



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CAMPUS A.C. SIMÕES

RAYSSA GABRIELY DUARTE TORRES

**RASTREAMENTO DE ALTERAÇÕES PATOGÊNICAS POR PCR-AE E
PADRONIZAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO DO GENE *CYP21A2***

Maceió/AL

2022

RAYSSA GABRIELY DUARTE TORRES

**RASTREAMENTO DE ALTERAÇÕES PATOGÊNICAS POR PCR-AE E
PADRONIZAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO DO GENE *CYP21A2***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Alagoas, como requisito parcial
à obtenção do título de Bacharelado.

Orientadora: Profa. Dra. Débora de Paula
Michelatto.

Maceió/AL

2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

T693r Torres, Rayssa Gabriely Duarte.
Rastreamento de alterações patogênicas por PCR-AE e padronização do sequenciamento do gene *CYP21A2* / Rayssa Gabriely Duarte Torres. – Maceió, 2022.
68 f. : il.

Orientadora: Débora de Paula Michelatto.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 57-68.

1. Hiperplasia suprarrenal congênita. 2. Transtornos testiculares 46, XX do desenvolvimento sexual. 3. Técnicas do diagnóstico molecular. 4. Sequenciamento de Sanger (Sequenciamento genético). 5. CYP21A2. I. Título.

CDU: 575

Folha de Aprovação

RAYSSA GABRIELY DUARTE TORRES

RASTREAMENTO DE ALTERAÇÕES PATOGÊNICAS POR PCR-AE E
PADRONIZAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO DO GENE *CYP21A2*

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido à banca examinadora do curso
de Ciências Biológicas Bacharelado da
Universidade Federal de Alagoas e
aprovada em 20 de dezembro de 2022.

Orientador(a) - Profa. Dra. Débora de Paula Michelatto, FAMED – UFAL

Banca examinadora:

Examinador 1: Prof. Dr. Dalmo Almeida de Azevedo, ICBS – UFAL

Examinadora 2: Profa. Dra. Mykaella Andrade de Araújo, Pitágoras/LACEN

Aos meus queridos pais, Rita Torres e Rinaldo Torres por todo amor, carinho, apoio e dedicação. A minha irmã, Ryanne Torres (Bê), por ser minha conselheira, amiga e ouvinte. E ao meu padrinho amado, Gilberto Torres, que me deixou tão cedo, mas que eu sei que está muitíssimo orgulhoso e feliz por mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus que me acolheu, sempre me ouviu e acalmou durante as minhas orações. A minha mãezinha do céu e aos meus anjinhos que não largaram a minha mão em nenhum momento de dificuldade.

Aos meus pais, meus anjos aqui na terra, que sempre me guiaram, escutaram e acolheram. Que me apoiaram em todos os momentos e me fizeram ser quem eu sou. Cada conquista e a cada vitória da vida eu dedico a eles, que mesmo com todas as dificuldades que tiveram, nunca foram insuficientes no seu amor, apoio, carinho e de fazer o máximo para guiar eu e a minha irmã no caminho certo.

A minha irmã, que é o meu amor aqui na terra, a minha metade. Sempre me apoiando, ouvindo e escutando. Que em todos os momentos ansiosos me abraça e cuida de mim. Além de ser uma pessoa extremamente inteligente e esforçada a qual eu tenho muito orgulho.

Ao meu padrinho, meu segundo pai, que eu sei que onde quer que ele esteja, ele está extremamente orgulhoso da mulher que eu me tornei.

E as famílias que a graduação me deu:

Ao *behavior lab* e ao grupo da epilepsia (LNFI/LAIF). Ao Prof, Marcelo, Prof., Olagide, Nandinha, Mirella (Mi), Gabi, Ane, Walleska, Amandinha, Edite, Jucinha, Igor, Keylla, Bianca, Bruno, Iara, Maisa, Millena, Coutinho e Vanessa; por sempre me acolherem, ouvirem, ensinarem. A Mi, que desde a nossa primeira conversa, se tornou minha amiga, uma das melhores, que me escuta, que me ensina e é conselheira. A Nandinha, que me abriu as portas, que me mostrou esse mundo maravilhoso da ciência, que sempre foi orientadora e amiga. A Gabi, Bianca e a Keyllinha que sempre foram amigas, acolhedoras e parceiras de experimentos. A Amandinha, a Edite e a Jucinha amigas e orientadoras de milhões. Aos professores Drs. Marcelo e Olagide, por serem ótimos orientadores e conselheiros; por me darem a oportunidade de aprender e evoluir. Minha eterna gratidão a essa iniciação na ciência. Prof. Marcelo, por ter um jeitinho especial de tratar cada aluno, com carinho e respeitando suas particularidades, com uma serenidade e calma que fazem os seus alunos acreditarem que tudo que queremos fazer é 100% possível.

Ao LGMH, uma das minhas maiores surpresas durante essa graduação. O acolhimento da minha orientadora, Profa. Dra. Débora, que sempre me acolheu, escutou e me ensinou esse mundo maravilhoso da genética e da área molecular, a qual se tornou uma das minhas

paixões. Aos professores Drs. Reginaldo, Isabella e Talita, pelo acolhimento no lab, pelo carinho, conversas e ensinamentos. Ao Diogo, biomédico, conselheiro, amigo, que me ensinou e que me ouviu em todos os dias de laboratório. A enfermeira diva maravilhosa, Chrys, pelas conversas. As minhas bbs, amigas, conselheiras, os meus presentes de vida, Thay (companheira de sanidade mental a 4 anos), Gabi, Mi, Ray, Grazi e Clara, não sei o que seria desse meu último ano de curso sem vocês, sem as conversas, sem as brincadeiras. Tenho certeza de que o restinho da minha sanidade se acabaria sem a presença de vocês em minha vida. A Joyce, Yonar, Mari Max, que eu já tenho um carinho especial. A minha querida amiga Pommy, que eu sei que estaria muito orgulhosa do rumo que cada amiga está tomando.

As minhas companheiras de curso e de loucuras, Mari, Nanda, Dulce, Rose e Mirely que foram sempre uma luz no fim do túnel, companheiras e conselheiras.

Ao meu amigo da EDF. Rapha, por ser ouvinte e conselheiro em todos os momentos durante esses 4 anos.

Ao laboratório LEPP/LACOM, por terem me presenteado com amigos maravilhosos. Aninha e Moniquita por serem minhas amigas irmãs. Ao Vitor, Dani, Jessica e Ciro, por todas as conversas e por todo o carinho.

Ao Matheus, por ter sido tão especial no tempo em que passamos juntos. Por ser suporte, conselheiro, companheiro, ouvinte. Seu amor pela ciência sempre me encantou, espero de todo o coração que siga sempre o caminho dos sonhos, mas que nunca esqueça que eles precisam de complementares. Aos seus pais e a sua irmã (minha irmãzinha de outra mãe), que são uma segunda família para mim, que sempre me acolheram e ouviram, meu amor por vocês é e sempre será presente.

Ao meu amigo Dan, que foi um presente nessa vida e que eu sou extremamente grata por tudo.

A minha amiga Kau, que nesses anos todos me entendeu, acolheu e fez parte de todas as minhas loucuras.

Por fim e desde o começo, a mim, por ter aguentado tanta coisa durante esses 4 anos, por ter sido forte, guerreira e por nunca ter desistido dos meus sonhos e das minhas pessoas. Esse é só o começo da minha linda jornada no mundo científico.

Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may less fear.

(Marie Currie)

RESUMO

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) é uma distúrbios de desenvolvimento sexual (DDS) caracterizada pela deficiência da biossíntese de esteroides adrenais. Compreende um conjunto de doenças autossômicas recessivas sendo, aproximadamente 95% dos casos decorrentes da deficiência da enzima 21-hidroxilase (21OHD). Na sua forma clássica, o acúmulo de precursores de cortisol e aldosterona são convertidos em andrógenos levando à uma virilização progressiva, rápido crescimento somático com maturação esquelética acelerada e concomitante perda de sal na forma mais grave da doença que, se não tratada, pode levar a crise adrenal, choque e morte. Esse trabalho dá continuidade à linha de pesquisa do LGMH/HUPAA/UFAL, onde é realizado o diagnóstico molecular da HAC-21OHD por reação em cadeia da polimerase alelo específica (PCR-AE) e padronizou o diagnóstico por sequenciamento de Sanger do gene *CYP21A2* para os casos não solucionados. Através da técnica PCR-AE e/ou por digestão com enzima de restrição oito alterações frequentes derivadas do pseudogene *CYP21A1P* e uma alteração rara, não proveniente deste, foram investigadas em 19 famílias (16 indivíduos com o diagnóstico de HAC-21OHD e 19 familiares). Por meio desta técnica foi possível elucidar o diagnóstico de 56,25% da nossa casuística (9 indivíduos afetados) e 43,75% (7 indivíduos) prosseguiram para investigação através das técnicas de sequenciamento completo do gene e por *MLPA* (do inglês *Multiplex ligation-dependent Probe Amplification*). Através destas técnicas o genótipo de 2 destes casos foram elucidados na instituição parceira. Ademais, o sequenciamento completo do gene *CYP21A2* foi padronizado no LGMH e, portanto, 5 casos desta casuística seguem em investigação no nosso grupo de pesquisa. Durante a padronização da técnica de sequenciamento completo do gene *CYP21A2* pelo método de Sanger, elucidou-se o diagnóstico molecular de uma família encaminhada para aconselhamento genético onde ambos os genitores possuem o genótipo p.Gln319*+p.Arg484fs*5. O diagnóstico molecular de grande parte dos casos de HAC-21OHD pode ser elucidado de forma rápida e com menor custo por rastreamento de alterações frequentes. Para casos não elucidados, o sequenciamento completo do gene *CYP21A2* é valioso uma vez que mais de 400 alterações patogênicas foram relacionadas a HAC-21OHD, com isso, a padronização dessa técnica, no presente trabalho, enriquece ainda mais o diagnóstico molecular de HAC realizado no estado pelo LGMH/HUPAA/UFAL.

Palavras-chave: Hiperplasia adrenal congênita; DDS 46,XX; Diagnóstico molecular; Sequenciamento de Sanger; gene *CYP21A2*.

ABSTRACT

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is a disorder of sex differentiation (DSD) characterized by deficiency of adrenal steroid biosynthesis. It comprises a set of autosomal recessive disorders, with approximately 95% of cases being due to a deficiency of the enzyme 21-hydroxylase (21OHD). In its classical form, the accumulation of cortisol and aldosterone precursors are converted into androgens leading to progressive virilization, rapid somatic growth with accelerated skeletal maturation and concomitant salt loss in the most severe form of the disease which, if left untreated, can lead to adrenal crisis, shock, and death. This work continues the research line of the LGMH/HUPAA/UFAL, where molecular diagnosis of HAC-21OHD by allele-specific polymerase chain reaction (PCR-AE) is performed and standardized diagnosis by Sanger sequencing of the *CYP21A2* gene for unresolved cases. Through the PCR-AE technique and/or by restriction enzyme digestion, eight frequent alterations derived from the *CYP21A1P* pseudogene and one rare alteration, not derived from it, were investigated in 19 families (16 individuals diagnosed with HAC-21OHD and 19 relatives). Using this technique, it was possible to elucidate the diagnosis of 56.25% of our series (9 affected individuals), and 43.75% (7 individuals) proceeded to investigation by techniques of complete sequencing of the gene and by MLPA (Multiplex ligation-dependent Probe Amplification). Through these techniques, the genotype of 2 of these cases was elucidated at the partner institution. Moreover, the complete sequencing of the *CYP21A2* gene was standardized at the LGMH, and therefore, 5 cases from this series are still under investigation in our research group. During the standardization of the complete sequencing technique of the *CYP21A2* gene by the Sanger method, we elucidated the molecular diagnosis of a family referred for genetic counseling where both parents have the genotype p.Gln319*+p.Arg484fs*5. The molecular diagnosis of most cases of HAC-21OHD can be elucidated quickly and inexpensively by screening for frequent alterations. For cases not elucidated, the complete sequencing of the *CYP21A2* gene is valuable since more than 400 pathogenic alterations have been related to HAC-21OHD, thus, the standardization of this technique, in the present work, enriches even more the molecular diagnosis of HAC performed in the state by the LGMH/HUPAA/UFAL.

Keywords: Congenital adrenal hyperplasia; DSD 46,XX; Molecular diagnosis; Sanger Sequencing; *CYP21A2* gene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Determinação e diferenciação do sexo humano Determinação e diferenciação do sexo humano	20
Figura 2 –	Diferenciação normal da genitália interna humana	22
Figura 3 –	Desenvolvimento genital externo masculino-feminino	23
Figura 4 –	Vias de síntese dos esteroides adrenais evidenciando as enzimas envolvidas na hiperplasia adrenal congênita	24
Figura 5 –	Hormônios hipotálamo-hipofisários e seus diferentes locais de atuação	25
Figura 6 –	<i>Feedback</i> negativo realizado pelo cortisol no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; secção da glândula adrenal em camadas.....	26
Figura 7 –	Escala de Prader para classificação do grau de virilização da genitália externa.....	29
Figura 8 –	Localização do gene <i>CYP21A2</i> no braço curto do cromossomo 6.....	30
Figura 9 –	Organização do gene <i>CYP21A2</i> na região <i>RCCX</i> bimodular	30
Figura 10 –	Correlação genótipo–fenótipo na Hiperplasia Adrenal Congênita pela deficiência da 21-hidroxilase baseada na atividade enzimática <i>in vitro</i>	32
Figura 11 –	Equipe multidisciplinar de assistência aos casos de DDS do SGC/HUPPA/UFAL	35
Figura 12 –	Resumo esquemático da metodologia abordada nesse trabalho.....	37
Figura 13 –	Porcentagem alélica das alterações patogênicas identificadas no gene <i>CYP21A2</i> de 19 famílias com diagnóstico de HAC-21OHD confirmado por PCR-AE	42
Figura 14 –	Fragmentação seletiva do gene <i>CYP21A2</i>	48
Figura 15 –	Alteração patogênica p.Gln319* identificada em heterozigose em ambos os genitores da família MC38.....	52
Figura 16 –	Alteração patogênica p.Arg484Profs*58 em heterozigose encontrada em ambos os genitores da família MC38.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Três formas de hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase – características e sintomas	28
Tabela 2 –	Fenótipo esperado na HAC-21OHD de acordo com a combinação de alterações patogênicas em diferentes alelos	33
Tabela 3 –	Protocolo de Digestão por enzima de restrição <i>PstI</i>	38
Tabela 4 –	Reagentes, condições de amplificação da reação de PCR para posterior sequenciamento e ciclo utilizado para a amplificação	39
Tabela 5 –	Reagentes utilizados para reação de PCR utilizando <i>BigDye™ Terminator Cycle Sequencing</i> e ciclo utilizados para a amplificação	40
Tabela 6 –	Resultados obtidos através da técnica de reação em cadeia da polimerase alelo específica (PCR-AE) ou digestão por enzima de restrição para o rastreamento de alterações patogênicas no gene <i>CYP21A2</i> em indivíduos diagnosticados com hiperplasia adrenal congênita (HAC) e o genótipo final de cada indivíduo	43
Tabela 7 –	Correlação genótipo-fenótipo dos indivíduos diagnosticados com hiperplasia adrenal congênita (HAC) investigados	45
Tabela 8 –	Resultados obtidos através da técnica de reação em cadeia da polimerase alelo específica (PCR-AE) ou digestão por enzima de restrição para o rastreamento de alterações patogênicas no gene <i>CYP21A2</i> em genitores e filhos saudáveis de indivíduos diagnosticados com hiperplasia adrenal congênita (HAC) e o genótipo final de cada indivíduo	47
Tabela 9 –	Sequência de <i>primers</i> utilizados para cada fragmento e o <i>amplicon</i> de cada fragmento para seleção completa do gene <i>CYP21A2</i>	49
Tabela 10 –	Volume unitário e ciclo de reação de cada reagente utilizado na PCR-AE para a correta seleção do F1 do gene <i>CYP21A2</i>	50

Tabela 11 –	Volume unitário e ciclo de reação de cada reagente utilizado na PCR-AE para a correta seleção do F2 do gene <i>CYP21A2</i>	50
Tabela 12 –	Variantes encontradas em heterozigose no indivíduo MC38P durante o sequenciamento completo do gene <i>CYP21A2</i>	51
Tabela 13 –	Variantes encontradas em heterozigose no indivíduo MC38M durante o sequenciamento do éxon 3 até a região 3’UTR do gene <i>CYP21A2</i>	52
Tabela 14 –	Volume unitário e ciclo de reação de cada reagente utilizado na PCR-AE para a correta seleção do SPLC do gene <i>CYP21A2</i>	54
Tabela 15 –	Volume unitário e ciclo de reação de cada reagente utilizado na PCR-AE para a correta seleção do F2 do gene <i>CYP21A2</i>	55
Tabela 16 –	Variantes encontradas no indivíduo MC34P durante o sequenciamento do fragmento SPLC e do F4	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABI3500	Analisador de DNA automático
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
CEP UFAL	Comitê de Ética em Pesquisa
CL-PS	Clássicos perdedores de sal
CL-VS	Clássicos virilizante simples
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
C4	Complemento C4
DDS	Distúrbios de desenvolvimento sexual
Delta 8	Deleção de 8 nucleotídeos no éxon 3
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FOXL2	Caixa de forquilha L2
FSH	Hormônio Folículo-estimulante
F1	Fragmento 1 do gene <i>CYP21A2</i>
F2	Fragmento 2 do gene <i>CYP21A2</i>
F4	Fragmento 4 do gene <i>CYP21A2</i>
GH	Hormônio do Crescimento
GHRH	Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HAC-21OHD	HAC por deficiência da 21OH
HAC-CL	Forma clássica da HAC-21OHD
HLA	Complexo de histocompatibilidade humana

HMA	Hormônio antimülleriano
HGMD	do inglês <i>The Human Gene Mutation database</i>
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HUPAA	Hospital Universitário Alberto Antunes
IGFs	Hormônios Somatomedinas
LGMH	Laboratório de Genética Molecular Humana
LH	Hormônio Luteinizante
NC	Não clássico
MLPA	do inglês <i>Multiplex ligation-dependent Probe Amplification</i>
PCR-AE	Reação em cadeia da polimerase alelo específica
PPSUS	Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
P450c21	Família dos citocromos P450
RP	Serina/treonina quinase nuclear <i>RP</i>
RN	Recém-nascidos
RSPO1	R-espondina 1
SGC	Serviço de Genética Clínica
SRY	do inglês <i>sex-determining gene</i>
ST	Síndrome de Turner
SUS	Sistema Único de Saúde
SUS-AL	Sistema Único de Saúde de Alagoas

SPLC	<i>Splice C</i> do gene <i>CYP21A2</i>
TDF	Fator de transcrição determinante dos testículos
TNX	Esteroides 21-hidroxilase <i>CYP21</i> e tenascina
TSH	Hormônio Tireoideestimulante
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UTR	do inglês <i>untranslated region</i>
WNT4	Wnt membro da família 4
3- β -HSD3	3- β -hidroxi-esteroide-desidrogenase
6p21.3	Braço curto do cromossomo 6, região 2, banda 1, sub-banda 3
11-DOC	11-desoxicortisol
17 α -OHP	17 α -hidroxiprogesterona
21OH	Enzima 21-hidroxilase
46, XY	Sexo cromossômico masculino
46, XX	Sexo cromossômico feminino

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Diferenciação sexual humana típica – do desenvolvimento embrionário às funções fisiológicas	19
2.2	Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC)	24
2.3	O gene <i>CYP21A2</i> e suas alterações patogênicas	29
2.4	Genótipo vs. Fenótipo	32
2.5	Diagnóstico molecular	33
2.6	Importância da triagem neonatal e do diagnóstico molecular – a equipe multidisciplinar	34
3.	OBETIVO	35
3.1	Objetivo geral	35
3.2	Objetivos específicos	35
4.	JUSTIFICATIVA.....	36
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1	Local de estudo	37
5.2	Amostras de pacientes	37
5.3	Obtenção das amostras biológicas e extração de DNA de sangue total por digestão com proteinase K	38
5.4	PCR-AE e digestão por enzima de restrição	38
5.5	PCR para posterior sequenciamento	39
5.6	Purificação do produto da PCR	39
5.7	Reação de sequenciamento	39
5.8	Análise dos dados	40

6.	RESULTADOS	40
6.1	Análise molecular de alterações patogênicas por PCR-AE ou por digestão enzimática	40
6.2	Padronização do sequenciamento completo do gene <i>CYP21A2</i> pela técnica de Sanger	48
6.2.1	Padronização da PCR e do sequenciamento do fragmento 1 (F1) do gene <i>CYP21A2</i>	49
6.2.2	Padronização do PCR e do sequenciamento do fragmento 2 (F2) do gene <i>CYP21A2</i>	54
6.2.3	Padronização do PCR e do sequenciamento do fragmento <i>splice c (SPLC)</i> do gene <i>CYP21A2</i>	54
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
8.	REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

Existem fatores biológicos importantes para a determinação do sexo humano, como: constituição cromossômica, genes determinantes do sexo (*e.g.*, presença ou ausência do gene *SRY*), eventos fenotípicos derivados da composição cromossômica que induzem a diferenciação gonadal, além dos hormônios produzidos que são considerados, por vezes, fatores-chave, tendo uma correlação direta com eixos importantes do cérebro (ARBOLEDA; VILAIN, 2016; BABBAR *et al.*, 2020; KHRAMTSOVA; DAVIS; STRANGER, 2019). O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) está em formação durante a etapa de desenvolvimento sexual, é um recurso importante para o desenvolvimento físico e psicológico do corpo, sendo responsável, principalmente, pela resposta ao estresse e pela homeostase corporal (O'CONNOR; O'HALLORAN; SHANAHAN, 2000; YEHUDA; SECKL, 2011).

