

JÚNIA YARA PENACHIONI

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Ciências Biomédicas da aluna **Junia Yara Penachioni**.

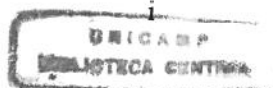
Campinas, 03 de maio de 2001

Maricilda Palandi de Mello
Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello
Orientadora

**DETERMINAÇÃO DE MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS
NO GENE *CYP11B1* HUMANO EM INDIVÍDUOS COM
DEFICIÊNCIA DE 11 β -HIDROXILASE**

200201377

2001



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

JÚNIA YARA PENACHIONI

DETERMINAÇÃO DE MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS NO
GENE *CYP11B1* HUMANO EM INDIVÍDUOS COM
DEFICIÊNCIA DE 11 β -HIDROXILASE

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas (UNICAMP) para
a obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas, área de concentração
Genética Médica

Orientadora: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Co-orientadora: Profa. Dra. Margaret de Castro

Campinas, 2001

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

- P37d Penachioni, Júnia Yara
 Determinação de mutações e polimorfismos no gene **CYP11B1**
 humano em indivíduos com deficiência de 11 β -hidroxilase / Júnia
 Yara Penachioni. Campinas, SP : [s.n.], 2001.
- Orientadores : Maricilda Palandi de Mello, Margaret de Castro
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Ciências Médicas.
1. Hiperplasia. 2. Mutação genética. I. Maricilda Palandi de
 Mello. II. Margareth de Castro. III. Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Membros:

1. Prof. Dr. Carlos Alberto Longui -

2. Profa. Dra. Antonia Paula M. de Faria -

3. Profa. Dra. Maricilda P. de Mello -

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 03.05.2001

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Silvestra, pelo grande apoio em todos os momentos da minha vida;

Ao Cleber, por estar comigo sempre, por me proporcionar momentos de alegria e me dar bons conselhos, mesmo quando eu não pedia...

Às minhas amigas de república, Tati, Silvana, Cris e Silvane, que estão comigo desde o começo deste trabalho e sempre me ajudaram muito;

Aos meus amigos, Fernanda e André, que me acolheram em sua casa, assim que cheguei em Campinas;

À Profa. Maricilda, por ter me dado a oportunidade de realizar um estágio enquanto eu terminava a minha graduação, por ter confiado no meu trabalho, por me incentivar e me apoiar em alguns momentos difíceis;

À Profa. Margaret de Castro, minha co-orientadora, por me incentivar desde o início deste trabalho;

Aos meus grandes professores da graduação (UNESP- São José do Rio Preto) que sempre me apoiaram muito e me incentivaram a seguir esta carreira;

À Ivy, que me ajudou muito no começo deste trabalho, me ensinando grande parte das técnicas utilizadas. Sou muito grata à ela;

À Marcela, Dani, Ju, Lucy, Eliana, Fernanda "s" (I e II), Heloísa, Camila, Marcelo, Lúcio, Fabiana, Andrey, enfim todos amigos do laboratório de Genética Humana, pelos momentos de descontração e risadas;

À Mada, pelo carinho e amizade, pelos auxílios no laboratório e também, lógico, pelos bolos e salgados;

Aos meus grandes amigos "totalmente fiéis", que sempre me proporcionaram grandes momentos de alegria, Kauê e Lua;

Ao Marcos e Ana Maria, Luciana e Lucimara, pelo total apoio, sempre;

Às secretárias do CBMEG, Sandra, Tânia, Fabiana e Patrícia, pelos trabalhos burocráticos que nos poupam; e também à Ritinha pela amizade e, claro, pela limpeza do CBMEG;

Aos pacientes, por permitirem a análise molecular da doença;

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS -----	xiii
LISTA DE TABELAS -----	xvii
LISTA DE FIGURAS -----	xxi
RESUMO -----	xxiii
SUMMARY -----	xxix

INTRODUÇÃO

1- ESTRUTURA, FUNÇÃO E REGULAÇÃO DA CÓRTEX ADRENAL -----	33
2- HIPERPLASIA CONGÊNITA DA ADRENAL -----	38
3- AS ISOENZIMAS 11 β -HIDROXILASE-----	41
4- GENE <i>CYP11B1</i> -----	44
5- MUTAÇÕES NO GENE <i>CYP11B1</i> -----	45
6- POLIMORFISMOS-----	51
7- CONVERSÃO GÊNICA-----	52
8- EFEITO FUNDADOR-----	54

OBJETIVOS -----	59
------------------------	----

MATERIAL E MÉTODOS

1- CASUÍSTICA-----	63
2- COLETA DE AMOSTRAS-----	63
3- DOSAGENS HORMONAIS E DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL -----	63
4- OBTENÇÃO DE DNA GENÔMICO-----	74
5- ELETROFORESE EM GEL-----	75

6- AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS POR PCR-----	76
7- PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR-----	78
7.1- PURIFICAÇÃO A PARTIR DO PRODUTO DE PCR-----	78
7.2- PURIFICAÇÃO A PARTIR DA BANDA DO GEL DE AGAROSE-----	79
8- SEQUENCIAMENTO DIRETO DOS FRAGMENTOS-----	79
9- GEL DE SEQUENCIAMENTO-----	82
10- ANÁLISE DOS SEQUENCIAMENTOS-----	83

RESULTADOS

1- AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS-----	87
1.1- AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO A-----	87
1.2- AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO B-----	88
1.3- AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO C-----	89
2- SEQUENCIAMENTO DIRETO DOS FRAGMENTOS-----	90

DISCUSSÃO

1- MUTAÇÕES NO GENE <i>CYP11B1</i> -----	103
1.1- MUTAÇÕES DESCRITAS-----	103
1.2- MUTAÇÕES DETECTADAS-----	104
2- POLIMORFISMOS NO GENE <i>CYP11B1</i> -----	110

CONCLUSÕES-----	117
-----------------	-----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	121
---------------------------------	-----

ANEXOS-----	133
-------------	-----

***A*BREVIATURAS**

ABREVIATURAS

°C - graus Celsius
μg - micrograma
μl - microlitro
μM - micromolar
ATP - trifosfato de adenosina
cDNA - DNA complementar
ddNTPs - didesoxinucleotídeos
DNA - ácido desoxirribonucleico
dNTPs - desoxinucleotídeos
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
g - grama
HCA- Hiperplasia Congênita da adrenal
HSD- hidroxisteróide desidrogenase
21-OH- 21- hidroxilase
11β-OH- 11β-hidroxilase
3β-HSD- 3β-hidroxisteróide desidrogenase
HSG- hiperaldosteronismo supressível por glicocorticóides
ACTH- *adrenocorticotropic hormone* (hormônio adrenocorticotrófico)
PRA- *plasma renin activity* (atividade da renina plasmática)
17-OH Preg- 17-hidroxipregnenelona
DHEA- desidroepiandrostenediona
SDHEA- sulfato de desidroepiandrostenediona
LH- *luteinizing hormone* (hormônio luteinizante)
17-OHP- 17-hidroxiprogesterona
DOC- desoxicorticosterona
HCG- *human chorionic gonadotropin* (gonadotrofina coriônica humana)
CRF- *corticotropin releasing factor* (fator liberador de corticotrofina)
TDF- *testis determining factor* (fator determinante dos testículos)
SRY- *sex determining region on the Y chromosome*
AMH- *anti-mullerian hormone* (hormônio anti-mülleriano)
TSH- substância urinária S- tetra hidro
SNP- *Single Nucleotide Polymorphisms*
FMRP-USP- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo
UNIFESP/EPM- Universidade Federal de São Paulo/ Escola Paulista de Medicina
BEG- bom estado geral
BRNF- bulbas rítmicas e normofonéticas
FC- frequência cardíaca
spm- sístole por minuto
F- cortisol
S- 11-desoxicortisol
E2- estradiol
Dm- *diabetis mellitus*

LHRH- *luteinizing hormone-releasing hormone* (fator liberador de hormônio luteinizante)
Kb - Quilo base
KDa - Quilo Dalton
Km - Constante de Michaelis
L - litro
M- molar
M- molaridade
mA- mili Ampère
mg- miligrama
min- minutos
mL- mililitro
mm- milímetro
mM- milimolar
mmol- milimol
ng- nanograma
nm- nanômetro
pb- pares de bases
PCR - *Polimerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)
pmol- picomol
RNA - ácido ribonucléico
rpm - rotações por minuto
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
seg - segundos
StAR- *steroidogenesis acute regulatory protein*
TAE - Tris/ácido acético/EDTA
Taq - DNA Polimerase de *Thermus aquaticus*
TBE - Tris/ácido bórico/EDTA
TE- Tris- EDTA
TEMED - N,N,N',N' - Tetrametiletilenodiamina
Tm - Temperatura de fusão (*melting*)
Tris - Tris(hidroximetil)aminometano
U - unidades
V - volts
W - watts
NADP- nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato
NADPH- nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato reduzida

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Enzimas e genes da esteroidogênese da adrenal- **página 35**

Tabela 2- Mutações encontradas no gene *CYP11B1* em pacientes portadores de hiperplasia congênita da adrenal- **página 47**

Tabela 3- Resumo dos dados clínicos dos indivíduos portadores de deficiência da 11 β -hidroxilase- **página 64**

Tabela 4- Sequência dos pares de “primers” utilizados para amplificação dos fragmentos A, B e C do gene *CYP11B1*- **página 77**

Tabela 5- Sequência dos pares de “primers” internos utilizados para o sequenciamento dos fragmentos B e C do gene *CYP11B1*- **página 81**

Tabela 6- Polimorfismos no gene *CYP11B1* analisados em alelos não-relacionados- **página 99**

Tabela 7- Genótipos dos pacientes e seus familiares quanto ao gene *CYP11B1*- **página 99**

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Esquema simplificado da esteroidogênese da adrenal ressaltando os passos que envolvem as participações das enzimas CYP11B1 e CYP11B2 - **página 36**
- Figura 2-** Regulação da secreção de cortisol em indivíduos - **página 37**
- Figura 3-** Resumo esquemático de *CYP11B1* e *CYP11B2*- **página 43**
- Figura 4-** Esquema das mutações mais comumente encontradas em *CYP11B1*- **página 46**
- Figura 5-** *Crossing over* desigual entre *CYP11B1* e *CYP11B2*- **página 54**
- Figura 6-** Esquema dos fragmentos gerados e “primers” específicos de *CYP11B1*- **página 77**
- Figura 7-** Amplificação dos éxons 1 e 2 no fragmento A com os “primers” 11B1.2S/11B1.2A- **página 87**
- Figura 8-** Amplificação dos éxons 3 a 5 no fragmento B com os “primers”: A=11B3.5S/11B3.5A e B=11B3.5S/11B3.5A- **página 88**
- Figura 9-** Amplificação dos éxons 6 a 9 no fragmento C com os “primers” 11B6.9S/11B16.9A- **página 89**
- Figura 10-** Autorradiografia de parte do seqüenciamento do gene CYP11B1 mostrando a mutação Q356X- **página 90**
- Figura 11-** Autorradiografia de parte do seqüenciamento do gene CYP11B1 mostrando a mutação Q356X- **página 91**
- Figura 12-** Autorradiografia de parte do seqüenciamento do gene CYP11B1 mostrando a mutação Q356X- **página 92**
- Figura 13-** Autorradiografia de parte do seqüenciamento do gene CYP11B1, mostrando a inserção de uma citosina- **página 93**
- Figura 14-** Autorradiografia de parte do seqüenciamento do gene CYP11B1, mostrando a troca de G→A no códon 267- **página 94**
- Figura 15-** Autorradiografia de parte do seqüenciamento do gene *CYP11B1* indicando o polimorfismo L75L- **página 96**
- Figura 16-** Autorradiografia de parte do seqüenciamento do gene *CYP11B1*, indicando a troca T→C, no códon 82 do éxon 2- **página 97**

- Figura 17-** Autorradiografia de parte do seqüenciamento do gene *CYP11B1*, indicando a troca G→A, no códon 291 do éxon 5- **página 98**
- Figura 18-** Mutações e polimorfismos encontrados no gene *CYP11B1* neste trabalho- **página 105**
- Figura 19-** Alinhamento das seqüências da proteína CYP11B1 humana (1) com as de seis espécies diferentes ressaltando a posição 267 não conservada. São elas: (2) *Rattus norvegicus*; (3) *Sus scrofa*; (4) *Ovis aries*; (5) *Bos taurus*; (6) *Cavia porcellus*; (7) *Mesocricetus auratus*- **página 107**
- Figura 20-** Análise das alterações na função de *splicing* das mutações ¹⁷⁵³G→A e ¹⁷⁵³G→C (A); ²⁰³⁷G→A (B) através do programa “Splice site predictions”- **página 108**
- Figura 21-** Análise das alterações na função de *splicing* das mutações ¹⁵¹¹C→T (A), no íntron 3 (ISV3AS,-39) e ³⁶³⁶G→C (B), no íntron 8 (ISV8AS,-14) através do programa “Splice site predictions”- **página 109**
- Figura 22-** Haplótipos de *CYP11B1* carregando a mutação Q356X determinada em três pacientes não relacionados de origem Africana- **página 113**

RESUMO

RESUMO

A hiperplasia congênita da adrenal (HCA) é uma das heredopatias mais comuns. Mais de 90% dos casos são devido à deficiência da 21-OH e 5-8% são causados pela deficiência da 11 β -OH. Ambas envolvem a incapacidade para sintetizar cortisol, sendo a última uma falha na conversão de 11-desoxicortisol a cortisol.

A enzima 11 β -OH é codificada pelo gene *CYP11B1* localizado na região q22 do cromossomo 8. Os indivíduos com mutações nesse gene têm grande prejuízo da atividade enzimática, manifestando sintomatologia por excesso de andrógenos e, geralmente, hipertensão.

Neste trabalho, realizou-se a análise molecular de *CYP11B1* de sete pacientes, cinco meninas e dois meninos, com a deficiência da 11 β -OH (forma clássica). A análise do seqüenciamento revelou, em cinco pacientes, a ocorrência de um códon de parada de síntese protéica no éxon 6 devido à uma mutação pontual CAG→TAG (Glu³⁵⁶→Stop). Todos os cinco pacientes são de origem africana e esta mutação já foi descrita anteriormente em pacientes afro-americanos. Em uma paciente caucasiana, encontrou-se uma nova mutação no códon 267 (nucleotídeo 1753, a partir do ATG) do éxon 4 causada pela transição G→A do íntron 4. Esta mutação ocorre na posição -1 do sítio doador de *splice* e pode influenciar o processamento correto do RNAm. Além disso, encontraram-se duas outras alterações intrônicas (ISV3AS,-39, C→T e ISV8AS,-14, G→C). Na análise dessas seqüências para avaliar a possibilidade de estarem provocando alterações no processo de *splicing*, verificou-se que a primeira não altera em nada o sítio acceptor de *splice*. Já a variação no íntron 8 IVS8AS,-14, G→C apenas altera o *score* do sítio acceptor normal de *splice* de 77% para 92%. Finalmente, em uma paciente de origem árabe, encontrou-se a inserção de uma citosina na posição nucleotídica 3275 a partir do códon ATG da seqüência genômica. Essa inserção causa um deslocamento no quadro de leitura a partir deste ponto e gera um códon de terminação no aminoácido 421. Alguns polimorfismos foram detectados e um deles representa a seqüência de *CYP11B2*, sugerindo que eventos de conversão gênica podem ocorrer (D82D no éxon 2). O estudo de polimorfismos intragênicos evidenciou dois diferentes haplótipos para a mutação Q356X

em pacientes afro-brasileiros.

Identificamos duas mutações novas e uma previamente descrita no gene *CYP11B1* em pacientes com deficiência da 11 β -OH. Nossos dados sugerem a possibilidade de um efeito fundador em mutações frequentemente identificadas.

SUMMARY

SUMMARY

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is one of the most common inherited endocrine diseases. More than 90% of cases are due to steroid 21-OH deficiency, whereas 5-8% are caused by 11 β -hydroxylase (11 β -OH) deficiency, the inherited inability to synthesize cortisol (failure to convert 11-deoxycortisol to cortisol).

The 11 β -OH enzyme is encoded by the *CYP11B1* gene on chromosome 8q22. Patients suffering from 11 β -OH deficiency carry mutations on *CYP11B1* that destroy enzymatic activity. Such patients normally present signs of androgen excess and usually have hypertension.

We carried out molecular genetic analysis of *CYP11B1* encoding steroid 11 β -OH on seven patients, being five girls and two boys affected with classical form of 11 β -OH deficiency. Sequencing analysis revealed the occurrence of a premature stop codon in exon 6 due to a point mutation, CAG $\rightarrow$ TAG (Glu³⁵⁶ $\rightarrow$ Stop) in five patients. All of the five patients are from Afro-Brazilian origin. The same mutation has been described previously in patients from Afro-American descent. In a Caucasian patient, it was determined a novel mutation at exon 4. An aminoacid change in codon 267 (G267S) originates from the a G $\rightarrow$ A transition. This mutation occurs in the -1 position from the intron 4 donor splice site and may influence mRNA splicing. Moreover, two intronic mutations (ISV3AS,-39, C $\rightarrow$ T e ISV8AS,-14, G $\rightarrow$ C) were found in this patient. The analysis of those sequences evaluating the possibility to provoke abnormal splice process, it was verified that the first does not change the score of the normal acceptor splice site. On the other hand, the nucleotide variation in intron 8 (IVS8AS,-14, G $\rightarrow$ C) modifies the normal acceptor splice site score from 77% to 92%. Finally, in one patient of Arabian origin, it was found an insertion of a cytosine at nucleotide position 3275 from ATG codon in the genomic sequence. This insertion causes a reading frameshift from this point on and generates a premature stop codon at the amino acid 421. Sequence polymorphisms occurring in affected alleles were detected as well. Sequences from *CYP11B2* representing silent mutations on *CYP11B1*, as the D82D caused by the transition GAT $\rightarrow$ GAC at codon 82 in exon 2, suggest that gene conversions may occur. The study of intragenic polymorphisms gave

evidences for two different haplotypes for Q356X mutation in the African-Brazilian patients.

In summary, we have identified two novel *CYP11B1* mutations and one recurrent mutation in patients with 11 β -hydroxylase deficiency. Our data suggest the possibility of founder effect in frequently identified mutations.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1- ESTRUTURA, FUNÇÃO E REGULAÇÃO DO CÓRTEX ADRENAL.

As glândulas adrenais estão situadas sobre o pólo superior de cada rim. São achatadas e têm forma de meia lua. Seu tamanho varia com a idade e com as condições fisiológicas do indivíduo, mas em geral, no adulto, as glândulas pesam cerca de 8 g em conjunto. A glândula é encapsulada e dividida nitidamente em duas camadas concêntricas: uma periférica, o córtex, e outra central, a medula. Essas duas camadas podem ser consideradas dois órgãos distintos, unidos apenas topograficamente. Suas origens embrionárias são diferentes, provindo o córtex do epitélio celomático, e, portanto, do mesoderma, enquanto a medular se origina de células da crista neural, sendo, então, de origem neuroectodérmica (Junqueira e Carneiro, 1995).

O córtex adrenal de mamíferos apresenta três camadas distintas: zona glomerulosa, zona fasciculada e zona reticular. Essas zonas possuem papéis distintos na produção de hormônios esteróides. A glomerulosa sintetiza mineralocorticóides, dos quais o mais importante é a aldosterona que age, principalmente, nos túbulos renais, mas também na mucosa gástrica, glândulas salivares e sudoríparas, estimulando a reabsorção de sódio. A fasciculada produz glicocorticóides, representados pelo cortisol, no homem, e pela corticosterona, em roedores. Agem, em particular, no metabolismo protéico, lipídico e de carboidratos, promovendo catabolismo protéico, com conseqüente aumento da produção de glicogênio e elevação da taxa de glicose no sangue. A zona mais interna do córtex, limítrofe com a camada medular, recebe o nome de reticular. Sintetiza esteróides C₁₉, também chamados andrógenos adrenais (New, 1998).

Existem duas grandes questões a respeito da divisão da adrenal em zonas ainda não respondidas: a primeira diz respeito à localização e a origem das “stem cells” (células tronco) adrenocorticais; a segunda, ao mecanismo que causa a divisão funcional do córtex adrenal, com a conseqüente capacidade de cada zona produzir hormônios esteróides específicos. A necessidade de uma divisão funcional da glândula adrenal é aparente quando se considera que a quantidade de aldosterona necessária para o controle do balanço salino

está entre 100 a 1000 vezes menor que a quantidade de cortisol necessária para o controle do metabolismo dos carboidratos. Os precursores necessários para a biossíntese de aldosterona (em particular, progesterona e desoxicorticosterona) são também sintetizados em grande quantidade na zona fasciculada, em níveis que levariam ao excesso de mineralocorticóide se fossem convertidos a aldosterona. A divisão da adrenal é, portanto, um caminho para controlar a produção relativa de mineralocorticóides e glicocorticóides (New, 1998).

Para que o córtex adrenal sintetize suas três classes de hormônios, os glicocorticóides, os mineralocorticóides e os esteróides sexuais, uma série de passos enzimáticos é necessária. A figura 1 representa esquematicamente as etapas da esteroidogênese da adrenal, que se inicia através com o transporte do colesterol da membrana externa para a membrana interna da mitocôndria por intermédio da ação da proteína StAR (“steroidogenesis acute regulatory protein”). Esse passo é considerado hoje o fator limitante do controle preciso da esteroidogênese (Kallen *et al.*, 1998). Na zona fasciculada do córtex adrenal, para que ocorra a síntese de cortisol a partir do colesterol são necessárias cinco conversões enzimáticas (White *et al.*, 1994). A enzima P450_{sc} (CYP11A1) catalisa a conversão de colesterol em pregnenolona. Este passo inicial na síntese de hormônios esteróides envolve três reações: 20 α -hidroxilação, 22-hidroxilação e clivagem na cadeia lateral. A enzima 3 β -hidroxiesteróide-desidrogenase (HSD)/isomerase (HSD3B2) converte pregnenolona em progesterona e a 17-OH pregnenolona (17-OH Preg) em 17-OH progesterona (17-OHP). A P450_{c17} (CYP17) catalisa a conversão de pregnenolona e progesterona a 17-OH Preg e 17-OHP (17-hidroxilação), respectivamente, bem como a clivagem da cadeia lateral em C17 (atividade 17, 20-liase) para formar DHEA e androstenediona. A 21-hidroxilação da progesterona e 17-OHP em 11-desoxicorticosterona e 11-desoxicortisol, respectivamente, é mediada pela P450_{c21} (CYP21A2). A P450_{c11} (CYP11B1) e a P450_{c18}, também conhecida como P450_{c11AS} (CYP11B2), são enzimas intimamente relacionadas. A P450_{c11}, encontrada em abundância na zona fasciculada, catalisa a conversão de 11-desoxicortisol em cortisol e a P450_{c18} (CYP11B2), em menor quantidade, catalisa a conversão de desoxicorticosterona em corticosterona, e é encontrada somente na zona glomerulosa, onde existe atividade de 11 β -

hidroxilase, 18-hidroxilase e 18-metil oxidase, desse modo, catalizando todos os passos necessários para converter desoxicorticosterona a aldosterona (Lenore *et al.*, 2000).

A tabela 1 apresenta as enzimas necessárias para a esteroidogênese, suas localizações celulares, os genes que as codificam e suas respectivas localizações cromossômicas.

Tabela 1- Enzimas e genes da esteroidogênese da adrenal (extraída da atualização de Lenore *et al.*, 2000).

Atividade enzimática	Enzima	Localização celular	Gene	Localização cromossômica
Colesterol desmolase	CYP11A1	Mitocôndria	<i>CYP11A1</i>	15q23-q24
3 β -hidroxiesteróide-desidrogenase	3 β HSD (3 β HSDII)	Retículo endoplasmático	<i>HSD3B2</i>	1p13.1
17 α -hidroxilase/17,20 liase	CYP17	Retículo endoplasmático	<i>CYP17</i>	10q24.3
21 α -hidroxilase	CYP21A2	Retículo endoplasmático	<i>CYP21</i>	6q21.3
11 β -hidroxilase	CYP11B1	Mitocôndria	<i>CYP11B1</i>	8q21-22
Aldosterona sintase (corticosterona 18-meticorticosterona oxidase/liase)	CYP11B2	Mitocôndria	<i>CYP11B2</i>	8q21-22

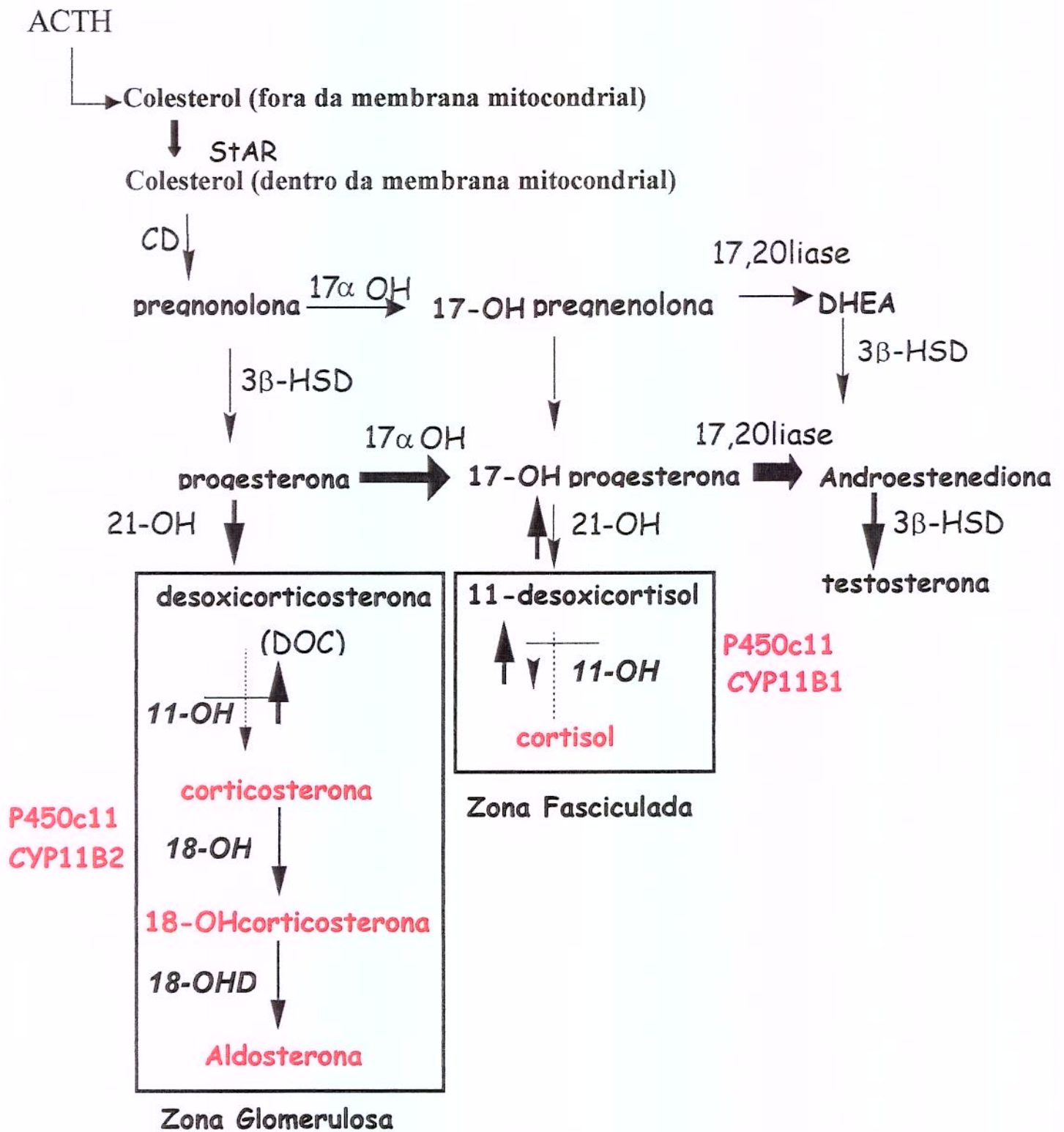


Figura 1- Esquema simplificado da esteroidogênese da adrenal ressaltando os passos que envolvem as participações das enzimas CYP11B1 e CYP11B2 (modificado de White *et al.*, 1994).

A regulação da secreção de cortisol está sob o controle do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). As concentrações circulantes de cortisol, por sua vez, retroalimentam por meio de uma alça de “feedback” negativo as concentrações de ACTH. Portanto, altos níveis circulantes de cortisol inibem, enquanto baixos níveis de cortisol estimulam a liberação de ACTH (figura 2). O sistema nervoso central determina o “set point” hipotalâmico para o nível de cortisol plasmático adequado. Os níveis de cortisol plasmáticos menores que o “set point” hipotalâmico-pituitário aumentarão o grau e a intensidade de pulsos secretórios de ACTH, com o intuito de elevar as concentrações plasmáticas de cortisol.

NORMAL

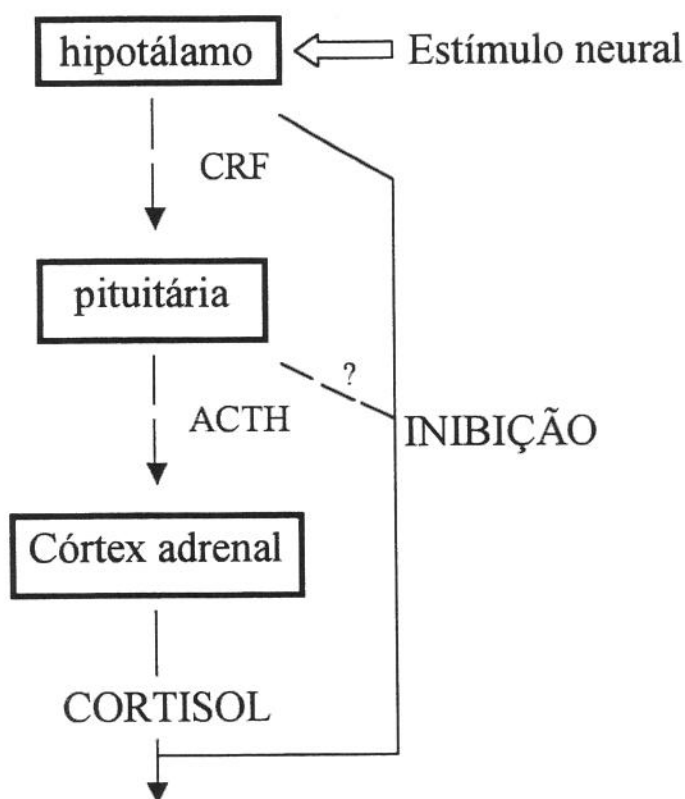


Figura 2- Regulação da secreção de cortisol em indivíduos normais. ACTH, Hormônio adrenocorticotrófico; CRF, fator liberador de corticotrofina (extraído de New *et al.*, 1989).

2- HIPERPLASIA CONGÊNITA DA ADRENAL

A Hiperplasia Congênita da Adrenal (HCA) representa um grupo de doenças autossômicas recessivas caracterizadas pela deficiência das atividades enzimáticas necessárias para a síntese de cortisol. Os resultados dessas deficiências enzimáticas são a diminuição da produção de cortisol com o aumento da secreção de ACTH, e conseqüentemente, hiperplasia da adrenal (New, 1998).

Dentre as principais formas de HCA, a deficiência da 21-hidroxilase se destaca por ser a mais comum, ocorrendo em cerca de 90% dos casos. Na maioria das populações, a deficiência da 11 β -OH compreende em torno de 5-8% dos casos de hiperplasia congênita da adrenal (Zachmann *et al.*, 1983) e ocorre em, aproximadamente, 1 para 100.000 nascimentos. É mais freqüente em determinadas populações, sendo por exemplo: de 1:30-40.000 em Israel, 1:5-7.000 em judeus provenientes do Marrocos (Rösler *et al.*, 1992) e pode chegar a mais de 25% dos casos de HCA na Arábia Saudita, devido ao grande número de casamentos consanguíneos nessas populações (Al-Jurayyan, 1995). Esses dados podem representar um efeito do fundador, baseado nas origens dos indivíduos afetados (White *et al.*, 1994).

Tanto a deficiência da enzima 21-OH como a da 11 β -OH são caracterizadas por um excesso de produção andrógenos, levando à virilização de fetos do sexo feminino. No entanto, os efeitos dos diferentes bloqueios enzimáticos na síntese de mineralocorticóides resultam em sintomas distintos: na deficiência grave da 21-OH, a não produção de aldosterona leva a perda de sal, desidratação e hipotensão arterial, enquanto na deficiência da 11 β -OH, o acúmulo dos metabólitos, 11-desoxicortisol e 11-desoxicorticosterona, causam retenção de sódio e hipertensão (Zachmann *et al.*, 1983, Levine *et al.*, 1980; Rösler *et al.*, 1982).

Os mecanismos responsáveis pela virilização intra-uterina podem ser explicados pelo processo de determinação e diferenciação sexual no feto. Até cerca de sete semanas após a fertilização, o embrião humano é potencialmente um organismo bissexual, equipado com primórdios gonadais e genitais capazes de se diferenciarem em fenótipo masculino ou feminino (Guerra *et al.*, 1997). A determinação sexual está relacionada com a existência de um gene no cromossomo Y, envolvido especificamente na diferenciação testicular,

denominado TDF (*testis determining factor*) (Page *et al.*, 1990). O gene *SRY* (*sex determining region on the Y chromosome*) foi identificado na região 1A1 do braço curto do cromossomo Y (Gubbay *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990). É encontrado no cromossomo Y de praticamente todos os mamíferos sendo sua expressão necessária para as gônadas indiferenciadas se transformarem em testículos (Hawkins, 1993). Portanto, a diferenciação sexual masculina na vida embrionária e fetal depende de duas funções dos testículos. A primeira é a secreção de quantidades suficientes de testosterona para direcionar a diferenciação das estruturas genitais internas masculinas (epidídimo, vaso deferente, vesículas seminais e ductos ejaculatórios e dos ductos de Wolff); a segunda é a secreção da glicoproteína hormonal não-esteroidal anti-mülleriana para suprimir o desenvolvimento dos ductos müllerianos, que resultariam em estruturas internas femininas (tubos de Falópio, útero, cérvix e parte superior da vagina).

Na HCA, em pacientes do sexo feminino, visto que não há produção anômala do hormônio anti-mülleriano, ocorrerá o desenvolvimento de estruturas reprodutivas internas normais. No entanto, como há excesso na produção de andrógenos durante o período crítico do desenvolvimento das estruturas sexuais, ocorrerá a masculinização da genitália externa. Os níveis de masculinização podem variar desde um pequeno aumento do clitóris até aumentos significativos com graus variados de fusão das saliências labioescrotais (New, 1998). Na vida pós-natal, a secreção contínua de altas taxas de andrógenos adrenais, causa maturação sexual prematura em ambos os sexos. Os sinais de hiperandrogenismo são crescimento pondero-estatural excessivo, com avanço da idade óssea, aumento de massa muscular, acne, pubarca precoce, hiperpigmentação de mamilos e genitais (Hochberg *et al.*, 1985). Outros sinais de excesso de andrógenos que ocorrem no período pós-natal incluem crescimento somático e maturação esquelética acelerados em crianças, levando ao fechamento prematuro das epífises ósseas e baixa estatura na idade adulta. O excesso de andrógenos pode também afetar o eixo hipotálamo-pituitária-gonadal levando à amenorréia ou oligomenorréia em mulheres e a alterações na espermatogênese no sexo masculino.

Outro sinal clínico importante da HAC por deficiência de 11 β -OH é a hipertensão arterial. Entretanto, apenas cerca de 30 a 60% dos casos de deficiência de 11 β -OH apresentam hipertensão (Al-Jurayyan, 1995, Huma *et al.*, 1995, Rösler, 1992), que muitas vezes, só se manifesta nas fases mais tardias da infância ou adolescência (Mimouni *et al.*,

1985). Portanto, a hipertensão pode ou não estar presente e somente a sua presença tem importância diagnóstica (Zachmann *et al.*, 1983, Levine *et al.*, 1980; Rösler *et al.*, 1982). Apesar do excesso de DOC, crises de perda de sal (Zachmann *et al.*, 1983, Hochberg *et al.*, 1984; Zadik *et al.*, 1984; Liel, 1993; Hochberg *et al.*, 1986) podem ocorrer na infância, quando os níveis de DOC ainda são relativamente baixos e há uma maior vulnerabilidade à perda de sal, provavelmente devido à supressão da secreção de renina pela DOC (White, 1991). A perda de sal também pode ocorrer após o tratamento com glicocorticóides, que também suprimem a DOC (Laue *et al.*, 1995, Kowarski *et al.*, 1968; Rodriguez-Portales *et al.*, 1988). É interessante salientar que pode haver uma completa dissociação entre as anormalidades bioquímicas, a gravidade da virilização e das manifestações cardiovasculares.

