

# HIPERPLASIA CONGÉNITA DA SUPRA-RENAL DE EXPRESSÃO TARDIA POR DEFICIÊNCIA DE 21-HIDROXILASE

## Revisão da Literatura e Estudo Genético

### Preconcepção de Cinco Casais

Alexandra VIEIRA, Sandra PAIVA, Carla BAPTISTA, Luísa RUAS, Júlia SILVA, João GONÇALVES, Francisco CARRILHO, Manuela CARVALHEIRO

#### RESUMO

A deficiência da enzima 21-hidroxilase (21-OH) é responsável por cerca de 90%-95% dos casos de hiperplasia congénita da supra-renal (HCSR). Trata-se de uma das doenças hereditárias de transmissão autossómica recessiva mais frequentes.

A doença pode apresentar-se de duas formas clínicas: 1 – Forma clássica, subdividida em perdedora de sal e simplesmente virilizante; 2 – Forma não clássica ou de expressão tardia.

A gravidade da doença correlaciona-se com o grau de actividade enzimática da 21-OH, que, por sua vez, depende do tipo de mutação que ocorre no gene *CYP21A2*.

A hiperplasia congénita da supra-renal de expressão tardia (HCSR-T) é aquela em que o bloqueio enzimático é menos grave. A clínica é variável: pubarca precoce, hirsutismo, oligoamenorreia, acne, ovários poliquísticos e infertilidade.

*O gold standard* para o diagnóstico da HCSR-T consiste na prova do tetracosactídeo, considerando-se diagnóstico positivo quando a hormona 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) é superior a 10-15 ng/mL. Muitos doentes não necessitam de tratamento; mas se necessário, este consiste essencialmente na administração de glicocorticóides e anti-androgéneos.

Dado que tanto indivíduos afectados como indivíduos portadores, podem possuir uma mutação grave no gene *CYP21A2*, e terem descendência com a forma clássica (caso o parceiro seja também portador de uma mutação grave), é mandatário o estudo genético do casal. Os autores demonstram a importância desse estudo genético através de cinco casos clínicos, cujo denominador comum é o desejo de terem filhos e o elemento feminino apresentar HCSR-T.

O estudo genético do casal permite o aconselhamento pré-concepção adequado e evita o uso de corticóides ao longo da gravidez, se não houver risco de descendência afectada com a forma clássica. Este aspecto deve ser tido em conta na programação da gravidez para obviar terapêuticas e receios desnecessários.

A.V., S.P., C.B., L.R., F.C., M.C.: Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. Hospitais da Universidade de Coimbra.

J.S., J.G.: Departamento de Genética, Unidade de Genética Molecular. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Coimbra

© 2011 CELOM

## SUMMARY

### LATE ONSET CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA DUE TO 21-HYDROXYLASE DEFICIENCY

#### Revision of Literature and Preconception Genetic Study of Five Couples

The deficiency of the enzyme 21-hydroxylase (21-HO) is responsible for about 90% to 95% of all cases of congenital adrenal hyperplasia (HCSR). This disorder is one of the most frequent hereditary illnesses of autosomal recessive trait.

The illness can be presented in two clinical forms: 1 – classic, subdivided in salt-wasting form and simple virilizing form; 2 – nonclassic or late-onset.

The severity of the illness is correlated with the degree of enzymatic activity of 21-HO, which depends on the type of mutation that occurs in gene *CYP21A2*.

The late onset congenital adrenal hyperplasia is that one where the enzymatic blockade is less intense. The clinical is variable: precocious pubarche, polycystic ovaries, hirsutism, oligoamenorrhea, acne and infertility.

Gold standard for the diagnosis of late onset congenital adrenal hyperplasia consists on the test of the *tetracosactide*, considering itself diagnostic positive when 17-hidroxi-progesterona (17-OHP) is higher of 10-15 ng per mL. Many patients don't need treatment; however, if necessary, such a treatment essentially consists on the administration of glucocorticoids and antiandrogens.

Considering that affected individuals and the carriers may have a severe mutation in *CYP21A2*, they can have descendents with the classic form (if their partner is also a carrier of a severe mutation), it is mandatory the genetic study of the couple. The authors illustrate the importance of this genetic study through five clinical cases, whose common link is the desire to have children, as well as the presence on the feminine element of late onset congenital adrenal hyperplasia.

The genetic study of the couple allows adequate pre-conception counseling and also prevents the use of corticoids throughout the pregnancy (if there's no risk of descendents being affected with the classic form). This aspect must be had in account in programming the pregnancy, in order to prevent therapeutics and unnecessary distrusts.

## INTRODUÇÃO

O controlo da actividade do córtex da supra-renal ocorre, primariamente, pela estimulação da hipófise pela CRH (*Corticotropin Releasing Hormone*, hormona libertadora de corticotropina) segregada pelo hipotálamo. Por sua vez, a hipófise segrega a ACTH que actua no córtex das supra-renais estimulando a esteroideogénese. A regulação entre o eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais ocorre por um mecanismo de retrocontrolo negativo<sup>1,2</sup>.

A hiperplasia congénita da suprarrenal (HCSR), um erro inato do metabolismo do cortisol, transmitido geneticamente de forma autossómica recessiva<sup>3-8</sup>, ocorre quando existe deficiência de uma das cinco enzimas envolvidas na biossíntese do cortisol, principal glicocorticóide humano (Figura 1)<sup>2,3,9-15</sup>. Uma vez que a secreção de cortisol está diminuída, os níveis de ACTH aumentam (retrocontrolo negativo) e estimulam a secreção de hormonas da supra-renal, levando à hiperplasia do seu córtex<sup>6,7,10,13,16,17</sup>.

O cortisol é produzido na zona fasciculada, a partir do colesterol, por uma série de passagens enzimáticas interligadas. A enzima 21-hidroxilase (21-OH), pertencente ao grupo de enzimas do citocromo P450, é responsável pela conversão da progesterona em desoxicorticosterona e pela conversão de 17-hidroxiprogesterona em 11-desoxicortisol<sup>7,12,13,18</sup>. A deficiência de 21-OH é a forma mais comum de HCSR, sendo responsável por cerca de 90%-95% dos casos<sup>1,2,5,7,9,10,12,14,16,19-21</sup>. Ocorre uma acumulação dos precursores que são substrato para a 21-hidroxilação<sup>6,17</sup>, e estes são desviados para a via da síntese de androgéneos<sup>7,10,12,13,17,18</sup>, levando a níveis elevados de androstenediona, testosterona, dihidrotestosterona e estrogéneos aromatizados periféricamente<sup>7,13</sup>. Os glicocorticóides endógenos são essenciais para o desenvolvimento e função da medula da supra-renal<sup>13,22-24</sup>. Na ausência de cortisol, a organogénese da medula da supra-renal é severamente alterada, com o consequente défice de catecolaminas, principalmente adrenalina<sup>13,23</sup>. O hiperandroge-