Uma interrupção em um desses parâmetros pode ser responsável pelo desenvolvimento dos distúrbios de desenvolvimento sexual (DDS) (ARBOLEDA; VILAIN, 2016; BABBAR *et al.*, 2020). Os DDS englobam um grupo de condições/anomalias congênitas nas quais o desenvolvimento do sexo cromossômico, gonadal ou anatômico é considerado atípico (HUGHES *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2016.) e, conforme o consenso de Chicago, são classificados em três grupos principais com base no seu cariótipo: DDS 46, XY, DDS 46, XX e alterações cromossômicas (HUGHES *et al.*, 2006). O diagnóstico é possível ao nascimento quando há ambiguidade da genitália externa ou alterações fenotípicas aparentes, entretanto, a confirmação do diagnóstico só é possível após a realização do exame de cariótipo somado a um conjunto de outros exames e deve ser realizada a abordagem multidisciplinar (COOLS *et al.*, 2018; GRINSPON; REY, 2020; NARASIMHAN; KHATTAB, 2019).

É importante salientar que a frequência estimada de ambiguidade genital está na faixa de 1:2.000 – 1:45.000 (BERGLUND *et al.*, 2016; HUGHES *et al.*, 2007). Todavia, o diagnóstico de DDS após o nascimento pode ocorrer em qualquer período da vida devido à virilização pós-natal, puberdade em atraso ou ausente, e até mesmo, infertilidade (LEE *et al.*, 2006; ONO; HARLEY, 2013). A hiperplasia adrenal congênita (HAC; OMIM: 207910) é um DDS que é classificado tanto como DDS 46, XX quanto como DDS 46, XY, a depender da enzima afetada (COOLS *et al.*, 2018; GRINSPON; REY, 2020; NARASIMHAN; KHATTAB, 2019).

A HAC é resultado de uma incapacidade hereditária de sintetizar esteroides no córtex adrenal adequadamente, pertencente ao grupo de desordens autossômicas recessivas e seus fenótipos são extremamente variáveis devido à grande complexidade da via de esteroidogênese adrenal (DE PAULA MICHELATTO *et al.*, 2016; FALHAMMAR *et al.*, 2022). A deficiência de qualquer umas das enzimas envolvidas na síntese dos esteroides adrenais podem causar essa patologia, sendo aproximadamente 95% dos casos causados por alterações patogênicas no gene *CYP21A2*, que codifica a enzima 21-hidroxilase (21OH) e pertencente à família dos citocromos P450 (P450c21) (SPEISER *et al.*, 2018; VAN DER GRINTEN *et al.*, 2022; WHITE; NEW; DUPONTT, 1986). De 5 a 8% dos casos de HAC são causados pela deficiência da enzima 11- β -hidroxilase e de 1 a 2% pela deficiência da enzima 3- β -hidroxi-esteroide-desidrogenase (3- β -HSD3) (BABBAR *et al.*, 2020). Corroborando com isso, dados de vários países com programas de triagem neonatal demonstram que a HAC por deficiência da enzima 21OH é a mais comum, com uma incidência geral de 1:15.000 nascidos vivos na sua forma clássica (PANG *et al.*, 1993; THERRELL, 2001).

A 21OH converte 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP) em 11-desoxicortisol (11-DOC) e progesterona em desoxicorticosterona sendo esses produtos precursores do cortisol e da aldosterona, respectivamente. O bloqueio total ou parcial nestas etapas desvia a síntese de esteroides adrenais para a via não afetada dos esteroides sexuais, levando a um excesso androgênico em períodos cruciais da diferenciação sexual intraútero (KOCOVA; ANASTASOVSKA; FALHAMMAR, 2020).

Fenotipicamente, a HAC por deficiência da 21OH (HAC-21OHD) pode ser dividida no grupo clássico, incluindo perdedores de sal (CL-PS) e virilizante simples (CL-VS) e no grupo não clássico (NC) (FALHAMMAR *et al.*, 2022). As características mais comuns na forma clássica são a genitália atípica em recém-nascidos 46, XX, devido ao excesso de andrógenos ainda no período intrauterino, e uma insuficiência adrenal primária ainda na infância em ambos os sexos (DUMIĆ, 1996). A ambiguidade genital é um desafio e motivo de aflição para o indivíduo, para a família e, até mesmo para a sociedade devido à necessidade de tomada de decisão quanto ao sexo de criação, a educação dos pais e dos próprios pacientes ao passo em que ocorre um gerenciamento médico e, até mesmo, científico (CHEN *et al.*, 2017; WILSON *et al.*, 2012).

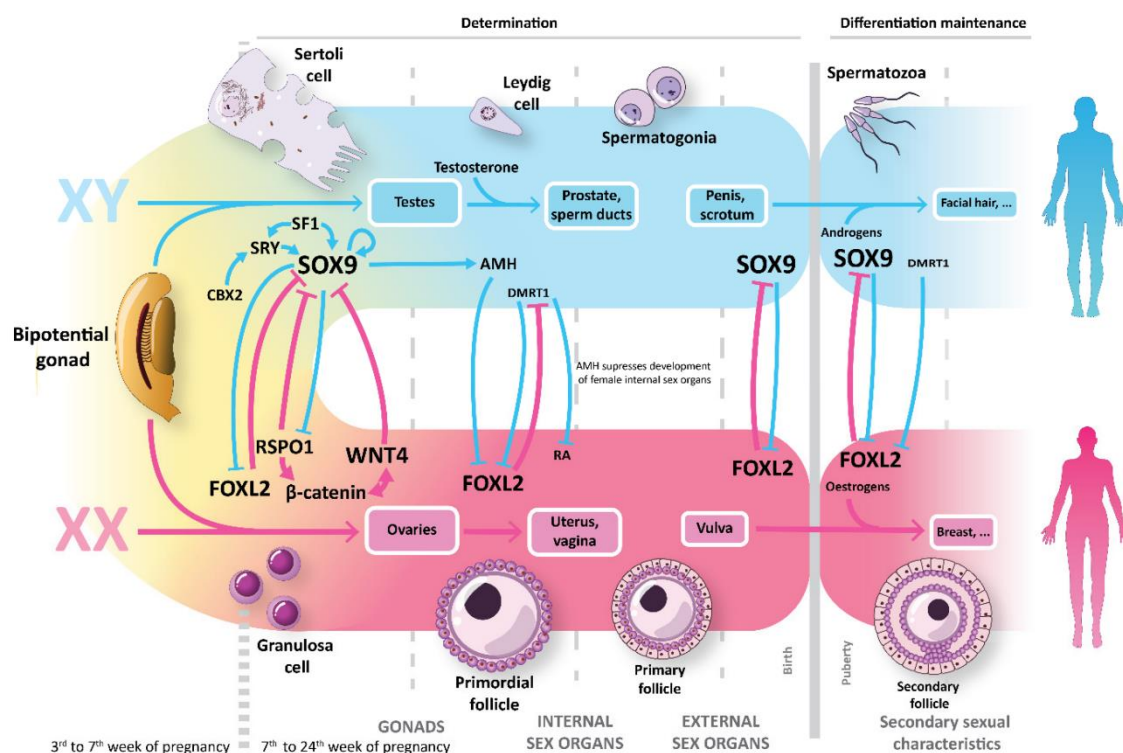
A HAC-21OHD está associada ao aumento da morbidade e mortalidade durante a infância, sendo grande parte relacionada ao tratamento inadequado e/ou ao diagnóstico tardio. Outrossim, é importante salientar que, sexo e gênero não têm, do ponto de vista médico e conceitual, o mesmo significado. Sexo refere-se à biologia das estruturas genitais internas e externas, ou seja, as suas características físicas, sendo considerada uma categoria binária. Em contrapartida, a identidade de gênero é experiência autodefinida de gênero, ou seja, a identificação psicossocial e emocional do indivíduo (CHEN *et al.*, 2017; EGGERS; SINCLAIR, 2012; MOHNACH; FECHNER; KEEGAN, 2016).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diferenciação sexual humana típica – do desenvolvimento embrionário às funções fisiológicas

A diferenciação sexual humana é um processo complexo influenciado por múltiplos fatores, composto por estágios sequenciais como o genético, gonadal, hormonal, fenotípico e psicológico (MAKIYAN, 2016). Nos seres humanos, a diferenciação sexual típica é determinada por uma cascata gênica, sendo o sexo biológico determinado por um par de cromossomos sexuais, estabelecido durante a fertilização, a saber XY nos indivíduos do sexo biológico masculino e XX nos indivíduos do sexo biológico feminino (DUTT; WEHRLE; JIALAL, 2022; MIHAI, 2011; PASK, 2016; SHE; YANG, 2014). Por volta da 3ª semana de gestação as gônadas bipotenciais se diferenciam em ovários ou testículos (JOST, 1972; MAKIYAN, 2016). Genes específicos induzem essa diferenciação, com posterior desenvolvimento da genitália interna e externa por volta da 7ª semana, sob a ação gênica e hormonal (Figura 1). Defeitos durante qualquer uma dessas etapas pode resultar em um DDS (BIASON-LAUBER, 2016; DUTT; WEHRLE; JIALAL, 2022; EID; BIASON-LAUBER, 2016; MAKIYAN, 2016).

Figura 1 – Determinação e diferenciação do sexo humano



Os suportes gonadais somáticos, células de Sertoli e células da granulosa, desempenham um papel central no desenvolvimento sexual, orquestrando a diferenciação das outras células gonadais e expressando SOX9 e caixa de forquilha L2 (FOXL2). Ambos os fatores se contrapõem em um delicado equilíbrio e sua expressão deve ser mantida através de diferentes estágios de desenvolvimento. **Fonte:** RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ; BIASON-LAUBER, 2019.

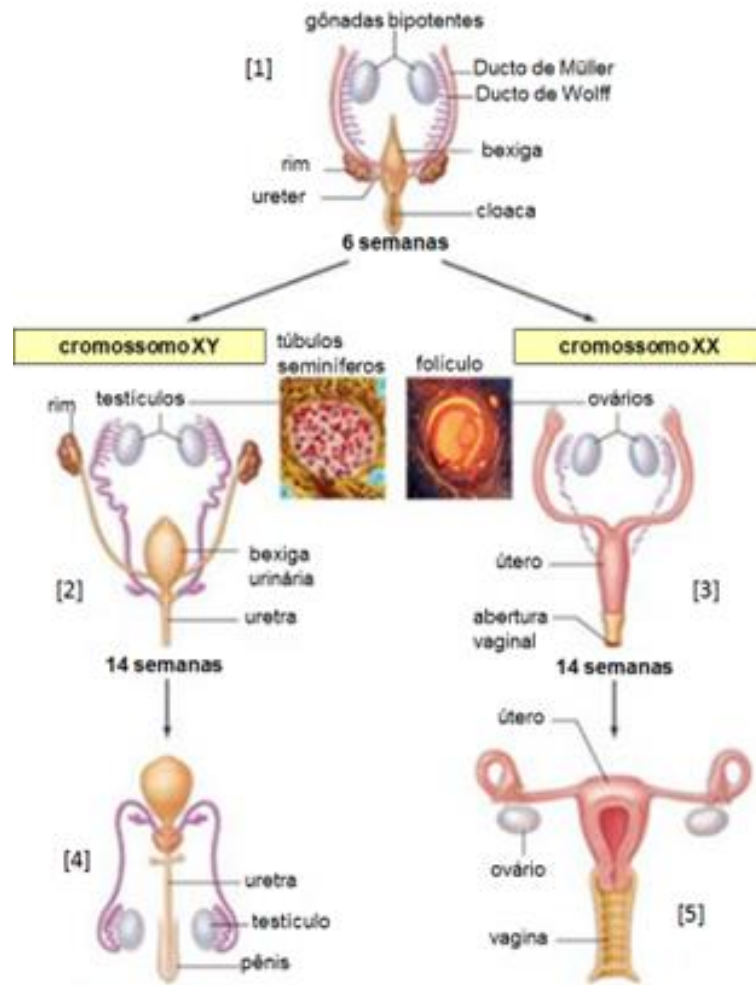
No embrião 46, XY a gônada bipotencial se diferencia em testículos sob a influência de vários genes, principalmente do gene determinante do sexo (*SRY*, do inglês *sex-determining gene*) localizado no braço curto do cromossomo Y (KOOPMAN *et al.*, 1991). A descoberta desse gene em 1990 foi um marco importante no processo de estudo da diferenciação sexual dos vertebrados (NAGAHAMA *et al.*, 2021). As cristas urogenitais se desenvolvem entre a 4ª e 6ª semana de gestação como excrescências do epitélio celômico (WITCHEL, 2018). O gene *SRY* possui um único éxon codificador do fator de transcrição determinante dos testículos (TDF). Ademais, sua expressão auxilia na diferenciação das células de Sertoli, que posteriormente resulta na produção de hormônio antimülleriano (HAM) (A; KRISHAN, 2022; DUTT; WEHRLE; JIALAL, 2022; MIHAI, 2011).

Além disso, o gene *SRY* induz a expressão do fator de diferenciação *SOX9*, ativando e mantendo a via de diferenciação gonadal masculina (AGRAWAL *et al.*, 2009). No estágio inicial, as células gonadais segregam-se em dois compartimentos que invadem a medula gonadal por cordões testiculares (composto por células germinativas e por células de Sertoli) e tecidos intersticiais (células de Leydig). As células de Leydig derivam do mesênquima da crista gonadal e sua vascularização é um processo dinâmico (BIASON-LAUBER, 2012; LAMBETH *et al.*, 2016).

A gônada XY recruta e padroniza a vasculatura por um mecanismo de remodelação. Na diferenciação dos testículos, os vasos mesonefros preexistentes se dissociam e formam um aglomerado de células endoteliais que migram e atingem abaixo do epitélio celômico da gônada, onde se reúnem para formar o vaso celômico (A; KRISHAN, 2022; BIASON-LAUBER, 2016; LAMBETH *et al.*, 2016). A formação desse vaso é uma das primeiras marcas do desenvolvimento do testículo que o distingue morfológicamente do ovário em desenvolvimento. Os ductos mesonefros formam o principal ducto genital do embrião 46, XY (BIASON-LAUBER, 2016; MAKIYAN, 2016). As partes restantes dos túbulos excretores ligam a rede testicular e o ducto mesonefro, que se torna o ducto deferente. Os túbulos seminíferos e os túbulos retos entram nos ductos eferentes (Figura 2) (A; KRISHAN, 2022; EID; BIASON-LAUBER, 2016).

No embrião 46, XX as gônadas se diferenciam após a 7^a semana de gestação, sendo alguns fatores de transcrição específicos do ovário envolvidos na diferenciação ovariana, são eles: a caixa de forquilha L2 (*FOXL2*), Wnt membro da família 4 (*WNT4*), R-espondina 1 (*RSPO1*), além da via β -catenina (A; KRISHAN, 2022; BIASON-LAUBER, 2012; WITCHEL, 2018). No seu estágio inicial, os cordões sexuais primitivos se desfazem em aglomerados irregulares de células, e estes ocupam a parte medular do ovário (KOOPMAN *et al.*, 1991; WITCHEL, 2018).

Figura 2 – Diferenciação normal da genitália interna humana.



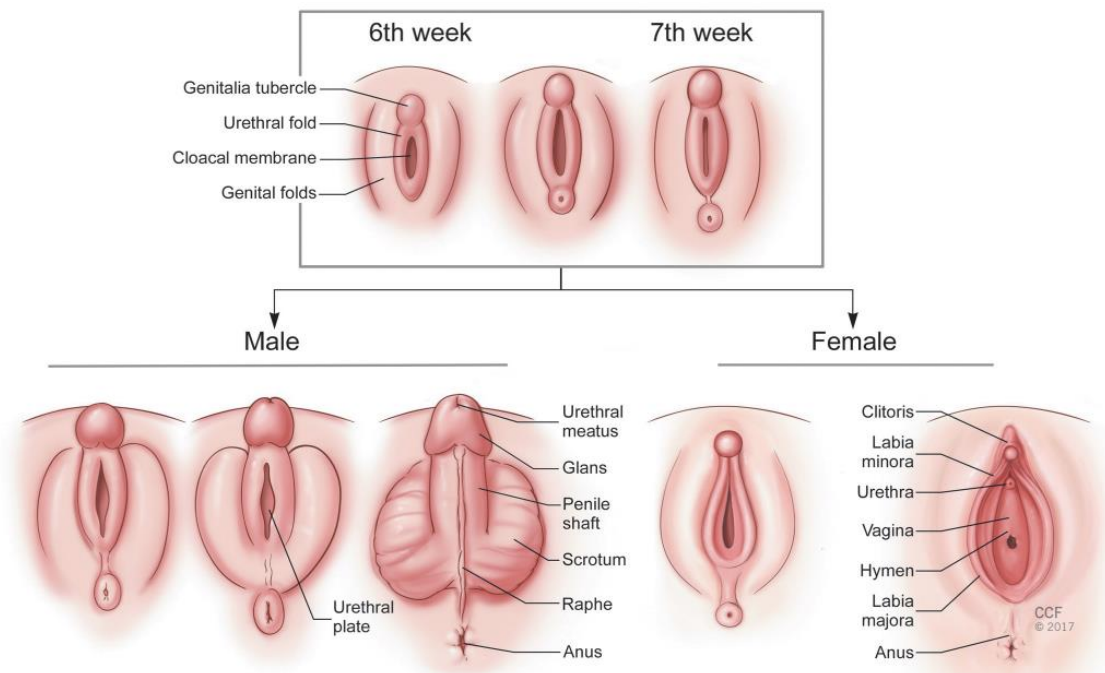
A partir do estágio indiferenciado (1), as gônadas bipotentes se diferenciarão em testículos (2) ou ovários (3) dependendo do sexo cromossômico. Os testículos produzirão testosterona e HAM resultando em uma genitália interna masculina completamente desenvolvida (4). A presença dos ovários, portanto, a ausência da testosterona e do HAM, resultará na genitália interna feminina completamente desenvolvida (5). Adaptado de NILLSON et al., 1965.

A posteriori, esses aglomerados irregulares são substituídos por estroma vascular que forma a medula ovariana. Durante a mitose, as células germinativas primitivas proliferam e irão se tornar em oogônias. Na 10ª semana de gestação, as oogônias entram na prófase meiótica, sendo o primeiro sinal de diferenciação ovariana. A maturação do ovário ocorre do centro à periferia gonadal (A; KRISHAN, 2022; WITCHEL, 2018). Logo em seguida, as oogônias ficam circundadas por uma camada de células granulosas, levando a uma meiose posterior e se transformando em oócitos até chegar aos folículos primordiais.

Os folículos primários se formam na 15^a-16^a semana e os primeiros folículos de Graff na 23^a-24^a semana. No final do 7^o mês de gestação, a atividade mitótica cessa e quase todas as células germinativas entram na prófase meiótica. Elas permanecem no estágio de diplóteno e a meiose será completa no momento da ovulação após a puberdade (Figura 2) (BIASON-LAUBER, 2016; MAKIYAN, 2016).

Já a diferenciação normal dos genitais externos depende da concentração de hormônios androgênicos na corrente sanguínea, produzidos pelos testículos e pelas glândulas adrenais. A di-hidrotestosterona (DHT), produto da conversão da testosterona pela enzima 5- α -redutase, determinando a virilização dos genitais externos. A alta concentração de andrógenos leva a uma genitália externa masculina, entretanto, as baixas concentrações levam a uma genitália externa feminina (Figura 3).

