**Revisor A**

**Comentário 1:**

**AMP publicou em 2011 Late onset congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: revision of literature and preconception  genetic**

**study of five couples -  que os  autores não citam.**

Resposta:

O artigo em questão foi incluído, após correcção, no penúltimo parágrafo da discussão – referência número 25.

--------------------------------------------------------------

**Revisor C:**

**Comentários gerais:**

**1. Trata-se uma casuística com um número reduzido de casos de hiperplasia congénita da suprarrenal (HCSR). Assim, a correlação genótipo / fenótipo é pouco significativa e relevante.  A separação em 5 grupos genotipicos de acordo com o tipo de mutação torna ainda as conclusões menos significativas.**

Resposta:

Apesar de ser uma casuística com número reduzido de casos, optamos por dividir por 5 grupos genotípicos já que vários estudos semelhantes também fizeram esta divisão, facilitando assim a comparação de dados:

* Speiser et al. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Invest. 1992;90:584–95. (referência 6)
* Krone N et al. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. J Clin Endocrinol Metab. 2000;85:1059-65. (referência 15)
* Finkielstain et al. Comprehensive genetic analysis of 182 unrelated families with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96:E161-72. (referência 13).

**2. A revisão bibliográfica inclui artigos antigos ( a maior parte ≤ 2000) e não cita 2 artigos fundamentais:**

**- New M  et al – PNAS 2013, análise de 1700 familias com HCSR**

**- Friães  et al – Mol Genet Metabol 2006 – analises de uma população**

**portuguesa de HCSR – 56 doentes**

Resposta:

Tal como sugerido incluímos o artigo de New M et al (referência 16). Reformulamos ainda o último parágrafo da discussão, utilizando este artigo para corroborar os dados encontrados . Assim substituímos:

“Foi também evidente o predomínio do sexo feminino ~~(72,7% da amostra),~~ o que está de acordo com a literatura. Como se trata de uma patologia autossómica recessiva, ocorre igualmente nos dois sexos.20 A assimetria na distribuição do género observada faz-nos pensar que os rapazes possam ser mais vezes subdiagnosticados.

Por:

“Foi também evidente o predomínio do sexo feminino, o que está de acordo com a literatura. Como se trata de uma patologia autossómica recessiva, ocorre igualmente nos dois sexos.22 A assimetria na distribuição do género observada, principalmente na forma NC, em que todas as crianças apresentaram genótipo V281L em pelo menos um dos alelos (com uma proporção de 9 raparigas para apenas 1 rapaz) faz-nos pensar que os rapazes possam ser mais vezes subdiagnosticados, pelo facto de os sinais de hiperandrogenismo serem menos óbvios, tal como descrito previamente.16

Quanto ao artigo: “Friães et al – Mol Genet Metabol 2006 – análises de uma população portuguesa de HCSR – 56 doentes”, não foi incluído porque não conseguimos encontrá-lo nem na pubmed nem através dos motores de busca tradicionais.

**3. Este estudo de Genética clínica não parece envolver nenhum Geneticista, pelo menos na lista de autores**

Resposta:

Nesta casuística não foi incluído nenhum Geneticista uma vez que os estudos genéticos foram solicitados pelo Endocrinologista Pediátrico e foram efectuados em diferentes centros.

**Comentários específicos:**

**4. Material e métodos:**

**O estudo molecular não incluiu a sequenciação de todo o gene nos casos em que não foram encontradas mutações.**

Resposta:

Tal como sugerido foi incluída essa informação no 3º parágrafo da secção material e métodos:

“O estudo molecular não incluiu a sequenciação de todo o gene nos casos em que não foram encontradas mutações. A pesquisa de grandes…”

**5. A classificação fenotípica foi realizada só por um endocrinologista pediátrico, sempre o mesmo?**

Resposta:

As classificações fenotípicas foram atribuídas após terem sido revistas em conjunto pelos três Endocrinologistas Pediátricos da Unidade. Essa informação foi incluída no 5º parágrafo na secção material e métodos. Substituímos:

“A classificação fenotípica dos doentes foi determinada por um endocrinologista pediátrico baseado em critérios clínicos e hormonais, através da revisão retrospetiva do registo clínico.”