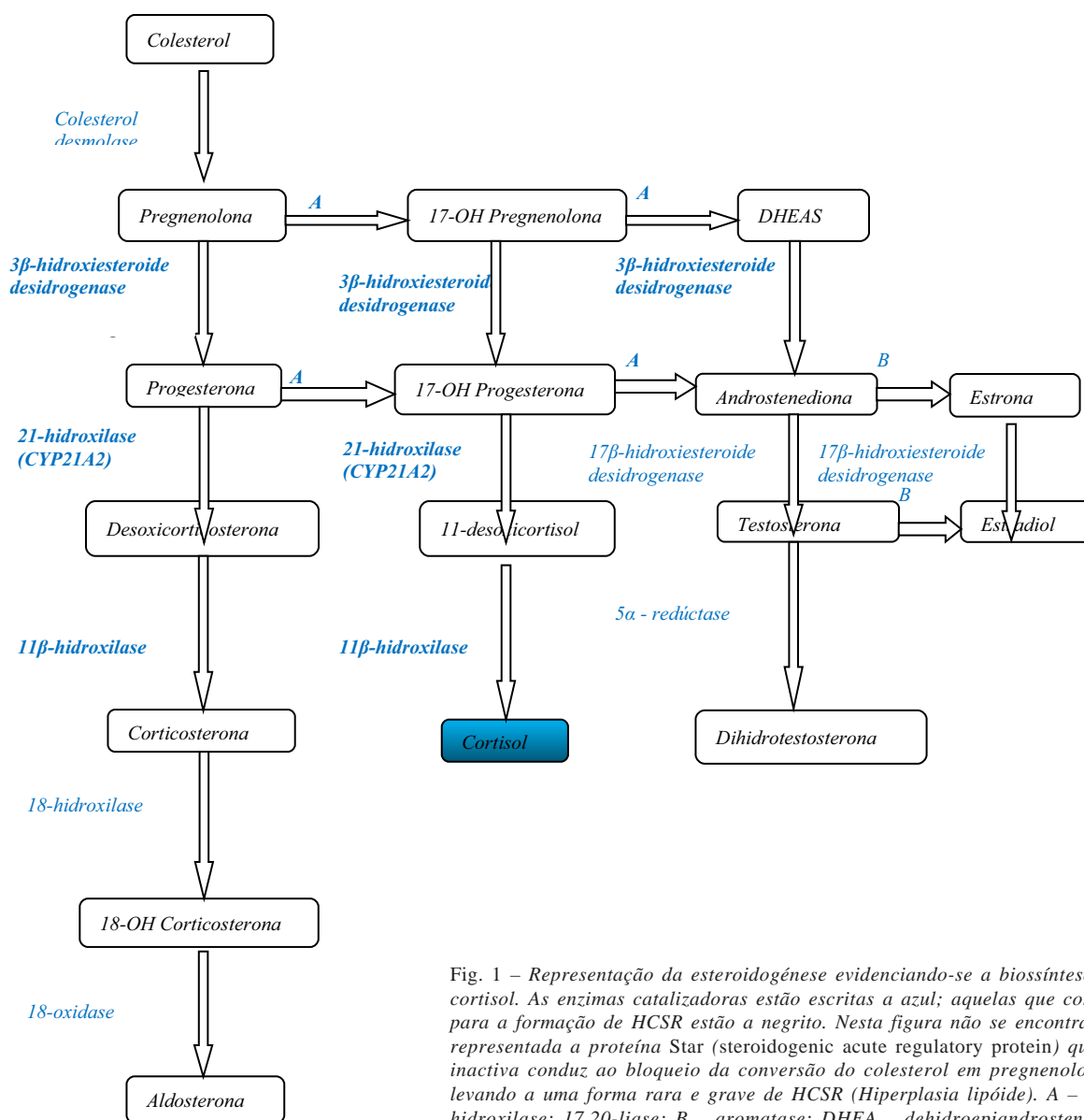


Fig. 1 – Representação da esteroidogénese evidenciando-se a biossíntese do cortisol. As enzimas catalizadoras estão escritas a azul; aquelas que contribuem para a formação de HCSR estão a negrito. Nesta figura não se encontra representada a proteína Star (steroidogenic acute regulatory protein) que quando inactiva conduz ao bloqueio da conversão do colesterol em pregnenolona levando a uma forma rara e grave de HCSR (Hiperplasia lipóide). A – 17 $\alpha$ -hidroxilase; 17,20-liase; B – aromatase; DHEA – dehidroepiandrostenediona.

nismo e a deficiência de adrenalina podem causar ou agravar o hiperinsulinismo e a hiperleptinémia, que contribuem para os vários distúrbios metabólicos observados na deficiência de 21-OH<sup>13</sup>.

### DADOSEPIDEMIOLÓGICOS

A HCSR por deficiência de 21-OH é uma das doenças autossómicas recessivas conhecidas mais frequentes<sup>2</sup>. A incidência da forma clássica da doença na população caucasiana é de cerca de 1:15000 a 1:10000 nados vivos<sup>2,3,6,7,17,18,25,26</sup>, enquanto que a prevalência da forma não clássica é de 0,2%<sup>12</sup>; contudo, existe uma prevalência

significativamente superior entre algumas populações nomeadamente em judeus Askanazy, hispânicos e jugoslavos cuja prevalência varia de 1,0% a 3,7%<sup>2,7,25,27</sup>. A heterozigotia para a deficiência de 21-OH-forma clássica está estimada em 1/60 em caucasianos não judeus<sup>13</sup> e em 1/3 em judeus Askanazy<sup>12,25</sup>.

### MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A doença pode apresentar-se em duas formas clínicas: forma clássica, subdividida em perdedora de sal (PS) e simplesmente virilizante (SV); e forma não clássica ou de expressão tardia (HCSR-T)<sup>1,2,9,18</sup>.

A forma clássica simplesmente virilizante (SV) caracteriza-se por ambiguidade genital nos fetos do sexo feminino<sup>2,12,13,17,20</sup> e por sinais de virilização precoce em indivíduos do sexo masculino, devido ao excesso de androgénios produzido pelo desvio da via metabólica do cortisol<sup>17</sup>. Quando não tratado, leva a virilização pós-natal progressiva, em ambos os sexos, com sinais e sintomas evidentes de pseudo-puberdade precoce (aumento do pénis sem correspondente aumento testicular, pubarca, hirsutismo, acne, engrossamento da voz, avanço da velocidade de crescimento e maturação esquelética)<sup>12,15,17,20</sup>. Os indivíduos do sexo feminino, se não medicados, apresentam irregularidades menstruais, com ou sem hirsutismo<sup>17</sup>; a forma SV tem sido associada a síndrome de ovário policístico<sup>17</sup>.

A fertilidade masculina está frequentemente diminuída devido à presença de tumores adrenais gonadais em 50-95% dos casos<sup>13,18,28,29,30</sup>. Estes tumores surgem em células que têm propriedades de células adrenais e de células de Leydig<sup>13</sup>. Devido à sua localização no testículo, podem causar a obstrução dos tubos seminíferos<sup>30</sup>. Para além disso, os esteróides produzidos pelo tumor podem alcançar a circulação interferindo com a secreção de FSH e LH pela hipófise e podem ser tóxicos para o tecido testicular, actuando de modo parácrino, contribuindo para a disfunção testicular<sup>30</sup>. Os glicocorticóides podem levar à supressão da secreção de ACTH, redução do tamanho do tumor<sup>18,20,30</sup> e reversão da infertilidade, contudo, a cirurgia pode ser necessária nos casos que não respondem ao tratamento hormonal<sup>13</sup>.

A forma perdedora de sal (PS) corresponde a 75%<sup>2,6,12,13,17,18,20</sup> dos casos da forma clássica. Ao nível dos órgãos genitais externos, a forma PS manifesta-se do mesmo modo que a forma SV, tornando-se esta mais grave, devido à deficiência na produção de mineralocorticóides que conduz a dificuldade de manutenção do balanço electrolítico do organismo<sup>10</sup>. Pode manifestar-se desde formas graves com quadro de desidratação hiponatrémica, hipercaliémia, vómitos, acidose metabólica, choque hipovolémico<sup>2,5,6,12,13,18</sup> e morte, se não for instituído tratamento adequado, até quadros mais discretos, onde se observa baixa progressão ponderal e alterações hidroelectrolíticas, com actividade da renina plasmática aumentada. Nestes casos, o risco de desidratação e choque existe quando esses indivíduos são submetidos a situações de stress, sem a adequada reposição de glicocorticóide<sup>1,2,9,17</sup>. O grau de perda de sal não se correlaciona com o grau de virilização<sup>13,17,31</sup>.