Figura 3 – Desenvolvimento genital externo masculino-feminino.

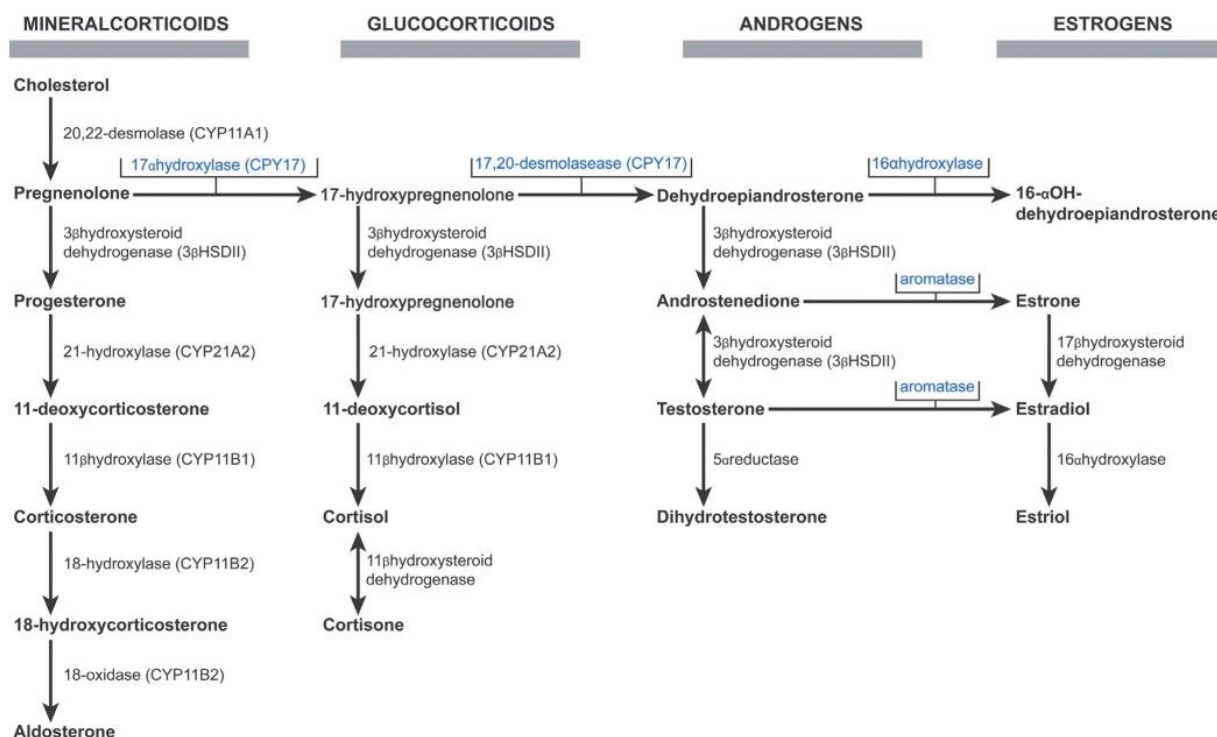


Desenvolvimento embrionário da genitália externa em ambos os sexos biológicos. **Fonte:** BABBAR et al., 2020.

2.2 Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC)

Em 1865, o patologista italiano Luigi De Crecchio, descreveu detalhadamente durante uma autópsia o caso de um homem que apresentava anatomia interna feminina e grandes glândulas adrenais, representando o primeiro caso conhecido de HAC. A síntese de hormônios esteroides adrenais é mediada por cinco enzimas cuja atividade, ao ser deficiente, resulta na HAC (Figura 4) (DELLE PIANE; RINAUDO; MILLER, 2015; NARASIMHAN; KHATTAB, 2019). A HAC é um distúrbio da biossíntese de esteroides adrenais, ou seja, uma condição nas quais as glândulas adrenais produzem cortisol de forma deficiente (DELLE PIANE; RINAUDO; MILLER, 2015; SHARMA, 2019; SIMPSON; HUGHES, 2021).

Figura 4 – Vias de síntese dos esteroides adrenais evidenciando as enzimas envolvidas na hiperplasia adrenal congênita.



Fonte: BABBAR et al., 2020.

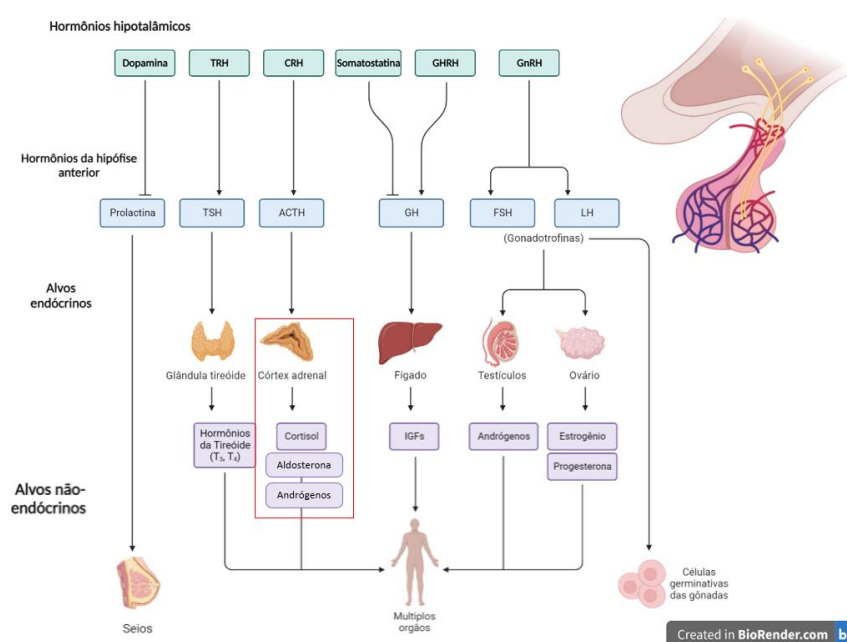
Nos seres humanos, existe três órgãos principais da esteroidogênese: a glândula adrenal (córtex adrenal); os testículos (células de Leydig); e os ovários (células granulosas e da teca) (PARSA; NEW, 2017). O córtex adrenal é formado a partir da 4ª semana de gestação (sendo diferenciado do mesoderma celômico), em um processo contínuo, e

durante a 6^a-7^a semana de gestação ele se torna funcional e secreta esteroides (VILLEE, 1972).

A esteroidogênese adrenal é regulada positivamente pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), produzidos pelo eixo HPA e controlada pelo cortisol por meio do mecanismo de *feedback* negativo. Sendo assim, a diminuição na produção de cortisol pela 21OHD resulta no aumento da secreção do CRH e do ACTH, super estimulando as adrenais, causando conseqüentemente sua hiperplasia e superprodução de andrógenos (PARSA; NEW, 2017). As características clínicas da HAC compreendem um amplo espectro que reflete as conseqüências da alteração patogênica específica (HINDMARSH; GEERTSMA, 2017; SIMPSON; HUGHES, 2021; VAN DER GRINTEN *et al.*, 2022).

Ademais, as manifestações fenotípicas da HAC são um *continuum* (VAN DER GRINTEN *et al.*, 2022), *e.g.*, três sistemas fisiológicos distintos sofrem perturbações: o HPA (regulador da produção de cortisol, que está relacionado, também com problemas comportamentais, por exemplo, a ansiedade) (Figura 5); o eixo renina-angiotensina-aldosterona (responsável pela regulação da produção de aldosterona); e, por fim, o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal que regula a produção de esteroides gonadais (JANSEN M WIT; VAN DEN BRANDE, 1981; MOOIJ *et al.*, 2015; OETLIKERF; ZURBRUGG, 1978; SHARMA, 2019).

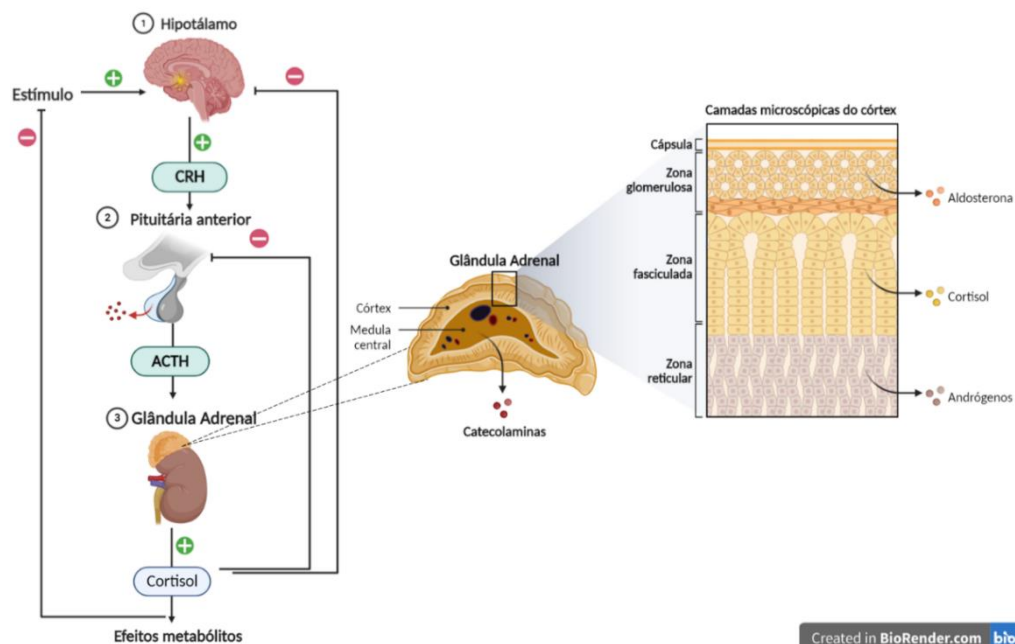
Figura 5 – Hormônios hipotalâmico-hipofisários e seus diferentes locais de atuação.



Destaque para o córtex adrenal, produtor de glicocorticoides (cortisol) responsável pelo feedback negativo, processo envolvido em várias patologias e importante para a homeostase corporal. Siglas: Hormônio Tireoideostimulante (TSH); Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); Hormônio do Crescimento (GH); Hormônio Folículo-estimulante (FSH); Hormônio Luteinizante (LH); Triiodotironina (T3); Tiroxina (T4); Hormônios Somatomedinas (IGFs); Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH); Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento (GHRH) e Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH). **Fonte:** Autora.

A 21 OHD leva a uma diminuição da produção de cortisol com consequente falta de *feedback* negativo (Figura 6) – resposta de “desligamento” regular – para a secreção de CRH e ACTH (HILLER-STURMHÖFEL; BARTKE, 1998, p. 153; SPEISER et al., 2018; THILÉN et al., 1998; WUDY et al., 2018). À vista disso, a 21OHD se traduz em um espectro de consequências fisiológicas e clínicas, que incluem insuficiência adrenal, ambiguidade genital e/ou desenvolvimento sexual desordenado, infertilidade, baixa estatura, hipertensão e aumento do risco de síndrome metabólica durante a adolescência e a idade adulta (KRONE et al., 2007; NARASIMHAN; KHATTAB, 2019; WITCHEL, 2018), sendo sua gravidade e características clínicas dependentes da atividade residual enzimática (KRONE et al., 2007; NARASIMHAN; KHATTAB, 2019).

Figura 6 – *Feedback negativo* realizado pelo cortisol no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; secção da glândula adrenal em camadas.



A retroalimentação negativa é um mecanismo essencial para a manutenção da homeostase corporal. Com isso, o hipotálamo faz a detecção da quantidade de cortisol presente na corrente sanguínea, quando ocorre a deficiência enzimática e, com isso, a detecção de baixos níveis de cortisol, ocorre uma desregulação nesse processo, levando a um aumento de alguns hormônios na corrente sanguínea, como o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Levando, assim, a uma superestimulação das glândulas adrenais, podendo causar inúmeras patologias como a hiperplasia adrenal congênita e, como consequência, a superprodução de andrógenos. **Fonte.** Autora.

Clinicamente a HAC-21OHD pode ser dividida em forma clássica (CL) e não clássica (NC). A HAC-CL ocorre em 1:14.000 indivíduos com base na triagem neonatal, sendo definida por uma atividade enzimática severamente reduzida ou ausente (<5%) (HADDAD; EUGSTER, 2019; NIMKARN et al., 2016), com a produção de cortisol prejudicada, manifestando-se clinicamente no período neonatal (ARRIBA; EZQUIETA, 2022; SIMONETTI *et al.*, 2018). Esta pode ser subdividida em virilizante simples (CL-VS) e perdedora de sal (CL-PS). A CL-VS é associada a atividade enzimática residual de 1% a 5%, resultando na deficiência de produção de cortisol e na produção de aldosterona suficiente para se manter o equilíbrio eletrolítico e evitar a perda de sal (HINDMARSH; GEERTSMA, 2017; VAN DER GRINTEN *et al.*, 2022). Já na forma mais grave, CL-PS, há pouca ou nenhuma atividade enzimática (<1%) resultando na deficiência de produção tanto de cortisol como de aldosterona (Tabela 1) (HADDAD; EUGSTER, 2019; NIMKARN et al., 2016).

Já a HAC-NC é considerada mais prevalente, tendo uma incidência entre 1:500 na população caucasiana, sendo essa alteração leva um bloqueio entre 10 – 20% da atividade enzimática, garantindo concentrações de cortisol iguais às de indivíduos não afetados. Podendo apresentar um alelo clássico e um não clássico ou dois alelos não clássicos. Com sintomas típicos em mulheres jovens de hirsutismo, oligomenorreia, infertilidade, acne e pubarca precoce, levando a poucos pacientes serem diagnosticados no período neonatal; e em crianças de puberdade precoce, velocidade de crescimento acelerada e maturação esquelética avançada (Tabela 1) (BABBAR *et al.*, 2020; SPEISER *et al.*, 1992, 2018).

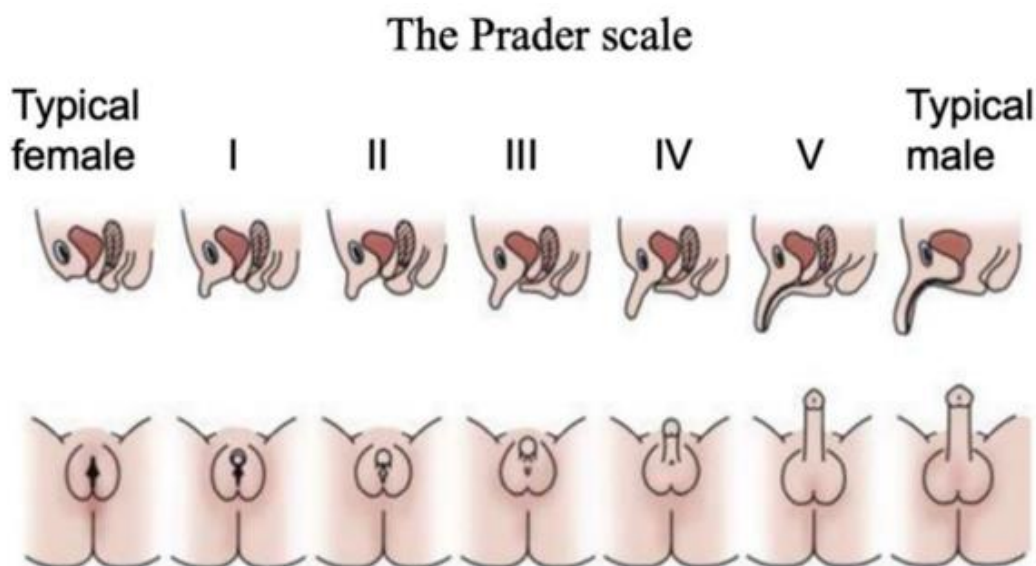
Tabela 1 – Três formas de hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase – características e sintomas.

Forma	Características	Sintomas
Clássica Perdedora de Sal (CL-PS)	Forma mais severa: presente ao nascimento; as glândulas suprarrenais produzem pouca aldosterona, levando a perda de sal; corresponde a 70–75% da HAC–CL;	46,XX – genitália externa ambígua; desidratação; crise de perda de sal nas primeiras semanas de vida. <hr/> 46,XY – crise de perda de sal nas primeiras semanas de vida, hiperpigmentação do escroto
Clássica Virilizante Simples (CL – VS)	Forma moderada: presente ao nascimento; produção de aldosterona suficiente para evitar a perda de sal; corresponde a 25–30% da HAC-CL	46,XX – genitália externa ambígua. <hr/> 46,XY – pseudopuberdade precoce.
Não Clássica (de início tardio; NC)	Forma branda: 21OHD parcial com manifestação tardia (qualquer período após o nascimento) e pode ser assintomática	46, XX e 46, XY – velocidade de crescimento acelerada com maturação esquelética precoce e pseudopuberdade precoce;

Fonte: NARASIMHAN; KHATTAB, 2019; SIMONETTI et al., 2018; WEDELL, 2007

É importante salientar que a ambiguidade genital nos fetos 46,XX pode se manifestar em diferentes graus, desde uma clitoromegalia até a fusão completa das saliências lábioescrotais com falo de aspecto peniano bem desenvolvido, classificada conforme a escala de Prader, no qual, as genitálias externas femininas típicas são designadas como 0 (Figura 7) (BERTA *et al.*, 1990; CHOWDHURY *et al.*, 2014). A escala de Prader é um sistema de classificação da medição do grau de virilização da genitália humana, visto que, no início do desenvolvimento embrionário, a genitália externa é indiferenciada, sendo morfologicamente idêntica nos fetos 46, XX e 46, XY (ESTERMANN; SMITH, 2020).

Figura 7 – Escala de Prader para a classificação do grau de virilização da genitália externa.

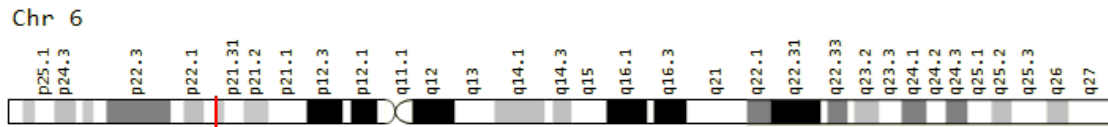


Na parte superior: corte sagital do espectro contínuo. Na parte inferior: visão perianal dos vários graus de virilização da genitália externa. Grau 1: genitália de aspecto feminino com aumento sutil do falo; Grau 2: aumento maior do falo, associação à fusão posterior das saliências labioescrotais, além de uma ausência de seio urogenital; Grau 3: aumento considerável do falo com fusão quase completa das saliências labioescrotais, além de uma presença de seio urogenital com abertura perineal; Grau 4: falo de aspecto peniano, associado à fusão completa das saliências labioescrotais e presença de seio urogenital com abertura perineal entre a base e a extremidade do falo; Grau 5: falo com aspecto peniano bem desenvolvido, com fusão completa das saliências labioescrotais e presença de seio urogenital com abertura balânica. **Fonte:** ESTERMANN; SMITH, 2020.

2.3 O gene *CYP21A2* e suas alterações patogênicas

O gene *CYP21A2* (GeneID 1589), que codifica a enzima 21OH, foi identificado pela primeira vez em 1984 (WHITE; NEW; DUPONT, 1984), está localizado dentro do maior complexo de histocompatibilidade humana (HLA), abrange 3,35 kb do braço curto do cromossomo 6 (6p21.3) (Figura 8) (CARROLL; CAMPBELL; PORTER, 1985; YANG *et al.*, 1999), é formado por 10 éxons e possui um quadro de leitura aberto de 1.488 pb (HIGASHI *et al.*, 1986; KOPPEANS; HOOGENBOEZEM; DEGENHART, 2002). A expressão desse gene ocorre principalmente na zona fasciculada e glomerulosa do córtex adrenal (MILLER, 2008).