Por:

“A classificação fenotípica dos doentes foi determinada após revisão em conjunto pelos três Endocrinologistas Pediátricos da Unidade, baseada em critérios clínicos e hormonais, através da análise retrospetiva do registo clínico.

**6. A virilização não é sinal de crise adrenérgica.**

Resposta

Foi corrigida a frase: “Na presença de sinais clínicos e bioquímicos evidentes de crise adrenérgica (~~virilização dos genitais externos~~, má evolução ponderal…).

**7. As unidades das determinações devem ser homogénea, isto é, utilizer sempre as mesmas, o que não se verifica nalguns casos.**

Resposta:

De forma a uniformizar as unidades, corrigimos os valores de 17-OHP, que agora constam apenas em ng/dl.

**8. A descrição da classificação por grupos não é muito clara e não há referencia a renina , exame fundamental no período neonatal precoce, no sexo feminino, para avaliar a perda de sal que pode clinicamente não se instalar se o tratamento for precoce.**

Resposta:

Tal como sugerido, incluímos o valor de renina na tabela 1, de forma a ajudar a clarificação dos grupos. Não tivemos, no entanto, acesso aos valores de renina de 5 doentes, o que é inerente às limitações de um estudo retrospetivo. Por uma questão de espaço, na tabela 1 retirou-se a coluna referente a “história familiar” para incluir os doseamentos da renina.

Com estes novos dados corrigimos no 4º parágrafo de Material e Métodos:

“A classificação fenotípica dos doentes foi determinada por um endocrinologista pediátrico baseado em critérios clínicos e hormonais, através da revisão retrospetiva do registo clínico. Na presença de sinais clínicos e bioquímicos evidentes de crise adrenérgica (má evolução ponderal, hiponatrémia, hipercalémia e ~~atividade plasmática da~~ renina elevada) os doentes eram classificados na forma CPS. Neste grupo, o valor de 17-OHP no primeiro mês de vida era >2500 ng/dL. Os doentes do sexo feminino com genitais ambíguos, com 17-OHP elevada, com renina aumentada mas sem desequilíbrios hidroelectrolíticos ou nos quais foi detetada virilização precoce para além do período neonatal, foram classificadas como forma CVS.

**Resultados e Discussão :**

**9. Dado o pequeno número de doentes e a sua divisão em grupos, os numerous absolutos são mais significativos e reflectem melhor a realidade que as percentagens, por exemplo 16/22 doentes sexo feminino e não 72.7% da amostra.**

Resposta:

Foi corrigido no 2º parágrafo da discussão, tendo-se optado pelo número absoluto em detrimento da percentagem. Nos restantes casos sempre que aparece percentagem, também é apresentado o número absoluto.

**10. Em 2 doentes só foi encontrada uma mutação o que a priori os exclui sob o ponto de vista genético. A sua inclusão deveria ter sido objecto de**

**comentário na discussão.**

Resposta:

Foi incluído o comentário sugerido no 4º parágrafo da discussão:

“As discrepâncias observadas podem também ser explicadas por novas mutações que não foram pesquisadas à data do diagnóstico (e que poderão justificar o fenótipo das 2 crianças em que apenas foi detectada uma mutação)…

**11. Uma das crianças classificada como CVS deveria ser classificada como CPS pois apresentou renina elevada no período neonatal e necessitou de tratamento com sal e fludrocortisona; a inexistência de achados clínicos deve-se ao diagnóstico da situação no 1º dia de vida.**

Resposta:

De forma a clarificar este aspecto, foi substuído o parágrafo:

“Uma recém-nascida diagnosticada no primeiro dia de vida por ambiguidade genital, cujo fenótipo esperado era CPS não evidenciou sinais de perda de sal porque o diagnóstico e tratamento foram precoces. No entanto, foi necessário tratamento com mineralocorticóide e suplementos de sal”

por:

“ Uma recém-nascida diagnosticada no primeiro dia de vida por ambiguidade genital, cujo fenótipo esperado era CPS, apesar de não ter evidenciado sinais de perda de sal foi classificada como tal, já que foi necessário tratamento com mineralocorticóide e suplementos de sal. Neste caso, o diagnóstico e tratamento foram precoces, tendo-se assim evitado a crise adrenérgica.”

