et al.*, 2017) (FIGURA 2). A 21OHD pode ser causada por deleções, conversões e mutações pontuais no gene CYP21A2. Mais de 200 mutações foram descritas até o momento (MATERN *et al.*, 2007). Como deleções e grandes conversões eliminam a transcrição gênica, a homozigose para essas alterações leva à HAC na forma mais grave, perdedora de sal. Algumas microconversões, tais como aquelas que determinam parada prematura da tradução, também estão associadas à forma perdedora de sal. Formas mais leves, tais como a virilizante simples e a não clássica, estão associadas às substituições de aminoácidos na proteína P450c21 causadas por microconversões no gene.

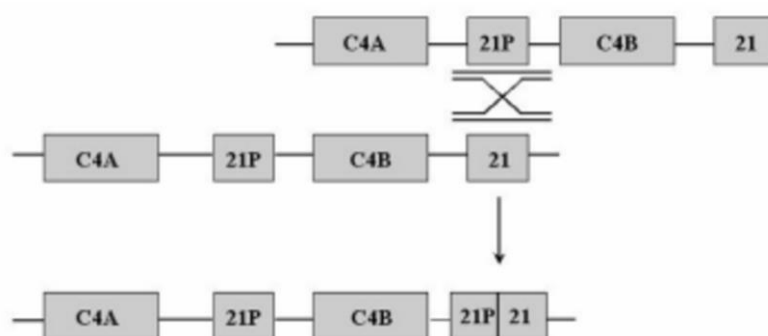


FIGURA 2: Esquema de emparelhamento desigual durante a meiose entre o gene CYP21A2 e CYP21P.

Fonte: Adaptada de Carvalho *et al.* (2016).

1.3 Triagem neonatal para HAC por 21OHD

Os programas de triagem neonatal para 21OHD começaram em 1977, no Alaska, quando Pang *et al.* (1982) desenvolveram o radioimunoensaio específico para analisar a 17OHP em amostras de sangue secas coletadas em cartões de papel de filtro (PANG *et al.*, 1982). Atualmente mais de 40 países já implantaram a triagem para HAC (EL-MAOUCHE *et al.*, 2017). Desde junho de 2013, a triagem para essa doença foi incluída no Programa de Triagem Neonatal do Estado de Minas Gerais (PTN-MG) após ser comprovada sua viabilidade em projeto piloto (PEZZUTI *et al.*, 2014). Como discutido anteriormente, o diagnóstico precoce é crucial para prevenir o óbito de lactentes por insuficiência adrenal. Os objetivos da triagem da 21OHD são detectar

recém-nascidos com a forma clássica perdedora de sal antes de apresentarem crise adrenal potencialmente fatal, especialmente no sexo masculino; prevenir ou reconhecer a atribuição de sexo incorreta de meninas muito virilizadas e antecipar o diagnóstico de meninos com virilização simples. Embora os recém-nascidos com formas não clássicas de HAC sejam ocasionalmente identificados, não são alvo dos programas de triagem (PEZZUTI *et al.*, 2014).

Em várias revisões recentes, os autores tentaram fazer uma análise do custo-benefício da triagem neonatal para HAC. Tais estimativas geralmente assumem que o único resultado adverso do diagnóstico tardio da HAC é a morte, particularmente em bebês do sexo masculino, e, assim, o benefício é quantificado em “anos de vida perdidos” (crianças salvas, por diagnóstico imediato, multiplicadas por expectativa de vida). As estimativas de custo recentes variaram de US \$ 20.000 a US \$ 25.000 por ano de vida. Pressupõe-se convencionalmente que a triagem para uma doença em particular é custo-efetiva se o gasto for menor que US \$ 50.000 por ano de vida (AL SAEDI *et al.*, 1996) Apesar dessas evidências, a triagem para HAC ainda não é universal e seus reais benefícios ainda são amplamente discutidos em alguns países. No Brasil, é realizada como rotina no sistema público de saúde em 15 estados e tem se mostrado muito importante para prevenir a morte e desfechos negativos das crianças acometidas (BRASIL, 2017).

1.3.1 Dificuldades da triagem neonatal para HAC

Uma das maiores dificuldades dos programas de triagem neonatal para HAC é o baixo valor preditivo positivo do teste e a alta taxa de falsos positivos. Os casos falso-positivos são aqueles que apresentam níveis de 17OHP acima dos valores de referência, porém sem critério diagnóstico clínico ou laboratorial para a doença. Isto pode ocorrer porque durante o período neonatal, várias condições podem aumentar os níveis de 17OHP fisiologicamente tais como prematuridade, asfixia e infecções (SILVEIRA *et al.*, 2009).

As crianças prematuras apresentam um atraso fisiológico na maturação da glândula adrenal e a atividade enzimática da 11-Beta hidroxilase se encontra reduzida, além de uma relativa imaturidade renal com função excretória insuficiente. Sendo assim, as concentrações plasmáticas da maioria dos metabólitos adrenais, inclusive da 17OHP se elevam. O estresse por doenças comumente presentes no período

neonatal (sepse, choque) também estimula a produção de esteroides adrenais. Essas alterações são fisiológicas e os níveis da 17OHP tendem a diminuir com o tempo em crianças sem HAC. Como consequência, há muitos resultados falso-positivos em prematuros e recém-nascidos doentes, na primeira amostra, assim reduzindo a especificidade dos exames de triagem, ao mesmo tempo em que adicionam custos monetários e emocionais significativos. A coleta de uma segunda amostra após alguns dias de vida e o ajuste nos níveis de 17OHP conforme peso e/ou idade gestacional são estratégias interessantes para minimizar o número de convocados e o custo dos programas. Porém, o valor preditivo positivo ainda se mantém menor que 1% em vários deles (ALLEN *et al.*, 1997; HAYASHI *et al.*, 2017).

Além disso, os imunoenaios utilizados para dosar a 17OHP sofrem interferência por reação cruzada de anticorpos com outros metabólitos adrenais, principalmente a 17-hidroxipregnenolona, que está elevada no recém-nascido. Sendo assim, a análise da 17OHP por cromatografia líquida - espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) como teste de segunda etapa, em crianças que apresentam níveis de 17OHP elevados no teste inicial, é uma boa estratégia para minimizar esses interferentes. A LC-MS/MS é mais apurada pois consegue distinguir outros metabólitos adrenais que porventura foram dosados, por reação cruzada, na primeira amostra (MATERN *et al.*, 2007).

Para aumentar o valor preditivo positivo da triagem neonatal para HAC e minimizar o número de casos falsos-positivos sem perda de sensibilidade, vários recursos têm sido testados e utilizados, muitas vezes de forma simultânea por um mesmo programa. Os mais estudados são coleta da segunda amostra em papel filtro após alguns dias da primeira amostra; ajuste no valor de referência para 17OHP conforme o peso e idade gestacional ao nascimento; análise da 17OHP e outros esteroides por LC-MS/MS; e estudo molecular dos pacientes triados (ALLEN *et al.*, 1997; HAYASHI *et al.*, 2017).

1.3.2 Análise molecular do gene CYP21A2

A ideia de análise genética como um método de segunda etapa na triagem para HAC por 21OHD baseia-se no fato de cerca de 90-95% das causas de HAC poderem ser atribuídas à homozigose ou heterozigose composta para um número limitado e

conhecido de mutações pontuais, deleções e rearranjos causados por cruzamento não homólogo entre o gene e seu pseudogene.

O gene CYP21A2 que codifica a 21OH está localizado no cromossomo 6p21.3, juntamente com seu pseudogene inativo, CYP21A1P. Cerca de 95% de todas as mutações detectadas no CYP21A2 são causadas por recombinações (conversões gênicas, microconversões ou cruzamentos desiguais) entre o gene e seu pseudogene altamente homólogo. As dez mutações mais frequentemente descritas na população brasileira são: Q318X, R356W, Leu397fs(Inst), V236E IVSE-13A/C>G, I172N P30L, P453S, V281L, G110EfsX21(E3Delta8BP) R408c, H62L)(CARVALHO *et al.*, 2016). Os 5% restantes das mutações são aqueles que não são causadas pela recombinação (KOPACEK, 2016; TORRESANI; BIASON-LAUBER, 2007).

Várias estratégias foram desenvolvidas para análise molecular do CYP21A2, baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) induzida por amplificação com oligonucleotídeos alelo-específicos para o gene CYP21A2, seguida de sequenciamento direto com avaliação do número de cópias do gene CYP21A. Recentemente, a análise de amplificação por sonda dependente de ligação Multiplex (MLPA) para o diagnóstico de 21OHD tem sido cada vez mais usada como uma ferramenta fácil, simples, rápida e sensível para detectar deleções ou duplicações do gene CYP21A2. No entanto, resultados falso-positivos podem ocorrer porque as mutações ou polimorfismos muito próximos das regiões de ligação da sonda e do local de ligação podem impedir a hibridização e a ligação da sonda. Às vezes é necessário a realização conjunta de PCR específica para a mutação que está sendo analisada (LEE;LEE;CHAO, 2010).