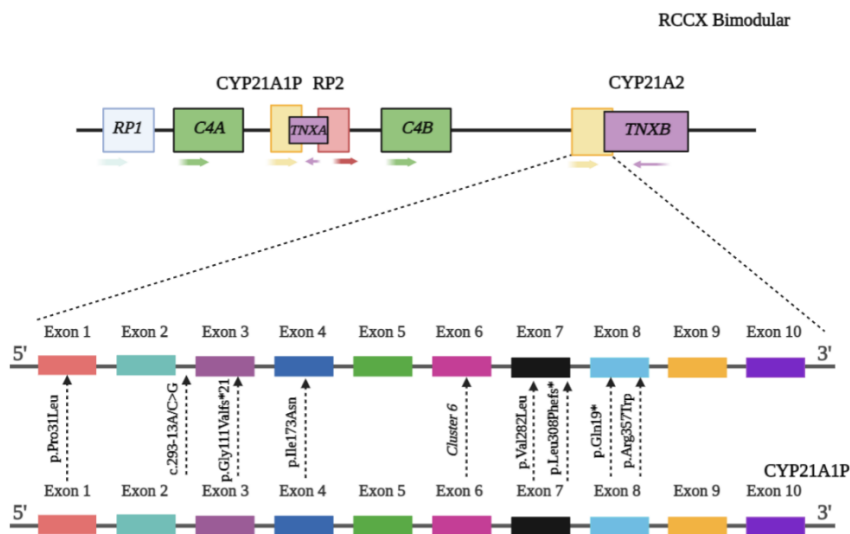
Figura 8 – Localização do gene *CYP21A2* no braço curto do cromossomo 6.



Fonte: Gene cards©.

O genoma humano possui duas cópias do gene *CYP21*, o gene *CYP21A2* (forma ativa) e o gene *CYP21A1P*, um pseudogene não funcional (WHITE AND SPEISER., 2000). Ambos fazem parte de uma unidade gênica designada módulo *RCCX*, que aparece normalmente duplicado; nessa região existem 4 genes arranjados em tandem (serina/treonina quinase nuclear *RP*, complemento – *C4*, esteroides 21-hidroxilase *CYP21* e tenascina [matriz proteica extranuclear] -*TNX*) (NARASIMHAN; KHATTAB, 2019a). Esse arranjo favorece grandes convenções/deleções gênicas por eventos de *crossing-over* desigual, sendo o resultado mais comum o módulo *RCCX* bimodular (*RP1-C4A-CYP21A1-TNXA/RP2-C4B-CYP21A2-TNXB*) (Figura 9) (NARASIMHAN; KHATTAB, 2019a). As duas cópias do gene *CYP21*, sua forma ativa *CYP21A2* e seu pseudogene *CYP21A1P*, apresentam alta homologia, com 98% de identidade entre seus éxons e 96% entre seus íntrons, entretanto 15 alterações patogênicas deletérias tornam o *CYP21A1P* não funcional (CONCOLINO *et al.*, 2010; ESPINOSA REYES *et al.*, 2021; HIGASHI *et al.*, 1986; MILLER; MERKE, 2018; RABBANI *et al.*, 2012; WHITE; NEW; DUPONTT, 1986; XU *et al.*, 2013).

Figura 9 – Organização do gene *CYP21A2* na região *RCCX* bimodular.



O gene *CYP21A2* e o pseudogene *CYP21A1P* estão arrançados em tandem, intercalados com dois genes *C4* que codificam para o fator 4 do sistema do complemento. Setas coloridas indicam a direção da transcrição. Além disso, nove mutações mais comumente encontradas no gene *CYP21A2* transferidas por eventos de microconversão entre o gene ativo *CYP21A2* e seu pseudogene *CYP21A1P* estão sendo evidenciadas. Baseado em KRONE & ARLT 2009.

Eventos de recombinação gênica são as principais causas das variantes no gene *CYP21A2*, devido à sua localização em uma região de complexidade altamente polimórfica (CARROLL; CAMPBELL; PORTER, 1985; PIGNATELLI et al., 2019). Tendo isso em vista, as recombinações intergênicas são responsáveis por aproximadamente 95% das variantes patogênicas que causam a 21OHD sendo o restante correspondente as alterações patogênicas espontâneas. Dentre as recombinações intergênicas pequenas deleções, inserções e trocas pontuais de nucleotídeos correspondem a 75% dos casos são consideradas microconversões (PIGNATELLI et al., 2019). Nos 20% restantes dos casos ocorre um desalinhamento por meio da travessia desigual durante a meiose (*crossing-over* desigual), que pode levar a supressões genéticas ou, duplicação, consideradas grandes conversões ou deleções (MILLER, 1994; PARKER et al., 2006; PIGNATELLI et al., 2019).

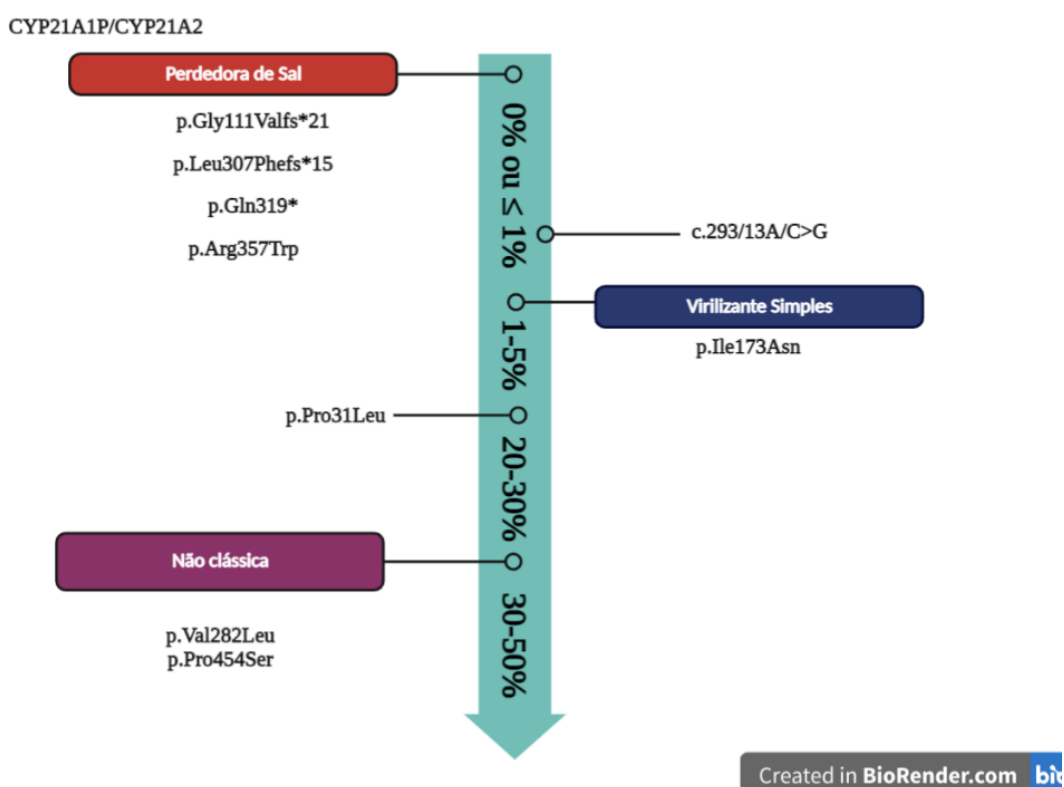
Ao longo dos anos, 401 alterações patogênicas foram descritas no gene *CYP21A2* e relacionadas a HAC segundo o *HGMD* (do inglês *The Human Gene Mutation database*) 2021.4, sendo 300 de acesso público e 101 de acesso restrito/profissional. Dessas, dezenove foram descritas nas regiões não traduzidas do gene.

A HAC-21OHD se enquadra em três categorias de alterações patogênicas: 1) 65% a 70% derivadas do pseudogene *CYP21A1P*, a saber c.293-13A/C>G, também conhecida popularmente por *splice G* (28%), p.Ile173Asn (9%), p.Val282Leu (9%), p.Gln319* (4%), p.Arg357Trp (4%), *cluster* E6 [p.Ile237Asn, p.Val238Glu, p.Met239Lys (4%)], p.Gly111Valfs*21, também conhecida por delta 8 (3%), p.Pro30Leu (2%) e p.Leu307Phefs*15 (1%); 2) 25% a 30% grandes deleções/conversões com gene híbrido *CYP21A2/CYP21A1P*; 3) 5% são alterações patogênicas espontâneas (ARRIBA; EZQUIETA, 2022; SIMONETTI et al., 2018).

2.4 Genótipo vs. Fenótipo

A natureza autossômica recessiva está bem estabelecida como padrão de herança na HAC. A maioria dos indivíduos diagnosticados HAC-21OHD são heterozigotos compostos, ou seja, possuem mais de uma mutação no mesmo gene/alelo (PAMPLONA-CUNHA *et al.*, 2020). Assim sendo, o fenótipo esperado deve ser deduzido pelo alelo cuja alteração patogênica causa menor dano a atividade enzimática (Tabela 2 e Figura 10). Contudo, algumas alterações patogênicas específicas podem ser correlacionadas a mais de um fenótipo, levantando a discordância entre essa correlação.

Figura 10 – Correlação genótipo-fenótipo na Hiperplasia Adrenal Congênita pela deficiência da 21-hidroxilase baseada na atividade enzimática *in vitro*.



Fonte: Autora.

Tabela 2 – Fenótipo esperado na HAC-21OHD de acordo com a combinação de alterações patogênicas em diferentes alelos.

Combinação de alterações patogênicas	Fenótipo deduzido
Duas alterações graves	CL-PS
Uma alteração grave + uma alteração intermediária ou duas intermediárias	CL-VS
Uma alteração leve + uma alteração grave; ou uma alteração intermediária + uma alteração leve ou duas alterações leves	NC

Fonte: Autora.

A correlação genótipo-fenótipo vem sendo estudada extensivamente e geralmente é concordante (KRONE; ARLT, 2009; SPEISER et al., 1992; TUKEL et al., 2003), principalmente em indivíduos com a forma clássica da patologia (BACHELOT *et al.*, 2008; JENKINS-JONES *et al.*, 2018), onde ambos os alelos apresentam atividade enzimática nula ou <5% (HIGASHI *et al.*, 1986).

A alteração patogênica que apresenta variação fenotípica com mais frequência é a c.290-13A/C>G no íntron 2 que cria um sítio alternativo de *splicing* fazendo um deslocamento do quadro de leitura na tradução da proteína. Em pacientes homozigotos foram relatados tanto o fenótipo CL-VS como o CL-PS. Uma possível explicação é que a troca g.656A/C>G deixa o sítio normal de *splice* inalterado, portanto, portadores dessa alteração podem produzir também um mRNA processado corretamente, assim seria possível a síntese de uma pequena quantidade de enzima funcional, suficiente para manter a síntese de aldosterona e evitar a perda de sal (ROGAN; CAMINSKY; MUCAKI, 2014; WANG *et al.*, 2015).

2.5 Diagnóstico molecular

Os exames moleculares do gene *CYP21A2* são essenciais, pois permitem o estabelecimento de correlações entre genótipo e fenótipo, confirmando o diagnóstico clínico e bioquímico, permitindo um aconselhamento genético diferencial, individual e completo para os familiares. Os métodos de detecção de alterações patogênicas baseados na detecção por reação em cadeia da polimerase alelo específica (PCR-AE) e com

sequenciamento genômico são considerados padrão ouro na genotipagem do gene *CYP21A2*. Destacam-se pela sua eficiência, sensibilidade, baixo custo e acessibilidade, sendo capaz de fornecer uma resposta direta e concisa para a população.

O Laboratório de Genética Humana (LGMH) do Hospital Universitário Alberto Antunes (HUPAA), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) compõe, juntamente com o ambulatório DDS, o Serviço de Genética Clínica (SGC) que é referência estadual nos casos de DDS em Alagoas e oferecem o serviço de aconselhamento e diagnóstico genético com técnicas padronizadas, atendendo ao Sistema Único de Saúde (SUS) desde 2003 e que se estende até os dias atuais com o auxílio do PPSUS (Programa Pesquisa para o SUS).

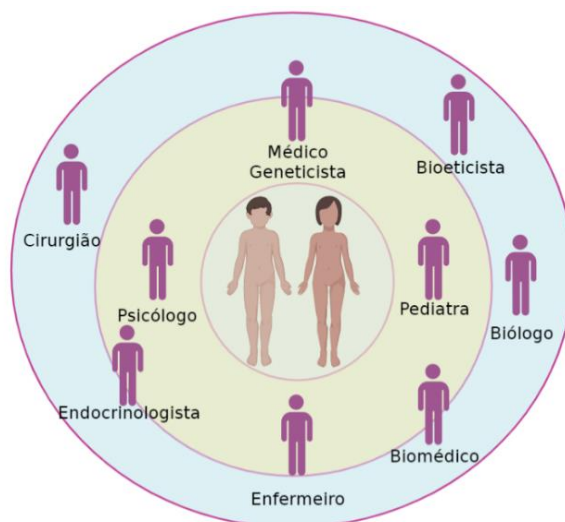
2.6 Importância da triagem neonatal e do diagnóstico molecular – a equipe multidisciplinar

A triagem neonatal foi desenvolvida pela primeira vez no final da década de 1970 (PANG et al., 1997). O método convencional utiliza imunoenaios para determinação dos níveis de 17OHP ao nascimento, precursor da enzima 21OH, em amostras de papel filtro com amostra de sangue seco. A HAC-21OHD foi incorporada ao Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) no Brasil em 2012 e implementada no Sistema Único de Saúde de Alagoas (SUS-AL) em 2016.

Esta incorporação tem por objetivo reduzir a morbidade e a mortalidade em recém-nascidos (RN) afetados com a forma CL-PS, principalmente em RN 46, XY antes que apresentem crises graves de perda de sal nas primeiras semanas de vida, uma vez que pela ausência de genitália ambígua o diagnóstico pode não ser feito ou realizado tardiamente. Essa triagem tem como base a determinação dos níveis de 17OHP ao nascimento, todavia, é importante ressaltar que, como todos os exames, este pode resultar em um falso positivo, fazendo-se imprescindível a coleta de sangue nas primeiras 48-72 horas de vida. O diagnóstico genético é uma ferramenta essencial para o diagnóstico e posterior tratamento das doenças monogênicas, caracterizadas pela correlação genótipo-fenótipo (DULÍN IÑIGUEZ; EZQUIETA ZUBICARAY, 2018). Esse trabalho dá continuidade à linha de pesquisa de diagnóstico molecular da HAC-21OHD, desenvolvida pela equipe multidisciplinar que compõe o grupo de pesquisa do LGMH/HUPAA/UFAL (Figura 11), e tem como objetivo padronizar o diagnóstico por sequenciamento completo do gene

CYP21A2 pelo método de Sanger para os casos não elucidados pela metodologia disponível.

Figura 11 – Equipe multidisciplinar de assistência aos casos de DDS do SGC/HUPPA/UFAL



Fonte: Autora.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o gene *CYP21A2* de pacientes diagnosticados clinicamente com HAC-21OHD provenientes do ambulatório de genética do HUPAA.

3.2 Objetivos específicos

- a. Investigar por PCR-AE ou por digestão com enzima de restrição 8 alterações frequentes derivadas do pseudogene *CYP21A1P* e uma alteração rara não proveniente deste;
- b. Identificar alterações patogênicas que possam esclarecer o fenótipo dos pacientes;
- c. Confirmar as alterações encontradas, verificando a correta segregação na família;
- d. Estabelecer a correlação fenótipo e genótipo;
- e. Padronizar o sequenciamento de Sanger do gene *CYP21A2* para futura investigação que possa esclarecer o fenótipo de pacientes que não apresentam alterações patogênicas investigadas por PCR-AE.

4. JUSTIFICATIVA

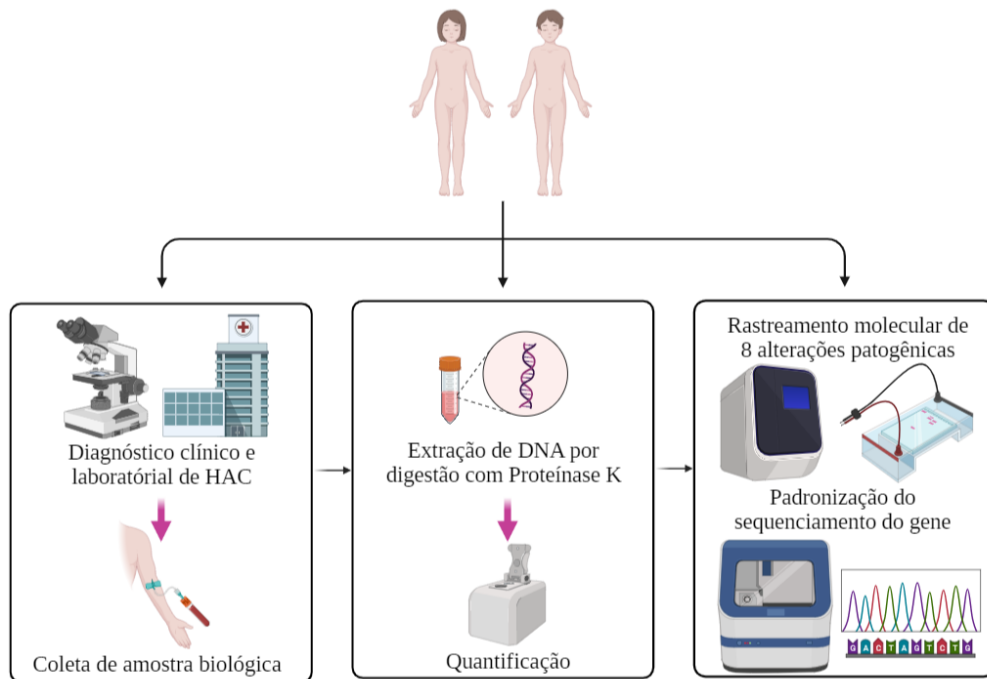
A triagem de alterações patogênicas frequentes por PCR-AE em busca do diagnóstico molecular para famílias com suspeita clínica/laboratorial de HAC-21OHD é de extrema importância no auxílio do diagnóstico médico e para um correto tratamento dos pacientes, além de proporcionar, de forma mais acurada, o aconselhamento genético e possibilitar os diagnósticos neo- e pré-natal, para as famílias envolvidas. Os DDS englobam um grupo de condições congênitas atípicas, sendo a HAC- 21OHD uma das desordens autossômicas recessivas mais frequentes.

Em alguns casos a triagem das alterações patogênicas frequentes por PCR-AE não esclarece o fenótipo, sendo necessária a investigação completa do gene *CYP21A2* por sequenciamento de Sanger em busca de outras alterações que possam justificar o fenótipo. A padronização desta técnica no LGMH/HUPAA/UFAL contribuiu significativamente para o estabelecimento do diagnóstico molecular e gerou, de uma maneira geral, resultados de excelente valor científico e para o esclarecimento das correlações genótipo-fenótipo.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização desse trabalho foram realizadas metodologias seguindo o fluxo adequado para melhorar o diagnóstico molecular dos pacientes (Figura 12).

Figura 12 – Resumo esquemático da metodologia utilizada nesse trabalho.



Created in **BioRender.com** **bio**

Fonte: Autora.

5.1 Local de estudo

Os experimentos foram realizados no LGMH/SGC/HUPAA/UFAL. A verba para a execução desse projeto é proveniente do projeto guarda-chuva aprovado pelo PPSUS-2020 edital FAPEAL no 06/2020 – processo 60030.0000000212/2021; CAPES/PPGCM.

5.2 Amostras de pacientes

O estudo conta com aprovação do CEP UFAL (Comitê de Ética em Pesquisa; CAAE: #010367/2009-29 e #19144013.5.000.5013). Foi realizado com amostras de DNA de 19 famílias com indivíduos com diagnóstico clínico/laboratorial de HAC-21OHD provenientes do SGC/HUPAA. Todos os pacientes são provenientes de cidades do estado de Alagoas.

Foram excluídos casos com material biológico insuficiente ou que não tinham condições de serem utilizados no trabalho.

5.3 Obtenção das amostras biológicas e extração de DNA de sangue total por digestão com proteinase K

Foram colhidos cerca de 10 mL de sangue total em EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) do indivíduo afetado e dos seus genitores para a obtenção do DNA genômico. Quando possível, também foram colhidas as amostras de irmãos e filhos. A metodologia de extração de DNA utilizada foi a de digestão por proteinase K, seguida de purificação fenólica, conforme SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989. O material genético obtido foi utilizado tanto para a realização da metodologia de PCR-AE quanto para o sequenciamento pelo método de Sanger.

5.4 PCR-AE e digestão por enzima de restrição

Após a quantificação de DNA das amostras, foram realizadas as PCR-AE, seguindo o protocolo já estabelecido e padronizado no LGMH/HUPAA/UFAL para a determinação da presença ou ausência das alterações patogênicas c.293-13A/C>G (rs6467); p.Gly111Valfs*21 (c.332_339del; rs387906510); p.Ile173As (c.518T>A; rs6475); p.Val282Leu (c.844G>T; rs6471) e p. Arg357Trp (c.1069C>T; rs7769409). Em todas as reações foram utilizados primers âncoras para correta seleção do gene *CYP21A2* descritos por WILSON et al., 1995, além disso, os primers específicos para a verificação da presença ou ausência da alteração patogênica investigada foram desenhados com o auxílio do programa *GENE RUNNER*© (versão 3.0) disponibilizado gratuitamente.