**12. O doente 21 é portador de mutação V281L em homozigotia, habitualmente referida na literatura como forma NC (vidé New et al, 2013), sendo esse o fenótipo esperado e que aliás é o referido na tabela 1, ao contrário do texto da discussão.**

Resposta:

Por lapso, no 3º parágrafo da discussão, em vez de doente 12 encontra-se mencionado doente 21. Foi feita substituição de:

“Num dos doentes (caso 21), o fenótipo observado foi menos grave do que o esperado. Tratava-se de um doente com 2 mutações anuladoras, cuja forma de apresentação foi CVS….

Por:

“Num dos doentes (caso 12), o fenótipo observado foi menos grave do que o esperado. Tratava-se de um doente com 2 mutações anuladoras, cuja forma de apresentação foi CVS….

**Conclusões**

**13. O DPN e tratamento prenatal  é realizado em pelo menos 2 centros do**

**País – H. Pediátrico de Coimbra e H. D. Estefania.**

Resposta:

Foi retirada a frase em questão:

“O facto de existir um número limitado de mutações responsáveis pela maioria dos casos de HCSR, já descrita na literatura e corroborada no nosso estudo, torna a deteção de mutações útil para o diagnóstico pré-natal, ~~ainda não implementado no nosso país.”~~

--------------------------------------------------------------

**Revisor F e G:**

**Comentário 1:**

**Inclusão das idades no Resumo, na secção resultados.**

Resposta:

Foi incluída a referida informação.

**“ Resultados:** Foi realizada genotipagem em 22 doentes não relacionados: 5 com a forma clássica perdedora de sal (idade média ao diagnóstico de 10,2 dias; mínimo 1, máximo 20 dias), 7 com a forma clássica virilizante simples (idade média ao diagnóstico de 3,5 anos; mínimo 2 anos, máximo 7 anos) e 10 com a forma não clásica (idade média ao diagnóstico de 5,7 anos; mínimo 4 anos, máximo 8 anos).”

**Comentário 2:**

**No Resumo, secção Discussão/Conclusões correcção: “relativamente à gravidade doença…”**

Resposta:

Foi feita a correcção: “relativamente à gravidade da doença…”

**Comentário 3:**

**No 5º parágrafo da Introdução “…sintetizar aldosterona suficiente manter balanço do sódio….”**

Resposta:

Foi feita a correcção:“…sintetizar aldosterona suficiente para manter balanço do sódio….”

**Comentário 4:**

**No 6º parágrafo da introdução, incluir hipotensão.**

Resposta:

Foi incluída a sugestão e, adicionalmente, uma vez que está relacionado incluído também choque hipovolémico:

“Para além dos sinais de virilização e hipocortisolismo, os doentes apresentam insuficiência mineralocorticóide, com predisposição para episódios de hipotensão, desidratação hiponatrémica com hipercalémia e choque hipovolémico potencialmente fatais no período neonatal”

**Comentário 5:**

**Na secção material e métodos o intervalo etário deve ser mencionado e proporção entre sexo feminino e masculino. Todas as crianças eram de raça caucasiana?**

Resposta:

Incluímos a sugestão:

“Estudo retrospetivo, que incluiu 22 crianças em idade pediátrica com critérios clínicos e laboratoriais de deficência de 21-OH, seguidas na Unidade de Endocrinologia do Centro Hospitalar do Porto entre 2000 e 2013. As classificações fenotípicas foram atribuídas após terem sido revistas em conjunto pelos três Endocrinologistas Pediátricos da Unidade.”