A análise das mutações do gene CYP21A2 é uma eficiente ferramenta para prever as manifestações clínicas do paciente, uma vez que a doença possui uma boa correlação genótipo-fenótipo. É capaz de confirmar o diagnóstico das formas clássicas de 21OHD, pode prever a gravidade da doença com implicações terapêuticas e permite a realização de aconselhamento genético. Embora a análise molecular não seja a melhor escolha, atualmente, como teste de 2ª linha na triagem neonatal (SPEISER *et al.*, 2018) é útil para elucidar os casos falso-positivos, que apresentam níveis de 17OHP persistentemente elevados, encurtando o tempo de seguimento e diminuindo o estresse familiar. Tendo conhecimento do genótipo, é possível evitar o tratamento desnecessário de formas não clássicas e dos falso-positivos (CASTRO *et al.*, 2019; TORRESANI; BIASON-LAUBER *et al.*, 2007).

O custo da análise molecular foi previamente estimado em US\$ 500, enquanto o acompanhamento de um caso falso-positivo pode custar cerca de US\$ 848. Tem sido sugerido que a análise molecular poderia reduzir o número de reconvocações e eliminar a necessidade de outros testes em 88% dos casos (CARVALHO *et al.*, 2016).

No entanto, a complexidade do gene CYP21A2 é um fator limitante. Apesar do potencial benefício da análise molecular do gene CYP21A2 de pacientes com triagem neonatal positiva para HAC, algumas considerações devem ser feitas. A detecção de variantes da normalidade pode ser um fator de confusão, pois nem sempre se sabe o real impacto dessas variantes na atividade enzimática *in vivo* e sua correlação com o quadro clínico. Outra questão é que, dependendo do método utilizado, mutações ou deleções podem não ser detectadas nas crianças acometidas pela doença. E, por último, o fenótipo pode não ter correspondência com o genótipo encontrado, já que outros fatores podem interferir na expressão fenotípica do paciente.

Na prática clínica, a análise molecular do gene CYP21A2 deve ser indicada em situações específicas.

1.3.3 Polimorfismo N493S

Um grande número de SNPs, do inglês, *single nucleotide polymorphisms*, que são variações pontuais encontradas ao longo do DNA, já foram descritas no gene CYP21A2. No entanto, vários destes polimorfismos permanecem com significado incerto se podem ou não ser responsáveis pelo aumento dos níveis de 17OHP e androgênios. Um exemplo, é o polimorfismo N493S localizado no éxon 10. Nele há a substituição da base Adenosina por uma Guanina, sendo produzido o aminoácido Serina no lugar da Asparagina. No banco de dados GeneBank (<https://www.uniprot.org/uniprot/P08686>) esta alteração é considerada patológica, porém, no banco de dados da ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/12159/>) é descrita como benigna. Em um estudo sobre modelo molecular do CYP21A2 humano, a carga eletrostática do aminoácido produzido pelo gene com a alteração N493S demonstrou ser inalterada (ROBINS *et al.*, 2006). Porém, a sua influência na atividade enzimática residual não foi ainda bem estabelecida *in vitro*. Existem trabalhos sugerindo que a presença deste polimorfismo, em associação com outras mutações no mesmo gene, poderia ser responsável pelo aumento da 17OHP (ASANUMA *et al.*, 1999).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar possíveis alterações no gene CYP21A2 de crianças assintomáticas com triagem positiva para HAC que justifiquem aumento persistente do nível sérico de 17OHP.

2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a frequência e tipo das mutações do gene CYP21A2 encontradas nessas crianças.
- b) Determinar a correlação entre o perfil clínico-hormonal e o genótipo encontrado.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo e casuística

Foi realizado um estudo do tipo transversal. Os pacientes com aumento persistente de 17OHP acompanhados no serviço de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), do ambulatório de Triagem neonatal para HAC, foram convidados a participar do estudo para análise do genótipo. Todos os pacientes apresentaram níveis de 17OHP no papel filtro maior que os valores de referência na triagem neonatal, sendo convocados pelo programa. Não apresentavam sinais e/ou sintomas de HAC e não recebiam reposição com hidrocortisona ou fludrocortisona. Também não apresentavam outra doença crônica e não faziam uso de outros medicamentos regularmente. Foram incluídos todos os pacientes que concordaram em participar, assinando o TCLE entre janeiro e setembro de 2018. Foi considerado como aumento persistente de 17OHP, a não normalização dos seus níveis séricos aos seis meses de vida da criança. Amostra de um dos genitores (preferencialmente a mãe) foi coletada para avaliar a segregação das mutações. A população de interesse foi composta por 36 pacientes, 18 do sexo masculino e 18 do sexo feminino, com mediana de idade de 2,8 anos (IQ 0,8-3,7).

Após avaliação inicial dos dados, foi criado um grupo controle para possibilitar melhor análise do éxon 10 do gene CYP21A2. Esse foi constituído por 46 indivíduos provenientes do PTN-MG, que realizavam acompanhamento em algum programa da triagem (hipotireoidismo congênito, fenilcetonúria, toxoplasmose congênita, fibrose Cística e/ou deficiência de Biotinidase), mas que tiveram triagem neonatal normal para HAC. Nesse grupo, 60% era do sexo feminino e a mediana de idade era de 5,4 anos (IQ 1,2-12,5). O critério de exclusão para este grupo foi apresentar aumento da 17OHP.

3.1.1 Protocolo atual da triagem para HAC do PTN-MG

O PTN-MG abrange todos os 853 municípios do estado e realiza, atualmente, a triagem de rotina para seis doenças: hipotireoidismo congênito, fenilcetonúria, fibrose cística, doença falciforme, deficiência de biotinidase e hiperplasia adrenal congênita. O PTN-MG segue as recomendações do Ministério da Saúde brasileiro, que

visam atingir 100% da população e definem o processo de triagem neonatal em cinco etapas: teste laboratorial, vigilância ativa de casos suspeitos, confirmação do diagnóstico, tratamento e acompanhamento por uma equipe multidisciplinar.

A triagem para HAC é realizada por meio da dosagem da 17-OHP em papel filtro (Whatman® – GE Healthcare), por método imunofluorimétrico DELFIA® (kit Neonatal 17-OHP; Perkin-Elmer), idealmente coletada entre o 3º e 5º dia de vida.

O protocolo do PTN-MG utiliza o percentil 99,7 da 17OHP para o peso de nascimento da criança como valor de corte no papel-filtro. Naquelas crianças que nasceram com peso <1500g, entre 1500 e 1999g, entre 2000 e 2499 e ≥2500g, os valores atuais correspondentes ao percentil 99,7 e empregados pelo PTN- MG são, respectivamente, <150, <92, <45 e <14 ng/ml (FIGURA 3). Dessa forma, valor menor que o percentil 99,7 (p99,7) é considerado dentro da normalidade. Se o valor for maior ou igual a duas vezes o p99,7, o recém-nascido (RN) é imediatamente convocado para consulta médica para realização de anamnese detalhada, exame físico minucioso e exames séricos confirmatórios. Em caso de valores entre o p99,7 e duas vezes este percentil, o RN é convocado para a coleta de segunda amostra em papel-filtro. Nesta situação, se o valor da segunda amostra estiver acima do p99,7, a criança é convocada para consulta para realização de seguimento no serviço de referência, até a normalização dos valores ou definição diagnóstica (FIGURA 4).

VALORES DE REFERÊNCIA DA 17OHP NO TESTE DE TRIAGEM EM PAPEL FILTRO*

FAIXA DE PESO DO RN	VALOR DE NORMALIDADE (ng/ml)	VALOR DE REFERÊNCIA P/ RECOLETA (ng/ml)	VALOR DE REFERÊNCIA P/ CONVOCAÇÃO P/ CONSULTA (ng/ml)
≥2.500g	< 14,0	≥14,0 < 28,0	≥28,0
≥2.000g a 2.499g	< 45,0	≥45,0 < 90,0	≥90,0
≥1.500g a 1.999g	< 92,0	≥92,0 < 180,0	≥180,0
<1.500g	< 150,0	≥150,0 < 300,0	≥300,0

*VR para a 17OHP Progesterona nas diferentes faixas de peso, válidos para exames realizados no Laboratório de triagem neonatal do NUPAD.

FIGURA 3: Valores de referência da 17-OHP no papel filtro do PTN- MG.