Na HCSR-T, o bloqueio enzimático é parcial, não ocorrendo deficiência de cortisol. Os indivíduos afectados apresentam manifestações de hiperandrogenismo com início na fase tardia da infância ou início da idade adulta<sup>2,10,13</sup>.

Não ocorre virilização pré-natal<sup>7,13</sup>. Estes doentes podem apresentar pubarca precoce<sup>7,17,18,20,25,27,32-34</sup>, hirsutismo (60%)<sup>2,7,18,20,25,27</sup>, oligomenorreia ou amenorreia (54%)<sup>7,12,17,18,20,25,27</sup> com ovários policísticos, acne (33%), principalmente na forma cística<sup>2,7,12,17,25</sup>, engrossamento da voz, avanço do crescimento e maturação esquelética<sup>18,25,27</sup> e infertilidade (13%)<sup>1,2,9,12,13,20,25,27,35</sup>. As crianças, apresentam uma estatura acima da média para a idade, mas a estatura final é baixa devido ao encerramento precoce das epífises<sup>25,29,36,37</sup>. Cerca de 50% das mulheres com a forma não clássica necessitam de tratamento com glicocorticóides para engravidar<sup>13,38,39</sup>.

Algumas mulheres não apresentam sintomas e muitos homens permanecem sempre assintomáticos<sup>2,7,13</sup>. A frequência da forma não clássica entre mulheres com infertilidade ou com sintomas de hiperandrogenismo é de 1-2%<sup>2,11,40,41</sup>. Estima-se que a frequência de HCSR-T entre mulheres com síndrome de ovário policístico seja de 1%-3%<sup>20</sup>.

Em relação aos indivíduos do sexo masculino com a forma não clássica, as manifestações de excesso de androgénios podem traduzir-se por baixa estatura, oligozoospermia<sup>7</sup> e diminuição da fertilidade<sup>7,17,25</sup>. Geralmente, não apresentam diminuição da função gonadal e tendem a ter uma contagem de espermatozóides normal<sup>12,25</sup>. Tem-se verificado resolução da infertilidade e da oligozoospermia com o tratamento com glicocorticóides<sup>7,25</sup>.

## DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico clínico deverá ser suportado por doseamentos hormonais. Os indivíduos com a forma clássica da doença, apresentam aumento acentuado de 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) sérica (superior a 100 ng/mL)<sup>2,12</sup>, sem aumento de 11-desoxicortisol, com aumento menos acentuado de dehidroepiandrosterona (DHEA),  $\Delta$ 4-androstenediona e testosterona basais. Os indivíduos com a forma não clássica podem apresentar valores normais de 17-OHP, pelo que o *gold standard* para o diagnóstico é a prova de estimulação com ACTH sintética (prova do tetraacosactídeo), com medição da 17-OHP após 60 minutos<sup>2,7,12,17,25</sup>. Embora a maioria dos autores defenda que esta prova deva ser realizada durante os primeiros dias do ciclo menstrual, há quem defenda que possa ser realizada em qualquer altura do ciclo<sup>2</sup>; normalmente, os indivíduos com a forma não clássica apresentam valores de 17-OHP superiores a 10 até 15 ng/mL 60 minutos após estimulação<sup>18</sup>. Uma concentração, após estimulação, de 17-OHP superior a 15 ng/mL<sup>12</sup> é diagnóstica de deficiência de 21-OH<sup>2</sup>. Muitos portadores têm apenas concentrações de 17-OHP ligeiramente aumentadas após teste de estimulação<sup>2</sup>.

Nas formas PS, verifica-se ainda aumento da actividade da renina plasmática, hiponatremia e hipercaliémia<sup>1,2,9,12,17,20</sup>.

## TERAPÊUTICA

Na forma clássica, os glicocorticóides são administrados em doses suficientes para suprimir parcialmente a secreção de androgéneos pela supra-renal, sem supressão total do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal; os mineralocorticóides são administrados para normalizar os desequilíbrios hidroelectrolíticos e normalizar a actividade da renina plasmática. A secreção fisiológica de cortisol é de cerca de 6 mg/m<sup>2</sup>/dia<sup>7,18,42,43</sup> e muitos doentes têm controlo satisfatório da produção de androgéneos com doses de hidrocortisona de 12-18 mg/m<sup>2</sup>/dia dividido em duas ou três tomas diárias<sup>2,13,18</sup>, conseguindo-se melhor controlo quando a dosagem é mais elevada na toma da manhã<sup>13,18</sup>. A concentração de androgéneos da supra-renal após o início da medicação diminui mas não deve ser suprimida abaixo dos valores normais devido ao risco de síndrome de Cushing iatrogénico<sup>2</sup>.

A hidrocortisona é o corticóide de escolha durante a infância, na dose de 10-20 mg/m<sup>2</sup>/dia dividido em três tomas<sup>7,12,17,44</sup>. Os glicocorticóides de maior duração de acção, tal como a prednisona (5,0-7,5 mg/dia divididas em duas tomas) e a dexametasona (0,25-0,5 mg ao deitar ou dividida em duas tomas) têm sido usados em adultos<sup>7,18</sup>, mas devem ser evitados nas crianças pelo risco de supressão de crescimento<sup>2,7,12,13</sup>. A eficácia do tratamento é monitorizada pela medição dos níveis de 17-OHP e de androstenediona, tendo sempre em conta a sua relação com a altura de administração do corticóide<sup>12,18</sup>. O objectivo da terapêutica é administrar a menor dose de glicocorticóide que permita supressão adequada dos androgéneos da supra-renal e mantenha um crescimento e desenvolvimento pubertário normais<sup>12,13</sup>. Os níveis de 17-OHP devem ser parcialmente suprimidos para a faixa de 1-10 ng/mL<sup>7,12,18</sup>. Os níveis de androstenediona e testosterona devem ser mantidos dentro dos valores que estão indicados para a idade e género do doente<sup>12,17</sup>.

Nos casos da forma PS é necessário também a reposição de mineralocorticóide, normalmente com a administração de fludrocortisona<sup>2,20</sup>. A dose deve ser ajustada de modo a manter a actividade da renina plasmática no valor intermédio do intervalo normal<sup>2</sup>. A dose diária habitual é de cerca de 100 µg-200 µg<sup>7,12,13,18</sup>. A dose é independente do volume corporal, sendo necessário, normalmente, a administração de doses superiores na infância precoce. O uso de fludrocortisona em doentes com a forma clássica

SV é recomendada e permite diminuir as doses de glicocorticóides<sup>7,13,18,20,44</sup>.

As crianças com a forma PS necessitam frequentemente da suplementação com cloreto de sódio (1-2 g/dia)<sup>7,12,18</sup>. A suplementação por rotina, normalmente, não é necessária após os 6-12 meses de vida<sup>2,17</sup>; os doentes devem ser encorajados a usar livremente o sal, de acordo com o seu desejo<sup>2,7,18</sup>. A ingestão adicional de sal pode ser necessária após exposição ao calor ou a exercício intenso<sup>2</sup>.

Quando existem alterações da genitália externa, torna-se necessário a intervenção cirúrgica, com clitoroplastia e introitoplastia, geralmente nos primeiros 12 a 18 meses de vida, tentando minimizar problemas psicossociais, permitindo uma vida sexual normal<sup>1,2,9</sup>, uma vez que não existem alterações a nível dos órgãos internos.