Foram investigadas por digestão com enzima de restrição uma alteração proveniente do pseudogene p.Gln319* (c.995C>T; rs7755898) e uma não proveniente deste p.Ser170fs* (c.511_512insA; rs1561499720). O protocolo de digestão está descrito na tabela 3.

TABELA 3 – Protocolo de Digestão por enzima de restrição *PstI*

Reagentes	[] 1X	Ciclo geral
H ₂ O deionizada.	q.s.p 30 µl	Banho maria a seco por 2 horas à 37°C
Tampão Invitrogen (10X)	1X	
Enzima <i>PstI</i>	1U	
Produto da PCR	9 µl	

5.5 PCR para posterior sequenciamento

A padronização da reação de sequenciamento completo do gene *CYP21A2* foi realizado em 4 fragmentos, utilizando *primers* âncoras para sua diferenciação do pseudogene e correta seleção do gene. A PCR foi padronizada a partir da tabela geral de condições de amplificação (Tabela 4).

TABELA 4 – Reagentes, condições de amplificação da Reação de PCR para posterior sequenciamento e ciclo utilizado para a amplificação.

Reagentes	[] Final	Ciclo geral
DNA genômico	1,0 – 2 µg	
Tampão Invitrogen (10X)	1X	
MgCl ₂ 50mM (Invitrogen)	1,5 mM	94°C ----- 5 minutos
dNTP 2nM (Invitrogen)	0,1 mM	30 ciclos de:
<i>Primer</i> direto 20 pmoles	0,67 pmoles	94°C ----- 1 minuto
<i>Primer</i> inverso 20 pmoles	0,67 pmoles	Tmédia do par de <i>primers</i> --- 1 minuto
Enzima <i>Taq DNA polymerase recombinant</i> (5U/µl, Invitrogen)	2,0 U	72°C ----- 10 minutos
		72°C ----- 2 minutos
H ₂ O deionizada.	q.s.p 60 uL	

5.6 Purificação do produto da PCR

Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados com o Kit *Wizard SV gel and PCR Clean-UP System* (Promega) seguindo o protocolo do fabricante. Após a purificação as amostras foram quantificadas utilizando 1µL do produto da purificação, com o auxílio do equipamento Nanodrop 8000 – *Multi-Sample Micro-Volume UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific, USA).

5.7 Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1 Ready Reaction* (ABI PRISM/Life Technologies, USA) seguindo as especificações da tabela 5.

TABELA 5 – Reagentes utilizados para reação de PCR utilizando *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing* e ciclo utilizados para a amplificação.

Reagentes	[] Final (µL)	Ciclo geral
Big Dye	1,0	96°C ----- 1 minutos
Amostra	2,0	35 ciclos de:
Tampão	1X	96°C ----- 15 segundos
<i>Primer</i>	1,0	50°C ----- 15 segundos
H ₂ O deionizada q.s.p.	q. s. p. 10 uL	60°C ----- 4 minutos
		4°C ----- ∞

O produto obtido foi purificado com o *Kit ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System Technical Manual* (Promega), segundo recomendações do fabricante. Posteriormente, o produto foi separado por eletroforese capilar no analisador de DNA automático (ABI3500).

5.8 Análise dos dados

Os resultados da PCR-AE foram analisados para se verificar a segregação das alterações encontradas nas famílias estudadas. O fenótipo esperado foi inferido pela alteração que determinou menor dano à atividade enzimática. As sequências obtidas na padronização do sequenciamento foram analisadas e comparadas com a sequência selvagem do gene *CYP21A2* disponível em bancos de dados de livre acesso (*Ensembl*; www.ensembl.org) com o auxílio dos programas *Chomas* e *CLC sequence viewer* ou outros programas de análise de sequências.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise molecular de alterações patogênicas por PCR-AE ou por digestão enzimática

A análise molecular do gene *CYP21A2* padronizada no LGMH/HUPAA/UFAL por PCR-AE conta com rastreamento de 8 alterações patogênicas mais frequentes derivadas do pseudogene *CYP21A1* e uma alteração rara não proveniente desse. Durante a execução desse trabalho, foi realizado o rastreamento de 7 dessas variações em 19 famílias de Alagoas com diagnóstico clínico e/ou bioquímico e HAC-21OHD. Os resultados obtidos para os indivíduos afetados pela patologia são apresentados na tabela 6. Por se tratar de uma linha de pesquisa

em andamento, os genótipos finais apresentados (tabela 6 e 7) foram definidos a partir da junção dos resultados obtidos nesse trabalho e dos dados obtidos previamente pelo nosso grupo de pesquisa e pela instituição parceira CBMEG/UNICAMP.

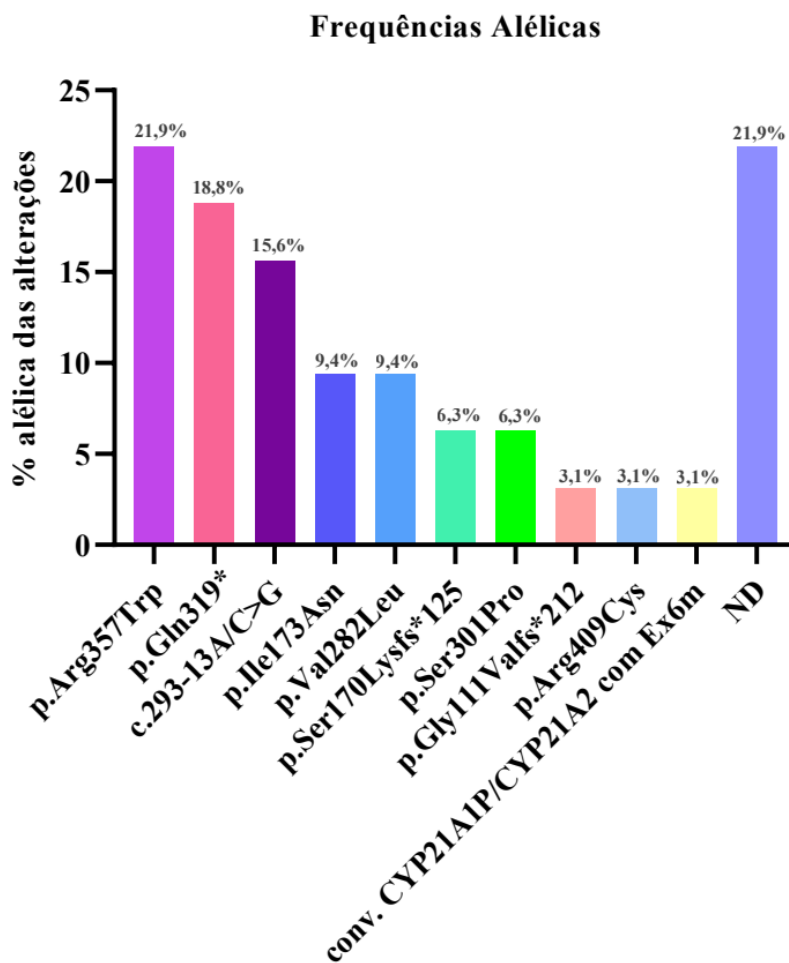
O rastreamento molecular de alterações patogênicas no gene *CYP21A2* é extremamente importante para a elucidação diagnóstica, haja vista o alto polimorfismo dessa região (CONCOLINO *et al.*, 2009). Sendo a PCR-AE a primeira escolha para este rastreamento em nosso laboratório, pois é uma técnica sensível, simples, rápida, barata e de fácil acesso (BAUMGARTNER-PARZER; WITSCH-BAUMGARTNER; HOEPFNER, 2020). Por meio dela, foi possível elucidar o diagnóstico de mais de 50% dos indivíduos afetados em nossa casuística.

Dos 16 indivíduos afetados, 9 (56,25%) tiveram seu genótipo esclarecido por PCR-AE, 7 (43,75%) precisaram prosseguir a investigação por sequenciamento completo do gene *CYP21A2* e por MLPA (do inglês *Multiplex ligation-dependent Probe Amplification*), quando se havia a suspeita de um gene híbrido. Destes 7, em 5 indivíduos (71,4%) uma alteração patogênica já tinha sido identificada por PCR-AE e 2 tiveram o seu genótipo esclarecido após a realização do sequenciamento completo e/ou MLPA na instituição parceira.

Outrossim, é importante salientar que estas 5 famílias continuam em investigação molecular. Isso se deve ao fato que as alterações que causam danos à atividade enzimática podem ser encontradas em diversas regiões do gene, *e.g.*, nos éxons, íntrons, nas regiões 5' UTR e 3'UTR (do inglês *untranslated region*) (ROBERT; PELLETIER, 2018). À vista disso, do alto número de alterações patogênicas e da ausência de um *hotspot* de alterações, o sequenciamento completo do gene se faz necessário.

A alteração patogênica mais frequentemente identificada foi a p.Arg357Trp (21,9%; rs7769409) (Figura 13). Essa alteração troca pontualmente o aminoácido arginina (Arg – CGG) por um triptofano W (Trp – TGG) sendo associada a forma CL-PS por resultar na perda completa da atividade enzimática (HAIDER *et al.*, 2013; KOR *et al.*, 2018; LAJIC *et al.*, 1997). Esta alteração *missense* está localizada no éxon 8 do gene *CYP21A2*, em uma região gênica que codifica a hélice K da enzima, sendo uma das alterações patogênicas mais comuns derivadas do pseudogene *CYP21A1P* (HAIDER *et al.*, 2013; LEVO; PARTANEN, 1997; PIGNATELLI *et al.*, 2019).

Figura 13 – Porcentagem alélica das alterações patogênicas identificadas no gene *CYP21A2* de 19 famílias com diagnóstico de HAC-21OHD confirmado por PCR-AE.



ND: alelo com alterações patogênicas não determinadas.

Tabela 6 – Resultados obtidos através da técnica de reação em cadeia da polimerase alelo específica (PCR-AE) ou digestão por enzima de restrição para o rastreamento de alterações patogênicas no gene *CYP21A2* em indivíduos diagnosticados com hiperplasia adrenal congênita (HAC) e o genótipo final de cada indivíduo.

COD (Afetados)	c.293-13A/C>G	p.Gly111Valfs*21	p.Ser170Lysfs*125	p.Ile173Asn	p.Val282Leu	p.Gln319*	p.Arg357Trp	Genótipo final⁺ (paterno/materno)
MC6Xa1 ^a	–	–	–	–	–	–	wt/ p.Arg357Trp	p.Arg409Cys ¹ / p.Gln319* ² +p.Arg357Trp conversão
MC8Xa1 ^b	–	wt/wt	–	–	–	–	–	<i>CYP21A1P/CYP21A2</i> com Ex6m ³ / c.293-13A/C>G ²
MC9Xa1	–	wt/wt	–	–	–	–	–	p.Gln319* ² +p.Arg357Trp ² / p.Arg357Trp ²
MC11Xa2	A/A	wt/wt	–	wt/wt	wt/wt	–	wt/wt	p.Ser301Pro ² / p.Ser301Pro ²
MC24Xa1 ^c	–	wt/wt	–	–	–	–	wt/wt	ND / ND
MC27Xa1 ^c	–	wt/p.Gly111Valfs*21	wt/wt	–	–	–	–	c.293-13A/C>G ² + p.Gly111Valfs*21+ p.Arg357Trp ² / ND
MC28Xa1	–	–	–	–	–	wt/wt	wt/wt	c.293-13A/C>G ² / c.293-13A/C>G ²
MC29Ya1 ^c	A/C	–	–	–	–	wt/wt	wt/wt	p.Ile173Asn ² / ND
MC30Pa	–	–	–	–	–	wt/wt	wt/wt	c.293-13A/C>G ² / p.Val282Leu ²
MC31Xa1	–	–	–	–	–	wt/wt	wt/p.Arg357Trp	p.Arg357Trp / p.Ile173Asn ²
MC32Ya1 ^c	–	–	–	–	–	wt/wt	wt/wt	p.Val282Leu ² / ND
MC33Ya1 ^c	–	–	–	–	–	wt/wt	wt/wt	ND / ND
MC34Ya1	–	–	–	–	–	p.Gln319*/p.Gln319*	wt/wt	p.Gln319*/p.Gln319* p.Val282Leu ² +p.Gln319* ² / p.Ser170Lysfs*125
MC37Ya1	–	wt/wt	wt/p.Ser170Lysfs*125	–	–	–	–	p.Gln319*+p.Arg357Trp / p.Ser170Lysfs*125
MC39Xa1	–	–	wt/p.Ser170Lysfs*125	–	–	wt/p.Gln319*	wt/p.Arg357Trp	p.Ser170Lysfs*125
MC40Ya1	–	–	–	–	–	wt/wt	wt/p.Arg357Trp	p.Arg357Trp / p.Ile173Asn ²

wt = *wild type*; ND = não determinado até o momento; † segregação alélica confirmada nos genitores; ^a genótipo esclarecido pela técnica PCR-AE e sequenciamento completo do gene *CYP21A2*; ^b genótipo esclarecido pela técnica PCR-AE, sequenciamento completo do gene *CYP21A2* e MLPA; ^c genótipo não esclarecido completamente pela técnica PCR-AE, indicação de sequenciamento completo do gene *CYP21A2*; ¹ Resultado obtido por sequenciamento de Sanger na instituição parceira CBMEG/UNICAMP; ² Resultado obtido previamente por PCR-AE no LGMH/HUPAA/UFAI; ³ Resultado obtido por MLPA na instituição parceira CBMEG/UNICAMP.

A segunda alteração patogênica mais frequente nesta casuística foi a p.Gln319* (18,8%; rs7755898), variação nucleotídica no éxon 8, *nonsense*, que causa um *stop códon* prematuro no resíduo 319 e interrompe precocemente a tradução da proteína (EZQUIETA *et al.*, 2002). E a terceira alteração patogênica mais frequente foi a c.293-13A/C>G (15,6%; rs6467), popularmente conhecida por *splice G*, no íntron 2, que cria um sítio alternativo de *splicing* fazendo um deslocamento do quadro de leitura na tradução proteica (KRONE *et al.*, 2000; KRONE; ARLT, 2009). Essas três alterações juntas representam 56,3% das alterações patogênicas identificadas nessa casuística.

Foi possível deduzir o fenótipo esperado para os 12 indivíduos afetados cujo genótipo foi estabelecido (Tabela 7). Para isto foi verificada a qual forma da HAC cada alteração patogênica estava associada e o fenótipo foi deduzido a partir daquela que determinava menor dano enzimático. O fenótipo observado foi verificado no prontuário de cada indivíduo, permitindo assim estabelecermos a relação fenótipo-genótipo, que foi correta para 66,7% dos indivíduos. Apesar da relação genótipo-fenótipo ser geralmente concordante na maioria dos trabalhos, a distinção entre as formas CL-PS, CL-VS e NC não é absoluta, pois vários afetados não se enquadram neste padrão (KRONE *et al.*, 2000; NIMKARN *et al.*, 2016; SPEISER, P. W. *et al.*, 1992).

O indivíduo MC8Xa1, como falado anteriormente, possui a variação c.293-13A/C>G, levando a um deslocamento do quadro de leitura na tradução proteica, sendo esperado o fenótipo PS no indivíduo, mas encontrado o fenótipo VS.

O indivíduo MC32Ya1 não teve o seu genótipo completamente elucidado, visto que, encontramos apenas a alteração p.Val282Leu (**rs6471**), a qual é uma variante *missense*, resultando em uma enzima com atividade residual de cerca de 50% frente a 17OHP e de 20% frente a progesterona, sendo associada à forma NC (TUSIE-LUNA; TRAKTMAN; WHITE, 1990). Com isso, deduzimos que o fenótipo esperado deveria ser NC, entretanto seu fenótipo observado é VS. É importante considerar que existe a possibilidade do indivíduo possuir mais de uma alteração no mesmo alelo (alteração em *cis*) (ROBERT; PELLETIER, 2018), como observado em outros 5 indivíduos analisados (Tabela 7), sendo um com uma combinação das alterações p.Val282Leu+p.Gln319*. Esta possibilidade pode justificar essa não correlação entre o genótipo-fenótipo, sendo assim o fenótipo esperado deve ser reanalisado após a conclusão do genótipo deste indivíduo.

Tabela 7 – Correlação genótipo-fenótipo dos indivíduos diagnosticados com hiperplasia adrenal congênita (HAC) investigados.

COD (Afetados)	Genótipo final[†] (paterno/materno)	Genótipo esperado	Genótipo observado
MC6Xa1 ^a	p.Arg409Cys ¹ / p.Gln319* ² +p.Arg357Trp	PS	VS
MC8Xa1 ^b	conv. <i>CYP21A1P/CYP21A2</i> com Ex6m ³ / c.293-13A/C>G ²	PS	VS
MC9Xa1	p.Gln319* ² +p.Arg357Trp ² / p.Arg357Trp ²	PS	PS
MC11Xa2	p.Ser301Pro ² / p.Ser301Pro ²	PS	PS
MC24Xa1 ^c	? / ?	?	VS
MC27Xa1 ^c	c.293-13A/C>G ² + p.Gly111Valfs*21 ² + p.Arg357Trp ² / ?	?	VS
MC28Xa1	c.293-13A/C>G ² / c.293-13A/C>G ²	PS	PS
MC29Ya1 ^c	p.Ile173Asn ² / ?	?	VS
MC30P	c.293-13A/C>G ² / p.Val282Leu ²	NC	NC
MC31Xa1	p.Arg357Trp/p.Ile173Asn ²	VS	PS
MC32Ya1 ^c	p.Val282Leu ² / ?	NC	VS
MC33Ya1 ^c	? / ?	?	VS
MC34Ya1	p.Gln319*/p.Gln319*	PS	PS
MC37Ya1	p.Val282Leu ² +p.Gln319* ² / p.Ser170Lysfs*125	PS	PS
MC39Xa1	p.Gln319*+p.Arg357Trp / p.Ser170Lysfs*125	PS	PS
MC40Ya1	p.Arg357Trp / p.Ile173Asn ²	VS	VS

[†] Segregação alélica confirmada nos genitores; ^a genótipo esclarecido pela técnica PCR-AE e sequenciamento completo do gene *CYP21A2*; ^b genótipo esclarecido pela técnica PCR-AE, sequenciamento completo do gene *CYP21A2* e MLPA; ^c genótipo não esclarecido completamente pela técnica PCR-AE, indicação de sequenciamento completo do gene *CYP21A2*; ¹ Resultado obtido por sequenciamento de Sanger na instituição parceira CBMEG/UNICAMP; ² Resultado obtido previamente por PCR-AE no LGMH/HUPAA/UFAL; ³ Resultado obtido por MLPA na instituição parceira CBMEG/UNICAMP.

Já para a não correlação genótipo-fenótipo identificada para os indivíduos MC6Xa1 e MC31Xa1 deve-se lembrar a diferença fenotípica entre a HAC CL-PS e a CL-VS que se dá pela diferença da atividade enzimática frente a enzima 17OHP e a progesterona, que a taxa de síntese de aldosterona se encontra entre 100 à 1000 vezes menor que a taxa de síntese de cortisol, evitando, assim, a perda de sal. Devemos levar sempre em consideração que mesmo que a doença tenha um padrão de herança autossômico recessivo (FALHAMMAR *et al.*, 2022), o *background* genético de cada indivíduo difere e possui suas peculiaridades, o que pode influenciar indiretamente na produção dos hormônios envolvidos na HAC-21OHD (KRONE; ARLT, 2009).

Por se tratar de uma patologia com o padrão de herança autossômico recessivo (FALHAMMAR *et al.*, 2022) é importante se confirmar a segregação encontrada nos

indivíduos afetados, para que se tenha uma melhor elucidação diagnóstica. Com isso, genitores e filhos saudáveis também entraram para o rastreamento molecular das alterações patogênicas que podem causar a HAC-21OHD e seus fenótipos (Tabela 8).

Ainda que o LGMH conte com um analisador de DNA (ABI3500) que possibilita o sequenciamento do gene completo do gene *CYP21A2* pelo método de Sanger, essa técnica não estava padronizada. Em vista disso, visando possíveis identificações das alterações patogênicas que possam justificar o fenótipo dos nossos pacientes que não obtiveram seu diagnóstico molecular elucidado pela técnica de PCR-AE, a padronização dessa técnica foi um dos objetivos desse trabalho.