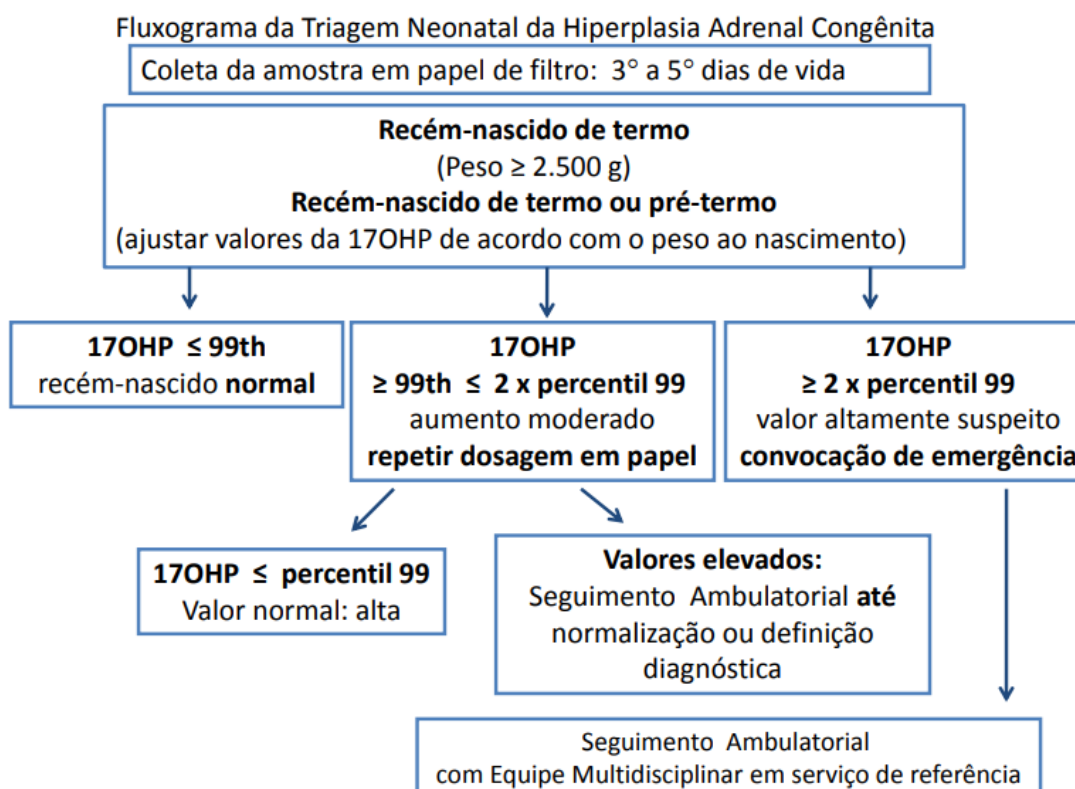


FIGURA 4: Fluxograma do protocolo de tratamento e acompanhamento clínico de crianças com HAC do PTN- MG.

Todas as crianças que atendem aos critérios e precisam de acompanhamento são encaminhadas para ambulatório especializado do Hospital das Clínicas da UFMG, onde são avaliadas clinicamente. Testes séricos confirmatórios para 17OHP, androstenediona, testosterona e Sódio (Na⁺) e Potássio (K⁺) são conduzidos em todas as crianças na primeira consulta. A 17OHP, a androstenediona e a testosterona séricas são avaliadas por quimiluminescência (ICMA), com os valores de referência do laboratório, descritos na tabela 1. Para a faixa etária em que esses valores não são disponíveis, foi definido o valor até 170 ng/dL, correspondente à faixa imediatamente superior.

TABELA 1: Valores de referência para a 17OHP, androstenediona e testosterona séricas.

Exames (ICMA)	Feminino	Masculino
17OHP	Até 30 dias: até 1680 ng/dL 31-60 dias: até 970 ng/dL 61-90 dias: até 310 ng/dL 4m - 2 anos: não disponível 3-14 anos: até 170 ng/dL	Até 30 dias: até 800 ng/dL 31-60 dias: até 1370 ng/dL 61-90 dias: até 400 ng/dL 4m - 2 anos: não disponível 3-14 anos: até 170 ng/dL
Androstenediona	Pré-puberal: <1,6 ng/mL	Pré-puberal: <1,6 ng/mL
Testosterona	<75 ng/dL	175-781 ng/dL

Notas: ICMA: quimiluminescência.

O diagnóstico de HAC é atribuído a crianças que apresentam comprovação clínica de perda de sal (perda de peso ou ganho insuficiente de peso e/ou sinais de desidratação) e meninas com sinais de virilização (graus I-V na classificação de Prader), além de aumento dos hormônios séricos (17OHP, androstenediona e testosterona), baixo nível de Na⁺ (< 135 mmol/L) e alto nível de K⁺ (> 5,5 mmol/L). Estas crianças são tratadas com esteroides, diariamente: 10-15 mg/m² de acetato de hidrocortisona e 0,1-0,2 mg de fludrocortisona. O diagnóstico é considerado inconclusivo quando os hormônios séricos confirmatórios apresentavam alterações, mas o ionograma é normal e não há sinais clínicos de doença. As crianças diagnosticadas com HAC ou com diagnóstico inconclusivo são acompanhadas clinicamente e por meio da dosagem sérica da 17OHP, androstenediona e testosterona, regularmente. Os casos inconclusivos são monitorados até que os níveis de 17OHP das crianças normalizem. Nesse momento, esses casos são classificados como falso-positivos e recebem alta do programa.

3.1.2 Avaliação clínico-laboratorial

Os dados relativos à caracterização das crianças (sexo, idade, intercorrências perinatais, número de consultas no programa), os valores de 17OHP em papel-filtro e os resultados das dosagens séricas de 17OHP, Testosterona e Androstenediona, realizadas de rotina durante o acompanhamento dos pacientes no PTN-MG, foram obtidos dos prontuários do arquivo do Núcleo de Pesquisa e Ações em Apoio Diagnóstico (NUPAD – UFMG).

3.1.3 Avaliação genética

O DNA das amostras dos pacientes com aumento persistente da 17OHP foi extraído com resina quelante *Chelex100* (BioRad), seguindo-se protocolo adaptado de Walsh *et al.* (1991), em amostras de sangue total periférico ou sangue em papel filtro FTA. A partir do DNA das amostras foi realizada a PCR específica para o gene CYP21A2 dividido em duas partes, sendo a região 1 (sistema Geral 1) com 2.046pb que compreende toda a extensão dos éxons 1 a 6 (incluindo introns) e região 2 (sistema Geral 2) com 1.375pb que compreende toda a extensão de parte do éxon 6 ao éxon 10 (incluindo introns) (WALSH; METZGER; HIGUCHI,1991).

Os *primers* e a estratégia para sequenciamento do gene CYP21A2 foi adaptada de Ordoñez-Sánchez *et al.* (1998), Wilson *et al.* (1995) e Applied Biosystems Chemistry Guide (1998). O produto da PCR dos sistemas Geral 1 e Geral 2 são purificados seguindo-se um protocolo de purificação alcoólica com pequenas modificações, descrito em *Automated DNA Sequencing – Chemistry Guide* (Applied Biosystems). Em seguida, o DNA de cada amostra foi quantificado em gel de agarose 2% tratado com *Sybr Safe* (Invitrogen). Foi realizada a reação de sequenciamento utilizando-se o kit *Big Dye Terminator* (Applied Biosystems) com primers específicos para cada fragmento a ser examinado (*forward* ou reverso), totalizando 5 a 6 fragmentos. Posteriormente, o produto da reação de sequenciamento foi purificado seguindo-se protocolo semelhante ao acima descrito e, em seguida, realizada a eletroforese capilar em sequenciador automático modelo *ABI Prism 3130XL Genetic Analyser* (Applied Biosystems) utilizando-se capilar de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems)(HALL,1999).

As sequências obtidas foram analisadas no software *Sequencing Analyses* v.5.3.1 (Applied Biosystems) e depois alinhadas com a sequência de referência obtida do NCBI **GeneBank** (NCBI) AH005282.2 e a sequência de proteína ENST00000418967, por meio do programa de alinhamento *BioEdit* v.7.2.5, para identificação das variantes (WILSON *et al.*, 1995).

O DNA das amostras do grupo controle foi extraído e processado da mesma maneira, porém apenas o éxon 10 foi analisado para avaliar a presença do polimorfismo N493S.

3.2 Análise estatística

Após identificação das mutações do gene CYP21A2 nos pacientes do estudo, a frequência de cada genótipo foi estabelecida. Para análise, os pacientes foram agrupados conforme a presença de mutações em: forma Não-Clássica, Heterozigotos para mutações conhecidas, portadores do polimorfismo N493S isolado no éxon 10 e negativo para qualquer mutação. Os valores de 17OHP do papel filtro e todos os níveis séricos de Testosterona, Androstenedina e 17OHP dos pacientes foram analisados. Foi feita análise descritiva dos dados encontrados, com medidas de tendência central, posição e variabilidade. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para verificar a hipótese de normalidade das variáveis. Os testes de Mann-Whitney e Kruskal Wallis foram usados para comparar as medianas entre dois grupos e mais de dois grupos, respectivamente. O intervalo de confiança (IC) de 95% foi calculado. A significância estatística foi estabelecida em 5% ($p < 0,05$).

Foi aplicado o Teste Z para duas proporções, com nível de significância de 5% (*Software Minitab 14 Release*) para calcular o número de indivíduos do grupo controle. Para obter 80% de poder estatístico na detecção de uma diferença de, no mínimo, 20% entre as porcentagens das mutações estudadas nos grupos foi calculado um N de 46 crianças.

A análise estatística foi feita com o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20.0 (SPSS IN., Chicago, Illinois, USA).

3.3 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e na Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas (DEPE-HC-UFMG) (ANEXOS A e B). Também teve a anuência e apoio do NUPAD – UFMG para a sua execução. O termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) foi assinado pelos pais ou responsáveis que concordaram voluntariamente em fazer parte da pesquisa (APÊNDICE A). Foi mantido o anonimato dos participantes da pesquisa. Os acompanhantes tinham uma cópia do termo de consentimento, na qual constava o telefone da equipe da pesquisa caso fosse necessário contactar em caso de dúvidas.