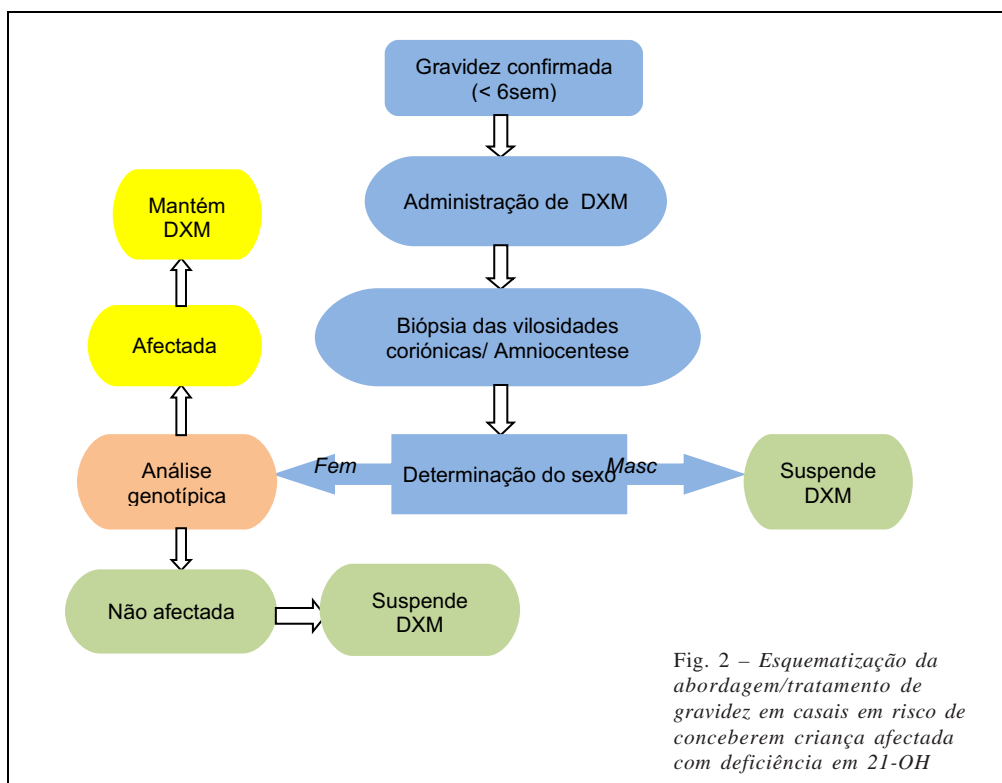
Os doentes com a forma clássica não conseguem produzir uma quantidade de cortisol suficiente em resposta ao stress e necessitam de doses elevadas de hidrocortisona (50-100 mg/m<sup>2</sup>/dia) em determinadas situações tais como doenças febris e cirurgia sob anestesia geral<sup>18,45</sup>.

Muitos doentes com a forma não clássica não necessitam de tratamento, sendo este recomendado apenas para os que apresentam sinais e/ou sintomas e o objectivo é reduzir o hiperandrogenismo<sup>12,27,44</sup>. O tratamento com glicocorticóides está indicado em crianças com excesso de androgéneos, enquanto as mulheres adultas podem necessitar de tratamento com anti-androgéneos<sup>2,12</sup>. Os anti-androgéneos devem ser usados com cuidado em conjunto com anti-concepcionais orais porque atravessam a placenta<sup>2</sup>. Quando a gravidez é desejada, pode ser necessário a indução da ovulação<sup>27</sup> e a administração de glicocorticóides que não atravessam a placenta (prednisolona e prednisona)<sup>2</sup>.

## DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO PRÉ-NATAL

Têm sido desenvolvidos métodos eficazes de diagnóstico e tratamento pré-natal, com a finalidade de evitar ambiguidade genital nos indivíduos do sexo feminino e a pseudopuberdade precoce no sexo masculino, assim como as perturbações psicossociais que daí advêm. O diagnóstico e tratamento pré-natal permitem evitar os óbitos nos casos da forma PS (figura 2)<sup>1,2,9,13,46,47</sup>. O diagnóstico pré-natal só é possível por volta da 10ª semana através da biopsia das vilosidades coriônicas<sup>48</sup> ou, alternativamente, pela amniocentese à 15ª-18ª semana<sup>17</sup>. Tem sido documentado uma alta taxa de abortos espontâneos após biopsia das vilosidades coriônicas para diagnóstico pré-natal<sup>7</sup>.





uma vez que o tratamento para ser eficaz é instituído antes do diagnóstico ser possível<sup>16</sup>. Para minimizar o tratamento desnecessário com dexametasona em fetos do sexo masculino ou do sexo feminino não afectados, o diagnóstico genético de ambos os elementos do casal é crucial<sup>12</sup>. Em mulheres tratadas durante a gravidez com dexametasona verifica-se uma incidência variável de complicações maternas,<sup>7,12,13,18,50</sup> como a síndrome de Cushing iatrogénica<sup>20</sup>, o excessivo ganho de peso<sup>17</sup> e a hipertensão arterial-

A mortalidade pré-natal em fetos do sexo feminino com a forma não clássica não tratada é elevada<sup>13</sup>. Abortos espontâneos ocorrem em cerca de 25,4% nas mulheres não tratadas *versus* 6,2% nas mulheres tratadas<sup>36</sup>.

É desejável o aconselhamento genético em todas as famílias afectadas<sup>12</sup>. A dexametasona administrada à grávida melhora a ambiguidade genital nos fetos do sexo feminino afectados<sup>7,12,13,15-18,44,49-52</sup>, através da supressão da produção excessiva de androgéneos<sup>19</sup>. É usada a dexametasona porque esta não é inactivada pela 11 $\beta$ -hidroxisteróide desidrogenase<sup>7,12,17,18,20,53</sup>. A dose recomendada é 20  $\mu$ g/kg/dia (baseado no peso prévio à gravidez) dividida em três tomas<sup>7,16-18</sup>, sendo a dose máxima de 1,5 mg/dia<sup>7,16,18</sup>. Esta terapêutica permite normalizar os níveis de 17-OHP no líquido amniótico dos fetos afectados<sup>16</sup>.

Visto tratar-se de uma doença autossómica recessiva, a probabilidade de nascer uma criança do sexo feminino afectada, quando ambos os progenitores são portadores de uma mutação grave, é de 1/8<sup>12,13,20</sup>. Para prevenir a virilização pós-natal, o tratamento pré-natal deve ser administrado no início da gravidez, antes das 7<sup>a</sup>-8<sup>a</sup> semanas<sup>7,17,18,48</sup>, a todas as mulheres cujos fetos estão em risco de possuírem a forma clássica da deficiência em 21-OH<sup>12</sup>. Coloca-se assim uma questão ética, pois sete de oito grávidas irão receber tratamento desnecessariamente para prevenir um caso de ambiguidade genital<sup>7,12,13,48</sup>,

documentadas em cerca de 1% das mulheres tratadas na gravidez<sup>12</sup>.

## ASPECTOS GENÉTICOS

A investigação molecular desenvolvida levou à identificação no braço curto do cromossoma 6 (6p21.3) de duas cópias do gene codificante para a enzima 21-hidroxilase (21-OH), *CYP21A1P* e *CYP21A2*, intercaladas com genes que codificam proteínas do complemento (C4A e C4B)<sup>7,17,18,25,54</sup>. Apenas o *CYP21A2* é activo. O *CYP21A1P*, apesar de possuir 98% de homologia com o *CYP21A2*<sup>7,15,17,19,20</sup>, não tem expressão devido a mutações deletérias adquiridas, sendo, portanto, um pseudogene<sup>25,54,55</sup>. Os quatro genes estão contidos num segmento de DNA de cerca de 60 Kb, sendo transcritos na mesma direcção.