HCA por deficiência de 11β -OH, em uma forma não clássica ou parcial, tem sido descrita em alguns casos. É uma forma relativamente incomum, mas a sutileza com que se manifesta e as dificuldades associadas com o seu diagnóstico podem retardar sua identificação e resultar em uma redução significativa da estatura final na idade adulta, se não tratada a tempo com reposição hormonal (Clarck, 2000). Pacientes com a forma não-clássica de deficiência de 11β -OH geralmente nascem com a genitália normal (algumas meninas afetadas apresentam clitoromegalia discreta), porém apresentam sinais e sintomas de excesso de andrógenos quando crianças. Mulheres adultas podem apresentar hirsutismo e oligomenorréia. Entretanto, a deficiência da 11β -OH é provavelmente responsável por menos de 1% dos casos de hirsutismo não selecionado e (ou) oligomenorréia hiperandrogênica, usando como critério diagnóstico níveis séricos elevados de 11-desoxicortisol e níveis de cortisol normais, após o estímulo com ACTH. As principais diferenças entre a deficiência da 11β -OH forma não-clássica e a forma clássica indicam que a incidência da deficiência da 11β -OH parcial é mais baixa na primeira, sendo considerada menor que 1:100.000, no sexo feminino. Além disso, a virilização pré-natal é rara quando na forma clássica está sempre presente e a hipertensão aparece apenas em alguns casos, enquanto está quase sempre presente na forma clássica.

O diagnóstico da forma clássica da deficiência da 11β -OH é feito pela constatação de níveis basais elevados de três hormônios principais: 11-desoxicortisol sérico, DOC e a substância S-tetra-hidro urinária (THS). Alguns pacientes apresentam somente a elevação

seletiva de um desses hormônios. O diagnóstico pode ser complicado por diversos fatores, como ausência de hipertensão e presença de níveis normais de cortisol, após estímulo por ACTH. Como parâmetro diagnóstico da forma não clássica, tem sido utilizado o valor correspondente a três vezes os valores observados para o percentil 95% de uma população controlada para sexo e idade (Clarck, 2000). Estudos em heterozigotos para a deficiência da 11 β -hidroxilase clássica mostraram resultados inconsistentes. Alguns casos não demonstraram nenhuma anormalidade, enquanto que anormalidades hormonais moderadas, isto é níveis elevados de 11-desoxicortisol plasmático após estímulo com ACTH, foram encontradas em poucos casos (Peter *et al.*, 1999).

Além da HCA por deficiência da 11 β -OH, outras duas doenças têm suas origens em distúrbios nos genes que codificam a enzima 11 β -OH: a deficiência de corticosterona metil oxidase (deficiência da aldosterona sintase) e o aldosteronismo controlável por glicocorticóides (Helmberg, 1993). A deficiência de corticosterona metil oxidase (deficiência de aldosterona sintase) é caracterizada por perda de sal em recém-nascidos, sem traços de virilização (Royer *et al.*, 1961; Visser *et al.*, 1964; Ulick *et al.*, 1964). É provocada pela interrupção nos passos finais da biossíntese de aldosterona e, portanto, não envolve a biossíntese do cortisol. O aldosteronismo controlável por glicocorticóides difere das outras deficiências por ser de transmissão autossômica dominante típica de mutações com ganho de função (New *et al.*, 1980), sendo caracterizada por hiperaldosteronismo causando retenção de sal e hipertensão. Apesar de paradoxal, há relatos baseados em dados empíricos de melhora por administração de glicocorticóides (Sutherland *et al.*, 1966).

3- AS ISOENZIMAS 11 β -HIDROXILASE

Em humanos, existem duas isoenzimas que são responsáveis, respectivamente, pela biossíntese de cortisol e aldosterona: a CYP11B1 (também denominada P450X1B1, P450c11, 11 β -hidroxilase) e a CYP11B2 (P450X1B2, P450c18, P450cmo, P450aldo ou aldosterona sintase) (figura 3). As isoenzimas pertencem à classe dos citocromos mitocondriais P450 localizados na membrana interna da matriz. Cada uma é sintetizada com 503 resíduos de aminoácidos, porém um peptídeo sinal é clivado na mitocôndria para produzir a proteína madura de 479 resíduos. As seqüências das duas proteínas são 93%

idênticas. Apesar de CYP11B1 e CYP11B2, idênticas no tamanho com base nas seqüências dos seus aminoácidos, seu tamanho molecular é estimado em 51 e 49 KDa, respectivamente, a partir de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio; sendo que a razão dessa diferença não é bem conhecida (White *et al.*, 1994).

Como outras enzimas da família do citocromo P450, CYP11B1 e CYP11B2, utilizam moléculas de oxigênio e seus redutores equivalentes (por exemplo, elétrons) provenientes de NADPH para catalisar hidroxilações específicas. Os redutores não são obtidos diretamente do NADPH, mas, em vez disso, são obtidos de duas proteínas acessórias transportadoras de elétrons; a adrenodoxina redutase que aceita elétrons de NADPH e os doa para a adrenodoxina, que os transfere ao P450. Essas proteínas intermediárias são necessárias porque a NADPH doa elétrons aos pares, enquanto as citocromos P450s podem aceitar somente um elétron isolado.

Existem algumas diferenças entre a atividade dessas duas isoenzimas. No caso da CYP11B1, o esteróide hidroxilado (corticosterona ou cortisol) é liberado. Já a CYP11B2 é um caso mais complexo, porque essa enzima é apta para realizar três conversões oxidativas sucessivas. Várias evidências sugerem que o esteróide permanece ligado durante as três conversões e estudos estão sendo realizados para se confirmar essa hipótese (Fisher *et al.*, 2000).

Alguns aminoácidos diferem entre a CYP11B1 e a CYP11B2. Para avaliar sua importância nas diferentes especificidades funcionais, Fisher *et al.* (2000) realizaram um trabalho em que foram substituídos alguns aminoácidos específicos da aldosterona sintase (ácido aspártico D147, isoleucina I248, glutamina Q43 e treonina T493) por aminoácidos específicos da 11 β -hidroxilase (glutamato E147, treonina T248, arginina R43 e metionina M493). Constatou-se que as trocas I248T, Q43R e T493M não têm efeito na produção de esteróides quando comparado com a aldosterona sintase do tipo “selvagem”. No entanto, a troca D147E na CYP11B2 causou um aumento significativo na produção de corticosterona e um pequeno aumento na produção de aldosterona e de DOC. Isto parece ser principalmente por um aumento na hidroxilação na posição 11 β para a conversão de DOC a corticosterona. Por outro lado, a proteína CYP11B2-D147E não teve efeito na conversão de 11-desoxicortisol a cortisol. A forma reversa (CYP11B1-E147D), substituindo o resíduo de 11 β -hidroxilase pelo equivalente da aldosterona sintase, diminuiu a conversão de DOC a

corticosterona. Estes resultados demonstraram que uma mudança conservativa no aminoácido pode afetar significativamente a afinidade da enzima pelos substratos específicos (Fisher *et al.*, 2000).

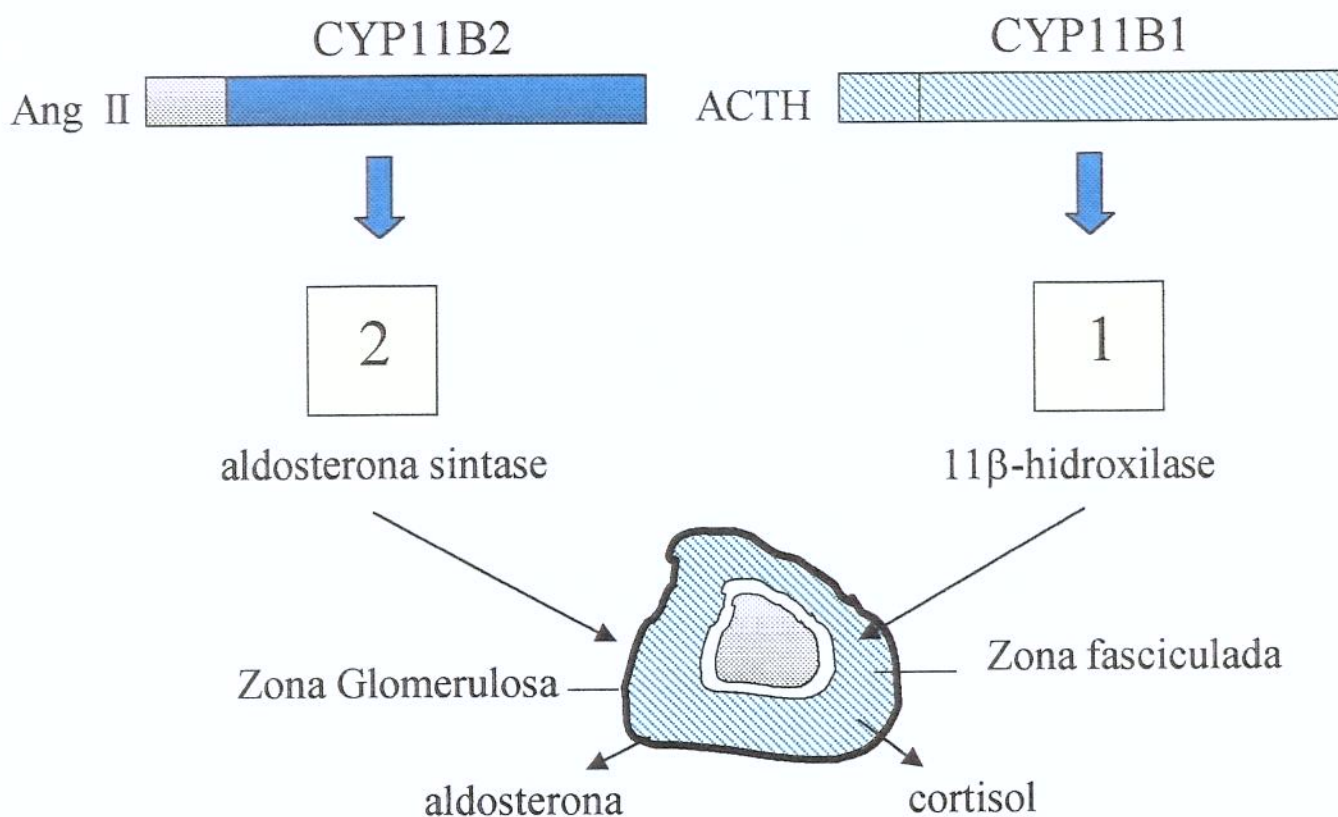


Figura 3- Resumo esquemático das funções de *CYP11B1* e *CYP11B2*. Glândula adrenal normal. *CYP11B1* codifica 11β-hidroxilase, é expresso em altos níveis na zona fasciculada e é requerido para a síntese de cortisol. *CYP11B2* codifica a aldosterona sintase, é expresso em baixos níveis na zona glomerulosa e é requerido para a síntese de aldosterona (White *et al.*, 1994).

4- GENE *CYP11B1*

A HCA devido à deficiência da 11 β -hidroxilase é resultado de mutações no gene que codifica para a enzima CYP11B1. Em 1987, Chua *et al.* isolaram clones para CYP11B1 de um banco de cDNA de adrenal humana e bovina. Utilizando-se de técnicas de hibridização e “Southern Blotting”, identificaram um gene que foi denominado *CYP11B* e sugeriram que a expressão de CYP11B1 ocorria a partir de uma única cópia no genoma haplóide humano.

Os métodos de análise de DNA, mais sensíveis, permitiram a constatação de um segundo gene, o *CYP11B2* em 8q21, através de transcrição reversa de RNA de indivíduos com HCA (Mornet *et al.*, 1989; Kawamoto *et al.*, 1990; Curnow *et al.*, 1991). Esse gene é extremamente homólogo ao *CYP11B* (redenominado *CYP11B1*). Ao contrário de *CYP11B1*, *CYP11B2* nunca foi detectado em tecidos da zona fasciculada por técnica de “Northern Blotting”. A análise do padrão de restrição de ambos os genes demonstrou que não se tratava de variação alélica, mas sim de dois genes íntegros (Mornet *et al.*, 1989).

À semelhança dos genes para 21-OH, a presença de dois genes para 11 β -OH parece ser o resultado da duplicação do gene original (*CYP11B*) (Strachan, 1989). Porém, ao contrário de *CYP21P* e *CYP21*, sendo *CYP21P* um pseudogene (Higashi *et al.*, 1986), os dois genes em 8q21 são ativos, o que está de acordo com a verificação das duas isoenzimas e citocromos diferenciais na membrana interna mitocondrial das duas zonas celulares (Mitani *et al.*, 1995). Ao contrário de *CYP21*, onde a duplicação do gene original aparentemente foi seguida de inutilização de uma das cópias, possibilitando o acúmulo de mutações, a duplicação de *CYP11B* iniciou um processo de especialização das funções metabólicas das enzimas que culminou na separação espacial de sua expressão na glândula (White *et al.*, 1994). O transcrito de *CYP11B1* codifica para uma enzima com atividade pura de 11 β -hidroxilase, na zona fasciculada, comprometida com a síntese de cortisol (Erdmann *et al.*, 1995). O *CYP11B2*, por sua vez, codifica uma segunda enzima capaz de agir como 11 β -hidroxilase, 18-hidroxilase e 18-oxidase, na zona glomerulosa (Curnow *et al.*, 1991 e White *et al.*, 1994).

Os genes *CYP11B1* e *CYP11B2* apresentam 9 éxons e 8 íntrons, dispostos em 7 kb de extensão e separados entre si por 40 kb. São 95% homólogos na sequência nucleotídica

dos éxons, 90% nos íntrons e 93% na sequência de aminoácidos das isoenzimas. As sequências de menor homologia concentram-se nas regiões 5' terminais ("upstream" ao códon de iniciação ATG). A posição dos íntrons, incluindo as sequências sinalizadoras de "splicing", são homólogas, correspondentes entre si e comparáveis ao gene *CYP11A* para a enzima colesterol desmolase (citocromo P450_{scc}), o que concorda com a relação dos dois genes como sendo membros da superfamília citocromo P450 (White *et al.*, 1991). Ambos os genes transcrevem mRNAs para enzimas com 503 aminoácidos, apresentando 24 resíduos excisáveis no momento da internalização, na membrana mitocondrial (peptídeo sinal).

5- MUTAÇÕES NO GENE *CYP11B1*

Mutações deletérias no gene *CYP11B1* (figura 4) estão presentes nas análises de DNA de pacientes com deficiência de 11 β -hidroxilase e são correlacionadas com alterações em sítios importantes da enzima (mutações "missense"), ou com interrupções da tradução normal do gene gerando proteínas alteradas (mutações "nonsense") (White *et al.*, 1991b; Helmberg *et al.*, 1992; Naiki *et al.*, 1993; Curnow *et al.*, 1993; Skinner e Rumsby, 1994; Nakagawa *et al.*, 1995; Geley *et al.*, 1996). Por muito tempo, se cogitou que a origem das mutações em *CYP11B1* e *CYP11B2* seriam eventos de conversão gênica, em analogia aos fenômenos de conversão amplamente verificados entre as duas cópias gênicas de *CYP21* e *CYP21P* (White *et al.*, 1992). Entretanto, a ausência de um pseudogene como *CYP21P*, a grande distância entre *CYP11B1* e *CYP11B2* (40 kb) e a alta homologia de éxons e de íntrons, sugerem que conversões gênicas entre eles, ainda que ocorram em frequências iguais àquelas verificadas entre *CYP21* e *CYP21P*, resultem, na grande maioria dos casos, em híbridos funcionais carregando sequências de éxons praticamente íntegros, estáveis e viáveis, codificando RNAs pouco diferentes dos produzidos pelos genes originais (White *et al.*, 1994). Como ambos os genes para CYP11B são ativos e expressam RNAs diferentes, a probabilidade de perpetuação de mutações deletérias previamente "estocadas" em regiões de baixa pressão seletiva não é significativa (Curnow *et al.*, 1993).

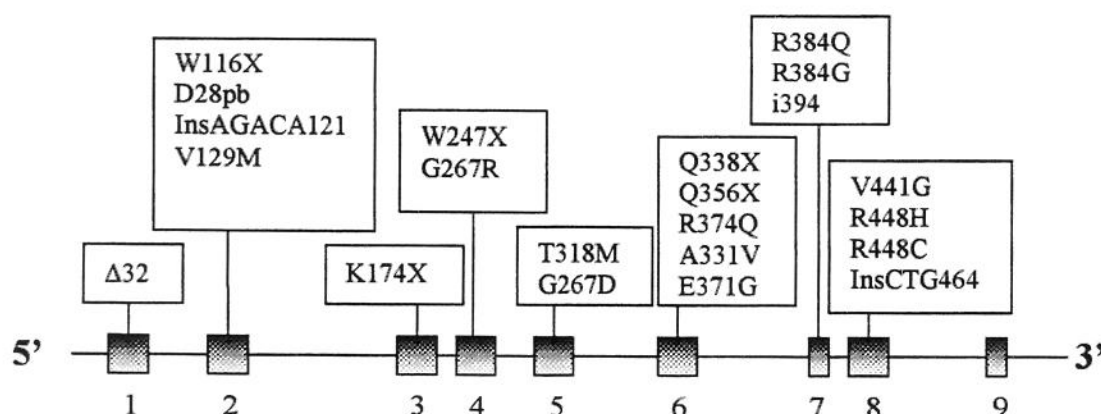


Figura 4- Esquema de algumas mutações encontradas em *CYP11B1* (White *et al.*, 1994).

Diversas mutações relacionadas com o fenótipo de HCA têm sido descritas em *CYP11B1* e estão concentradas, principalmente, em certos grupos étnicos com alto grau de endogamia (judeus iranianos e marroquinos). A recorrência dessas mutações sugere um forte efeito do fundador na origem da irradiação dos alelos mutantes (Rösler e White, 1993). A primeira alteração molecular causando deficiência da 11 β -hidroxilase descrita foi a mutação missense no códon 448 (Arg→His) em judeus de origem Marroquina (Helmberg *et al.*, 1992).

A maioria das mutações deletérias para a hidroxilação em c11 de 11 β -OH estão situadas entre os éxons 6-8 (Curnow *et al.*, 1993), formando um “cluster” de mutações. Duas hipóteses básicas têm sido levantadas para explicar essa concentração: mutações nessas regiões aconteceriam com a mesma frequência que no resto dos éxons, porém teriam maior probabilidade de serem deletérias na atividade enzimática, ou a região do “cluster” representaria uma área “hot-spot” no gene de *CYP11B1*, estando por alguma razão mais suscetível a mutações.

Segundo a “The Human Gene Mutation Database” (Krawczak e Cooper, 1997) até o momento foram descritas 31 mutações no gene *CYP11B1*, entre elas: 25 mutações missense/nonsense, 1 “splicing”, 2 pequenas deleções e 3 pequenas inserções (tabela 2).

Tabela 2- Mutações encontradas no gene *CYP11B1* em pacientes portadores de hiperplasia congênita da adrenal (Krawczak e Cooper, 1997). A- mutações *missense/nonsense*. B- Mutações 'splicing'. C- Pequenas deleções. D- Pequenas inserções.

A - mutações *missense/nonsense*

Número de acesso	Referência	Códon	Nucleotídeo	Aminoácido
CM980493	Merke et al., 1998	19	gCAA-TAA	Gln-Term
CM970405	Joeher et al., 1997	42	gCCC-TCC	Pro-Ser
CM930173	Naiki et al., 1993	116	TGG-TAG	Trp-Term
CM960464	Geley et al., 1996	129	cGTG-ATG	Val-Met
CM970406	Joeher et al., 1997	133	gAAT-CAT	Asn-His
CM930174	Curnow et al., 1993	174	gAAG-TAG	Lys-Term
CM960465	Geley et al., 1996	247	TGG-TAG	Trp-Term
CM960467	Skinner et al., 1996	267	cGGC-CGC	Gly-Arg
CM960466	Skinner et al., 1996	267	GGC-GAC	Gly-Asp
CM980494	Merke et al., 1998	318	ACG-AGG	Thr-Arg
CM930175	Curnow et al., 1993	318	ACG-ATG	Thr-Met
CM970407	Joeher et al., 1997	319	ACG-ATG	Thr-Met
CM960468	Geley et al., 1996	331	GCT-GTT	Ala-Val
CM930176	Curnow et al., 1993	338	gCAG-TAG	Gln-Term
CM930177	Curnow et al., 1993	356	cCAG-TAG	Gln-Term
CM960469	Geley et al., 1996	371	GAG-GGG	Glu-Gly
CM930178	Curnow et al., 1993	374	CGG-CAG	Arg-Gln
CM930179	Curnow et al., 1993	384	CGA-CAA	Arg-Gln
CM950330	Nakayama et al., 1995	384	gCGA-GGA	Arg-Gly
CM970408	Joeher et al., 1997	423	TATa-TAG	Tyr-Term
CM960470	Skinner et al., 1996	427	CGC-CAC	Arg-His
CM930180	Curnow et al., 1993	441	GTG-GGG	Val-Gly
CM960471	Geley et al., 1996	448	gCGC-TGC	Arg-Cys
CM910103	White et al., 1991	448	CGC-CAC	Arg-His
CM960472	Skinner et al., 1996	494	TGC-TTC	Cys-Phe

B - mutações em sítios de 'splicing'

Número de acesso	Referência	ivs	Doador/receptor	Localização relativa	Substituição
CS982152	Merke et al., 1998	5	ds	+1	G-A

C - Pequenas deleções

Número de acesso	Referência	codon	deleção
CD930942	Curnow et al., 1993	31	GCCCCGG^GTCCcCAGGACAGTG
CD991687	Cerame et al., 1999	393	GTGCTT^CAGAACTACCACATC

D - Pequenas inserções

Número de acesso	Referência	codon	inserção
CI941859	Skinner et al., 1994	121	AGACA
CI920932	Helmberg et al., 1992	394	GA
CI962264	Geley et al., 1996	464	CTG

A maioria das mutações já descritas para o gene *CYP11B1* resulta em uma proteína truncada não funcional. No entanto, algumas alterações desempenham papéis diferentes. A seguir, estão descritas todas as 31 mutações encontradas até o momento, em pacientes portadores de deficiência da 11 β -hidroxilase, quanto a atividade enzimática e a expressão das proteínas. O método utilizado foi o de estudo de expressão *in vitro*. Para esse tipo de análise utilizam-se, na maioria das vezes, células COS transfectadas com três plasmídios de expressão cada um contendo cDNAs que codificam para *CYP11B1* (normal ou mutante), adrenodoxina e adrenodoxina redutase humanas. As atividades enzimáticas são analisadas pela adição de 11-desoxicortisol. A partir daí, extrai-se esteróides dessas culturas e estes são separados por cromatografia para diferenciar cortisol de outros metabólitos não definidos (Joehrer *et al.*, 1997; Geley *et al.*, 1996; Curnow *et al.*, 1993; Naiki *et al.*, 1993; White *et al.*, 1991).

Q19X: transição CAA→TAA no éxon 1, resultando em um códon de terminação de tradução precoce produzindo um polipeptídeo truncado sem atividade enzimática (Merke *et al.*, 1998).

P42S: CCC→TCC, no éxon 1. Os cDNAs mutante e normal foram expressos em cultura de células COS-1 e constatou-se uma redução da atividade enzimática, sendo que a proteína mutante apresentou apenas 37% da atividade normal (Joehrer *et al.*, 1997).

T116X: TGG→TAG, no éxon 2, resultando em um códon de terminação de tradução precoce produzindo um polipeptídeo truncado sem atividade enzimática (Naiki *et al.*, 1993).

V129M: GTG→ATG, no éxon 2. Abole totalmente a atividade da enzima (Geley *et al.*, 1996).

N133H: AAT→CAT, no éxon 3. Reduz a atividade da enzima a 15% (Joehrer *et al.*, 1997).

K174X: AAG→TAG, no éxon 3, resultando em um códon de terminação de tradução precoce produzindo um polipeptídeo truncado sem atividade enzimática (Curnow *et al.*, 1993).

W247X: TGG→TAG, no éxon 4. Abole a atividade da enzima e forma proteína truncada não funcional (Geley *et al.*, 1996).

G267R e G267D: GGC→CGC e GGC→GAC, a primeira no último nucleotídeo do éxon 4 e a segunda no primeiro nucleotídeo do éxon 5. Além de causarem a troca de aminoácido, ocorrem, respectivamente, na posição -1 do sítio doador e +1 do receptor de “splice” e podem influenciar o processo de “splicing” do RNAm (Skinner *et al.*, 1996).

T318M: ACG→ATG, no éxon 5. Altera o sítio conservado de transferência de prótons nas hidroxilações em c11, anulando a atividade enzimática (Curnow *et al.*, 1993).

T319M: ACG→ATG, no éxon 6. Reduz a atividade da enzima a 17% (Joehrer *et al.*, 1997).

A331V: GCT→GTT, no éxon 8. Anula totalmente a atividade enzimática (Geley *et al.*, 1996).

Q338X: CAG→TAG, no éxon 6. Ocorre a formação de proteína truncada e não funcional (Curnow *et al.*, 1993).

Q356X: CAG→TAG, no éxon 6. Proteína truncada e não funcional (Curnow *et al.*, 1993).

E371G: GAC→GGG, no éxon 6. O domínio protéico em E371 pode ser de fundamental importância por ser conservado entre as espécies e, com esta mutação, a atividade enzimática fica comprometida, provavelmente por interromper interações com a proteína acessória, adrenodoxina (proteína oxi-redutora de P450c11) (Geley *et al.*, 1996).

R374Q: CGG→CAG, no éxon 6. Altera o sítio de ligação à adrenodoxina (Curnow *et al.*, 1993).

R384Q: CGA→CAA, no éxon 7. Em estudos de expressão em células COS-1, observou-se um comprometimento da atividade enzimática, por alterar sítio de ligação ao substrato (11-desoxicortisol) levando à formação da proteína não funcional (Curnow *et al.*, 1993).

R384G: CGA→GGA, no éxon 7. Altera sítio de ligação ao substrato (11-desoxicortisol) (Nakagawa *et al.*, 1995).

Y423X: TAT→TAG, no éxon 8. Ocorre a formação de uma proteína truncada e não funcional (Joehrer *et al.*, 1997).

R427H: CGC→CAC, no éxon 8. Altera uma arginina altamente conservada para uma histidina numa região do *CYP11B1* próxima ao sítio de ligação do grupo heme (Skinner *et al.*, 1996).

V441G: GTG→GGG, no éxon 8. Altera a estrutura secundária da região de ligação ao grupo heme (Curnow *et al.*, 1993).

R448C: CGC→TGC, no éxon 8. R448 é uma região conhecida por interagir com o grupo heme não-protéico e mutações nesta região podem anular a atividade enzimática (Geley *et al.*, 1996).

R448H: CGC→CAC, no éxon 8. Em estudos de expressão *in vitro*, observou-se atividade enzimática interrompida, por alterar sítio muito conservado de ligação ao ferro do grupo não-protéico heme (White *et al.*, 1991).

C494F: TGC→TTC, no éxon 9. Está localizado a 10 aminoácidos da posição C-terminal da proteína numa região envolvida com a transferência de elétrons para o grupo heme (Skinner *et al.*, 1996).

Splice: transição G→A no primeiro par de bases do íntron 5 entre o sítio doador de splice e uma mutação já descrita Q356X. Ocorre splicing anormal e formação de proteína não funcional (Merke *et al.*, 1998).

ΔC32: frameshift, deleção de um par de base - C-. Formação de proteína anômala sem atividade enzimática (Curnow *et al.*, 1993).

R394Δ1: deleção de um par no códon 394 (AAC→AC). Elimina o domínio de ligação do grupo heme. Atividade enzimática anulada (Cerame *et al.*, 1999).

i121: inserção de 5 pares de base, AGACA, no éxon 2, frameshift. Formação de proteína anômala sem atividade enzimática (Skinner *et al.*, 1994).

i394: inserção de 2 pares de bases no éxon 7, AG. Causa um frameshift começando com o códon 394 e levando a um 'stop códon' na posição 469. Formação de proteína anômala sem atividade enzimática (Helmberg *et al.*, 1992).

i464: inserção CTG no éxon 8, 'in frame'. Introduz o aminoácido leucina em 464, com formação de proteína anômala sem atividade enzimática (Geley *et al.*, 1996).

6- POLIMORFISMOS

Denominam-se polimorfismos de nucleotídeos (SNPs, do inglês “Single Nucleotide Polymorphisms”) aquelas alterações no DNA que não têm nenhum efeito fenotípico, seja porque a alteração não modifica a sequência primária de aminoácidos de um polipeptídeo seja porque a alteração resultante da sequência de aminoácidos codificada ocorre numa região não crítica do polipeptídeo. Logo, nem todas as proteínas variantes trazem consequências clínicas. Pelo contrário, muitas proteínas mostram atividade normal em duas ou mais formas estruturalmente distintas, geneticamente diferentes e relativamente comuns (Thompson *et al.*, 1991).

A definição de polimorfismos nos loci *CYP11B1* e *CYP11B2* é útil não somente para os diagnósticos, mas também para estudos de ligação ou estudos de associação para determinar se os genes têm um papel em, por exemplo, hipertensão (Skinner *et al.*, 1998). Através da análise por SSCP (“single strand conformational polymorphism”) de DNA de indivíduos com deficiência de 11 β -hidroxilase (Skinner *et al.*, 1996) e também de indivíduos com hiperaldosteronismo tratado por glicocorticóides (Lifton *et al.*, 1992) um grande número de polimorfismos nos loci *CYP11B1* e *CYP11B2* foram identificados.

Vários polimorfismos são encontrados no gene *CYP11B1*. Alguns são provenientes do gene homólogo *CYP11B2*, tais como a troca nucleotídica CGG→CAG na posição genômica 128 causando a substituição do aminoácido arginina para glutamina no codon 43 (R43Q), que embora provoque a troca de aminoácido, não modifica a atividade enzimática; e, a transição GAT→GAC na posição genômica 626 no éxon 2 que se trata de uma mutação silenciosa e não altera o aminoácido do códon 82 (D82D). Outros não tiveram a sua origem no *CYP11B2*, como CTG→CTA na posição genômica 225 no éxon 1 (L75L), GCG→GCA no nucleotídeo 2110 no éxon 5 (A291A) e a transversão CTG→CTC no nucleotídeo 2690 do éxon 6 representando a mutação silenciosa L362L. Skinner *et al.* (1996) descreveram o polimorfismo L75L, no éxon 1 em associação com uma mudança na sequência do intron 3 (IVS3AS ou DS+12,A→G). A frequência destes polimorfismos os faz úteis como marcadores intragênicos para o diagnóstico pré-natal ou estudos de famílias. As mudanças nas sequências nos íntrons 1 e 3, estão presentes no gene *CYP11B2* e podem representar o resultado da conversão gênica entre *CYP11B1* e *B2*. A conversão gênica entre

CYP11B1 e *B2* parece não ser a principal causa da doença nesses *loci*, possivelmente porque ambos os genes codificam produtos funcionais (Skinner *et al.*, 1996). Uma possível exceção é a mutação V386A no gene *CYP11B2*, encontrada em pacientes com HSG (Pascoe *et al.*, 1992). Esses indivíduos possuem um cromossomo que carrega três genes *CYP11B*, ao invés de dois. Isto provavelmente foi gerado pelo *crossing over* meiótico desigual (figura 6). O gene extra é um híbrido com as regiões regulatórias 5' correspondentes ao *CYP11B1* e as regiões codificadoras 3' de *CYP11B2* (Pascoe *et al.*, 1992). Células transfectadas com cDNAs híbridos contendo os três primeiros éxons de *CYP11B1* sintetizaram aldosterona em níveis próximos àqueles das células carregadoras de *CYP11B2*, mas células transfectadas com híbridos contendo os cinco primeiros ou mais éxons de *CYP11B1* não sintetizaram quantidades detectáveis de aldosterona. Esses dados demonstram que hiperaldosteronismo supressível a glicocorticóides é causado pela expressão de um gene que está regulado como *CYP11B1*, mas que codifica uma proteína capaz de sintetizar aldosterona (Pascoe *et al.*, 1992).

7- CONVERSÃO GÊNICA

O mecanismo mais importante pelo qual o genoma aumenta em tamanho e complexidade é a duplicação de seqüências do gene e a subsequente divergência. A importância da duplicação gênica é que uma cópia do gene duplicado pode sofrer mutações na ausência de seleção, uma vez que a outra cópia pode fornecer a proteína necessária à manutenção da função celular. Isso é denominado flutuação genética que pode ser desejável na geração de diversidade genética em genes duplicados, mas, em outras situações, ela deve ser evitada. Isso pode ocorrer de duas maneiras. O *crossing over* desigual leva ao acúmulo de cópias extras de um gene repetido, um após o outro. Quando há um excessivo número de cópias de uma forma mutante que se acumulam, o indivíduo que as carrega pode ficar em desvantagem seletiva, e as mutações seriam, portanto, eliminadas da população. As mutações, ao invés de eliminadas, podem ser corrigidas por **conversão gênica**. Nesse caso, uma quebra numa fita de DNA do alelo normal leva ao emparelhamento das bases dessa fita com a fita complementar no alelo mutante. Após o reparo e a replicação, a seqüência mutante é substituída pela seqüência normal. Esse resultado é mais provável que o inverso,

ou seja, a sequência normal ser trocada pela sequência mutante, pelo fato de existirem mais alelos do tipo selvagem que alelos mutantes. Assim, a quebra que inicia o processo é mais provável de acontecer no selvagem (Watson *et al.*, 1997).

Em genética humana, o termo **conversão gênica** refere-se à mudança de toda ou parte da sequência de um gene homólogo; conversões gênicas parecem ser o produto de dois eventos de *crossing over* homólogos, mas o produto recíproco, geralmente, não é encontrado (Baltimore, 1981). Fardella *et al.* (1996) encontraram a inserção dos éxons 3 e 4 do gene *CYP11B2* no gene *CYP11B1*, provavelmente, ocorrida a muitas gerações atrás como uma mutação de linhagem germinativa pré-meiótica, mas que, pode ter sido perdida como um corpúsculo polar de um óvulo ou como um espermatozóide que não fertilizou o óvulo.

Muitas conversões gênicas têm sido descritas em muitos *loci*, incluindo os genes da imunoglobulina (Baltimore, 1981) e genes da globina (Slightom *et al.*, 1980; Liebhaver *et al.*, 1981). No *locus* da 21-hidroxilase, conversão de parte ou de todo o gene *CYP21* funcional para sequências correspondentes no pseudogene *CYP21P* não funcional é de aproximadamente 85% dos alelos que causam a forma mais comum de HCA (Miller *et al.*, 1988; Morel *et al.*, 1991). Conversões gênicas parecem ser devidas a duas ou mais recombinações homólogas, em contraste com as recombinações não-homólogas que resultam na duplicação do *locus* da 21-OH (Gitelman *et al.*, 1992) ou nas recombinações homólogas únicas que levam aos genes híbridos *CYP11* que causam a hipertensão supressível por glicocorticóide (Lifton *et al.*, 1992; Pascoe *et al.*, 1992). Uma mutação pontual encontrada em judeus de origem Iraniana com CMOII (deficiência da corticosterona metiloxidase II), Val³⁸⁶→Ala, pode ser atribuída a uma conversão gênica, pelo fato de o *CYP11B1* possuir o aminoácido Ala na posição 386 (Pascoe *et al.*, 1992).

Podem existir conversões gênicas não deletérias entre *CYP11B1* e o *CYP11B2* que, como já descrito, possuem uma grande homologia. Assim alguns polimorfismos observados em *CYP11B1* tiveram sua origem em *CYP11B2* (R43Q e D82D), provocando uma certa variabilidade alélica.

