

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

doutorado

BC/46107

IB/ 81676

INSTITUTO DE BIOLOGIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP

Instituto de Biologia
Departamento de Genética e Evolução



**CARACTERIZAÇÃO DE HAPLÓTIPOS DO “CLUSTER” GÊNICO
CYP21/C4 EM INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA DA ENZIMA 21-
HIDROXILASE**

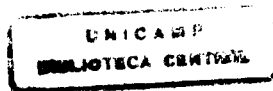
MARCELA DE ARAUJO

Orientadora: Prof. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) <i>marcela de araujo</i> e aprovada pela Comissão Julgadora. <i>15/05/2001 Maricilda Palandi de Mello</i>
--

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas
(Unicamp) para obtenção do título de
Doutor em Genética e Biologia Molecular
na área de Genética Humana e Médica.

Campinas, 2001



UNIDADE IB/81676
 N.º CHAMADA: 71 UNICAMP
Ar15c
 V. _____ Ex. _____
 TOMBO BC/ 46107
 PROC. 16-392/01
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 16-02-01
 N.º CPD _____

CM00158812-3

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Araujo, Marcela de

Ar15c

Caracterização de haplótipos do “Cluster” gênico CYP21/C4 em indivíduos com deficiência da enzima 21-hidroxilase/Marcela de Araujo. - - Campinas, S.P.[s.n.], 2001.
109f: illus.

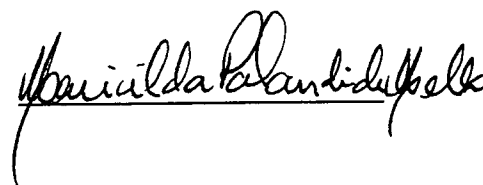
Orientadora: Maricilda Palandi de Mello
Tese(doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Polimorfismo. 2. Hiperplasia congênita da adrenal. 3. Gene.
4. Enzima 21-hidroxilase. I.Mello, Maricilda Palandi de. II.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

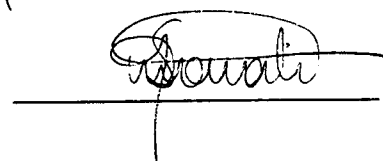
Banca Examinadora

Campinas, 15 de maio de 2001.

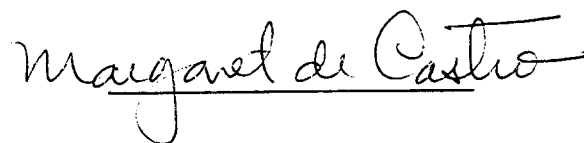
Profa. Dra Maricilda Palandi de Mello (orientadora)



Profa. Dra. Maria Fátima Sonati



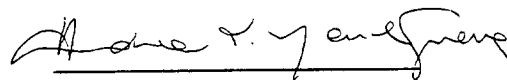
Profa. Dra. Margaret de Castro



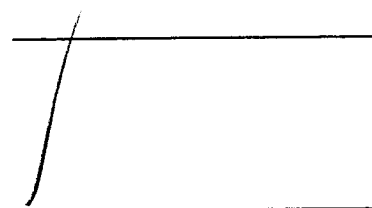
Profa. Dra. Christine Hackel



Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra



Profa. Dra. Anete Pereira Souza



Prof. Dr. Gil Guerra Júnior

Agradecimentos

À Profa. Maricilda, pela orientação, amizade e compreensão durante estes anos.

Aos componentes da banca: Dra Fátima Sonati, Dra. Christine Hackel, Dra. Margaret Castro e Dra. Andréa Maciel Guerra.

Às professoras Edi Sartorato, Laura Ottoboni e Fátima Sonati pelas sugestões e críticas na pré-banca deste trabalho.

Ao Dr. Gil e a Dra. Sofia por colaborarem com o trabalho de triagem dos pacientes.

Aos amigos do Lab. Lucy, Eliana, Juliana, Daniela, Eneida, Fernanda, Júnia, Heloísa, Camila, Fabiana, Fernanda II, Hamilton, Osmar e André pela amizade, carinho, convivência e inúmeros bons momentos compartilhados.

Aos amigos-irmãos, Sandra Eugênia, Lee e Ed Ricardo pelo carinho sempre recebido.

Aos amigos Isabel e Marcelo pela ajuda nos cálculos estatísticos.

À minha sempre e querida amiga Madá, pela sua presença em todos esses anos.

E todos aqueles que sempre me incentivaram a ir em frente mesmo estando longe.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Agradecimentos especiais

Aos meus pais, José Pereira e Azélia, por todo carinho e amor.

Ao meu companheiro Celso, obrigada pela ajuda, compreensão e amor.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO.....	1
1. Hiperplasia congênita da adrenal.....	2
2. Córtex da adrenal.....	2
2.1. A esteroidogênese na adrenal.....	3
3. Deficiência da 21-hidroxilase.....	5
3.1. Características clínicas da deficiência da 21-hidroxilase.....	6
3.2. Herança e incidência.....	9
4. Diagnóstico	9
4.1. Clínico.....	9
4.2. Laboratorial e tratamento.....	10
4.3. Diagnóstico e tratamento pré-natal.....	10
5. A enzima 21-hidroxilase.....	11
5.1. Configuração do <i>locus CYP21</i>	11
6. Rearranjos no "cluster" do gene da 21-hidroxilase.....	13
7. Microconversões (mutações pontuais).....	15
8. Correlação entre genótipo e fenótipo.....	16
9. Polimorfismos intergênicos e intragênicos.....	19
10. Efeito fundador.....	21
OBJETIVOS.....	25
MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
1. Casuística.....	28
2. Obtenção das amostras.....	28
3. Extração de DNA genômico.....	29
4. Análise da variação numérica dos genes <i>CYP21</i> e <i>C4</i>	29
4.1. "Southern blot".....	29
4.2. Sondas utilizadas.....	30
4.3. Marcação das sondas através de "random priming"	31
4.4. Purificação da sonda.....	31
4.5. Hibridização.....	32
4.6. Auto-radiografia e remoção da sonda das membranas.....	32
5. Determinação das mutações em alelos afetados.....	32

5.1. PCR alelo-específico para as mutações freqüentes.....	33
6. Caracterização dos alelos <i>CYP21</i> pelos polimorfismos intergênicos...	35
7. Caracterização dos alelos <i>CYP21</i> pelos polimorfismos intragênicos...	36
7.1. Polimorfismos de leucinas.....	36
7.1.1. Reações de amplificação seletiva.....	36
7.1.2. Gel de poli(acrilamida) para análise do polimorfismo de Leu.	38
7.2. Polimorfismo de T→C na posição 395.....	39
RESULTADOS.....	40
1. Caracterização dos alelos quanto à variação numérica e RFLP com <i>Taq I</i> de <i>C4B</i>	41
1.1. Alelos sem alteração numérica das unidades gênicas <i>CYP21/C4</i> .	41
1.2. Alelos com duplicação ou deleção da unidade de <i>CYP21P/C4B</i> ..	42
1.3. Alelos com conversão gênica.....	43
1.4. Alelos com deleção de 30 kb apresentando o gene híbrido <i>CYP21P/CYP21</i>	43
2. Análise das mutações pontuais.....	45
2.1. Ilustração dos resultados da análise.....	45
2.2. Investigação do ponto de recombinação nos alelos com deleção e conversão gênica.....	46
2.3. Frequência das microconversões.....	52
3. Análise do polimorfismo de A→C na posição 656.....	52
4. Análise do polimorfismo de leucinas.....	54
5. Polimorfismo de T→C na posição 395.....	55
6. Análise dos haplótipos.....	57
7. Comparação entre frequências de haplótipos semelhantes dos grupos normal (heterozigotos obrigatórios) e afetado	64
DISCUSSÃO.....	69
CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

ABREVIATURAS

Δ^4 - Δ^4 androstenediona
 3β -HSD - 3β -hidroxiesteróide desidrogenase
17-HOP - 17- hidroxiprogesterona
ACTH - hormônio adrenocorticotrófico
AMH - hormônio anti-mülleriano
ASOH - hibridização alelo-específica
ASO-PCR - PCR alelo-específico
BSA - soro albumina bovina
C4 - genes para o quarto componente da via clássica do complemento
cDNA - ácido desoxiribonucleico complementar
CRH - hormônio liberador de corticotrofina
CYP11A1 - 20,22-desmolase
CYP11A1 - gene 20,22-desmolase
CYP11B1 - 11β -hidroxilase
CYP17 - 17α -hidroxilase
CYP21A2 -21- hidroxilase
CYP21 - gene 21-hidroxilase
CYP21P - pseudogene 21-hidroxilase
dATP - desoxiadenosina trifosfato
dCTP - desoxicitidina trifosfato
dGTP - desoxiguanosina trifosfato
DHEA - desidroepiandrosterona
DNA - ácido desoxiribonucleico
dNTP - conjunto de quatro desoxiribonucleotídeos trifosfatos
DOCA - desoxicorticosterona
dTTP - desoxitimidina trifosfato
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
HCA - Hiperplasia Congênita da Adrenal
HLA - complexo antígeno leucocitário humano ('Human Leukocyte Antigen')
kb - quilobase
LB - meio de cultura Luria-Bertani
pb - pares de base
PS - perdedor de sal
rpm - rotações por minuto
SDS - dodecil sulfato de sódio
SNPs - polimorfismos de sequência nucleotídica ('Single Nucleotide Polymorphisms')
SSC - citrato de sódio salino
TBE - tris/ácido bórico/EDTA
TE - tris-EDTA
tris - tris-(hidroximetil)- aminometano
UV - ultra-violeta
VS - virilizante simples

RESUMO

Hiperplasia Congênita da Adrenal (HCA) pela deficiência da enzima 21-hidroxilase é uma doença hereditária comum que afeta a biossíntese de esteróides na adrenal. Aparentemente, a maioria das mutações causadoras de HCA resulta de recombinações entre o gene *CYP21*, que codifica a enzima 21-hidroxilase normal, e o seu pseudogene *CYP21P* não funcional, altamente homólogo. *CYP21* e *CYP21P* estão localizados dentro do complexo principal de histocompatibilidade da classe III no cromossomo 6p21.3, uma região que apresenta altas taxas de recombinação. Tem sido observado que em pequenas populações etnicamente homogêneas, existe um efeito fundador associado à baixa variação dos haplótipos *CYP21* afetados. Considerando a população brasileira como etnicamente mista, foram analisados os haplótipos de indivíduos afetados com HCA para determinar se um efeito fundador poderia estar associado à herança de HCA. Com este objetivo, foram analisados os eventos de duplicação e deleção na unidade *CYP21/C4*, microconversões, RFLP de *C4B* e polimorfismos intragênicos em *CYP21*. Através de "Southern", PCR-ASO e análise de restrição. Deste modo, foram identificados 58 haplótipos em um total de 113 cromossomos afetados em um total de 230 cromossomos estudados, o que reflete o alto grau de heterogeneidade da população brasileira. Verificou-se que a maioria das mutações recorrentes no gene *CYP21* tem origens independentes e que todos os polimorfismos usados para caracterizar os haplótipos estão dentro do equilíbrio esperado de Hardy-Weinberg. Entretanto as mutações I172N e Q318X/R356W, Sp2 e V281L apresentaram uma frequência significativa de seus haplótipos, o que poderia indicar um efeito do fundador na população estudada.

ABSTRACT

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to steroid 21-hydroxylase deficiency is a common inherited defect of adrenal steroid hormone biosynthesis. Usually, the majority of mutations causing CAH apparently result from recombinations between the *CYP21* gene encoding the 21-hydroxylase enzyme and the closely linked, highly homologous pseudogene *CYP21P*. *CYP21* and *CYP21P* are located within the major histocompatibility complex class III on chromosome 6p21.3, a region that undergoes high recombination rates. It has been observed that in small and ethnically homogeneous populations, a founder effect was directly associated with low variation of defective *CYP21* haplotypes. Considering the Brazilian population as ethnically mixed, we performed mutation-haplotype analyses to determine whether or not a founder effect could be implicated in CAH heritage. For this purpose, we have used Southern, PCR-ASO and restriction analyses, to evaluate duplication and deletion events on the *CYP21/C4* unit, microconversions, *C4B* RFLP, and single nucleotide polymorphisms in the *CYP21*. We have identified 58 different haplotypes in 113 affected chromosomes from a total of 230 studied, which reflect the wide heterogeneity of the Brazilian population. It was verified that the majority of the recurrent mutations on *CYP21* is of various independent origins and that all the polymorphisms used here to characterize the haplotypes fall within the expected Hardy-Weinberg equilibrium. However, it was observed high frequencies of certain haplotypes, particularly those containing the I172N and Q318X/R356W, Sp2 and V281L mutations, which strongly indicate a founder effect in the population studied.

INTRODUÇÃO

1. Hiperplasia congênita da adrenal

Hiperplasia congênita da adrenal (HCA) é definida como um erro inato do metabolismo dos esteróides adrenais causado pela deficiência de uma das cinco enzimas necessárias para a conversão do colesterol em cortisol (*DeCrechio, 1865).

2. Córtex da adrenal

As glândulas supra-renais ou adrenais são formadas pela medula (menor componente) e pelo córtex (80% da glândula). O córtex é dividido em três zonas distintas: a glomerular, mais externa, a fasciculada, mais interna e a reticular. No córtex adrenal é produzido e secretado um grupo de hormônios, denominados corticoesteróides, que são sintetizados a partir do colesterol. Os dois tipos principais de hormônios são os mineralocorticóides e os glicocorticóides. Além desses, são secretadas pequenas quantidades de hormônios sexuais, especialmente hormônios androgênicos. Esses hormônios, em certas anormalidades do córtex da adrenal podem ser secretados em grandes quantidades resultando em efeitos masculinizantes (Miller, 1991a; Calliari, 1992; New, 1998).

Os mineralocorticóides afetam especificamente os eletrólitos (sódio e potássio) dos líquidos extracelulares, enquanto que os glicocorticóides desempenham um papel importante no controle da glicemia. A aldosterona, secretada pela zona glomerulosa do córtex da adrenal, é o mineralocorticóide mais potente e tem como atividade principal a retenção de sal (Kluda *et al.*, 1978; New, 1998). O cortisol secretado na zona fasciculada é o principal glicocorticóide humano e quantitativamente o mais produzido (New *et al.*, 1989a; Calliari, 1992; White, 1994). Logo abaixo da zona fascicular, localiza-se a zona reticular onde são secretados os andrógenos (Calliari, 1992). Os andrógenos da adrenal, principalmente a androstenediona e a testosterona, são responsáveis pelo desenvolvimento sexual normal e dos caracteres sexuais secundários, como pêlos púbicos nos homens e axilares nas mulheres (New e Crawford, 1994; Miller e Morel, 1989).

*DeCRECCHIO, L., Sopra un caso di apparenze virili in una donna. *Morgagni*, 7: 151 (1865), apud HELMBERG, A., 1993.

A síntese do cortisol na zona fasciculada está sob o controle do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) produzido pela adeno-hipófise. Sua secreção é controlada e induzida pelo sistema nervoso central, através da ação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), produzido pelo hipotálamo. Os níveis circulantes de cortisol plasmático, por sua vez, são responsáveis pelo controle do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, regulando a produção do ACTH e CRH num processo chamado de retrocontrole ou "feedback" negativo (**figura 1A**) (Gutai *et al.*, 1977; White *et al.*, 1987a; New e Speiser, 1989; ; Calliari, 1992; New, 1995). Desta forma, altos níveis de cortisol no soro inibem a liberação de CRH e ACTH, enquanto baixos níveis têm atuação contrária (Guyton, 1986; Calliari, 1992). Nos tipos de HCA, onde uma deficiência enzimática causa redução na síntese de cortisol, observa-se a secreção excessiva de ACTH e hiperplasia do córtex supra-renal (**figura 1B**) (New e Speiser, 1989; Migeon e Donohoue, 1991; White e New, 1992).

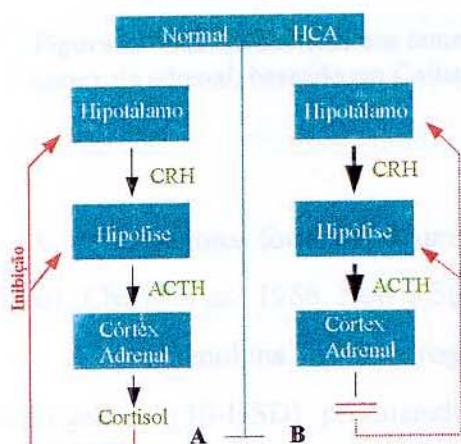


Figura 1: Regulação da produção de cortisol através do sistema de "feedback" negativo sobre o eixo hipotálamo-hipofisário. **A)** Sob condições normais, o cortisol produzido no córtex da adrenal inibe a liberação dos hormônios CRH e ACTH. **B)** Em indivíduos afetados por HCA, não ocorre a inibição do eixo hipotálamo-hipofisário, superestimando o córtex da adrenal. Extraído de New *et al.* (1989b).

2.1. A esteroidogênese na adrenal

O passo limitante para a esteroidogênese é o transporte do colesterol de reservas citoplasmáticas para a mitocôndria, onde o colesterol é clivado em pregnenolona pela enzima colesterol 20,22-desmolase, conhecida como CYP11A1 (**figura 2**). Esse transporte é mediado por uma proteína denominada StAR ("steroidogenesis acute regulatory protein"), cuja síntese é aumentada rapidamente pelo estímulo do ACTH. O mecanismo pelo qual a StAR faz o transporte do colesterol através da membrana

mitocondrial ainda não é conhecido (White *et al.*, 1987b; Miller e Morel, 1989; Migeon e Donohoue, 1991; White, 1994; Stocco e Clark, 1996, Stocco, 2000).

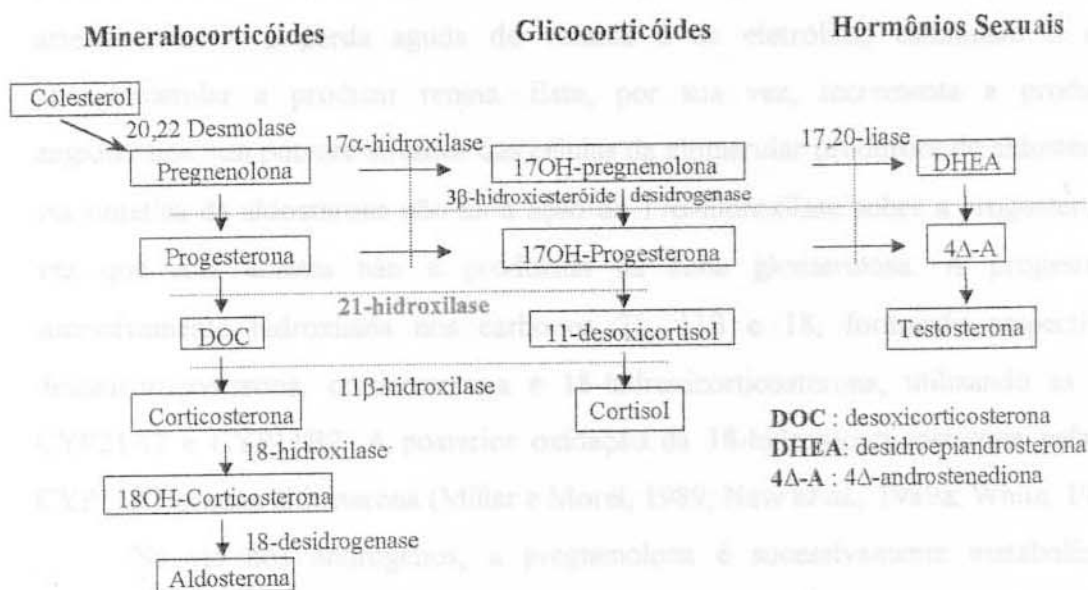


Figura 2: Vias metabólicas dos mineralocorticóides e hormônios sexuais produzidos no córtex da adrenal, baseado em Calliari (1992).

A pregnenolona formada é um precursor comum dos esteróides produzidos na adrenal (Chung *et al.*, 1986; New e Speiser, 1989).

A pregnenolona é desidrogenada na posição 3 β pela 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD) produzindo progesterona. Tanto a pregnenolona quanto a progesterona são hidroxiladas na posição C-17 α por uma enzima microssomal específica, a 17 α -hidroxilase (CYP17), formando 17-hidroxipregnenolona e 17-hidroxiprogesterona (17-OHP), respectivamente. A 17-hidroxipregnenolona, por ação da 3 β -HSD é transformada em 17-OHP. No passo seguinte, a 17-OHP é hidroxilada na posição 21 por outra enzima microssomal da família do citocromo P450, a 21-hidroxilase (CYP21A2), produzindo 11-desoxicortisol. Este composto é transportado de volta para a membrana interna da mitocôndria, onde sofre hidroxilação por uma quarta enzima da família do citocromo P450, a 11 β -hidroxilase (CYP11B1), finalmente dando origem ao cortisol (New e Speiser, 1989; Migeon e Donohoue, 1991; Huma *et al.*, 1995) (**figura 2**).

O hormônio mineralocorticoide aldosterona é sintetizado na zona glomerulosa do córtex adrenal sob o controle do sistema renina-angiotensina, e de uma forma mais direta, pelas altas concentrações de potássio. A depleção corpórea de sódio, a queda da pressão arterial renal e a perda aguda de volume e de eletrólitos estimulam o aparelho justaglomerular a produzir renina. Este, por sua vez, incrementa a produção de angiotensina, um potente ativador das células da glomerular produtora de aldosterona. Na via sintética da aldosterona não há a ação da 17 α -hidroxilase sobre a progesterona uma vez que esta enzima não é produzida na zona glomerulosa. A progesterona é sucessivamente hidroxilada nos carbonos 21, 11 β e 18, formando respectivamente desoxicorticosterona, corticosterona e 18-hidroxycorticosterona, utilizando as enzimas CYP21A2 e CYP11B2. A posterior oxidação da 18-hidroxycorticosterona pela enzima CYP11B2 origina aldosterona (Miller e Morel, 1989; New *et al.*, 1989a; White, 1994).