Tabela 8. Resultados obtidos através da técnica de reação em cadeia da polimerase alelo específica (PCR-AE) ou digestão por enzima de restrição para o rastreamento de alterações patogênicas no gene *CYP21A2* em genitores e filhos saudáveis de indivíduos diagnosticados com hiperplasia adrenal congênita (HAC) e o genótipo final de cada indivíduo.

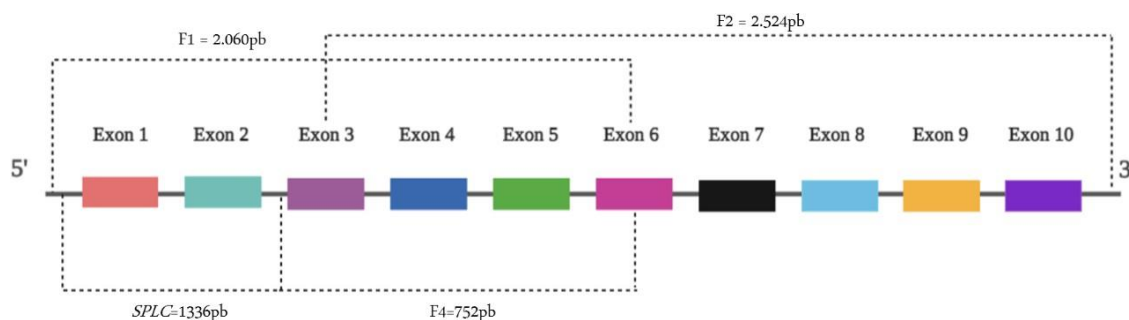
COD (Genitores)	c.293-13A/C>G	p.Gly111Valfs*21	p.Ser170Lysfs*125	p.Gln319*	p.Arg357Trp	Genótipo final [†]
MC8P ^a	-	wt/wt	-	-	-	conv. <i>CYP21A1P/CYP21A2</i> com Ex6m ¹ / wt
MC8M	-	wt/wt	-	-	-	c.290-13A/C>G ² / wt
MC9P	-	wt/wt	-	-	-	p.Gln319* ² +p.Arg357Trp ² / wt
MC12M	C/G	-	-	-	-	c.290-13A/C>G / wt
MC15P	-	-	-	-	wt/wt	wt / wt
MC16M	-	wt/wt	-	wt/wt	-	p.Ser170Lysfs*125 ² / wt
MC22M	A/A	wt/wt	-	-	-	p.Val281Leu ² / wt
MC24M ^b	-	wt/wt	-	wt/wt	wt/wt	wt / ND
MC25P	-	-	-	-	wt/wt	p.Ser170Lysfs*125 ² / wt
MC27M ^b	-	wt/wt	-	-	wt/wt	wt / ND
MC27P	-	-	-	-	wt/p.Arg357Trp	c.293-13A/C>G ² + p.Gly111Valfs*21 ² + p.Arg357Trp / wt
MC28P	-	wt/wt	-	wt/wt	wt/wt	c.290-13A/C>G ² / wt
MC28M	-	wt/wt	-	wt/wt	wt/wt	c.290-13A/C>G ² / wt
MC30Yn1	-	-	wt/wt	-	-	p.Val281Leu ² / wt
MC30M	-	-	-	wt/wt	wt/wt	wt / ND
MC31P	A/A	wt/wt	-	wt/wt	wt/p.Arg357Trp	p.Arg356Trp / wt
MC31M	-	-	-	wt/wt	wt/wt	p.Ile172Asn ² / wt
MC32M	-	-	-	wt/wt	wt/wt	p.Val281Leu ² / wt
MC33P ^b	-	-	-	wt/wt	wt/wt	wt / ND
MC33M ^b	-	-	-	wt/wt	wt/wt	wt / ND
MC34M	-	-	-	wt/p.Gln319*	wt/wt	p.Gln319* / wt
MC34P ^b	-	-	-	-	wt/#	p.Gln319* / wt
MC35P ^b	-	wt/wt	-	-	wt/wt	wt / ND
MC38P ^b	-	wt/wt	-	wt/wt	wt/wt	wt / ND
MC39P	-	wt/wt	-	wt/p.Gln319*	wt/p.Arg357Trp	p.Gln319*+p.Arg356Trp / wt
MC39M	-	-	-	wt/wt	wt/wt	p.Ser170Lysfs*124 ² / wt
MC40M	-	-	-	wt/wt	wt/wt	p.Ile172Asn ² / wt

wt = wild type; [†] segregação alélica confirmada na prole; ^a genótipo esclarecido pela técnica PCR-AE, sequenciamento completo do gene *CYP21A2* e MLPA; ^b genótipo não esclarecido completamente pela técnica PCR-AE, indicação de sequenciamento completo do gene *CYP21A2*; ¹ Resultado obtido por MLPA na instituição parceira CBMEG/UNICAMP. ² Resultado obtido previamente por PCR-AE no LGMH/HUPAA – UFAL;

6.2 Padronização do sequenciamento completo do gene *CYP21A2* pela técnica de Sanger

Como relatado anteriormente, devido à grande homologia entre gene e pseudogene, o sequenciamento gênico completo é uma tarefa difícil. Com isso, para a padronização, foi necessário realizar uma divisão do gene *CYP21A2* em dois fragmentos (1 e 2) (Figura 14), se baseando em dois métodos descritos na literatura.

Figura 14 – Fragmentação seletiva do gene *CYP21A2*.



Indivíduos que possuem *splice C* possuem também uma amplificação não preferencial. Por esse motivo foi selecionado mais 2 fragmentos para análise deste alelo (*splice C [SPLC]* e fragmento 4 [F4]).

A primeira metodologia para seleção do gene foi descrita por Owerbach et al., (1990), baseando-se na presença de uma variação *frameshift* com deleção de 8 pares de bases no éxon 3 do gene (p.Gly111Valfs*; rs387906510) que impede a síntese proteica e pode causar o fenótipo CL-PS. A segunda, descrita por Wilson et al., (1995), teve como referência a troca de 3 nucleotídeos no éxon 6, onde ocorre a maioria das trocas entre gene e pseudogene, muito conhecida como *cluter 6* (p.Ile237Asn; Val238Glu; Met240Lys), que abole a atividade enzimática da 21OH, sendo geralmente associada ao fenótipo CL-PS (MARTÍNEZ-ARIAS et al., 2001; NIMKARN et al., 2016). Logo, *primers* âncoras, ou seja, específicos para essas regiões, são capazes de amplificar seletivamente o nosso gene de interesse. Foram desenhados e utilizados *primers* descritos na tabela 8, para a cobertura total do *CYP21A2*.

Devido à amplificação não preferencial do alelo com *splice* (c.293-13C) na amplificação do fragmento 1, foi necessário dividir esta região em mais duas amplificações que se selecionassem especificamente o alelo com *splice C* para os indivíduos que o possuem. Estes fragmentos (*Splice C e F4*) estão ilustrados na figura 13 e os respectivos *primers* utilizados na tabela 9.

Tabela 9 – Sequência de primers utilizados para cada fragmento e o amplicon de cadafragmento para seleção completa do gene *CYP21A2*.

Fragmento	pb ⁴	Primer ⁵	5'→3'	T _m (°C)
1	2.060pb	5'21B1s	TGA GTG AGT GCG CAC AAA G	52,0
		5'Bas	GGC CCT GAG GTG CCA CTT A	56,0
		Int1s	TGA GAG GCT GAT CTC GCT C	53,0
		Ex2as	TAA GTG GCT CAG GTC TGC C	53,0
		Ex6nas	CCT CAG CTG CAT CTC CAC GA	57,0
2	2.524pb	Ex3ns	CGG ACC TGT CCT TGG GAG ACT AC	59,0
		Int7as	CAG AGC TGA GTG AGG GTG	51,0
		Ex9As	TTG GGG ATG AGT GAG GAA AG	51,0
		Ex9Bas	ACC CAC CTG TCC ACC CGC C	60,0
		Ex10s	GGA GCT CTT CGT GGT GTG CTG A	53,5
		Int10as	CAG AGG GAG CT GGA GTT GA	62,0
Splice C	1336pb	ProEx1s	TTG AGT GAG TGC CCA CAA AGC	56
		5'Bas	GGC CCT GAG GTG CCA CTT A	56,0
		Int1s	TGA GAG GCT GAT CTC GCT C	53,0
		Ex2as	TAA GTG GCT CAG GTC TGC C	53,0
		Int2Cas	CAG CTT GTC TGC AGG AGG AGG	57,0
		ProEx1s	TTG AGT GAG TGC CCA CAA AGC	56
4	762pb	5'Bas	GGC CCT GAG GTG CCA CTT A	56,0
		Int2Cs	TTC CCA CCC TCC AGC CCC CAC	62,0
		Ex6nas	CCT CAG CTG CAT CTC CAC GA	57,0
		Ex2ns	TCT CCT CAC CTG CAG CAT CAT	55,0

⁴Quantidade de pares de base do fragmento (*Amplicon*); ⁵s = *sense* ou *forward* e as = *antisense* ou *reverse*;

⁶T_m = temperatura de *melting* do *primer*.

Sendo assim, os fragmentos 1, 2, *splice C* e 4 (F1, F2, *SPLC* e F4), serviram como molde para a realização e padronização do sequenciamento direto.

6.2.1 Padronização da PCR e do sequenciamento do fragmento 1 (F1) do gene *CYP21A2*

O fragmento 1 do gene tem um *amplicon* de 2.060 pares de bases (pb) e vai a extremidade 5'UTR, até o meio do éxon 6. Para a padronização desse fragmento foram utilizados os oligonucleotídeos CYP21A2_5'21B1s e CYP21A2_EX6nas (âncora), que seleciona corretamente o gene *CYP21A2*. Devido a grande quantidade de pares de base do *amplicon* foi utilizada a *Taq DNA Polymerase* específica para fragmentos de DNA maiores (*Patinum Taq DNA Polymerase*, Brasil, ThermoFisher™, Cat. N°10966-030). As condições de amplificação da PCR que se demonstraram ideais para esta reação estão descritas na tabela 10.

Tabela 10 – Volume unitário e ciclo de reação de cada reagente utilizado na PCR-AE para a correta seleção do F1 do gene *CYP21A2*.

Reagentes	Valor unitário	Ciclo
Água	q. s. p. 60 µL	95°C-----5'
Tampão (10X)	1X	95°C-----30''
MgCl ₂ (50 mM)	1,17 mM	60°C ^A -----40''
dNTP (2 nM)	0,17 nM	72°C-----2'
Primer (20pmoles)	0,67 pmoles	95°C-----30''
Primer (20pmoles)	0,67 pmoles	52°C-----40''
BSA 1%	–	72°C-----2'
DMSO	1,5	15°C-----∞
Taq.DNA Polimerase (5U)	0,033 U	

A reação de sequenciamento foi realizada as condições descritas na tabela 5. Devido ao grande tamanho do *amplicon*, além dos *primers* externos 5'21B1s e Ex6nas utilizados para amplificação do fragmento, foram utilizados também os *primers* internos 5'Bas, Int1s e Ex2as. As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com as sequências selvagens do gene e pseudogene com o auxílio dos programas *Chromas*® e *CLC sequence viewer*® e estão apresentados na tabela 11.

O fragmento 2 (F2) do gene, tem o *amplicon* de 2.524pb e vai do meio do éxon 3 até o a região 3'UTR do gene. Para a padronização desse fragmento foi realizada a mesma metodologia do F1, sendo utilizados os oliconucleotídeos CYP21A2_Ex3ns (âncora) e CYP21A2_Int10as. O ciclo e as condições ideais da reação F2 estão descritos na tabela 11.

Tabela 11 – Volume unitário e ciclo de reação de cada reagente utilizado na PCR-AE para a correta seleção do F2 do gene *CYP21A2*.

Reagentes	Valor unitário	Ciclo
Água	q. s. p. 60 µL	95°C-----5'
Tampão (10X)	1X	95°C-----30''
MgCl ₂ (50 mM)	1,41 mM	63°C-----40''
dNTP (2 nM)	0,17 nM	72°C-----2'
Primer (20pmoles)	0,67 pmoles	95°C-----30''
Primer (20pmoles)	0,67 pmoles	55°C-----40''
BSA 1%	–	72°C-----2'
DMSO	1,5	15°C-----∞
Taq.DNA Polimerase (5U)	0,033 U	

Após a amplificação do F2, os produtos foram purificados e quantificados como descrito anteriormente. Para a realização do sequenciamento do F2 foram utilizados os primers internos Int7as, Ex9As, Ex9Bas e Ex10s descritos na tabela 9.

Para a padronização do F1 e F2 foi eleito um casal cujo filho veio a óbito antes do resultado do teste do pezinho, apresentando resultado positivo para HAC-21OHD; e que apresentava uma necessidade de se oferecer um aconselhamento genético com maior precisão e acurácia. Tendo em vista que o casal não possui o alelo *splice C*, o sequenciamento completo foi obtido a partir das amplificações do F1 e F2. Com isso, após a padronização do sequenciamento completo do indivíduo MC38P, o DNA da mãe (indivíduo MC38M) foi inserido na investigação, até o momento foi analisada por sequenciamento a região do F2 que cobre do meio do éxon 3 até a região 3'UTR do gene. Os resultados obtidos do MC38P e MC38M estão nas tabelas 12 e 13.

Tabela 12 – Variantes encontradas em heterozigose no indivíduo MC38P durante o sequenciamento completo do gene *CYP21A2*.

Variante	Tipo	Localização	Significado clínico	Proteína	Nucleotídeo	MAF ⁷
rs283816 41	Deleção	Éxon 1	Não reportado	–	–	0.25
rs6468	Sinônima	Éxon 1	Benigna	p.Leu40=	c.118C>T	0.29
rs6464	Sinônima	Éxon 1	Benigna	p.Pro46=	c.138C>A	0.37
rs6462	SNV [#]	Íntron 2	Benigna	–	c.292+9C>T	0.45
rs6463	SNV [#]	Íntron 2	Não reportado	–	–	0.22
rs6449	SNV [#]	Íntron 2	Não reportado	–	–	0.39
rs6474	<i>Splice</i>	Éxon 3	Benigna	p.Arg103Lys	c.308G>A	0.48
rs775589 8	<i>Stop codon</i>	Éxon 8	Patogênica	p.Gln319*	–	0.05
rs397509 367	Indel	Éxon 10	Patogênica	Arg484Profs*58	c.1451_1452 delinsC	–
rs6446	Sinônima	Éxon 10	Benigna	p.Pro491=	c.1473G>A	<0.01
rs6473	<i>Missense</i>	Éxon 10	Benigna	p.Ser494Asn	c.1481G>A	0.03

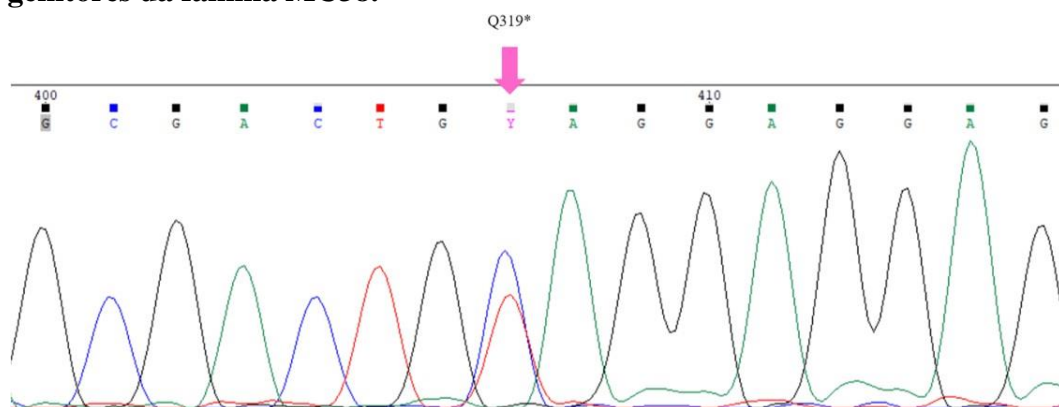
[#]single nucleotide variant; ⁷ = Minor allele frequency

Tabela 13 – Variantes encontradas em heterozigose no indivíduo MC38M durante o sequenciamento do éxon 3 até a região 3’UTR do gene *CYP21A2*.

Variante	Tipo	Localização	Significado clínico	Proteína	Nucleotídeo	MAF ⁷
rs6465	Intronica	–	Não reportado	–	–	0.31
rs6477	Sinônima	Éxon 8	Benigna	p.Leu249=	c.747C>G	0.35
rs7755898	<i>Stop códon</i>	Éxon 8	Patogênica	p.Gln319*	–	0.05
rs397509367	Indel	Éxon 10	Patogênica	Arg484Profs*58	c.1451_1452delinsC	–
rs6446	Sinônima	Éxon 10	Benigna	p.Pro491=	c.1473G>A	<0.01
rs6473	<i>Missense</i>	Éxon 10	Benigna	p.Ser494Asn	c.1481G>A	0.03

A variante patogênica p.Gln319* *CYP21A2* foi identificada em ambos os genitores. Essa alteração sem sentido no códon 319, onde a trinca CAG (codificaglutamina) muda para TAG, que resulta em uma enzima não funcional devido ao término prematuro da tradução proteica (ARRIBA; EZQUIETA, 2022; DULÍN IÑIGUEZ; EZQUIETA ZUBICARAY, 2018). O eletroferograma que indica essa variante em heterozigose em ambos os genitores está sendo mostrado na figura 15.

Figura 15 – Alteração patogênica p.Gln319* identificada em heterozigose em ambos os genitores da família MC38.

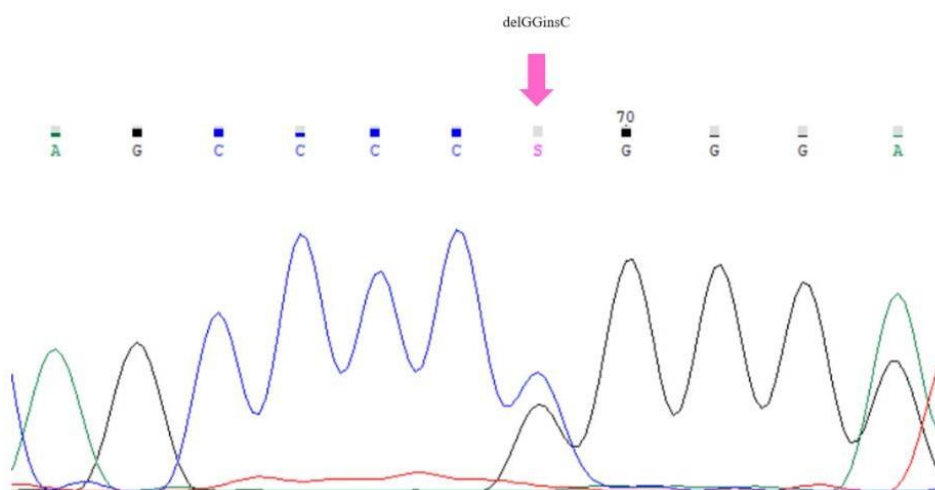


A seta rosa está evidenciando a alteração encontrada no eletroferograma do gene *CYP21A2* da família MC38.

Além dessa alteração, foi identificada a variante p.Arg484Profs*58 considerada rara e sem descrição na nossa população (Figura 16). Essa alteração patogênica foi descrita pela

primeira vez em 1992 (WEDELL *et al.*, 1992), em associação com a alteração p.Gln319*. As bases 2675-676 (GG) que fazem parte da trinca codificante da arginina 319 no éxon 10, são substituídas por uma citosina (alteração *delins*), causando uma mudança no quadro de leitura da proteínas e um *stop códon* após 45 aminoácidos (WANG; ZOU; YANG, 2021; WEDELL *et al.*, 1992). Uma vez que não possuíamos o material biológico do filho afetado do casal, foi deduzido que este possuía o genótipo p.Gln319*+p.Arg484fs*58 / p.Gln319*+p.Arg484fs*58 que resultaria em um fenótipo CL-PS e assim, a completa inatividade enzimática, levando ao falecimento precoce do indivíduo pois não foi levantada a suspeita clínica e tratamento a tempo.

Figura 16 – Alteração patogênica p.Arg484Profs*58 em heterozigose encontrada em ambos os genitores da família MC38.



A seta rosa está evidenciando a alteração encontrada no eletroferograma do gene *CYP21A2* da família MC38.