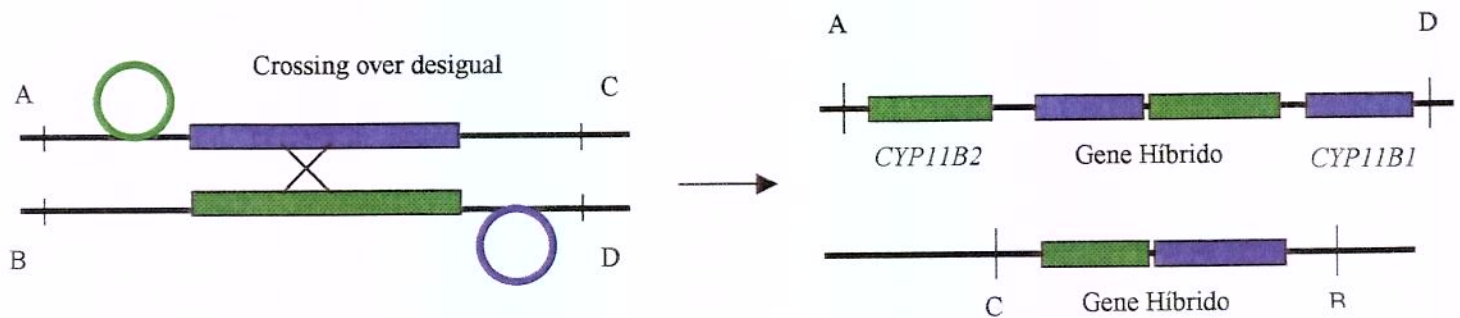


Figura 5- Crossing over desigual entre *CYP11B1* e *CYP11B2*. *CYP11B2* está à esquerda e é 95% similar ao *CYP11B1*. A direção de transcrição ocorre da esquerda para a direita. **A e C** e **B e D** são regiões homólogas 5'e 3', respectivamente, dos genes *CYP11B*. Um *crossing over* entre estes genes durante a meiose resulta em um gameta com material genético duplicado, contendo um gene híbrido com seqüências 5' de *CYP11B1* e seqüências 3' de *CYP11B2*. A presença de uma única cópia de um alelo é suficiente para explicar as características do hiperaldosteronismo supressível a glicocorticóides. O segundo gameta é deficiente, contendo somente o gene híbrido complementar. Deleções e duplicações podem ser detectadas por Southern Blotting de DNA genômico como resultado de um mapa de restrição alterado (Pascoe *et al.*, 1992).

8- EFEITO DO FUNDADOR

Os acidentes genéticos inerentes às populações de tamanho pequeno podem ser importantes durante a colonização. Se uma ilha ou pedaço de um habitat, não ocupados previamente por uma determinada espécie, é colonizado por um ou poucos indivíduos desta mesma espécie, todos os genes da população originada derivarão daqueles portados pelos fundadores e também de mutações e imigrantes subsequentes (Futuyma, 1997).

Uma colônia fundada por um par de indivíduos diplóides pode ter, no máximo, quatro alelos por loco, embora possa existir um número muito maior de alelos na população de onde vieram. Entretanto, ainda que o número de alelos seja reduzido, o grau de heteroziguidade, e portanto a variância genética, é quase tão alto quanto o da população de

onde vieram os colonizadores. Isto ocorre simplesmente porque os alelos raros pouco contribuem para o nível de heterozigosidade da população originadora e são esses mesmos alelos que provavelmente estarão ausentes na colônia. Entretanto, se a colônia permanecer pequena, a heterozigosidade da colônia diminuirá rapidamente por deriva genética e lentamente haverá sua recomposição por mutação e deriva; a menos que a seleção natural aumente a frequência dos alelos raros. Se, entretanto, a colônia crescer rapidamente, não haverá grande redução na quantidade de variação genética (Futuyma, 1997).

Mayr (1954) propôs que a mudança genética poderia ser extremamente rápida e penetrante em todo o genoma nas populações pequenas e localizadas que são fundadas por poucos indivíduos e cuja troca gênica com o corpo principal da espécie esteja interrompida. As pressões seletivas atuando sobre a colônia são, provavelmente, diferentes porque o ambiente de uma área pequena é, frequentemente, mais homogêneo que aquele de uma área maior e, daí, as pressões conflitantes que atuam sobre uma população amplamente distribuída podem ser menos numerosas. As frequências alélicas diferirão, em alguns locos, daquelas da população parental devido a acidentes de amostragem, como deriva genética.

Essa forma de deriva genética¹ ocorre quando um pequeno grupo sai de uma grande população para fundar nova colônia. Essa “oscilação aguda”, chamada **efeito do fundador**, é originada de uma única amostragem de geração, seguida de diversas gerações durante as quais a população permanece pequena. Por exemplo, o efeito do fundador é, provavelmente, responsável pela ausência do grupo sanguíneo B nos índios americanos, cujos ancestrais chegaram em número muito pequeno vindo pelo estreito de Bering, durante o final da última Era Glacial, há cerca de 10.000 anos. Exemplos mais recentes são vistos em isolados religiosos como os Dunkers e a Velha Ordem dos Amish na América do Norte. Essas seitas foram fundadas por pequeno número de migrantes a partir de suas congregações bem maiores na Europa Central. Eles têm permanecido desde então quase que totalmente fechados ao convívio com a população americana vizinha. Como resultado, as frequências gênicas de seus grupos sanguíneos são muito diferentes daquelas das populações vizinhas, tanto na Europa como na América do Norte (Suzuki *et al.*, 1992).

Nas famílias originárias da comunidade judaica de Marrocos, a presença da mutação R448H parece ser um evento bastante comum entre indivíduos portadores da

deficiência da 11 β -hidroxilase, filhos de casais consanguíneos. Estes resultados foram os primeiros a apresentarem evidências de um efeito do fundador. Houve poucos casamentos entre comunidades judaicas (não-européias) relativamente pequenas antes da imigração para Israel e, então, a heterogeneidade genética em certos *loci* pode estar limitada (White *et al.*, 1991). Devido à grande proporção de indivíduos com deficiência da 11 β -hidroxilase pela mutação R448H, em Israel, o diagnóstico pré-natal nessa população pode ser informativo em muitos casos se este único alelo mutante for seqüenciado (White *et al.*, 1991). Outra mutação recorrente que parece representar um efeito do fundador é a Q356X que foi determinada em pacientes de origem afro-Americana e afro-Brasileira (de Carvalho *et al.*, 1999; Merke *et al.*, 1998; Curnow *et al.*, 1993).

Assim, combinando-se o estudo de polimorfismos com os de mutações recorrentes no gene *CYP11B1* responsáveis pela deficiência da 11 β -hidroxilase poder-se-ia avaliar o efeito do fundador sobre a frequência de alelos mutantes representam dentro de um determinado grupo étnico.

¹ Deriva Genética: mudanças na frequência de um alelo que ocorrem porque os genes da prole não representam uma amostragem típicas dos genes parentais.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Os objetivos propostos para este trabalho foram:

- ✓ determinar possíveis mutações e polimorfismos no gene *CYP11B1* em indivíduos com diagnóstico de HCA por deficiência da 11 β -OH;
- ✓ determinar a frequência de heterozigose do gene responsável pela deficiência da 11 β -OH em familiares de pacientes com HCA;
- ✓ analisar o efeito do fundador na frequência de alelos mutados recorrentes ligados à HCA devido à deficiência da 11 β -OH em pacientes brasileiros.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1- CASUÍSTICA

Foram estudados 16 indivíduos oriundos de 7 famílias diferentes, sendo sete afetados (um de cada família) e 9 familiares. Dois indivíduos afetados eram do sexo masculino e cinco, do sexo feminino, sendo que duas foram criadas no sexo masculino até encaminhadas à avaliação psicológica e feita a identificação com sexo feminino. Os pacientes possuíam idades variando entre 3 dias e 20 anos. Dois pacientes foram avaliados no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da FMRP-USP seguidos pelo Dr. Ayrton C. Moreira e pela Dra. Margaret de Castro, 3 na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento HC- FMUSP, seguidos pela Dra. Berenice Mendonça e Dra. Tânia A. A. Bachega e 2 pacientes no Grupo Multicêntrico Brasileiro de Estudo da Hiperplasia Congênita da Adrenal, UNIFESP/EPM, seguidos pelo Dr. Cláudio E. Kater.

2- COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de sangue desses pacientes foram coletadas nos ambulatórios onde se realizaram as consultas. Retiraram-se 5 mL de sangue periférico dos pacientes (crianças) e 20 mL dos pais, colhidos com EDTA, utilizado para obtenção das dosagens hormonais e extração de DNA genômico.

3- DOSAGENS HORMONAIS E DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL

As dosagens hormonais dos indivíduos participantes deste estudo foram realizadas nos laboratórios de origem dos pacientes e gentilmente cedidas pela equipe médica responsável.

O diagnóstico da deficiência de 11 β -OH foi estabelecido, na forma clássica da doença, pelos elevados níveis basais circulantes de 11-desoxicortisol. Adicionalmente, há

elevação dos andrógenos plasmáticos (testosterona, SDHEA, androstenediona) e supressão da atividade da renina plasmática. Anteriormente, utilizavam-se as dosagens urinárias de metabólitos tetra-hídricos (tetra-hidro-S) e tetraidrodesoxicorticosterona. Na forma não-clássica da deficiência da 11 β -OH, há a necessidade de se estabelecer o diagnóstico através de teste de ACTH exógeno. Nesse caso uma elevação maior que 3 vezes os valores do percentil 95% de indivíduos normais comparados por sexo e idade. A seguir, estão descritos os relatos dos casos de todos os pacientes estudados nesse trabalho.

A tabela 3 está indicando um resumo das principais características clínicas observadas nos pacientes com deficiência da 11 β -hidroxilase estudados neste trabalho.

Tabela 3- Resumo dos dados clínicos dos indivíduos portadores de deficiência da 11 β -hidroxilase.

P	Idade na 1ª consulta	Peso (kg)	Altura (cm)	Idade do diagnóstico	Genitália	Pilificação	Pressão Arterial	Cariótipo	Sexo de criação
1	3m16d	4,6	57	2a8m	Clitoromegalia (2,5 x 1,0 cm)	Tanner PII	140/90 mmHg	46, XX	feminino
2	20a	51,5	160	20a	clitório sepultado, orifício perineal único	Tanner PV	160/110 mmHg	46, XX	feminino
3	5a6m	19,0	110	5a6m	Micropênis Criptoquirdia bilateral	Tanner PIII	100/60 mmHg	46, XX	masculino
4	3d	3,9	53	11a3m	Clitoromegalia	Tanner PIV	140/110mmHg	46, XX	feminino
5	2m	4,8	58	7a 11m	Macrogenitossomia	Tanner PII	130/80 mmHg	46, XY	masculino
6	12a4m	36,7	145,0	21a4m	Ambíguas com clitoromegalia	Tanner PIII	90/65 mm Hg	46, XX	feminino
7	5a11m	37,9	145,5	5a11m	Macrogenitossomia	Tanner PIV	140/90 mmHg	46, XY	masculino

Paciente 1

Identificação: T.F.S., atendida pela primeira vez aos 3 meses e 16 dias, sexo de criação feminino, de ascendência africana.

Motivo do encaminhamento: encaminhada com 1 mês de vida ao endocrinologista, pois os pais notaram que a genitália da criança era anormal.

Antecedentes pessoais: mãe fizera pré-natal e negava uso de medicações durante a gravidez; criança nascida a termo, pesando 2.350 g. Mãe referia que a criança não apresentava vômitos, diarreia e nem desidratação, porém não estava ganhando peso adequadamente. A criança tem um irmão do sexo masculino, sem problemas de saúde. Os pais são primos de primeiro grau e negam casos semelhantes na família.

Exame Físico: BEG, corada e hidratada; com peso de 4.600 g e comprimento de 57 cm; pele com discreta hiperpigmentação; musculatura normotrófica, com ausência de hipertrofia; coração 2 BRNF, sem sopros, FC= 140 spm; não foi aferida a PA na primeira consulta; pulmões limpos; ausência de mamas (Tanner M1); genitália feminina, com clitoromegalia (1,8 x 0,8 cm), fusão de rafe e sem pêlos pubianos (Tanner P1).

Exames complementares

Exames Laboratoriais Basais: Cortisol= 26,0 µg/dL (5-25); testosterona= 110 ng/mL (<10); DHEAS= 44 µg/dL (<30); 17-α OHP= 503 ng/dL (10-200); 11-desoxicortisol= 6030 ng/dL (25-68); corticosterona= 2,8 µg/dL (<2); ACTH= 365 pg/mL (10-50); sódio= 130 mEq/L (135-145); potássio= 5,0 mEq/L (3,5-4,5); cariótipo= 46,XX; idade óssea: 3 meses = idade cronológica Realizou ainda teste de estimulação com ACTH:

	basal	60min
cortisol (ug/dL)	7,8	9,6
17OHP (ng/dL)	539	507
11desoxicortisol (mmol/L)	134	128
ACTH (pg/mL)	368	-
Corticosterona (ug/dL)	2,8	-

Diagnóstico: A impressão diagnóstica foi de genitália ambígua a esclarecer, por provável HCA por deficiência de 21-OH, forma não perdedora de sal. Foi optado por iniciar tratamento com glicocorticóide oral. Devido a seguimento irregular, a paciente apresentou pubarca prematura (Tanner 2), aumento do clitóris (2,5 x 1,0 cm) e hipertensão

arterial (150x100 mmHg) com a idade de 2 anos. A partir desse quadro confirmou-se HCA por deficiência da 11 β -hidroxilase.

Conduta: Aos 2 anos e 6 meses foi submetida à correção da genitália. Família tornou-se mais aderente ao tratamento e houve melhora da hipertensão arterial (120x90 mmHg). Atualmente apresenta valores de andrógenos, velocidade de crescimento e idade óssea compatíveis com a idade cronológica.

Paciente 2

Identificação: I.B.R., 20 anos, sexo de criação feminino, de ascendência africana, procedente da Bahia.

Motivo do encaminhamento: queixa de genitália ambígua desde nascimento. Conta que foi encaminhada ao médico aos 2 meses devido a dúvida na identificação sexual sendo orientado atendimento especializado, para ser submetida à cirurgia.

Antecedentes pessoais: Gestação sem patologias ou uso de medicações; nascida de parto normal, domiciliar a termo, sem intercorrências. Sem informações quanto às condições de nascimento. Nega história de desidratação. Desenvolvimento neuro-psicomotor normal. Refere que sempre foi pequena e magra. No Hospital Darcy Vargas iniciado Meticorten® (não sabe dose). Nega uso de Florinef®. Submetida à genitoplastia aos 3 anos. Submetida a nova cirurgia devido aumento do clitóris aos 11 anos, no mesmo Hospital. Paciente refere aparecimento de pêlos pubianos, axilares e menarca (ciclos mensais, 6 dias, pouca quantidade), aos 11 anos. Pouco desenvolvimento mamário aos 12/13 anos. Amenorréia desde os 16 anos, com aumento musculatura, engrossamento da voz, aparecimento de pêlos no tórax e na face (mento e buço). Durante o período em que menstruou fez uso regular da medicação. Opção sexual pelo sexo feminino à partir dos 13 anos, pois, até então, gostaria de ser homem, acha bom não menstruar. Nega relacionamento afetivo ou relações sexuais. Segundo informante, tinha aspecto feminino até 16 anos, quando passou a ter aspecto masculino, não querendo usar roupas e adereços femininos. Antecedente de HCA desde os 9 anos, sem tratamento específico. Acidente

vascular cerebral com seqüela, fazendo uso de medicação anti-hipertensiva com controle no Posto Saúde. Voltou a procurar auxílio médico (Hospital Darcy Vargas) sendo encaminhada para Endocrinologia no HC com diagnóstico de HCA por deficiência 21-hidroxilase. Nessa ocasião, suspeitado de HAC por deficiência 11 β -hidroxilase. Pais consanguíneos (primos em terceiro grau).

Exame Físico: BEG, corada, aparência masculina, voz grave, PA= 160/110 mmHg, FC= 80 spm, 2 BRNF sem sopros; peso= 51,5 Kg; altura alvo de 160 cm; altura de 149,5 cm; pele/anexos: pêlos depilados em mento e buço; pêlos terminais em tórax, abdome e membros superiores e inferiores 4+/4+; distribuição masculina dos pêlos em genitália e acne facial. Genitália: clitoris sepultado, orifício perineal único, grandes lábios pigmentados. Mamas: Tanner II, pêlos pubianos Tanner V.

Exames complementares

Exames de imagem: US pelve: útero com forma, contornos e dimensões normais, ecotextura característica, cavidade virtual; 6,2x2,3x3 cm; ovários de dimensões, localização e textura normais; OD = 2,1x1,3x2,0 cm OE = 2,3x1,2x1,9 cm; TC abdome: adrenais com dimensões aumentadas e morfologia normal; sem nódulos focais.

Exames Laboratoriais: PA= 150/100 mmHg; Androstenediona= 34 ng/mL (0,2-0,6); Testosterona= 1180 ng/dL (<30); 17-OHP= 33 ng/mL (0,1-0,8); DHEAS= 70,85 μ g/dL (<30); composto S= 198 ng/mL (0,8-3,6); F= 15 (FIA), 28 Mcg/dL (RIE).

OBS: a paciente apresentava níveis normais de cortisol avaliados pelo método RIE e FIE, não compatíveis com a forma clássica da doença. Não podemos afastar a presença de reação cruzada com precursores.

Diagnóstico: Forma clássica da hiperplasia da adrenal congênita por deficiência da 11 β -OH; seqüela de AVC por provável crise hipertensiva.

Conduta: a avaliação psicológica e o tratamento posterior mostraram que a paciente se identifica com o sexo feminino e atualmente está bem integrada neste sexo social, apresentando desenvolvimento mamário normal Tanner V e ciclos regulares.

Paciente 3

Identificação: E.S.F., encaminhada aos 5 anos e 6 meses, sexo social masculino.

Motivo do encaminhamento: nascida com micropênis e criptorquidia bilateral.

Antecedentes pessoais: apresentando-se com pubarca precoce iniciada aos 12 meses e incontinência urinária primária. Pais são primos em primeiro grau.

Exame físico: peso de 19 Kg; altura de 110 cm (+ 1,2 DP); PA= 100x60 mmHg
Idade óssea= 11 anos. Genitais: pênis 2,9 x 1,0 cm (<2,5 DP), uretra peniana, bolsa rasa e vazia, sem gônadas palpáveis na região inguinal; pêlos pubianos Tanner III, mamas Tanner I. Cariótipo 46, XX; sódio= 137 mEq/L (135-145); potássio= 4,6 mEq/L (3,5-4,5).

Exames complementares

Exames de imagem: ultrassom, uretrocistografia e tomografia computadorizada demonstraram presença de útero, seio urogenital longo e hiperplasia da adrenal.

Exames laboratoriais: realizado teste de estímulo com ACTH e teste de supressão com dexametasona:

Tempo	Cortisol μg/dL	11desoxicortisol ng/mL	17OHP ng/mL	DHEA ng/mL	Andro ng/mL	Prog ng/mL	Testo ng/dL	E2 pg/mL	DHEAS ng/mL
0'	7,3	40	0,7	6,7	5,2	0,8	160	< 10	316
valores normais	7 a 25	0,8 a 3,6	0,1 a 0,8	0,2 a 1,4	0,2 a 0,6	<1,0	<30	<10	20 a 150
60' após ACTH	9,0	81	0,9	7,2	5,1	1,3			
Dex 2 mg 2 dias	0,6	1,0	0,4	0,3	<0,2	<0,1	15	<10	94

Diagnóstico: HCA devido à deficiência da 11β-hidroxilase.

Conduta: À avaliação psicológica, observou-se identificação com sexo feminino e orientou-se para mudança do sexo social para feminino, o que foi acompanhado de controle

espontâneo da micção. Realizada genitoplastia com excelente resultado. Medicada com acetato de cortisona 18 mg/m²/dia com controle do hiperandrogenismo.

Paciente 4

Identificação: S.B., 11 anos e 6 meses, ascendência árabe, natural de Cruz Alta-RS, registrada como sexo feminino após resultado de cariótipo.

Motivo do encaminhamento: o obstetra percebeu aumento de clitóris e orifício vaginal fechado.

Antecedentes pessoais: Concepção 9 meses após suspensão de Clomid® usado durante 2 anos, nega uso de cremes ou outras medicações durante gestação. Nascida a termo; parto cesáreo, sem intercorrências. Peso ao nascimento de 3,9 kg e comprimento de 53 cm. Desenvolvimento neuropsicomotor normal. Nega alterações de pilificação ou hidratação. Aos 3 dias de idade foi encaminhada para São Paulo e introduzido Meticortem® (5 mg 1/4cp por dia) e aos 40 dias foi submetida a genitoplastia. Aos 4 anos apresentou quadro de diarreia, vômitos, febre de 40 graus e desidratação grave. Em uso de Florinef® desde 1994. Apresentou infecção de garganta e febre, com outro episódio de vômitos, diarreia, desidratação com duração de 4 dias. Submetida à nova genitoplastia (abertura de orifício vaginal), permanecendo com colostomia por 3 meses. Nega alterações de crescimento. Peso sempre um pouco acima da média. Surgimento de pêlos pubianos, axilares e telarca aos 10 anos. Pais primos de primeiro grau. Nega casos semelhantes na família.

Exame físico: aos 10 anos apresentava mamas Tanner 3-4; pêlos axilares 3+; Clitóris de 1cm > diâmetro. Presença de 2 orifícios na região perineal; pêlos pubianos Tanner 4.

Exames complementares

Exames de imagem: ultrassom mostrando útero: 5,53/3,34/1,4 cm e ovários normais. Ressonância magnética: adrenais bem identificadas com forma e intensidade normais, discreta nodularidade.

Exames laboratoriais: realizados na época do diagnóstico: 17-OHP= 470 ng/dL (10-200); DHEAS= 17,5 µg/dL (<30), testosterona= 0,74 ng/mL (<10); androstenediona= 4,4 ng/mL (0,2-0,6); cortisol= 3 µg/dL (7-25); sódio= 141mEq/L (135-145); potássio= 3,8 mEq/L (3,5-4,5); 11-desoxicortisol= 108 ng/mL (0,8-3,6); Aldosterona= 7,4 ng/dL e renina indetectável. Cariótipo 46, XX; Submetida ao teste da Cortrosina:

Tempo	F (µg/dL)	17OHP (ng/mL)	CompS (ng/mL)	Δ4 (ng/mL)	DHEA (ng/mL)
Basal 1	7,6	23	121	11	1,4
Basal 2	6,9	9,9	145	15	1,7
60min após	7,8	18	147	12	1,4

Diagnóstico: HCA por deficiência da 11β-hidroxilase.

Conduta: Atualmente vinha em uso de Meticortem® (5 mg 12/12h) e Florinef® (50 mg 12/12h), tendo, então, aumentado a ingestão de sal.

Paciente 5

Identificação: E.L., 7 anos e 11 meses, natural e procedente de São Paulo, ascendência africana, sexo masculino.

Motivo do encaminhamento: crescimento progressivo.

Antecedentes pessoais: presença de diagnóstico de hipertensão arterial materna desde os 4 meses de gestação, parto cesáreo (posição transversa) a termo, peso ao nascimento de 4.800 g e comprimento de 58 cm. Desenvolvimento neuropsicomotor normal. Aos 2 meses de vida iniciou com quadro de vômitos, diarreia, desidratação e, algumas vezes, com processos infecciosos como broncopneumonia, bronquite, anemia (4x).

Com 1a e 1m houve aumento da pigmentação corporal. Com 1 a e 10 m, permaneceu internado durante 3 meses por distúrbio hidroeletrólítico associados a processo infeccioso. Recebeu hidrocortisona 30 mg/kg/dia. Com 1 ano e 11 meses, a mãe notou crescimento mamário, sem secreção. Aos 2 anos, observou pêlos não pigmentados em axilas e pigmentados em base peniana. Pênis e escroto bem desenvolvidos desde o nascimento. Tem ereções. Nega masturbação. Pais consangüíneos.

Exame físico: aos 3 anos: peso= 28,4 Kg; estatura= 118,4 cm; PA= 90/60 mmHg; pênis= 7 cm, com estículos de 2 mL; G2-3 P2-3 e velocidade de crescimento de 7,8 cm/ano. Aos 7 anos e 1 mês apresentava idade óssea de 13 anos; pênis= 11 cm; TD= 2,3 cm e TE : 2,5 cm, iniciando com hipertensão arterial 130/100 mmHg.

Exames complementares:

Exames Laboratoriais: 17-OHP= 130,0 ng/dL (10-200); testosterona= 224,4 ng/dL (<30); androstenediona= 8,0 ng/dL (0,2-0,6); SDHEA= 132,0 µg/dL (<30); cortisol= 7,4 µg/dL (7-25); ACTH= 140 pg/mL (10-60); aldosterona= < 1,0 ng/dL; renina= 0.9 ng/mL/h (0.3-0.7); composto S= 1300 ng/dL (15-550).

Diagnóstico: HCA por deficiência de 11β-OH.

Paciente 6

Identificação: S.M., 21 anos e 4 meses, ascendência africana, sexo feminino.

Motivo do encaminhamento: genitália ambígua desde o nascimento.

Antecedentes pessoais: gravidez sem intercorrências; nascida de parto cesáreo, peso ao nascimento de 4.000 g. Nasceu com genitália ambígua. Apresentou desenvolvimento neuropsicomotor adequado. Aos 6 meses foi diagnosticado anemia falciforme. Paciente é acompanhada no ambulatório desde os 12 anos e 4 meses, por HCA por deficiência de 11β-OH e anemia falciforme. Até os 12 anos e 3 meses teve 14

internações com quadros de hemólise. Realizadas cirurgias para clitoroplastia, vaginoplastia e colostomia. Apresentou, ainda, litíase renal e vesicular. Em 1990, internou 6 vezes com quadros de hemólise, sendo a última com artrite do quadril esquerdo e septicemia. Menarca aos 14 anos e 2 meses. Pais são primos em primeiro grau.

Exame físico: aos 12 anos e 4 meses apresentava peso de 36,7 kg, estatura de 145,0 cm, PA 90/65 mmHg, IO= 9 anos e 4 meses.

Exames complementares

Exames laboratoriais: disponíveis apenas após 12 anos e em tratamento: 17 α -OHP= 460,0 ng/dL (10-200), testosterona= 62,0 ng/dL (<30); androstenediona= 9,4 ng/dL (0,2-0,6), DHEAS= 100 μ g/dL (<30); composto S= 0,5 ng/mL (0,8-3,6); ACTH= 54 pg/mL (10 – 50); cortisol= 4ug/dL (7-25); Na= 137mEq/L (135-145); K = 3,8 mEq/L (3,5-4,5).

Diagnóstico: HCA por deficiência de 11 β -hidroxilase.

Conduta: em uso de Prednisona 5 mg/dia. Paciente com boa evolução da HCA, porém apresentando as complicações inerentes à anemia falciforme.

Paciente 7

Identificação: D.E.S., deu entrada no serviço de Endocrinologia do HCFMRP-USP aos 5 anos e 11 meses, ascendência africana, sexo masculino.

Motivo do encaminhamento: A mãe observou que a criança sempre foi maior que as crianças de sua idade e apresentou aumento peniano. Há um ano notou aceleração do crescimento, surgimento de pêlos pubianos e agressividade.

Antecedentes pessoais: nasceu de parto normal a termo, peso ao nascimento de 3.500 g. Desenvolvimento neuropsicomotor adequado. Sem casos de diarreia, vômitos, desidratação. Possui dois irmãos (17 e 18 anos) hígidos. Pais consanguíneos.

Exame físico: Peso= 37,9 kg; estatura= 143,5 cm (>P97); BEG, hidratado. Presença de hipertrofia muscular, ausência de pêlos axilares. FC= 80 bpm, PA= 140x90 mmHg, genitália masculina, P3 → P4, pênis= 12,4 x 3,6 cm, testículo direito= 2,8 x 1,5 cm e testículo esquerdo= 2,8 x 1,4 cm. Idade Cronológica= 6 anos e idade óssea= 16 anos.

Exames complementares

Exames laboratoriais: valores basais de: sódio= 145 mEq/L (135-145); potássio= 3,5 mEq/L (3,5-4,5); DHEAS= 54 µg/dL (<30); Δ4= 1.888,0 ng/dL; cortisol= 6,7 µg/dL (7-25); 17-OHP= 312,0 ng/dL (10-200); testosterona= 235 ng/dL (<30); estradiol= 32,4 pg/mL; LH= <0,12 mU/mL; FSH <0,38; ACTH: 300,3 pg/mL e 266,0 pg/mL (10-50). Internou em 10/11/98 para testes diagnósticos: ACTH exógeno e supressão com dexametasona para descartar hipótese diagnóstica de tumor.

Teste da Cortrosina

Compostos	Pré	Pós
Testosterona	105,0 ng/dL	118,7 ng/dL
Δ4	1228,9 ng/dL	1344,0 ng/dL
DHEAS	66 µg/ dL	
Cortisol	8,4 ng/ dL	9,6 ng/ dL
17 OHP	381 ng/ dL	400 ng/ dL
11 DOC	16.200 ng/ dL	17.400 ng/ dL

Teste de Supressão com Dexametasona – 0,5 mg 6/6h durante 5 dias

Compostos	Pré	Pós
Testosterona	425,0 ng/dL	22,5 ng/dL
Δ4	1875,8 ng/dL	142,9 ng/dL
DHEAS	34,0 µg/ dL	3,9 µg/ dL
Cortisol	12,0 ng/ dL	<1,0 ng/dL
17 OHP	502,0 ng/ dL	—

Diagnóstico: confirmado o diagnóstico de HCA por deficiência de 11β-OH.

Conduta: iniciado tratamento com Decadron® (0,375 mg/ dia) que mostrou diminuição dos níveis de andrógenos, porém os mesmos não se normalizaram. Exames realizados 1 mês após início do tratamento: testosterona= 215,0 ng/dL; Δ4= 661 ng/dL;

DHEAS= 52 µg/dL. Solicitado teste do LHRH para investigar puberdade precoce secundária e precocidade sexual, o qual demonstrou amadurecimento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Paciente utilizando Decadron® (0,250 mg/2xdia) e iniciado agonista do LHRH para tratamento da puerdade precoce central secundária, apresentando boa evolução.

4- OBTENÇÃO DE DNA GENÔMICO

Algumas amostras de DNA genômico foram extraídas nos serviços de origem dos pacientes. Quando extraídos no Laboratório de Genética Molecular Humana – CBMEG, a metodologia de extração de DNA utilizada foi a de lise com Proteinase K (Boehringer Mannheim, Germany) padronizada no laboratório (Araújo *et al.*, 1996), detalhada a seguir:

- Lise dos leucócitos: adição de 35 mL de solução A (solução de lise). O homogenado é colocado em gelo por 30 minutos.
- Centrifugação a 2500 rpm/4°C por 10 minutos.
- Descarte do sobrenadante e ressuspensão do “pellet” em 20 mL de solução A.
- Nova centrifugação a 2500 rpm/4°C por 15 minutos.
- Descarte do sobrenadante.
- O procedimento é repetido até se obter o “pellet” incolor, livre de hemáceas lisadas.
- Ressuspensão do “pellet” em 1 mL de solução B.
- Adição de 250 µL de solução C preparada na hora.
- Incuba-se em banho-maria a 37°C durante a noite.
- Tratamento com 1,25 mL fenol saturado/tampão Tris-HCl 10mM pH 8,0.
- Homogeneização por inversão durante 5 minutos.

- Centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos.
- Extração da camada superior aquosa.
- Novo tratamento de extração com fenol.
- Camada aquosa tratada com clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1).
- Precipitação do DNA em solução 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M pH 5,5/2 volumes de etanol absoluto.
- Isolamento do precipitado de DNA com bastão plástico estéril.
- Lavagem com etanol a 70% para eliminação do excesso de sal.
- Diluição do DNA em 200-500 µL TE.

Soluções usadas na obtenção de DNA genômico

Solução A	Solução B (2x concentrada)	Solução C
Triton-X -----1%	Na ₂ EDTA----- 20 mM	0,5 mL de solução B
MgCl ₂ -----5 mM	NaCl-----20 mM	1 mg de proteinase K*
Sacarose-----0,32 M	Tris-HCl-----20 mM (pH 8,0)	0,5 mL de SDS 10%
Tris-HCl-----10 mM(pH 8,0)		

*Boehringer Mannheim GmgH, Mannheim, Germany.

O DNA, após extraído, é colocado em um tubo (tipo Eppendorf) devidamente marcado, dissolvido em TE, e conservado em geladeira.

5- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A análise da qualidade do DNA, sua integridade e concentração, amplificação do produto de PCR e separação de fragmentos gerados por digestão enzimática são testados por eletroforese em gel de agarose, sendo que a concentração da agarose a ser utilizada varia de acordo com o tamanho do fragmento a ser testado. Gel de agarose 0,8% é utilizado para testar amostras de DNA genômico e digestão enzimática. Por serem de alto peso

molecular, a menor concentração da agarose permite uma melhor separação dos fragmentos. Já para produtos de amplificação por PCR, utiliza-se agarose em uma concentração de 1-1,5%, dependendo do fragmento amplificado. Para os fragmentos B e C, do gene *CYP11B1*, o gel de agarose foi feito em uma concentração de 1% (1 g de agarose num volume final de 100 mL de TBE 1x) e para o fragmento A, 1,5% (1,5 g de agarose num volume final de 100 mL de TBE 1x). Corre-se o gel em uma cuba de eletroforese com TBE 1x (1/10 do volume de tampão de corrida), preparado segundo protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (na concentração final de 0,5 µg/mL) feito a partir de solução estoque de brometo de etídio a 10mg/mL: 5 µL desta solução foram diluídos em 100 mL de água MilliQ e os fragmentos amplificados foram visualizados sob iluminação ultra violeta e fotografados.

A solução estoque do tampão utilizado na corrida é o TBE 10x, descrito a seguir:

TBE (Tris-Borato) 10x

- ácido bórico----- 55,0 g
- trizma-base----- 108 g
- EDTA 0,2 M, pH 8,0---- 100 mL
- H₂O----- q.s.p. 1000 mL

6- AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS POR PCR

Três fragmentos do gene *CYP11B1* (A, B e C) foram amplificados por PCR usando “primers” específicos que previnem a eventual amplificação do *CYP11B2*, pois eles se anelam em regiões intrônicas específicas para *CYP11B1* que margeiam os fragmentos que foram amplificados (figura 6). Os “primers” utilizados cobrem todos os nove éxons, incluindo a região do “cluster” de mutações. Em alguns casos foram usados “primers” internos (íntron 3 e íntron 4) para a amplificação, especialmente do fragmento B.

A PCR foi realizada utilizando-se um termociclador (Thermocycle 480, Perkin-Elmer) e os ciclos foram diferenciados dependendo do fragmento a ser amplificado e dos

pares de “primers” utilizados (tempo de extensão e anelamento variam segundo a T_M de cada par de “primers”). Normalmente, utilizou-se uma desnaturação inicial de 95° C a 5 minutos seguida por 35 ciclos (94°C 1 min, 60°-65°C 1 min, 72°C, 1:15-3:30 min) e uma extensão final de 5 min a 72°C. Os pares de “primers” utilizados, conjuntamente com o tamanho dos respectivos fragmentos estão descritos na tabela 4.

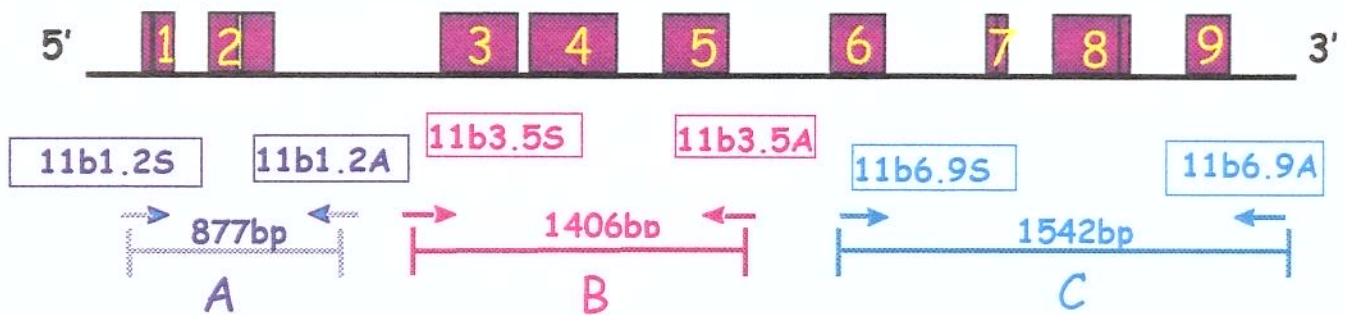


Figura 6- Esquema dos fragmentos gerados e *primers* específicos de *CYP11B1*.