Uma vez que se trata de um estudo retrospetivo, colocamos os intervalos etários e a proporção de género na secção Resultados, já que só após analisarmos os dados obtivemos essa informação. Adicionamos a informação sugerida relativamente à raça caucasiana, também nos resultados:

“Todos os doentes eram caucasianos e verificamos um claro predomínio do sexo feminino, 16/22 doentes.”

**Comentário 6:**

**Falta a pontuação final (.)**

Resposta:

Feita a alteração.

“…aceleração marcada do crescimento, com valor de testosterona de 142 ng/dL e 17-OHP basal de 4550 ng/dL.”

**Comentário 7:**

**A frase “Os doentes foram seguidos na mesma unidade, pelo que a categorização clínica foi efetuada do mesmo modo.” deve ser incluída na metodologia.**

Resposta:

Foi retirada essa frase da Discussão. Após a alteração sugerida pelo revisor C – comentário 5, essa informação passou a constar da metodologia:

“As classificações fenotípicas foram atribuídas após terem sido revistas em conjunto pelos três Endocrinologistas Pediátricos da Unidade.”

**Comentário 8:**

**No 4º parágrafo da Discussão retirar “a” a mais.**

Resposta:

Feita a correcção.

“A grande variabilidade da atividade enzimática da mutação I172N13 poderá contribuir para a ~~a~~ variabilidade fenotípica e ser uma possível explicação neste caso”

**Comentário 9:**

**No parágrafo:**

**Neste estudo verificamos que mais de metade dos doentes apresentaram a forma clássica da doença (54,5%), o que não seria de esperar.20 Este achado pode refletir dificuldades no diagnóstico ou subvalorização das formas com apresentação clínica mais ligeira.1,20 ou apenas a reduzida dimensão da amostra?**

Resposta:

Feita a correcção e alteração do parágrafo para:

“Neste estudo verificamos que mais de metade dos doentes apresentaram a forma clássica da doença (54,5%), o que não seria de esperar.20 Este achado pode refletir dificuldades no diagnóstico, bem como a subvalorização das formas com apresentação clínica mais ligeira.1,20 No entanto, não podemos excluir que estes resultados resultem da reduzida dimensão da amostra.”

**Comentário 10:**

**Nas conclusões mencionar a vantagem do diagnóstico pré-natal.**

**Resposta:**

**Foi incluída a informação sugerida no 1º parágrafo da conclusão:**

“O facto de existir um número limitado de mutações responsáveis pela maioria dos casos de HCSR, já descrita na literatura e corroborada no nosso estudo, torna a deteção de mutações útil para o rastreio pré-natal. O diagnóstico pré-natal com análise do DNA obtido por amniocentese ou por biópsia das vilosidades coriónicas tem implicações terapêuticas importantes no sexo feminino, podendo evitar a virilização dos genitais externos e a atribuição incorrecta do sexo. Por outro lado, pode antecipar a instalação de uma crise adrenérgica potencialmente fatal e evitar o hiperandrogenismo durante a infância.”

**Comentário 11:**

**Na bibliografia, relativamente à referência 6 rever na bibliografia o número máximo de autores a referir.**

Resposta:

As normas da revista refrentes à bibliografia referem que no caso de >6 autores, devem constar os primeiros 6, seguindo-se de et al. O exemplo dado é “Norte A, Santos C, Gamboa F, Ferreira AJ, Marques A, Leite C, et al. Pneumonia Necrotizante: uma complicação rara. Acta Med Port. 2012;25:51-5.”

No caso da referência em questão estão discriminados os 6 primeiros autores seguindo-se de et al, tal como indicado. Foi corrigido/adicionada a vírgula antes de et al.

**1-** Speiser PW, **2-** Dupont J, **3-** Zhu D, **4 -** Serrat J, **5-** Buegeleisen M, **6-** Tusie-Luna MT, et al. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Invest. 1992;90:584–95.