Na região analisada de ambos os genitores foi possível observar a presença dos mesmos polimorfismos e alterações patogênicas. Foi determinado o genótipo final de ambos os genitores como: p.Gln319* + p.Arg484Profs*58/ *wild type*. Esse resultado nos leva a suspeitar de uma possível consanguinidade na família. No prontuário médico o casal nega a união consanguínea, infere-se que os mesmos não tenham conhecimento da situação, haja vista que este um fator de risco na ocorrência de doenças autossômicas recessivas (BEN-OMRAN *et al.*, 2020; HAMAMY, 2012).

Portanto o provável genótipo do filho falecido era p.Gln319*+p.Arg484Profs*58/ p.Gln319*+p.Arg484Profs*58, correspondendo a um fenótipo CL-PS.

6.2.2 Padronização do PCR e do sequenciamento do fragmento 2 (F2) do gene *CYP21A2*

Como descrito anteriormente há uma amplificação não preferencial do alelo c.293-13C. Para solucionar isso uma amplificação alelo específica foi realizada. A primeira região recebeu a denominação de *splice c* (SPLC) e tem o *amplicon* de 1.336pb, que cobre da região 5'UTR próxima ao éxon 1 até a região do splice C no íntron 2 do *CYP21A2*. Para a padronização desse fragmento foi realizada a mesma metodologia descrita anteriormente, sendo utilizados os oliconucleotídeos CYP21A2_ProEx1s e CYP21A2_Int2Cas (âncora). O ciclo e as condições ideais da reação SPLC estão descritos na tabela 14.

Tabela 14 – Volume unitário e ciclo de reação de cada reagente utilizado na PCR-AE para a correta seleção do SPLC do gene *CYP21A2*.

Reagentes	Valor unitário (µL)	Ciclo
Água	q.s.p 30 µL	
Tampão (10X)	1X	
MgCl ² (50 mM)	0,15 nM	95°C ----- 5'
dNTP (2 nM)	0,15 nM	95°C ----1'
<i>Primer</i> (20pmoles)	0,67 pmoles	61,5°C----1'
<i>Primer</i> (20pmoles)	0,67 pmoles	72°C-----2'
BSA 1%	-	72°C ----5'
DMSO	0,3	15°C-----∞
<i>Taq. DNA Polimerase (5U)</i>	0,033 U	
DNA	200-500 ng	

Após a amplificação do produto da PCR-AE, o produto foi purificado e quantificado como descrito anteriormente. Para a realização do sequenciamento de SPLC foram utilizados os primers descritos na tabela 9.

6.2.3 Padronização do PCR e do sequenciamento do fragmento *splice C* (SPLC) do gene *CYP21A2*

Diferentemente dos outros fragmentos, o fragmento 4 (F4) possui um *amplicon* menor que 1.000pb (762pb), contudo, ele amplificou nas mesmas condições dos fragmentos anteriores, com a utilização da *Taq Platinum, Brasil* utilizando os oliconucleotídeos CYP21A2_Ex6nas (âncora) e CYP21A2_Int2Cs para a seleção da região. O ciclo e as condições ideais da reação F4 estão descritos na tabela 15.

Tabela 15 – Volume unitário e ciclo de reação de cada reagente utilizado na PCR-AE para a correta seleção do F2 do gene *CYP21A2*.

Reagentes	Valor unitário (µL)	Ciclo
Água	q.s.p 30 µL	
Tampão (10X)	1X	
MgCl ² (50 mM)	1,17 mM	94°C ----- 5'
dNTP (2 nM)	0,17 nM	94°C -----1'30''
Primer (20pmoles)	0,67 pmoles	67°C-----1'
Primer (20pmoles)	0,67 pmoles	72°C-----2'30''
BSA 1%	0,3	72°C-----5' } 18x
DMSO	–	15°C-----∞
Taq. DNA Polimerase (5U)	0,5	
DNA (200-500 ng)	1	

Após a amplificação, o F4 foi levado para a quantificação e posteriormente para o sequenciamento. Diferentemente dos outros fragmentos, conseguimos apenas uma leitura parcial do F4. Novas tentativas para a completa padronização estão em andamento.

Para a padronização do sequenciamento dos fragmentos SPLC e F4 foi utilizado a amostra de DNA do indivíduo MC34P, que sabidamente possui o polimorfismo c.293-13C em heterozigose (c.293-13A / c.293-13C). As variantes encontradas no indivíduo MC34P estão descritas na tabela 16.

Tabela 16 – Variantes encontradas no indivíduo MC34P durante o sequenciamento do fragmento SPLC e do F4.

⁷ = Minor allele frequency

Variante	Tipo	Localização	Significado clínico	Proteína	Nucleotídeo	MAF ⁷
rs6454	Missense	Íntron 5	Não reportado	–	–	
rs6475	Missense	Éxon 5	Patogênica	p.Ile173Asn	c.518T>A	0.01
rs1040311	Splice	Éxon 5	Benigna			0.12
rs12525076	Non coding	Íntron 5	Benigna	c.651+35A>G		0.02

Mesmo com a padronização parcial do fragmento 4, a padronização dessa técnica no LGMH/HUPPA/UFAL será de extrema importância para elucidação de casos futuros de HAC-21OHD cujo genótipo não seja elucidado por PCR-AE.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A investigação molecular pela técnica de PCR-AE e/ou enzima de restrição se mostrou elucidativa para mais de 50% dos pacientes.
- Através da técnica de PCR-AE foi possível confirmar a segregação das alterações identificadas nos filhos afetados.
- O sequenciamento completo do gene *CYP21A2* foi padronizado no LGMH/HUPAA/UFAL para indivíduos que não possuam a variação c.293-13C.
- Para indivíduos que possuem a variação c.293-13C no gene *CYP21A2* a padronização está em andamento e perto de ser concluída.
- A técnica de sequenciamento de Sanger está disponível para o rastreamento de alterações que possam justificar o fenótipo de indivíduos com HAC-21OHD cujo genótipo não tenha sido completamente elucidado por PCR-AE.
- O presente trabalho, em conjunto de estudos futuros, permitirá a completa elucidação do diagnóstico molecular dos pacientes com HAC-21OHD do estado de Alagoas atendidos no SGC/HUPAA/UFAL.

8. REFERÊNCIAS

- A, A. P.; KRISHAN, K. Embryology, Sexual Development. **StatPearls**, 8 maio 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557601/>>. Acesso em: 15 jul. 2022.
- AGRAWAL, R.; WESSELY, O.; ANAND, A.; SINGH, L.; AGGARWAL, R. K. Male-specific expression of Sox9 during gonad development of crocodile and mouse is mediated by alternative splicing of its proline-glutamine-alanine rich domain. **The FEBS journal**, v. 276, n. 15, p. 4184–4196, ago. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19594829/>>. Acesso em: 15 jul. 2022.
- ARBOLEDA, V.; VILAIN, E. Disorders of Sex Development. **Genetic Diagnosis of Endocrine Disorders**, p. 259–278, 1 jan. 2016. . Acesso em: 7 out. 2022.
- ARRIBA, M.; EZQUIETA, B. Molecular Diagnosis of Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: A Practical Approach. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, 29 mar. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3901848/>>. Acesso em: 14 jul. 2022.
- BABBAR, P.; SHAH, A.; ABELSON, B.; RHEE, A. C. Disorders of Sexual Development. *Em: Comprehensive Care of the Transgender Patient*. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 25–33.
- BACHELOT, A.; CHAKTHOURA, Z.; ROUXEL, A.; DULON, J.; TOURAINÉ, P. Classical Forms of Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency in Adults. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 69, n. 4, p. 203–211, 2008. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/113020>>. Acesso em: 4 nov. 2022.
- BAUMGARTNER-PARZER, S.; WITSCH-BAUMGARTNER, M.; HOEPPNER, W. EMQN best practice guidelines for molecular genetic testing and reporting of 21-hydroxylase deficiency. **European Journal of Human Genetics**, v. 28, n. 10, p. 1341–1367, 1 out. 2020.
- BEN-OMRAN, T.; AL GHANIM, K.; YAVARNA, T.; EL AKOUM, M.; SAMARA, M.; CHANDRA, P.; AL-DEWIK, N. Effects of consanguinity in a cohort of subjects with certain genetic disorders in Qatar. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 8, n. 1, 1 jan. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/328246/>>. Acesso em: 6 dez. 2022.
- BERGLUND, A.; JOHANNSEN, T. H.; STOCHHOLM, K.; VIUFF, M. H.; FEDDER, J.; MAIN, K. M.; GRAVHOLT, C. H. Incidence, prevalence, diagnostic delay, and clinical presentation of female 46, XY disorders of sex development. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 101, n. 12, p. 4532–4540, 1 dez. 2016.
- BERTA, P.; HAWKINS, J. B.; SINCLAIR, A. H.; TAYLOR, A.; GRIFFITHS, B. L.; GOODFELLOW, P. N.; FELLOUS, M. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. **Nature**, v. 348, n. 6300, p. 448–450, 1990. . Acesso em: 30 jul. 2022.

BIASON-LAUBER, A. WNT4, RSPO1, and FOXL2 in sex development. **Seminars in reproductive medicine**, v. 30, n. 5, p. 387–395, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23044875/>>. Acesso em: 15 jul. 2022.

BIASON-LAUBER, A. The Battle of the Sexes: Human Sex Development and Its Disorders. **Results and problems in cell differentiation**, v. 58, p. 337–382, 1 jun. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27300185/>>. Acesso em: 15 jul. 2022.

CARROLL, M. C.; CAMPBELL, R. D.; PORTER, R. R. **Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man (congenital adrenal hyperplasia/cytochrome P450)**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.pnas.org>>.

CHEN, M. J.; MCCANN-CROSBY, B.; GUNN, S.; GEORGIADIS, P.; PLACENCIA, F.; MANN, D.; AXELRAD, M.; KARAVITI, L. P.; MCCULLOUGH, L. B. Fluidity models in ancient Greece and current practices of sex assignment. **Seminars in Perinatology**, v. 41, n. 4, p. 206–213, 1 jun. 2017.

CHOWDHURY, T. K.; CHOWDHURY, M. Z.; MILI, F.; HUTSON, J. M.; BANU, T. Gender identity shows a high correlation with Prader score in patients with disorders of sex development (DSD) presenting in mid childhood. **Pediatric Surgery International**, v. 30, n. 5, p. 527–532, 2014. . Acesso em: 30 jul. 2022.

CONCOLINO, P.; MELLO, E.; TOSCANO, V.; AMEGLIO, F.; ZUPPI, C.; CAPOLUONGO, E. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for the detection of CYP21A2 gene deletions/duplications in congenital adrenal hyperplasia: first technical report. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 402, n. 1–2, p. 164–170, abr. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19263525/>>. Acesso em: 30 nov. 2022.

CONCOLINO, P.; MELLO, E.; ZUPPI, C.; CAPOLUONGO, E. Molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: An update of new CYP21A2 mutations. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 48, n. 8, p. 1057–1062, 1 ago. 2010. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/CCLM.2010.239/html>>. Acesso em: 14 jul. 2022.

COOLS, M.; NORDENSTRÖM, A.; ROBEVA, R.; HALL, J.; WESTERVELD, P.; FLÜCK, C.; KÖHLER, B.; BERRA, M.; SPRINGER, A.; SCHWEIZER, K.; PASTERSKI, V. Caring for individuals with a difference of sex development (DSD): A Consensus Statement. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 7, p. 415–429, 1 jul. 2018.

DE PAULA MICHELATTO, D.; KARLSSON, L.; LUSA, A. L. G.; SILVA, C. D. A. M.; ÖSTBERG, L. J.; PERSSON, B.; GUERRA-JÚNIOR, G.; LEMOS-MARINI, S. H. V. de; BARBARO, M.; DE MELLO, M. P.; LAJIC, S. Functional and Structural Consequences of Nine CYP21A2 Mutations Ranging from Very Mild to Severe Effects. **International Journal of Endocrinology**, v. 2016, 2016. . Acesso em: 23 dez. 2022.

DELLE PIANE, L.; RINAUDO, P. F.; MILLER, W. L. 150 Years of Congenital Adrenal Hyperplasia: Translation and Commentary of De Crecchio's Classic Paper from 1865. **Endocrinology**, v. 156, n. 4, p. 1210–1217, 1 abr. 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article/156/4/1210/2803353>>. Acesso em: 13 out. 2022.

DULÍN IÑIGUEZ, E.; EZQUIETA ZUBICARAY, B. Newborn screening of congenital adrenal hyperplasia. **Endocrinología, Diabetes y Nutrición (English ed.)**, v. 65, n. 1, p. 1–4, 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://www.elsevier.es/en-revista-endocrinologia-diabetes-nutricion-english-ed--413-articulo-newborn-screening-congenital-adrenal-hyperplasia-S2530018018300088>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

DUMIĆ, M. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase enzyme deficiency. **Lijecnicki vjesnik**, v. 118 Suppl 1, p. 13–16, 23 set. 1996. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1909786>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

DUTT, M.; WEHRLE, C. J.; JIALAL, I. Physiology, Adrenal Gland. **StatPearls**, 8 maio 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537260/>>. Acesso em: 15 jul. 2022.

EGGERS, S.; SINCLAIR, A. Mammalian sex determination-insights from humans and mice. **Chromosome Research**, v. 20, n. 1, p. 215–238, jan. 2012.

EID, W.; BIASON-LAUBER, A. Why boys will be boys and girls will be girls: Human sex development and its defects. **Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews**, v. 108, n. 4, p. 365–379, 1 dez. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28033664/>>. Acesso em: 15 jul. 2022.

ESPINOSA REYES, T. M.; COLLAZO MESA, T.; LANTIGUA CRUZ, P. A.; AGRAMONTE MACHADO, A.; DOMÍNGUEZ ALONSO, E.; FALHAMMAR, H. Genotype-Phenotype Correlation in Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency in Cuba. **International Journal of Endocrinology**, v. 2021, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35488888/>>. Acesso em: 29 out. 2022.

ESTERMANN, M. A.; SMITH, C. A. Applying Single-Cell Analysis to Gonadogenesis and DSDs (Disorders/Differences of Sex Development). **International Journal of Molecular Sciences** 2020, Vol. 21, Page 6614, v. 21, n. 18, p. 6614, 10 set. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/18/6614/htm>>. Acesso em: 30 jul. 2022.

EZQUIETA, B.; CUEVA, E.; OYARZÁBAL, M.; OLIVER, A.; VARELA, J. M.; JARIEGO, C. Gene conversion (655G splicing mutation) and the founder effect (Gln318Stop) contribute to the most frequent severe point mutations in congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in the Spanish population. **Clinical Genetics**, v. 62, n. 2, p. 181–188, 2002.

FALHAMMAR, H.; FRISÉN, L.; HIRSCHBERG, A. L.; NORDENSKJÖLD, A.; ALMQVIST, C.; NORDENSTRÖM, A. Increased Prevalence of Fractures in Congenital Adrenal Hyperplasia: A Swedish Population-based National Cohort Study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 107, n. 2, p. e475–e486, 18

jan. 2022. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/e475/6380622>>.

GRINSPON, R. P.; REY, R. A. Disorders of Sex Development. *Em: Maternal-Fetal and Neonatal Endocrinology*. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 841–867.

HADDAD, N. G.; EUGSTER, E. A. Peripheral precocious puberty including congenital adrenal hyperplasia: causes, consequences, management and outcomes. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 33, n. 3, p. 101273, 1 jun. 2019. . Acesso em: 20 out. 2022.

HAIDER, S.; ISLAM, B.; D'ATRI, V.; SGOBBA, M.; POOJARI, C.; SUN, L.; YUEN, T.; ZAIDI, M.; NEW, M. I. Structure-phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 7, p. 2605–2610, 12 fev. 2013. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1221133110>>. Acesso em: 1 dez. 2022.

HAMAMY, H. Consanguineous marriages: Preconception consultation in primary health care settings. **Journal of Community Genetics**, v. 3, n. 3, p. 185, jul. 2012. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3419292/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23419292/)>. Acesso em: 6 dez. 2022.

HIGASHI, Y.; YOSHIOKA, H.; YAMANE, M.; GOTOH, O.; FUJII-KURIYAMA, Y. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 9, p. 2841, 1986. Disponível em: <[pmc/articles/PMC323402/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/273402/)>. Acesso em: 11 nov. 2022.

HILLER-STURMHÖFEL, S.; BARTKE, A. The Endocrine System: An Overview. **Alcohol Health and Research World**, v. 22, n. 3, p. 153, 1998. Disponível em: <[pmc/articles/PMC6761896/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6761896/)>. Acesso em: 28 out. 2022.

HINDMARSH, P. C. (Peter C.); GEERTSMA, Kathy. **Congenital adrenal hyperplasia : a comprehensive guide**. [s.l.] Academic Press, 2017.

HUGHES, I. A.; HOUK, C.; AHMED, S. F.; LEE, P. A.; LWPES CONSENSUS GROUP; ESPE CONSENSUS GROUP. Consensus statement on management of intersex disorders. **Archives of disease in childhood**, v. 91, n. 7, p. 554–63, 14 jul. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16624884>>.

HUGHES, I. A.; NIHOUL-FÉKÉTÉ, C.; THOMAS, B.; COHEN-KETTENIS, P. T. Consequences of the ESPE/LWPES guidelines for diagnosis and treatment of disorders of sex development. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 3, p. 351–365, 1 set. 2007. . Acesso em: 22 out. 2022.

HUGHES, I.; NIHOUL-FÉKÉTÉ, C.; ... B. T.-B. P. & 2007, undefined. Consequences of the ESPE/LWPES guidelines for diagnosis and treatment of disorders of sex development. **Elsevier**, [s.d.] Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521690X07000553?casa_token=hJ6m5nPT1A8AAAAA:oShbRa2NeZVsLasIDOXiR7W-

huiM725JWgx0niAwkxiL3xCFSO-DOWgj_tid4QfBs4neyn0L2-il>. Acesso em: 17 jul. 2022.

JANSEN M WIT, M. J.; VAN DEN BRANDE, J. L. **REINSTITUTION OF MINERALOCORTICOID THERAPY IN CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA Effects on Control und Groii*thActu Pzdiutr Scund.** [s.l: s.n.].

JENKINS-JONES, S.; PARVIAINEN, L.; PORTER, J.; WITHE, M.; WHITAKER, M. J.; HOLDEN, S. E.; MORGAN, C. L.; CURRIE, C. J.; ROSS, R. J. M. Poor compliance and increased mortality, depression and healthcare costs in patients with congenital adrenal hyperplasia. **European Journal of Endocrinology**, v. 178, n. 4, p. 309–320, 1 abr. 2018. Disponível em: <<https://ej.e.bioscientifica.com/view/journals/eje/178/4/EJE-17-0895.xml>>. Acesso em: 4 nov. 2022.

JOST, A. A new look at the mechanisms controlling sex differentiation in mammals. 1972. Disponível em: <<https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=PASCAL7336112367>>. Acesso em: 29 out. 2022.

KHRAMTSOVA, E. A.; DAVIS, L. K.; STRANGER, B. E. The role of sex in the genomics of human complex traits. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 3, p. 173–190, 23 mar. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41576-018-0083-1>>.

KOCOVA, M.; ANASTASOVSKA, V.; FALHAMMAR, H. Clinical outcomes and characteristics of P30L mutations in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **Endocrine**, v. 69, n. 2, p. 262–277, 5 ago. 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s12020-020-02323-3>>.

KOOPMAN, P.; GUBBAY, J.; VIVIAN, N.; GOODFELLOW, P.; LOVELL-BADGE, R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. **Nature**, v. 351, n. 6322, p. 117–121, 1991. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2030730/>>. Acesso em: 15 jul. 2022.

KOPPEANS, P. F. J.; HOOGENBOEZEM, T.; DEGENHART, H. J. Duplication of the CYP21A2 gene complicates mutation analysis of steroid 21-hydroxylase deficiency: Characteristics of three unusual haplotypes. **Human Genetics**, v. 111, n. 4–5, p. 405–410, out. 2002. . Acesso em: 14 jul. 2022.

KOR, Y.; ZOU, M.; AL-RIJJAL, R. A.; MONIES, D.; MEYER, B. F.; SHI, Y. Phenotype heterogeneity of congenital adrenal hyperplasia due to genetic mosaicism and concomitant nephrogenic diabetes insipidus in a sibling. **BMC Medical Genetics**, v. 19, n. 1, p. 115–115, 11 jul. 2018. Disponível em: <<https://europepmc.org/articles/PMC6042323>>. Acesso em: 1 dez. 2022.