Tabela 4- Sequência dos pares de “primers” utilizados para amplificação dos fragmentos A, B e C do gene *CYP11B1* (White *et al.*, 1991).

Éxons Amplificados	Sequência dos pares de “Primer” (5' ⇌ 3')	Temperatura anelamento	Fragmentos Gerados
I e II	11B1.2S* 5' TCGAAGGCAAGGCACCAG 3' 11B1.2A* 5' TGCTCCCAGCTCTCAGCT 3'	65°C	A (968 pb)
III, IV e V	11B3.5S 5' AGAAAATCCCTCCCCCCT 3' 11b3.5A 5' GACACGTGGGCGCCGTGT 3'	60°C	B (1406 pb)
VI, VII, VIII, IX	11B6.9S 5' TGACCCTGCAGCTGTGTCT 3' 11B6.9A 5' GAGACGTGATTAGTTGATGGC 3'	65°C	C (1542 pb)

A* - fita antisense S*- fita sense

As condições utilizadas para a PCR estão descritas a seguir:

Reagentes	Concentração	Volume utilizado
DNA genômico	1 µg	1 µL
Tampão Pharmacia com MgCl ₂	10x	5 µL
dNTP (Pharmacia)	0,2 mM	2,5 µL
“Primer sense”	20 pmoles/µL	1 µL
“Primer antisense”	20 pmoles/µL	1 µL
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerase (Pharmacia)	5 U/µL	0,4 µL

Completa-se para um volume final de 50 µL com água milliQ estéril.

7- PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS POR PCR

Alguns produtos de PCR, ao serem testados no gel de agarose, apresentavam bandas inespecíficas, além da banda de interesse. Para que o produto ficasse sem as bandas inespecíficas foi necessário a purificação desses produtos.

7.1- PURIFICAÇÃO A PARTIR DO PRODUTO DE PCR

Para a purificação direta do PCR utilizou-se um Kit de purificação (InConcertTM Rapid PCR Purification System – Life Technologies). Inicialmente adicionou-se à cada amostra a ser purificada 400 µL de H1¹ (tampão fornecido pelo fabricante do kit), centrifugou-se por 1 minuto. O sobrenadante foi colocado em uma “peneira” que retém o DNA (fornecida no próprio kit) e centrifugado por mais 1 minuto. Descartou-se o filtrado e adicionou-se 700 µL de H2² (tampão fornecido no kit) e centrifugou-se por 1 minuto para lavar o DNA retido. Descartou-se o filtrado e centrifugou-se novamente. Adicionou-se TE³ 1x (pré-aquecido em banho-maria a 70°C) e centrifuga-se por 2 minutos para eluição do DNA. Descartou-se a “peneira”, ficando com o produto purificado.

¹ Tampão H1: hidrocloreto de guanidina concentrado, EDTA, Tris-HCl e isopropanol.

² Tampão H2: NaCl, EDTA e Tris-HCl.

³ TE: 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0) e 0,1 mM de EDTA.

7.2- PURIFICAÇÃO A PARTIR DE BANDA DO GEL DE AGAROSE

Nesses casos realizou-se a purificação da amostra com o Kit para purificação da Gibco BRL (InConcertTM Rapid Gel Extraction System). Toda a amostra foi aplicada em um gel de TAE 1,0% com brometo de etídio. Após a corrida de eletroforese, com o auxílio de um bisturi, retirou-se a banda desejada. Esta foi incubada com a solução L1⁴ (tampão fornecido no kit) a 50°C por 15 minutos. Depois colocou-se em uma “peneira” (fornecida no próprio kit), sendo em seguida centrifugada, descartando o filtrado. Acrescentou-se à “peneira” mais 500 µL de L1, realizando o mesmo processo. Em temperatura ambiente acrescentou-se 700 µL de L2⁵ (fornecido pelo fabricante do kit), após 5 minutos realizou-se o mesmo procedimento que com L1. Por fim, colocou-se na “peneira” 50 µL de TE (pré-aquecido em banho- maria a 70 °C), trocando o tubo onde a “peneira” se acoplava e centrifugou-se por 2 minutos para eluição do DNA.

8- SEQÜENCIAMENTO DIRETO DOS FRAGMENTOS

Após feita a reação de PCR e a purificação do produto, quando pertinente, fêz-se um pré-tratamento inicial com as enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP- “Shrimp Alkaline Phosphatase”). Estas enzimas foram necessárias para a remoção de DNA fita simples residual e os dNTPs remanescentes do produto de PCR. Para este procedimento utilizou-se o “PCR product pre-sequencing Kit”- Amersham Pharmacia.

Produto de PCR (~20 ng/µL)-----	5 µL
Exonuclease I (10 U/µL)-----	1 µL
SAP (2 U/µL)-----	1 µL
Volume final-----	7 µL

⁴ Tampão L1: perclorato de sódio concentrado, acetato de sódio e TBE solúvel.

⁵ Tampão L2: NaCl, EDTA e Tris-HCl.

$$\text{Tempo de Reação} \begin{cases} 37^{\circ}\text{C}-----15 \text{ minutos} \\ 80^{\circ}\text{C}-----15 \text{ minutos} \end{cases}$$

O método utilizado para o sequenciamento dos fragmentos gerados por PCR é o descrito primeiramente por Sanger (Sanger *et al.*, 1974). Têm como princípio o uso de terminadores de cadeia denominados didesoxinucleotídeos (ddNTPs) marcados com o isótopo ^{33}P na posição α . Essas moléculas de α - ^{33}P -ddNTPs podem ser incorporadas normalmente em uma cadeia crescente de DNA através de seus grupos 5'trifosfato. Entretanto, eles não podem formar ligações fosfodiéster com o próximo desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) a ser incorporado por não apresentar a hidroxila da posição 3'. Quando uma pequena quantidade de um didesoxi-NTP é incluída junto aos quatro desoxi-NTP - normalmente requeridos na mistura da reação para a síntese de DNA pela DNA polimerase I - o produto é formado de uma série de cadeias, especificamente terminadas com o resíduo ddNTP incorporado.

Assim, os fragmentos A, B e C amplificados foram sequenciados com o “Thermo-Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit” (Amersham/Pharmacia), utilizando-se os mesmos “primers” e também “primers” internos, devido ao grande tamanho dos fragmentos gerados pela PCR. Cada “primer” permite a leitura de aproximadamente 300-500 pb da sequência.

No caso do fragmento A que cobre a região que engloba o éxon1/intron1/éxon2, não foi necessária a utilização de “primers” internos para a leitura, já que é o menor fragmento (~900 pb) e, além disso, os éxons estão dispostos exatamente nas extremidades do produto amplificado, possibilitando, assim, a leitura direta. No caso dos outros dois fragmentos (B e C) foram utilizados “primers” internos para sua leitura completa (tabela 5).

Tabela 5- Seqüência dos pares de primers internos utilizados para o seqüenciamento dos fragmentos B e C do gene *CYP11B1*.

Posição dos primers internos	Seqüência dos pares de "Primer" (5'↔3')	Orientação das fitas de DNA
Intron 2	5' ACAAGGAGGATGGGATA 3'	Sense
Intron 3	5' GGACTGAAGGGAGTGTG 3'	Sense
Intron 3	5' GGACTGAAGGGAGTGTG 3'	Sense
Intron 4S	5' GGATGAGAGCAGGGAGAC 3'	Sense
Intron 4A	5' AGCCTCACACCAATCTCCCC 3'	Antisense
Intron 6	5' GGTGCAGAGAGCACAGG 3'	Sense
Intron 7	5' TCGAGCTGAGAACCTCC 3'	Sense

As condições da reação de seqüenciamento estão descritas a seguir:

Reação	Concentração	Volume utilizado
Tampão da reação	10x	2 µL
PCR pré-tratado	50-500 ng	7 µL
"Primer sense"/"antisense"	2 pmoles/µL	1 µL
Thermo-sequenase DNA polimerase	4 U/µL	2 µL
H ₂ O		q.s.p 20 µL

Dessa mistura, transfere-se 4,5 µL para cada um de 4 tubos diferentes aos quais acrescenta-se, finalmente, 0,5 µL de um dos α-³³P-ddNTPs (G, A, T e C) e 2 µL da mistura de dNTPs em uma concentração de 0,06 µM e 6 µM, respectivamente. O volume final em cada tubo será de 7 µL.

Os tubos foram colocados em um termociclador, dando início à reação através do seguinte ciclo:

95°C- 30 segundos	} 40 ciclos
T _m do <i>primer</i> - 30 segundos	
72°C- 1 minuto	

Finalizada a reação acrescenta-se 4 µL de solução de terminação (“stop solution”) contendo 95% de formamida, 0,05% de azul de bromofenol e 20 mM de EDTA.

9- GEL DE SEQUENCIAMENTO

A corrida de sequenciamento foi feita em géis de poliacrilamida desnaturante 6% contendo uréia 6 M.

Reagentes	Concentração	Volume utilizado
Bis-acrilamida 40%	6%	75 mL
Uréia	6 M	210 g
TBE	10x	50 mL
Água		q.s.p. 500 mL

Para a polimerização do gel foram adicionados 500 µL de persulfato de amônio 10% e 50 µL de TEMED (tetrametiletilenodiamino). A solução foi vertida entre duas placas de vidro, próprias para sequenciamento (dimensões de 42 cm x 33,5 cm e 39,5 cm x 33,5 cm) emparelhadas e tendo entre elas espaçadores sem gradiente de espessura. A espessura do gel varia conforme o espaçador utilizado na preparação da placa (0,2-0,4 mm). As placas são previamente lavadas com detergente, acetona e etanol absoluto. Na placa maior, utiliza-se 3 mL de *Repel-Silane-ES*, “plus one” (Pharmacia Biotech) (reagente à base de silicone que evita a aderência do gel à placa).

Para todos os sequenciamentos, utilizou-se uma cuba de sequenciamento (“HoeferTM SQ3 Sequencer”) e uma fonte de alta voltagem (Amersham-Pharmacia) e os parâmetros de corrida foram 2.000 V, 50 mA e 50 W. O tempo de corrida variou de 2 a 5 horas, de acordo com o tamanho do fragmento que estava sendo sequenciado. Fêz-se uma pré-corrida para um aquecimento prévio do gel e após esse procedimento, aplicou-se 3 µL de cada reação (previamente desnaturadas a 95°C por 5 min) na sequência G, A, T, C,

sendo que foram aplicados todos os Gs, todos os As, e assim por diante, em um gel com mais de um indivíduo para facilitar a leitura de alterações quando presentes. O tampão utilizado foi o TBE 1x, aproximadamente 1.500 mL. Após a corrida, as placas foram desmontadas; o gel, aderido à placa menor não tratada com *Repel-Silane*, foi transferindo para um papel de filtro Whatmann 3 MM, que confere aderência do gel. Em seguida, o gel aderido ao papel foi envolto por filme de PVC e secado a vácuo a 80°C durante uma hora. Para a autorradiografia, o gel foi exposto ao filme de raio-X sensível aos raios β (X-OMAT/AR - Kodak) durante 4 ou 5 dias. O filme foi revelado utilizando-se uma máquina reveladora (Macrotec- MX-2) que possui temperaturas específicas para a revelação e secagem.

10- ANÁLISE DOS SEQUENCIAMENTOS

Para a análise dos sequenciamentos realizados no gene *CYP11B1* utilizou-se a sequência que está depositada no GENE BANK pelo número de acesso # M32863, M32878, M32879) (anexo 1).

***R**ESULTADOS*

RESULTADOS

1. AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS

Cada um dos três fragmentos para o gene *CYP11B1* foi amplificado, utilizando-se “primers” específicos. A temperatura de anelamento e tempo de extensão dos “primers” diferenciou-se de acordo com o fragmento a ser amplificado.

1.1. AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO A

Para amplificar o fragmento A, utilizou-se o par de “primers” 11B1.2S/11B1.2A. Como esperado, o fragmento encontrado foi de 968 pb, indicado na figura 7.

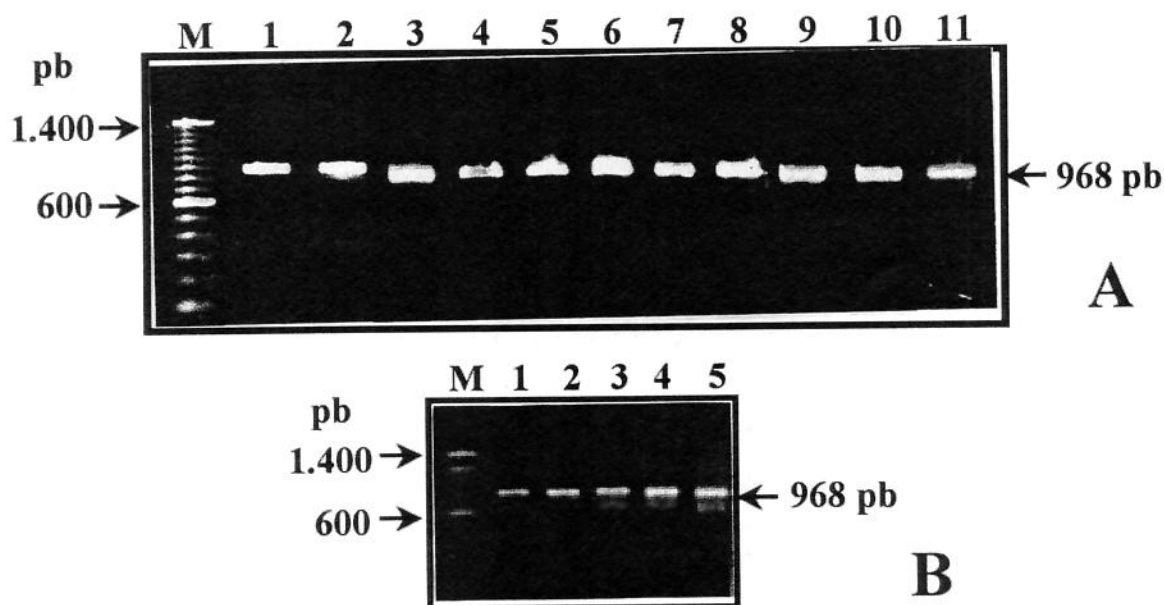


Figura 7- Amplificação dos éxons 1 e 2 no fragmento A com os “primers” 11B1.2S/11B1.2A. M: marcador de peso molecular “100 pb ladder” (LifeTechnologies). Parte A: linha 1, Paciente 1; linha 2, controle normal; linha 3: paciente 2; linha 4: paciente 3; linha 5: mãe da paciente 3; linha 6: pai da paciente 3; linha 7: paciente 4; linha 8: mãe da paciente 4; linha 9: paciente 5; linha 10: mãe do paciente 5; linha 11: mãe da paciente 1. Parte B: linha 1: paciente 7; linha 2: pai do paciente 7; linha 3: irmã da paciente 7; linha 4: irmã da paciente 7; linha 5: irmão do paciente 7.

1.2.AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO B

Para amplificar o fragmento B foi utilizado o seguinte par de “primers”: 11B3.5S/11B3.5A que engloba os éxons III, IV e V. O fragmento mostrado na figura 8 é de aproximadamente 1406 pb. Nesse caso somente 7 indivíduos apresentaram amplificação do fragmento correto. Assim, foi utilizado um “primer” alternativo, também específico para o *CYP11B1*. A amplificação foi então realizada com os “primers”: 11B3.5S/11B3.5A-1. O fragmento gerado é de 1420 pb. Com esse procedimento as amostras de 3 outros indivíduos foram amplificadas.

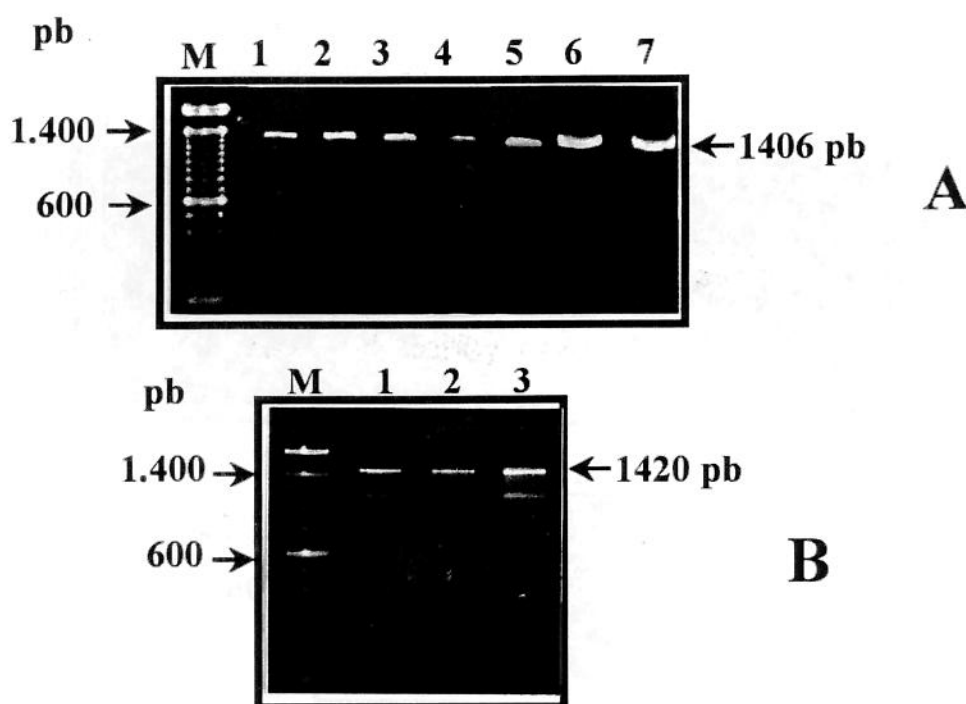


Figura 8- Amplificação dos éxons 3 a 5 no fragmento B com os “primers”: A=11B3.5S/11B3.5A e B=11B3.5S/11B3.5A-1. Parte A: M: marcador de peso molecular “100 pb ladder” (LifeTechnologies). Linha 1, Paciente 6; linha 2, mãe da paciente 3; linha 3: pai da paciente 3; linha 4: paciente 5; linha 5: paciente 3; linha 6: paciente 2; linha 7: mãe do paciente 5. Parte B: linha 1, controle normal; linha 2: paciente 1; linha 3: mãe da paciente 1.

1.3.AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO C

O fragmento C foi amplificado utilizando-se o par de “primer” 11B6.9S/11B6.9A, indicando um fragmento de 1542 pb, como mostrado na figura 9.

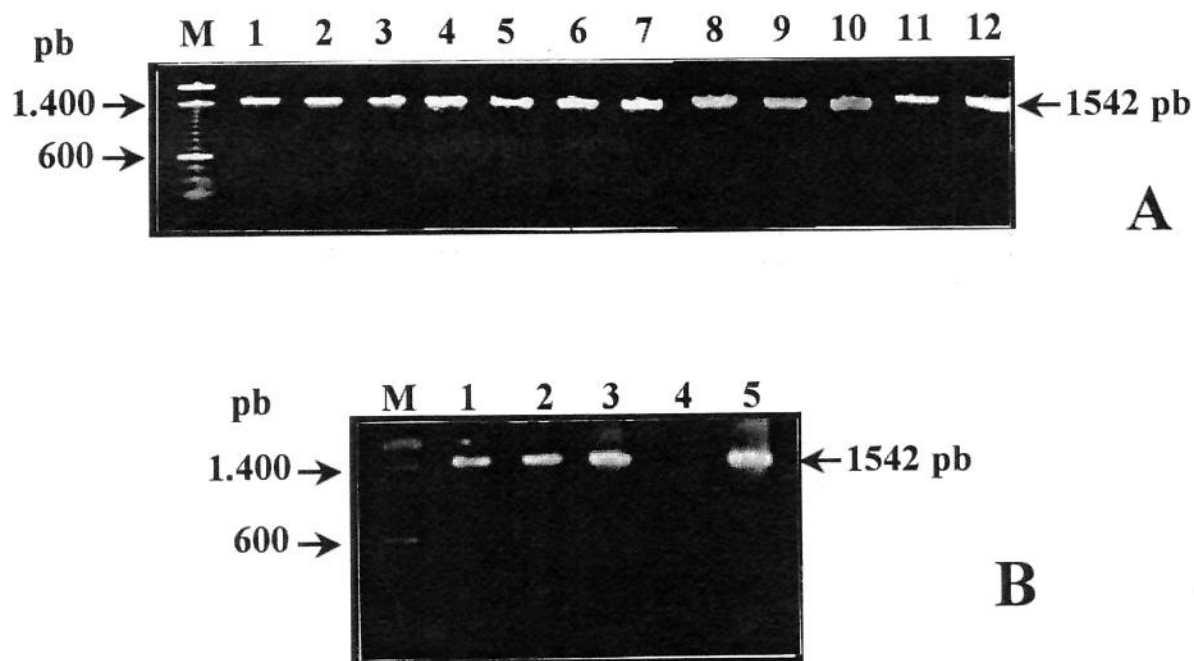


Figura 9- Amplificação dos éxons 6 a 9 no fragmento C com os “primers” 11B6.9S/11B6.9A M: marcador de peso molecular “100 pb ladder” (LifeTechnologies). Parte A: linha 1, Paciente 2; linha 2, paciente 6; linha 3: paciente 5; linha 4: mãe da paciente 1; linha 5: paciente 3; linha 6: mãe da paciente 3; linha 7: pai da paciente 3; linha 8: paciente 4; linha 9: mãe da paciente 4; linha 10: mãe do paciente 5; linha 11: paciente 1; linha 12: controle normal. Parte B: linha 1: paciente 7; linha 2: pai do paciente 7; linha 3: irmã da paciente 7; linha 4: irmã da paciente 7; linha 5: irmão do paciente 7.

2. SEQUENCIAMENTO DIRETO DOS FRAGMENTOS

DETERMINAÇÃO DA MUTAÇÃO Q356X

O sequenciamento direto do fragmento C revelou uma mutação “nonsense” CAG→TAG no éxon 6, no códon 356 (Q356X) presente em homozigose em 5 pacientes e em heterozigose na mãe de dois deles. Todos os pacientes com essa mutação são de origem afro-brasileira e filhos de casais consanguíneos. Não foram realizados estudos moleculares nos pais dos pacientes. Para os cinco pacientes afetados com a transição C→T, parte da sequência do gene *CYP11B1* onde ocorre a mutação está indicada nas figuras 10, 11 e 12.

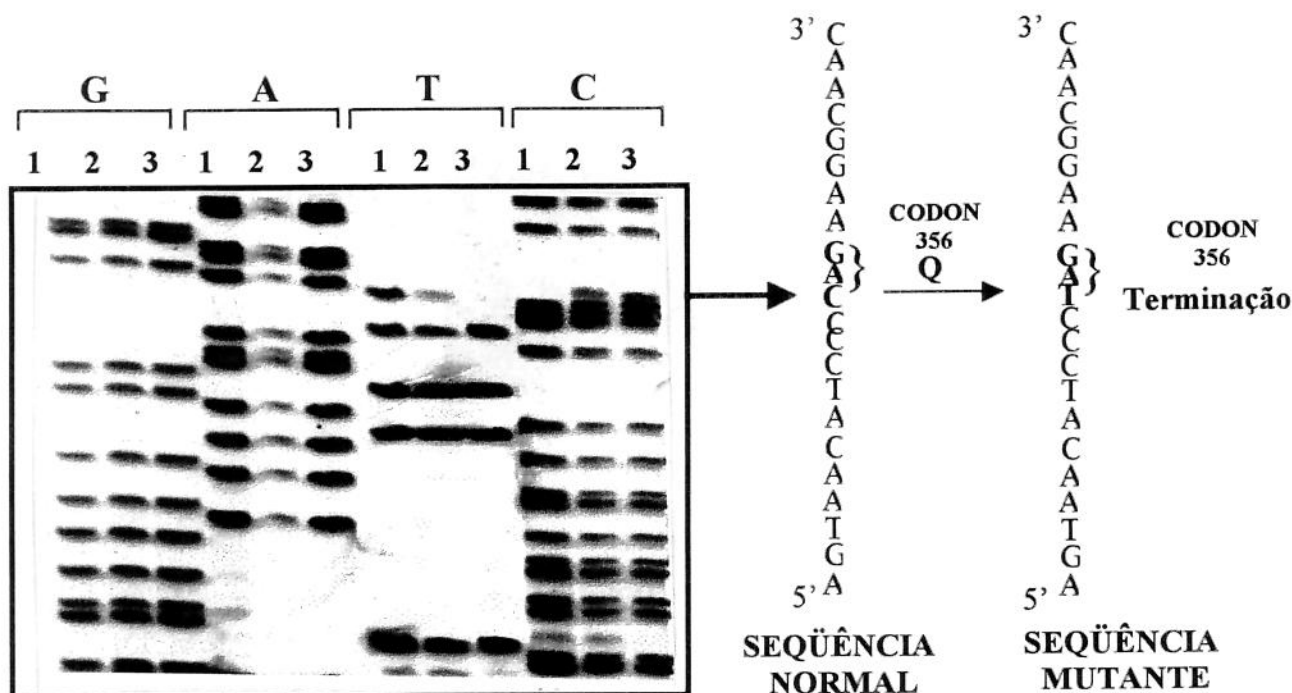


Figura 10– Autorradiografia de parte do sequenciamento do gene *CYP11B1* mostrando a mutação Q356X. O produto de PCR foi sequenciado diretamente usando o kit “Thermo-Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit” (Amersham - Pharmacia). A seta indica a transição C→T na posição nucleotídica 1066 gerando um códon de terminação. O gel de poliacrilamida foi carregado na seguinte ordem: linha 1, paciente 1; linha 2, mãe do paciente 1; linha 3, controle normal. Cada grupo de três linhas corresponde ao nucleotídeo indicado acima dos números.

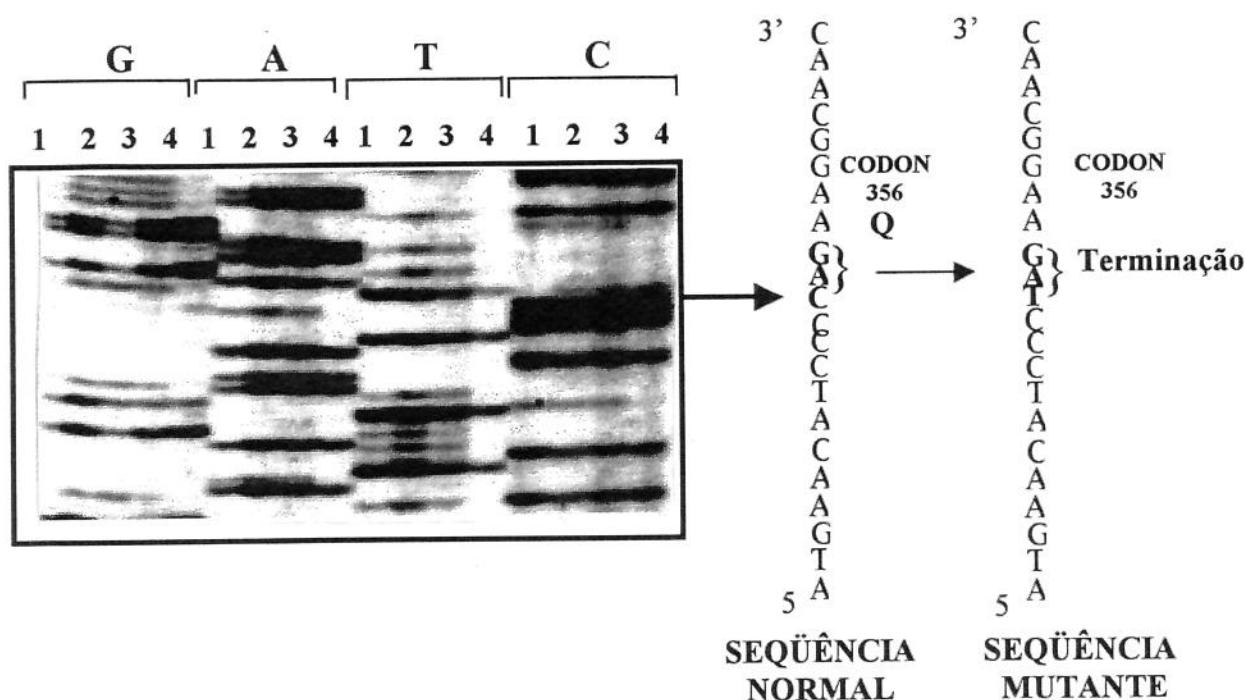


Figura 11– Autorradiografia de parte do sequenciamento do gene *CYP11B1* mostrando a mutação Q356X. O produto de PCR foi sequenciado diretamente usando o kit “Thermo-Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit” (Amersham - Pharmacia). A seta indica a transição C→T na posição nucleotídica 1066 gerando um códon de terminação. O gel de poliacrilamida foi carregado na seguinte ordem: linha 1, paciente 7; linha 2, pai do paciente 7; linha 3, irmã normal do paciente 7; linha 4, irmão normal do paciente 7. Cada grupo de quatro linhas corresponde ao nucleotídeo indicado acima dos números.

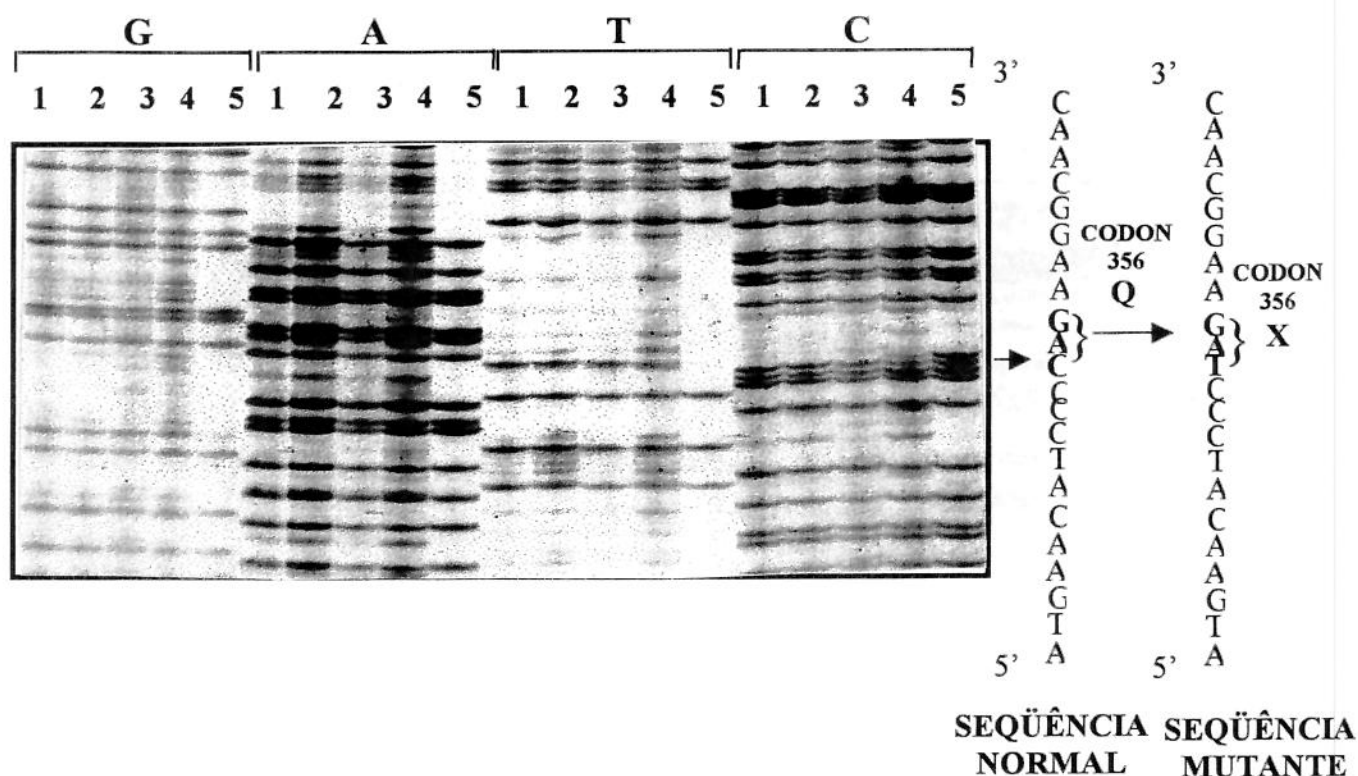


Figura 12 – Autorradiografia de parte do sequenciamento do gene *CYP11B1* mostrando a mutação Q356X. O produto de PCR foi sequenciado diretamente usando o kit “Thermo-Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit” (Amersham - Pharmacia). A seta indica a transição C→T na posição nucleotídica 1066 gerando um códon de terminação. O gel de poliacrilamida foi carregado na seguinte ordem: linha 1, paciente 2; linha 2, paciente 6; linha 3, paciente 5; linha 4, mãe do paciente 5; linha 5, controle normal. Cada grupo de três linhas corresponde ao nucleotídeo indicado acima dos números.

DETERMINAÇÃO DA INSERÇÃO R404C+

Na paciente 4 foi encontrada uma mutação no início do éxon 8 alterando o aminoácido da posição 404. Trata-se da inserção de uma citosina na posição nucleotídica 3.275 a partir do códon ATG da sequência genômica. Esta inserção causa o deslocamento do quadro de leitura a partir deste ponto e gera um códon de terminação (*stop codon*) no

aminoácido 421. A mãe da paciente é heterozigota para esta mutação. Esta inserção ainda não foi descrita na literatura, tratando-se, portanto de uma nova mutação (figura 13).