REFERÊNCIAS

AL Saedi S, Dean H, Dent W, Stockl E, Cronin C. Screening for congenital adrenal hyperplasia: the Delfia Screening Test overestimates serum 17-hydroxyprogesterone in preterm infants. *Pediatrics*. 1996 Jan;97(1):100-2.

Allen DB, Hoffman GL, Fitzpatrick P, Laessig R, Maby S, Slyper A. Improved precision of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia using weight-adjusted criteria for 17-hydroxyprogesterone levels. *J Pediatr*. 1997 Jan;130(1):128-33.

Applied Biosystems Chemistry Guide. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. 2nd ed. 1998. Chapter 3, p. 34-35.[citado 09 fev 2020]. Disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_041003.pdf.

Asanuma A, Ohura T, Ogawa E, Sato S, Igarashi Y, Matsubara Y et al. Molecular analysis of Japanese patients with steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Hum Genet*. 1999; 44(5):312-7.

Barra CB, Silva IN, Pezzuti IL, Januário JN. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Rev Assoc Med Bras*. [citado 09 Fev. 2020] 2012;58(4):459-64. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302012000400017&lng=en&nrm=iso.

Brasil. Ministerio da Saude. Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). Dados sobre o Programa Nacional de Triagem Neonatal. Publicado: Quarta, 28 de Junho de 2017, 15h16 Última atualização em Segunda, 21 de Agosto de 2017, 11h40.[citado em 08 fev 2020]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/progrma-nacional-da-triagem-neonatal/dados-sobre-o-programa-nacional-de-triagem-neonatal>.

Carvalho DF, Miranda MC, Gomes LG, Madureira G, Marcondes JA, Billerbeck AE, et al. Molecular CYP21A2 diagnosis in 480 Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia before newborn screening introduction. *Eur J Endocrinol*. 2016 Aug;175(2):107-16.

Castro PS, Rassi TO, Araujo RF, Pezzuti IL, Rodrigues AS, Bachega TASS, et al. High frequency of non-classical congenital adrenal hyperplasia form among children with persistently elevated levels of 17-hydroxyprogesterone after newborn screening. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2019 May 27;32(5):499-504.

ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/12159/>).

El-Maouche D, Arlt W, Merke DP. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet*. 2017 Nov 11;390(10108):2194-2210.

GeneBank (<https://www.uniprot.org/uniprot/P08686>).

Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.1999.

Han TS, Stimson RH, Rees DA, Krone N, Willis DS, Conway GS et al. United Kingdom Congenital Adrenal Hyperplasia Adult Study Executive (CaHASE) *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;78(2):197-203.

Hayashi GY, Carvalho DF, Miranda MC, Faure C, Vallejos C, Brito VN, et al. Neonatal 17-hydroxyprogesterone levels adjusted according to age at sample collection and birthweight improve the efficacy of congenital adrenal hyperplasia newborn screening. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2017 Apr;86(4):480-487.

Hi7.co » saude.hi7.co.Saúde. Fisiologia endócrina _ Tipos de hormônios: esteróides. [citado 08 fev 2020]. Disponível em http://saude.hi7.co/fisiologia-endocrina_-_tipos-de-hormonios--esteroides-561f2f001a7fb.html

Kopacek C. Clinical and molecular profile of 132 newborns with confirmed or suspicious Congenital Adrenal hyperplasia in the first two years of a public screening program implementation, Porto Alegre, 2016. 56f. Tese (Doutorado em Ciências médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.

Lee HH, Lee YJ, Chao MC. Comparing the Southern blot method and polymerase chain reaction product analysis for chimeric RCCX detection in CYP21A2 deficiency. *Anal Biochem*. 2010 Apr 15;399(2):293-8.

Matern D, Tortorelli S, Oglesbee D, Gavrillov D, Rinaldo P. Reduction of the false-positive rate in newborn screening by implementation of MS/MS-based second-tier tests: the Mayo Clinic experience (2004-2007). *J Inher Metab Dis*. 2007 Aug;30(4):585-92.

Neocleous V, Shamma C, Phedonos AA, Phylactou LA, Skordis N. Phenotypic variability of hyperandrogenemia in females heterozygous for CYP21A2 mutations. *Indian J Endocrinol Metab*. 2014;18(Suppl 1):S72-9.

Ordoñez-Sánchez ML, Ramírez-Jiménez S, López-Gutierrez 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 Feb;102(2):170-7.

Pang S, Murphey W, Levine LS, Spence DA, Leon A, LaFranchi S, et al. A pilot newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Alaska. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982 Sep;55(3):413-20.

Pezzuti IL, Barra CB., Mantovani RM, Januário JN., Silva IN. A three-year follow-up of congenital adrenal hyperplasia newborn screening, *J. Pediatr. (Rio J.)* [Internet].

2014 Apr [citado 2020 Feb 08]; 90(2): 300-307. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572014000200300&lng=en.

Robins T, Carlsson J, Sunnerhagen M, Wedell A, Persson B. Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia. *Mol Endocrinol*. 2006 Nov;20(11):2946-64.

Silveira EL, Elnecave RH, Santos EP, Moura V, Pinto EM van der Linden Nader I, et al. Molecular analysis of CYP21A2 can optimize the follow-up of positive results in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Clin Genet*. 2009 Dec;76(6):503-10.

Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, et al. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018 Nov 1;103(11):4043-4088.

Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, et al; Endocrine Society. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Sep;95(9):4133-60.

Torresani T, Biason-Lauber A. Congenital adrenal hyperplasia: diagnostic advances. *J Inherit Metab Dis*. 2007 Aug;30(4):563-75.

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 1991 Apr;10(4):506-13.

Wilson RC, Wei JQ, Cheng KC, Mercado AB, New MI. Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 May;80(5):1635-40.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo

Polimorfismo N493S do gene CYP21A2 e triagem positiva para hiperplasia adrenal congênita: existe associação?

Introdução

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) consiste em um grupo de doenças causadas por deficiência enzimática na biossíntese do cortisol nas glândulas adrenais. A deficiência da enzima 21 alfa hidroxilase (21OH) é a mais comum, ocorrendo deficiência de cortisol e aldosterona, além de aumento de esteroides sexuais em graus variados (SILVEIRA *et al.*, 2009).

A deficiência de 21OH (21OHD) é monogênica, resulta de herança autossômica recessiva e a maior parte dos pacientes é heterozigota composta. Há um espectro bioquímico e fenotípico da doença, que varia desde formas leves, sem clínica evidente, a formas graves. A manifestação clínica é definida pelo alelo que resulta em maior função enzimática. Na maior parte dos casos há uma boa correlação genótipo-fenótipo (SPEISER *et al.*, 2010).

O gene que codifica a 21OH, o CYP21A2, está localizado no braço curto do cromossomo 6, especificamente dentro do locus do complexo de histocompatibilidade (HLA) classe III. Este gene e um pseudogene homólogo, o CYP21A1P, se estendem sobre uma região de 30kb. Eventos de recombinação durante a meiose são comuns nessa região do genoma devido ao alto grau de homologia entre os genes duplicados. Cerca de 95% de todas as mutações detectadas no CYP21A2 são causadas por conversões gênicas, microconversões ou cruzamentos desiguais entre o gene e seu pseudogene (AL SAEDI *et al.*, 1996).

Uma das maiores dificuldades dos programas de triagem neonatal para HAC é o baixo valor preditivo positivo do teste e a alta taxa de falsos positivos. Isto ocorre, porque, durante o período neonatal, observa-se que várias condições podem aumentar os níveis de 17OHP fisiologicamente tais como prematuridade, asfixia e infecções (SILVEIRA *et al.*, 2009). Além disso, os testes de imunoensaio utilizados para dosar a 17OHP sofrem interferência por reação cruzada com outros metabólitos

adrenais, especialmente com a 17-hidroxipregnenolona, que está elevada no recém-nascido (MATERN *et al.*,2007).

Para aumentar a especificidade e o valor preditivo positivo da triagem neonatal e minimizar o número de falsos-positivos sem perda de sensibilidade, vários recursos são utilizados tais como: coleta de segunda amostra em papel filtro após alguns dias da primeira amostra, em casos selecionados; ajuste do valor de referência da 17OHP conforme o peso de nascimento e/ou idade gestacional; análise da 17OHP por cromatografia líquida - espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) e estudo da biologia molecular.

A ideia de rastreio genético, como um método de segunda etapa, baseia-se no achado de homozigose ou heterozigose composta para um número limitado de mutações pontuais, deleções e rearranjos decorrentes do emparelhamento desigual entre o gene CYP21A2 e seu pseudogene em cerca de 90-95% dos casos de HAC (CARVALHO *et al.*, 2016; KOPACEK, 2016; TORRESANI; BIASON-LAUBER, 2007).