O alto grau de homologia entre as unidades C4B+CYP21A2 e C4A+CYP21A1P facilita a ocorrência de emparelhamento desigual durante a meiose entre os cromossomas homólogos e cromátides irmãs. Deste modo, podem ser formados gâmetas com organização dos genes CYP21/C4 alterada. A deficiência da enzima 21-OH pode ser causada então por uma deleção total ou parcial do gene *CYP21A2*, ou pode resultar de um processo de conversão génica em larga escala ou de microconversões (que

envolve a transferência de mutações pontuais), em que o gene *CYP21A2* é convertido (total ou parcialmente) no pseudogene *CYP21A1P*<sup>1,9,56</sup>. 1-2% dos alelos afectados são mutações espontâneas<sup>12</sup>. Recombinações espontâneas entre *CYP21A2* e *CYP21A1P* são detectadas em um em 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> espermatozoides<sup>35,57</sup>.

Vários estudos têm demonstrado elevada taxa de concordância entre o genótipo e o fenótipo em doentes com as formas mais ligeiras e mais graves da doença, existindo menor concordância genótipo-fenótipo nas formas moderadas da doença<sup>7,15,31,35,58,59</sup>. Muitos doentes são heterozigotos compostos (têm diferentes mutações nos dois alelos) e o fenótipo clínico está, geralmente, relacionado com o alelo mutado menos grave<sup>12,13,15,18,31,35,58,59</sup>.

As formas, clássica e não clássica, estão associadas a diferentes genótipos<sup>11,25,35,60</sup>.

O genótipo da forma clássica geralmente corresponde à presença de uma mutação grave em ambos os alelos, com actividade enzimática da 21-OH nula ou inferior a 5%<sup>25</sup>. As deleções, conversões extensas, mutações de *frameshifts* ou *nonsense* que levam à quase ausência de actividade da enzima, estão frequentemente associadas à forma PS<sup>18</sup>. A mutação pontual que ocorre na posição -13 do intrão 2 em que os nucleótios A/C são substituídos por guanina, é uma mutação grave que ocorre mais frequente associada à forma clássica, a qual origina um *splicing* anormal e consequentemente uma proteína também anormal resultante da alteração da fase de leitura e de um subsequente codão de terminação prematuro<sup>25,56</sup>. Muitos doentes que são homozigóticos para esta mutação têm níveis muito baixos ou ausentes de aldosterona e apresentam a forma PS<sup>25,58</sup>. Uma mutação no exão 4 (pI172N), especificamente associado com a forma VS<sup>55</sup>, possui cerca de 1%-2% da actividade da enzima<sup>7,12,13,18,25,35,60-62</sup>. Apesar desta baixa actividade enzimática, ela é suficiente para permitir a síntese de aldosterona<sup>12,25</sup>. Na forma não clássica, os indivíduos apresentam mutações suaves em ambos os alelos ou uma mutação grave e uma mutação suave (compostos heterozigóticos). As mutações *missense* no exão 7 (V281L)<sup>17</sup> e exão 1 (P30L) estão predominantemente associadas à forma não clássica<sup>7,16,18,58</sup>, e apresentam cerca de 20-50% da actividade enzimática normal<sup>12,25</sup>. As mutações *missense* no exão 8 (R339H) e exão 10 (P453S)<sup>16</sup> estão, também, associadas à forma não clássica<sup>25,31,58,59,63-66</sup>.

### Porquê o estudo genético pré-concepção?

Diferentes estudos têm demonstrado que 27-76% dos indivíduos com a forma não clássica são portadores de uma mutação grave num alelo<sup>38,67</sup>. Estes indivíduos estão

em risco de conceber uma criança com a forma clássica se o outro progenitor também for portador de uma mutação grave<sup>38</sup>, assim, é importante conhecer o genótipo de ambos os progenitores para o aconselhamento genético<sup>12</sup>.

A probabilidade calculada de um casal, em que um dos elementos possui a forma não clássica e o outro elemento é da população em geral, de ter uma criança afectada com a forma clássica é de 1:480 (ou seja, 1/60 x 1/2 x 1/4), assumindo uma prevalência de heterozigotia para mutações graves na população geral de 1/60<sup>7,17,38</sup>, e que aproximadamente 50% dos indivíduos com a forma não clássica são compostos heterozigóticos portadores de uma mutação suave e de uma mutação grave<sup>7,38,58,67</sup>. Esta probabilidade calculada é significativamente maior que o risco determinado com base na incidência da forma clássica verificada na população, que é de cerca de 1:12000-23000<sup>7,38</sup>. A probabilidade de uma mulher com a forma não clássica ter uma criança com a forma não clássica será muito maior porque a percentagem de portadores para mutações suaves na população geral é de cerca de cerca de 1:16<sup>38,63,68</sup>. Assim, existe uma probabilidade de 1:32 (ou seja, 1/16 x 1/1 x 1/2) de um dos pais com a forma não clássica de ter uma criança com a mesma patologia, comparada com uma prevalência na população geral de 1:400-2000<sup>38,63,68</sup>.

A verdadeira frequência das formas clássica e não clássica entre os recém-nascidos de pais com a forma não clássica, provavelmente é superior à calculada, principalmente em algumas comunidades, em que existe uma tendência para casar entre elementos do mesmo grupo étnico<sup>38</sup>.

Um estudo recente<sup>38</sup> sugere que a prevalência da forma clássica entre recém-nascidos de mulheres com a forma não clássica é de cerca de 2,5%; a prevalência da forma não clássica entre crianças com mães com a forma não clássica, ainda segundo este estudo, é de cerca de 15%<sup>38</sup>. O diagnóstico e o tratamento precoces das crianças com a forma não clássica pode diminuir o risco do desenvolvimento das manifestações clínicas de hiperandrogenismo e melhorar a estatura final<sup>38</sup>, contudo existem dados insuficientes para verificar a eficácia e segurança do tratamento em crianças assintomáticas<sup>44</sup>.

O rastreio hormonal através do doseamento de 17-OHP não permite detectar a forma clássica nas primeiras 24h de vida, uma vez que a 17-OHP está elevada em todas as crianças; este doseamento deve ser realizado entre as 48 h e as 72 h após o nascimento<sup>44</sup>. Podem ocorrer falsos-positivos entre prematuros e crianças de baixo-peso<sup>5,12,13,18,26</sup>. Por outro lado, podem ocorrer falsos negativos nos casos ligeiros da forma clássica e na forma não clássica<sup>38</sup>. O rastreio do recém-nascido é eficiente no diagnóstico da forma PS mas parece ser menos efectivo na identificação

dos doentes com formas moderadas da forma clássica, nos quais os falsos negativos podem atingir os 30%<sup>69</sup>.

### Estudo genético dos casais

Tendo em conta os estudos e conhecimentos acima referidos, estudamos cinco casais que pretendiam engravidar. Todas as mulheres apresentavam HCSR-T.

Foi obtida uma amostra de sangue periférico em EDTA dos elementos dos cinco casais; a partir das referidas amostras extraiu-se o ADN genómico utilizando o kit *MAGNA Pure LC DNA isolation Kit-Large Volume*. Em todos os casos procedeu-se à pesquisa das nove mutações mais frequentes (Quadro 1). Esta pesquisa foi efectuada por amplificação específica do gene *CYP21A2* seguida de minisequenciação com iniciadores específicos para cada mutação<sup>70</sup>; os respectivos produtos reaccionais foram detectados num sequenciador automático. Foi realizada a pesquisa do alelo não funcional: deleção completa do gene *CYP21A2* (*CYP21A2del*) e da conversão do gene funcional *CYP21A2* no pseudogene não funcional *CYP21A1P* (*CYP21A2>CYP21A1P-conv*), realizada por restrição enzimática do fragmento de PCR (749f+Tena 32f) com endonuclease Taq I<sup>71</sup>.