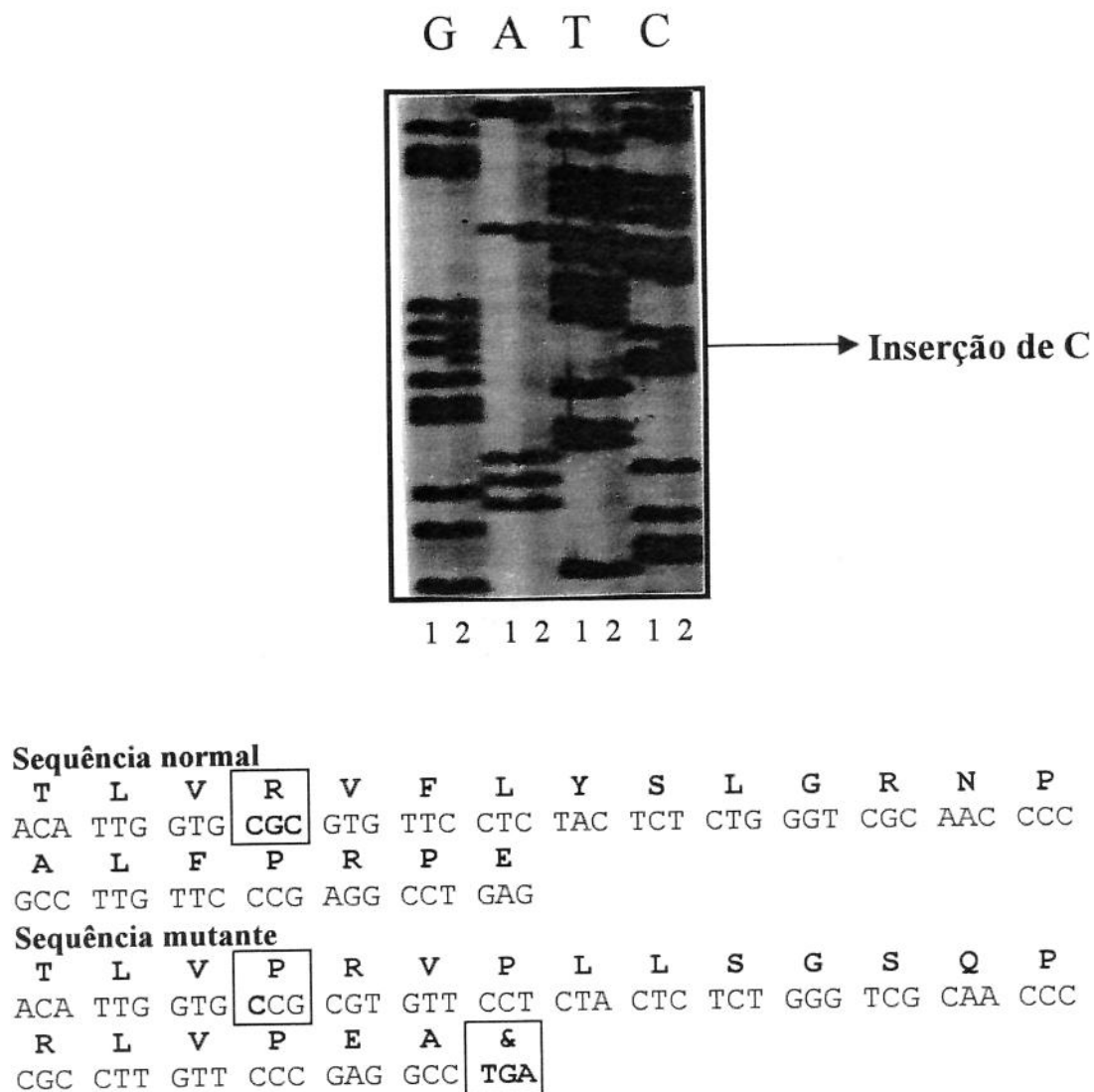
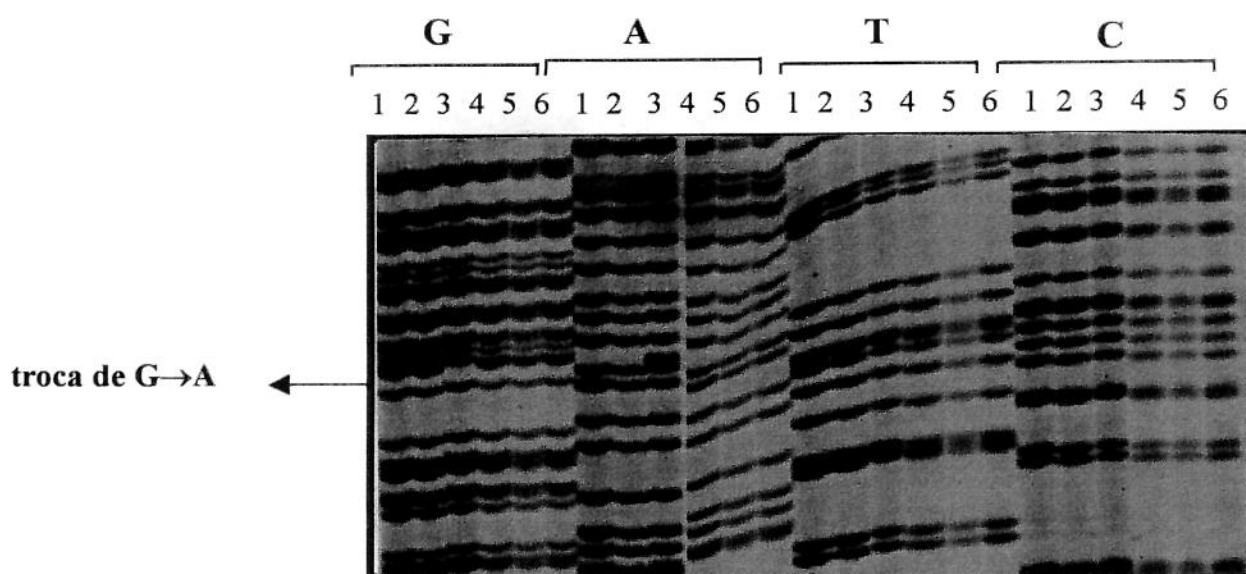


Figura 13- Autorradiografia de parte do seqüenciamento do gene *CYP11B1* mostrando a mutação R404C+, gerando um stop codon no aminoácido 421. O produto de PCR foi seqüenciado diretamente usando o kit "Thermo-Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit" (Amersham - Pharmacia). Linha 1: paciente 4; Linha 2: mãe da paciente 4.

DETERMINAÇÃO DA MUTAÇÃO G267S

Usando “primer” íntron 3, o seqüenciamento direto do fragmento B, indicou uma mutação missense, em homozigose, em uma paciente caucasiana. A paciente apresenta uma troca de GGC→AGC no códon 267 que normalmente codifica uma glicina. A transição G→A encontra-se no nucleotídeo 1753 (a partir do ATG) na última posição do éxon 4 (figura 14). Essa transição provoca a troca da glicina por uma serina. Trata-se de uma mutação ainda não descrita.



Sequência normal

K	E	H	F	E	A	W	D	C	I	F	Q	Y	G
AAG	GAG	CAC	TTT	GAG	GCC	TGG	GAC	TGC	ATC	TTC	CAG	TAC	GGC

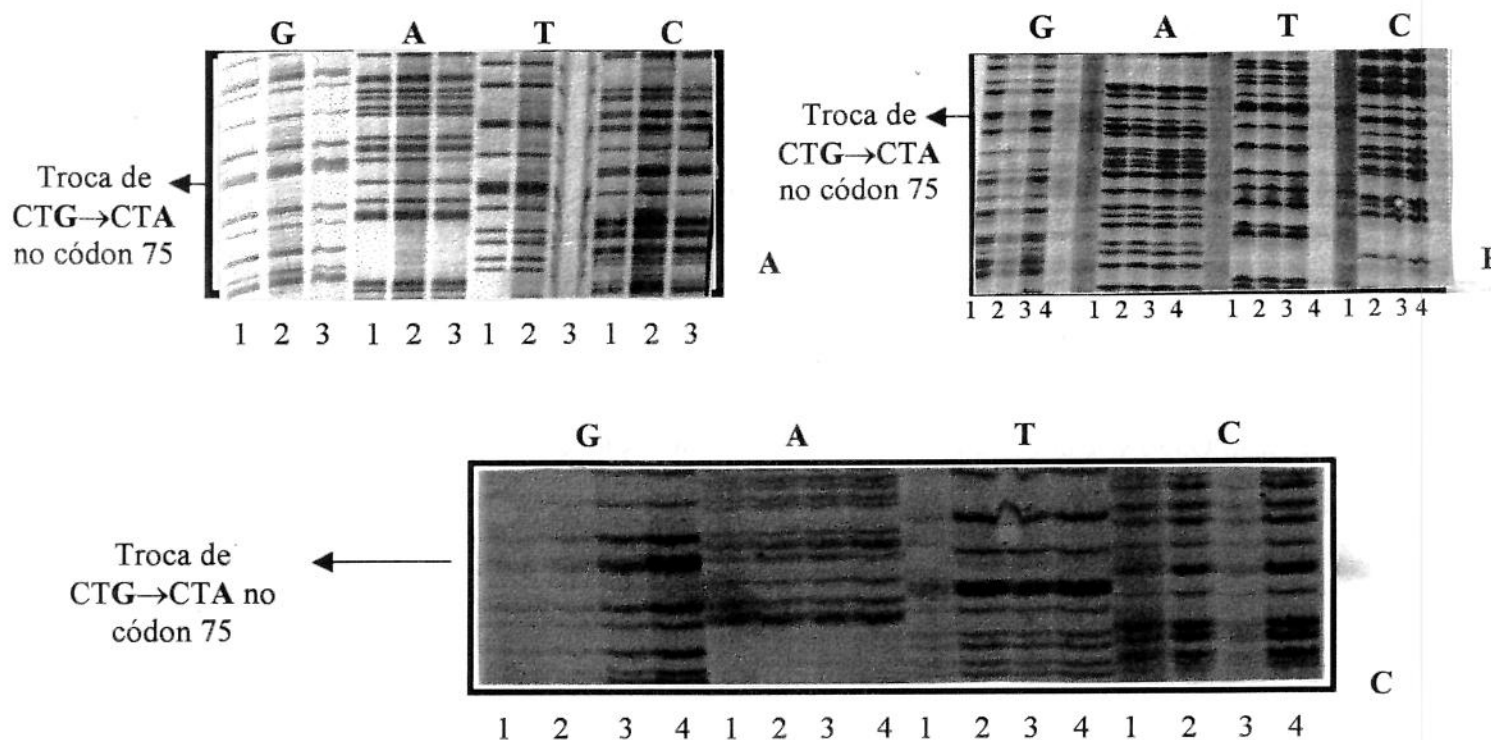
Sequência mutante

K	E	H	F	E	A	W	D	C	I	F	Q	Y	S
AAG	GAG	CAC	TTT	GAG	GCC	TGG	GAC	TGC	ATC	TTC	CAG	TAC	AGC

Figura 14- Autorradiografia de parte do seqüenciamento do gene *CYP11B1*, mostrando a troca de G→A no códon 267 (indicado em vermelho), mudando o aminoácido de glicina (G) para serina (S). Linha 1: paciente 2; Linha 2: paciente 5; Linha 3: paciente 3 (portadora da mutação); Linha 4: paciente 4; Linha 5 e 6: controles normais.

DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMOS**POLIMORFISMOS NO ÉXON 1****Variação L75L**

A mutação silenciosa no éxon 1 CTG → CTA (figura 15) não provém do gene *CYP11B2*, mas trata-se de uma variação encontrada em cerca de 30% de alelos normais (De Carvalho *et al.*, 1999). O alelo variante A foi encontrado em 5 alelos afetados portadores da mutação Q356X. Um dos alelos afetados com a mutação Q356X não apresentou a variação L75L, diferenciando-se dos demais. A variante foi ainda encontrada em 4 alelos normais de indivíduos portadores obrigatórios da mutação Q356X.



Sequência *CYP11B1* normal

E	V	H	Q	T	F	Q	E	L
GAA	GTA	CAC	CAG	ACC	TTC	CAG	GAA	CTG

Sequência *CYP11B1* variante

E	V	H	Q	T	F	Q	E	L
GAA	GTA	CAC	CAG	ACC	TTC	CAG	GAA	CTA

Figura 15- Autorradiografia de parte do sequenciamento do gene *CYP11B1* indicando o polimorfismo L75L. **A-** linha 1: paciente 1; linha 2: mãe da paciente 1; linha 3: controle. **B-** linha 1: paciente 7; linha 2: pai do paciente 7; linha 3: irmão do paciente 7; linha 4: irmã do paciente 7. **C-** linha 1: paciente 2; linha 2: paciente 5; linha 3: mãe do paciente 5; linha 4: controle.

POLIMORFISMOS NO ÉXON 2

Variação D82D

Outra mutação silenciosa causada pela transição GAT → GAC no códon 82 do éxon 2 (figura 16) foi determinada também em homozigose para a variante C nos cinco pacientes portadores da mutação Q356X e também na paciente portadora da mutação G267S. Por outro lado foi encontrada em sete alelos normais nos portadores obrigatórios. Aparentemente, este polimorfismo é bastante comum na população visto que foi determinado em cerca de 75 % dos alelos normais (De Carvalho *et al.*, 1999).

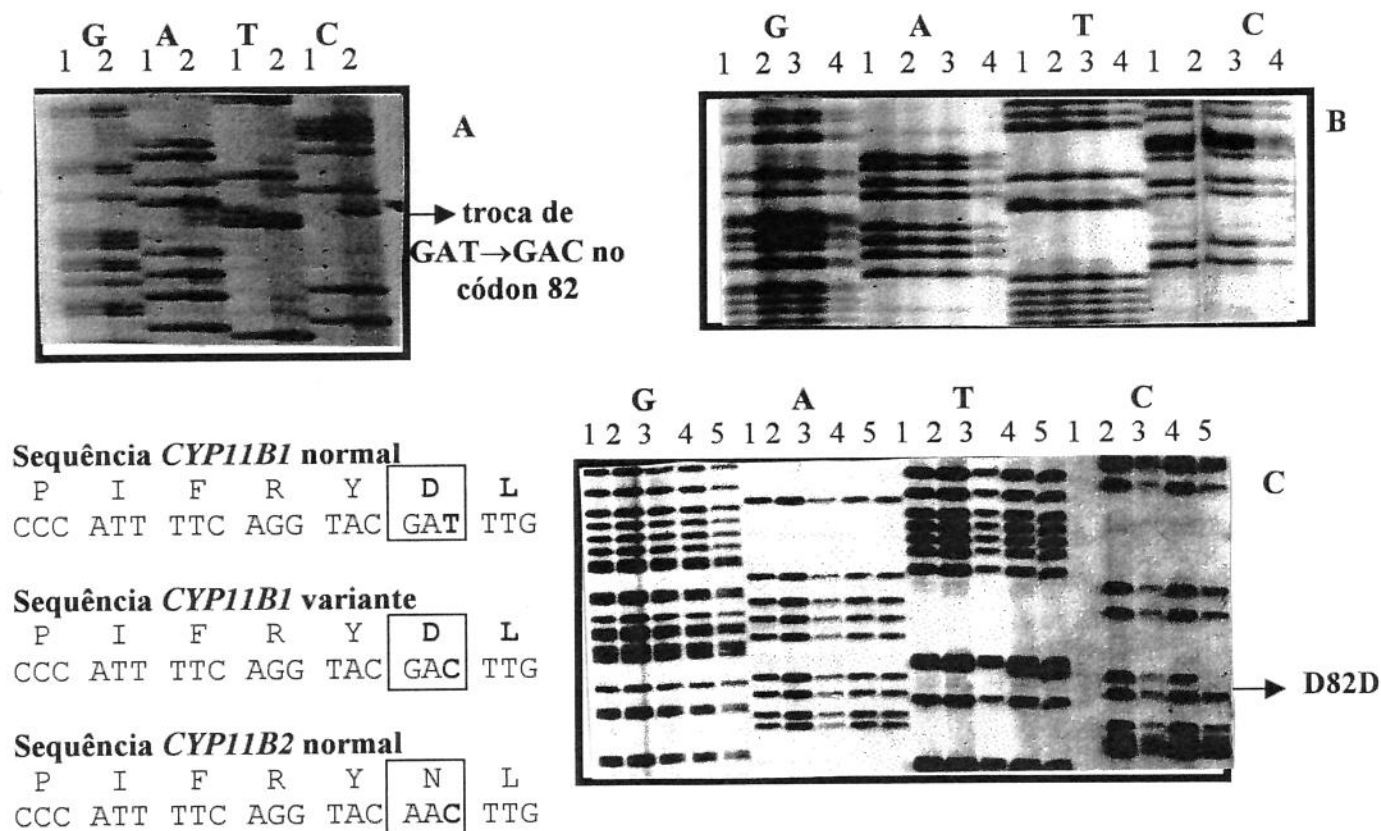
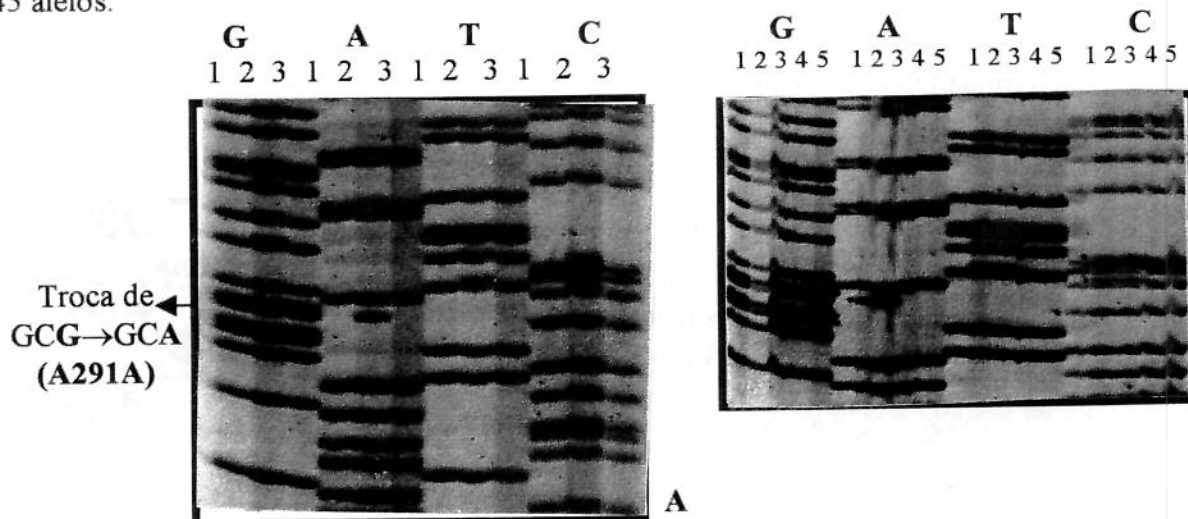


Figura 16- Autorradiografia de parte do sequenciamento do *CYP11B1*, indicando a troca T→C, no códon 82 do éxon 2. **A-** Linha 1: paciente 4 (não portadora desta mutação silenciosa); Linha 2: paciente 3. **B-** Linha 1: controle; Linha 2: mãe do paciente 5; Linha 3: paciente 5; Linha 4: paciente 2. **C-** Linha 1: pai da paciente 3; Linha 2: mãe da paciente 3; Linha 3: paciente 3; Linha 4: mãe da paciente 4; Linha 5: paciente 4 (novamente).

POLIMORFISMO NO ÉXON 5

Varição A291A

A variação GCG→GCA no éxon 5 (figura 17) não foi encontrada em nenhum dos alelos afetados. Porém, dois alelos normais em portadores obrigatórios apresentaram a variante A. Aparentemente este polimorfismo é raro uma vez que não foi encontrado em cerca de 45 alelos.

**Sequência *CYP11B1* normal**

T	S	I	V	A
ACC	AGC	ATC	GTG	GCG

Sequência *CYP11B1* variante

T	S	I	V	A
ACC	AGC	ATC	GTG	GCA

Figura 17- Autorradiografia de parte do sequenciamento do *CYP11B1*, indicando a troca G→A, no códon 291 do éxon 5. **A-** Linha 1: paciente 1; Linha 2: mãe da paciente 1. **B-** Linha 1: paciente 7; Linha 2: pai do paciente 7; Linha 3: irmã do paciente 7; Linha 4: irmã do paciente 7; linha 5: irmão do paciente 7.

Tabela 6 – Polimorfismos no gene *CYP11B1* analisados em alelos não-relacionados.

Posição do aminoácido (códon)	Número de alelos não-relacionados (Total)	Frequência (%)	Sequência no CYP11B2
R43 (CGG)	39 (42)	92,8	-
Q43 (CAG)	3 (42)	7,2	CAG
L75 (CTG)	30 (47)	63,8	CTG
L75 (CTA) variação	17 (47)	36,2	Não
D82 (GAT)	5 (27)	18,5	-
D82 (GAC) variação	22 (27)	81,5	AAC
A291 (GCG)	12 (14)	85,7	
A291 (GCA)	2 (14)	14,3	GCA

*Os números entre parênteses indicam o total de alelos não-relacionados estudados para cada polimorfismo

Tabela 7: Genótipos dos pacientes e seus familiares quanto ao gene *CYP11B1*.

Indivíduos	Q356X	R404C+	G267S	L75(G)	L75(A)	D82(T)	D82(C)	A291(G)	A291(A)
Paciente 1	+/+	-/-	-/-	-	+	-	+	+	-
Mãe	+/-	-/-	-/-	-	+	-	+	+	+
Paciente 2	+/+	-/-	-/-	-	+	-	+	+	-
Paciente 3	-/-	-/-	+/+	+	-	-	+	+	-
Mãe	-/-	-/-	+/-	+	-	-	+	+	-
Pai	-/-	-/-	nd	+	-	-	+	+	-
Paciente 4	-/-	+/+	-/-	+	-	+	-	+	-
Mãe	-/-	+/-	-/-	+	-	+	+	+	-
Paciente 5	+/+	-/-	-/-	-	+	-	+	+	-
Mãe	+/-	-/-	-/-	-	+	-	+	+	-
Paciente 6	+/+	-/-	-/-	+	-	-	+	+	-
Paciente 7	+/+	-/-	-/-	-	+	-	+	+	-
Pai	+/-	-/-	-/-	-	+	-	+	+	+
Irmão	+/-	-/-	-/-	-	+	-	+	+	-
Irmã1	+/-	-/-	-/-	-	+	-	+	+	+
Irmã2	+/-	-/-	-/-	-	+	-	+	+	-

nd- não determinado

***D**ISSCUSSÃO*

DISCUSSÃO

1- MUTAÇÕES NO GENE *CYP11B1*

1.1- MUTAÇÕES DESCRITAS

Estão descritas no “The Human Mutation Database” (Krawczak & Cooper (1997) 31 mutações diferentes no gene *CYP11B1* levando à deficiência enzimática. Em geral, as mutações produzem uma proteína alterada, que se apresenta com atividade enzimática diminuída ou ausente e, portanto, não funcional. Essas alterações levam ao quadro clínico de hiperplasia congênita da adrenal devido à deficiência da 11 β -hidroxilase. As alterações moleculares variam e incluem as mutações pontuais, pequenas inserções ou deleções. As mutações pontuais, normalmente, são transições ou transversões que levam à troca de aminoácidos e à formação de códons de terminação na síntese protéica ou alteram sítios de “splicing”. Algumas mutações exibem recorrência em grupos étnicos e geográficos distintos devido, principalmente, ao grande número de casamentos consanguíneos bastante comuns em algumas populações, como por exemplo, na Arábia Saudita. Esses dados podem representar um efeito do fundador, baseado nas origens dos indivíduos afetados (de Carvalho *et al.*, 1999; Merke *et al.*, 1998; White *et al.*, 1994).

Em judeus de origem marroquina, um grupo com alta prevalência de deficiência de 11 β -hidroxilase, quase todos os alelos afetados carregam a mesma mutação, R448H. A arginina da posição 448 é adjacente ao aminoácido Cisteína na posição 450, o 5º ligante do átomo de ferro do grupo prostético heme. O aminoácido R448 é encontrado em todas as enzimas do citocromo P450 eucarióticas examinadas até o momento, sugerindo um alto grau de conservação para este códon, portanto, substituições nesta posição são fracamente suportadas. A mutação R448H é uma mudança CpG→TpG em uma fita codificante. Presumivelmente, isto se deve a uma desaminação do dinucleotídeo metilado ^{Me}CpG, que é a causa mais frequente de mutação pontual em humanos (White *et al.*, 1991). Esta mutação abole a atividade enzimática (Curnow *et al.*, 1993). Foram encontradas outras mutações também neste mesmo códon, indicando que mudanças nesta posição são sempre deletérias ou, então, sugerindo que essa região possa ser um “hot spot” no gene (Geley *et al.*, 1996).

As mutações ocorridas no gene *CYP11B1* podem levar ou a uma inativação total ou apenas a uma falha enzimática (proteína mutante com alguma atividade enzimática residual). As razões pelas quais as alterações moleculares conduzem a esta inativação enzimática são diversas. Estudos funcionais em culturas de células *COS* -1 demonstraram que a atividade enzimática é menor nas células com mutações que a observada nas células sem alteração molecular (selvagem). Por exemplo, Joehrer *et al.* (1997) demonstraram que as mutações P42S, N133H e T319M reduzem a atividade em 15, 17 e 37%, respectivamente.

As mutações que afetam o mecanismo de *splicing* alteram a expressão e a tradução correta do gene. Estas abolem sítios de *splicing* normais ou criam sítios alternativos. Em ambos os casos, o RNAm maduro não é corretamente processado e a proteína traduzida pode estar truncada. A maioria das mutações de *splice* conhecidas se localizam nas seqüências CAG 3' do sítio acceptor de *splice* ou GT 5' do sítio doador de *splice* (Merke *et al.*, 1998). A substituição G+1→A em sítios doadores de *splice* foi considerada responsável por fenótipos afetados em pelo menos 26 doenças humanas. Nestas doenças, mutações G+1→A no sítio doador de *splice* diferem no grau da inativação do sítio doador, mas sempre resultam em *splicing* anormal (Merke *et al.*, 1998).

Algumas mutações impedem a síntese da enzima incluindo mutações "nonsense" W116X, K174X, Q338X e Q356X e mutações frameshift nos códons 32 (deleção de 1 nucleotídeo) e 394 (inserção de 2 nucleotídeos) (White *et al.*, 1994).

Algumas alterações do tipo *missense*, tais como R384Q e R384G alteram o sítio de ligação ao substrato, o 11-desoxicortisol (Nakagawa *et al.*, 1995; Curnow *et al.*, 1993); V441G altera a estrutura secundária da região de ligação ao grupo heme (Curnow *et al.*, 1993); R448H altera um sítio muito conservado de ligação ao ferro do grupo não protéico heme (White *et al.* 1991); R374Q altera o sítio de ligação à adrenodoxina, proteína oxidoreductora de P450c11 (Curnow *et al.*, 1993); T318M altera o sítio conservado de transferência de prótons nas hidroxilações em c11 (Curnow *et al.*, 1993).

1.2- MUTAÇÕES DETECTADAS

Foi realizada a análise do gene *CYP11B1* em sete famílias, cada uma com um indivíduo com deficiência de 11β-OH. As mutações detectadas foram do tipo *missense*

(G267S), *nonsense* (Q356X) e uma inserção (R404+C). A mutação Q356X, já anteriormente descrita (Curnow *et al.*, 1993), foi observada em cinco dos sete pacientes, todos homozigotos para a mutação e de origem africana. Em uma paciente de origem árabe, encontrou-se a inserção R404C+ em homozigose, e por fim, em uma paciente caucasiana, a mutação *missense* no códon 267, última base do éxon 4 (G→A), alterando o aminoácido de glicina para serina. A figura 18 resume as mutações e polimorfismos encontrados neste trabalho.

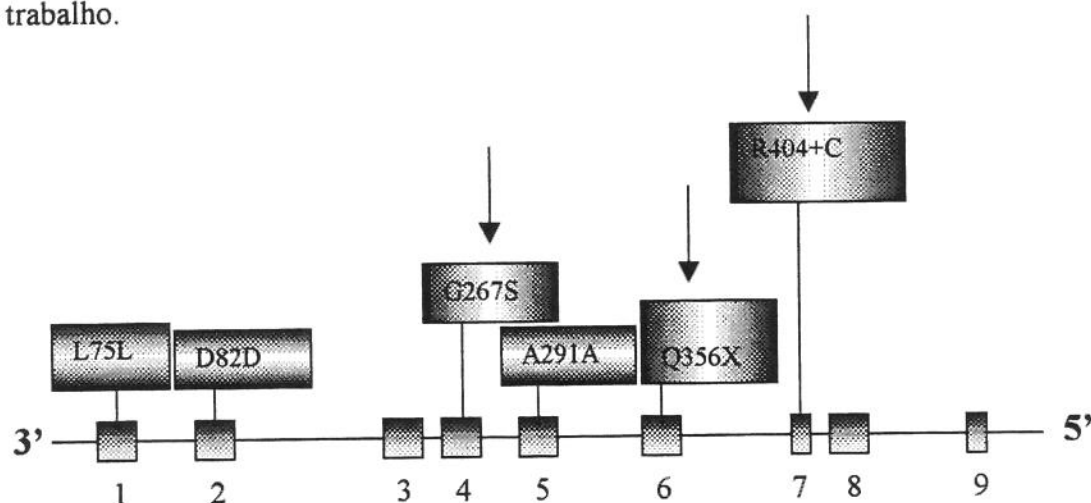


Figura 18- Mutações (indicadas com as setas) e polimorfismos (sem setas) encontrados no gene *CYP11B1* neste trabalho.

MUTAÇÃO Q356X

Os pacientes portadores da mutação Q356X (pacientes 1, 2, 5, 6 e 7) são de ascendência africana e filhos de casais consanguíneos. A mutação foi confirmada pela heterozigose presente em pelo menos um dos genitores em cada família. A mutação Q356X foi a primeira encontrada em pacientes brasileiros com deficiência da 11 β -hidroxilase (De Carvalho *et al.*, 1999). Essa mesma mutação foi descrita em pacientes de origem afro-americana (Curnow *et al.*, 1993, Merke *et al.*, 1998) e, portanto a presença da mesma mutação em pacientes de uma mesma etnia sugere a possibilidade de um efeito do fundador do alelo afetado. Historicamente, afro-americanos e afro-brasileiros tiveram diferentes origens (Bortolini *et al.*, 1997), embora possa ser considerado que compartilhem o mesmo ancestral. A investigação de polimorfismos intragênicos ligados aos alelos mutados ajuda a identificar os haplótipos afetados com a mesma mutação (De Carvalho *et al.*, 1999), os

haplótipos com a mutação Q356X serão discutidos mais adiante. Pacientes portadores desta mutação possuem atividade enzimática deficiente devido ao 'stop codon' gerado. A proteína resultante é truncada e não funcional.

MUTACÃO R404+C

Uma nova mutação foi encontrada em uma paciente de origem árabe (paciente 4). Trata-se da inserção de uma citosina na posição nucleotídica 3.275 substituindo o aminoácido do códon 404, no éxon 8, de arginina para prolina e alterando todo o quadro de leitura. Isso gera um códon de terminação na posição 421. A mãe da paciente é heterozigota para tal mutação. Nenhum dos polimorfismos avaliados foi encontrado em associação a essa mutação. Como ainda não foi descrita na literatura, trata-se de uma mutação nova. Para pacientes de origem árabe, existe descrita uma mutação bastante freqüente, em que ocorre a troca de uma arginina para uma histidina no códon 448, também no éxon 8. Embora a paciente aqui estudada seja descendente de família árabe, a mutação encontrada difere da esperada para indivíduos dessa etnia. Considera-se que a proteína produzida a partir do gene mutado seja anômala e tenha, portanto, sua atividade enzimática comprometida.

MUTACÃO G267S

Nessa paciente caucasiana (paciente 3), encontrou-se uma mutação, em homozigose, não descrita na literatura, em que há uma troca de G→A na primeira base do códon 267, no último nucleotídeo do éxon 4, que codifica normalmente para uma glicina e com a mutação passa a codificar para uma serina (G267S). Esse códon é formado pelo último nucleotídeo do éxon 4 e pelos dois primeiros nucleotídeos do éxon 5. Embora o aminoácido glicina dessa posição não seja conservado nas *CYP11B1* de, pelo menos, 5 espécies (figura 19), mutações nessa posição devem ser deletérias, já que podem afetar a atividade do sítio doador de *splice* do intron 4.