A análise das mutações do gene CYP21A2 pode elucidar os casos duvidosos, incluindo crianças assintomáticas e com níveis de 17OHP persistentemente elevados, encurtando o tempo de seguimento dessas crianças e diminuindo o estresse familiar. Tendo conhecimento do genótipo, é possível evitar o tratamento desnecessário de formas não clássicas e dos falso-positivos (PANG *et al.* 1982).

Diante disso, o objetivo do trabalho foi determinar se crianças com triagem positiva para hiperplasia, assintomáticas e com níveis persistentemente elevados de 17OHP apresentam alteração no gene CYP21A2 que justifique os achados laboratoriais.

Pacientes e Métodos

Trata-se de estudo transversal, que avaliou 36 crianças com triagem positiva para HAC (FIGURA 5) e que estavam em acompanhamento no ambulatório do programa de triagem neonatal de Minas Gerais (PTN-MG), no período entre janeiro e setembro de 2018, por níveis persistentemente elevados de 17OHP. Essas crianças não apresentavam sinais ou sintomas de HAC e não estavam em reposição com glicocorticóides ou mineralocorticoide. Foi considerado como aumento persistente da 17OHP, níveis séricos acima do valor de referência estabelecido pelo laboratório, aos

seis meses de vida. As crianças não apresentavam nenhuma doença crônica e não recebiam medicação regularmente. Foram incluídos todos os pacientes que preenchiam esses critérios e que concordaram em participar do estudo, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido, durante o período estudado.

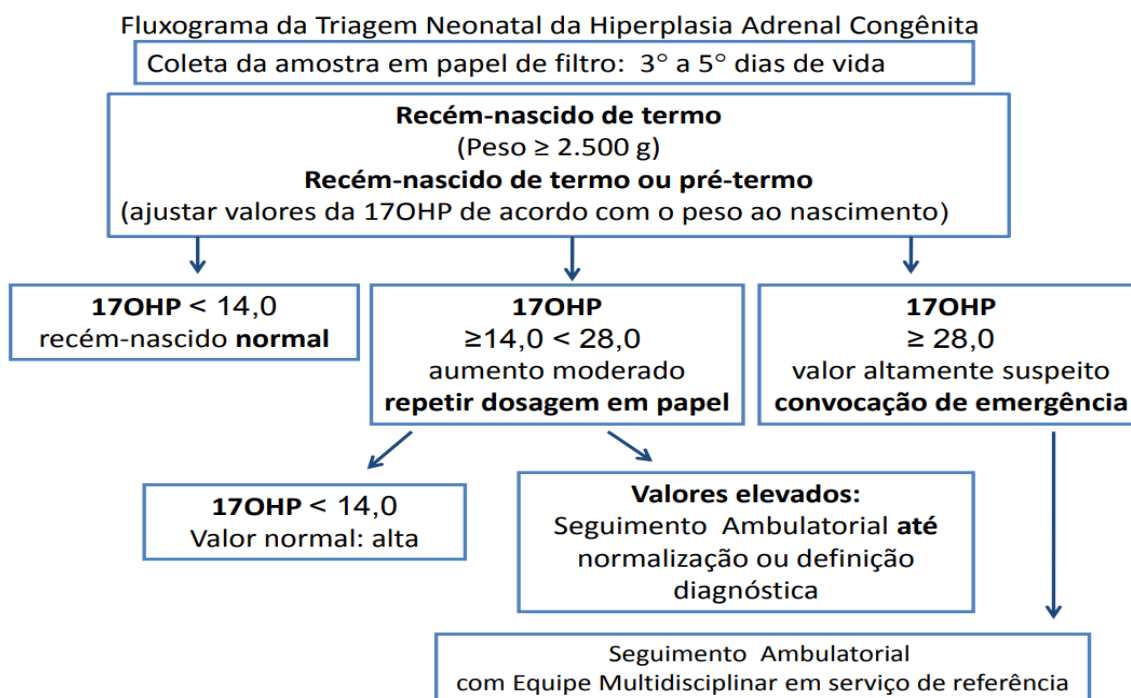


FIGURA 5: Fluxograma da triagem neonatal da hiperplasia adrenal congênita.

Após avaliação preliminar dos dados foi incluído um grupo controle especificamente para analisar o éxon 10 do gene CYP21A2. Este grupo foi constituído por crianças que apresentavam 17OHP no papel filtro normal, porém realizavam acompanhamento no PTN-MG devido triagem positiva para hipotireoidismo congênito, fenilcetonúria, toxoplasmose congênita, fibrose cística e/ou deficiência de biotinidase. O critério de exclusão para este grupo foi apresentar aumento da 17OHP na amostra em papel filtro.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Dados laboratoriais

Os dados relativos à caracterização das crianças (sexo, idade, intercorrências perinatais, número de consultas no programa), os valores de 17OHP em papel-filtro e os resultados das dosagens séricas de 17OHP, Testosterona e Androstenediona, realizadas de rotina durante o acompanhamento dos pacientes no PTN-MG, foram obtidos dos prontuários médicos.

O DNA das amostras dos pacientes com aumento persistente da 17OHP foi extraído com resina quelante *Chelex100* (BioRad), seguindo-se protocolo adaptado de Walsh *et al* (1991), em amostras de sangue total periférico ou sangue em papel filtro FTA. A partir do DNA das amostras foi realizada a PCR específica para o gene CYP21A2 dividido em duas partes, sendo a região 1 (sistema Geral 1) com 2.046pb que compreende toda a extensão dos éxons 1 a 6 (incluindo introns) e região 2 (sistema Geral 2) com 1.375pb que compreende toda a extensão de parte do éxon 6 ao éxon 10 (incluindo introns). Os *primers* e a estratégia para sequenciamento do gene CYP21A2 foi adaptada de Ordoñez-Sánchez *et al.* (1998) e Wilson *et al.* (1995) e Applied Biosystems *Chemistry Guide* (1998).

O produto da PCR dos sistemas Geral 1 e Geral 2 são purificados seguindo-se um protocolo de purificação alcoólica com pequenas modificações, descrito em *Automated DNA Sequencing* (Applied Biosystems Chemistry Guide,1998). Em seguida, o DNA de cada amostra foi quantificado em gel de agarose 2% tratado com *Sybr Safe* (Invitrogen). Em seguida, foi realizada a reação de sequenciamento utilizando-se o kit *Big Dye Terminator* (Applied Biosystems) com primers específicos para cada fragmento a ser examinado (*forward* ou reverso), totalizando 5 a 6 fragmentos. Posteriormente, o produto da reação de sequenciamento foi purificado seguindo-se protocolo semelhante ao acima descrito e, em seguida, realizada a eletroforese capilar em sequenciador automático modelo *ABI Prism 3130XL Genetic Analyser* (Applied Biosystems) utilizando-se capilar de 50 cm e polímero POP7 (HALL, 1999).

As sequências obtidas foram analisadas no software *Sequencing Analyses* v.5.3.1 (Applied Biosystems) e depois alinhadas com a sequência de referência obtida do NCBI (AH005282.2), por meio do programa de alinhamento *BioEdit* v.7.2.5, para identificação das variantes.

O DNA das mostras do grupo controle foi extraído e processado da mesma maneira, porém apenas o éxon 10 do gene CYP21A2 foi analisado para avaliar a presença ou não do polimorfismo N493S.

Análise estatística

Após genotipagem dos pacientes, a frequência de cada genótipo foi estabelecida. Os pacientes foram então agrupados em: Forma não clássica, heterozigotos para as mutações conhecidas, portadores do polimorfismo N493S isolado no éxon 10 e negativo para qualquer mutação.

Foi feita análise descritiva dos dados encontrados, com medidas de tendência central, posição e variabilidade. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para verificar a hipótese de normalidade das variáveis. Os testes de Mann-Whitney e Kruskal Wallis para comparar as medianas entre os grupos e mais de dois grupos, respectivamente. O intervalo de confiança (IC) de 95% foi calculado. A significância estatística foi estabelecida em 5%.

A análise estatística foi feita no software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20.0.

Para calcular o número de indivíduos do grupo controle, foi aplicado o Teste Z para duas proporções, no Software Minitab 14 Release, utilizando também um nível de significância de 5%.

Resultados

Participaram do estudo, 36 pacientes com aumento persistente da 17OHP sérica (nos primeiros 6 meses de vida) durante o acompanhamento no programa de triagem.

A mediana de idade das crianças era de 2,8 anos (0,8-3,7), sendo 50% do sexo feminino. A média dos valores de 17OHP no papel filtro foi de 26,38 ng/mL ($\pm 13,39$). Três crianças nascidas a termo apresentaram intercorrências perinatais (icterícia com necessidade de fototerapia, hipoglicemia e sepse) e, dos 5 prematuros da amostra, 4 deles também tiveram intercorrências associadas. O número médio de consultas realizadas pelos pacientes do estudo foi de 6 consultas ($\pm 4,6$). Dez pacientes (27,7%) já receberam alta do programa. A média de tempo de acompanhamento até a alta foi

de 18,7 meses ($\pm 16,67$) (TABELA 2).

TABELA 2: Caracterização de 36 crianças com 17OHP sérica persistentemente elevada.