### CASAL 1

Mulher de 27 anos, referenciada à Consulta de Endocrinologia aos 16 anos e 11 meses por acne com quatro anos de evolução, hirsutismo e oligomenorreia. Menarca aos 15 anos. A ecografia pélvica revelou ovários poliquísticos. Analiticamente apresentava FSH: 5,6 mUI/mL (< 9,6); LH: 13 mUI/mL (< 12);  $\Delta$ 4-androstenediona: 9,5 ng/mL (0,5-

3,4); DHEA-SO<sub>4</sub>: 4,1 µg/mL (0,35-4,3); 17-OHP: 20 ng/mL (0,2-1); Estradiol: 56 pg/mL (10-200); Progesterona: 1,1 ng/mL (< 1,5); PRL: 5,9 ng/mL (< 20); Testosterona total: 1,4 ng/mL (0,1-0,9); ACTH: 28 pg/mL (9-52); cortisol: 23 µg/dL (5-25). A doente foi medicada com dexametasona 0,5 mg/dia com melhoria clínica. Por desejar engravidar, foi efectuado o estudo molecular do gene *CYP21A2* no casal, o qual revelou duas mutações no caso index g.711\_718del e g.1688G>T, respectivamente, nos exões 3 e 7 e a mutação g.1688G>T também presente no parceiro. À mutação g.711\_718del corresponde uma actividade enzimática nula enquanto que à mutação g.1688G>T corresponde uma actividade *in vitro* da 21-OH de 20-50% relativamente à sua actividade normal e usando, respectivamente, a progesterona ou a 17-OHP como substrato. A mutação g.1688G>T geralmente está associada à forma não clássica da deficiência de 21-OH. O genótipo da doente é compatível com um défice parcial de 21-OH.

O casal tem um risco de 50% de ter descendentes afectados com a forma não clássica da deficiência de 21-OH pelo que não é necessário medicação com corticóide durante a gravidez. A gravidez foi induzida com citrato de clomifeno e processou-se sem intercorrências. O parto ocorreu às 40 semanas por cesariana não electiva por estado fetal não tranquilizador. Nasceu uma criança do sexo masculino, 3500 g, saudável.

### CASAL 2

Mulher de 27 anos, referenciada à Consulta de Endocrinologia há alguns meses por hirsutismo e oligomenorreia. Analiticamente, apresentava 17-OHP de 3,5 ng/ml

Quadro 1 – Mutações pesquisadas no gene *CYP21A2*. \*Numeração nucleotídica e da sequência de aminoácidos de acordo com Rodrigues NR, et al (1987). EMBO Journal 6:1653-1661

*Mutação pesquisada	*Alteração na proteína	Descrição da mutação segundo a base de dados do Gene <i>CYP21A2</i>
g.92C>T	P31L	g.89C>T
g.IVS2-13A/C>G	Splicing alternativo	g.655A/C>G
g.711_718del	G111_Y113delfs	g.707_714del
g.1004T>A	I173N	g.999T>A
g.1688G>T	V282L	g.1683G>T
g.1767_1768insT	L308fs	g.1762_1763insT
g.1999C>T	Q319X	g.1994C>T
g.2113C>T	R357W	g.2108C>T
g.2584C>T	P454S	g.2578C>T



(0,2-1), pelo que foi submetida a prova de tetracosactídeo (250 µg) com doseamentos de 17-OHP de 12,3 ng/mL após estimulação. Foi medicada com prednisona 2,5 mg/dia com melhoria clínica. Por desejar engravidar, foi efectuado o estudo genético do casal. Este mostrou que o caso índice possui a mutação g.1688G> T em homozigotia no exão 7 do gene *CYP21A2*; não foi detectada a conversão total do gene *CYP21A2* no pseudogene não funcional *CYP21A1P* nem a deleção completa do gene *CYP21A2*. A análise molecular que compreendeu a sequenciação dos exões referidos anteriormente revelou a presença, em heterozigotia, de uma conversão génica parcial que envolve pelo menos os exões 1 a 7 do pseudogene *CYP21A1P*. A mutação g.1688G> T está associada a uma actividade enzimática de 21-OH de 20-50% da actividade normal; por outro lado, embora a conversão génica parcial detectada na doente corresponda a um alelo *CYP21A2* não funcional associado a uma actividade enzimática nula<sup>7</sup>, a presença da mutação g.1688G> T deverá conferir à doente uma deficiência parcial compatível com a forma não clássica. Foi realizada análise genética semelhante ao parceiro da doente, a qual revelou, em heterozigotia, a alteração g.1641C> T (p.Ala266Val) a qual corresponde a uma substituição conservativa de aminoácidos. Embora esta alteração não esteja descrita na base de dados do gene *CYP21A2*, foi anteriormente descrita associada à forma não clássica da doença<sup>72</sup>, por outro lado, tanto quanto se sabe a alteração g.1641C> T ainda não foi detectada em homozigotia, nem associada na forma de heterozigotia composta a uma mutação grave, pelo que a sua relevância clínica ainda não é conhecida. Complementarmente, estudos de expressão *in vitro* da alteração p.Ala266Val, revelaram que esta alteração aparentemente não afecta a actividade enzimática da 21-OH<sup>72</sup>. Assim, o risco do casal vir a ter uma criança do sexo feminino afectada com a forma clássica da doença é bastante reduzido, apesar disso, entendeu-se encaminhar o casal para uma consulta de aconselhamento genético.

### CASAL 3

Mulher de 31 anos, referenciada à Consulta de Endocrinologia há cerca de 4 anos, por hirsutismo e oligomenorreia apesar de medicada com contraceptivo oral. A ecografia pélvica mostrou a presença de ovários policísticos. Analiticamente apresentava FSH: 0,9 mUI/mL (< 9,6); LH: 1,3 mUI/mL (< 12); Δ4-androstenediona: 6,8 ng/mL (0,5-3,4); DHEA-SO<sub>4</sub>: 2,8 µg/mL (0,35-4,3); 17-OHP: 23 ng/mL (0,2-1); Estradiol: 22 pg/mL (10-200); Progesterona: 0,7 ng/mL (< 1,5); PRL: 16 ng/mL (< 20); Testosterona livre: 3,1 pg/mL (< 3,9); ACTH: 16,6 pg/mL (9-52); Cortisol: 11,4 µg/dL (5-25). Foi medicada com prednisona 5 mg/dia com

melhoria clínica. Por desejar engravidar, foi realizado estudo genético do casal. Este mostrou que o caso índice possui ambas as cópias do gene *CYP21A2* mutadas. Uma das cópias possui a mutação g.IVS2-13A/C>G a qual corresponde a uma mutação de *splicing* que afecta o processamento normal do mRNA sendo considerada uma mutação grave, uma vez que está associada a uma actividade enzimática *in vitro* de 21-OH inferior a 5% relativamente à sua actividade normal. A outra cópia do gene possui a mutação g.1688G> T a qual está associada a uma actividade enzimática de 20 a 50% relativamente à actividade normal da 21-OH (mutação suave). Assim, o genótipo do caso índice corresponde a uma heterozigotia composta e o mesmo deverá conferir-lhe uma deficiência parcial de 21-OH compatível com a forma não clássica. O parceiro da doente não apresentou nenhuma das 9 mutações mais frequentes nem qualquer outra alteração no gene *CYP21A2* compatível com deficiência em 21-OH.