Aminoácido 267

```

1  241 PRSLSRWTSPKVWKEHFEAWDCIFQYGDNCIQKIYQELAFSRPQQYTSIVAEALLNAELS
2  241 PKSLTRWTSTRVWKEHFDSDIISEYVTKCIKNVYRELAEGROQSW-SVISEMVAQSTLS
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
3  241 PRSLSRWTSTGTWKEHFEAWDCIFQYANKAIQRLYQELTLGHPWHYSGVVAELLTHANMT
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
4  241 PRRLSRWTSSSMWREHFEAWDYIFQYANRAIQRIYQELALGHPWHYSGIVAELLMRADMT
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
5  241 PRRLSRWMSTNMWREHFEAWDYIFQYANRAIQRIYQELALGHPWHYSGIVAELLMRADMT
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
6  242 PRSLSRWMRSQAWKEHFEAWDYISEYAEENRIQKKYEELARGC-SQYNSIVANLMLQGNL
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
7  241 PSLGLTRWISTRVWKENFDSWDFVSEYVTKNVKNVYQEVQSGGPQSWSVISQLVAEGALTM
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 19- Alinhamento das seqüências da proteína CYP11B1 humana (1) com as de seis espécies diferentes ressaltando a posição 267 não conservada. São elas: (2) *Rattus norvegicus*; (3) *Sus scrofa*; (4) *Ovis aries*; (5) *Bos taurus*; (6) *Cavia porcellus*; (7) *Mesocricetus auratus*

Duas outras mutações neste mesmo códon já foram descritas: G267R e G267D. A mutação descrita nesse trabalho (G267S) e a G267R, que resulta da troca de G→C, ocorrem na mesma posição nucleotídica 1.753. Além de provocarem a troca do aminoácido, ocorrem na seqüência consenso do sítio doador de *splice* no éxon 4 e podem afetar a taxa de *splicing*, para a formação do RNAm (Skinner *et al.*, 1996). Por outro lado, a mutação G267D ocorre na primeira base do éxon 5 e, provavelmente, pode afetar a atividade do sítio aceptor de *splice*.

Utilizando-se um programa de computador fornecido pela rede ("Splice site predictions", http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), pode-se estimar a probabilidade das trocas ¹⁷⁵³G→A, ¹⁷⁵³G→C e ²⁰³⁷G→A afetarem a atividade de *splicing* (figura 20).

Colocando-se a seqüência correta na posição 1753, observa-se que a probabilidade dessa região ser doadora de *splice* é de 98%. Já alterando o nucleotídeo de ¹⁷⁵³G→A, esta probabilidade diminui para menos da metade (42%). Por outro lado, quando se estima a probabilidade para a troca ¹⁷⁵³G→C, essa diminuição não é tão acentuada (61%) (figura 20A). De qualquer forma essas probalidades diminuídas podem estar indicando que, associada às mutações missenses, deve-se observar uma diminuição da taxa de

processamento correto do RNAm, levando a um maior comprometimento na atividade enzimática. Analisando a mutação G267D da mesma forma, observa-se que nesse caso a mutação 2037 G→A suprime completamente o sítio acceptor de *splice* (figura 20B). Este fato pode estar relacionado com o quadro clínico grave que esta paciente apresenta, já que até os cinco anos, ela foi criada como menino, devido à grave virilização, com presença de micropênis e criptoquirdia bilateral.

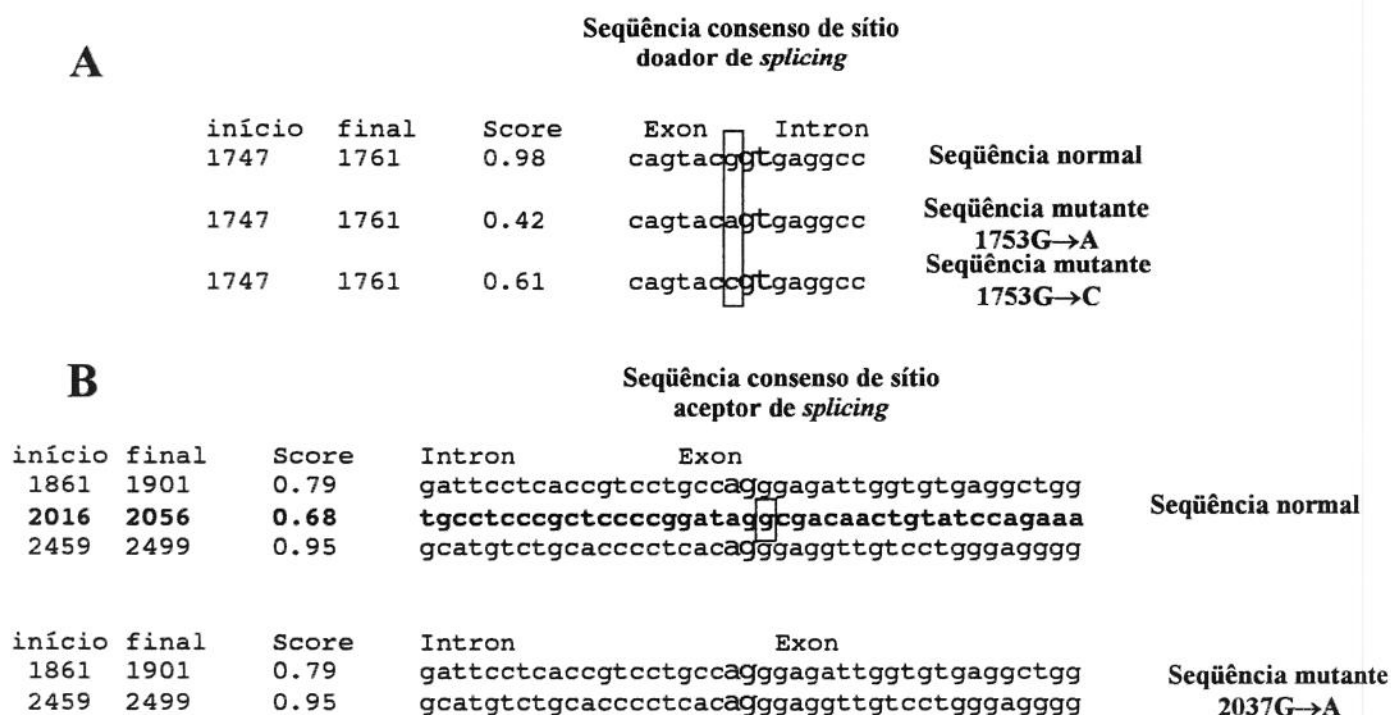


Figura 20- Análise das alterações na função de *splicing* das mutações ¹⁷⁵³G→A e ¹⁷⁵³G→C

(A); ²⁰³⁷G→A (B) através do programa “Splice site predictions”,

http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html.

Na paciente 3, além da mutação G267R, foram encontradas duas outras variações nucleotídicas. Uma troca C→T na posição 1511 no íntron 3 (ISV3AS,-39, C→T) e uma troca G→C na posição 3636 no íntron 8 (ISV8AS,-14, G→C) foram determinadas em homozigose. Na análise dessas seqüências, ao avaliar a possibilidade de estarem provocando alterações no processo de *splicing*, verificou-se que a primeira, aparentemente,

não altera o *score* (41%) do sítio normal acceptor de *splice* que se localiza na posição 1549 (figura 21A). Essa alteração, ainda não descrita parece ser um polimorfismo já que não há evidências de qualquer alteração funcional associada a ela. No entanto, deve-se considerar num futuro estudo funcional a possibilidade de que essa troca C→T, em conjunto com as outras alterações encontradas nessa paciente, possam justificar seu grave fenótipo. A variação no íntron 8 IVS8AS,-14, G→C apenas altera o *score* do sítio acceptor normal de *splice* de 77% para 92%.

			Seqüência consenso de sítio acceptor de <i>splicing</i>		
A					
início	final	Score	Intron	Exon	
1194	1234	0.90	gctctgccctggcctctgt	aggaatgggcctgaatggcgct	Seqüência normal
1529	1569	0.41	agcagtgcacacctccccgc	agccagcaacttggctcttttt	
1861	1901	0.79	gattcctcaccgtcctgcc	agggagattggtgtgaggctgg	
B					
início	final	Score	Intron	Exon	
3246	3286	0.58	cccgtctgtctccgtccgc	agacattggtgcgcgtgttcct	Seqüência normal
3629	3669	0.77	gaaacccggttctgtcct	aggtgctgaaacacctccaggt	
3730	3770	0.76	gtgccccctcctcaccttc	agagccatcaactaatcacgtc	
início	final	Score	Intron	Exon	
3246	3286	0.58	cccgtctgtctccgtccgc	agacattggtgcgcgtgttcct	Seqüência mutante ³⁶³⁶ G→C
3629	3669	0.92	gaaaccc  gttctgtcct	aggtgctgaaacacctccaggt	
3730	3770	0.76	gtgccccctcctcaccttc	agagccatcaactaatcacgtc	

Figura 21- Análise das alterações na função de *splicing* das mutações ¹⁵¹¹C→T (A), no íntron 3 (ISV3AS,-39) e ³⁶³⁶G→C (B), no íntron 8 (ISV8AS,-14) através do programa "Splice site predictions", http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html.

Algumas variações intrônicas são encontradas no gene *CYP11B1* (Skinner *et al.*, 1999), porém não se tem registro de muitas alterações em sítios de *splicing*. No "The Human Mutation Database" (Krawczak & Cooper (1997) há apenas uma mutação que suprime o sítio doador de *splicing* do íntron 5, a mutação IVS5DS+1, G→A (Merke *et al.*, 1998). Recentemente, Chabre *et al.* (2000) discutem se uma troca G→C no último nucleotídeo do éxon 5 causando a mutação silenciosa T318T, seria capaz de inibir o *splicing* correto uma vez que o RNAm produzido não continha os éxons 3, 4, 5, 6 e 7. No

mesmo trabalho, encontram a alteração IVS8DS+4, A→G produzindo um RNAm menor devido à ausência do éxon 8. Este trabalho dá respaldo à suposição de que o grave fenótipo da paciente 3 deva ser resultado das drásticas alterações no processo de *splicing* causado pelas trocas $^{1753}\text{G}\rightarrow\text{C}$ e $^{3636}\text{G}\rightarrow\text{C}$.

2- POLIMORFISMOS NO GENE *CYP11B1*

Um dos polimorfismos analisados neste trabalho é a transição G→A no códon 75 descrita por Merke *et al.* (1998) em uma paciente afro-americana portadora da mutação Q356X. A variante A para esse polimorfismo foi determinada em homozigose em quatro dos cinco pacientes com a mutação Q356X. Além disso, essa variante foi encontrada em cerca de 36% dos alelos estudados, sendo 40 deles alelos normais. Na literatura, existem dois outros pacientes descritos com a mesma mutação, ambos de origem afro-americana. Para um dos pacientes não se dispõe de dados quanto aos polimorfismos (Curnow *et al.*, 1993). A paciente descrita no trabalho de Merke *et al.* (1998), por ser heterozigota para a mutação Q356X, pode apresentar um dos três possíveis haplótipos mostrados na figura 22B. De qualquer forma nossos dados podem indicar a presença de dois haplótipos diferentes nos pacientes portadores da mutação Q356X no Brasil (figura 22).

Já a transição T→C, no códon 82, indicado como um “conflito” na sequência GENE BANK #D16153, foi determinada em 81,5% dos alelos estudados, incluindo alelos afetados e não afetados. Esta mudança de nucleotídeo pode ter tido origem no gene *CYP11B2*, no qual o códon 82 é AAC e codifica uma asparagina. Pode-se observar que todos os pacientes, analisados até o momento, que possuem a mutação Q356X também possuem o polimorfismo no códon 82 do éxon 1.

A paciente 3, homozigota para a mutação G267S é também homozigota para o polimorfismo no éxon 2 (D82D). Dessa forma, é importante salientar que a presença deste polimorfismo não está estritamente ligada à mutação Q356X, porém no alelo portador da mutação sempre se verifica a presença deste polimorfismo, como encontrado até o momento. Considera-se que este polimorfismo seja bastante comum na população em geral (81,5%). Em um trabalho de Skinner *et al.* (1996) também foi encontrado o polimorfismo D82D, inclusive nos pacientes portadores da mutação no códon 267 (G267D).

Observou-se também o polimorfismo A291A (G→A), presente no éxon 5, somente em alelos não afetados por nenhuma das mutações. Esta mutação silenciosa já foi anteriormente descrita por Merke *et al.* (1998).

O polimorfismo D82D pode ser resultado de conversão gênica entre *CYP11B1* e *CYP11B2*. Estas conversões parecem ser eventos bastante comuns, já que os dois genes são bastante homólogos e estão relativamente próximos.

Crossing overs desiguais envolvendo *CYP11B1* e *CYP11B2* poderiam produzir dois cromossomos com características diferentes. Um teria uma duplicação genética e carregaria 3 genes: *CYP11B2*, um gene híbrido com extremidades 5' e 3' correspondentes ao *CYP11B1* e *CYP11B2*, respectivamente, e *CYP11B1*. O gene híbrido seria expresso em altos níveis na zona fasciculada devido à presença de seqüências regulatórias de *CYP11B1*, mas dependendo da posição do *crossing over*, a enzima codificada teria atividades de 18-hidroxilase e 18-oxidase, normalmente presentes somente em *CYP11B2*. Genes híbridos deste tipo têm sido observados em pacientes com uma condição denominada hiperaldosteronismo supressível por glicocorticóides, uma forma rara autossômica dominante de hipertensão arterial herdada (Curnow *et al.*, 1993).

Conversões gênicas que transferem seqüências de *CYP11B2* para *CYP11B1* não possuem um efeito adverso na atividade enzimática porque *CYP11B2*, normalmente, codifica uma enzima ativa. No entanto, transferências de seqüências de *CYP11B1* para *CYP11B2* poderiam destruir a atividade de 18-hidroxilase e 18-oxidase da enzima *CYP11B2*, levando a uma incapacidade para sintetizar aldosterona, uma condição denominada deficiência de corticosterona metiloxidase II (Curnow *et al.*, 1993).

Outra questão bastante pertinente refere-se à presença da maioria das mutações entre os exons 6-8. Isto pode estar indicando uma região "hot-spot" porque até o momento 14 mutações, incluindo a mutação nova encontrada neste trabalho no éxon 8 (R404C+), estão presentes entre os exons 6 a 8, em pacientes portadores da deficiência da 11β-hidroxilase de vários grupos étnicos. A alta freqüência de mutações nestes exons pode estar refletindo a presença de resíduos de aminoácidos funcionalmente importantes ou, alternativamente, uma alta concentração de dinucleotídeos CpG nestes exons. Resíduos de citosina metilados em dinucleotídeos CpG são propensos à mutações espontâneas por

desaminação à timidina, um mecanismo, possivelmente, básico de algumas dessas mutações (Curnow *et al.*, 1993).

As mutações encontradas nesses pacientes parecem comprometer bastante o funcionamento do gene, pois todos apresentam quadro clínico bastante grave, correspondendo à forma clássica da doença. Isso significa que as proteínas formadas a partir dos genes com estas mutações têm suas atividades comprometidas, não sendo funcionais. Não podemos dizer o quanto esta proteína está expressando, pois este tipo de análise não foi efetuado. A análise das atividades enzimáticas da 11 β -hidroxilase nestas formas mutante do gene *CYP11B1* será objeto de trabalho futuro.

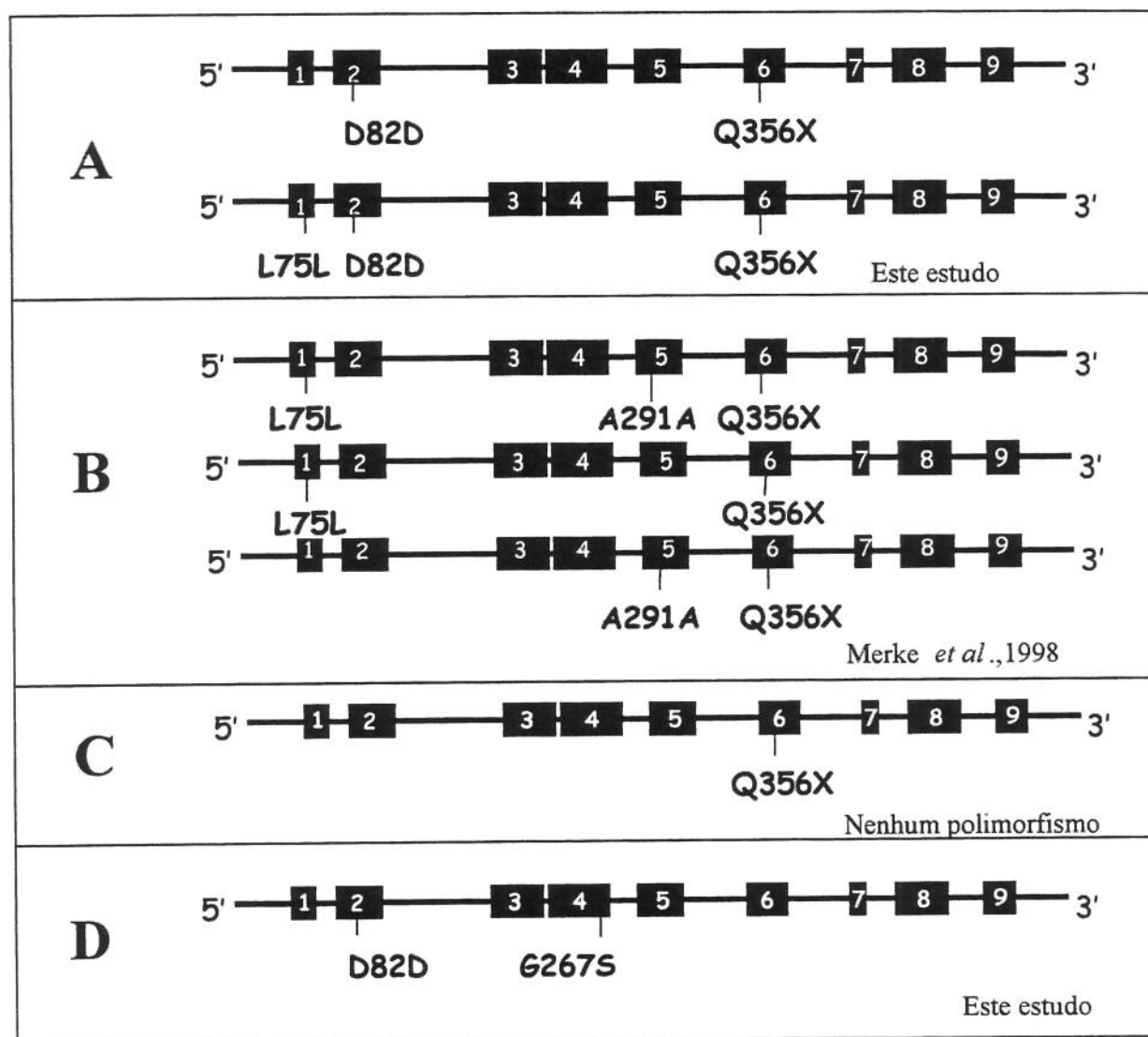


Figura 22- Haplótipos de *CYP11B1* carregando a mutação Q356X determinada em três pacientes não relacionados de origem africana. Parte A: haplótipo de *CYP11B1* dos pacientes brasileiros. Parte B: três possíveis haplótipos de *CYP11B1* do paciente descrita por Merke *et al.* (1998) que é heterozigoto para a mutação Q356X. Parte C: haplótipo para o paciente de Curnow *et al.* (1993) com nenhum polimorfismo intragênico mencionado. Parte D: haplótipo para a paciente descrita neste trabalho portadora da mutação G267S e com o plimorfismo D82D. As caixas pretas representam os éxons de 1-9.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

✓ Este estudo permitiu o diagnóstico molecular, com base em análise de seqüenciamento, em todas as famílias estudadas.

✓ A possibilidade de deleções envolvendo os éxons no gene *CYP11B1* foi descartada, uma vez que, utilizando *primers* específicos para *CYP11B1*, os fragmentos A (éxons 1 e 2), B (éxons 3, 4 e 5) e C (éxons 6, 7, 8 e 9) foram amplificados corretamente e diretamente seqüenciados.

✓ Duas mutações novas foram identificadas, a G267S e R404C+, em pacientes caucasianos, filhos de casais consanguíneos.

✓ A mutação Q356X parece representar um alelo fundador uma vez que foi encontrada em cinco pacientes de origem africana, filhos de casais consanguíneos e já havia sido descrita em pacientes Afro-americanos.

✓ Três polimorfismos em éxons (SNPs = "Single Nucleotide Polymorphisms") também foram identificados (L75L, D82D e A291A) os quais foram úteis para diferenciação de alelos com a mesma mutação.

✓ A mutação G267S além de trocar o aminoácido do códon 267, pode afetar a taxa de *splicing* para a formação do RNAm, levando ao quadro de deficiência de 11 β -hidroxilase. No mesmo alelo, além da mutação silenciosa D82D, foi verificada uma troca G→C na posição 1511 no íntron 3 (ISV3AS,-39, C→T) e uma troca G→C na posição 3636 no íntron 8 (ISV8AS,-14, G→C).

✓ A inserção R404+C leva a uma mudança no quadro de leitura, com a produção de um 'stop codon' na posição 421. Considera-se que a proteína produzida a partir do gene mutado seja anômala e tenha portanto sua atividade enzimática comprometida.

✓ O polimorfismo A291A (G→A), presente no éxon 5, foi somente encontrado em alelos não afetados de portadores obrigatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-JURAYYAN N. Congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency in Saudi Arabia: clinical and biochemical characteristics. **Acta Paediatr** **84**: 651-4, 1995.
- ARAÚJO M. Caracterização das Alterações Gênicas Relativas à deficiência da 21-Hidroxilase em 21 famílias, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, 1996.
- BALTIMORE D. Gene conversion: some implications for immunoglobulin genes. **Cells** **24**: 592-594, 1981.
- BISTRITZER T, EHRMANN DA, BRIGELL DF, ROSENFELD RL. Ovarian steroidogenic responses to gonadotrophin-releasing hormone agonist testing with nafarelin in hirsute women with adrenal responses to adrenocorticotropin suggestive of 3-beta-hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **76**: 450-455, 1993.
- BORTOLINI MC, ZAGO MA, SALZANO FM, DA SILVA WA Jr, BONATTO SL, DA SILVA MC, WEIMER TA. Evolutive and anthropological implications of mitochondrial DNA variation in African Brazilian populations. **Hum Biol** **69**: 141-159, 1997.
- BRAUTBAR C, THEODOR R, SACK J, LERENE C, DUPONT B, LEVINE LS, SHARON, SMALLER S, COHEN T, RÖSLER A. HLA in a selective aldosterone biosynthetic defect due to type 2 corticosterone methyl-oxidase deficiency. **Tissue Antigens** **17**: 212-216, 1981.
- CERAME BI, NEWFIELD RS, PASCOE L, CURNOW KM, NIMKARN S, ROE TF, NEW MI, WILSON RC. Prenatal diagnosis and treatment of 11beta-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia resulting in a normal female genitalia. **J Clin Endocrinol Metab** **84**: 3129-34, 1999.
- CHUA SC, SZABO, P, VITEK A, GRZESCHIK KH, JOHN M, WHITE PC. cloning of cDNA encoding steroid 11-beta-hydroxylase (P450c11), **Proc Natl Acad Sci USA**, **84**: 7193-7197, 1987.
- CLARK P. Nonclassic 11 β -hydroxylase deficiency: report of two patients and review. **J Ped Endocrinol Metab** **13**: 105-109, 2000.
- COOPER, DN, YOUSSEF, H. the CpG dinucleotide and human disease. **Hum Genet** **78**: 151-155, 1988.

- CURNOW MK, TUSIE-LUNA MT, PASCOE L, NATARAJAN R, GU J-L, NADLER JL, WHITE PC. The product of the *CYP11B2* gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. **Mol Endocrinol** 5: 1513-1522, 1991.
- CURNOW KM, SLUTSKER L, VITEK J, COLE T, SPEISER PW, NEW MI, WHITE PC, PASCOE L. Mutations in *CYP11B1* causing Congenital Adrenal Hyperplasia and Hypertension Cluster in exons 6,7 and 8. **Proc Natl Acad Sci USA** 90: 4552-4556, 1993.
- DE CARVALHO CE, PENACHIONI JY, CASTRO M, MOREIRA AC, MELLO MP. *CYP11B1* intragenic polymorphisms give evidence for a different Q356X allele in an African-Brazilian Patient. **Jour Endocr Gen**, 1999.
- DOMALIK LJ, CHAPLIN DD, KIRKMAN MS, WU RC, LIU WW, HOWARD TA, SELDIN MF, PARKER, KL. Different isozymes of mouse 11 beta-hydroxylase produce mineralocorticoids and glucocorticoids. **Mol Endocrinol** 5(12): 1853-61, 1991.
- ERDMANN B, DENNER K, GERST H, LENZ D, BERNHARDT R. Human Adrenal *CYP11B1*: Localization by in situ-Hybridization and Functional Expression in Cell Cultures. **Endocr Res** 21: 425-435, 1995.
- FARDELLA CE, HUM DW, RODRIGUEZ H, ZHANG G, BARRY FL, ILICKI A, BLOCH CA, MILLER WL. Gene conversion in the *CYP11B2* gene encoding P450c11AS is associated with, but does not cause, the syndrome of corticosterone methyloxidase II deficiency. **J Clin Endocr Metab** 81(1): 321-326, 1996.
- FISHER A, FRASER R, Mc CONNELL J, DAVIES E. Amino acid residue 147 of human aldosterone synthase and 11 β -hydroxylase plays a key role in 11 β -hydroxylation. **J Clin Endocr Metab** 85(3): 1261-1266, 2000.
- GELEY S, KAPELARI K, JOHRER K, PETER M, GLATZL J, VIERHAPPER H, SIEGFRIED S, HELMBERG A, SIPPELL WG, WHITE PC, KOFLER R. *CYP11B1* Mutations Causing Congenital Adrenal Hyperplasia due to 11 β -Hydroxylase Deficiency, **J Clin Endocr Metab** 81: 2896-2901, 1996.
- GIESE K, PAGEL J, GROSSCHEDL R. Distinct DNA-binding properties of HMG domain of murine and human SRY. **Proc Natl Acad Sci USA** 91: 3368-72, 1994.
- GITELMAN SE, BRISTOW J, MILLER WL. Mechanism and consequences of the duplication of the human *C4/P450c21*/gene X-locus. **Mol Cell Biol** 12: 2124-2134, 1992.

- GUBBAY J, COLLIGNON J, KOOPMAN P, CAPEL B, ECONOMOU A, MÜNSTERBERG A. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family embryonically expressed genes. **Nature** **346**: 245-50, 1990.
- GUERRA GJ, MACIEL-GUERRA AT. A determinação e a diferenciação sexual normais: atualização. **Arquivos Brasileiros de Endocr e Metab** **41(4)**: 191-197, 1997.
- HAQQ CM, KING CY, DONAHOE PK, WEISS MA. SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. **Proc Natl Acad Sci USA** **90**: 1097-101, 1993.
- HARINARAYAN CV, AMMINI AC, KARMAKAR MG, PRAKASH V, GUPTA R, TANEJA N, MOHAPARA I, KUCHERIA K, AHUJA MM. Congenital adrenal hyperplasia and complete masculinization masquerading as sexual precocity and cryptorchidism. **Indian Pediatr** **29**: 103-106, 1992.
- HAWKINS JR. The SRY gene. **Trends Endocrinol Metab** **4**: 328-38, 1993.
- HELMBERG A. Twin genes and endocrine disease: CYP21 and CYP11B genes. **Acta Endocrinol** **129**: 97-108, 1993.
- HELMBERG A, AUSSERER B, KOFLER R. Frame Shift by Insertion of 2 Basepairs in Codon 394 of CYP11B1 Causes Congenital Adrenal Hyperplasia due to Steroid 11 β -Hydroxylase Deficiency. **J Clin Endoc Metab** **75**: 1278-1281, 1992.
- HIGASHI Y, YOSHIOKA H, YMANE M, GOTOH O, FUJI-KURUYAMA Y. Complete nucleotide sequence of 2 steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged on human chromosome: A pseudogene and a genuine gene. **Proc Natl Acad Sci USA** **83**: 2841-2845, 1986.
- HOCHBERG Z, BENDERLY A, ZADIK Z. Salt loss in congenital adrenal hyperplasia due to 11 beta-hydroxylase deficiency. **Arch Dis Child** **11**: 1092-4, 1984.
- HOCHBERG Z, SCHECHTER J, BENDERLY A, LEIBERMAN E, RÖSLER A. Growth and pubertal development in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 11-beta-hydroxylase deficiency. **Ma J Dis Child** **139**: 771-776, 1985.
- HOCHBERG Z, BENDERLY A, KAHANA L, ZADIK Z. Requirement of mineralocorticoid in congenital adrenal hyperplasia due to 11 beta-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **63(1)**: 36-40, 1986.

- HUANG CH, REID M, DANIELS G, BLUMENFELD OO. Alteration of splice site selection by an exon mutation in the human glycophorin A gene. **J Biol Chem** **268**: 25902-25908, 1993.
- HUMA Z, CRAWFORD C, NEW MI. Congenital adrenal hyperplasia. In: Brook CGD, ed. *Clinical Paediatric Endocrinology*. London: Blackwell Science Ltd, 1995.
- JOEHRER K, GELEY S, STRASSER-WOZAK EMC, AZZIZ R, WOLLMANN HA, SCHMITT K, KOFLER R, WHITE, PC. *CYP11B1* mutations causing non-classic adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. **Hum Mol Genet** **6(11)**: 1829-34, 1997.
- JUNQUEIRA LC & CARNEIRO J. *Histologia Básica*. Ed. Guanabara Koogan, 8ª edição, 1995.
- KALLEN CB, ARAKANE F, CHRISTENSON LK, WATARI H, DEVOTO L, STRAUSS JF. Unveiling the mechanism of action and regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. **Mol Cell Endocrinol** **145(1-2)**: 39-45, 1998.
- KAWAMOTO T, MITSUUCHI Y, OHNISHI T, ICHIKAWA Y, YOKOYAMA Y, SUMIMOTO H, TODA K, MIYAHARA K, KURIBAYASHI I, NAKAO K, HOSODA K, YAMAMOTO Y, IMURA H, SHIZUTA Y. Cloning and Expression of a cDNA for Human Cytochrome P-450 α Related to Primary Aldosteronism. **Biochem Biophys Res Comm** **173**: 309-316, 1990.
- KIRITA S, MOROHASHI K-I, HASHIMOTO T, YOSHIOKA H, FUJII-KURIYAMA Y, OMURA T. Expression of two kinds of cytochrome P-450-11 β mRNA in bovine adrenal cortex. **J Biochem** **104**: 683-686, 1988.
- KOWARSKI A, RUSSELL A, MIGEON CJ. Aldosterone secretion rate in the hypertensive form of congenital adrenal hyperplasia. **J Clin Endocrinol Metab** **28(10)**: 1445-9, 1968.
- KRAWCZAK M, COOPER DN. The Human Gene Mutation Database. **Trends Genet** **13**: 121-122, 1997.
- LAUE L, RENNERT OM. Congenital adrenal hyperplasia: molecular genetics and alternative approaches to treatment. **Adv Pediatr** **42**: 113-43, 1995.
- LENORE S, LEVINE MD. Congenital adrenal hyperplasia. **Pediatr Rev** **21(5)**: 159-170, 2000.

- LEVINE LS, RAUH W, GOTTESDIENER K, CHOW D, GUNCZLER P, RAPAPORT R, PANG S, SCHNEIDER B, NEW MI. New Studies of 11-beta-Hydroxylase and 19-Hydroxylase Enzymes in the Hypertensive Form of Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Clin Endocr Metab* 50: 258-263, 1980.
- LIEBHABER SA, GOOSSENS M, KAN YW. Homology and concerted evolution at the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ loci of human α -globin. *Nature* 290: 26-29, 1981.
- LIEL Y. Acute adrenal crisis complicating hypertensive congenital adrenal hyperplasia due to 11 beta-hydroxylase deficiency. *Clin Genet* 43(2): 92-3, 1993.
- LIFTON RP, DLUHY RG, POWERS M, RICH GM, COOK S, ULICK S, LALOUEL JM. A chimaeric 11 β -hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 355: 262-265, 1992.
- MERKE DP, TAJIMA T, CHHABRA A, BARNES K, MANCILLA E, BARON J, CUTLER GB. Novel *CYP11B1* mutations in congenital adrenal hyperplasia due to steroid 11 β -hydroxylase deficiency. *J Clin Endocr Metab* 83(1): 270-3, 1998.
- MILLER WL. Gene conversions, deletions and polymorphisms in congenital adrenal hyperplasia. *Am J Hum Genet* 42: 4-7, 1988.
- MIMOUNI M, KAUFMAN H, ROITMAN A, MORAG C, SADAN N. Hypertension in a neonate with 11-beta-hydroxylase deficiency. *Eur J Pediatr* 143: 231-233, 1985.
- MITANI F, OGISHIMA T, MIYAMOTO H, ISHIMURA Y. Localization of P450Aldo and P45011 β in Normal and Regeneration Rat Adrenal Cortex. *Endocr Res* 21: 413-423, 1995.
- MOREL Y, MILLER WL. Clinical and molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia due to 21- hydroxylase deficiency. *Adv Hum Genet* 20: 1-68, 1991.
- MORNET E, DUPONT J, VITEK A, WHITE PC. Characterization of Two Genes Encoding Human Steroid 11 β -hydroxylase (P450-11 β). *J Biol Chem* 264: 20961-20967, 1989.
- MÜLLER J, SCHMID C, BONI-SCHNETZLER M, LAUBER M. Two Forms of Cytochrome P45011 β in Rat Glomerulosa Cells- a Short Review. *Endocr Rev* 17: 165-184, 1991.

- NAIKI Y, KAWAMOTO T, MITSUUCHI Y, MIYAHARA K, TODA K, ORII T, IMURA H, SHIZUTA Y. A Nonsense Mutation (TGG [Trp116] $\Rightarrow$ TAG [Stop] in CYP11B1 Causes Steroid 11 β -Hydroxylase Deficiency. **J Clin Endocrin Metabol** 77: 166-1682, 1993.
- NAKAGAWA Y, YAMADA M, OGAWA H, IGARASHI Y, Missense mutation in CYP11B1 (CGA[Arg-384] - GGA [Gly]) causes steroid 11 β -hydroxylase deficiency. **Eur J Endocrinol** 132: 286-289, 1995.
- NEW MI, OBERFIELD SE, LEVINE LS, DUPONT B, POLACK MS, GILL JR, BARTTER FC. Demonstration of autosomal dominant transmission and the absence of HLA linkage in dexamethasone suppressible hyperaldosteronism. **Lancet** 1: 550-551, 1980.
- NEW MI, GERTNER JM, SPEISER PW, DEL BAZO P. Growth and final height in classical and non-classical 21-hydroxylase deficiency. **J Endocr Invest** 12: 91-95, 1989.
- NEW MI. Diagnosis and Management of congenital adrenal hyperplasia. **Annu Ver Med** 49: 311-28, 1998.
- NONAKA Y, MATSUKAWA N, YING Z, OGIHARA T, OKAMOTO M. Molecular Nature of Aldosterone Synthase, A Member of Cytochrome P-45011 β Family. **Endocr Res** 17: 151-163, 1991.
- OGISHIMA T, SHIBATA H, SHIMADA H, MITANI F, SUZUKI H, SARUTA T, ISHIMURA Y. Aldosterone synthase cytochrome P-450 expressed in the adrenals of patients with primary aldosteronism. **J Biol Chem** 266(17): 10731-4, 1991.
- OKAMOTO M, NONAKA Y, OHTA M, TAKEMORI H, KRISHNA HALDER S, ZHI-NONG W, SUN T, HATANO O, TAKAKUSU A, MURAKAMI T. Cytochrome P450(11 β): Structure-Function Relationship of the Enzyme and its Involvement in Blood Pressure Regulation. **J Steroid Biochem Molec Biol** 53: 89-94, 1995.
- PAGE DC, MOSHER R, SIMPSON JL, FISHER EM, MARDON G, MCGILLIVRAY B. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. **Cell** 51: 1091-104, 1987.
- PAGE DC, FISHER EM, MCGILLIVRAY B, BROWN LG. Additional deletion in sex-determining region of the human Y chromosome resolves paradox of 46, X, t (Y;22) female. **Nature** 346: 279-81, 1990.

- PASCOE L, CURNOW KM, SLUTSKER L, CONNELL JMC, SPEISER PW, NEW MI, WHITE PC. Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism results from hybrid genes created by unequal crossovers between *CYP11B1* and *CYP11B2*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 8327-8331, 1992.
- PASCOE L. The biochemical phenotypes of two inborn errors in the biosynthesis of aldosterone. *J Endocrinol Invest* **18**(7): 571-5, 1995.
- PEREIRA ET, DE ALMEIDA JC, CUNHA AC, PATTON M, TAYLOR R, JEFFREY S. Use of probes for ZFY, SRY and the Y pseudoautosomal boundary in XX males, XX true hermaphrodites and an XY female. *J Med Genet* **28**: 591-5, 1991.
- PETER M, DUBUIS JM, SIPPELL WG. Disorders of aldosterone synthase and steroid 11 β -Hydroxylase deficiencies. *Horm Res* **51**: 211-222, 1999.
- PVINIK EK, WATCHEL SS, WOODS D, SIMPSON JL, BISHOP CE. Mutations in the conserved domain of SRY are uncommon in XY gonadal dysgenesis. *Hum Genet* **90**: 1091-104, 1987.
- RAINEY W.E. Adrenal Zonation: clues from 11 β -hydroxylase and aldosterona synthase. *Mol Cell Endocr* **151**: 151-160, 1999.
- RODRIGUEZ-PORTALES JA, ARTEAGA E, LOPEZ-MORENO JM, BIGLIERI EG. Zona glomerulosa function after life-long suppression in two siblings with the hypertensive virilizing form of congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. **66**(2): 349-54, 1988.
- RÖSLER A, LEIBERMAN E, SACK J, LANDAU, H, BENDERLY A, MOSES SW, COHEN T. Clinical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11-beta-hydroxylase deficiency. *Horm Res* **16**: 133-141, 1982.
- RÖSLER A, WESHLER N, LEIBERMAN E, HOCHBERG Z, WEIDENFELD J, SACK J, CHEMKE J. 11 β -hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia: update of prenatal diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab* **66**: 830-838, 1988.
- RÖSLER A, LEIBERMAN E, COHEN T. High frequency of congenital adrenal hyperplasia (classic 11 β -hydroxylase deficiency) among Jews from Morocco. *Am J Med Genet* **42**: 827-34, 1992.
- RÖSLER A, WHITE PC. Mutations in Human 11 β -Hydroxylase Genes: 11 β -Hydroxylase Deficiency in Jews of Morocco and Corticosterone Methyl-Oxidase II Deficiency in Jews of Iran. *J Steroid Biochem Molec Biol* **45**: 99-106, 1993.

- ROYER P, LESTRADET H DE MENIBUS CH, VERMEIL G.
Hypoaldostérisme familial chronique a début néo-natal. **Ann Pédiatri** 8:
133-138, 1961.
- SINCLAIR AH, BERTA P, PALMER MS, HAWKINS JR, GRIFFITHS BL,
SMITH MJ. A gene from the human sex-determining region encodes a protein
with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature** 346: 240-4, 1990.
- SKINNER CA, RUMSBY G. Steroid 11 β -Hydroxylase Deficiency Caused by a
Five Base Pair Duplication in the CYP11B1 Gene. **Hum Mol Genet** 3: 377-
378, 1994.
- SKINNER CA, RUMSBY G, HONOUR JW. Single Strand Conformation
Polymorphism (SSCP) analysis for detection of Mutations in the *CYP11B1*
gene. **J Clin Endocrinol Metab** 81(6): 2389-2393, 1996.
- SKINNER CA, YOUSAF N, HONOUR JW, RUMSBY G. Characterization of
polymorphisms at the 11 β -hydroxylase (CYP11B1) locus. **Ann Hum Genet**
62: 181-183, 1998.
- STRACHAN, T. , Molecular Genetics of Congenital Adrenal Hyperplasia. **Trends**
Endocr 32: 68-72, 1989.
- SUTHERLAND DJA, RUSE JL, LAIDLAW JC. Hypertension, increased
aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by
dexamethasone. **Can Med Assoc J** 95: 1109-1119, 1966.
- THOMPSON MW, McINNES RR, WILLARD HF. Genética Médica. Ed.
Guanabara Koogan, 5ª edição, 1993.
- ULICK S, GAUTIER E VETTER KK, MARKELO JR, YAFFE S, LOWE CU.
An aldosterone biosynthetic defect in a salt-losing disorder. **J Clin**
Endocrinol Metab 24: 669-672, 1964.
- VISSER HKA, COST WS. A new hereditary defect in the biosynthesis of
aldosterone: urinary C21-corticosterone pattern in three related patients with a
salt losing syndrome , suggesting an 18-oxidation defect. **Acta Endocrinol**
(Copenh) 47: 589-612, 1964.
- WHITE PC, Defects in cortisol metabolism causing low-renin hypertension.
Endocr Res 17: 85-107, 1991a.

- WHITE PC, DUPONT B, NEW MI, LEIBERMAN E, HOCHBERG Z, RÖSLER A. A Mutation in CYP11B1 (Arg-448 $\Rightarrow$ His) Associated with Steroid 11 β -Hydroxylase Deficiency in Jews of Moroccan Origin. **J Clin Invest** 87: 1664-1667, 1991b.
- WHITE PC, NEW MI. Genetic basis of endocrine disease. 2. Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 74: 6-11, 1992.
- WHITE PC, CURNOW KM, PASCOE L. Disorders of Steroid 11 β -Hydroxylase Isozymes. **Endocr Rev** 15: 421-438, 1994.
- WHITE PC, SLUTSKER L. Haplotype analysis of CYP11B2. **Endocr Res** 21: 437-442, 1995.
- WHITFIELD LS, LOVEL-BADGE R, GOODFELLOW PN. Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. **Nature** 364: 713-5, 1993.
- ZACHMANN M, TASSINARI D, PRADER A. Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. A study of 25 patients. **J Clin Endocrinol Metab** 56: 222-9, 1983.
- ZADIK Z, KAHANA L, KAUFMAN H, BENDERLY A, HOCHBERG Z. Salt loss in hypertensive form of congenital adrenal hyperplasia (11-beta-hydroxylase deficiency). **J Clin Endocrinol Metab** 58(2): 384-7, 1984.

ANEXOS

Legenda:

→ Região flanqueadora 5'e 3'.

→ Introns

→ Éxons

→ Mutações encontradas

→ Polimorfismos

-636	TTTTCTAGTT	CTTTTAATTG	TGATGTTAGG	GTGTCAGTTT	TGGATCTTTC
-586	CTGCTTTCTC	TTGTGGGCAT	TTAGTGCTAT	AAATTTCCCT	CTACACACTG
-536	CTTTGAATGT	GTTCCAGAGA	TTCTGGTATG	CTGTGTCTTT	GTTCTCGTTG
-486	GTTTCAAGAA	CATCTTTATT	TCTGCCTTCA	TTTTGTTACG	TACCCAGTAG
-436	TCATTCAGGA	GCAGGTTGCT	CAGTTTCCAT	GTAATTGAGC	GGTTTTGAGT
-386	GAGTTTCTTA	ATCCTGAGTT	CTAGTTTGAT	TGCACTAAAA	TTTTTAAAAA
-336	GTAAAAA	TACATGTGGT	TTAATACAAT	TCATGCCAAC	TCATTCCCTC
-286	GTTTTTTGCT	ATAAACCTTG	CAAGGAGATG	AATAATCCAA	GGCTCTTGGA
-236	TAAGATAAGG	GCCCCATCCA	TCTTGCTCCT	CTCAGCCCTT	GGAGGAGGAG
-186	GGAGAGTCCT	TTTCCCCTGT	CTACGCTCAT	GCACCCCCAA	TGAGTCCCTG
-136	CCTCCAGCCC	TGACCTCTGC	CCTCGGTCTC	TCAGGCAGAT	CCAGGGCCAG
-86	TTCTCCCATG	ACGTGATCCC	TCTCGAAGGC	AAGGCACCAG	GCAAGAT TAAA

Tata Box

-36	AGGATTGCAG	CTGAACAGGG	Transcrito primário TGGAGGGAGC	ATTGGA	ATGG	CACTCAGGGC
					Exon 1 +1	
14	AAAGGCAGAG	GTGTGCATGG	CAGTGCCCTG	GCTGTCCCTG	CAAAGGGCAC	
64	AGGCACTGGG	CACGAGAGCC	GCCCGGGTCC	CCAGGACAGT	GCTGCCCTTT	
114	GAAGCCATGC	CCCGG ¹ CGTCC	AGGCAACAGG	TGGCTGAGGC	TGCTGCAGAT	
164	CTGGAGGGAG	CAGGGTTATG	AGGACCTGCA	CCTGGAAGTA	CACCAGACCT	
214	TCCAGGAACT	G ² GGGCCCATT	TTCAGGTAAA	GCCCTCCCTG	GCCCTCGCTG	
264	GAACACCCAG	TGCCCTGCCC	TTGCTGCCCCA	GGACCCTGCC	GGGCACTCAG	
314	CACTGCCATT	CCCAGCAGGT	CCCGGCACTC	TGCATCCTTT	GGAAGAGGGA	
364	AGATCGAGCA	CGTGCTGTCT	GTGCGCTGCA	GGGCAGGGCA	TGTGCAGAGC	
414	AAATGGGAGC	TCGGCTGCAG	AGAGGGCAGG	ACTCAGAGGC	ACTGAAGTTA	
464	AGAGGTTCGG	GGCAGTCAGC	AAGAGGGCGT	TTAGCTGTGA	AGCCGCTAAT	
514	CCAGGAGAGG	GGAGGGTGGA	CAGGAGACAC	TTTGGATTGG	GACTGCAGGG	
564	TGGGGCCAGC	AGGGACTAGA	CCCCGTCCAG	CAGGGCCTCC	TGCTTGCCCC	
		Exon 2				
614	CACAG	GTACG	ATT ³ GGGAGG	AGCAGGCATG	GTGTGTGTGA	TGCTGCCGGA
664	GGACGTGGAG	AAGCTGCAAC	AGGTGGACAG	CCTGCATCCC	CACAGGATGA	

¹ Polimorfismo R43Q: CGG→CAG

714 GCCTGGAGCC CTGGGTGGCC TACAGACAAC ATCGTGGGCA CAAATGTGGC
 764 GTGTTCTTGC TGTAAAGCGGC GAGCTGAGAG CTGGGAGCAG GGTGGGCAGC
 814 CTGGGTGTAG GGGGGAGGCG AGAGAGGCAG GAAAAGCTTG ACAACAGGGG
 864 TCAGTTCCTT TCTTGCAGAA AATCCCTCCC CCCTACTACA GGGAGGGCCC
 914 GCATGGGTGA GGTGGTGCCA GACTTGGGGC GCCAGGTCCC GGAATGACC
 964 TCAGTTACCC TGTCAGCACC TGTGGGCAGA AGCTACCATC TCATCCCTGC
 1014 TTAGACCTGA GTGGCCTTTG TCCAGCACCT GGAGGCCGTC TGAGAAAAGG
 1064 CTGCAGCTCG AACACAAACA GGCAGCTTCT ACCAGGGCCC CCAGTCAGCT
 1114 CCCTGCAGGC CGATTCCCCT TGGGACAAGG AGGATGGGAT ACGGGTCAGG
 1164 GCCTGTGTTT TGCTGGGGCG GCCTCACAAG CTCTGCCCTG GCCTCTGTAG
 Exon 3
 1214 GAATGGGCCT GAATGGCGCT TCAACCGATT GCGGCTGAAT CCAGAAGTGC
 1264 TGTCGCCCAA CGCTGTGCAG AGGTTCTCTC CGATGGTGGA TGCAGTGGCC
 1314 AGGGACTTCT CCCAGGCCCT GAAGAAGAAG GTGCTGCAGA ACGCCCGGGG
 1364 GAGCCTGACC CTGGACGTCC AGCCCAGCAT CTTCCACTAC ACCATAGAAG
 1414 GTGTGGGCCA CATGGGTGGA TCCAGCCTCA GAGACCCTGG AGTGGCCAGG

² Polimorfismo L75L: CTG→CTA³ Polimorfismo D82D: TTT→CTT

1464	GACGGGGATG	GGGGACTGAA	GGGAGTGTGG	GGAGGCAGCC	AGGAGGCCCG
				Exon 4	
1514	GTTCCCTTGT	GCTCAGCAGT	GCATCCTCCC	CGCAG	CCAGC AACTTGGCTC
1564	TTTTTGGAGA	GCGGCTGGGC	CTGGTTGGCC	ACAGCCCCAG	TTCTGCCAGC
1614	CTGAACTTCC	TCCATGCCCT	GGAGGTCATG	TTCAAATCCA	CCGTCCAGCT
1664	CATGTTCATG	CCCAGGAGCC	TGTCTCGCTG	GACCAGCCCC	AAGGTGTGGA
1714	AGGAGCACTT	TGAGGCCTGG	GACTGCATCT	TCCAGTACG ⁴ G	TGAGGCCAGG
1764	GACCCGGGCA	GTGCTATGGG	GAAGGACACC	ATCGGGCCCC	CAATTTCTCC
1814	CTCTCCACCA	CCCAGTGGGG	AATGGAGGCC	ACAGGGAGGG	GTCGGGGATT
1864	CCTCACCGTC	CTGCCAGGGA	GATTGGTGTG	AGGCTGGGGC	TGGGCTGGGC
1914	TGATCCGGAG	AATTTGGGAT	GAGAGCAGGG	AGACTTGGTG	CTGGGCTAGC
1964	TGGCAGGAGG	AGGACACTGA	AGGATGTTTC	CCAGCACCAA	AGTCTGAGGG
			Exon 5		
2014	CTGCCTCCCG	CTCCCCGGAT	AG	GCGACAAC	TGTATCCAGA AAATCTATCA
2064	GGAAGTGGCC	TTCAGCCGCC	CTCAACAGTA	CACCAGCATC	GTGGCC ⁵ GAGC
2114	TCCTGTTGAA	TGCGGAACTG	TCGCCAGATG	CCATCAAGGC	CAACTCTATG
2164	GAACTCACTG	CAGGGAGCGT	GGACACGGTC	AGGCCGGCAA	CCAGCCCCAC

⁴ Mutação G267S: GGC→AGC⁵ Polimorfismo A291A: GCG→GCA

2214	CCAGAGAGGG	TGATGCCAAG	CCTGCCTCCC	AGGCACTGCC	TGCCAATGTC
2264	ACACGGCGCC	CACGTGTCCC	ATGCCCAGGC	TATGGGCCCC	ACATTTCTTA
2314	CTTGGGATTG	TGATGTGATA	AACACGTTTG	CAGGTTGCCA	TGGTTGGAAT
2364	GGGGGGTTCC	TTTCCTTCTG	TGGAGGACTC	AGGGAAACGG	GGTTTGGATG
2414	GGCATTAGGA	TTTGAAGTCT	TGGGCTCTGT	CGTGCTCAGG	GTATGCATGT
2464	CTGCACCCCT	CACAGGGAGG	TTGTCCTGGG	AGGGGTGTCC	CGGGGGCTGA
2514	GTCCTCCTGT	GCAAGGTCTG	ACCCTGCAGC	TGTGTCTCCT	GCAG Exon 6 ACGGTG
2564	TTTCCCTTGC	TGATGACGCT	CTTTGAGCTG	GCTCGGAACC	CCAACGTGCA
2614	GCAGGCCCTG	CGCCAGGAGA	GCCTGGCCGC	CGCAGCCAGC	ATCAGTGAAC
2664	ATCCCCAG ⁶ AA	GGCAACCACC	GAGCTGCCCT	TGCTGCGTGC	GGCCCTCAAG
2714	GAGACCTTGC	GGTGGGTGCT	GGCTGAGGCC	TCCCTGTGGC	CCTGGCCCTG
2764	CTGGAGAGTC	AGCCCCCACT	GGGTGGTTGC	AGACAGAATC	TGGGCTATAA
2814	ACACCTACCC	AGCAGCCATC	CTGACTGCTC	TCTCGCGTCA	AGGACAGGGA
2864	GCTCTTCTTC	CTCTGGAATC	CCTCTTCAAC	GCCCTGGGGA	TTAACGTGGG
2914	GGCATGTCCT	TCTGCGCTCG	GGGCTGCTTA	AGTTAGGGGA	GGTTTGGCCG

⁶ Mutação Q356X: CAG→TAG

2964	GGCTCAGCAG	GTGCAAGGAA	GCACTTCCTA	CACCTGGGCT	TCCCATGGAT	
3014	CTGGGACCTC	TGCGGGGTCT	TCGGTAGGAA	GGGTGCAGAG	AGCACAGGAA	
3064	CCCCATCCCA	GCTGAGACCC	TTTCTATGGA	TGCCCCCACC	TCCAG	Exon 7 GCTCT
3114	ACCCTGTGGG	TCTGTTTCTG	GAGCGAGTGG	CGAGCTCAGA	CTTGGTGCTT	
3164	CAGAACTACC	ACATCCCAGC	TGGGGTGAGT	GAGCCCCACA	CCCTCGAGCT	
3214	GAGAACCTCC	CTCCCCAGTC	ATTCCCTGAT	CCCCGCTCTG	CTCCGTCCGC	
3264	AG	Exon 8 ACATTGGT	GC ⁷ GCGTGTTT	CTCTACTCTC	TGGGTCGCAA	CCCCGCCTTG
3314	TTCCCGAGGC	CTGAGCGCTA	TAACCCCCAG	CGCTGGCTAG	ACATCAGGGG	
3364	CTCCGGCAGG	AACTTCTACC	ACGTGCCCTT	TGGCTTTGGC	ATGCGCCAGT	
3414	GCCTTGGGCG	GCGCCTGGCA	GAGGCAGAGA	TGCTGCTGCT	GCTGCACCAT	
3464	GTGAGCAGGC	CCGGGGAATT	CTGGGCCTGG	GCTGTAAGGT	GGGGCTGGTC	
3514	AGGAATGAAA	CAGGTTGGAG	GCCAGGCTGC	TGTTCCCCCT	TCAGCATAAT	
3564	CTCTGCAACT	TTGAGGGTCT	GAGAAGGCTG	CACCACGTCG	ATGGGCTGCG	
3614	GACCAAGCCA	GATGGAAACC	CGGCTTCTGT	CCTAG	Exon 9 GTGCT	GAAACACCTC
3664	CAGGTGGAGA	CACTAACCCA	AGAGGACATA	AAGATGGTCT	ACAGCTTCAT	

⁷ Mutação R404C+: CGC→CCG

3714	ATTGAGGCC	AGCATGTGCC	CCCTCCTCAC	CTTCAGAGCC	ATCAACTAAT
3764	CACGTCTCTG	CACCCAGGGT	CCCAGCCTGG	CACCAGCCTC	CCTTTCTGCC
3814	TGACCCCAGG	CCACCCCTCT	TCTCTCCCAC	ATGCACAGCT	TCCTGAGTCA
3864	CCCCTCTGTC	TAACCAGCCC	CAGCACAAAT	GGAAC TCCCG	AGGGCCTCTA
3914	GGACCAGGGT	TTGCCAGGCT	AAGCAGCAAT	GCCAGGGCAC	AGCTGGGGAA
3964	GATCTTGCTG	ACCTTG TCCC	CAGCCCCACC	TGGCCCTTTC	TCCAGCAAGC
4014	ACTGTCCTCT	GGCAGTTTGC	CCCCATCCCT	CCCAGTGCTG	GCTCCAGGCT
4064	CCTCGTGTGG	CCATGCAAGG	GTGCTGTGGT	TTTGTCCCTT	GCCTTCCTGC
4114	CTCTAGTCTC	ACATGTCCCT	GTTCTCTTTC	CCCTGCCAGG	GCCCCTGCGC
4164	AGACTGTCAG	AGTCATTAAG	CGGGATCCCA	GCATCTAGAG	TCCAGTCAAG
4214	TTCCCTCCTG	CAGCCTGCCC	CCTAGGCAGC	TCGAGCATGC	CCTGAGCTCT
4264	CTGAAAGTTG	TCGCCCTGGA	ATAGGGTCCT	GCAGGGTAGA	ATAAAAAGGC
4314	CCCTGTGGTC	ACTTGTCTCTG	ACATCCCCAT	TTTCAAGTGA	TACAACTGAG
4364	TCTCGAGGGA	CGTGTGTTCC	CCAGCTGATC	GTGTCAGCCT	CATGCCCCTG
4414	GCCTCATCTT	TCATGGACCA	GGCCTTGTTTC	CAGGAGTGGG	CGTTGGGTCC
4464	TCTGCTTCCT	GTGCTGTCCC	CTGGGGAAGG	TCCCAAGGAT	GCTGTCAGGA

4514 GATGGAAGAG TCATGTGGGG TGGGAACCTG GGGTGTGGTT CCAGAAATGT
4564 TTTTGGCAAC AGGAGAGACA GGATTGGGCC AACAAAGGACT CAGACGAGTT
4614 TTATTGACTA TTCTCTGACA

ARTIGO PUBLICADO

“*CYP11B1* intragenic polymorphisms give an evidence for a different Q356X allele in an African-Brazilian Patient”.

CYP11B1 Intragenic Polymorphisms Give Evidence for a Different Q356X Allele in an African-Brazilian Patient

C.E. De Carvalho¹, J.Y. Penachioni¹, M. Castro², A.C. Moreira² and M.P. De Mello¹

¹*Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas and* ²*Department of Physiology and Department of Medicine, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil.*

ABSTRACT

The adrenal cortex is responsible for the production of more than 50 different cholesterol-derived steroids. For such complex metabolism, an arsenal of functional enzymes is necessary. Deficiency of the 11 β -hydroxylase enzyme (11 β -OH) results in the interruption of the last step of cortisol production. It represents the second most frequent cause of congenital adrenal hyperplasia (CAH). Mutations in the 11 β OH coding gene (CYP11B1) have been described as the main cause of the 11 β -OH deficiency. We describe here a nonsense mutation on the CYP11B1 gene in a patient with 11 β -OH deficiency presenting with ambiguous genitalia at birth and premature pubarche, clitoris enlargement, hypertension and high 11-deoxycortisol levels at the chronological age of 2 yr. This patient is the daughter of a consanguineous couple of African descent. Sequencing data indicated a homozygous mutation (Q356X) in the 11 β -OH coding gene. Although the same mutation has been described before in two non-related patients of African-American origin, the investigation of intragenic polymorphisms raises the possibility of a different allele in the African-Brazilian patient. In addition, this is the first mutation determined in a patient with 11 β -OH deficiency in Brazil.

KEY WORDS

CYP11B1 gene, 11 β -OH deficiency, congenital adrenal hyperplasia

INTRODUCTION

Congenital adrenal hyperplasia (CAH), an autosomal recessive disorder, is one of the most common inherited endocrine disorders ¹⁻³. Deficiency of the 11 β -hydroxylase enzyme (11 β -OH) accounts for approximately 5-8% of all CAH patients ^{3,4}. Features of 11 β -OH deficiency include inability to synthesize cortisol, high ACTH levels, and overproduction of steroid precursors that are shunted into the androgen biosynthetic pathway. Female patients are born with ambiguous external genitalia and precocious pseudo-puberty occurs in both sexes ⁵. Deoxycorticosterone, a steroid with mineralocorticoid activity, accumulates in 11 β -OH deficiency and may cause hypertension and hypokalemia early in life in about two-thirds of untreated patients ⁵⁻⁷.

There are two genes (CYP11B1 and CYP11B2) encoding 11 β -OH isoenzymes ⁸ located in tandem on chromosome 8q22, a chromosomal array very similar to the 21-hydroxylase coding gene (CYP21B) and its pseudogene (CYP21A) ⁹. In contrast to CAH due to 21-OH deficiency, in which gene conversion events are the main mechanism of the mutant allele formation, gene conversion between CYP11B1 and its 95% homologous gene, CYP11B2, although possible ¹⁰, has never been described as responsible for CAH due to 11 β -OH deficiency; nonetheless it is responsible for frequent sequence polymorphisms ¹¹. Molecular cloning and characterization of the CYP11B1 gene ¹² showed a single copy gene, mapped at 40 kb

Reprint address:

Dra. Maricilda Palandi de Mello
Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
Universidade Estadual de Campinas, CP 6109
13083-970 Campinas, SP, Brasil
Email: mmello@obelix.unicamp.br

from CYP11B2, which codes for aldosterone synthase (cytochrome P450cAldo). The CYP11B1 gene encompasses 7 kb of genomic DNA, and contains 9 exons and 8 introns; its mRNA of 1,639 bp is specifically transcribed in the cells of the zona fasciculata¹². Point mutations in the CYP11B1 gene have been described as the main cause of 11 β -OH deficiency. To date, a total of 29 mutations have been found in the molecular analyses of patients with classical and non-classical 11 β -OH deficiency, being 25 nonsense/missense^{11,13-19}, four frameshift^{15-17,20} and one affecting a splice site¹¹. In general, mutations have been reported along the entire coding region, but they seem to cluster in two regions: exon 2 and exons 6 to 8¹⁷.

In this study we performed molecular genetic analysis of the CYP11B1 gene in a patient of African-Brazilian origin with 11 β -OH deficiency, and we describe the first CYP11B1 gene mutation reported in Brazil.

PATIENT AND METHODS

Patient

The patient was a three month-old girl of African origin with enlargement of the genital tubercle leading to clitoromegaly and with partially fused labioscrotal folds. Pubertal stage was Tanner stage 1 pubic hair. Height, weight, and blood pressure were normal and the patient did not present signs of mineralocorticoid deficiency. The female genotype was confirmed by a normal 46,XX karyotype. Both parents, who are first degree cousins, were apparently healthy as well as an older brother. Measurement of serum steroid metabolite levels (normal levels in parentheses) were: cortisol 26 (5-25 μ g/dl); testosterone 110 (<10 ng/dl); dehydroepiandrosterone sulfate 44 (<30 μ g/dl); 17-hydroxyprogesterone 503 (10-200 ng/dl); 11-desoxycortisol 6030 (25-68 ng/dl); corticosterone 2.8 (<2 μ g/dl); ACTH 365 (10-50 pg/ml); sodium 130 and 140 (135-145 mEq/l); potassium 5.0 and 4.6 (3.5-4.5 mEq/l). The diagnosis of CAH due to 11 β -hydroxylase was established and glucocorticoid replacement was initiated. With irregular follow up, the patient presented premature pubarche (Tanner stage 2 pubic hair), clitoris enlargement, and

hypertension (150/100 mm Hg) at the chronological age of 2 yr.

Steroid determination