Idade (anos) Mediana	Sexo	17OHP no papel filtro (ng/mL) Média (DP)	Intercorrências perinatais, n=7	n de consultas médicas *	Tempo até a alta, em meses, n=10*
2,8 (0,8-3,7)	F:18 M:18	26,38 ($\pm 13,39$)	Icterícia Hipoglicemia Sepse neonatal	6 ($\pm 4,6$)	18,7 ($\pm 16,67$)

Notas: F: feminino; M: masculino; n: número de pacientes; 17OHP: 17OH-progesterona; PTN-MG: programa de triagem neonatal de Minas Gerais

Os 36 pacientes foram agrupados conforme resultado da análise molecular (não clássica, heterozigoto, N493S isolado e negativo). Sete das nove crianças com o polimorfismo N493S isolado, dois de nove heterozigotos e o paciente negativo para qualquer mutação já receberam alta do programa, devido normalização dos níveis séricos de 17OHP (TABELA 3).

TABELA 3: Caracterização de 36 crianças conforme resultado da análise molecular do gene CYP21A2.

Grupo	N	Número consultas	17OHP no papel filtro (ng/mL) Média	Intercorrências perinatais N (%)	Prema- turos N (%)	Alta do programa
Não Clás- sica	17	4,4 ($\pm 2,6$)	21,18 ($\pm 18,3$)	1 (0,05%)	1 (0,05%)	0
Heterozigoto	9	6,1 ($\pm 1,5$)	29,42 ($\pm 23,5$)	1 (0,11%)	1 (0,11%)	2
N493S isolado	9	4,4 ($\pm 4,3$)	28,63 ($\pm 15,2$)	4 (0,44%)	2 (0,22%)	7
Negativo	1	6	33,90	1 (100%)	1 (100%)	1

Dentre os 36 pacientes, 17 (47,2%) apresentavam genótipo relacionado à forma não clássica, sendo que os mais comuns desse grupo foram: V281L/I2G e V281L/Q318X. Nove pacientes (25%) eram heterozigotos, sendo a mutação V281L a mais prevalente. Nove pacientes (25%) apresentavam apenas o polimorfismo N493S, sem associação com outra mutação e em apenas um paciente não foi encontrado nenhuma mutação ou polimorfismo. O polimorfismo N493S estava presente em 34 dos 36 pacientes (94,4%), sendo 80% na forma homozigota e 20% na heterozigota (TABELA 4).

TABELA 4: Genótipo de 35 crianças conforme resultado da análise molecular do gene CYP21A2.

	Não Clássica (n=17)	Heterozigoto (n=9)	N493S isolado (n=9)
Genótipo	V281L- I2G-N493S / N493S	V281L-N493S / N493S	N493S/ N493S
	V281L-I2G- N493S / N493S	V281L-N493S / N493S	N493S/ N493S
	V281L- I2G- N493S / N493S	V281L-N493S / N493S	N493S/ N493S
	V281L- I2G- N493S / N493S	V281L-N493S / N493S	N493S/ N493S
	V281L-Q318X- N493S / N493S	V281L-N493S / N493S	N493S/ N493S
	V281L-Q318X- N493S / N493S	V281L-N493S / N493S	N493S/ N493S
	V281L-Q318X / N493S	V281L-N493S / N493S	N493S / -
	V281L-R356W / N493S	I2G- N493S / N493S	N493S / -
	V281L-G424S- N493S / N493S	P30L- N493S / N493S	N493S / -
	V281L-I172N- N493S / N493S		
	V281L-G381V- N493S / N493S		
	V281L-P30L- N493S / N493S		
	V281L-IVS-2A>G -N493S / N493S		
	V281L-L198-F N493S / N493S		
	V281L-F306+T- N493S / N493S		
	V281L -F306+T-Q318X / R356W		
	I172N-F306+T / N493S		

Foram comparados os valores medianos de 17OHP, androstenediona e testosterona séricos, realizados ao longo do acompanhamento, entre os grupos (TABELA 5).

TABELA 5: Comparação das medianas da 17OHP, androstenediona e testosterona séricas conforme resultado da análise molecular do gene CYP21A2.

	Não Clássica	Heterozigoto	N493S isolado	Negativo	p
17OHP (ng/mL)	10,81 (1,1-89)	10,65 (1,4 -77)	3,81 (0,7 -83,6)	3,09 (0,8 -9,8)	*0,72; #0,001; †0,001
Androstenediona (ng/mL)	0,3 (0,3-10)	0,3 (0,3-10)	0,3 (0,3-10)	0,3 (0,3-5,2)	*0,715; #0,0862; †0,695
Testosterona (ng/dL)	10 (7-295)	10 (10-625)	10 (10-667)	10 (10-188)	*0,82; #0,137; †0,189

Notas: *comparação entre os grupos Não Clássica e Heterozigoto; #comparação entre os grupos Não Clássica e N493 isolado; †comparação entre os grupos Heterozigoto e N493S isolada.

Com relação aos valores da mediana da 17OHP sérica, não houve diferença entre os grupos Não Clássica e Heterozigoto. Ambos os grupos apresentaram níveis de 17OHP mais elevados do que o grupo com o polimorfismo N493S isolado.

Não houve diferença estatística entre as medianas da androstenediona ou da testosterona, entre os grupos.

Devido à elevada incidência do polimorfismo N493S no grupo estudado, avaliou-se o éxon 10 do gene CYP21A2 de 46 crianças com triagem negativa para HAC (mediana de idade 5,4 anos (1,2-12,5), 60% do sexo feminino). O polimorfismo N493S estava presente em 44 das 46 crianças analisadas (95,6%), sendo 60% na forma homozigota e 40% na forma heterozigota. Não houve diferença estatisticamente significativa, entre o grupo de pacientes inicialmente avaliado e esse grupo controle, quanto à presença do polimorfismo N493S ($p=1,0$). Também não houve diferença entre os grupos em relação à frequência de heterozigoto ou homozigoto para essa alteração ($p=0,112$).

Discussão

No presente estudo, foi possível identificar que 47% dos pacientes com níveis persistentemente elevados de 17OHP tinham genótipo compatível com a forma não clássica da doença, sendo o V281L/Q318X e o V281L/I2G os mais frequentes. Nenhum paciente apresentou genótipo relacionado à forma virilizante simples. Além disso, detectou-se que mais de 90% deles tinha a alteração no éxon 10 (N493S), que também foi encontrada, na mesma proporção, em pacientes sem elevação dos níveis de 17OHP.

A triagem neonatal para HAC tem o objetivo de detectar as formas graves da doença, mas já é amplamente conhecido que formas virilizantes simples e não clássicas podem ser identificadas. No presente estudo, o achado de crianças com a forma não clássica foi semelhante ao relatado na literatura (Silveira *et al.*, 2009) e mais elevado que o percentual encontrado em estudo anterior, no mesmo serviço do estudo (Castro *et al.*, 2019). Esse achado chama atenção para a necessidade de melhor caracterização das crianças que se apresentam como “falso-positivas” no programa, especialmente porque os valores da 17OHP no papel-filtro e séricos não permitem essa identificação. Até o momento, nenhuma criança diagnosticada com a forma não clássica precisou de tratamento medicamentoso. No entanto, o diagnóstico é valioso para o acompanhamento a longo prazo, permitindo o tratamento precoce se houver uma evolução desfavorável, ainda que rara.

A análise das mutações do gene CYP21A2 é uma eficiente ferramenta para

predizer as manifestações clínicas do paciente, uma vez que a doença possui uma boa correlação genótipo-fenótipo. É capaz de confirmar o diagnóstico das formas clássicas de 21OHD, pode predizer a gravidade da doença com implicações terapêuticas e permite a realização de aconselhamento genético. Além disso, a análise molecular pode elucidar os casos falso-positivos, que apresentam níveis de 17-hidroxiprogesterona persistentemente elevados, encurtando o tempo de seguimento e diminuindo o estresse familiar. Tendo conhecimento do genótipo, é possível evitar o tratamento desnecessário de formas não Clássicas e dos casos falso-positivos. As recentes diretrizes da *Endocrine Society* não indicam o teste genético como segunda etapa da triagem neonatal devido à complexidade do gene CYP21A2 (SPEISER *et al.*, 2018). Além disso, é um método caro e pouco acessível. No entanto, o custo da análise molecular foi previamente estimado em US\$ 500 por paciente, enquanto o acompanhamento de um caso falso-positivo poderia custar cerca de US\$ 848 (SILVEIRA *et al.*, 2009). No presente estudo, a análise molecular se mostrou útil para reduzir o tempo de acompanhamento das crianças e evitar tratamento desnecessário.

Um grande número de SNPs, do inglês, *single nucleotide polymorphisms*, que são variações pontuais encontradas ao longo do DNA, já foram descritas no gene CYP21A2. No entanto, vários destes polimorfismos permanecem com significado incerto se podem ou não ser responsáveis pelo aumento dos níveis de 17OHP e androgênios. Um exemplo, é o polimorfismo N493S localizado no éxon 10. Nele há a substituição da base Adenosina por uma Guanina, sendo produzido o aminoácido Serina no lugar da Asparagina. Existem trabalhos mostrando que a presença do polimorfismo N493S, em associação com outras mutações no mesmo gene, pode ser responsável pelo aumento da 17OHP e consequente hiperandrogenismo. Porém, a sua influência na atividade enzimática residual não foi ainda bem estabelecida *in vitro*. Em um estudo sobre modelo molecular do CYP21A2 humano, a carga eletrostática do aminoácido produzido pelo gene com a alteração N493S demonstrou ser inalterada (ROBINS *et al.*, 2006). Wedell e Luthman (1993) consideraram esta alteração uma variante da normalidade.