### CASAL 4

Mulher de 27 anos, referenciada à Consulta de Endocrinologia há cerca de quatro anos por alterações analíticas referentes a doseamentos da supra-renal. Analiticamente apresentava DHEA-SO<sub>4</sub>: 3,4 µg/mL (0,35-4,3); Δ4-androstenediona: 2,5 ng/mL (0,5-3,4); 17-OHP: 1,5 ng/mL (0,2-1). Foi submetida a prova de tetracosactídeo (250 µg) com doseamentos de 17-OHP de 12 ng/mL após estimulação. Foi medicada com contraceptivo oral, com melhoria clínica. Por desejar engravidar, foi submetida a estudo genético. O caso índice revelou a presença da mutação g.1688G> T em heterozigotia no exão 7 do gene *CYP21A2* que corresponde a uma actividade *in vitro* da 21-OH de 20%-50% da actividade normal; esta última mutação geralmente está associada à forma não clássica da deficiência de 21-OH. O parceiro da doente não apresentou nenhuma das nove mutações pesquisadas nem o alelo não funcional correspondente à deleção de *CYP21A2* ou à conversão total de *CYP21A2* em *CYP21A1P*, logo este casal possui um risco similar ao da população em geral de vir a ter descendentes do sexo feminino afectados com a forma clássica da deficiência de 21-OH.

### CASAL 5

Mulher de 27 anos, referenciada à Consulta de Endocrinologia aos 24 anos por hirsutismo, oligomenorreia e alteração de doseamentos hormonais da supra-renal. Analiticamente apresentava FSH: 1,0 mUI/mL (< 9,6); LH: 4,7 mUI/mL (< 12); DHEA-SO<sub>4</sub>: 3,2 µg/mL (0,35-4,3); 17-OHP: 18 ng/mL (0,2-1); Progesterona: 8,9 ng/mL (< 1,5); Testosterona total: 1,1 ng/mL (0,1-0,9); ACTH: 29 pg/mL (9-52);

Cortisol: 19 µg/dL (5-25). A doente foi medicada com hidrocortisona 10 mg + 5 mg e acetato de ciproterona, com melhoria clínica. Por desejar engravidar, foi efectuado estudo genético do casal. Este mostrou que o caso índice possui a mutação g.1688G> T em homozigotia no exão 7 do gene *CYP21A2*; este defeito enzimático corresponde a uma actividade enzimática *in vitro* de 20%-50% da actividade da enzima 21-OH. O parceiro da doente não apresentou nenhuma das nove mutações; a pesquisa da mutação completa do gene *CYP21A2* e da conversão do gene funcional *CYP21A2* no pseudogene não funcional *CYP21A1P* também foram negativos. Assim, este casal possui um risco similar ao da população em geral de vir a ter descendentes do sexo feminino afectados com a forma clássica da deficiência de 21-OH.

## CONCLUSÃO

A HCSR-T é uma patologia muito frequente. As mulheres com sinais ou sintomas de hiperandrogenismo devem ser rastreadas para esta patologia. O *gold standard* para o diagnóstico consiste na prova do tetracosactídeo, sendo considerado o diagnóstico positivo quando o valor de 17-OHP é superior a 10-15 ng/mL.

As mulheres com HCSR-T portadoras de uma mutação grave estão em risco acrescido de conceberem crianças afectadas com a forma clássica da doença, caso o outro progenitor também seja portador de uma mutação grave.

O estudo genético do casal permite o aconselhamento pré-concepção adequado e evita o uso de corticóides ao longo da gravidez, se não houver risco de descendência afectada com a forma clássica. Este aspecto deve ser tido em conta na programação da gravidez, uma vez que há relatos de efeitos adversos, tanto para a mãe como para o feto, em gravidezes submetidas a tratamento com dexametasona.

Para além disso, o estudo genético de ambos os progenitores também permite avaliar o risco de conceber uma criança com a forma não clássica. Isto tem interesse uma vez que o rastreio do recém-nascido, através do doseamento da 17-OHP, não é muito efectivo no diagnóstico das formas menos graves da doença, cabendo aos pais e clínicos (tendo em conta a probabilidade da criança apresentar HCSR-T) estarem atentos às manifestações iniciais desta patologia, sendo assim possível o diagnóstico e tratamento atempados.

Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

Fontes de financiamento:

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

## BIBLIOGRAFIA

1. NEW MI: An update of congenital adrenal hyperplasia. *Ann NY Med Acad Sci* 2004;1038:14-43
2. MERKE DP, BORNSTEIN SR: Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 2005;365:2125-36
3. MAO R, NELSON L, KATES R et al: Prenatal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency caused by gene conversion and rearrangements: pitfalls and molecular diagnostic solutions. *Prenat Diagn* 2002;22:1171-6
4. KEEGAN CE, KILLEEN AA: An overview of molecular diagnosis of steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Mol Diagn* 2001; 3:49-54
5. JANZEN N, PETER M, SANDER S et al: Newborn screening of congenital adrenal hyperplasia: additional steroid profiler using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2581-9
6. BENTO LR, RAMOS CC, GONÇALVES EM et al: Hiperplasia adrenal congénita por deficiência da 21-hidroxilase, forma clássica: estudo da frequência em famílias de indivíduos afectados. *Rev Paul Pediatr* 2007;25:202-6
7. WHITE P, SPEISER P: Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000;21:245-291
8. WHITE P, CURNOW K, PASCOE L: Disorders of steroid 11β-hydroxylase isozymes. *Endocr Rev* 1994;15:421-438
9. FOREST MG: Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase. *Hum Reprod Update* 2004;10:469-485
10. NEW MI: Extensive clinical experience – nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4205-14
11. ESCOBAR-MORREALE HF, SANCHÓN R, SAN MILLÁN JL: A prospective study of the prevalence of nonclassic congenital adrenal hyperplasia (NCAH) among women presenting with hyperandrogenic symptoms and signs. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:527-533
12. SPEISER P, WHITE: Congenital adrenal hyperplasia. *N Eng J Med* 2003;349:776-788
13. RIEPE F, SIPELLI W: Recent advances in diagnosis, treatment, and outcome of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Rev Endocr Metab Disord* 2007;8:349-363
14. BONFIG W, BECHTOLD S, SCHMDIT H, KNORR D, SCHWARZ HP: Reduced final height outcome in congenital adrenal under prednisone treatment: deceleration of growth velocity during puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1635-9
15. GONÇALVES J, FRIÃES A, MOURA L: Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency. *Exp Rev Mol Med* 2007;9:1-23
16. LAJIC S, NORDENSTROM A, RITZÉN E, WEDWLL A: Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2004;151:63-9
17. WAJNRAJCH MP, NEW MI: Defects of adrenal steroidogenesis. In: DeGroot LJ, Jameson JL. *Endocrinology*. 4ª edição. Philadelphia:WB Saunders. 2001,1721-36