Na via dos andrógenos, a pregnenolona é sucessivamente metabolizada em 17-hidroxipregnenolona e desidroepiandrosterona (DHEA) pela 17 α -hidroxilase/17,20-liase. O andrógeno DHEA dá origem à delta-4-androstenediona (Δ^4), pela ação da enzima 3 β -HSD, que é reduzida a testosterona pela enzima 17-cetoesteróide redutase (Zuber *et al.*, 1986; New e Speiser, 1989; Huma *et al.*, 1995) (**figura 2**).

3. Deficiência da 21-hidroxilase

A deficiência da 21-hidroxilase é a forma mais comum de HCA, sendo responsável por aproximadamente 90% dos casos (White *et al.*, 1987b; Miller e Levine, 1987; New *et al.*, 1989b). A deficiência das enzimas CYP11B1, CYP17 e 3 β -HSD também são relatadas como causadoras de HCA, porém em uma frequência menor que 10% (Calliari, 1992; White, 1994).

Na deficiência da 21-hidroxilase, 17-OHP não é convertida em 11-desoxicortisol, tornando ineficiente a síntese do cortisol. Em consequência, há perda do “feedback” negativo, resultando em elevados níveis de ACTH, levando à super produção e acúmulo dos compostos que antecedem o bloqueio: progesterona na via dos mineralocorticóides e 17-OHP na via dos glicocorticóides. Como consequência, ocorre um desvio da síntese

para o sentido de uma maior secreção dos andrógenos DHEA e $\Delta 4$ (este considerado um andrógeno de atividade moderada), sendo este último convertido em testosterona em níveis muito acima do normal (White *et al.*, 1987a, Miller e Morel, 1989; Migeon e Donohoue, 1991; Calliari, 1992).

A característica clínica marcante da deficiência da 21-hidroxilase é a virilização. No momento em que o córtex adrenal dá início à sua função, por volta do 3º mês de gestação, o feto fica exposto a níveis androgênicos aumentados, coincidindo com a fase crítica do desenvolvimento sexual, de forma que fetos XX originarão indivíduos femininos com ambigüidade genital ao nascimento (White *et al.*, 1987a; Calliari, 1992; New, 1993; New e Wilson, 1999).

3.1. Características clínicas da deficiência da 21-hidroxilase.

A HCA por deficiência da 21-hidroxilase ocorre num amplo espectro de variantes clínicas que podem ser agrupadas em duas categorias: forma clássica que, apresenta duas divisões fenotípicas, a perdedora de sal (PS) e a virilizante simples (VS), e a forma tardia, conhecida como não clássica (NC), que freqüentemente se manifesta durante a puberdade. No geral, o quadro clínico da doença depende da intensidade e do grau do bloqueio enzimático (Speiser e New, 1985; Miller e Morel, 1989; Helmberg, 1993; New, 1995).

A forma clássica da deficiência da 21-hidroxilase envolve bloqueio completo ou quase completo da atividade enzimática e está clinicamente presente ao nascimento (Strachan, 1990; Miller, 1991a; Helmberg, 1993). Assim, o neonato do sexo feminino apresenta ambigüidade genital em diversos graus, variando de uma leve clitoromegalia até a completa fusão dos grandes lábios formando um escroto, sem que este no entanto apresente gônada (Richards *et al.*, 1978; Rumsby *et al.*, 1986; Miller, 1991a; Calliari, 1992).

O sexo genético e a diferenciação gonadal são sempre normais em pacientes com HCA. A diferenciação dos órgãos internos masculinos está sob o controle de mais dois hormônios produzidos em quantidades suficientes apenas pelos testículos: a testosterona, que direciona a formação das estruturas genitais masculinas a partir dos ductos de Wolff, e

o hormônio anti-mülleriano (AMH), que suprime o desenvolvimento dos ductos Müllerianos nas estruturas internas masculinas. O AMH está sempre ausente no sexo feminino, mesmo nos casos de virilização externa graves, não havendo desenvolvimento de estruturas internas masculinas. Assim, a genitália interna feminina, a saber, ovários, útero e porção superior da vagina, são sempre normais, não sendo afetado por andrógenos (Grumbach *et al.*, 1985; Huma *et al.*, 1995). Em casos extremos, a masculinização da genitália externa pode fazer com que tais recém-nascidos do sexo feminino sejam considerados como meninos criptorquídicos e criados como tal, o que é altamente inadequado para sua formação psico-social (Costa *et al.*, 1997; Kuhnle *et al.*, 1997; Berenbaum, 1999). No genótipo 46,XY pode haver macrogenitossomia neonatal, porém o mais comum é a criança desenvolver sinais de hiperandrogenismo após os primeiros 6 a 12 meses de vida (Miller, 1991a; New, 1995).

Cerca de 1/4 dos casos clássicos de deficiência da 21-hidroxilase é do tipo virilizante simples (VS), os quais podem sintetizar quantidades suficientes de aldosterona (Strachan, 1989; Strachan, 1990). São reconhecidos como portadores da forma clássica VS os indivíduos do sexo feminino com genitália externa ambígua virilizada, resultante do excesso de andrógenos e aumento na concentração de 17-OHP, mas sem deficiência de mineralocorticóide. Em indivíduos do sexo masculino portadores da forma VS, os principais sintomas capazes de identificar a HCA por deficiência da 21-hidroxilase são os sinais de virilização precoce devido ao excesso de andrógenos, como aparecimento de pelos púbicos, faciais e axilares e desenvolvimento precoce da genitália, com dosagem laboratorial de 17-OHP aumentada (Miller e Morel, 1989; Helmberg, 1993; Huma *et al.*, 1995; New e Wilson, 1999).

O distúrbio clássico da deficiência da 21-hidroxilase PS ocorre em cerca de 3/4 dos casos, sendo a forma mais grave da doença. Os sinais de hiperandrogenismo são os mesmos apresentados pelos portadores de HCA VS. A característica que os distingue é a capacidade de sintetizar ou não quantidade suficiente do mineralocorticóide aldosterona (Fife e Rappaport, 1983; New, 1995). A incapacidade de sintetizar aldosterona leva a crises de perda de sal associadas com graves hiponatremia, hipercalemia e hipovolemia com acidose metabólica, perda do tônus vascular e choque hipovolêmico, que em muitos

casos é fatal (White *et al.*, 1987a; Miller, 1991a; Calliari, 1992; New, 1995). Pacientes não tratados podem ir a óbito nas primeiras semanas de vida pela incapacidade de reter o sódio (New e Levine, 1984). Os sintomas de perda de sal podem ocorrer a qualquer instante após os primeiros dias de vida, enquanto que a virilização pode se tornar evidente após 18 meses de idade. Casos clássicos VS ou PS não tratados originam crianças altas, com rápido desenvolvimento somático e avanço da idade óssea induzida pelos andrógenos, mas que se tornam adultos mais baixos do que o esperado, devido à calcificação prematura das epífises (Migeon e Donohoue, 1991; New, 1995;).

Indivíduos do sexo masculino e feminino quando não tratados podem ainda apresentar aparecimento prematuro de pêlos pubianos, acne, odor de adulto e um crescimento contínuo excessivo do pênis ou do clitóris. Pode-se observar também nos indivíduos do sexo feminino, ovários policísticos (White *et al.*, 1987a). A função do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal fica afetada em ambos os sexos. No sexo feminino, altos níveis de progesterona no sangue podem interferir com a capacidade do estradiol de estimular picos do hormônio luteinizante, resultando na ausência ou irregularidade de menstruações (Richards *et al.*, 1978).

Pacientes com a deficiência da 21-hidroxilase não-clássica não apresentam anormalidades ao nascimento, mas essas podem surgir com a idade manifestando-se no final da infância ou na adolescência; esta forma da doença muitas vezes é citada como “adquirida”, “tardia” ou “atenuada” (Laron *et al.*, 1980; Kohn *et al.*, 1982). Essas manifestações podem variar em gravidade; deste modo pode ser difícil distinguir clinicamente indivíduos masculinos com a forma VS, de indivíduos masculinos com a forma não clássica da deficiência. Por outro lado, alguns indivíduos, embora apresentem anormalidades bioquímicas semelhantes às da forma não clássica, permanecem assintomáticos (forma “oculta” ou “críptica”) (Levine *et al.*, 1981; Pang *et al.*, 1988). Indivíduos do sexo feminino não apresentam genitália ambígua ao nascimento, embora nos dois sexos feminino e masculino, possam apresentar sinais de excesso de andrógenos em alguma fase do desenvolvimento, tais como: aparecimento de pilificação pubiana precoce, pêlos axilares, hirsutismo, acne, irregularidade menstrual e infertilidade. Concomitantemente, pode haver aceleração no ritmo de crescimento e avanço da idade

óssea (Speiser e New, 1985; White *et al.*, 1985; New *et al.*, 1989a; Feldman, 1992; Calliari, 1992).

3.2. Herança e incidência

A forma clássica de HCA pela deficiência da 21-hidroxilase é uma doença genética transmitida de forma autossômica recessiva (Migeon e Donohoue, 1991). A incidência da deficiência da 21-hidroxilase varia consideravelmente dependendo do grupo populacional estudado (Miller e Morel, 1989). A análise dos neonatos na população mundial demonstrou que a forma clássica da HCA tem uma prevalência que varia de 1:10.000 a 1:14.000 nascimentos (Pang *et al.*, 1988). Entretanto, este cálculo exclui dois grupos, os Esquimós Yupik, com uma frequência de 1:280 (Speiser *et al.*, 1992a) e uma população de Réunion, com incidência de 1:2.000. Sugere-se que isto se deva provavelmente à maior frequência de casamentos consanguíneos nesses grupos étnicos (White *et al.*, 1987a; Pang *et al.*, 1988; White *et al.*, 1989; New *et al.*, 1989a; Helmberg, 1993). Em caucasianos, a frequência calculada para o gene mutante através da equação de Hardy-Weinberg foi de 1 para 60 em portadores heterozigotos (Pang, 1988; Miller e Morel, 1989). A forma não clássica tem sido observada em alta frequência em populações brancas (1:100) e é maior em etnias específicas como 1:27 em judeus Ashkenazi, 1:40 em hispânicos, 1:50 em iugoslavos e 1:333 em italianos (Sherman *et al.*, 1988; Dunic *et al.*, 1990).

4. Diagnóstico

4.1. Clínico

A HCA devido a deficiência da 21-hidroxilase deve ser sempre lembrada nos casos de ambigüidade genital em crianças com virilização precoce e nos quadros de perda salina com desidratação. A consanguinidade e a presença de outros casos na família são dados que sugerem o diagnóstico (Calliari, 1992).

4.2. Laboratorial e tratamento

O diagnóstico laboratorial é feito principalmente através de dosagem hormonal. Na HCA clássica, progesterona, 17-OHP, androstenediona e testosterona são secretados em excesso. O diagnóstico pode ser feito pela medida dos metabólitos esteróides que são excretados na urina, os quais são encontrados em alta concentração (Dupont *et al.*, 1980; White *et al.*, 1987b). Entretanto, o diagnóstico hormonal para todos os tipos de deficiência da 21-hidroxilase é melhor obtido pelo teste de estímulo com ACTH. Além dos exames laboratoriais, é importante também a determinação do cariótipo do recém-nascido para confirmação do sexo e ultra-sonografia pélvica para visualização dos órgãos genitais internos (Miller, 1991a; Migeon e Donohoue, 1991).

O tratamento do paciente é feito por substituição hormonal contínua a fim de suprir a falta de glicocorticóides e impedir a produção excessiva de andrógenos. A forma PS requer tratamento com mineralocorticóide, sendo utilizado normalmente 9 α -fluoridroxycortisona (New *et al.*, 1989b). É possível também realizar tratamento pré-natal através da administração de um análogo do cortisol, a dexametasona (Owerbach *et al.*, 1992).

4.3. Diagnóstico e tratamento pré-natais

O diagnóstico e tratamento pré-natais têm sido utilizados em casos de HCA com a deficiência da 21-hidroxilase, com o objetivo principal de evitar a virilização da genitália externa feminina ainda no útero; nos casos de fetos masculinos, o diagnóstico precoce possibilita o início do tratamento ao nascimento, evitando a pseudopuberdade precoce (White *et al.*, 1989; Miller, 1998). No entanto, ainda há controvérsias quanto à administração de drogas no tratamento da HCA ainda na fase uterina, por poder causar problemas na infância e adolescência pela exposição excessiva de glicocorticóides durante a gestação (Ritzén, 1998).

5. A enzima 21-hidroxilase

Das cinco enzimas participantes da síntese do cortisol, quatro pertencem à família do citocromo P-450: CYP11A1 (20,22-Desmolase), CYP17, CYP21A2 e CYP11B1 (Miller, 1991b). Os Citocromos P-450 fazem parte de uma superfamília de monooxigenases (oxidases e peroxidases) contendo um grupo heme, e metabolizam uma ampla variedade de compostos lipofílicos. Na adrenal, apresentam função específica na esteroidogênese (Gonzalez e Nebert, 1990). As enzimas P450 apresentam características em comum incluindo alto grau de conservação de resíduos hidrofóbicos e de ligação do grupo heme (New *et al.*, 1989a; Huma *et al.*, 1995).

A enzima 21-hidroxilase é um citocromo P450 microsomal (CYP21A2) que apresenta atividade de 21-hidroxilase sobre 17-OHP e progesterona, quando em presença de NADPH. O citocromo CYP21A2 é um polipeptídeo com peso molecular de aproximadamente 52.000 Da. Esta proteína é bastante conservada em mamíferos e na espécie humana pode conter 494 ou 495 aminoácidos, devido a um polimorfismo de repetições CTG (leucina) no éxon 1, sem que haja entretanto uma diminuição significativa da atividade enzimática (White *et al.*, 1986; Higashi *et al.*, 1986; Rodrigues *et al.*, 1987).

O isolamento e purificação da proteína CYP21A2 bovina possibilitaram avanços no estudo molecular com subsequente localização e caracterização do gene bovino (White *et al.*, 1984b) e em seguida do gene humano (White *et al.*, 1984b; White *et al.*, 1985).

5.1. Configuração do locus CYP21

Foi demonstrado que o locus da HCA em humanos se localiza dentro da classe III do complexo de histocompatibilidade (HLA), entre os loci HLA-B (classe I) e HLA-DR (classe II), no braço curto do cromossomo 6, como mostra a **figura 3A** (Carrol *et al.* 1985a; White *et al.* 1985), e que existem duas cópias do gene da 21-hidroxilase, *CYP21P* e *CYP21* (**figura 3B**). *CYP21P* localiza-se entre os genes *C4A* e *C4B*, enquanto *CYP21* flanqueia *C4B* na posição 3' (**figura 3B**) (White *et al.*, 1985; Carrol *et al.*, 1985a; Dunham *et al.*, 1989).

Ambos *CYP21* e *CYP21P* apresentam aproximadamente 3,0 kb, sendo compostos por 10 éxons (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986). Embora os genes *CYP21* e *CYP21P*

possuam 98% de homologia em seus éxons e 96% entre seus íntrons, apenas *CYP21* é ativo. *CYP21P* é considerado um pseudogene, pois não produz a proteína funcional, como consequência de várias mutações deletérias adquiridas (**figura 3B**).

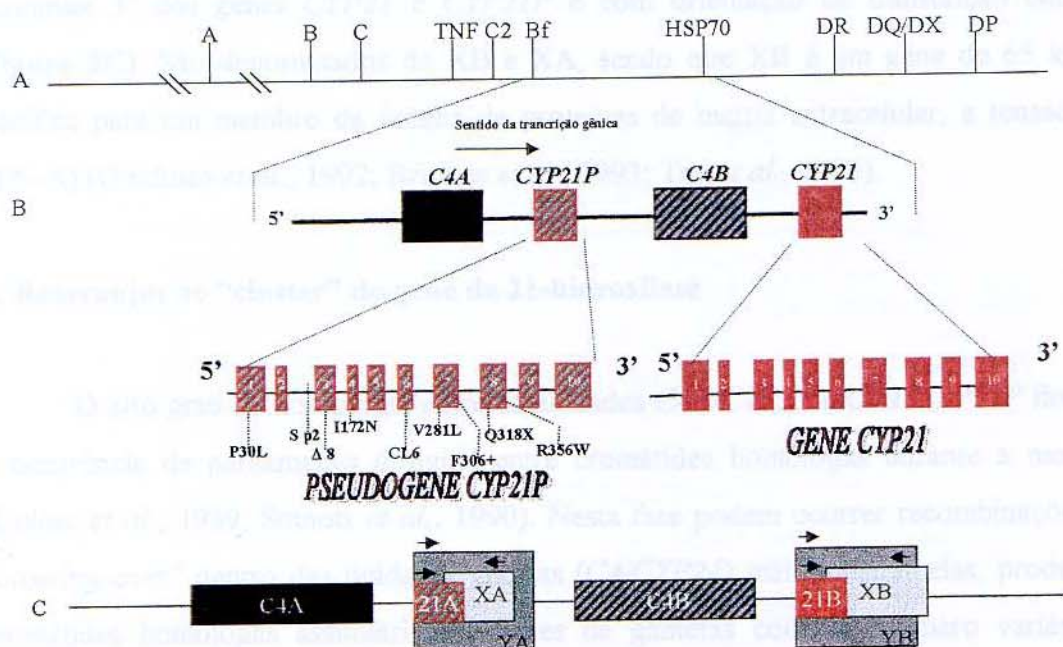


Figura 3: Mapa do braço curto do cromossomo 6 representando o sistema HLA e o complexo gênico da enzima 21-hidroxilase. A) Genes principais do sistema HLA classes I, II, III. B) Organização dos genes *C4* e *CYP21* e as mutações mais frequentes encontradas no pseudogene *CYP21P*. Baseado em Araujo, 1996. C) Representação dos genes *X* e *Y*, mapeados no complexo gênico da 21-hidroxilase. As setas indicam o sentido de transcrição dos genes. Baseado em Tee *et al.* (1995).

Na verdade, nenhum transcrito do gene *CYP21P* foi detectado quando se hibridizou mRNA da adrenal com sonda específica do pseudogene (Higashi *et al.*, 1986).

As primeiras mutações descritas no pseudogene incluem uma deleção de oito pares de bases no 3º éxon e a inserção de um par de base no 7º éxon que causam um "frameshift" e ainda uma transição C-T no éxon 8; as três geram um códon de terminação prematuro da proteína (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986; Rodrigues *et al.*, 1987; Higashi *et al.*, 1991; Wedell *et al.*, 1992; Wedell e Luthman, 1993). A organização dos genes *C4* e *CYP21* formam duas unidades de 30 kb, *C4A/CYP21P* e *C4B/CYP21* sugerindo uma duplicação em tandem (White *et al.*, 1985), mas unidades individuais podem ter até 33 kb (unidades longas) ou 26,5 kb (unidades curtas), em consequência de

um polimorfismo no gene *C4B* (Paldosttir *et al.*, 1987).

Além dos genes citados acima, foi demonstrada a existência de dois genes adicionais neste complexo, que se situam na fita oposta do DNA, sobrepondo-se aos terminais 3' dos genes *CYP21* e *CYP21P* e com orientação de transcrição contrária (**figura 3C**). São denominados de XB e XA, sendo que XB é um gene de 65 kb que codifica para um membro da família de proteínas de matriz extracelular, a tenascina-X (TN-X) (Gitelman *et al.*, 1992; Bristow *et al.*, 1993; Tee *et al.*, 1995).

6. Rearranjos no “cluster” do gene da 21-hidroxilase

O alto grau de homologia entre as unidades *C4B/CYP21* e *C4A/CYP21P* favorece a ocorrência de pareamento desigual entre cromátides homólogas durante a meiose I (Collier *et al.*, 1989; Sinnott *et al.*, 1990). Nesta fase podem ocorrer recombinações por “crossing-over” dentro das unidades gênicas (*C4/CYP21*) mal emparelhadas, produzindo cromátides homólogas assimétricas e pares de gametas com um número variável de unidades completas (Collier *et al.*, 1989; Strachan, 1989; Miller e Morel, 1989; White e New, 1992). O emparelhamento desigual dos cromossomos pode gerar vários rearranjos tanto dentro do gene da 21-hidroxilase como dentro do gene *C4*, como os propostos por Helmberg *et al.* (1993) e reunidos na **figura 4** (White *et al.*, 1988; Collier *et al.*, 1989; Helmberg *et al.*, 1992 e Helmberg *et al.*, 1993). O “crossing-over” desigual nos pontos a e b produz alelos com uma deleção de DNA, formando genes híbridos *CYP21P/CYP21* cujas apresentações fenotípicas variam dependendo do ponto de rearranjo (Higashi *et al.*, 1988a; Urabe *et al.*, 1990; Helmberg *et al.*, 1992; Bormann *et al.*, 1992; L'Allemand *et al.*, 2000). Os zigotos formados em contrapartida (não mostrados na **figura 4**) apresentam duplicação da unidade gênica *CYP21/C4B*, sendo uma das cópias um gene híbrido *CYP21/CYP21P*. Apesar dos alelos duplicados não estarem relacionados diretamente com a deficiência da 21-hidroxilase, eles podem predispor o portador a gerar novos alelos mutantes de *CYP21* (Sinnott *et al.*, 1990). O cruzamento em outros pontos, como os pontos e, d e c mostrados na **figura 4**, podem gerar zigotos portadores de outras duplicações e deleções.