KRONE, N.; ARLT, W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 23, n. 2, p. 181–192, 2009a.

KRONE, N.; ARLT, W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 23, n. 2, p. 181–192, abr. 2009b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19500762/>>. Acesso em: 17 ago. 2022.

KRONE, N.; ARLT, W. **Genetics of congenital adrenal hyperplasia** *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* abr. 2009c.

KRONE, N.; BRAUN, A.; ROSCHER, A. A.; KNORR, D.; SCHWARZ, H. P. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 85, n. 3, p. 1059–1065, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10720040/>>. Acesso em: 1 dez. 2022.

KRONE, N.; DHIR, V.; IVISON, H. E.; ARLT, W. Congenital adrenal hyperplasia and P450 oxidoreductase deficiency. **Clinical Endocrinology**, v. 66, n. 2, p. 162–172, 1 fev. 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2265.2006.02740.x>>. Acesso em: 14 jul. 2022.

LAJIC, S.; LEVO, A.; NIKOSHKOV, A.; LUNDBERG, Y.; PARTANEN, J.; WEDELL, A. A cluster of missense mutations at Arg356 of human steroid 21-hydroxylase may impair redox partner interaction. **Human Genetics** **1997 99:6**, v. 99, n. 6, p. 704–709, jun. 1997. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s004390050436>>. Acesso em: 1 dez. 2022.

LAMBETH, L. S.; MORRIS, K.; AYERS, K. L.; WISE, T. G.; O'NEIL, T.; WILSON, S.; CAO, Y.; SINCLAIR, A. H.; CUTTING, A. D.; DORAN, T. J.; SMITH, C. A. Overexpression of Anti-Müllerian hormone disrupts gonadal sex differentiation, blocks sex hormone synthesis, and supports cell autonomous sex development in the chicken. **Endocrinology**, v. 157, n. 3, p. 1258–1275, 1 mar. 2016. . Acesso em: 15 jul. 2022.

LEE, P. A.; HOUK, C. P.; AHMED, F.; HUGHES, I. A.; ACHERMANN, J.; BASKIN, L.; BERENBAUM, S.; BERTELLONI, S.; BROCK, J.; CARMICHAEL, P.; CHASE, C.; COHEN-KETTENIS, P.; CONTE, F.; COPELAND, K.; DONOHOU, P.; DRIVER, C.; DROP, S.; EUGSTER, E.; FUJIEDA, K.; GIEDD, J.; GREEN, R.; GRUMBACH, M.; HARLEY, V.; HINES, M.; HIORT, O.; HOUK, C.; HUGHES, I.; LEE, P.; LOOIJENGA, L.; MENDOCA, B.; MEYER-BAHLBURG, H.; MIGEON, C.; MOREL, Y.; MOURIQUAND, P.; NORDENSTRÖM, A.; RANSLEY, P.; RAPAPORT, R.; REINER, W.; RICHTER-APPELT, H.; RINK, R.; RISSMAN, E.; SAENGER, P.; SANDBERG, D.; SCHOBER, J.; SPACK, N.; THOMAS, B.; THYEN, U.; VILAIN, E.; WARNE, G.; WILSON, J.; WISNIEWSKI, A.; WOODHOUSE, C.; ZUCKER, K. Consensus statement on management of intersex disorders. Em: *Pediatrics*, 2., 2006, [...]. American Academy of Pediatrics, 2006. v. 118

LEE, P.; NORDENSTRÖM, A.; HOUK, C.; ... S. A.-H. research in; 2016, undefined. Global disorders of sex development update since 2006: perceptions, approach and care. **karger.com**, [s.d.] Disponível em: <<https://www.karger.com/article/fulltext/442975/27603905>>. Acesso em: 17 jul. 2022.

LEVO, A.; PARTANEN, J. Mutation-haplotype analysis of steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency in Finland. Implications for the population history of defective alleles. **Human Genetics** **1997 99:4**, v. 99, n. 4, p. 488–497, abr. 1997. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s004390050394>>. Acesso em: 1 dez. 2022.

- MAKIYAN, Z. Studies of gonadal sex differentiation. **Organogenesis**, v. 12, n. 1, p. 42–51, 2 jan. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26950283/>>. Acesso em: 15 jul. 2022.
- MARTÍNEZ-ARIAS, R.; CALAFELL, F.; MATEU, E.; COMAS, D.; ANDRÉS, A. Sequence Variability of a Human Pseudogene. p. 1071–1085, 2001.
- MIHAI, R. Physiology of the pituitary, thyroid and adrenal glands. **Surgery (Oxford)**, v. 29, n. 9, p. 419–427, 1 set. 2011. . Acesso em: 15 jul. 2022.
- MILLER, W. Steroidogenic Enzymes. **Endocrine Development**, v. 13, p. 1–18, 2008. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/134751>>. Acesso em: 11 nov. 2022.
- MILLER, W. L. **CLINICAL REVIEW 54 Genetics, Diagnosis, and Management of 2 1-Hydroxylase Deficiency***. [s.l: s.n.].
- MILLER, W. L.; MERKE, D. P. Tenascin-X, Congenital Adrenal Hyperplasia, and the CAH-X Syndrome. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 89, n. 5, p. 352–361, 1 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/481911>>. Acesso em: 29 out. 2022.
- MOHNACH, L.; FECHNER, P. Y.; KEEGAN, C. E. Nonsyndromic Disorders of Testicular Development. **GeneReviews®**, 2 jun. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1547/>>. Acesso em: 17 jul. 2022.
- MOOIJ, C. F.; PARAJES, S.; PIJNENBURG-KLEIZEN, K. J.; ARLT, W.; KRONE, N.; VAN DER GRINTEN, H. L. C. Influence of 17-Hydroxyprogesterone, Progesterone and Sex Steroids on Mineralocorticoid Receptor Transactivation in Congenital Adrenal Hyperplasia. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 83, n. 6, p. 414–421, 22 jul. 2015.
- NAGAHAMA, Y.; CHAKRABORTY, T.; PAUL-PRASANTH, B.; OHTA, K.; NAKAMURA, M. SEX DETERMINATION, GONADAL SEX DIFFERENTIATION, AND PLASTICITY IN VERTEBRATE SPECIES. **Physiological Reviews**, v. 101, n. 3, p. 1237–1308, 1 jul. 2021. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00044.2019>>. Acesso em: 29 out. 2022.
- NARASIMHAN, M. L.; KHATTAB, A. Genetics of congenital adrenal hyperplasia and genotype-phenotype correlation. **Fertility and Sterility**, v. 111, n. 1, p. 24–29, 1 jan. 2019a. Disponível em: <<http://www.fertstert.org/article/S0015028218322027/fulltext>>. Acesso em: 25 jul. 2022.
- NARASIMHAN, M. L.; KHATTAB, A. **Genetics of congenital adrenal hyperplasia and genotype-phenotype correlation** *Fertility and Sterility* Elsevier Inc., 1 jan. 2019b.
- NILLSON, L.; INGELMAN-SUNDBERG, A.; WIRSÉN, C. **A child is born : the drama of life before birth in unprecedented photographs : a practical guide for the expectant mother**. 1st. ed. New York: Delacorte Press, 1965. 156 p.

NIMKARN, S.; GANGISHETTI, P. K.; YAU, M.; NEW, M. I. 21-Hydroxylase-Deficient Congenital Adrenal Hyperplasia. In: **Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. Available from:**

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1171/>, 4 fev. 2016a. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1171/>>. Acesso em: 25 jul. 2022.

NIMKARN, S.; GANGISHETTI, P. K.; YAU, M.; NEW, M. I. 21-Hydroxylase-Deficient Congenital Adrenal Hyperplasia. In: **Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. Available from:**

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1171/>, 4 fev. 2016b. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1171/>>. Acesso em: 1 dez. 2022.

O'CONNOR, T. M.; O'HALLORAN, D. J.; SHANAHAN, F. **The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia** *Q J Med.* [s.l: s.n.].

OETLIKERF, O. H.; ZURBRUGG, R. P. **Renal Regulation of Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Homeostasis in the Salt-Losing Syndrome of Congenital Adrenal Hyperplasia (SL-CAH)* ECF Volume: A Compensating Factor in Aldosterone Deficiency** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* [s.l: s.n.].

ONO, M.; HARLEY, V. R. Disorders of sex development: new genes, new concepts. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 9, n. 2, p. 79–91, fev. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23296159/>>. Acesso em: 17 jul. 2022.

OWERBACH, D.; CRAWFORD, Y. M.; DRAZNIN, M. B. Direct analysis of CYP21B genes in 21-Hydroxylase deficiency using polymerase chain reaction amplification. **Molecular Endocrinology**, v. 4, n. 1, p. 125–131, 1990.

PAMPLONA-CUNHA, H.; MEDEIROS, M. F.; SINCERO, T. C. M.; BACK, I. de C.; DA SILVA, E. L. Portador Heterozigoto Composto de Hipercolesterolemia Familiar Causada por Variantes no LDLR. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, n. 3, p. 587, 1 set. 2020. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC9363081/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3363081/)>. Acesso em: 1 dez. 2022.

PANG, S.; CLARK, A.; NETO, E.; GIUGLIANI, R.; SCREENING, H. D.-; 1993, undefined. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: newborn screening and its relationship to the diagnosis and treatment of the disorder. **Elsevier**, 1993. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/092561649390024D>>. Acesso em: 14 out. 2022.

PANG, S.; HOTCHKISS, J.; ... A. D.-T. J. of; 1977, undefined. Microfilter paper method for 17 α -hydroxyprogesterone radioimmunoassay: its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasia. **academic.oup.com**, [s.d.] Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/45/5/1003/2677310>>. Acesso em: 16 jul. 2022.

- PARKER, E. A.; HOVANES, K.; GERMAK, J.; PORTER, F.; MERKE, D. P. **Maternal 21-hydroxylase deficiency and uniparental isodisomy of chromosome 6 and X results in a child with 21-hydroxylase deficiency and Klinefelter syndrome [1]***American Journal of Medical Genetics, Part A* 15 out. 2006.
- PARSA, A. A.; NEW, M. I. Steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 165, p. 2–11, 1 jan. 2017. . Acesso em: 3 dez. 2022.
- PASK, A. The Reproductive System. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 886, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26659484/>>. Acesso em: 15 jul. 2022.
- PIGNATELLI, D.; CARVALHO, B. L.; PALMEIRO, A.; BARROS, A.; GUERREIRO, S. G.; MAÇUT, D. **The complexities in genotyping of congenital adrenal hyperplasia: 21-hydroxylase deficiency***Frontiers in Endocrinology* Frontiers Media S.A., 2019a.
- PIGNATELLI, D.; CARVALHO, B. L.; PALMEIRO, A.; BARROS, A.; GUERREIRO, S. G.; MAÇUT, D. **The complexities in genotyping of congenital adrenal hyperplasia: 21-hydroxylase deficiency***Frontiers in Endocrinology* Frontiers Media S.A., 2019b.
- RABBANI, B.; MAHDIEH, N.; ASHTIANI, M. T. H.; LARIJANI, B.; AKBARI, M. T.; NEW, M.; PARSA, A.; SCHOUTEN, J. P.; RABBANI, A. Mutation Analysis of the CYP21A2 Gene in the Iranian Population. <https://home.liebertpub.com/gtmb>, v. 16, n. 2, p. 82–90, 15 fev. 2012. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/gtmb.2011.0099>>. Acesso em: 14 jul. 2022.
- ROBERT, F.; PELLETIER, J. Exploring the Impact of Single-Nucleotide Polymorphisms on Translation. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 507, 30 out. 2018. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6218417/](https://pmc/articles/PMC6218417/)>. Acesso em: 3 dez. 2022.
- RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ, D.; BIASON-LAUBER, A. Pluripotent Cell Models for Gonadal Research. **International Journal of Molecular Sciences** 2019, Vol. 20, Page 5495, v. 20, n. 21, p. 5495, 4 nov. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/21/5495/htm>>. Acesso em: 4 nov. 2022.
- ROGAN, P. K.; CAMINSKY, N.; MUCAKI, E. J. Interpretation of mRNA splicing mutations in genetic disease: review of the literature and guidelines for information-theoretical analysis. **F1000Research**, v. 3, 18 nov. 2014. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4329672/](https://pmc/articles/PMC4329672/)>. Acesso em: 3 dez. 2022.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Molecular cloning: a laboratory manual.**, n. Ed. 2, 1989. . Acesso em: 3 dez. 2022.
- SHARMA, R. Congenital Adrenal Hyperplasia and Growth Outcomes. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 86, n. 2, p. 111–112, 4 fev. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12098-018-2841-7>>.

SHE, Z. Y.; YANG, W. X. Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. **Journal of molecular endocrinology**, v. 53, n. 1, 13 jun. 2014.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24928207/>>. Acesso em: 15 jul. 2022.

SIMONETTI, L.; BRUQUE, C. D.; FERNÁNDEZ, C. S.; BENAVIDES-MORI, B.; DELEA, M.; KOLOMENSKI, J. E.; ESPECHE, L. D.; BUZZALINO, N. D.; NADRA, A. D.; DAIN, L. CYP21A2 mutation update: Comprehensive analysis of databases and published genetic variants. **Human Mutation**, v. 39, n. 1, p. 5–22, 1 jan. 2018. . Acesso em: 25 jul. 2022.

SIMPSON, H.; HUGHES, I. Congenital adrenal hyperplasia. **Medicine**, v. 49, n. 8, p. 507–511, 1 ago. 2021. . Acesso em: 20 out. 2022.

SPEISER, P. W.; ARLT, W.; AUCHUS, R. J.; BASKIN, L. S.; CONWAY, G. S.; MERKE, D. P.; MEYER-BAHLBURG, H. F. L.; MILLER, W. L.; HASSAN MURAD, M.; OBERFIELD, S. E.; WHITE, P. C. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: An endocrine society* clinical practice guideline. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 103, n. 11, p. 4043–4088, 2018a.

SPEISER, P. W.; ARLT, W.; AUCHUS, R. J.; BASKIN, L. S.; CONWAY, G. S.; MERKE, D. P.; MEYER-BAHLBURG, H. F. L.; MILLER, W. L.; MURAD, M. H.; OBERFIELD, S. E.; WHITE, P. C. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society* Clinical Practice Guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 103, n. 11, p. 4043–4088, 1 nov. 2018b.

SPEISER, P. W.; DUPONT, J.; ZHU, D.; SERRAT, J.; BUEGELEISEN, M.; TUSIE-LUNA -, M. T.; LESSER, M.; NEW, M. I.; WHITE, P. C. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **The Journal of clinical investigation**, v. 90, n. 2, p. 584–595, 1992a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1644925/>>. Acesso em: 16 jul. 2022.

SPEISER, P. W.; DUPONT, J.; ZHU, D.; SERRAT, J.; BUEGELEISEN, M.; TUSIE-LUNA -, M. T.; LESSER, M.; NEW, M. I.; WHITE, P. C. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **The Journal of clinical investigation**, v. 90, n. 2, p. 584–595, 1992b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1644925/>>. Acesso em: 1 dez. 2022.

THERRELL, B. L. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 15–30, 1 mar. 2001. Disponível em:

<<http://www.endo.theclinics.com/article/S0889852908700173/fulltext>>. Acesso em: 10 out. 2022.

THILÉN, A.; NORDENSTRÖ, A.; HAGENFELDT, L.; VON DÖ BELN, U.; GUTHENBERG, C.; LARSSON, A. **Benefits of Neonatal Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia (21-Hydroxylase Deficiency) in Sweden**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.pediatrics.org/>>.

- TUKEL, T.; UYGUNER, O.; ... J. W.-T. J. of; 2003, undefined. A novel semiquantitative polymerase chain reaction/enzyme digestion-based method for detection of large scale deletions/conversions of the CYP21 gene and. **academic.oup.com**, [s.d.]Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article-abstract/88/12/5893/2661499>>. Acesso em: 16 jul. 2022.
- TUSIE-LUNA, M. T.; TRAKTMAN, P.; WHITE, P. C. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 34, p. 20916–20922, 5 dez. 1990. . Acesso em: 4 dez. 2022.
- VAN DER GRINTEN, H. L. C.; SPEISER, P. W.; FAISAL AHMED, S.; ARLT, W.; AUCHUS, R. J.; FALHAMMAR, H.; FLÜCK, C. E.; GUASTI, L.; HUEBNER, A.; KORTMANN, B. B. M.; KRONE, N.; MERKE, D. P.; MILLER, W. L.; NORDENSTRÖM, A.; REISCH, N.; SANDBERG, D. E.; STIKKELBROECK, N. M. M. L.; TOURAINE, P.; UTARI, A.; WUDY, S. A.; WHITE, P. C. Congenital Adrenal Hyperplasia-Current Insights in Pathophysiology, Diagnostics, and Management. **Endocrine reviews**, v. 43, n. 1, p. 91–159, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33961029/>>. Acesso em: 7 out. 2022.
- VILLEE, D. B. The development of steroidogenesis. **The American journal of medicine**, v. 53, n. 5, p. 533–544, 1972. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4263466/>>. Acesso em: 11 nov. 2022.
- WANG, R.; ZOU, L.; YANG, X. microRNA-210/ Long non-coding RNA MEG3 axis inhibits trophoblast cell migration and invasion by suppressing EMT process. **Placenta**, v. 109, p. 64–71, 1 jun. 2021.
- WANG, Y.; LIU, J.; HUANG, B.; XU, Y.-M.; LI, J.; HUANG, L.-F.; LIN, J.; ZHANG, J.; MIN, Q.-H.; YANG, W.-M.; WANG, X.-Z. Mechanism of alternative splicing and its regulation. **Biomedical Reports**, v. 3, n. 2, p. 152, mar. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25681111/>>. Acesso em: 3 dez. 2022.
- WEDELL, A. Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency): implications for diagnosis, prognosis and treatment. **Acta Paediatrica**, v. 87, n. 2, p. 159–164, 2 jan. 2007. . Acesso em: 30 jul. 2022.
- WEDELL, A.; RITZEN, E. M.; HAGLUND-STENGLER, B.; LUTHMAN, H. Steroid 21-hydroxylase deficiency: Three additional mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 15, p. 7232–7236, 1992. . Acesso em: 30 out. 2022.
- WHITE, P. C.; NEW, M. I.; DUPONT, B. HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 23 I, p. 7505–7509, 1984. . Acesso em: 10 ago. 2022.
- WHITE, P. C.; NEW, M. I.; DUPONTT, B. **Structure of human steroid 21-hydroxylase genes***Biochemistry*. [s.l: s.n.].

WHITE, P.; REVIEWS, P. S.-E.; 2000, undefined. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **academic.oup.com**, [s.d.]Disponível em: <<https://academic.oup.com/edrv/article-abstract/21/3/245/2423831>>. Acesso em: 14 jul. 2022.

WILSON, J.; RIVAROLA, M.; MENDONCA, B.; WARNE, G.; JOSSO, N.; DROP, S. S.; GRUMBACH, M. Advice on the management of ambiguous genitalia to a young endocrinologist from experienced clinicians. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 30, n. 5, p. 339–350, 2012.

WILSON, R. C.; WEI, J. Q.; CHENG, K. C.; MERCADO, A. B.; NEW, M. I. Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 80, n. 5, p. 1635–1640, 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7745011/>>. Acesso em: 10 ago. 2022.

WITCHEL, S. F. DISORDERS OF SEX DEVELOPMENT. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 48, p. 90, 1 abr. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/>>. Acesso em: 15 jul. 2022.

WUDY, S. A.; SCHULER, G.; SÁNCHEZ-GUIJO, A.; HARTMANN, M. F. The art of measuring steroids: Principles and practice of current hormonal steroid analysis. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 179, p. 88–103, 1 maio 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28962971>>.

XU, Z.; CHEN, W.; MERKE, D. P.; MCDONNELL, N. B. Comprehensive Mutation Analysis of the CYP21A2 Gene: An Efficient Multistep Approach to the Molecular Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 15, n. 6, p. 745–753, 1 nov. 2013. . Acesso em: 14 jul. 2022.

YANG, Z.; MENDOZA, A. R.; WELCH, T. R.; ZIPF, W. B.; YUNG YU, C. Modular variations of the human major histocompatibility complex class III genes for serine/threonine kinase RP, complement component C4, steroid 21-hydroxylase CYP21, and tenascin TNX (the RCCX module): A mechanism for gene deletions and disease associations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 17, p. 12147–12156, 23 abr. 1999.

YEHUDA, R.; SECKL, J. Minireview: **Stress-related psychiatric disorders with low cortisol levels: A metabolic hypothesis** *Endocrinology* dez. 2011.