O achado do polimorfismo N493S em quase 95% dos pacientes do presente estudo, despertou o interesse sobre a participação do mesmo na elevação persistente da 17OHP. De fato, foi observado que poucos recém-nascidos apresentaram intercorrências perinatais que justificassem essa elevação hormonal. Em indivíduos

com mutações do CYP21A2 esse polimorfismo nem sempre é relatado. Ele foi encontrado em apenas 3 pacientes em estudo Francês com 119 casos (Barbat *et al.*, 1995) e em outros 3, em estudo da Turquia, com 258 indivíduos (SAVAS ERDEVE *et al.*, 2017). Em ambos, essa alteração no éxon 10 foi identificada como mutação associada à forma não clássica. Ordonez-Sánchez *et al.* (1998) encontraram uma alta frequência do polimorfismo N493S em uma população mexicana e uma maior proporção de homozigose para o N493S nos pacientes com HAC.

Em outro estudo realizado na Cidade do México, pacientes com HAC apresentaram uma frequência muito alta do polimorfismo N493S (42,5%). Foram analisados também 20 indivíduos saudáveis (indivíduos clinicamente não afetados e sem história familiar de HAC). A frequência do polimorfismo não apresentou diferença significativa entre os dois grupos (42,5%, vs 37,5% $p=0,5$), como no presente estudo. No entanto, uma maior proporção de homozigotos foi encontrada entre os doentes (30% vs 15%, $p=0,01$) (RODRIGUES *et al.*, 1987). Apesar de termos, também, observado maior proporção de homozigotos nas crianças com 17OHP elevada em relação aos controles, a diferença não alcançou significância estatística. Já um estudo em Chipre (ilha no Mediterrâneo) mostrou que entre 57 mulheres com hiperandrogenismo, seis eram homozigotas e as demais 51 heterozigotas para o polimorfismo N493S. A maioria das pacientes com N493S apresentou níveis basais ou estimulados de 17OHP elevados e sinais clínicos de excesso de androgênio. Sendo assim, foi sugerido que a presença do polimorfismo N493S pode ter um papel direto na manifestação do hiperandrogenismo e do aumento dos níveis da 17OHP (NEOCLEOUS *et al.*, 2014).

Um efeito sinérgico de mutações parcialmente inativadoras (P105L e P453S) já foi documentado para o gene CYP21A2 (NIKOSHKOV *et al.*, 1997). Também foi sugerido que o N493S, quando associado a outro polimorfismo, o S268T, resulte em diminuição da atividade enzimática (ASANUMA *et al.*, 1999). Este último já foi caracterizado como inativo (WU *et al.*, 1991), mas, em publicação recente, foi associado ao fenótipo da HAC (KHAJURIA *et al.*, 2017).

Diante desses achados, a avaliação de crianças sem elevação da 17OHP foi mandatória. O encontro de percentual similar do polimorfismo N493S nessas crianças, e, de acordo com dados da literatura citados acima, pode sugerir que essa alteração seja mais frequente em algumas etnias. Até o momento, porém, uma possível patogenicidade desse polimorfismo continua incerta.

Uma limitação do nosso estudo foi a impossibilidade de realização do sequenciamento completo do CYP21A2 nos controles, que poderia revelar outros polimorfismos, o que poderia contribuir para melhor caracterização de associações nessas crianças.

Conclusões

A análise molecular do gene CYP21A2 contribuiu para o diagnóstico da forma não clássica da HAC em praticamente metade das crianças assintomáticas e com aumento persistente da 17OHP, após triagem neonatal para HAC. Esse percentual, bastante elevado, corrobora a utilidade do estudo genético em situações especiais.

A identificação do polimorfismo N493S, previamente associado à redução da atividade enzimática da 21OH, em 95% dos pacientes, suscita dúvidas e motiva o desenvolvimento de novos estudos para esclarecer seu papel.

Referências

Al Saedi S, Dean H, Dent W, Stockl E, Cronin C. Screening for congenital adrenal hyperplasia: the Delfia Screening Test overestimates serum 17-hydroxyprogesterone in preterm infants. *Pediatrics*. 1996 Jan;97(1):100-2.

Applied Biosystems Chemistry Guide. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. 2nd ed. 1998. Chapter 3, p. 34-35. Disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_041003.pdf. Acesso 09 fev. 2020.

Asanuma A, Ohura T, Ogawa E, Sato S, Igarashi Y, Matsubara Y et al. Molecular analysis of Japanese patients with steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Hum Genet*. 1999; 44(5):312-7.

Bachega TA, Brenha EM, Billerbeck AE, Marcondes JA, Madureira G, Arnhold IJ, 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.

Barbat B, Boguo A, Raux- Demay MC, Kuttann F, Boue J, Simon- Bouy B, et al. Screening of CYP21 gene mutations in 129 french patients affected by steroid 21-hydroxylase deficiency. *Hum Mutat*. 1995; 5:126-30.

Carvalho DF, Miranda MC, Gomes LG, Madureira G, Marcondes JA, Billerbeck AE, et al. Molecular CYP21A2 diagnosis in 480 Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia before newborn screening introduction. *Eur J Endocrinol*. 2016 Aug;175(2):107-16.

Castro PS, Rassi, TO, Araujo RF, Pezzuti IL, Rodrigues AS, Bachega TASS et al. High frequency of non-classical congenital adrenal hyperplasia form among children with persistently elevated levels of 17-hydroxyprogesterone after newborn screening. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2019; 32(5): 499-504.

El-Maouche D, Arlt W, Merke DP. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet*. 2017 Nov 11;390(10108):2194-2210.

Ezquieta B, Oliver A, Gracia R, Gancedo PG. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Hum Genet*. 1995;96:198-204

Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999; 41: 95-98.

Lajic S, Clauin S, Robins T, Vexiau P, Blanché H, Bellanne-Chantelot C, et al. Novel mutations in CYP21 detected in individuals with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:2824-9.

Khajuria R, Walia R, Bhansali A, Prasad R. The spectrum of CYP21A2 mutations in Congenital Adrenal Hyperplasia in an Indian cohort. *Clinica Chimica Acta* 2017; 464: 189–194.

Kopacek, C. Clinical and molecular profile of 132 newborns with confirmed or suspicious Congenital Adrenal hyperplasia in the first two years of a public screening program implementation, Porto Alegre, 2016. 56f. Tese (Doutorado em Ciências médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.

Matern D, Tortorelli S, Oglesbee D, Gavrillov D, Rinaldo P. Reduction of the false-positive rate in newborn screening by implementation of MS/MS-based second-tier tests: the Mayo Clinic experience (2004-2007). *J Inher Metab Dis.* 2007 Aug;30(4):585-92.

Menabò S, Balsamo A, Baldazzi L, Barbaro M, Nicoletti A, Conti V, et al. A sequence variation in 3'UTR of CYP21A2 gene correlates with a mild form of congenital adrenal hyperplasia. *J Endocrinol Invest* 2012;35:298-305.

Neocleous V, Shamma C, Phedonos AA, Phylactou LA, Skordis N. Phenotypic variability of hyperandrogenemia in females heterozygous for CYP21A2 mutations. *Indian J Endocrinol Metab.* 2014;18(Suppl 1):S72-9.

Nikoshkov A, Lajic S, Holst M, Wedell A, Luthman H. Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Jan;82(1):194-9.

Ordoñez-Sánchez ML, Ramírez-Jiménez S, López-Gutierrez 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 Feb;102(2):170-7.

Pang S, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon ICT, Dobbins RH, Kling S, Fujieda K, Suwa S (1988) Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 81:866–874

Robins T, Carlsson J, Sunnerhagen M, Wedell A, Persson B. Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia. *Mol Endocrinol.* 2006 Nov;20(11):2946-64.

Rodrigues NR, Dunham I, Yu CY, Carroll MC, Porter RR, Campbell RD. Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. *EMBO J.* 1987 Jun;6(6):1653-61.

Savaş-Erdeve Ş, Çetinkaya S1, Abalı ZY, Poyrazoğlu Ş, Baş F, Berberoğlu M, et al. Clinical, biochemical and genetic features with nonclassical 21-hydroxylase deficiency and final height. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2017; 30(7):759-766.

Silveira EL, Elnecave RH, dos Santos EP, Moura V, Pinto EM, van der Linden Nader I, Mendonca BB, Bachega TA. Molecular analysis of CYP21A2 can optimize the follow-up of positive results in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Clin Genet.* 2009 Dec;76(6):503-10.

Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, et al; Endocrine Society. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Sep;95(9):4133-60.

Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, et al. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018 Nov 1;103(11):4043-4088.

Torresani T, Biason-Lauber A. Congenital adrenal hyperplasia: diagnostic advances. *J Inherit Metab Dis.* 2007 Aug;30(4):563-75.