Um outro evento mutacional que forma um gene híbrido é o que se convencionou denominar de conversão gênica em larga escala (Strachan, 1989; Strachan, 1990; Strachan, 1991; Speiser *et al.*, 1992b). O gene híbrido neste caso pode surgir pela ocorrência de dois eventos de "crossing-over" desiguais entre as fitas emparelhadas incorretamente (**figura 4**, 2ª recombinação).

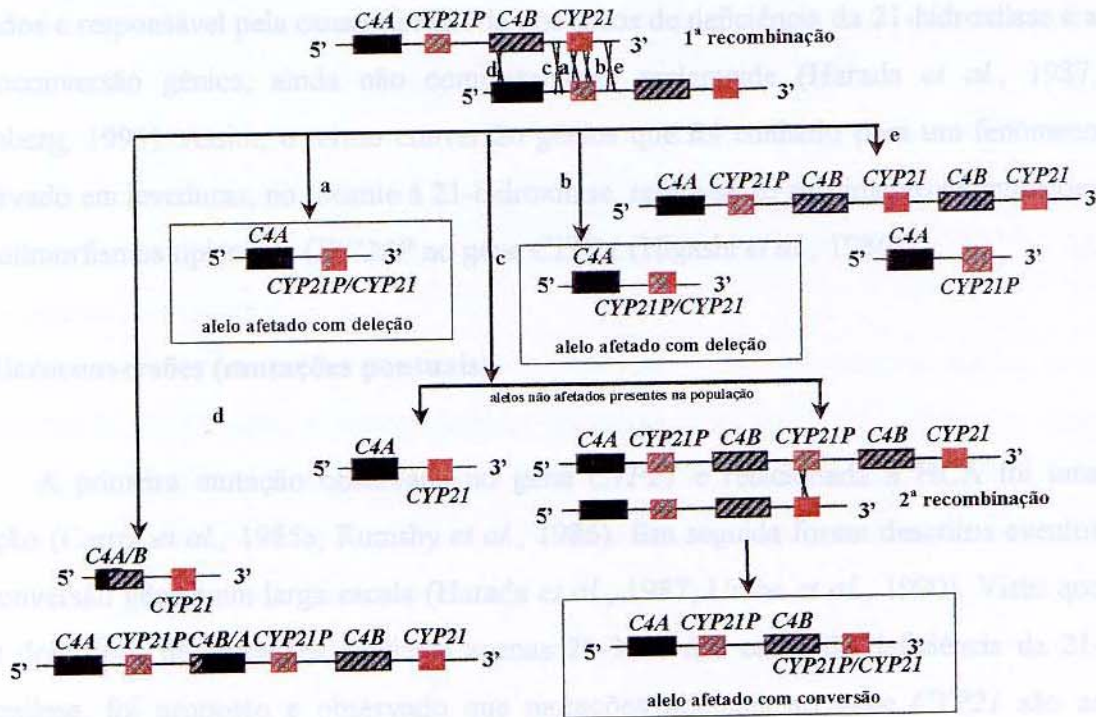


Figura 4: Rearranjos possíveis no cluster gênico da 21-hidroxilase.

No entanto há uma segunda hipótese para explicar tais conversões onde enzimas responsáveis pelo reparo pós-duplicação reconheceriam o pareamento errado e converteriam *CYP21* em pseudogene desde pequenas porções (microconversões) até a totalidade do gene (conversão em larga escala) e vice-versa. No processo de conversão, uma das fitas serve de molde para o reparo da outra, sem sofrer, no entanto, nenhuma alteração (Werkmeister *et al.*, 1986; Higashi *et al.*, 1988a; Urabe *et al.*, 1990; Strachan, 1990; Strachan, 1994).

Estudos populacionais demonstram que o evento de deleção formando o gene híbrido *CYP21P/CYP21* está presente em apenas 30% dos alelos de indivíduos afetados,

entre europeus, norte americanos e japoneses (Carrol *et al.*, 1985b; Harada *et al.*, 1987). No caso de mexicanos e sul-americanos essa porcentagem é ainda mais baixa (10%) (Tusié-Luna *et al.*, 1996; Araujo *et al.*, 1996; Dardis *et al.*, 1997; Paulino *et al.*, 1999; Bachega *et al.*, 1999).

O mecanismo molecular mais freqüentemente envolvido na produção de alelos afetados e responsável pela causa da maioria dos casos de deficiência da 21-hidroxilase é a microconversão gênica, ainda não completamente esclarecida (Harada *et al.*, 1987; Helmberg, 1993). Assim, o termo conversão gênica que foi cunhado para um fenômeno observado em leveduras, no tocante à 21-hidroxilase, refere-se ao surgimento de mutações ou polimorfismos típicos de *CYP21P* no gene *CYP21* (Higashi *et al.*, 1986).

7. Microconversões (mutações pontuais)

A primeira mutação observada no gene *CYP21* e relacionada à HCA foi uma deleção (Carrol *et al.*, 1985a; Rumsby *et al.*, 1986). Em seguida foram descritos eventos de conversão gênica em larga escala (Harada *et al.*, 1987; Urabe *et al.*, 1990). Visto que estes dois tipos de mutações explicam apenas 20-30% dos casos de deficiência da 21-hidroxilase, foi proposto e observado que mutações pontuais no gene *CYP21* são as causas mais freqüentes de HCA (Higashi *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992a; Wilson *et al.*, 1995a; Ezquieta *et al.*, 1995). As mutações mais freqüentes incluindo pequenas deleções, inserções e trocas pontuais de nucleotídeos, encontradas nos casos de deficiência da 21-hidroxilase das formas clássicas e tardias, estão normalmente presentes no pseudogene e são consideradas microconversões (Globerman *et al.*, 1988; Higashi *et al.*, 1988a; Mornet *et al.*, 1991).

A microconversão, ou conversão gênica em pequena escala, é responsável por 65 a 90% dos alelos afetados (Mornet *et al.*, 1991; Owerbach *et al.*, 1992; Paulino *et al.*, 1999; Kapelari *et al.*, 1999). Quando transferidas por conversão gênica para o *CYP21*, nove das mutações encontradas no gene *CYP21P* causam danos em diversos graus à função enzimática normal. Outras diferenças em nucleotídeos podem ser encontradas entre os genes *CYP21P* e *CYP21*. Essas variações podem constituir polimorfismos neutros ou

mutações mais raras por não serem transferidas com tanta frequência para o gene *CYP21* (Helmberg, 1993).

Mutações do tipo “frameshift” (inserções ou deleções de nucleotídeos capazes de alterar o quadro de leitura) e mutações “nonsense” (substituições de nucleotídeos que criam códon e terminação - ‘stop códon’) são capazes de alterar drasticamente a estrutura e função da proteína e abolir completamente a atividade enzimática. Essas mutações estão associadas com a forma clínica mais grave, PS (Tusie-Luna *et al.*, 1990).

Mutações do tipo “missense” causam a substituição de um aminoácido por outro e podem dar origem à diversas formas fenotípicas da deficiência da 21-hidroxilase (Tusie-Luna *et al.*, 1990). As mutações mais comuns associadas a forma PS, VS e não clássica estão descritas na **tabela 1**.

Em geral, estudando-se as deleções, conversões e microconversões, consegue-se determinar 85% dos alelos afetados, ficando em média 15% atribuído a mutações raras determinadas somente por seqüenciamento do *locus CYP21* (Lajic e Wedell, 1996). No Brasil, o estudo da deficiência da 21-hidroxilase revelou, de forma semelhante, que 13% dos alelos afetados não apresentam as mutações mais comuns no *locus CYP21* (Paulino *et al.*, 1999). É provável que essas mutações raras não sejam geradas por microconversão, uma vez que muitas delas estão ausentes nos alelos *CYP21P* (Wedell *et al.*, 1992).

8. Correlação entre genótipo e fenótipo

Em particular, as mutações podem ser correlacionadas com as diferentes formas clínicas da deficiência da 21-hidroxilase, PS, VS e não clássica (**figura 5**). Consideradas independentemente, diversas mutações associam-se a diferentes graus de atividade enzimática e conseqüentemente à gravidade do fenótipo do indivíduo portador da deficiência. Levando-se em conta a heterozigose com duas mutações diferentes, o fenótipo deve ser deduzido por aquela que determinar menor dano à atividade enzimática. Assim, a forma clínica PS seria determinada pela combinação de duas mutações graves, a VS por uma grave e uma intermediária ou por duas intermediárias e a não clássica por duas mutações brandas ou uma branda combinada com uma grave ou uma intermediária. Há,

entretanto, vários portadores da deficiência que não se enquadram neste padrão (Miller, 1991b; Mornet *et al.*, 1991).

Speiser *et al.* (1992a) classificaram 90 pacientes dentro de 3 grupos, com base no grau de comprometimento enzimático. Mutações do grupo A (sem atividade enzimática) consistiu-se principalmente de pessoas com a forma PS, grupo B de portadores VS (2% de atividade) e grupo C da forma não clássica (10-20% de atividade).

Tabela 1. Mutações mais comuns no gene *CYP21*, provenientes do pseudogene *CYP21P*.

Tipo ^a	Mutação/nt ^b	E/I ^c	Efeito	Atividade 21-OH (%) ^d	Incidência Média ^e	Forma Clínica	Referência
P30L	89 C→T	E ₁	"missense"	20-30	2,2	NC	Tusie-Luna <i>et al.</i> , 1991
Sp2	656 A/C→G	I ₂	"splicing" anormal	< 5	27,9	VS-PS	Higashi <i>et al.</i> , 1988b
Δ8	deleção de 8 pb	E ₃	"frameshift"	0	2	PS	Higashi <i>et al.</i> , 1986
I172N	1001 T→A	E ₄	"missense"	1	13	VS	Amor <i>et al.</i> , 1988
CL6	L236N/V237Q/M239K	E ₆	"missense"	0	-	PS	Tusie-Luna <i>et al.</i> , 1990
V281L	1685 G→T	E ₇	"missense"	0	8	NC	Speiser <i>et al.</i> , 1988
F306+1nt	1759 +T	E ₇	"frameshift"	0	-	PS	White <i>et al.</i> , 1986
Q318X	1996 C→T	E ₈	"nonsense"	0	6	PS	Globerman <i>et al.</i> , 1988
R356W	2110 C→T	E ₈	"missense"	0	7	PS	Chiou <i>et al.</i> , 1990

a- Δ, deleção; +, inserção; nt, nucleotídeo; as letras representam os códons dos aminoácidos: F, fenilalanina; I, isoleucina; L, leucina; N, asparagina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; V, valina; W, triptofano; X, "stop" códon. b- Os nucleotídeos estão numerados a partir do códon de início ATG, de acordo com as referências Higashi *et al.*, 1986, White *et al.*, 1986 e Rodrigues *et al.*, 1987. Sendo que nesta última existe 1 códon a mais na sequência. Os íntrons estão incluídos na sequência. c- E, éxon; I, intron. d- Medida da atividade da enzima mutante em cultura de células. Quando dois valores estão presentes, representam a atividade da 17-OHP e progesterona respectivamente. e- Valor médio da frequência de cada mutação calculado a partir dos dados de White e Speiser (2000). PS- perdedor de sal; VS- virilizante simples; NC- não clássica.

Neste sentido, foi medida a atividade enzimática *in vitro* de proteínas mutantes, correlacionando-as com a frequência destas mutações em pacientes afetados pelas formas PS, VS e não clássica (Tusie-Luna *et al.*, 1990; Higashi *et al.*, 1991; Wu e Chung, 1991). Entretanto, cada grupo apresentou pacientes com fenótipos mais ou menos grave do que o predito, com uma taxa de 80% de acerto entre o predito e observado, sugerindo que outros fatores além das mutações podem estar interferindo no fenótipo final (Miller, 1991a; Mornet *et al.*, 1991).

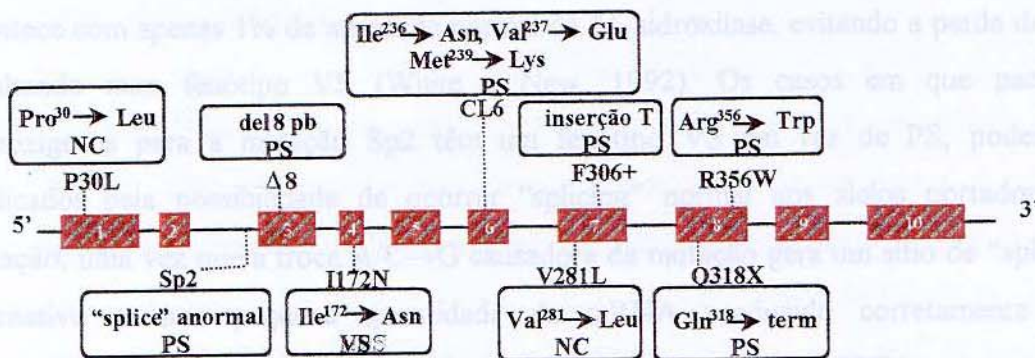


Figura 5: Mutações e suas respectivas manifestações no fenótipo. PS – perdedora de sal; VS – virilizante simples; NC – não clássica ou tardia.

Uma faceta importante da variabilidade clínica da deficiência da 21-hidroxiase concerne à capacidade dos portadores da deficiência sintetizar aldosterona. Deleções gênicas, mutações “nonsense” (como a do códon 318 no éxon 8) e mutações “frameshift” (incluindo a deleção de 8 pb no éxon 3 e a inserção de 1 pb no éxon 7), as quais impedem completamente a atividade da 21-hidroxiase, são associadas com a forma PS da doença (Higashi *et al.*, 1988b; Collier *et al.*, 1989; Carrera *et al.*, 1996; Wedell, 1998). Enzimas com a mutação Ile-Val-Glu-Met²³⁶⁻²³⁹→Ans-Glu-Glu-Lys (Higashi *et al.*, 1988b) ou com uma simples substituição Arg356Trp (Chiou *et al.*, 1990) também são relacionadas com a forma PS. Porém a mutação Sp2 tem sido encontrada em pacientes com a deficiência da 21-hidroxiase tanto em PS como em VS (Higashi *et al.*, 1988b; Owerbach *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1995b; Krone *et al.*, 2000). Além disso, a mutação Ile172Asn frequentemente encontrada em pacientes com a forma VS também é encontrada em pacientes PS (Wilson *et al.*, 1995b; Bachega *et al.*, 1998; Krone *et al.*, 2000).

A princípio, o fenótipo VS é devido a uma mutação da enzima 21-hidroxiase que afeta a atividade da 17-OHP e mantém a produção da progesterona relativamente intacta. Assim, a causa mais provável da diferença fenotípica entre as formas VS e PS, é a diferença da atividade de 21-hidroxiase frente aos substratos progesterona e 17-OHP. Como a aldosterona é normalmente secretada numa razão de 1-10 vezes menor do que o cortisol, torna-se evidente que a atividade da 21-hidroxiase terá que diminuir a baixos

níveis para que a falta de aldosterona seja manifestada. Assim, a síntese de aldosterona acontece com apenas 1% de atividade normal da 21-hidroxilase, evitando a perda de sal e resultando num fenótipo VS (White e New, 1992). Os casos em que pacientes homozigotos para a mutação Sp2 têm um fenótipo VS em vez de PS, podem ser explicados pela possibilidade de ocorrer “splicing” normal nos alelos portadores da mutação, uma vez que a troca A/C→G causadora da mutação gera um sítio de “splicing” alternativo e uma pequena quantidade de mRNA produzido corretamente seria responsável pela síntese de alguma enzima funcional (Wilson *et al.*, 1995b).

A associação entre a forma clínica e a classe da mutação patológica discutida em trabalhos recentes é geralmente concordante, mas a distinção entre as formas VS, PS e não clássica não é absoluta (Sinnott *et al.*, 1992; Speiser *et al.*, 1992b; Wedell *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1995a; Koppens *et al.*, 1998; Krone *et al.*, 2000).

9. Polimorfismos intergênicos e intragênicos

Polimorfismos de sequência nucleotídica (SNPs - “Single Nucleotide Polymorphisms”) têm sido relatados tanto no gene ativo como no pseudogene da enzima 21-hidroxilase, bem como nas cópias gênicas do *C4* (Chung *et al.*, 1986; Higashi *et al.*, 1986; Rodrigues *et al.*, 1987). A presença dos SNPs nos genes da 21-hidroxilase é de grande interesse, por várias razões. Primeiramente, eles podem ser utilizados para análise da segregação dos alelos em estudos genéticos, especialmente nas famílias com HCA. Além disso, eles permitem a identificação de deleções gênicas em famílias informativas e podem oferecer novos “insights” nas taxas relativas de mutações nesses genes (Jiddou *et al.*, 1999).

Em particular, existem alguns desses polimorfismos que afetam sítios de restrição que possibilitam a diferenciação entre as cópias gênicas tanto do *C4* quanto da 21-hidroxilase; esse polimorfismo possibilita a caracterização do *locus* por análise de “Southern blotting” (White *et al.*, 1985; Carrol *et al.*, 1985a; Donohoue *et al.*, 1986).

Deste modo, a análise de “RFLP” (‘Restriction Fragment Length Polymorphisms’) do *locus CYP21/C4* possibilita a avaliação das deleções, duplicações e conversões em larga

escala que ocorrem nos casos de HCA (Mornet *et al.*, 1986; Morel *et al.*, 1989; Haglund-Stengler *et al.*, 1991a; White *et al.*, 1992).

Análise de restrição com *Taq* I, revelada por hibridização com sondas dos genes *CYP21* e *C4*, permitem a distinção entre os alelos *CYP21P* e *CYP21* e entre *C4A* e *C4B* (Mornet *et al.*, 1986; Rumsby *et al.*, 1988), como mostrado na **figura 6**. Neste experimento, o pseudogene *CYP21P* é caracterizado por um fragmento de 3,2 kb, o gene *CYP21*, por um fragmento de 3,7 kb e o gene *C4A*, por um fragmento de 7,0 kb. Já o gene *C4B* pode apresentar dois fragmentos de diferentes tamanhos, um de 6,0 (*C4B* longo) e outro 5,4 kb (*C4B* curto), dependendo da presença ou ausência de uma sequência de 6,5 kb no íntron 9 do gene (**figura 6**). Uma cópia híbrida do gene *C4B* formada pela junção do terminal 5' de *C4A* e a parte 3' de *C4B* curto presente em alelos com deleção de *CYP21P* é reconhecida por um fragmento *Taq* I de 6,4 kb (Prentice *et al.*, 1986; Schneider *et al.*, 1986; Paldostir *et al.*, 1987).

À variação do "cluster" C4/CYP21 quanto ao número de cópias gênicas e quanto ao tamanho do *C4B* chamamos de polimorfismos intergênicos.

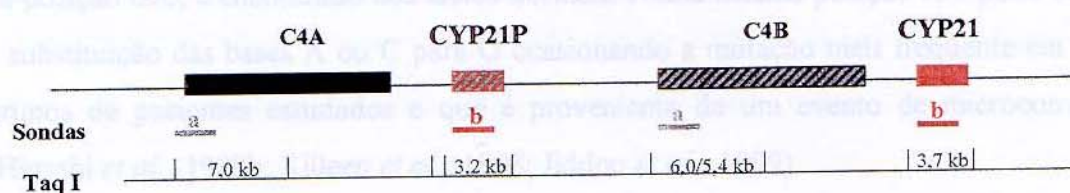


Figura 6: Representação esquemática dos sítios de restrição da enzima *Taq* I nos genes *C4* e *CYP21*. Fragmentos de 3,7 kb e 3,2 kb correspondem a *CYP21* e *CYP21P*, respectivamente; o fragmento de 7,0 kb refere-se a *C4A*, enquanto os fragmentos de 6,0 kb e 5,4 kb a *C4B*. Barras simbolizam as sondas C4B550, para os genes C4 (a) e pC21/3c (b), para 21-hidroxilase.

Com o sequenciamento dos genes *CYP21* e *CYP21P*, muitos SNPs intragênicos foram encontrados. A presença de um códon CTG (Leu) extra foi verificada em *CYP21* (Rodrigues *et al.*, 1987), numa região descrita previamente com 4 códons para Leucina nas posições 6-10 do éxon 1 (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986). Comparações entre espécies revelaram a presença de leucinas nessas mesmas posições, indicando possivelmente um polimorfismo de tamanho na enzima 21-hidroxilase, variando entre 494 e 495 aminoácidos (Rodrigues *et al.*, 1987). Posteriormente foi confirmado que a inserção

de leucina não acarretava alteração da atividade enzimática e que pode ser normalmente encontrada no *CYP21P* (New e Crawford, 1994). Outros polimorfismos na sequência protéica podem ser encontrados como, por exemplo, as seguintes trocas de aminoácidos: Arg102Lys e Ser268Thr (Rodrigues *et al.*, 1987) que, da mesma forma que a variação do número de Leucinas, não alteram a atividade enzimática.

Além das variações na proteína descritas acima, pode-se encontrar outros SNPs, especialmente dentro do íntron 2. Este íntron contém um grande número de sequências polimórficas, entre elas, as encontradas nas posições nucleotídicas 395 e 453 (T→C) e 601 (A→C) (Higashi *et al.*, 1986; Rodrigues *et al.*, 1987; Wedell *et al.*, 1992; Bobba *et al.*, 1997). Esses três polimorfismos podem ser reconhecidos por enzimas de restrição, como *Hae* III/*Msp* I (395 e 601) e *Bbv* I (453).