Blood samples were collected in heparinized tubes and immediately centrifuged at 4°C. Plasma was kept frozen at -20°C until assayed. Plasma steroids and ACTH were measured using previously described methods²¹.

DNA extraction, amplification and sequencing

Genomic DNA samples were obtained from peripheral blood leukocytes using a previously described protocol²². Three fragments of the CYP11B1 gene were amplified by PCR using CYP11B1 specific primers that prevent the amplification of CYP11B2 (Table 1), as previously described by White *et al.*¹³. PCR was performed in a Thermocycle 480 (Perkin-Elmer) with an initial denaturation cycle at 95°C for 5 min, a "hot start" at 85°C, followed by 35 cycles (94°C 1 min, 65°C 1 min and 72°C 3 min) and a final extension cycle at 72°C for 10 min. The amplified fragments were treated with the PCR Product Pre-sequencing Kit (Amersham-Pharmacia) and were directly sequenced with Thermo-Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham-Pharmacia) using the same CYP11B1 specific primers or internal primers, when necessary (Table 1).

Sequence analysis

We compared the obtained sequencing data to the CYP11B1 sequence described by Mornet *et al.*⁸ (GENEBANK access # M32863, M32878, M32879). Sequence variations were verified in the GENEBANK access # D16153.

RESULTS

Direct sequencing of CYP11B1 fragment C showed that the 11 β -OH deficient patient is homozygous and her mother is heterozygous for the nonsense mutation CAG $\rightarrow$ TAG in exon 6 at codon 356 (Q356X) (Fig. 1). Unfortunately, the father was not available for molecular studies. In addition to this deleterious mutation in the CYP11B1 gene,

TABLE 1
Oligonucleotide CYP11B1 specific primers for PCR and sequencing

PCR and Sequencing			
Amplified exons	CYP11B1 specific primer sequences (5'→3')		Fragment size
1 and 2	11b1.2S	5' TCGAAGGCAAGGCACCAG 3'	866bp (A)
	11B1.2A	5' TGCTCCCAGCTCTCAGCT 3'	
3, 4 e 5	11b3.5S	5' AGAAAATCCCTCCCCCCT 3'	1401bp (B)
	11b3.5A	5' GACACGTGGGCGCCGTGT 3'	
6, 7, 8 and 9	11B6.9S	5' TGACCCTGCAGCTGTGTCT 3'	1542bp (C)
	11B6.9A	5' GAGACGTGATTAGTTGATGGC 3'	

Sequencing		
Position of Internal Primers	Primer sequences (5'→3')	Strand orientation
Intron 2	5' ACAAGGAGGATGGGATA 3'	sense
Intron 3	5' GGACTGAAGGGAGTGTG 3'	sense
Intron 4s	5' GGATGAGAGCAGGGAGAC 3'	sense
Intron 4a	5' AGCCTCACACCAATCTCCC 3'	antisense
Intron 6	5' GGTGCAGAGAGCACAGG 3'	sense
Intron 7	5' TCGAGCTGAGAACCTCC 3'	sense

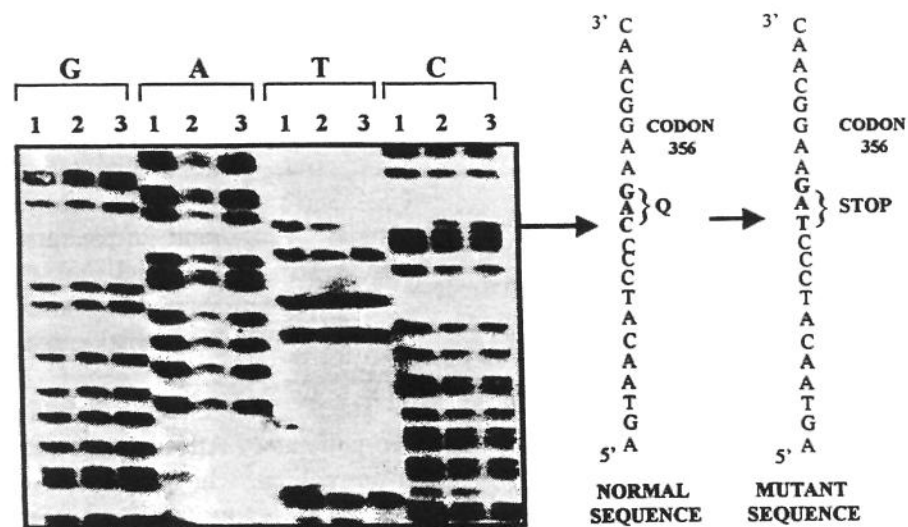


Fig. 1: CYP11B1 nucleotide sequence in a Brazilian patient with 11 β -hydroxylase deficiency showing the Q356X deleterious mutation. PCR products were directly sequenced using manual sequencing with Thermo-Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham-Pharmacia). Arrow indicates the C→T transition at nucleotide position 1066 causing a stop codon. Polyacrylamide gel was loaded in the following order: lane 1, patient; lane 2, patient's mother; lane 3, non-related normal control. Each set of three lanes corresponds to the nucleotide indicated above the numbers.

two polymorphisms were identified on the gene sequence of the patient: a CTG→CTA polymorphism in codon 75 at exon 1 (Leu75Leu) and a GAT→GAC polymorphism in codon 82 at exon 2 (Asp82Asp). In order to verify the frequency of common known polymorphisms, we investigated three CYP11B1 sequence variations in non-related alleles (Table 2), two of them in exon 1 and one in exon 2. The transition G→A at nucleotide position 128 that causes an amino acid change from arginine to glutamine is apparently a gene conversion from CYP11B2 (Fig. 2A) and it was previously described as a variation in codon 43 (R43Q) (GENEBANK access # D16153). The GAT→GAC polymorphism in exon 1 (Leu75Leu), which does not come from CYP11B2 (Fig. 2C), was found in the patient and in 28.6% (10/35) of the studied alleles. This polymorphism was first reported by Merke *et al.*¹¹. The silent mutation D82D represented by the transition GAT→GAC in codon 82 at exon 2, denoted as a "conflict" in the GENEBANK sequence #D16153, was also determined in the patient's gene sequence and in 73.3% (11/15) of the analyzed alleles. This nucleotide change may have originated from the CYP11B2 sequence in which codon 82 is AAC and codes an asparagine (Fig. 2B). The following two gene sequence variations, the transversion CTC→CTG, causing the silent mutation L362L in exon 6, and G→A causing the silent mutation A291A in exon 5, were investigated only in the patient's DNA: both were absent.

DISCUSSION

This paper describes the first mutation in the CYP11B1 gene in a Brazilian patient with 11 β -hydroxylase deficiency. The patient was homozygous for the Q356X mutation, as expected for a child of a consanguineous marriage. The same nonsense mutation (Q356X) has been previously described in two patients of African-American origin^{11,15}. Our patient is also of African origin, and the presence of the same mutation in patients of similar ethnic background suggests the possibility of a founder effect for the mutant allele.

The incidence of CAH due to 11 β -hydroxylase deficiency depends on the geographic location and ethnic background^{5,23-25}. In general, the incidence

is about 1/100,000-1/200,000 births in Caucasians⁵. A larger number of patients (1/5,000-1/7,000) has been reported in Israel among Jewish immigrants from Morocco²⁴. This presumably reflects a geographically and culturally isolated population and reinforces the idea for a founder effect of the R448H mutation, which probably originated in Jews or Berbers from South Morocco²⁴. In Saudi Arabia, the overall prevalence of the disease is not known; however, it seems not to be a rare disease in this part of the world²⁵. There is no report about the prevalence of this disease in Brazil. It is interesting to note that the ethnic origin of the Brazilian population is heterogeneous with a high degree of miscegenation. Different ethnic groups can be found unevenly distributed all over the country. In addition to the Indians and Portuguese colonists, Brazil received immigrants from several countries including Italy, Spain, Germany, Japan and the Middle East and Africa (Negro slaves). Several polymorphisms²⁶⁻²⁸, especially those linked to the β^s hemoglobin mutation, have provided important information regarding the genetic diversity in African-Brazilian populations^{29,30}. It has been demonstrated that the prevalence of the β^s hemoglobin Bantu haplotype is high in South-eastern Brazil (the region where this study was carried out) which received slaves from Angola, the Congo and Mozambique, while the β^s hemoglobin Benin haplotype, rare in the southeastern region, is frequent in the northeastern region which received slaves from Nigeria and Ghana³⁰. Likewise, the β^s hemoglobin Senegal haplotype, frequent in the USA and the Caribbean, is rare in Brazil. Such a genetic background differentiates African-Brazilians and makes the study of CAH in Brazil very interesting, and raises the possibility of achieving additional insights into the genetic modulation of the disease.

The Q356X mutation previously described in two patients of African-American origin and found in our patient, who is also of African origin, could directly represent a founder effect for 11-hydroxylase deficiency if African-Americans and African-Brazilians had the same origin in Africa. Historically, those two populations had different origins, although they share the same ancestry. The establishment of haplotypes by the investigation of

TABLE 2
CYP11B1 gene sequence polymorphisms analyzed in non-related alleles

Amino acid position (codon)	Number of non-related alleles (total)	Frequency (%)	Sequence in CYP11B2
R43 (CGG)	40 (45)	88.8	—
Q43 (CAG) variation	5 (45)	11.1	CAG
L75 (CTG)	25 (35)	71.4	CTG
L75 (CTA) variation	10 (35)	28.6	no
D82 (GAT)	4 (15)	26.4	—
D82 (GAC) variation	11 (15)	73.3	AAC

Numbers in parenthesis are the total of non-related alleles studied for each polymorphism.

CYP11B1 R43Q POLYMORPHISM								A
codon	40	41	42	43	44	45	46	
Aminoacid sequence	A	M	P	Q	H	P	G	CYP11B2
Nucleotide sequence	GCC	ATG	CCC	<u>CAG</u>	CAT	CCA	GGC	
Aminoacid sequence	A	M	P	R	R	P	G	CYP11B1
Nucleotide sequence	GCC	ATG	CCC	<u>CGG</u>	CGT	CCA	GGC	
Aminoacid sequence	A	M	P	Q	R	P	G	CYP11B1
Nucleotide sequence	GCC	ATG	CCC	<u>CAG</u>	CGT	CCA	GGC	variation

CYP11B1 D82D POLYMORPHISM								B
codon	79	80	81	82	83	84	85	
Aminoacid sequence	F	R	Y	N	L	G	G	CYP11B2
Nucleotide sequence	TTC	AGG	TAC	<u>AAC</u>	TTG	GGA	GGA	
Aminoacid sequence	F	R	Y	D	L	G	G	CYP11B1
Nucleotide sequence	TTC	AGG	TAC	<u>GAT</u>	TTG	GGA	GGA	
Aminoacid sequence	F	R	Y	D	L	G	G	CYP11B1
Nucleotide sequence	TTC	AGG	TAC	<u>GAC</u>	TTG	GGA	GGA	variation

CYP11B1 L75L POLYMORPHISM								C
codon	72	73	74	75	76	77	78	
Aminoacid sequence	F	Q	E	L	G	P	I	
Nucleotide sequence	TTC	CAG	GAG	<u>CTG</u>	GGG	CCC	ATT	CYP11B2
	TTC	CAG	GAA	<u>CTG</u>	GGG	CCC	ATT	CYP11B1
	TTC	CAG	GAA	<u>CTA</u>	GGG	CCC	ATT	CYP11B1 variation

Fig. 2: Alignment of CYP11B1 and CYP11B2 gene sequences highlighting three regions of frequent CYP11B1 polymorphisms. Panel A shows the R43Q polymorphism in the CYP11B1 gene that probably originated from the CYP11B2 sequence. Panel B shows the T→C polymorphism in codon 82 in the CYP11B1 gene; this polymorphism may also come from the CYP11B2 sequence. Panel C shows G→A in codon 75 which is absent in the CYP11B2 sequence.

intragenic polymorphisms linked to recurrent mutations helps to search for founder effects among ethnically similar populations. Figure 3 illustrates the different CYP11B1 haplotypes bearing the Q356X mutation found in different patients of African origin. There are no data about CYP11B1 sequence polymorphisms for the patient described by Curnow *et al.*¹⁵ (Fig. 3C). The patient described by Merke *et al.*¹¹ is heterozygous for the Q356X mutation inherited from her mother and presents two sequence variations, a G→A in exon 1 (Leu 75Leu) and a G→A (Ala291Ala) in exon 5. Nonetheless, those authors did not mention whether both variations were also inherited from the mother, which would mean that they are linked to the Q356X mutation; therefore the CYP11B1 haplotype in this case could be one of the three arrangements shown in Figure 3B. The patient described here is homozygous for the Q356X mutation and for two other polymorphisms. Like the patient studied by Merke *et al.*¹¹, our patient bears the G→A (Leu75Leu) sequence variation

which seems to be very frequent in the Brazilian general population (~30%). On the other hand, we did not identify the G→A (Ala291Ala) polymorphism but a T→C (Asp82Asp) polymorphism, not described in Merke's patient, although it is very frequent among the alleles studied here (73.3%). The presence of the T→C (Asp82Asp) polymorphism in our African-Brazilian patient indicates that the CYP11B1 haplotype (Fig. 3A) is different from the African-American haplotype described by Merke *et al.* (Fig. 3B)¹¹, suggesting that a recurrent mutation in itself may not represent a founder effect among different populations.

In conclusion, the present study identified the first mutation reported in a patient with 11β-OH deficiency in Brazil. Although Q356X is a recurrent mutation, intragenic polymorphisms give evidence for a different allele in the African-Brazilian patient. In addition, our data raise the need for more detailed molecular analysis to determine founder effects in frequently identified mutations.

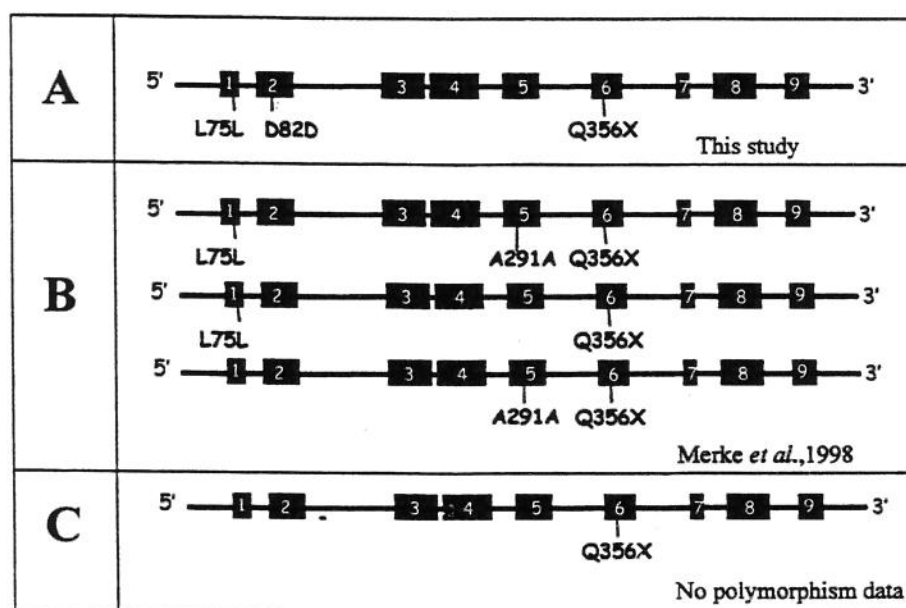


Fig. 3: CYP11B1 haplotypes bearing the Q356X mutation determined in three non-related patients of African origin. Panel A shows the CYP11B1 haplotype of the Brazilian patient described in this paper. Panel B shows the three possible CYP11B1 haplotypes of Merke's patient¹¹ who is heterozygous for the Q356X mutation. Panel C shows the haplotype for Curnow's patient¹⁵ with no information on intragenic polymorphism. Black boxes represent the CYP11B1 exons oriented from 1-9.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Maria Madalena V. Rosa for excellent technical assistance. This work was partially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. no. 97/14076-4).

REFERENCES

- Pang S. Congenital adrenal hyperplasia. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1997; 11: 281-306.
- White PC. Genetic diseases of steroids metabolism. *Vitam Hormones* 1994; 49: 131-195.
- White PC, Curnow KM, Pascoe L. Disorders of steroid 11 β -hydroxylase isozymes. *Endocr Rev* 1994; 15: 421-438.
- Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 49: 411-417.
- Zachmann M, Tassinari D, Prader A. Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. A study of 25 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 56: 222-229.
- Levine LS, Rauh W, Gottesdiener K, Chow D, Gunczler P, Rapaport R, Pang S, Shneider B, New MI. New studies of the 11 β -hydroxylase and 18-hydroxylase enzymes in the hypertensive form of congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 50: 258-263.
- Mimouni M, Kaufman H, Roitman A, Morag C, Sadan N. Hypertension in a neonate with 11 β -hydroxylase deficiency. *Eur J Pediatr* 1985; 143: 231-233.
- Mornet E, Dupont J, Vitek A, White PC. Characterization of two genes encoding human steroid 11 β -hydroxylase (P-450(11 β)). *J Biol Chem* 1989; 264: 20961-20967.
- Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2841-2845.
- Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, Lalouel JM. A chimaeric 11 β -hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 1992; 355: 262-265.
- Merke DP, Tajima T, Chhabra A, Barnes F, Mancilla E, Baron J, Cutler G. Novel mutation in congenital adrenal hyperplasia due to steroid 11 β -hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 270-273.
- Chua SC, Szabo P, Vitek A, Grzeschik KH, John M, White PC. Cloning of cDNA encoding steroid 11 β -hydroxylase (P450c11). *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7193-7197.
- White PC, Dupont B, New MI, Leiberman E, Hochberg Z, Rösler A. A Mutation in CYP11B1 (Arg-448 $\rightarrow$ His) associated with steroid 11 β -hydroxylase deficiency in Jews of Moroccan origin. *J Clin Invest* 1991; 87: 1664-1667.
- Naiki Y, Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Miyahara K, Toda K, Orii T, Imura H, Shizuta Y. A nonsense mutation (TGG [Trp116] $\rightarrow$ TAG [stop]) in CYP11B1 causes steroid 11 β -hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 166-1682.
- Curnow KM, Slutsker L, Vitek J, Cole T, Speiser PW, New MI, White PC, Pascoe L. Mutations in CYP11B1 causing congenital adrenal hyperplasia and hypertension cluster in exons 6, 7 and 8. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4552-4556.
- Skinner CA, Rumsby G. Steroid 11 β -hydroxylase deficiency caused by a five base pair duplication in the CYP11B1 gene. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 377-378.
- Geley S, Kapelari K, Johrer K, Peter M, Glatzl J, Vierhapper H, Siegfried S, Helmberg A, Sippell WG, White PC, Kofler R. CYP11B1 mutations causing congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2896-2901.
- Nakagawa Y, Yamada M, Ogawa H, Igarashi Y. Missense mutation in CYP11B1 (CGA[Arg-384] $\rightarrow$ GGA [Gly]) causes steroid 11 β -hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol* 1995; 132: 286-289.
- Joehrer K, Geley S, Strasser-Wozak EM, Azziz R, Wollmann HA, Schmitt K, Kofler R, White PC. CYP11B1 mutations causing non-classic adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1829-1834.
- Helmberg A, Ausserer B, Kofler R. Frame shift by insertion of 2 base pairs in codon 394 of CYP11B1 causes congenital adrenal hyperplasia due to steroid 11 β -hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1278-1281.
- Moreira AC, Leal AMO, Castro M. Characterization of adrenocorticotropin secretion in a patient with 17 α -hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 86-91.
- Araujo M, Sanches MR, Suzuki LA, Guerra G Jr, Farah SB, De Mello MP. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 1-13.
- Lubani MM, Issa ARA, Bushnaq R, Al-Saleh QA, Dudin KA, Reaven PC. Prevalence of congenital adrenal hyperplasia in Kuwait. *Eur J Pediatr* 1990; 149: 391-392.
- Rösler A, Leiberman E, Cohen T. High frequency of congenital adrenal hyperplasia (classic 11 β -hydroxylase deficiency) among Jews from Morocco. *Am J Med Genet* 1992; 42: 827-834.
- Al-Jurayyan N. Congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency in Saudi Arabia: clinical and

- biochemical characteristics. *Acta Paediatr* 1995; 84: 651-654.
26. Bortolini MC, Zago MA, Salzano FM, da Silva WA Jr, Bonatto SL, da Silva MC, Weimer TA. Evolutionary and anthropological implications of mitochondrial DNA variation in African Brazilian populations. *Hum Biol* 1997; 69: 141-159.
 27. Bortolini MC, Weimer TA, Salzano FM, Moura LB. Genetic structure of two urban Afro-Brazilian populations. *Int J Anthropol* 1997; 12: 5-16.
 28. Bortolini MC, da Silva WA Jr, Weimer T de A, Zago MA, de Guerra DC, Schneider MP, Layrisse Z, Castellano HM, Salzano FM. Protein and hypervariable tandem repeat diversity in eight African-derived South American populations: inferred relationships do not coincide. *Hum Biol* 1998; 70: 443-461.
 29. Gonçalves MS, Nechman JF, Figueiredo MS, Kerbaux J, Arruda VR, Sonati MF, Saad STO, Costa FF, Stoning TA. Sickle cell anemia in a Brazilian population from São Paulo. A study of the β^s haplotypes. *Hum Hered* 1994; 44: 96-97.
 30. Figueiredo MS, Kerbaux J, Gonçalves MS, Arruda VR, Saad STO, Sonati MF, Stoning TA, Costa FF. Effect of α -thalassemia and β -globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. *Am J Hematol* 1996; 53: 72-76.

ARTIGO ENVIADO

“Two novel mutations R404+C and G267s in the *CYP11B1* gene in Brazilian patients with 11-beta-hydroxylase deficiency”.

TWO NOVEL MUTATIONS R404+C AND G267S IN THE *CYP11B1* GENE IN BRAZILIAN PATIENTS WITH 11-BETA-HYDROXYLASE DEFICIENCY

Junia Y. Penachioni¹, Margaret de Castro², Tânia A. S. S. Bachega, Berenice B. Mendonça³
and Maricilda P. de Mello¹

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil; ²Dept. de Fisiologia, Faculdade de Medicina-Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil; and ³Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP, Brasil.

Short title: Novel mutations on *CYP11B1* gene

Corresponding author:

Maricilda Palandi de Mello, Ph.D.

CBMEG-UNICAMP

Caixa Postal 6010

CEP 13083-970, Campinas, SP

Brasil.

Phone # 55-19-3788-1146

Fax # 55-19-3788-1089

e-mail: mmello@unicamp.br

ABSTRACT

The 11 β -hydroxylase (11 β -OH) deficiency results in the impairment of the conversion of both 11-deoxycortisol to cortisol and 11-deoxycorticosterone to corticosterone. The clinical expression of this disorder in females includes several degrees of genital ambiguity and blood hypertension due to androgen excess and to the accumulation of mineralocorticoids, respectively. Mutations in the *CYP11B1* gene are responsible for the disease. We report two novel mutations in the *CYP11B1* gene in Brazilian patients. A complete virilized female patient is homozygous for the substitution of glycine to serine at amino acid residue 267 (G267S) and also alters the 5' donor splice site consensus sequence of intron 4. A patient from Arabian origin is homozygous for the insertion of a cytosine at the beginning of exon 8 changing the arginine of codon 404 to a proline and causes the reading frameshift from this point and creates a stop codon at amino acid 421. Both patients are children of consanguineous marriage and their mothers are heterozygous for respective mutations. In conclusion, we identified two novel *CYP11B1* affected alleles correlated with the classical form of congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase bearing a frameshift mutation and nucleotide variations causing both a missense mutation and splice alterations.

Key words: *CYP11B1* gene, 11 β -OH deficiency, novel mutations, congenital adrenal hyperplasia

INTRODUCTION

Congenital Adrenal Hiperplasia (CAH) is the general designation for autosomal recessive disorders characterized by inborn errors of steroidogenesis. CAH caused by the 11β -OH deficiency is a disorder of steroid metabolism, which impairs the last step of cortisol synthesis. Steroid 11β -OH deficiency comprises about 5% of CAH cases, occurring in about 1 of 100,000 births in the general Caucasian population (1). Features of 11β -OH deficiency include inability to synthesize cortisol, high ACTH levels, and overproduction of steroid precursors that are shunted into the androgen biosynthetic pathway (2-4). As in 21-hydroxylase deficiency, the more frequent cause of CAH, the overproduction of adrenal androgens leads to virilization of female fetus or pseudoprecocious puberty in male infants (2-4). In contrast to steroid 21-hydroxylase deficiency, untreated steroid 11β -OH-deficient patients have no salt loss. Patients frequently present low renin related to overproduction of deoxycorticosterone (DOC) and possibly other precursors with mineralocorticoid activity leading to severe hypertension in about two thirds of untreated patients, sometimes early in life (6-9).

The molecular basis of this disorder is the presence of inactivating mutations affecting the gene that encodes adrenal microsomal cytochrome CYP11B1 (4, 5). The *CYP11B1* gene codifies for the 11β -OH enzyme and maps to chromosome 8q21 at approximately 40 kilobases from the homologous *CYP11B2* gene coding for the aldosterone synthase (5). These two functional genes share 95% homology in the amino acid sequence, but they differ in the expression of catalytic activities (10). To date, there are a total of 34 mutations in *CYP11B1* gene, being 25 nonsense/missense, four mutations

involving splice process, two small deletions and three small insertions (11, 12). Those mutations are distributed over the entire coding region, but they seem to cluster specially in two regions, exon 2 and exons 6 to 8 (13). Moreover, different mutations have been reported in the same codon (9-11), suggesting either the presence of mutational hot spots or a low degree of mutational tolerance at special codons. There are also some recurrent mutations occurring mainly in certain ethnic groups (13-16), especially those with high degree of endogamy such as the Jewish from Iran and from Morocco suggesting a strong founding effect in the origin for the irradiation of the mutant alleles (17).

We performed molecular analysis of *CYP11B1* gene in two Brazilian Caucasian patients with 11 β -hydroxylase deficiency. This paper describes the novel G267S missense mutation associated to two intronic variations, and a new frameshift mutation, the insertion of a C at nucleotide 3275 (R404+C).

SUBJECTS AND METHODS

The following studies were undertaken under an institutionally approved ethic protocol and informed consent was obtained from all subjects.

Subjects

Two unrelated patients with 11 β -hydroxylase deficiency were studied. Patient 1, a Brazilian female child whose parents were Lebanese Arab and first grade cousins, presented with clitoral enlargement and fused labioscrotal folds. Serum hormone levels at diagnosis included a 17-hydroxyprogesterone level of 470 ng/dL (normal, 20–100), 11-

deoxycortisol of 121 ng/mL (normal, 0,8-3,6), testosterone of 74 ng/dL (normal, <10), androstenedione of 11 ng/ml (0,2-0,6), normal sodium and potassium and undetectable PRA. The 11-deoxycortisol plasma concentration after ACTH stimulation test was 147 ng/dL. Blood pressure (140/110 mmHg) normalized with glucocorticoid treatment. The external genitalia was corrected by surgery. The child remained prepubertal with growth along the 95th percentile until 10 years old, when telarche and pubarche started. She presents regular menstrual cycles and had no signs of over treatment.

Patient 2 is a Brazilian Caucasian girl who was born with micropenis and was initially raised as a male. At 12 months of age, she developed pubic hair and primary urinary incontinence. When she was five years old she was evaluated in our clinic hospital presenting micropenis, bilateral cryptorchidism and pubic hair (Tanner III) leading to the diagnosis of pseudoprecocious puberty in a 46,XX female with pseudohermaphroditism. Bone age was 11 yr, and systolic blood pressure was 100/60 mmHg. At diagnosis she had a serum 17-hydroxyprogesterone level of 70 ng/dL (normal, 20–100), 11-deoxycortisol of 40 ng/mL (normal, 0,8-3,6), testosterone of 160 ng/dL (normal, <10), androstenedione of 5,2 ng/ml (0,2-0,6), normal sodium and potassium and undetectable PRA, confirming the steroid 11 β -hydroxylase deficiency. The 11-deoxycortisol plasma concentrations after ACTH stimulation test were 81 ng/dL. The imaging exams showed presence of uterus and bilateral enlarged adrenals. Psychological evaluation disclosed a female identification and social sex was changed to female with complete adequacy. Suppressive treatment with acetate of cortisone (18 mg/m²) was initiated and the external genitalia was corrected by surgery.

Steroid determinations

Blood sample was collected in immediately centrifuged at 4°C. Serum was kept frozen at -20°C until assayed. Plasma steroids were measured using previously described methods (16).

DNA extraction, amplification and sequence analysis

Genomic DNA samples were obtained from peripheral leukocytes using a previously described protocol (18). PCR specific amplification of the *CYP11B1* gene was described elsewhere (16) and performed using specific *CYP11B1* primer pairs to prevent the amplification of *CYP11B2* (4). The amplified fragments were purified with in ConcertTM Rapid Gel Extraction System (Gibco-BRL) followed by the treatment with PCR Product Pre-sequencing Kit (Amersham-Pharmacia) and directly sequenced with Thermo-sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham-Pharmacia) using the internal primers (16). Sequencing data obtained in this study were compared to the *CYP11B1* gene sequence described by Mornet et al. (5) (GENEBANK access # M32863, M32878, M32879). Sequence variations were verified in the GENEBANK access # D16153.

RESULTS

DNA analysis of patient 1 by direct sequencing of *CYP11B1* fragment containing exons 6-9 with a primer sense of intron 7 showed an insertion of a cytosine in nucleotide

position 3275 from ATG codon of the genomic sequence (Figure 1A) at the beginning of exon 8 (R404+C). This insertion changes the arginine of codon 404 to a proline, CGC→CCG (R404P). Moreover, it causes the reading frameshift from this point and generates a stop codon at the aminoacid 421 (Figure 1B). The patient's mother is heterozygote for the R404+C mutation as it can be observed in the sequence gel, where, in each nucleotide, lanes 2 presents double bands above the point of the insertion, corresponding to the normal and the mutated allele, which is one nucleotide longer. Her father is deceased. None polymorphisms were found in the *CYP11B1* gene sequence of this patient.

Direct sequencing of *CYP11B1* fragment containing exons 3-5 using an intron 3 sense primer indicated that patient 2 is homozygous for the nucleotide change G→A at the residue 1753 (Figure 2A). This transition occurs in the last nucleotide of exon 4 causing the missense mutation G267S (GGC→AGC). This nucleotide is also at the position -1 of the intron 4 splice donor site and may influence the splicing process to form the mRNA. To test this hypothesis we used a splice site prediction program available in Internet (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html). Figure 3A shows that the G1753A cause a reduction of score for the donor splice site from 0.98 (normal sequence) to 0.42 (mutated sequence). The mother is heterozygous for the G267S mutation, whereas the DNA sample available from the father was not sufficient for the sequence analysis of this fragment. In addition to this deleterious mutation in the *CYP11B1* gene, a GAT→GAC polymorphism at codon 82 in exon 2 (D82D) was identified in homozygosis on the gene sequence of the patient and in heterozygosis in both parents. This nucleotide change may have been originated from *CYP11B2* sequence in which the codon 82 is AAC coding an asparagine

and it is considered to be very frequent (15). Two other intronic nucleotide variations have been found in this affected allele: the C→T transition at nucleotide 1511 on intron 3 (ISV3AS,-39, C→T) and the G→C transversion at nucleotide 3636 on intron 8 (ISV8AS,-14, G→C) (data not shown).

DISCUSSION

Steroid 11 β -hydroxylase deficiency is the second most common cause of congenital adrenal hyperplasia and results in the virilized and hypertensive form of the disease. A large number of cases have been reported among Jewish immigrants from Marroco or in Turkey ancestry (4). Recently, we described a recurrent mutation in the *CYP11B1* gene in an African-Brazilian patient, who presented different affected haplotype from the African-American patient carrying the same mutation (13, 15). In the present study we describe two new mutations in Brazilian patients, a new frameshift mutation (R404+C) and a novel homozygous G267S missense mutation in the *CYP11B1* gene of unrelated patients with 11 β -hydroxylase deficiency. The later occurs at the same codon of two different mutation previously reported by Skinner *et al.* (19).

Both patients were female and were born with masculinized external genitalia, since elevated levels of ACTH caused steroid precursors accumulation proximal to the blocked step and shunted them into the pathway for androgen biosynthesis during the intra uterine period. Patient 1 also presented hypertension in an early period of life whereas patient 2 did not develop hypertension. Although they had different clinical presentation with respect to mineralocorticoid activity, their biochemical parameters were very similar. It

has been described significant differences in signs and symptoms of androgen and mineralocorticoid excess and no correlation with biochemical parameters (9). The variation in the spectrum of phenotype has been described even in patients from families presumably with identical genotype (2). Therefore, other epigenetic or nongenetic factors probably influence the clinical phenotype of this disease.

Patient 1 has Arabian descent and is homozygous for the mutation R404+C while her mother was heterozygous. Although the molecular analysis of her father was not possible he was considered to carry the mutation, as the parents were first-degree cousins. The same consideration was applicable for patient 2 from Caucasian origin who is homozygous for the mutation G267S. The R448H mutation, also located in exon 8, has been described as very frequent in 11 β -OH deficiency patients of Arabian origin suggesting a strong founding effect for affected alleles among the Jewish from Iran and from Morocco. Although patient 1 is from Arabian origin, she presents a new mutation, different from the one expected for her ethnic group. The R404+C is considered to produce a truncated protein with deficient enzymatic activity since it causes a premature stop codon at amino acid 421.

A new mutation found in this study in exon 8 reinforces the idea that the region comprising exons 6-8, is "hot-spot" due to the fact that until now thirteen mutations, clustering in exons 6-8, have been identified in 11 β -hydroxylase-deficient patients from various ethnic groups. The high frequency of mutations in certain exons might reflect the presence of functionally important amino acids residues or, alternatively, a higher concentration of CpG dinucleotides in these exons. Methylated cytosine residues in CpG dinucleotides are prone to spontaneous mutation by deaminations to thymidine, a

mechanism possibly underlying some of these mutations (13). Another hypothesis is that mutations in this region are less tolerated because it involves very important amino acid residues for the enzyme activity. Codon 374 is considered to be responsible to the interaction with the accessory protein adrenodoxin (20), while codon 384 is thought to be involved in the substrate binding, and codon 448 interacts with the heme prosthetic group (21). The R404+C mutation eliminates the heme prosthetic group domain from the protein, therefore it will be completely inactive.

Patient 2 presented a new missense mutation G267S. The glycine to serine amino acid change in residue 267 itself is unlikely to be responsible for the severe phenotype of the patient for two reasons. One is that both amino acids are basic and probably the substitution does not cause drastic changes in the biochemical characteristics; the second is that the 267 position in the *CYP11B1* genes is not conserved among mammalian species (Figure 2C) indicating that the glycine 267 does not have an important role in the protein biological function. However, codon 267 is formed by the last nucleotide of exon 4 and the first two nucleotides of exon 5 and the mutation occurs in the last residue of exon 4 (G1753A) which is part of the consensus sequence of 5' donor splice site at the -1 position from the GT. The consensus sequence of 5' splice donor sites is considered to be (C/A)AG/GT(G/A)AGT (22) which is recognized by nuclear ribonucleoproteins involved in the splice process. Substitutions at the very conserved -1 nucleotide might influence mRNA splicing. Huang *et al.* (23) have shown that a G to A transition in the last nucleotide position of an exon was sufficient to reduce the level of correctly spliced RNA in the human glycophorin A gene. Splicing consensus sequences forming splice sites can be predicted with an estimated score (24). As RNA from adrenal gland of this patient was not available for analysis, an alternative for the RNA experiments was the use of a splice site prediction program to show

that the G1753A cause a reduction of the score for the normal sequence of donor splice site from 0.98 to 0.42 for the mutated sequence (Figure 3A). Two other missense mutations have been described in the same codon, the G267R and the G267D (19). The G267R is provoked by a G to C change at the nucleotide 1753, therefore it alters the first nucleotide of codon 267 as well. This substitution is predicted to reduce the score of normal donor splice site to 0.61. The G267D mutation is caused by a G→A transition in the first base of exon 5, altering the second nucleotide of the codon and it is predicted to abolish the normal acceptor splice site. Recently, Chabre *et al.* (12) described a *CYP11B1* deficient allele bearing a G→C transversion at the genomic position 2191, the last nucleotide of exon 5 causing the conservative mutation T318T, which was not expressed. They speculate if an aberrant splice due to the mutation could generate an unstable mRNA undetectable by RT-PCR methods. They also determined an intronic mutation, the IVS8DS+4, G→A, which caused exon 8 skipping. In the splicing prediction program both G2191C and IVS8DS+4, G→A substitutions suppress the normal 5' donor splice site of introns 5 and 8, respectively, confirming the reliability of the splice abnormality predictions. In addition to the G1753A transition, patient 2 bears two other intronic sequence variations the C1511T in intron 3 (ISV3AS-39, C→T) and the G3636C in intron 8 (ISV8AS-14, G→C). Searching for predicted splicing alterations caused by those *CYP11B1* nucleotide variations it was verified that ISV3AS-39, C→T does not alter the scores of normal splice sites. The ISV8AS-14, G→C transversion only raises the score of the normal acceptor splice site from 0.77 to 0.98 (figure 3B).

In conclusion, the present study identified two *CYP11B1* alleles bearing a frameshift mutation and nucleotide variations causing either a missense or splice alterations, which

have not been described before, and both correlated with classical form of congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase.

Acknowledgments: We are grateful to Maria Madalena V. Rosa for technical assistance. This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, SP, Brasil, (proc. nº 97/14076-4) and personal grant to JYP (FAPESP proc. nº 98/16309-9).

REFERENCES

- 1- White PC, Curnow KM, Pascoe L. 1994 Disorders of steroid 11 β -hydroxylase isoenzymes. *Endocr Rev.* 15:421–438.
- 2- Carlson AD, Obeid JS, Kanellopoulou N, Wilson RC, New MI. 1999 Congenital adrenal hyperplasia: update on prenatal diagnosis and treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 69 (1-6): 19-29.
- 3- New MI, Wilson RC. 1999 Steroid disorders in children: congenital adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96 (22): 12790-7.
- 4- White PC, Speiser PW. 2000 Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine Rev.* 21 (3): 245-91.
- 5- Mornet E, Dupont J, Vitek A, White PC. 1989 Characterization of two genes encoding human steroid 11 β -hydroxylase (P45011 β). *J Biol Chem.* 264:20961–20967.
- 6- Rosler A, Leiberman E, Sack J, et al. 1982 Clinical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. *Horm Res.* 16:133–141.
- 7- Zachmann M, Tassinari D, Prader A. 1983 Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. A study of 25 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 56:222–229.
- 8- Spoudeas HA, Slater JD, Rumsby G, Honour JW, Brook CG. 1993 Deoxycorticosterone, 11 β -hydroxylase and the adrenal cortex. *Clin Endocrinol (Oxf).* 39:245–251.
- 9- Hague W, Honour J. 1983 Malignant hypertension in congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf).* 18:505-510.

- 10- White PC, Mune T, Rogerson FM, Kayes KM, Agarwal AK. 1997 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and its role in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Pediatr Res.* 41(1): 25-9.
- 11- Krawczak M, Cooper DN. 1997 The Human Gene Mutation Database. *Trends Genet.* 13: 121-122
- 12- Chabre O, Portrat-Doyen S, Vivier J, Morel Y, Defaye G. 2000 Two novel mutations in splice donor sites of *CYP11B1* in congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. *Endocrine Res.* 26(4), 797-801.
- 13- Curnow KM, Slutsker L, Vitek J, et al. 1993 Mutations in the CYP11B1 gene causing congenital adrenal hyperplasia and hypertension cluster in exons 6, 7, and 8. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:4552–4556.
- 14- White PC, Dupont J, New MI, Leiberman E, Hochberg Z, Rösler A. 1991 A mutation in CYP11B1 (Arg 448 His) associated with steroid 11-hydroxylase deficiency in Jews of Moroccan origin. *J Clin Invest.* 87:1664–1667.
- 15- Merke D, Tajima T, Chhabra A, et al. 1998 Novel CYP11B1 mutations in congenital adrenal hyperplasia due to steroid 11 β -hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:270–273.
- 16- De Carvalho C.E., Castro M., Moreira A.C. and de Mello M.P. 1999 CYP11B1 Mutation and Polymorphisms in Congenital Adrenal Hyperplasia due to 11-Beta Hydroxylase Deficiency. *Journal of Endocrine Genetics* 1: 79-86.
- 17- Rösler A, White PC. 1993 Mutations in Human 11 β -Hydroxylase Genes: 11 β -Hydroxylase Deficiency in Jews of Morocco and Corticosterone Methyl-Oxidase II Deficiency in Jews of Iran. *J Steroid Biochem Molec Biol* 45: 99-106.

- 18- Araujo M, Sanches MR, Suzuki LA, Guerra-Jr G, Farah SB, DeMello MP. 1996 Molecular Analysis of CYP21 and C4 Genes in Brazilian Families with the Classical Form of Steroid 21- Hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res.* 29: 1-13.
- 19- Skinner CA, Rumsby G, Honour JW. 1996 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analysis for detection of Mutations in the *CYP11B1* gene. *J Clin Endocrinol Metab* 81(6): 2389-2393.
- 20- White PC, Slutsker L. 1995 Haplotype analysis of CYP11B2. *Endocr Res* 21: 437-442.
- 21- Ravichandran KG, Boddupalli SS, Hasemann CA, Peterson JA, Deisenhofer J. 1993 Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science.* 261(5122): 731-6.
- 22- Mount SM. 1982 A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.* 10(2): 459-72.
- 23- Huang CH, Reid M, Daniels G, Blumenfeld OO. 1993 Alteration of splice site selection by an exon mutation in the human glycophorin A gene. *J Biol Chem* 268: 25902-25908.
- 24- Brunak S, Engelbrecht J, Knudsen S J 1991 Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *Mol Biol.* 220(1): 49-6.

LEGENDS OF THE FIGURES

Figure 1: Direct sequencing analysis of *CYP11B1* gene showing the R404+C mutation. A)

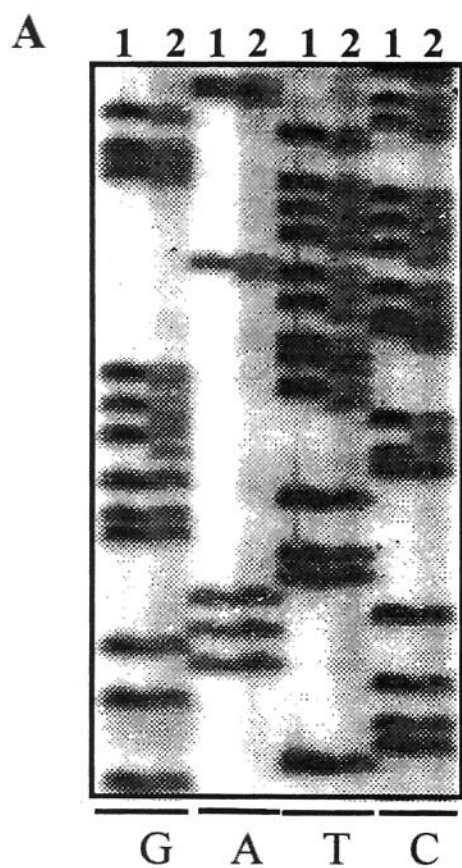
Part of the sequencing gel of the fragment containing exons 6-9 and sequenced with a sense primer annealing within intron 7. The insertion of a C between the nucleotides 3275-3276 is visualized in the homozygous affected patient (Lane 1), in the heterozygous mother (Lane 2). The gel was loaded in the nucleotide order G, A, T and C as indicated below the figure. B) Normal and mutant sequence of *CYP11B1* gene showing the insertion point, the reading frameshift, the amino acid changes and the creation of a stop codon at the amino acid 421.

Figure 2: Direct sequencing analysis of *CYP11B1* gene showing the G267S mutation. A)

Part of the sequencing gel of the fragment containing exons 3-5 and sequenced with a sense primer annealing within intron 3. The G→A nucleotide change at residue 1753 is visualized in the homozygous affected patient (Lane 3), in the heterozygous mother (number 4), lanes 1 and 2 are different patients. The gel was loaded in the nucleotide order G, A, T and C as indicated below the figure. B) Normal and mutant sequence of *CYP11B1* gene showing codon 267 divided by intron 4. Underlined adenine in the mutant sequence is the substituted nucleotide causing the amino acid change in codon 267 marked in bold. Underlined nucleotides in the normal sequence are exonic consensus for 5' donor splice site (exon 4) and 3' acceptor splice site (exon 5). Underlined nucleotides in the intron 4 sequence are intronic consensus for 5' donor splice site (left) and 3'

acceptor splice site (right). C) Alignment of part of CYP11B1 protein sequences from amino acid 241 to 300 including codon 267 (box) showing no conservation of the glycine 267 among different mammals: (1) *Homo sapiens*; (2) *Rattus norvegicus*; (3) *Sus scrofa*; (4) *Ovis aries*; (5) *Bos taurus*; (6) *Cavia porcellus*; (7) *Mesocricetus auratus*. Asterisks below amino acids denote conservation among species.

Figure 3: Splicing alteration analysis performed by Splice Site Predictions program of the nucleotide changes: (A) ¹⁷⁵³G→A responsible for the mutation G267S; (B) the intron 8 variation ISV8AS-14, G→C at the nucleotide position 3636.
http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html.



B

Normal Sequence

Codon 404

T	L	V	<u>R</u>	V	F	L	Y	S
ACA	TTG	GTG	<u>CGC</u>	GTG	TTC	CTC	TAC	TCT
L	G	R	N	P	A	L	F	P
CTG	GGT	CGC	AAC	CCC	GCC	TTG	TTC	CCG
R	P	E						
AGG	CCT	GAG						

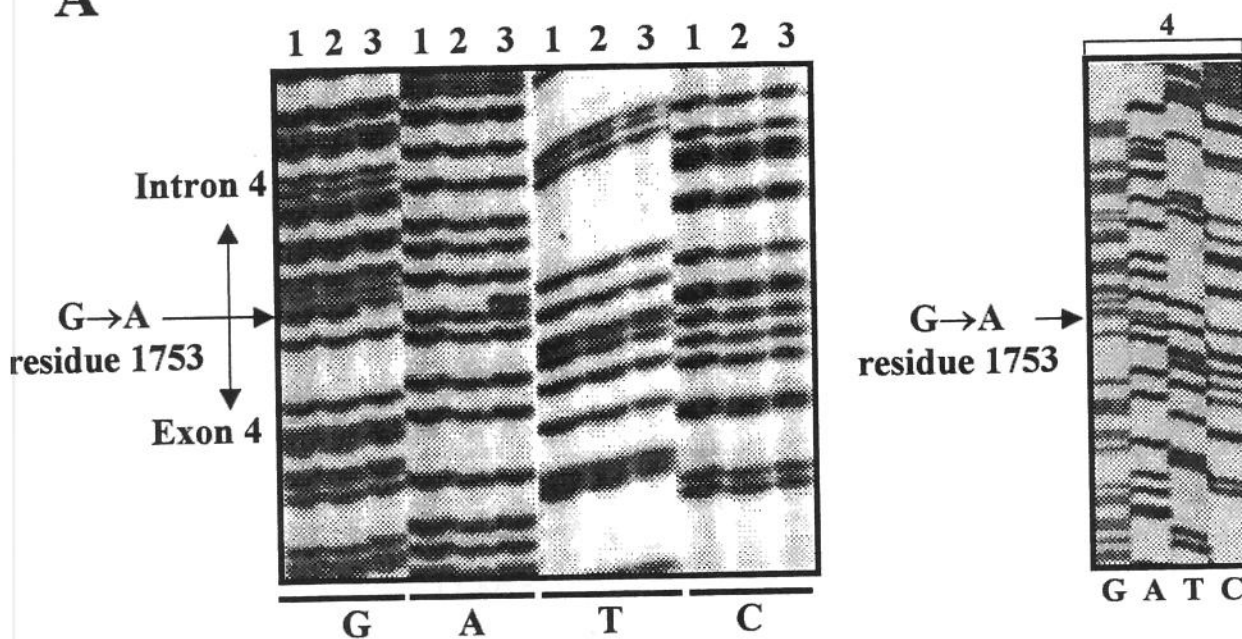
C+ Mutant Sequence
nt 3275-3276

Codon 404

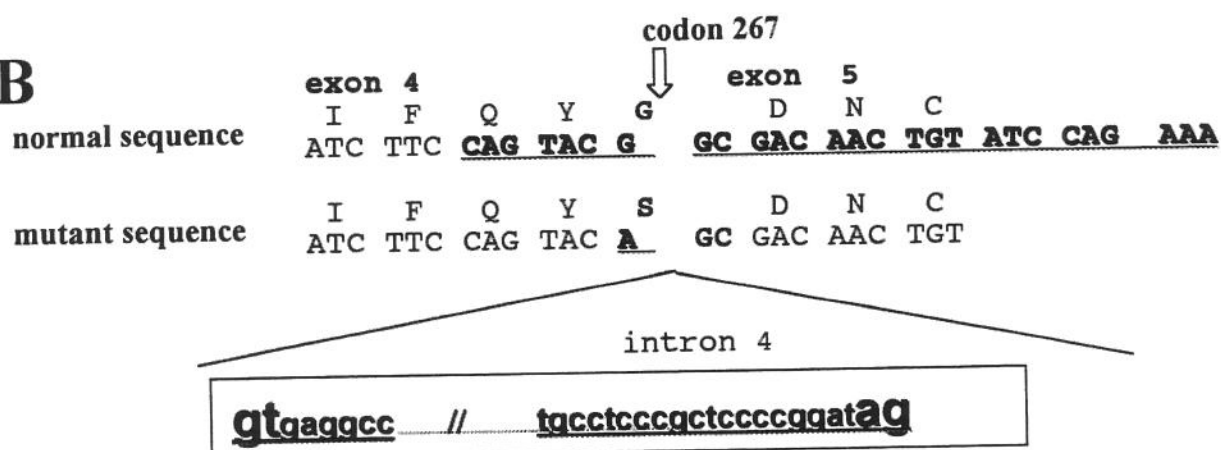
T	L	V	<u>P</u>	R	V	P	L	L
ACA	TTG	GTG	<u>CCG</u>	<u>CGT</u>	<u>GTT</u>	<u>CCT</u>	<u>CTA</u>	<u>CTC</u>
S	G	S	Q	P	R	L	V	P
TCT	GGG	TCG	CAA	CCC	CGC	CTT	GTT	CCC
E	A	&						
<u>GAG</u>	<u>GCC</u>	<u>TGA</u>						

Codon 421

A



B



C

Aminoacid 267