18. WHITE P: Congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2001; 15: 17-41.
19. CHIU R, LAU T, CHEUNG P et al: Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem* 2002;48:778-780
20. STEWART P: The adrenal cortex. In: Kronenberg H, Melmed S, Polonsky K et al. *Williams Textbook of Endocrinology*. 11ª edição. Saunders Elsevier. 2008;486-8
21. BACHEGA T, BRENHA E, BILLERBECK A 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;87:786-790
22. GREEN-GOLAN L, YATES C, DRINKARD B et al: Patients with classic congenital adrenal hyperplasia have decreased epinephrine reserve and defective glycemic control during prolonged moderate-intensity exercise. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:3019-24
23. MERKE D, CHROUSOS G, EISENHOFER G et al: Adrenomedullary dysplasia and hypofunction in patients with classic 21-hydroxylase deficiency. *N Eng J Med* 2000;343:1362-8
24. WEISE M, MEHLINGER S, DRINKARD B et al: Patients with classic congenital adrenal hyperplasia have decreased epinephrine reserve and defective glycemic control during prolonged high-intensity exercise. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:591-7
25. TRAKAKIS E, RIZOS D, LOGHIS C et al: The prevalence of non-classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in greek women with hirsutism and polycystic ovary syndrome. *Endocr J* 2008;55:33-9
26. FITNESS J, DIXIT N, WEBSTER D et al: Genotyping of CYP21, linked chromosome 6p markers, and a sex-specific gene in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:960-6
27. AZZIZ R, DEWAILLY D, OWERBACH D: Clinical review 56 – nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:810-5
28. STIKKELBROECK N, OTTEN B, PASIC A et al: High prevalence of testicular adrenal rest tumours, impaired spermatogenesis, and Leydig cell failure in adolescent and adult males with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5721-8.
29. CABRERA M, VOGIATZI M, NEW M: Long term outcome in adult males with classic congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3070-8
30. CLAAHSEN-VAN DER GRINTEN H, OTTEN B, TAKAHASHI S et al: Testicular adrenal rest tumours in adult males with congenital adrenal hyperplasia: evaluation of pituitary-gonadal function before and after successful testis-sparing surgery in eight patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:602-615
31. KRONE N, BRAUN A, ROSCHER A, KNORR D, SCHWARZ HP: Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1059-65
32. BALDUCCI R, BOSCHRINI B, MANGIANTINI A, MORELLINI N, TOSCANO V: Isolated precocious pubarche: an approach. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:582-9
33. MOAYERI H, RABBANI N: Non classic 21 hydroxylase deficient adrenal hyperplasia in patients with isolated precocious pubarche. *TUMJ* 2002;60:171-4
34. DACOU-VOUTETAKIS C, DRACOPOULOU M: High incidence of molecular defects of the CYP21 gene in patients with premature adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1570-4
35. SPEISER P, DUPONT J, ZHU D et al: Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 1992;90:584-595
36. LIN-SU K, VOGIATZI M, MARSHALL I et al: Treatment with growth hormone and luteinizing hormone releasing hormone analog improves final adult height in children with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3318-25
37. GIRGIS R, WINTER J: The effects of glucocorticoid replacement therapy on growth, bone mineral density, and bone turnover markers in children with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3926-9
38. MORAN C, AZZIZ R, WEINTROB N et al: Reproductive outcome of women with 21-hydroxylase deficient nonclassic adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3451-6
39. FELDMAN S, BILLAUD L, THALABARD J et al: Fertility in women with late-onset adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:635-9
40. AZZIZ R, SANCHEZ A, KNOCHENHAUER E et al: Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:453-462
41. AZZIZ R, CARMINA E, DEWAILLY D et al: Criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an androgen excess society guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4237-45
42. KERRIGAN J, VELDHUIS J, LEYO S, IRANMANESH A, ROGOL A: Estimation of daily cortisol production and clearance rates in normal pubertal males by deconvolution analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1505-10
43. METZGER D, WRIGHT N, VELDHUIS J, ROGOL A, KERRIGAN J: Characterization of pulsatile secretion and clearance of plasma cortisol in premature and term neonates using deconvolution analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:458-463
44. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology: *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4048-53
45. LAMBERTS S, BRUINING H, JONG F: Corticosteroid therapy in severe illness. *New Eng J Med* 1997;337:1285-92
46. BROSNAN P, BROSNAN C, KEMP S et al: Effect of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1999;153:1272-8
47. VAN DER KAMP H, NOORDAM K, ELVERS B, VAN BAARLE, OTTEN B, VERKERK P: Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in the Netherlands. *Pediatrics* 2001; 108:1320-4
48. HIRVIKOSKI T, NORDENSTROM A, LINDHOLM T et al: Cognitive functions in children at risk for congenital adrenal hyperplasia treated prenatally with dexamethasone. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:542-8
49. MERCADO A, WILSON R, CHENG K, WEI J, NEW M: Prenatal treatment and diagnosis of congenital adrenal hyperplasia owing to steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2014-20
50. LAJIC S, WEDELL A, BUI T, RITZÉN EM, HOLST M: Long term somatic follow-up of prenatally treated children with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3872-80

51. DORR H, SIPPELL W: Prenatal dexamethasone treatment in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: effect on midgestational amniotic fluid steroid levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:117-120
52. NEW M, CARLSON A, OBEID J et al: Prenatal diagnosis for congenital adrenal hyperplasia in 532 pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5651-7
53. WHITE P, MUNE T, AGARWAL A: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocr Rev* 1997;18:135-156
54. HIGASHI Y, YOSHIOKA H, YAMANE M, GOTOH O, FUJII-KURIYAMA Y: Complete nucleotide sequence of 2 steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:2841-5
55. KOPPENS P, HOOGENBOEZEM T, DEGENHART H: CYP21 and CYP21P variability in steroid 21-hydroxylase deficiency patients and in the general population in the Netherlands. *Eur J Hum Genet* 2000;8:827-36
56. HIGASHI Y, TANAE A, INOUE H, HIROMASA T, FUJII-KURIYAMA Y: Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase (P450(C21)) deficiency in humans: possible gene conversion products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:7486-90
57. TUSIE-LUNA M, WHITE P: Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10796-800
58. WILSON R, MERCADO A, CHENG K, NEW M: Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2322-9
59. JAASKELAINEN 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
60. MORNET E, CRÉTÉ E, KUTTENN F 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
61. TUSIE-LUNA M, TRAKTMAN P, WHITE P: Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant Vaccinia Virus. *J Biol Chem* 1990;265:20916-22
62. AMOR M, PARKER K, GLOBERMAN H, NEW M, WHITE P: Mutation in the CYP21B gene (Ile-72 $\rightarrow$ Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;85:1600-4
63. SHERMAN S, ASTON C, MORTON N, SPEISER P, NEW M: A segregation and linkage study of classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Gen* 1988;42:830-8
64. STIKKELBROECK N, HOEFSLOOT L, WIJS I, OTTEN B, HERMUS A, SISTERMANS E: CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in the Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3852-9
65. WEDELL A, THILÉN A, RITZÉN E, STENGLER B, LUTHMAN H: Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1145-52
66. HELMBERG A, TUSIE-LUNA M, TABARELLI M, KOFLER R, WHITE P: R339H and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. *Mol Endo* 1992;6:1318-22
67. DENEUX C, TARDY V, DIB A et al: Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:207-213
68. SPEISER P, DUPONT B, RUBINSTEIN P, PIAZZA A, KASTELAN A, NEW M: High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985;37:650-667
69. VOTAVA F, TOROK D, KOVÁCS J et al: Estimation of the false-negative rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2005;152:869-874
70. FRIÃES A, RÊGO A, ARAGUÉS J et al: CYP21A2 mutations in Portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia: identification of two novel mutations and characterization of four different partial gene conversions. *Mol Genet Metab* 2006;88:58-65
71. KOPPENS P, DEGENHART H: PCR-based detection of CYP21 deletions. *Clin Chem* 2003;49:1555-6; author reply 1556-7
72. BLEICKEN C, LOIDI L, DHIR V et al: Structural and functional analysis of three CYP21A2 mutations employing two different in vitro expression systems and molecular modeling. *Horm Res* 2007;68(suppl1):27