A frequência desses três polimorfismos estudados em indivíduos normais de famílias do CEPH (“Centre d’Étude du Polymorphisme Humain”) da França, foram de 395C (0,17%), 395T (0,83%), 453C (0,71%), 453T (0,29%), 601A (0,1%) e 601C (0,9%) (Killeen *et al.* 1998). Um outro polimorfismo descrito no íntron 2, a troca A→C na posição 656, é encontrado nos alelos normais. Nessa mesma posição 656 pode ocorrer a substituição das bases A ou C para G ocasionando a mutação mais freqüente em todos grupos de pacientes estudados e que é proveniente de um evento de microconversão (Higashi *et al.*, 1988b; Killeen *et al.*, 1998; Jiddou *et al.*, 1999).

Esses polimorfismos são suficientemente freqüentes para serem seguidos na segregação dos alelos de *CYP21* mutantes em famílias afetadas por deficiência da 21-hidroxilase e encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população em geral (Killeen *et al.*, 1998).

10. Efeito do fundador

Agora que os estudos das frequências de mutações na deficiência da 21-hidroxilase em populações dos quatro continentes têm sido publicados, a idéia de que exista um efeito do fundador das mutações mais freqüentes para essa doença e que as mutações façam parte de haplótipos específicos, vem sendo explorada no estudo da genética molecular da

hiperplasia congênita da adrenal.

Desde as décadas de 70 e 80, estudos de populações e de famílias afetadas com HCA devido à deficiência da 21-hidroxilase demonstraram um desequilíbrio de ligação entre certos haplótipos do HLA e várias condições de doenças, incluindo alotipos característicos do complemento C4. Como os acasalamentos humanos são aleatórios, a frequência com que se encontra um dado alelo em um *locus* do HLA com um dado alelo em um segundo *locus* deve ser simplesmente o produto das frequências de cada alelo na população. Entretanto, certas combinações de alelos são encontradas com uma frequência muito maior do que a esperada, fenômeno conhecido como desequilíbrio de ligação. A ligação entre o complexo HLA e a HCA devido à deficiência da 21-hidroxilase foi inicialmente relatada por Dupont *et al.* em 1977 e subsequentemente confirmada em uma grande série de famílias (Levine *et al.*, 1978; Pucholtz *et al.*, 1978; Pollack *et al.*, 1979; Klouda *et al.*, 1980). Os estudos de populações e de famílias afetadas com HCA devido à deficiência da 21-hidroxilase demonstraram um desequilíbrio de ligação de certos antígenos ou combinações de antígenos (referido como haplótipos) do HLA. A forma grave PS de HCA, por exemplo, foi encontrada em associação com o haplótipo HLA-A3;Bw47;Bf*F;C2*C;DR7 com uma alta frequência (O'Neill *et al.*, 1982; Fleischnick *et al.* 1983). Esse haplótipo também carregava um alelo nulo em um dos *loci* C4. Algum tempo depois, foi demonstrado que esse alelo possuía uma deleção que incluía o gene CYP21 e C4B (White *et al.*, 1984a). Da mesma forma, as duplicações CYP21P+C4 no complexo gênico também eram particularmente observadas em associação com o haplótipo HLA-B14;DR1 (Carrol *et al.*, 1984) e, na sua grande maioria, este haplótipo carrega a mutação V281L (Speiser *et al.*, 1988; Dondi *et al.*, 1994), sendo frequentemente associado com a forma não clássica da HCA (Pollack *et al.*, 1981). Além desses haplótipos, o HLA A1;B8;C4AQ0,C4B1;DR3 está ligado à deleção do pseudogene CPY21P (White *et al.*, 1986). Essa combinação de haplótipo-mutação, embora achada em muitas populações, é particularmente enriquecida na população judaica Ashkenazi (Levo e Partanen, 1997), a qual apresenta uma alta taxa de endogamia.

Em populações heterogêneas, não têm sido encontrado um forte desequilíbrio de ligação entre os diferentes haplótipos de HLA e mutações no gene CYP21 ou nos

polimorfismos analisados. Isto provavelmente indica que uma dada mutação pode ter origens independentes. Por exemplo, Amor *et al.* (1988) observaram que a mutação I172N na população de Nova Iorque não está associada com nenhum haplótipo de HLA em particular. Embora a maioria dos estudos em populações variadas tenham focado apenas a determinação de mutações sem avaliar os haplótipos para as mutações mais frequentes no gene *CYP21*, a possibilidade de um efeito do fundador de algumas mutações tem sido aventada em populações com alto grau de miscigenação sem o estudo de haplótipos (Dardis *et al.*, 1997, Fardella *et al.*, 1998). Por outro lado, fortes associações têm sido observadas em populações pequenas e bem definidas, como as da Irlanda (Sinnot *et al.*, 1991) e dos Esquimos Yupik (Speiser *et al.*, 1992a).

Em um trabalho realizado na Finlândia, Levo e Partanen (1997) analisaram alelos portadores das dez mutações mais frequentes no gene *CYP21* e determinaram haplótipos característicos para cada mutação associada com a deficiência da 21-hidroxilase em 51 famílias não relacionadas. Todas as famílias analisadas no estudo originaram de uma população bem definida e etnicamente homogênea. O principal achado desse estudo foi a baixa variação de haplótipos com a deficiência da 21-hidroxilase. Partanen *et al.* (1989) já havia indicado que um pequeno número de haplótipos poderia contribuir para a maioria de todos os cromossomos afetados naquela população, sendo que 82,4% de todos os haplótipos afetados foram observados mais de uma vez. Foi demonstrado que cada um desses haplótipos estaria ligado especificamente a uma aberração no gene *CYP21*, sugerindo que cada um deles, represente, muito provavelmente, uma mutação fundadora separada. Um número significativo de haplótipos mostrou claramente um efeito do fundador na Finlândia; de fato, 16 haplótipos aparentemente independentes foram observados mais de uma vez em famílias não relacionadas. Comparando-se estes dados com os publicados em populações de outras origens, fica evidente que muitas das combinações dos haplótipos mutantes na Finlândia, são de fato achadas em pacientes de origem Européia e Americana, sugerindo que esses haplótipos possuem uma origem comum (Chu *et al.*, 1992; Helmberg *et al.*, 1992; Donohoue *et al.*, 1995).

Efeito do fundador tem sido verificado também em alelos de hemoglobinopatias, principalmente os da β -globina (Keclard *et al.*, 1997; Harding *et al.*, 1997; Villalobos-

Arambula *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1997; Merghoub *et al.*, 1997). Nesses casos, verifica-se que alguns haplótipos causadores da anemia falciforme (homozigose do gene da Hb S - $\alpha_2\beta_2$ - 6-glu-val) tiveram sua origem há muitas gerações e vêm sendo conservados dando inclusive indícios da migração populacional. Uma situação muito semelhante ao que encontramos para a 21-hidroxilase é descrita para hemoglobinopatia ligada à α -globina no que diz respeito à variabilidade numérica das cópias gênicas e às mutações pontuais (Hartevelde *et al.*, 1997; Mukherjee *et al.*, 1997).

No estudo de outras doenças observa-se a presença do efeito do fundador na distribuição dos haplótipos. Um deles é o estudo da doença Hipercolesterolemia familiar (FH); a análise de haplótipos de 18 famílias não relacionadas têm identificado pelo menos 5 diferentes cromossomos com FH. O haplótipo mais comum foi identificado em 11 das 18 famílias estudadas, indicando uma mutação fundadora no receptor do gene LDL responsável pela FH na população de Islândia (Gudnason *et al.*, 1997). A frequência desta doença em muitas comunidades é de 1:500, deixando a FH como uma das mais comuns doenças monogênicas conhecidas. Devido ao efeito do fundador a frequência desta doença ou das mutações em particular é muito alta em países com populações isoladas por limites geográficos ou culturais, como a população canadense do Quebec (Hobbs *et al.*, 1978), os Libaneses cristãos (Kachaduriam e Uthman, 1973), israelitas (Meiner *et al.*, 1991) e populações africanas como a da África do Sul (Leitersdorf *et al.*, 1989).

Neste trabalho, foram caracterizados os haplótipos associados aos cromossomos afetados por mutações no gene através de marcadores intergênicos e intragênicos ligados ao gene *CYP21* nas famílias com HCA atendidas no ambulatório de Endócrino Pediatria do Hospital das Clínicas-UNICAMP em Campinas.

OBJETIVOS

- 1- Determinar os haplótipos associados aos cromossomos afetados por mutações recorrentes no gene *CYP21*, com base em:
 - polimorfismos de sequência de DNA intragênicos;
 - RFLP do locus *C4B*;
 - número de cópias gênicas *CYP21/C4*

- 2- Caracterizar o ponto de quebra dos híbridos formados durante os eventos de deleção e conversão gênica em larga escala;

- 3- Avaliar a variabilidade na organização gênica *CYP21/C4* e o grau de heterozigose da mutação V281L em amostra de indivíduos controle.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Casuística

Foram estudadas 60 famílias, com pelo menos um indivíduo afetado, com a forma clássica de HCA por deficiência da 21-hidroxilase, além de dois indivíduos isolados, totalizando 113 alelos afetados. Foram retirados aqueles que se repetiram na amostragem, uma vez que 8 famílias são constituídas por casamentos consanguíneos e 3 são aparentadas entre si. Além dos indivíduos afetados, foram estudados também seus pais e irmãos normais, quando presentes, em um total 117 alelos. Entre os pacientes, 35 foram classificados com a forma PS e 26 com a forma VS, e 1 não foi determinado. Incluiu-se também uma amostra de 100 indivíduos controles, perfazendo um total de 198 alelos após a remoção de 2 alelos, uma vez 4 são aparentados entre si. Esses indivíduos não possuem nenhuma relação com as famílias afetadas com a deficiência da 21-hidroxilase. Assim, este trabalho contribuiu com as análises da variação numérica e de determinação de microconversões de *CYP21* e *C4* de 21 famílias, visto que 41 famílias haviam sido previamente estudadas quanto a estas características (Araujo *et al.*, 1996; Paulino *et al.*, 1999). Entretanto, o presente trabalho caracterizou os polimorfismos intragênicos de todos os indivíduos das 60 famílias para a análise dos haplótipos.

As amostras dos indivíduos afetados e de seus familiares foram encaminhadas ao nosso laboratório pelo Ambulatório de Endocrinopediatria do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Os indivíduos normais foram voluntários recrutados principalmente entre os estudantes de Pós-Graduação e Graduação da UNICAMP, cujo consentimento formal para a utilização das amostras em pesquisa, foi obtido por escrito.

2. Obtenção das amostras

Amostras de sangue periférico (10 a 20 mL) foram colhidos dos pacientes e seus familiares no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do HC-UNICAMP. Ao sangue foi adicionado EDTA pH 8,0 (1% final), como anticoagulante.

3. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico a partir de sangue total foi feita de acordo com o método padronizado no Laboratório de Genética Molecular Humana – CBMEG que tem por princípio a lise dos leucócitos com proteinase K e extração do DNA com fenol:cloróformio:álcool isoamílico, e encontra-se descrito em detalhes em Araujo *et al.* (1996).

A concentração do DNA obtido foi calculada através de leitura de absorbância a 260 nm. A quantidade e qualidade do DNA extraído foram analisadas também em eletroforese de gel de agarose, como descrito por Sambrook *et al.* (1989). Tipicamente, ~ 1 µg de DNA genômico em 0,1 volume de tampão de corrida (0,25% de Azul de Bromofenol; 50% glicose) foi separado em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1x, e posteriormente corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) durante 10 minutos, para visualização e documentação.

4. Análise da variação numérica dos genes *CYP21* e *C4*

Esta análise foi realizada através da comparação de intensidade das bandas obtidas em “Southern Blots” com a enzima *Taq* I e hibridização com as sondas de *CYP21* e *C4*. Os procedimentos estão descritos abaixo em detalhes.

4.1. “Southern blot”

DNA genômico (10 µg) foi digerido com *Taq* I (10 U) em 150 µL de tampão de reação 1x seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante da enzima. As reações foram incubadas em banho a 65°C, “overnight”. Após a reação, o DNA foi precipitado com 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado, por 18 h a -20 °C. A mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos em microcentrifuga e o precipitado contendo o DNA digerido foi lavado com etanol 70%. Após centrifugação (12.000 rpm por 10 minutos), o DNA foi ressuspenso em 15 µL de

TE, separado em gel de agarose e fotografado, como descrito no item 3.

O DNA genômico digerido com *Taq* I e separado em gel de agarose, foi transferido para uma membrana de nylon (hybond N⁺, Amersham), seguindo-se as especificações do fabricante da membrana. Antes da transferência, o gel foi depurinado em HCl 0,25 N por 15 min, e em seguida desnaturado em NaOH 0,4 N, NaCl 1N por 30 min. O DNA foi transferido para a membrana, por capilaridade, durante aproximadamente 18 h, como descrito em Sambrook *et al.* (1989). Após a transferência, a membrana foi neutralizada em tampão fosfato de sódio 0,1 M, durante 30 min, seca em papel de filtro, e colocada em forno a 80°C por 2 h.

4.2. Sondas utilizadas

A sonda para a detecção do gene *CYP21* (pC21/3c) foi gentilmente cedida pelo Dr. Perrin White, Cornell University Medical College, New York, EUA. A sonda pC21/3c corresponde ao cDNA de *CYP21* (2 kb) isolado das glândulas adrenais humanas, clonado em sítio *Bam*H I no vetor pcD.

A sonda correspondente ao gene *C4* do Sistema Complemento foi gentilmente cedida pelo Dr. Tom Strachan, Dept of Medical Genetics, St. Mary's Hospital, Manchester, Inglaterra. A sonda C4 é um fragmento de cDNA (550bp) correspondente à região 5' do gene, clonado nos sítios *Bam*H I e *Kpn* I no vetor pTZ18B.

Os plasmídios contendo as sondas de interesse foram usados para transformar células competentes de *Escherichia coli*, segundo Sambrook *et al.* (1989). As células de DH5α foram incubadas com o plasmídio de interesse por 30 min em gelo, em seguida mantidas a 42°C por 90 s e novamente mantidas em gelo. As bactérias foram crescidas em meio LB líquido (Sambrook *et al.*, 1989) por 1 h e plaqueadas em meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL). Células transformantes foram crescidas em meio LB líquido com ampicilina e mantidas em glicerol (20%) a -70°C.

Plasmídios foram extraídos pelo método de “miniprep” com lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) ou pela utilização de ‘kit’ de extração “in concert” (Life Technologies). Os plasmídios foram digeridos com enzimas apropriadas e os produtos das

digestões foram separados em gel de agarose 0,8%. Os fragmentos de DNA correspondentes às sondas *C4* e *CYP21* foram extraídos do gel e purificados utilizando-se o protocolo do kit “Rapid Gel Extraction” (Life Technologies). Os fragmentos foram mantidos a -20°C até serem utilizados como sonda.

4.3. Marcação das sondas através de “Random Priming”

As sondas de DNA foram marcadas com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham) pelo método de “Random Priming”, seguindo-se o protocolo do fabricante do kit de marcação “Rad Primer DNA Labeling System” (Life Technologies). Desnaturou-se 25-50 ng de DNA a 100°C durante 10 min e em seguida colocou-se o tubo em gelo, por 5 min. Centrifugou-se rapidamente e acrescentou-se tampão Hepes 0,67 M, Tris-HCl, 0,17 mM pH 6,8, contendo 17 mM de MgCl_2 , 33 mM 2-mercaptoetanol, 1,33 mg/mL de BSA e “primers” aleatórios (hexâmeros); 0,01 mM dNTPs (dATP, dTTP, dGTP), 5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mmol), 3U DNA polimerase, fragmento Klenow, e água para um volume final de 50 μL . A reação foi incubada a 37°C por 2 h, quando foi adicionado 5 μL de “stop buffer” (Life Technologies) e 45 μL de TE.

4.4. Purificação da sonda

A sonda foi purificada através de filtração em gel usando-se uma coluna de Sephadex G-50 (Pharmacia), empacotada em solução saturada de Tris-HCl, 1 M, pH 8,0, em uma seringa de 1 mL, através de sucessivas centrifugações de 4 min a 3.000 x g. Antes de purificar a sonda, equilibrou-se a coluna com 100 μL de TE, por centrifugação. Após a purificação da sonda retirou-se 1 μL para a contagem do nível de incorporação radioativa em contador de cintilação líquida (LKB).

4.5. Hibridização

As membranas de “Southern” foram hibridizadas separadamente com as sondas *CYP21* e *C4* seguindo-se o protocolo descrito por Mornet *et al.* (1986), com algumas modificações. As membranas foram pré-hibridizadas em Tris-HCl 0,2 M, pH 7,0, contendo 50% formamida, 10x Denhardt's (Sambrook *et al.*, 1989), 5x SSC, 1% SDS, e 100 µg/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado, e incubadas em forno de hibridização (Amersham) a 42°C, por aproximadamente 18 h. A solução de pré-hibridização foi substituída, porém, usando-se apenas 5x Denhardt's, e adicionando-se a sonda marcada desnaturada em NaOH 0,3 N. As membranas foram hibridizadas a 42 °C por 16 h. Após hibridização, os filtros foram lavados uma vez em solução de estringência média (2x SSC; 0,1% SDS) à temperatura ambiente, por 10 min (Sambrook *et al.*, 1989). Em seguida, lavou-se os filtros duas vezes em solução de alta estringência (0,1x SSC; 0,1% SDS) a 65°C durante 15 min.

4.6. Auto-radiografia e remoção da sonda das membranas

Os filtros lavados foram expostos a filmes de raio-X (Hyperfilm MP-Amersham) em cassetes de exposição contendo intensificador de sinal (“Lightning Plus” da Dupont), a -70°C, por períodos variáveis. Após um período mínimo de 14 h, os filmes foram revelados e lavados. A sonda foi removida dos filtros incubando-se os mesmos em solução Tris-HCl 5 mM, pH 8,0, 0,04% de EDTA e 0,1% de SDS, a 100°C, até que a solução atingisse a temperatura ambiente. Os filtros lavados foram selados em saco plástico, armazenados a 4°C e posteriormente re-hibridizados.

5. Determinação das mutações em alelos afetados

A determinação dos rearranjos gênicos no “cluster” *CYP21/C4*, como deleções, conversões e duplicações gênicas, foi feita através de “Southern blot” como descrito em Araujo *et al.* (1996). As microconversões em 41 famílias foram determinadas por

hibridização alelo-específica (ASOH) por Paulino *et al.* (1999). Em 21 famílias que não fazem parte do trabalho de Paulino *et al.* (1999) foram estudadas por PCR alelo-específico (ASO-PCR). A técnica utilizada por Wilson *et al.* (1995a) está descrita a seguir.

5.1. PCR alelo-específico para as mutações freqüentes

Essa estratégia foi utilizada para estudar 8 mutações pontuais em 21 famílias não descritas no trabalho de Paulino *et al.* (1999).

Uma das maiores dificuldades no estudo das mutações do gene *CYP21* é a presença das mesmas mutações no pseudogene *CYP21P*, as quais resultam provavelmente de processos de microconversão. Além disso, as duas cópias gênicas apresentam 98% de homologia nos éxons (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986), o que dificulta o desenho de “primers” adequados para a amplificação específica do gene ativo. Atualmente o método mais prático e direto de se determinar essas mutações é através da estratégia descrita por Wilson *et al.* (1995a) denominada PCR alelo-específico, a qual consiste de duas reações de PCR: em uma delas o “primer” é complementar à sequência normal e na outra, complementar à sequência mutante. O segundo “primer” do par é comum para as duas reações e consiste de uma sequência específica para o gene ativo (“primer” âncora). Embora seja uma técnica direta e rápida, não elimina as análises por “Southern blot” pois não fornece nenhum dado a respeito de deleções, conversões em larga escala ou duplicações; pelo contrário, eventualmente pode fornecer um resultado falso caso os alelos sejam possuidores de alterações numéricas e genes híbridos. O resultado é positivo ou negativo com base na amplificação ou não de fragmentos em cada uma das reações. Portanto, se o indivíduo testado for homozigoto para a sequência normal, será obtido o produto de PCR apenas com o “primer” normal. Os “primers” utilizados por Wilson *et al.* (1995a) e neste trabalho estão discriminados na **tabela 2**.

As condições gerais para a reação de amplificação por PCR alelo-específico utilizadas para a caracterização das mutações seguem abaixo:

Reação	[] final	Ciclo geral
DNA genômico	1 µg	1 ciclo de: 94°C, 5 min
Tampão Gibco BRL (10x)	1x	5 ciclos de: 94°C, 1 min
MgCl ₂	1,5 mM	*T _m do "primer", 1min 30 seg
dNTP (Pharmacia)	0,2 mM	72°C, 10 min
"primer sense"	0,6 pmoles	30 ciclos de: 94°C, 1 min
"primer antissense"	0,6 pmoles	*T _m do "primer", 1min 30 seg
Enzima Taq DNA polimerase		72°C, 4 min
Gibco BRL (5 U/µL)	1 U	1 ciclo de: 72°C, 5 min
BSA	0,01%	
Volume Final	30 µL	

* T_m para cada "primer" encontra-se na tabela 2. Para a reação de amplificação da mutação do intron 2 (A/C656G), as concentrações finais dos "primers sense" e "antissense" e de MgCl₂ foram alteradas (0,3 pmoles para os "primers" e 0,75 mM para MgCl₂). Ao término das reações, as amostras foram separadas em gel de agarose 1% e fotografadas, como descrito no item 3.

Tabela 2: Sequência dos "primers" utilizados para o PCR alelo-específico.