Van der Kamp HJ, Wit JM. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol.* 2004;151 Suppl 3:U71-5

Wedell A, Luthman H. Steroid 21-hydroxylase (P450c21): a new allele and spread of mutations through the pseudogene. *Hum Genet.* 1993; 91:236–240.

Wilson RC, Wei JQ, Cheng KC, Mercado AB, New MI. Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80:1635-1640.

Wu DA, Chung BC. Mutations of P-450c21 (steroid 21-hydroxylase) at Cys428, Val281, and Ser268 result in complete, partial, or no loss of enzymatic activity, respectively. *J Clin Invest.* 1991; 88:519–523.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A Senhora e seu filho(a) estão sendo convidados a participar da pesquisa **“Análise molecular das crianças assintomáticas triadas pelo programa de Triagem neonatal para Hiperplasia adrenal congênita com níveis persistentemente elevados de 17 hidroxiprogesterona”**.

A hiperplasia adrenal congênita é uma doença genética, caracterizada pela produção diminuída dos hormônios cortisol e aldosterona, responsáveis pela manutenção do nível de glicose (açúcar) no sangue e da conservação da água e sal no organismo.

O diagnóstico precoce é extremamente importante para as formas graves e por isso é feita a triagem neonatal, “teste do pezinho”, entre o 3º e o 5º dias de vida.

O resultado positivo no teste do pezinho significa que há uma chance do bebê ter a doença. Mas, em situações de estresse por exemplo, em crianças doentes, prematuras e/ou com baixo peso ao nascer pode ocorrer um resultado falso positivo quando o hormônio 17-hidroxiprogesterona está transitoriamente elevado e o bebê não tem a doença. Pode acontecer também do bebê apresentar uma forma leve da doença.

A pesquisa contribuirá para o diagnóstico precoce das crianças com exames falso-positivos e formas leves da doença na triagem neonatal para Hiperplasia adrenal congênita.

01) Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização de sangue periférico da Senhora e de seu filho(a). A utilização do material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa.

02) Nesta pesquisa pretendemos analisar as mutações do gene CYP21A2 nas crianças assintomáticas com 17 hidroxiprogesterona persistentemente elevadas. Para esta pesquisa iremos coletar 5 ml de sangue periférico venoso no centro de coleta do Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio diagnóstico-Nupad. O material biológico será tratado seguindo todas as regras da vigilância sanitária.

03) Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em desconforto transitório durante a coleta de sangue que serão minimizados através de uma coleta por profissionais qualificados em ambiente adequado.

04) Para participar deste estudo a senhora não terá nenhum custo e nem receberá nenhum ressarcimento financeiro.

05) A senhora terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para recusar-se a participar a qualquer momento. A recusa em participar não acarretará qualquer modificação durante o acompanhamento de seu filho(a).

07) A senhora será informada dos resultados obtidos pela pesquisa quando finalizada. Os participantes não serão identificados nos produtos que possam resultar do estudo, como publicações, por exemplo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no **Ambulatório de triagem neonatal para Hiperplasia adrenal congênita** e a outra será fornecida a senhora.

Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portadora do documento de Identidade _____ e responsável por _____ meu filho(a), fui informada e concordo em participarmos da pesquisa **“Análise molecular das crianças assintomáticas triadas pelo programa de Triagem neonatal para Hiperplasia adrenal congênita com níveis persistentemente elevados de 17 hidroxiprogesterona”**

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo do participante

Data

Assinatura do participante

Nome completo do Pesquisador Responsável: Profa. Ivani Novato Silva

Endereço: Avenida Alfredo Balena 190-Departamento Pediatria

CEP: 30130100 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 3409-9566

E-mail: ivanins@gmail.com

Assinatura do pesquisador responsável

Data

Nome completo do Pesquisador: Dra. Raquel Ferreira Araujo

Endereço: Rua Paracatu 878/702 Barro Preto

CEP: 30455190 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 3337-1663

E-mail: quelfa@gmail.com

Assinatura do pesquisador (mestrando ou doutorando)

Data

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Grupo Controle

A Senhora e seu filho(a) estão sendo convidados a participar da pesquisa **“Análise molecular das crianças assintomáticas triadas pelo programa de Triagem neonatal para Hiperplasia adrenal congênita com níveis persistentemente elevados de 17 hidroxiprogesterona”**.

A pesquisa contribuirá para o diagnóstico precoce das crianças com exames falso-positivos e formas leves da doença na triagem neonatal para Hiperplasia adrenal congênita.

01) Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização de sangue periférico de seu filho(a). A utilização do material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa.

02) Nesta pesquisa pretendemos analisar ao éxon 10. Para esta pesquisa iremos coletar sangue periférico venoso no papel filtro FTA no centro de coleta do Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio diagnóstico-Nupad. O material biológico será tratado seguindo todas as regras da vigilância sanitária.

03) Para participar deste estudo a senhora não terá nenhum custo e nem receberá nenhum ressarcimento financeiro.

04) A senhora terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para recusar-se a participar a qualquer momento. A recusa em participar não acarretará qualquer modificação durante o acompanhamento de seu filho(a).

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no **Ambulatório de triagem neonatal para Hiperplasia adrenal congênita** e a outra será fornecida a senhora.

Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portadora do documento de Identidade _____ e responsável por _____ meu filho(a), fui informada e concordo em participarmos da pesquisa **“Análise molecular das crianças assintomáticas triadas pelo programa de Triagem neonatal para Hiperplasia adrenal congênita com níveis persistentemente elevados de 17 hidroxiprogesterona”**

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Assinatura do Responsável

Nome completo do Pesquisador: Dra. Raquel Ferreira Araujo

Endereço: Rua Paracatu 878/702 Barro Preto

CEP: 30455190 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 3337-1663

E-mail: quelfa@gmail.com

Assinatura do pesquisador

Data

ANEXOS

ANEXO A – Declaração de apoio institucional



DECLARAÇÃO DE APOIO INSTITUCIONAL

Declaro que o projeto de pesquisa intitulado "Análise molecular das crianças assintomáticas triadas pelo programa de Triagem neonatal para Hiperplasia adrenal congênita com níveis persistentemente elevados de 17 hidroxiprogesterona", foi considerado "viável" e que os dados necessários a realização da pesquisa, serão disponibilizados, conforme solicitação feita ao Nupad/FM/UFMG por meio do detalhamento operacional e financeiro anexo a esta declaração.

O projeto segue as normas regimentais do Nupad/FM/UFMG e cumpre as diretrizes do Setor de Apoio Administrativo a Gestão de Projetos. A aceitação está condicionada ao cumprimento, por parte dos solicitantes pesquisadores, aos requisitos da Resolução 468/2012 e suas complementares, e que ainda se comprometem a utilizar os dados e materiais coletados, exclusivamente para os fins propostos no referido projeto de pesquisa.

Belo Horizonte, 25 de abril de 2019.

Prof. Ana Lúcia Pimenta Starling
Coordenadora Acadêmica
Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais

Universidade Federal de Minas Gerais

Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG
Av. Alfredo Balena, 190 - 5ª andar - Santa Efigênia - CEP: 30130-100 Belo Horizonte - MG
Fone: (31) 3409-8900 - Fax: (31) 3409-8967 - E-mail: nupad@medicina.ufmg.br
Site: www.nupad.medicina.ufmg.br



FACULDADE
DE MEDICINA
• UFMG •

UFMG

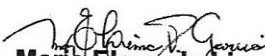
ANEXO B – Parecer de aprovação do COEP

UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais <i>Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP</i>
-------------	--

Parecer nº. ETIC 392/07**Interessado(a): Profa. Ivani Novato Silva**
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina/UFMG**DECISÃO**


O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 29 de agosto de 2007, o projeto de pesquisa intitulado **"Implantação de Programa de Triagem Neonatal para Hiperplasia Congênita da Supra-Renal no Sistema Público de Saúde"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.


O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO C – Folha de aprovação

VIA DO ALUNO

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE



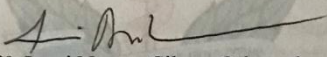
FOLHA DE APROVAÇÃO

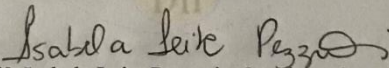
ANÁLISE MOLECULAR DO GENE CYP21A2 DE CRIANÇAS COM TRIAGEM POSITIVA PARA HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA, ASSINTOMÁTICAS E COM NÍVEIS PERSISTENTEMENTE ELEVADOS DE 17-HIDROXIPROGESTERONA

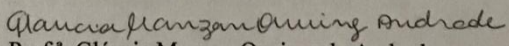
RAQUEL FERREIRA ARAUJO

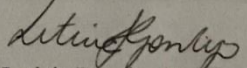
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE - SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE, área de concentração em CIÊNCIAS DA SAÚDE.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:


Prof.^a Ivani Novato Silva - Orientadora
UFMG


Prof.^a Isabela Leite Pezzuti - Coorientadora
UFMG


Prof.^a Gláucia Manzan Queiroz de Andrade
UFMG


Prof.^a Leticia Ferreira Gontijo Silveira
UFMG

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2020.