```

1  241 PRSLSRWTSPKVWKEHFEAWDCIFQYGDNCIQKIYQELAFSRPQQYTSIVAEALLNAELS
2  241 PKSLTRWTSTRVWKEHFDSDIISEYVTKCIKNVYRELAEGROQSW-SVISEMVAQSTLS
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
3  241 PRSLSRWTSTGTWKEHFEAWDCIFQYANKAIQRLYQELTLGHPWHYSGVVAELLTHANMT
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
4  241 PRRLSRWTSSSMWREHFEAWDYIFQYANRAIQRIYQELALGHPWHYSGIVAELLMRADMT
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
5  241 PRRLSRWMSTNMWREHFEAWDYIFQYANRAIQRIYQELALGHPWHYSGIVAELLMRADMT
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
6  242 PRSLSRWMRSQAWKEHFEAWDYISEYAENRIQKKYEELARGC-SQYNSIVANLMLQGNL
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
7  241 PSGLTRWISTRVWKENFDSWDFVSEYVTKNVKNVYQEVQSGGPQSWSVISQLVAEGALTM
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

A

**Intron 4 - 5' splice donor
consensus sequence**

start	end	Score	Exon	Intron
1747	1761	0.98	cagtacggtgaggcc	
1747	1761	0.42	cagtacagtgaggcc	

Normal Sequence

Mutant Sequence
¹⁷⁵³G→A

B

**Intron 8 - 3' splice acceptor
consensus sequence**

start	end	Score	Intron	Exon
3629	3669	0.77	gaaacccggttctgtcctaggtgctgaaacacctccaggt	
3629	3669	0.92	gaaacccggttctgtcctaggtgctgaaacacctccaggt	

**Normal 3' splice
acceptor site**



Mutated Sequence
³⁶³⁶G→C