"Primer"	Sequência (5'-3')	Mutação	T _m (°C)	Local
Ex1ns	TCC GGA GCC TCC ACC TCC C	(A)	72	Éxon 1
Ex1ms	TCC GGA GCC TCC ACC TCC T	(A) P30	72	Éxon 1
In2ns	TTC CCA CCC TCC AGC CCC CAA	(B)	72	Intron 2
In2ms	TTC CCA CCC TCC AGC CCC CAG	(B)(656)A/C-G	72	Intron 2
In2cs	TTC CCA CCC TCC AGC CCC CAC	(B)	72	Intron 2
Ex3ns	CGG ACC TGT CCT TGG <u>GAG ACT AC</u>	(C)	70	Éxon 3
Ex3ms	ACT ACC CGG ACC TGT CCT TGG TC	(C) del. 8 pb	70	Éxon 3
Ex3na	TCC AGA GCA GGG AGT AGT CTC	(D)	70	Éxon 3
Ex4ns	TTC TCA CCT GCA GCA TCA T	(E)	68	Éxon 4
Ex4ms	CTC TCC TCA CCT GCA GCA TCA A	(E) I172N	70	Éxon 4
Ex6ns	GAG GGA TCA CAT CGT GGA GAT G	(F)	70	Éxon 6
Ex6na	AGC TGC ATC TCC ACG ATG TGA	(G)	70	Éxon 6
Ex6ma	TCA GCT GCT TCT CCT CGT TGT GG	(Gm) [*] (CL6)	70	Éxon 6
Ex7na	TCC ACT GCA GCC ATG TGC AC	(H)	68	Éxon 7
Ex7ma	TCC ACT GCA GCC ATG TGC AA	(H) V281L	68	Éxon 7
Ex8.1na	TTC GTG GTC TAG CTC CTC CTG	(I)	70	Éxon 8
Ex8.1ma	AGT TCG TGG TCT AGC TCC TCC TA	(I) Q318X	70	Éxon 8
Ex8.2na	CTA AGG GCA CAA CGG GCC G	(J)	72	Éxon 8
Ex8.2ma	CTA AGG GCA CAA CGG GCC A	(J) R356W	72	Éxon 8

*- mutação do "cluster" (L236N, V237Q, M239K) no éxon 6. Os "primers" das mutações P30L, A/C → G (656), deleção de 8 pb e I172N foram usados com o Ex6na como âncora. Os "primers" das mutações V281L, Q318X e R356W foram usados com o "primer" Ex6ns como âncora. Os "primers" para a mutação no éxon 6 foram usados com o "primer" Ex3ns como âncora. As letras em negrito indicam o sítio da mutação pontual. No intron 2 foi utilizado o primer In2cs para detectar o polimorfismo A→C existente na posição 656. n = normal, m = mutante; s = "primer sense", a = "primer antissense", a sequência sublinhada do "primer" Ex3ns indica a deleção de 8 pares de base do gene CYP21P. As letras de A-J, se referem a nomeação dos "primers" mostrada na figura 7. OBS: Neste trabalho não foi estudado a mutação F306+T presente no éxon 7 pelo método descrito por Wilson *et al.* (1995a). As mutações F306+T citadas neste trabalho foram provenientes do trabalho de Paulino *et al.* (1999), identificadas pelo método ASOH.

A figura 7 mostra uma representação esquemática da posição dos “primers” e tamanho dos fragmentos.

6. Caracterização dos alelos *CYP21* quanto aos polimorfismos intergênicos

Os alelos de indivíduos normais ou afetados com a forma clássica de HCA foram caracterizados quanto à duplicação e deleção de genes no *locus C4/CYP21* e quanto ao RFLP do gene *C4B*. A metodologia para este procedimento foi descrita nos itens de 4.1 a 4.6.

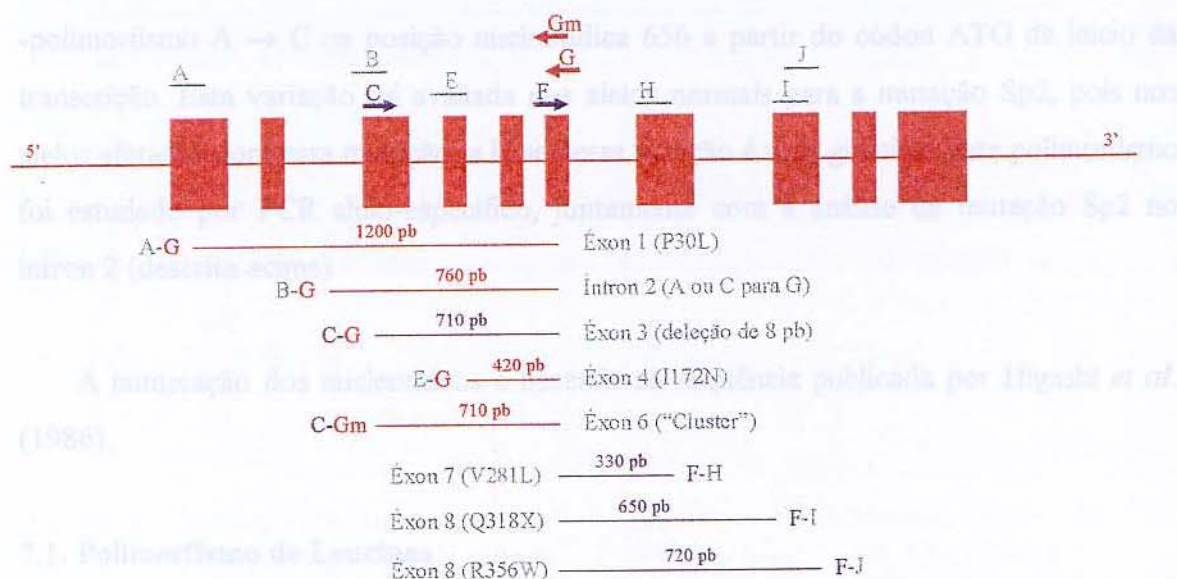


Figura 7. Representação esquemática do gene *CYP21* e da localização relativa dos “primers” utilizados para amplificação do PCR alelo-específico. Os retângulos escuros representam os éxons de 1 a 10. A-J, representam os “primers” utilizados para o PCR alelo-específico do gene *CYP21* (tabela 1). C, D, F e G, são “primers” específicos para o gene *CYP21*; a orientação dos “primers” é dada pelo sentido das setas abaixo deles. A, B, E, H, I e J, são pares de “primers” normal e mutante. Gm, e o “primer” mutante que em conjunto com o “primer” C normal detecta a mutação do éxon 6. O tamanho dos fragmentos originados pelo PCR estão representados abaixo das linhas.

Com base nos marcadores intergênicos, alelos *CYP21* afetados foram separados pelo tipo de mutação e polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição *Taq* I do gene *C4B*, e também pelo número de cópias de cada gene no “cluster” *CYP21/C4*.

7. Caracterização dos alelos *CYP21* pelos polimorfismos intragênicos

As técnicas descritas abaixo foram empregadas para a separação de alelos *CYP21* com base em marcadores intragênicos. Os 230 alelos das famílias estudadas foram avaliadas quanto a três polimorfismos intragênicos:

- polimorfismo do número de códons para Leu no éxon 1, onde encontram-se alelos com 4 (posições 6 e 10) ou 5 Leucinas (posições 6 e 11) (Rodrigues *et al.*, 1987);
- polimorfismo T → C na posição nucleotídica 395 a partir do códon ATG de início da transcrição;
- polimorfismo A → C na posição nucleotídica 656 a partir do códon ATG de início da transcrição. Esta variação foi avaliada nos alelos normais para a mutação Sp2, pois nos alelos afetados com essa mutação, a base nessa posição é uma guanina. Este polimorfismo foi estudado por PCR alelo-específico, juntamente com a análise da mutação Sp2 no intron 2 (descrita acima).

A numeração dos nucleotídeos é baseada na sequência publicada por Higashi *et al.* (1986).

7.1. Polimorfismo de Leucinas

Esse polimorfismo foi avaliado através da amplificação específica do éxon 1 e separação do produto em gel de poliacrilamida para separar fragmentos com diferença de três pares de base. Para tanto, duas reações de PCR foram necessárias.

7.1.1. Reações de amplificação seletiva

A amplificação específica do éxon 1 do gene *CYP21* foi realizada com o par de “primers” ProEx1s e Ex3na. O “primer” Ex3na só se anela na porção correspondente ao gene *CYP21*, portanto funcionando como um “primer” seletivo para o mesmo (Wilson *et*

al., 1995a). Depois de selecionado o fragmento correspondente ao gene de estudo, uma “nested” PCR foi realizada com os “primers” ProEx1s e Ex1a para a produção de um fragmento menor, obtendo-se assim uma melhor separação em gel de poliacrilamida e visualização dos resultados. A seqüências dos “primers” encontram-se na **tabela 3** e os tamanhos dos fragmentos obtidos estão representados na **figura 8**.

Tabela 3: Seqüência dos “primers” utilizados para o polimorfismo de Leucinas

“Primer”	Seqüência (5’-3’)	T _m (°C)
ProEx1s	GGA TGG CTG GGG CTC TTG AG	66
Ex3na	TCC AGA GCA GGG AGT AGT CTC	70
Ex1a	CTT CCA CCA GTT CCA CAG CAG G	66

s= “primer sense”, a= “primer antissense”

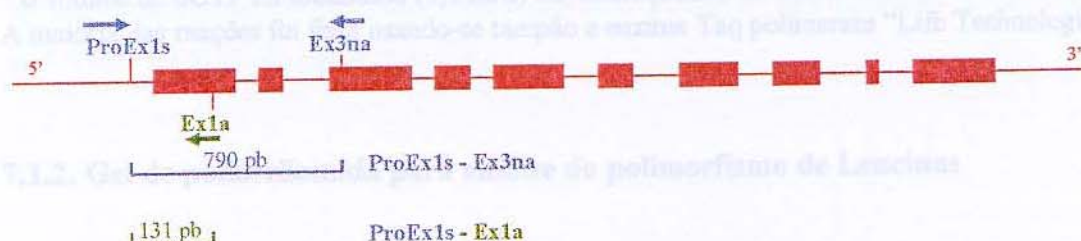


Figura 8: Representação esquemática do gene *CYP21* e da localização relativa dos “primers” utilizados nos PCRs. O “primer” ProEx1s está localizado aproximadamente 20 pb acima do códon de início do gene *CYP21*. Os retângulos representam os éxons de 1 a 10. A orientação dos “primers” é dada pelo sentido das setas acima deles. O “primer” Ex3na foi utilizado para selecionar o gene *CYP21* em detrimento do pseudogene *CYP21P*. Os tamanhos dos fragmentos gerados estão indicados.

As condições de PCR utilizadas para a amplificação com os dois pares de “primers” ProEx1s-Ex3na e ProEx1s-Ex1a estão representadas abaixo. O produto da reação com os “primers” ProEx1s-Ex1a foi marcado com $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP para análise do polimorfismo em gel de poliacrilamida.

Reação (“primers” ProEx1s-Ex3na)	[] final	Ciclos	
DNA genômico	0,5-1 µg	1 ciclo de:	94°C, 5 min
Tampão (10x)	1x	30 ciclos de:	94°C, 45 seg 65°C, 1 min e 30 seg 72°C, 1 min e 45 seg
MgCl ₂	1,5 mM		
dNTP (Pharmacia)	0,2 mM		
“primer sense e antissense”	0,6 pmoles	1 ciclo de:	72°C, 5 min
Taq DNA Polimerase (5U/µL)	1U		
Volume final	30 µL		
Reação (“primers” ProEx1s-Ex1a)	[] final	Ciclos	
DNA genômico	0,5-1 µg	1 ciclo de:	94°C, 5 min
Tampão (10x)	1x	30 ciclos de:	94°C, 30 seg 68,6°C, 30 seg 72°C, 1 min e 15 seg
MgCl ₂	1,5 mM		
dNTP (Pharmacia) com *dCTP↓	0,2 mM		
“primer” sense e antissense	20 pmoles	1 ciclo de:	72°C, 5 min
Taq DNA Polimerase (5U/µL)	1 U		
α ³³ PdCTP	1 µCi		
Volume final	30 µL		

* o volume do dCTP foi diminuído (0,1 mM) em consequência do acréscimo do α³³P-dCTP.
A maioria das reações foi feita usando-se tampão e enzima Taq polimerase “Life Technologies”

7.1.2. Gel de poliacrilamida para análise do polimorfismo de Leucinas

Às aliquotas de 2 µL do produto da PCR com os “primers” ProEx1s-Ex1a foram adicionados 3 µl de “stop solution” (formamida deionizada 88% (v/v), EDTA 10 mM, xileno cianol 0,01% e azul de bromofenol 0,01%) e em seguida a mistura foi desnaturada a 94°C por 5 minutos. Os fragmentos foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 7% contendo TBE 1x e uréia 7 M, com espessura de 0,4 mm. Os parâmetros de corrida foram 2.000 V, 50 mA a 50 W, por tempos que variaram de 2 a 3 horas. Após a corrida o gel foi transferido para uma folha de papel Whatman 3MM e secado a vácuo (Hoefer® Drygel Sr). Os produtos de amplificação foram detectados através de exposição a filme de raios-X (Kodak X - Omat AR), por tempo variável. A revelação do filme foi feita de acordo com as indicações do fabricante.

7.2. Polimorfismo T→C na posição 395

A posição 395 no íntron 2 pode apresentar os nucleotídeos T ou C, tanto no gene *CYP21* como no pseudogene *CYP21P*. Portanto, trata-se de um polimorfismo gerado por microconversão, que pode refletir uma taxa de recombinação neste ponto intragênico. A troca do nucleotídeo T por C na posição 395 cria um sítio de restrição com a *Msp* I.

Assim, o fragmento de PCR de 790 pb amplificado com os "primers" ProEx1s-Ex3na (ver figura 8), englobando o polimorfismo T→C do íntron 2, foi digerido com *Msp* I por 4 h, num volume final de 20 µl como indicado abaixo:

	[] final
PCR	2 µg de DNA
Enzima (10U/µL)	0,5 U
Tampão 10x	1x
BSA (10 µg/µL)	0,01 µg/µL
Água	q.s.p 20 µL

Após o término da digestão, foram adicionados a cada reação 4 µL de tampão de amostra (Sambrook *et al.*, 1989) e em seguida os produtos das digestões foram separados e analisados em gel de agarose 1,5%.

RESULTADOS

Neste trabalho foram analisados 230 alelos com forma clássica de HCA por deficiência da 21-hidroxilase. Foram determinados 58 haplótipos em 107 do total de 113 alelos afetados. Os haplótipos correspondentes aos alelos afetados foram caracterizados pelas mutações no gene *CYP21*, duplicações e deleções de genes da unidade *C4/CYP21*, pelo polimorfismo de tamanho do gene *C4B* e pela análise de três polimorfismos encontrados no gene *CYP21*. Através da análise dos alelos normais dos indivíduos portadores obrigatórios de mutações no gene *CYP21*, foi possível estimar as frequências dos polimorfismos em alelos não afetados. A variação do número de cópias gênicas no *locus C4/CYP21* foi estimada em 198 alelos de indivíduos controles não relacionados. O estudo destes indivíduos incluiu também a análise da mutação V281L para se estimar sua incidência na população.

1. Caracterização dos alelos quanto à variação numérica e RFLP com *Taq I* de *C4B*.

Eventos de deleção e de conversão gênica em larga escala envolvendo a unidade *CYP21/C4* foram detectados nos “blots” por redução de intensidade (heterozigotos) ou ausência (homozigotos) dos fragmentos de DNA correspondentes ao *CYP21*, *CYP21P* e *C4A* ou *C4B* obtidos após digestão com a enzima *Taq I*. As duplicações foram avaliadas pelo aumento da intensidade das bandas correspondentes a cada gene. A intensidade relativa de cada fragmento de restrição foi determinada pela análise densitométrica das bandas após hibridização com sonda pC21/3c específica para *CYP21* e *CYP21P* e a sonda C4B550 para *C4A* e *C4B*. A metodologia de análise dos padrões de restrição com *Taq I* e os resultados de parte da casuística (41 famílias) encontram-se publicadas nos trabalhos de Araujo *et al.* (1996) e Paulino *et al.* (1999). Tomando-se o total de 113 alelos afetados, com base nos padrões densitométricos, os alelos afetados foram classificados em quatro tipos:

1.1. Alelos sem alteração numérica das unidades gênicas *CYP21/C4*

Um total de 68 alelos afetados sem nenhuma alteração numérica das unidades gênicas *CYP21/C4* foram encontrados. Por não apresentarem alteração numérica ou mutação detectável por “Southern blot”, tais alelos foram diferenciados apenas pelo polimorfismo

de *C4B*. Esses alelos foram classificados em quatro haplótipos como mostra a **figura 9 (A-D)**. Assim, 25 dos alelos afetados possuem o fragmento *Taq* I de *C4B* de 5,4 kb, enquanto que 43 apresentam o fragmento de 6,0 kb (**figura 9, A e B**, respectivamente). Ainda dentro desta categoria estão representados dois alelos raros encontrados em 2 famílias sem relação de parentesco. Um deles apresenta um fragmento *Taq* I de *C4B* de 3,9 kb na família 26 (**figura 9 C**) e outro com um fragmento *Taq* I de 5,6 kb referente ao *CYP21* ou *CYP21P* na família 22 (**figura 9 D**).



Figura 9: Unidades *CYP21/C4* sem alteração numérica. Os números em kb dentro dos retângulos indicam o tamanho dos fragmentos observados nos “Southern blots” com as respectivas sondas.

1.2. Alelos com duplicação ou deleção da unidade de *CYP21P/C4B*

As duplicações, bem como as deleções do pseudogene *CYP21P* não são consideradas diretamente como causa da deficiência da 21-hidroxilase. Entretanto, foram encontrados 2 alelos com deleções e 16 com duplicações de *CYP21P* dentre os 113 alelos afetados (**figura 10, A-E**). Entre os alelos com duplicação da unidade *CYP21P/C4B*, 11 possuem *C4B* de 5,4 kb duplicado, enquanto 4 contém duas cópias de *C4B* de 6,0 kb (**figura 10, A e B**, respectivamente) e 1 com cópias de *C4B* de 6,0 kb e 5,4 kb (**figura 10 C**). Dois alelos com deleção apresentam a unidade gênica *CYP21P/C4B* deletada, sendo que um deles apresenta o fragmento de *C4* de 6,4 kb que caracteriza o híbrido de *C4A/B* (**figura 10 D e E**). Este fragmento resultante da junção da porção 5' do *C4A* com a parte 3' do *C4B* curto (de 5,4 kb) é considerado como marcador de deleção para o pseudogene *CYP21P* (Paldosttir *et al.*, 1987).



Figura 10: Alelos com duplicação da unidade *CYP21P/C4* e com deleção de *CYP21P*.

1.3. Alelos com conversão gênica

Os alelos com conversão gênica foram encontrados em 15 pacientes e divididos em três tipos diferentes, de acordo com o RFLP de *Taq I* no gene *C4B* e o número de unidades gênicas *CYP21P/C4B* (figura 11, A-C). Assim, 9 alelos foram determinados contendo fragmentos *C4B* de 6,0 kb, 3 alelos com *C4B* de 5,4 kb e 3 alelos com duplicação de *CYP21P+C4B*^[5,4 kb] e *C4B* de 5,4 kb (figura 11, A, B e C, respectivamente).

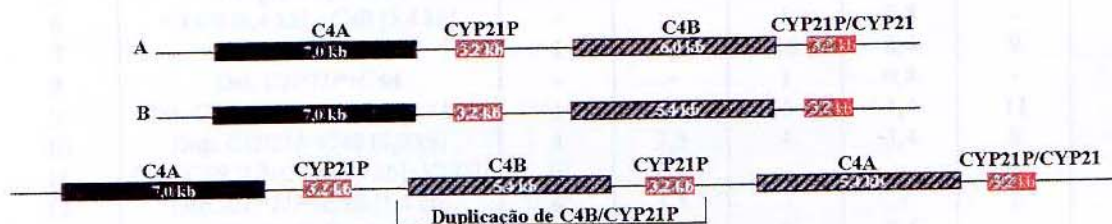


Figura 11: Alelos com conversão gênica.

1.4. Alelos com deleção de 30 kb apresentando o gene híbrido *CYP21P/CYP21*

A figura 12 mostra os alelos com deleções gênicas de 30 kb que inclui o final 3' de *CYP21P* mais o gene *C4B* e o final 5' do *CYP21*. Geralmente essa deleção é representada por um gene híbrido *CYP21P/CYP21*. Dez alelos com esta deleção foram encontrados em

10 indivíduos afetados, sendo que a deleção encontrada nos alelos da paciente 30 (filha de casamento consanguíneo) foi associada ao fragmento *Taq* I de 6,4 kb do gene *C4* (figura 12 B). Isto caracteriza um evento de deleção raro, uma vez que o fragmento de 6,4 kb sempre aparece associado a deleção de *CYP21P*.

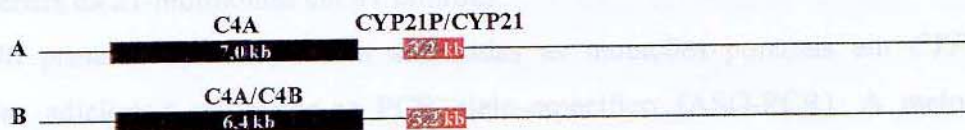


Figura 12: Alelos com deleção de *CYP21*.

Uma comparação da diversidade gênica e do polimorfismo intergênico de *C4B* obtidos por análise de “Southern blot” está descrita na tabela 4 e inclui além dos alelos afetados e normais (portadores obrigatórios) os alelos dos controles normais sem relação com a deficiência da 21-hidroxilase.

Tabela 4: Comparação dos polimorfismos intergênicos dos alelos afetados e normais (dos portadores obrigatórios e doadores voluntários).

haplótipos	Polimorfismos	Alelos afetados	(%) afetados	Alelos normais	(%) normais	Alelos controles	(%) controles
1	<i>C4B</i> [5,4 kb]	37	32,7	48	40,3	70	36,1
2	<i>C4B</i> [6,0 kb]	53	47	43	36,2	69	35,6
3	<i>C4B</i> [5,4 kb] com <i>C4A/B</i> de 6,4 kb	-	-	1	0,8	-	-
4	<i>C4B</i> [5,4 kb] V281L	-	-	-	-	1	0,5
5	<i>C4B</i> [6,0 kb] V281L	-	-	-	-	1	0,5
6	<i>C4A/B</i> [6,4 kb] e <i>C4B</i> [5,4 kb]	-	-	1	0,8	-	-
7	Del. <i>CYP21P</i> + <i>C4B</i>	1	0,9	10	8,4	9	4,6
8	Del. <i>CYP21P</i> + <i>C4A</i>	-	-	1	0,8	-	-
9	Del. <i>CYP21P</i> com <i>C4A/B</i> [6,4 kb]	1	0,9	4	3,4	11	5,7
10	Dup. <i>CYP21P</i> + <i>C4B</i> [6,0 kb]	4	3,5	4	3,4	8	4,1
11	Dup. <i>CYP21P</i> + <i>C4B</i> [5,4 kb]+V281L	10	8,8	-	-	8	4,1
12	Dup. <i>CYP21P</i> + <i>C4B</i> [5,4 kb]	4	3,5	-	-	2	1,0
13	Dup. <i>CYP21P</i> + <i>C4B</i> [6,0 e 5,4 kb]	1	0,9	3	2,5	-	-
14	Dup. <i>CYP21</i> + <i>C4B</i> [5,4 kb]	-	-	-	-	11	5,7
15	Dup. <i>CYP21</i> + <i>C4B</i> [5,4 kb] Q318X	-	-	2	1,7	1	0,5
16	<i>C4B</i> raro de 3,9 kb	1	0,9	-	-	1	0,5
17	<i>CYP21</i> ou <i>CYP21P</i> de 5,6 kb	1	0,9	-	-	-	-
18	CV de <i>CYP21P</i> → <i>CYP21</i> [5,4 kb]	-	-	1	0,8	1	0,5
19	CV de <i>CYP21P</i> → <i>CYP21</i> [6,0 kb]	-	-	-	-	1	0,5
Total de alelos		113	100	119	100	194	100

cv: conversão gênica. Dup: duplicação gênica. Del: deleção gênica. Em cada linha está representado um haplótipo diferente. As mutações V281L e Q318X foram destacadas nestes polimorfismos para diferenciar as duplicações.

2. Análise das mutações pontuais

Paulino *et al.* (1999), utilizando a técnica de ASOH, estimaram as frequências das mutações pontuais no gene *CYP21* originárias do pseudogene *CYP21P*, responsáveis pela deficiência da 21-hidroxilase em 41 famílias.

No presente trabalho, foram analisadas as mutações pontuais em *CYP21* em 21 famílias adicionais utilizando-se PCR alelo-específico (ASO-PCR). A metodologia de (ASO-PCR) foi desenvolvida por Wilson *et al.* (1995a) para reduzir o tempo de análise do locus da 21-hidroxilase. Com este método, oito das mutações mais comuns encontradas no gene *CYP21* podem ser detectadas em gel de agarose, dispensando a marcação radioativa de oligonucleotídios, necessária em ASOH.

2.1. Ilustração dos resultados da análise

Um exemplo da análise de mutação pontual por ASO-PCR é mostrado aqui pelo estudo da família 105 (figura 13).



Figura 13: A) PCR alelo-específico para a mutação Sp2. Os números referem-se aos indivíduos estudados (1-pai, 2- mãe, 3- filho afetado), enquanto que as letras referem-se à variação do nucleotídeo na posição 656 e no "primer" alelo-específico utilizado; A e C indicam polimorfismo normal, G, mutação Sp2. C+, controle positivo. C-, controle negativo. L- marcador Ladder de 100 pb (Gibco-BRL). A seta à direita do gel indica a banda de 760 pb correspondente ao fragmento amplificado. B) PCR alelo-específico da mutação Q318X. Os números 1, 2 e 3 referem-se a pai, mãe e filho afetado respectivamente. C+, controles positivo. C-, controle negativo. N- reação normal, M- reação mutante. L- marcador 100 pb Ladder. 650 pb representa o tamanho da banda para mutação Q318X.

No intron 2 de *CYP21*, pode ocorrer a substituição de nucleotídeos, A ou C (polimorfismo neutro) por G (mutação Sp2) (Higashi *et al.*, 1988b). Portanto, três reações de PCR são necessárias para a sua determinação. Encontrou-se o pai homozigoto para o nucleotídeo normal A (A/A) e a mãe heterozigota para a mutação Sp2 (A/G). O filho afetado herdou o alelo A normal do pai e o alelo G mutante da mãe, sendo portanto heterozigoto para a mutação Sp2. O controle positivo utilizado no experimento é homozigoto para a mutação Sp2 (G/G), enquanto o controle negativo possui alelos com polimorfismos de A e C, ambos normais (**Figura 13 A**).

A mutação Q318X também foi encontrada na família 105. A **figura 13 B** mostra o estudo desta mutação, onde o pai se mostra heterozigoto, a mãe, homozigota normal e o filho afetado, heterozigoto. Assim, o filho apresenta a deficiência da 21-hidroxilase por possuir a mutação Sp2 herdada da mãe e a mutação Q318X herdada do pai.

Das oito mutações estudadas por ASO-PCR (Sp2, $\Delta 8$, I172N, V281L, Q318X, R356W, P30L e CL6), P30L e CL6 foram encontradas apenas nos alelos com deleção e conversão gênica, enquanto que as demais independem do tipo de mutação causadora da doença.

2.2. Investigação do ponto de recombinação nos alelos com deleção e conversão gênica

Nos eventos de deleção e conversão gênica geralmente ocorre a formação de um gene híbrido não funcional, com a porção 5' do pseudogene *CYP21P* e a porção 3' do gene *CYP21*. Dependendo do ponto de recombinação, o gene híbrido pode apresentar porções variáveis pertencentes ao pseudogene *CYP21P* e ao gene *CYP21*, como se encontra ilustrado na **figura 4**. Para mapear as regiões pertencentes ao gene e pseudogene nos híbridos *CYP21P/CYP21* de indivíduos com deleção e conversão gênica, foi utilizada a técnica de ASO-PCR. Sete pares de “primers sense”, normais e mutantes, foram utilizados em conjunto com dois “primers antissense” ancoradores específicos de *CYP21*, nas reações de PCR (**figura 14**). Os “primers sense” normais detectam seqüências do *CYP21*, enquanto que as respectivas versões mutantes detectam mutações pontuais mais frequentes provenientes do *CYP21P*. A **figura 15** mostra os diferentes pontos de quebra encontrados nos alelos com conversão e deleção gênica dos indivíduos afetados, e a **tabela 5** mostra o

número e o tipo de conversão/deleção gênica apresentados pelos diferentes alelos.

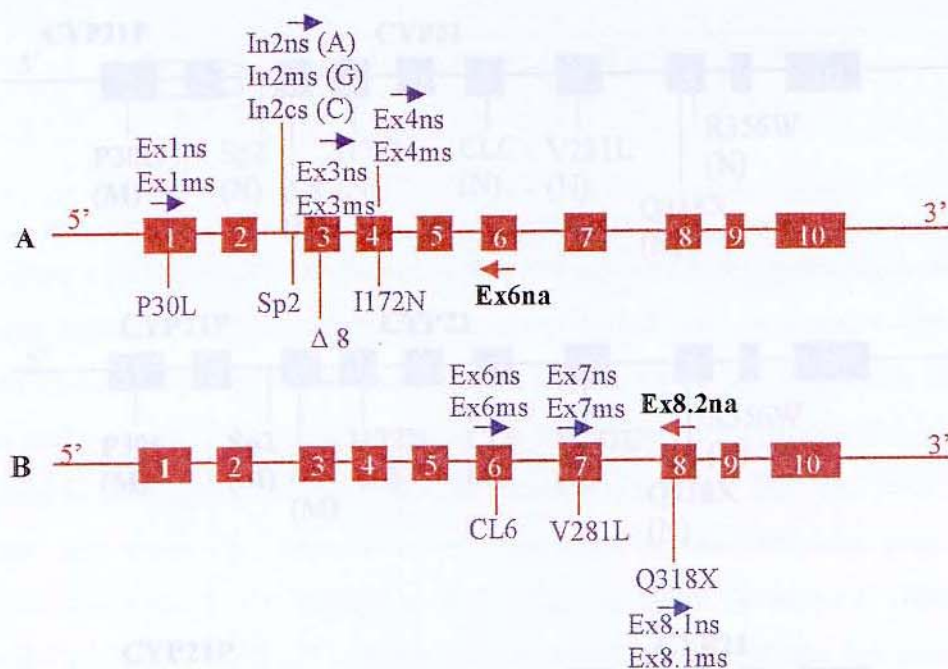


Figura 14: Estratégia do PCR alelo-específico para a identificação das mutações pontuais nos alelos híbridos com deleção e conversão gênica. A- alelos com conversão e deleção até o éxon 4; B- alelos com conversão e deleção até a primeira mutação do éxon 8. Os quadrados representam os éxons e a linha os íntrons. As setas indicam o sentido dos “primers”, a= “antissense” e s= “sense”. Os “primers” estão mostrados sobre as setas e as mutações abaixo de cada éxon.

Foram encontrados 10 alelos com deleção, no total de 113 estudados. Destes, foram caracterizadas deleções cujos pontos de recombinação na formação do gene híbrido se situam entre as mutações P30L e Sp2, Δ8 e I172N e CL6 e V281L (**tabela 5** e **figura 16 A-C**, respectivamente). Conversões gênicas foram encontradas em 15 alelos e caracterizadas por eventos que se estendem até algum ponto entre as mutações P30L e Sp2, Δ8 e I172N, CL6 e V281L e entre V281L e Q318X (**tabela 5** e **figura 15 A-D**, respectivamente). Os 3 alelos com conversão gênica classificados como no esquema C (**figura 15**, **tabela 4**) foram encontrados em 2 famílias distintas (50 e 59) e em um indivíduo isolado (100Ya1). Estes alelos não foram analisados quanto às mutações V281L, Q318X e R356W, e portanto, a localização exata do ponto de recombinação além da mutação CL6, não pode ser determinada.

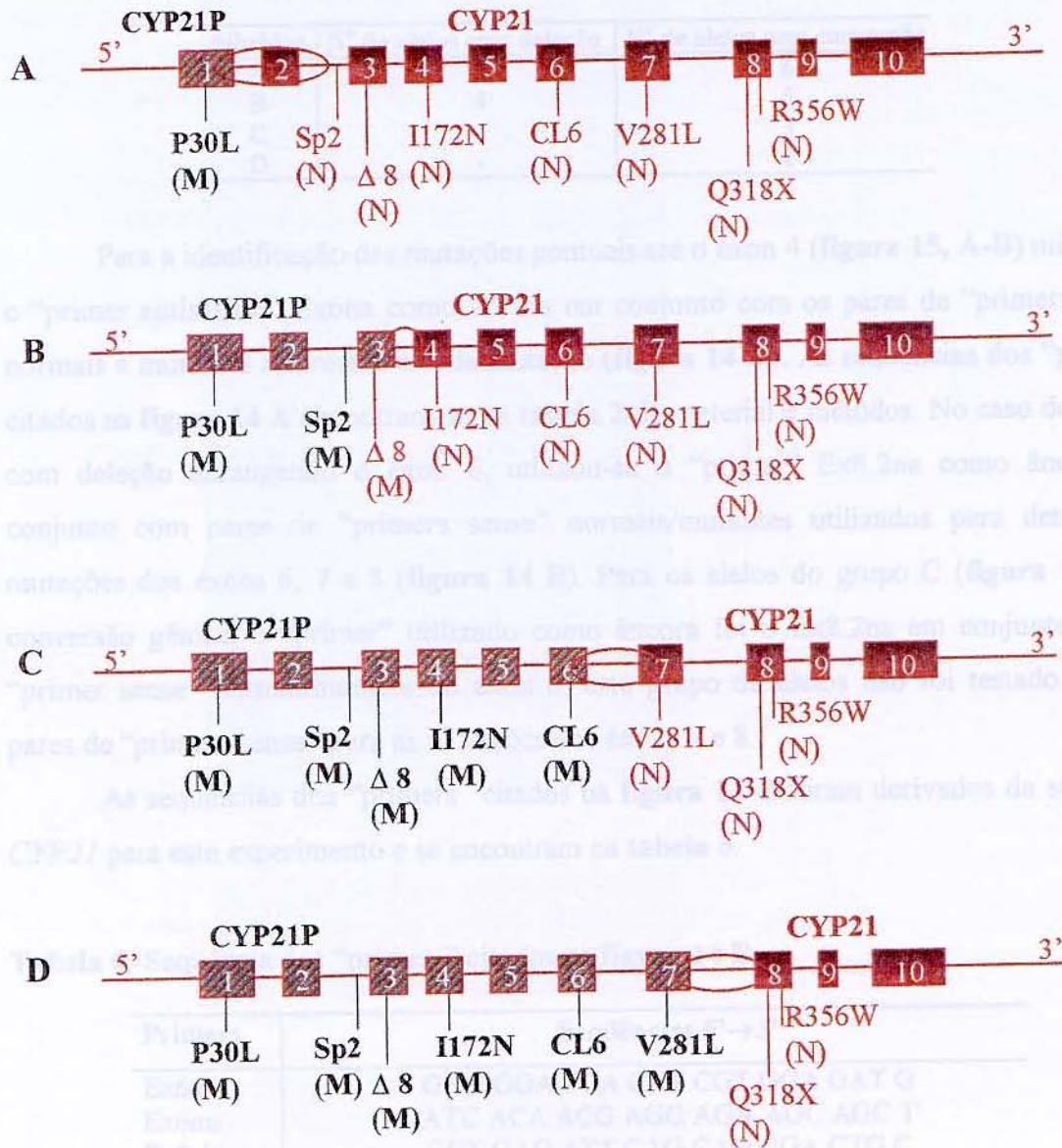


Figura 15: Pontos de quebra entre os genes *CYP21P* e *CYP21* dos híbridos formados nos eventos de deleção e conversão gênica. Os quadrados representam os éxons e as linhas os introns. O gene *CYP21* normal possui aproximadamente 3,5 kb e é dividido em 10 éxons. Os quadrados listrados representam seqüências do pseudogene *CYP21P* e os quadrados sombreados seqüências do gene *CYP21*. As mutações testadas estão representadas abaixo de cada éxon. A letra M indica presença da mutação e a letra N, alelo normal. O círculo engloba a área do ponto de quebra, que permanece indeterminada. As letras de A-D representam os diferentes genes híbridos com seus respectivos pontos de quebra encontrados nos indivíduos estudados.

Tabela 5: Número de alelos com conversão/deleção gênica divididos entre os diferentes híbridos representados na **figura 15**.

híbridos	Nº de alelos com deleção	Nº de alelos com conversão
A	2	6
B	4	5
C	4	3
D	-	1

Para a identificação das mutações pontuais até o éxon 4 (**figura 15, A-B**) utilizou-se o “primer antissense” Ex6na como âncora em conjunto com os pares de “primers sense” normais e mutantes referentes a cada mutação (**figura 14 A**). As seqüências dos “primers” citados na **figura 14 A** encontram-se na **tabela 2** de material e métodos. No caso dos alelos com deleção abrangendo o éxon 6, utilizou-se o “primer” Ex8.2na como âncora em conjunto com pares de “primers sense” normais/mutantes utilizados para detectar as mutações dos éxons 6, 7 e 8 (**figura 14 B**). Para os alelos do grupo C (**figura 15**) com conversão gênica, o “primer” utilizado como âncora foi o Ex8.2na em conjunto com o “primer sense” normal/mutante do éxon 6; este grupo de alelos não foi testado com os pares de “primers sense” para as mutações dos éxons 7 e 8.

As seqüências dos “primers” citados na **figura 14 B** foram derivados da seqüência *CYP21* para este experimento e se encontram na **tabela 6**.

Tabela 6: Seqüência dos “primers” citados na **figura 14 B**.

Primers	Seqüências 5'→3'
Ex6ns	GAG GGA TCA CAT CGT GGA GAT G
Ex6ms	ATC ACA ACG AGG AGA AGC AGC T
Ex8.1ns	CCT GAG ATT CAG CAG CGA CTG C
Ex8.1ms	CCT GAG ATT CAG CAG CGA CTG T
Ex7ns	ACA GCT CCT GGA AGG GCA CG
Ex7ms	ACA GCT CCT GGA AGG GCA CT
Exn8.2a	CTA AGG GCA CAA CGG GCC G

As seqüências dos “primers” Ex6ns e Ex8.2na também estão mostradas na **tabela 2**

Exemplos de análises do ponto de quebra dos alelos com conversão e deleção por PCR alelo específico são mostrados na **figura 16** e **figura 17**, respectivamente.

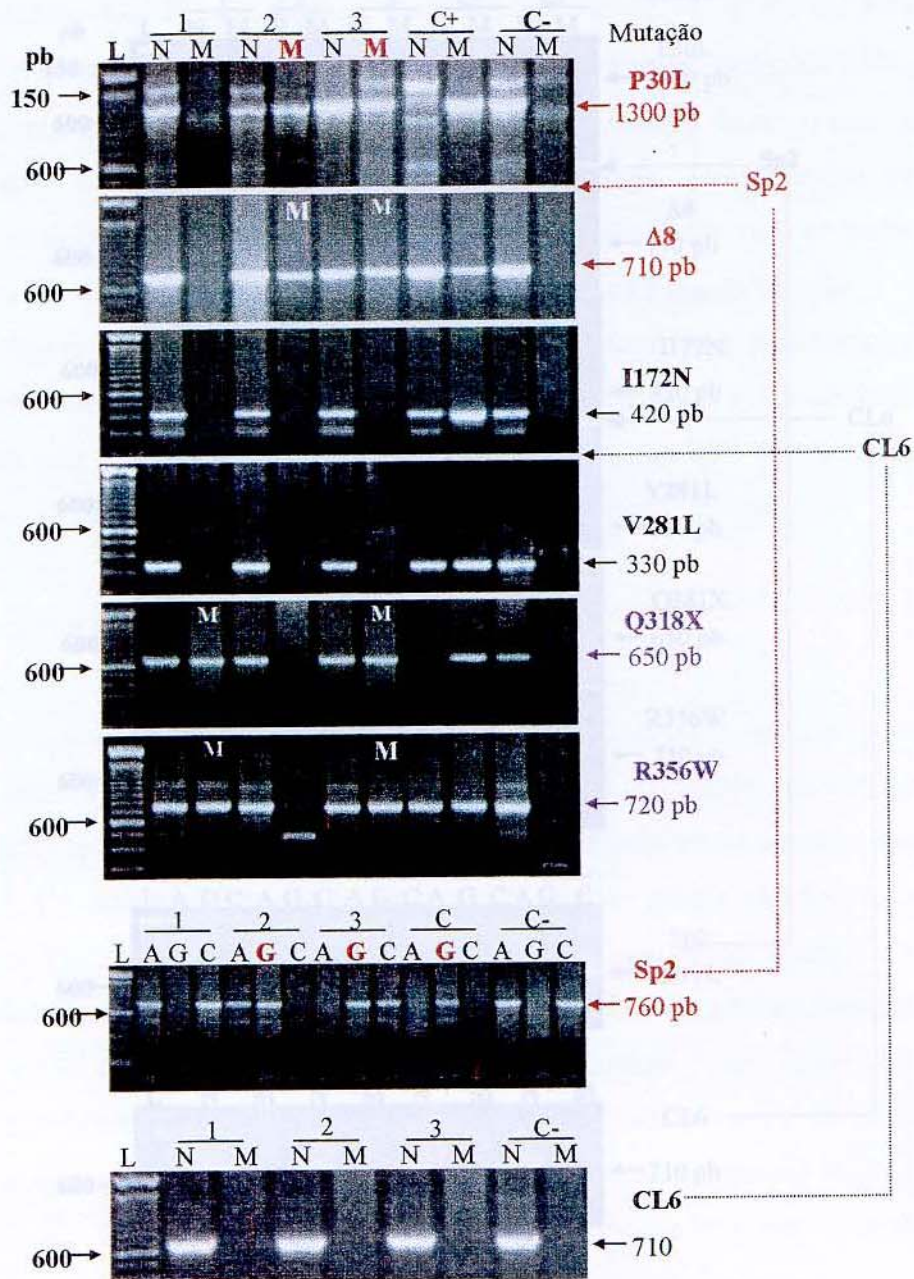


Figura 16: Análise do ponto de quebra por PCR alelo-específico de um alelo afetado com conversão gênica, estendendo-se até a mutação $\Delta 8$, encontrado na família 16. Os números 1, 2 e 3 referem-se ao pai, mãe e filha afetada respectivamente. C+, controle positivo. C-, controle negativo. N- normal, M- mutante. As letras A e C indicam reação normal para mutação Sp2 e polimorfismo para a variação na posição 656. G, mutação Sp2. O controle positivo utilizado para o estudo das mutações Sp2 e Q318X, é homozigoto para as mesmas, enquanto que para as demais mutações é heterozigoto. L- marcador 100 pb Ladder. As mutações testadas e o tamanho esperado das bandas estão indicados. As mutações estão sequencialmente na ordem dos éxons do gene *CYP21*.

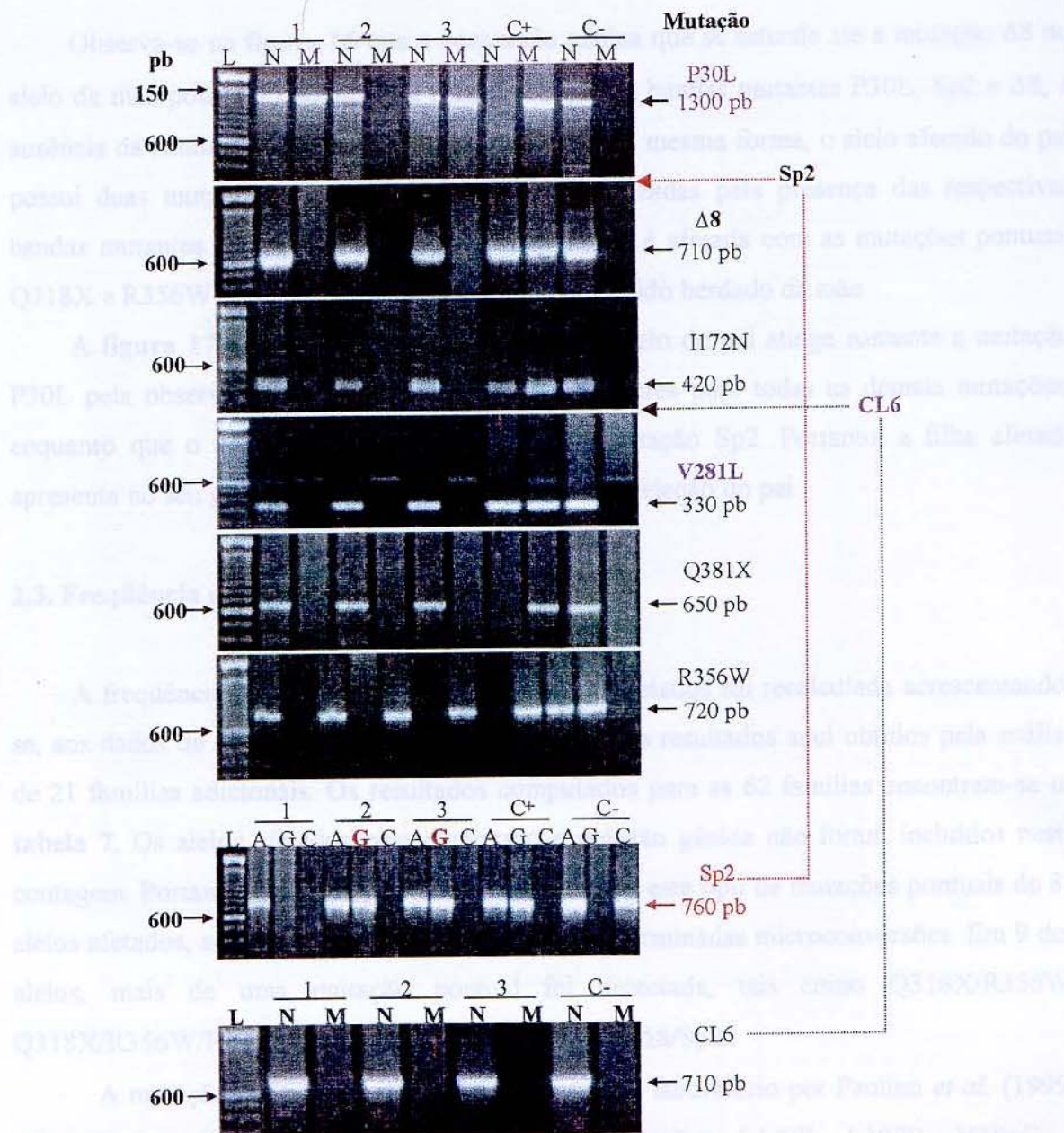


Figura 17: Análise do ponto de quebra por PCR alelo-específico de um alelo afetado com deleção gênica, atingindo apenas a mutação P30L, encontrada na família 23. Os números 1, 2 e 3 referem-se ao pai, mãe e filha afetada respectivamente. C+, controle positivo. C-, controle negativo. N- normal, M- mutante. As letras A e C indicam reação normal para mutação Sp2 e polimorfismo para a variação na posição 656. G, mutação Sp2. O controle positivo é homozigoto para as mutações P30L e Q318X, e heterozigoto para as demais. L- marcador 100 pb Ladder. As mutações testadas e o tamanho esperado das bandas estão indicados. As mutações estão sequencialmente na ordem dos éxons do gene *CYP21*.

Observa-se na **figura 16** que a conversão gênica que se estende até a mutação $\Delta 8$ no alelo da mãe pode ser determinada pela presença das bandas mutantes P30L, Sp2 e $\Delta 8$, e ausência da banda mutante para a mutação I172N. Da mesma forma, o alelo afetado do pai possui duas mutações (Q318X e R356W) caracterizadas pela presença das respectivas bandas mutantes. Desse modo, nesta família, a filha é afetada com as mutações pontuais Q318X e R356W herdadas do pai e pelo alelo convertido herdado da mãe.

A **figura 17** mostra que a deleção gênica no alelo do pai atinge somente a mutação P30L pela observação da ausência de bandas mutantes para todas as demais mutações, enquanto que o alelo da mãe é afetado com a mutação Sp2. Portanto, a filha afetada apresenta no seu genótipo a mutação Sp2 da mãe e a deleção do pai.

2.3. Frequência das microconversões

A frequência das microconversões nos alelos afetados foi recalculada acrescentando-se, aos dados de 41 famílias (Paulino *et al.*, 1999), os resultados aqui obtidos pela análise de 21 famílias adicionais. Os resultados computados para as 62 famílias encontram-se na **tabela 7**. Os alelos afetados com conversão e deleção gênica não foram incluídos nesta contagem. Portanto, foram computados os dados para este tipo de mutações pontuais de 88 alelos afetados, sendo que em 6 deles, não foram determinadas microconversões. Em 9 dos alelos, mais de uma mutação pontual foi detectada, tais como Q318X/R356W, Q318X/R356W/F306+, V281L/Sp2, V281L/I172N e $\Delta 8$ /Sp2.

A mutação F306+T foi determinada em nosso laboratório por Paulino *et al.* (1999) pela técnica de ASOH, enquanto que as mutações L142P, L107P, H38+C e IVS2AS,A→G,-2 foram caracterizadas por Lau (2000) através de sequenciamento direto do gene *CYP21*. Esses dados estão sendo utilizados neste trabalho para uma melhor caracterização dos haplótipos.

3. Análise do polimorfismo de A→C na posição 656

Da mesma forma que as famílias foram analisadas para a mutação Sp2, os polimorfismos de A→C na posição 656 também foram determinados. Esses dados foram

utilizados para auxiliar a classificação dos haplótipos. Foram excluídos da contagem os alelos com deleção e conversão gênica com o ponto de quebra além da mutação prolina (P30L).

Tabela 7: Frequências das mutações pontuais encontradas nos alelos afetados.

Mutações pontuais	ASOH e ASO-PCR	
	Nº de alelos	Frequência (%)
Sp2	27	30,7
I172N	19	21,6
Q318X	9	10,2
R356W	5	5,7
Q318X/R356W	3	3,5
Q318X/R356W/F308+	1	1,1
V281L	4	4,5
V281L/Sp2	3	3,5
V281L/I172N	1	1,1
F306+T	3	3,5
Δ8	2	2,3
Δ8/Sp2	1	1,1
L142P	1	1,1
L107P	1	1,1
H38+C	1	1,1
IVS2AS,A→G,-2	1	1,1
ND	6	6,8
Total alelos afetados	88	100

A **tabela 8** mostra as frequências encontradas nos alelos afetados e normais para os nucleotídeos A, C e G na posição 656.

Tabela 8: Frequência do polimorfismo A→C na posição 656 nos alelos afetados e normais.

Polimorfismos	Nº alelos afetados	Frequência (%)	Nº alelos normais	Frequência (%)
656 A	37	38,5	82	71,3
656 C	27	28,2	33	28,7
656 A/C*	-	-	2	1,7
656G	31	32,3	-	-
não determinados	1	1,0	-	-
Total de alelos	96	100	117	100

*656 A/C, duas bases polimórficas em um alelo duplicado com duas cópias do *CYP21*.

4-Análise do Polimorfismo de leucinas

O polimorfismo de leucina no éxon 1 também foi utilizado como um marcador para a caracterização dos haplótipos. Nesse polimorfismo, os alelos apresentam quatro (Leu-) ou cinco (Leu+) códons CTG para leucina no éxon 1, entre as posições 6 a 10 e 6 a 11 da sequência do gene *CYP21*, respectivamente (Rodrigues *et al.*, 1987; Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986).

Duas reações de PCR foram realizadas para determinar os polimorfismos de 107 alelos. Na primeira reação, amplifica-se um fragmento de DNA de aproximadamente 790 bp específico de *CYP21*, utilizando-se os “primers” ProEx1s e Ex3na. Esse fragmento é utilizado como molde em uma segunda reação “nested” usando-se os “primers” ProEx1s-Ex1a, os quais amplificam um fragmento de 128 pb no caso de 4 leucinas e 131 pb no caso de 5 leucinas. O polimorfismo de leucinas (diferença de três pares de base) foi analisado separando-se o produto de PCR da segunda reação em gel de poliacrilamida. Um exemplo na análise deste polimorfismo é mostrado na **figura 18**.

Indivíduos heterozigotos para o polimorfismo apresentam 5 e 4 códons para leucinas nos alelos, e portanto apresentam duas bandas no gel de poliacrilamida (**figura 18**). O indivíduo heterozigoto controle Leu+/Leu- foi determinado previamente por seqüenciamento direto do éxon 1 (Lau, 2000). Na família 70 (linhas 1a, 2a e 3a, **figura 18**), o pai (linha 1a) é homozigoto Leu+/Leu+. Por outro lado, a mãe (linha 2a) possui deleção de *CYP21* (análise de “Southern blot”); neste caso somente é observado um alelo quanto ao polimorfismo de Leucina, correspondente ao alelo normal (Leu+/----). Portanto, o padrão de bandas do filho afetado (linha 3a) refere-se apenas ao polimorfismo de leucina herdado do pai. Deste modo, o filho afetado é hemizigoto para leucina (Leu+/----). Na família 93 (linhas 1b, 2b e 3b, **figura 19**), o pai (linha 1b), a mãe (linha 2b) e a filha afetada (linha 3b) são homozigotos para essa variação (Leu-/Leu-). Na família 92 (linhas 1c, 2c e 3c, **figura 19**), o pai (linha 1c) apresenta 5 códons nos dois alelos (Leu+/Leu+) enquanto a mãe (linha 2c) é homozigota para 4 códons (Leu-/Leu-). A filha afetada (linha 3c) é, portanto heterozigota (Leu+/Leu-). Os levantamentos da frequência do polimorfismo de leucinas nos alelos afetados e normais encontram-se na **tabela 9**.

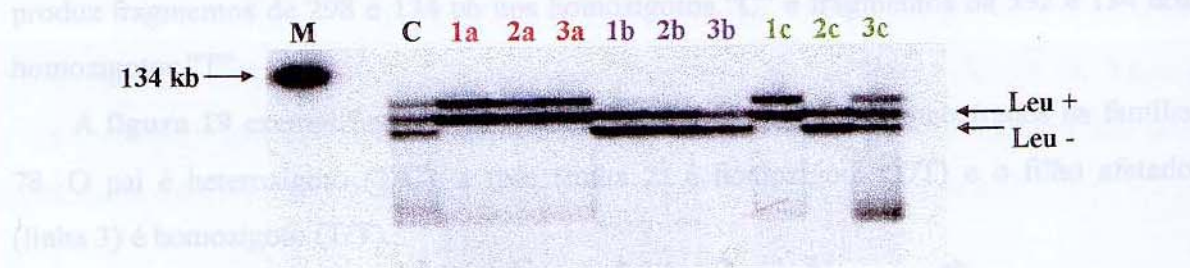


Figura 18: Detecção do polimorfismo de leucinas em gel de poliacrilamida. As linhas 1, 2 e 3 representam pai, mãe e filho/a afetado/a das famílias estudadas. As letras a, b e c representam os indivíduos das famílias 70, 93 e 92 respectivamente. M- marcador ladder de 1 kb. C- controle heterozigoto leucinas (Leu+/Leu-). Leu+ = 5 códons para leucinas, Leu- = 4 códons para leucinas.

O polimorfismo de leucinas nos alelos com a mutação pontual $\Delta 8$ não foi determinado ($n= 3$). O “primer” Ex3na utilizado para o estudo desse polimorfismo não amplifica os alelos com a mutação $\Delta 8$, pois se anela somente aos alelos normais. Permaneceram indeterminados também os alelos de deleção e conversão gênica com o ponto de quebra além da mutação P30L ($n= 16$).

Tabela 9: Frequência do polimorfismo de Leu encontrada nos alelos afetados e normais.

Polimorfismos	Nº alelos afetados	Frequência (%)	Nº alelos normais	Frequência (%)
Leu + (5 códons)	63	56,0	66	56,4
Leu – (4 códons)	18	16,0	31	26,5
Não determinados	32	28,0	20	17,1
Total	113	100	117	100

5. Polimorfismo de T→C na posição 395

Um outro polimorfismo utilizado na identificação e caracterização dos alelos afetados foi o polimorfismo de T→C, localizado dentro do íntron 2, na posição nucleotídica 395 a partir do códon ATG de início de transcrição do gene (Higashi *et al.*, 1986). O fragmento de 790 pb (amplificado com os “primers” ProEx1s e Ex3na) descrito acima, contendo o polimorfismo 395T→C, cria um sítio *Msp* I. Portanto, quando digerido com esta enzima

produz fragmentos de 298 e 134 pb nos homozigotos "C" e fragmentos de 592 e 134 nos homozigotos "T".

A **figura 19** exemplifica a análise do polimorfismo 395T→C encontrados na família 78. O pai é heterozigoto (T/C), a mãe (linha 2) é homozigota (T/T) e o filho afetado (linha 3) é homozigoto (T/T).

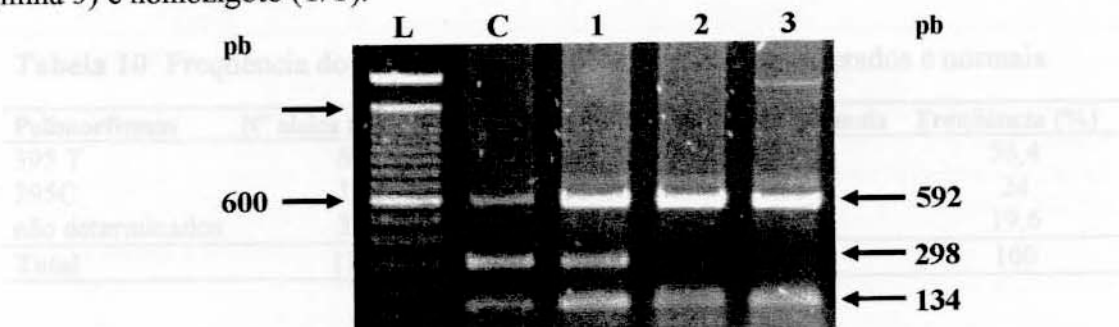


Figura 19: Análise do polimorfismo 395T→C por digestão do fragmento ProEx1s/Ex3na (790 bp) com *Msp* I. Os números 1, 2 e 3 indicam pai, mãe e filho afetado respectivamente. C, controle heterozigoto (T/C). M, marcador ladder de 100 pb. Os números à direita representam o tamanho dos fragmentos de restrição gerados.

Outro exemplo do polimorfismo 395T→C é mostrado na **figura 20** pela análise da família 91. Neste caso, o alelo da mãe é afetado por conversão gênica e portanto não é amplificado. Assim, o alelo da mãe (linha 2) analisado refere-se apenas ao alelo normal "T" (T/--). O pai (linha 1) é homozigoto "C" (C/C) e o filho afetado (linha 3) apresenta um alelo "C" do pai e herdou o alelo convertido da mãe, portanto não apresenta o alelo da mãe, sendo hemizigoto (C/--).

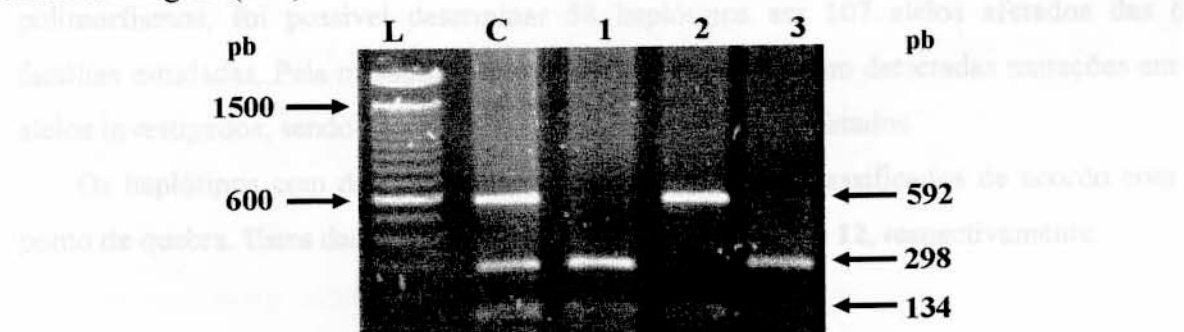


Figura 20: Análise da digestão do produto de PCR ProEx1s-Ex3na com *Msp* I. Os números 1, 2 e 3 indicam pai, mãe e filho afetado respectivamente. C, controle heterozigoto (T/C). M, marcador ladder de 100 pb. Os números a direita representam o tamanho dos fragmentos de restrição gerados pela enzima *Msp* I.

Os alelos com a mutação $\Delta 8$, deleção e conversão gênica com ponto de quebra além da mutação P30L, que permaneceram indeterminados no polimorfismo de leucinas, também permanecem indeterminados no polimorfismo 395T→C. A frequência dos alelos afetados e normais com o polimorfismo 395T→C encontram-se na **tabela 10**.

Tabela 10: Frequência do polimorfismo 395T→C nos alelos afetados e normais.

Polimorfismos	Nº alelos afetados	Frequência (%)	Nº alelos normais	Frequência (%)
395 T	60	54	66	56,4
395C	18	16	28	24
não determinados	35	30	23	19,6
Total	113	100	117	100

6. Análise dos haplótipos

Os alelos afetados foram caracterizados pela técnica de “Southern blotting” com a enzima *Taq* I e hibridização com as sondas de *C4* e *CYP21*, possibilitando a triagem de conversões, deleções e duplicações gênicas no “cluster” gênico *CYP21/C4*. Os alelos afetados também foram analisados pela técnica de PCR alelo-específico, pela qual foram investigadas 8 mutações pontuais recorrentes, além de três polimorfismos intragênicos (polimorfismo de leucinas, de 395T→C (posição) e de 656A→C). Em uma análise conjunta incluindo todos os resultados de mutações pontuais (ASOH e ASO-PCR), polimorfismo de C4B, duplicações e deleções das unidades gênicas *CYP21/C4* e os 3 polimorfismos, foi possível determinar 58 haplótipos em 107 alelos afetados das 62 famílias estudadas. Pela metodologia aqui empregada não foram detectadas mutações em 6 alelos investigados, sendo excluídos da contagem dos alelos afetados.

Os haplótipos com deleção e conversão gênica foram classificados de acordo com o ponto de quebra. Estes dados estão mostrados nas **tabelas 11 e 12**, respectivamente.

Tabela 11: Haplótipos afetados com deleção gênica de 30 kb.

haplótipos	Polimorfismos				Ponto de quebra (Figura 15)	Nº alelos	Frequência (%)
	Leu	³⁹⁵ T/C	⁶⁵⁶ A/C→G	• <i>C4B</i>			
1	5	C	A	-	híbrido A	2	20
2	-	-	G	-	híbrido B	4	40
3	-	-	G	-	híbrido C	3	30
4	-	-	-	6,4	híbrido C	1	10
Total de alelos						10	100

Em cada linha está representado um tipo de haplótipo. Deleção de 30 kb, refere-se ao gene híbrido *CYP21P/CYP21*. Leu, polimorfismo para 5 e 4 códon de leucinas. T/C representa o polimorfismo no íntron 2 na posição nucleotídica 395. A/C representa o polimorfismo na posição nucleotídica 656. A letra G representa a base da mutação Sp2. O fragmento de 6,4 kb representa o híbrido *C4A/C4B*. •*Taq I* RFLP de *C4B*.

Tabela 12: Haplótipos afetados com conversão gênica em larga escala.

haplótipos	Polimorfismos				Duplicação <i>CYP21P/C4B</i>	Ponto de quebra Figura 15	Nº alelos	Frequência (%)
	Leu	T/C	A/C→G	• <i>C4B</i>				
1	5	T	A	6,0	-	híbrido A	5	33,3
2	5	T	A	5,4	-	híbrido A	1	6,7
3	-	-	G	6,0	-	híbrido B	1	6,7
4	-	-	G	5,4	-	híbrido B	2	13,2
5	-	-	G	5,4	5,4	híbrido B	1	6,7
6	-	-	G	5,4	5,4	híbrido B* + V281L	1	6,7
7	-	-	G	5,4	5,4	híbrido D	1	6,7
8	-	-	G	6,0	-	híbrido C	3	20,0
Total de alelos							15	100

Em cada linha está representado um tipo de haplótipo. Conversão gênica em larga escala refere-se à alteração envolvendo o sítio de restrição de *Taq I*. Leu, polimorfismo para 5 e 4 códon de leucinas. T/C representa o polimorfismo no íntron 2 na posição nucleotídica 395. A/C representa o polimorfismo na posição nucleotídica 656. A letra G representa a base da mutação Sp2. Dup: duplicação de *CYP21P+C4B*, * haplótipo com conversão gênica até a mutação 8 e duplicação de *CYP21P* e *C4B* de 5,4 com a mutação V281L. • *Taq I* RFLP *C4B*.

Os haplótipos afetados com as mutações pontuais Sp2, I172N, Q318X, Q318X/R356W, R356W, V281L, Δ8, ΔT (F306+T) e mutações raras estão representados nas tabelas 13 a 21, respectivamente.

Tabela 13: Representação dos haplótipos afetados com a mutação Sp2.

haplótipos	Polimorfismos				Deleção de <i>CYP21P/C4B</i>	Nº alelos	Frequência (%)
	Leu	³⁹⁵ T/C	⁶⁵⁶ A/C→G	<i>Taq</i> I RFLP de <i>C4B</i>			
1	4	T	G	6,0	-	5	18,5
2	5	T	G	6,0	-	3	11,1
3	5	C	G	6,0	-	5	18,5
4	5	-	G	6,0	-	1	3,7
5	5	T	G	6,4 (<i>C4A/C4B</i>)	+	1	3,7
6	5	T	G	5,4	-	9	33,4
7	4	T	G	5,4	-	1	3,7
8	5	-	G	5,4	-	1	3,7
9	5	T	G	-	+	1	3,7
Total de alelos						27	100

Em cada linha está representado um tipo de haplótipo. Leu, polimorfismo para 5 e 4 códon de leucinas. T/C representa o polimorfismo no intron 2 na posição nucleotídica 395. A/C representa o polimorfismo na posição nucleotídica 656. A letra G representa a base da mutação Sp2. O fragmento de 6,4 kb representa o híbrido *C4A/C4B*. Del representa a deleção de *CYP21P/C4B*.

Tabela 14: Representação dos haplótipos afetados com a mutação I172N.

haplótipos	Polimorfismos				Duplicação de <i>CYP21P/C4B</i>	Nº alelos	Frequência (%)
	Leu	³⁹⁵ T/C	⁶⁵⁶ A/C	• <i>C4B</i>			
1	4	C	C	6,0	-	1	5,3
2	-	-	C	6,0	-	4	20,0
3	5	C	C	6,0	-	1	5,3
4	5	T	C	6,0	-	1	5,3
5	4	T	C	6,0	-	2	10,5
6	4	T	A	6,0	-	2	10,5
7	4	T	A	6,0	+	1	5,3
8	5	C	A	6,0	-	2	10,5
9	5	T	A	6,0	-	1	5,3
10	5	T	C	5,4	-	1	5,3
11	-	-	C	5,4	-	2	10,5
12	5	T	A	5,4	-	1	5,3
Total de alelos						19	100

Em cada linha está representado um tipo de haplótipo. Leu, polimorfismo para 5 e 4 códon de leucinas. T/C representa o polimorfismo no intron 2 na posição nucleotídica 395. A/C representa o polimorfismo na posição nucleotídica 656. • *Taq* I RFLP de *C4B*.

Tabela 15: Representação dos haplótipos afetados com a mutação Q318X.

haplótipos	Polimorfismos				Duplicação de CYP21P/C4B	Nº alelos	Frequência (%)
	Leu	³⁹⁵ T/C	⁶⁵⁶ A/C	•C4B			
1	5	-	C	5,4	-	1	11,1
2	5	T	A	5,4	+	2	22,2
3	5	T	A	5,4	-	2	22,2
4	5	T	A	6,0/5,4	+	1	11,1
5	4	T	A	6,0	-	1	11,1
6	5	C	A	6,0	-	1	11,1
7	-	-	C	6,0	+	1	11,1
Total de alelos						9	100

Em cada linha está representado um tipo de haplótipo. Leu, polimorfismo para 5 e 4 códon de leucinas. T/C representa o polimorfismo no íntron 2 na posição nucleotídica 395. A/C representa o polimorfismo na posição nucleotídica 656. • *Taq* I RFLP de *C4B*.

Tabela 16: Representação dos haplótipos afetados com as mutações Q318X/R356W.

haplótipos	Polimorfismos				Duplicação de CYP21P/C4B	Mutação 2 ^{ária}	Nº alelos	Frequência (%)
	Leu	³⁹⁵ T/C	⁶⁵⁶ A/C	•C4B				
1	-	-	-	5,4	-	-	1	25,0
2	-	-	C	5,4	-	-	1	25,0
3	5	T	C	5,4	-	-	1	25,0
4	5	T	C	5,4	+	F306+T	1	25,0
Total de alelos							4	100

Em cada linha está representado um tipo de haplótipo. Leu, polimorfismo para 5 e 4 códon de leucinas. T/C representa o polimorfismo no íntron 2 na posição nucleotídica 395. A/C representa o polimorfismo na posição nucleotídica 656. • *Taq* I RFLP de *C4B*.

Tabela 17: Representação dos haplótipos afetados com a mutação R356W.

haplótipos	Polimorfismos				Duplicação de CYP21P/C4B	Nº alelos	Frequência (%)
	Leu	³⁹⁵ T/C	⁶⁵⁶ A/C	•C4B			
1	4	T	C	3,9	-	1	20,0
2	5	C	A	6,0	-	2	40,0
3	4	T	A	6,0	+	2	40,0
Total de alelos						5	100

Em cada linha está representado um tipo de haplótipo. Leu, polimorfismo para 5 e 4 códon de leucinas. T/C representa o polimorfismo no íntron 2 na posição nucleotídica 395. A/C representa o polimorfismo na posição nucleotídica 656. • *Taq* I RFLP de *C4B*.

Tabela 18: Representação dos haplótipos afetados com a mutação V218L.

haplótipos	Polimorfismos				Duplicação de CYP21P/C4B	Mutação 2 ^{ária}	Nº alelos	Frequência (%)
	Leu	³⁹⁵ T/C	⁶⁵⁶ A/C→G	•C4B				
1	5	T	G	5,4	+	Sp2	3	37,5
2	5	T	A	5,4	+	-	4	50,0
3	5	T	A	5,4	+	I172L	1	12,5
Total de alelos							8	100

Em cada linha está representado um tipo de haplótipo. Leu, polimorfismo para 5 e 4 códons de leucinas. T/C representa o polimorfismo no íntron 2 na posição nucleotídica 395. A/C representa o polimorfismo na posição nucleotídica 656 e G representa a base da mutação Sp2.

• *Taq* I RFLP C4B.

Tabela 19: Representação dos haplótipos afetados com a mutação Δ8.

haplótipos	Polimorfismos				Mutação 2 ^{ária}	Nº alelos	Frequência (%)
	Leu	³⁹⁵ T/C	⁶⁵⁶ A/C→G	•C4B			
1	-	-	G	5,4	Sp2	1	33,3
2	-	-	A	6,0	-	2	66,7
Total de alelos						3	100

Em cada linha está representado um tipo de haplótipo. Leu, polimorfismo para 5 e 4 códons de leucinas. T/C representa o polimorfismo no íntron 2 na posição nucleotídica 395. A/C representa o polimorfismo na posição nucleotídica 656. A letra G representa a base da mutação Sp2. • *Taq* I RFLP de C4B.

Tabela 20: Representação dos haplótipos afetados com a mutação ΔT (F306+T).

haplótipos	Polimorfismos				No alelos	Frequência (%)
	Leu	³⁹⁵ T/C	⁶⁵⁶ A/C	•C4B		
1	5	T	A	5,4	1	33,3
2	5	C	A	6,0	2	66,7
Total de alelos					3	100

Em cada linha está representado um tipo de haplótipo. Leu, polimorfismo para 5 e 4 códons de leucinas. T/C representa o polimorfismo no íntron 2 na posição nucleotídica 395. A/C representa o polimorfismo na posição nucleotídica 656. • *Taq* I RFLP de C4B.

Tabela 21: Representação dos haplótipos afetados com as mutações raras.

haplótipos	Polimorfismos				Mutação rara	Nº alelos
	Leu	³⁹⁵ T/C	⁶⁵⁶ A/C	•C4B		
1	-	T	C	5,4	L143P	1
2	5	T	C	5,4	L107R	1
3	5	C	A	6,0	IVS2AS,A→G,-2	1
4	4	T	C	6,0	H28C+	1
Total de alelos						4

Em cada linha está representado um tipo de haplótipo. Leu, polimorfismo para 5 e 4 códons de leucinas. T/C representa o polimorfismo no íntron 2 na posição nucleotídica 395. A/C representa o polimorfismo na posição nucleotídica 656. • *Taq* I RFLP de C4B. Foram classificadas como mutações raras, aquelas mutações que não são provenientes do CYP21P. Essas mutações raras foram determinadas por Lau (2000).

Um resumo das **tabelas 11 a 21** está representado na **tabela 22** que mostra o número total de alelos e haplótipos afetados encontrados para cada mutação.

Tabela 22: Resumo do número de alelos e haplótipos afetados.

Mutação no <i>CYP21</i>	Nº alelos	Nº haplótipos
Deleção de <i>CYP21</i>	10	4
<i>cv CYP21</i> → <i>P</i>	15	8
Sp2	27	9
I172N	19	12
Q318X	9	7
V281L	8	3
R356W	5	3
Q318X/R356W	4	4
Δ8	3	2
F306+T	3	2
L107R	1	1
L142P	1	1
H28+C	1	1
IVS2AS, A→G, -2	1	1
total de mutações	107	58 haplótipos

A frequência dos alelos normais das 62 famílias analisadas também foi determinada, somando um total de 119 diferentes alelos (**tabela 23**). Foram considerados alelos normais aqueles não relacionados com o fenótipo doente, presentes nos heterozigotos obrigatórios (pais dos indivíduos afetados). Os alelos normais foram caracterizados com a mesma metodologia utilizada para determinar os alelos afetados. Dois alelos normais dos heterozigotos obrigatórios permaneceram indeterminados e não foram incluídos na contagem alélica.

Uma amostragem de 100 indivíduos controles (sem relação com as famílias afetadas, sendo 4 aparentados entre si) foi avaliada quanto à variabilidade numérica dos genes no “cluster” *CYP21/C4*, ao RFLP de *C4B* e ao grau de heterozigose para a mutação V281L, ligada à forma tardia (**tabela 24**). Os indivíduos controles não foram estudados quanto aos polimorfismos Leu (éxon 1), T→C (na posição nucleotídica 395) e A→C (na posição nucleotídica 656).

Tabela 23. Frequência dos alelos e haplótipos não afetados nos heterozigotos obrigatórios.

Polimorfismos					Mutação <i>CYP21P</i> / <i>CYP21</i>	Duplicação e/ou deleção	Nº alelos	Frequência (%)
haplótipos	Leu	T/C	A/C	•C4B				
1	5	C	A	6,0	-	-	10	8,6
2	5	C	A	5,4	-	-	9	8,0
3	5	C	C	5,4	-	-	5	5,0
4	-	-	C	6,0	-	-	8	6,9
5	5	T	A	5,4	-	-	23	19,7
6	5	T	A	6,0	-	-	4	3,4
7	-	-	C	5,4	-	-	4	3,4
8	-	T	C	5,4	-	-	2	1,7
9	5	-	A	5,4	-	-	2	1,7
10	4	T	A	6,0	-	-	15	12,9
11	4	T	A	5,4	-	-	3	2,56
12	4	T	C	5,4	-	-	1	0,85
13	4	C	A	6,0	-	-	1	0,85
14	4	T	C	6,0	-	-	1	0,85
15	4	C	C	5,4	-	CV de <i>CYP21P/CYP21</i>	1	0,85
16	5	-	A	6,0	-	Dup. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
17	-	T	C	6,0	-	Dup. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
18	4	T	A	6,0	-	Dup. <i>CYP21P/C4B</i>	4	3,4
19	5	-	C	6,0	-	Dup. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
20	-	-	C	6,0/5,4	-	Dup. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
21	4	T	A	6,0/5,4	-	Dup. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
22	4	-	C	6,0/5,4	-	Dup. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
23	5	T	A/C	5,4	Q318X*	Dup. <i>C4B/CYP21</i>	2	1,7
24	5	C	A	-	-	Del. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
26	5	T	A	-	-	Del. <i>CYP21P/C4B</i>	4	3,4
25	5	C	C	-	-	Del. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
27	-	-	C	-	-	Del. <i>CYP21P/C4B</i>	3	2,56
28	4	T	A	-	-	Del. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
29	5	-	A	5,4	-	Del. <i>C4A/CYP21P</i>	1	0,85
30	5	T	A	6,4	-	Del. <i>C4A/B/CYP21P</i>	1	0,85
31	-	-	C	6,4	-	Del. <i>C4A/B/CYP21P</i>	1	0,85
32	4	T	C	6,4	-	Del. <i>C4A/B/CYP21P</i>	1	0,85
33	5	T	C	6,4	-	Del. <i>C4A/B/CYP21P</i>	1	0,85
34	4	T	A	6,4/5,4	-	<i>C4A/B</i> (2 recombinações)	1	0,85
Total de alelos							117	100

Em cada linha está representado um tipo de haplótipo. Leu, polimorfismo para 5 e 4 códons de leucinas. T/C representa o polimorfismo no intron 2 na posição nucleotídica 395. A/C representa o polimorfismo na posição nucleotídica 656. Dup: duplicação de *CYP21P+C4B* ou de *CYP21P+C4A*, del: deleção de *CYP21P+C4B* ou de *CYP21P/C4A* ou de *CYP21P/C4A/B* (6,4). CV: conversão gênica em larga escala de *CYP21P* para *CYP21*. * a mutação Q318X pertence a um dos dois duplicados *CYP21* neste alelo. Embora eventos de deleção e/ou duplicação do pseudogene *CYP21P* sejam encontrados como um polimorfismo na população em geral, não são responsáveis pela manifestação da doença. • *Taq I* RFLP de *C4B*.

Tabela 24. Frequência dos alelos em indivíduos controles (voluntários universitários).

Haplótipos	unidade gênica <i>CYP21/C4</i> alterada ou não	Mutação em <i>CYP21</i>	RFLP de <i>Taq I</i> de <i>C4B</i>	Nº alelos	Frequência (%)
1	Deleção de <i>CYP21P</i> e <i>C4B</i>	-	-	9	4,5
2	Deleção de <i>CYP21P</i> e <i>C4B</i>	-	<i>C4A/B</i> 6,4	11	5,6
3	CV de <i>CYP21P</i> → <i>CYP21</i>	-	5,4	1	0,5
4	CV de <i>CYP21P</i> → <i>CYP21</i>	-	6,0	1	0,5
5	Dup. <i>CYP21P/C4B</i> ^[5,4 kb]	V281L	5,4	8	4,0
6	Dup. <i>CYP21P/C4B</i> ^[5,4 kb]	-	5,4	2	1,0
7	Dup. <i>CYP21P/C4B</i> ^[6,0 kb]	-	6,0	8	4,0
8	Dup. <i>CYP21/C4B</i> ^[5,4 kb]	-	5,4	11	5,6
9	Dup. <i>CYP21/C4B</i> ^[5,4 kb]	Q318X	5,4	1	0,5
10	-	V281L	5,4	1	0,5
11	-	V281L	6,0	1	0,5
12	-	-	3,9	1	0,5
13	-	-	5,4	70	35,4
14	-	-	6,0	69	34,8
15	não determinados	-	-	4	2,0
Total de alelos				198	100%

cv: conversão gênica envolvendo o sítio de restrição de *Taq I*. Dup= duplicação da unidade gênica *CYP21/C4*. Em cada linha está representado um haplótipo diferente.

7. Comparação entre as frequências de haplótipos semelhantes dos grupos normal (heterozigotos obrigatórios) e afetado

Para uma melhor visualização com respeito às semelhanças entre haplótipos normais e afetados, os haplótipos foram organizados em tabelas de acordo com suas características.

O haplótipo 5 entre os alelos normais (**tabela 23**) foi o mais frequente. Se considerarmos as características dos polimorfismos intragênicos e o RFLP de *C4B*, sem levarmos em conta as mutações ou a duplicação gênica, verificamos que também entre os alelos afetados este haplótipo foi frequente (26%, 28 alelos em 107). A **tabela 25** mostra a reorganização desses haplótipos. Da mesma forma as **tabelas 26-29** mostram a organização dos haplótipos semelhantes em ordem decrescente de frequência.

Tabela 25: Comparação dos haplótipos afetados quanto à semelhança dos polimorfismos intragênicos em relação ao haplótipo 5 da **tabela 23**.

Polimorfismos					Mutação <i>CYP21P</i> / <i>CYP21</i>	Duplicação e/ou deleção	Nº alelos	Frequência (%)
haplótipos	Leu	T/C	A/C	•C4B				
5 (tabela 23)	5	T	A	5,4	-	-	23 (117)	19,7
6 (tabela 13)	5	T	G	5,4	Sp2	-	9 (27)	33,4
7 (tabela 13)	4	T	G	5,4	Sp2	-	1 (27)	3,7
8 (tabela 13)	5	-	G	5,4	Sp2	-	1 (27)	3,7
9 (tabela 13)	5	T	G	-	Sp2	+	1 (27)	3,7
5 (tabela 13)	5	T	G	6,4 (C4A/B)	Sp2	+	1 (27)	3,7
12 (tabela 14)	5	T	A	5,4	I172N	-	1 (19)	5,3
2 (tabela 15)	5	T	A	5,4	Q318X	+	2 (9)	22,2
3 (tabela 15)	5	T	A	5,4	Q318X	-	2 (9)	22,2
4 (tabela 15)	5	T	A	6,0/5,4	Q318X	+	1 (9)	11,1
1 (tabela 18)	5	T	G	5,4	V281L+Sp2	+	3 (8)	37,5
2 (tabela 18)	5	T	A	5,4	V281L	+	4 (8)	50,0
3 (tabela 18)	5	T	A	5,4	V281L+I172L	+	1 (8)	12,5
1 (tabela 20)	5	T	A	5,4	F306+T	-	1 (3)	33,3

Tabela 26: Comparação dos haplótipos afetados quanto à semelhança dos polimorfismos intragênicos em relação aos haplótipos 10 e 18 da **tabela 23**.

Polimorfismos					Mutação <i>CYP21P</i> / <i>CYP21</i>	Duplicação e/ou deleção	Nº alelos	Frequência (%)
Haplótipos	Leu	T/C	A/C	•C4B				
10 (tabela 23)	4	T	A	6,0	-	-	15 (117)	12,9
18 (tabela 23)	4	T	A	6,0	-	Dup. CYP21P/C4B	4 (117)	3,4
1 (tabela 13)	4	T	G	6,0	Sp2	-	5 (27)	18,5
6 (tabela 14)	4	T	A	6,0	I172N	-	2 (19)	10,5
7 (tabela 14)	4	T	A	6,0	I172N	Dup. CYP21P/C4B	1 (19)	5,3
5 (tabela 15)	4	T	A	6,0	Q318X	-	1 (9)	11,1
3 (tabela 17)	4	T	A	6,0	R356W	+ (dup)	2 (5)	40,0

Tabela 27: Comparação dos haplótipos afetados quanto à semelhança dos polimorfismos intragênicos em relação ao haplótipo 1 da **tabela 23**.

Polimorfismos					Mutação <i>CYP21P</i> / <i>CYP21</i>	Duplicação e/ou deleção	Nº alelos	Frequência (%)
Haplótipos	Leu	T/C	A/C	•C4B				
1 (tabela 23)	5	C	A	6,0	-	-	10 (117)	8,6
3 (tabela 13)	5	C	G	6,0	Sp2	-	5 (27)	18,5
8 (tabela 14)	5	C	A	6,0	I172N	-	2 (19)	10,5
6 (tabela 15)	5	C	A	6,0	Q318X	-	1 (9)	11,1
2 (tabela 17)	5	C	A	6,0	R356W	-	2 (5)	40,0
2 (tabela 20)	5	C	A	6,0	F306+T	-	2 (3)	66,7
3 (tabela 21)	5	C	A	6,0	IVS2AS,A→G,- 2	-	1	-

Tabela 28: Comparação dos haplótipos afetados quanto à semelhança dos polimorfismos intragênicos em relação ao haplótipo 6 da **tabela 23**.

Polimorfismos					Mutação <i>CYP21P</i> / <i>CYP21</i>	Duplicação e/ou deleção	Nº alelos	Frequência (%)
Haplótipos	Leu	T/C	A/C	•C4B				
6 (tabela 23)	5	T	A	6,0	-	-	4 (117)	3,4
2 (tabela 13)	5	T	G	6,0	Sp2	-	3 (27)	11,1
9 (tabela 14)	5	T	A	6,0	I172N	-	1 (19)	5,3

Tabela 29: Comparação dos haplótipos afetados quanto à semelhança dos polimorfismos intragênicos em relação ao haplótipo 14 da **tabela 23**.

Polimorfismos					Mutação <i>CYP21P</i> / <i>CYP21</i>	Duplicação e/ou deleção	Nº alelos	Frequência (%)
Haplótipos	Leu	T/C	A/C	•C4B				
14 (tabela 23)	4	T	C	6,0	-	-	1 (117)	0,85
5 (tabela 14)	4	T	C	6,0	I172N	-	2 (19)	10,5
4 (tabela 21)	4	T	C	6,0	H28C+	-	1	-

A **tabela 30** mostra haplótipos mais raros que foram reunidos pela similaridade dos polimorfismos, embora alguns destes permaneçam indeterminados.

Tabela 30: Comparação dos haplótipos afetados quanto à semelhança dos polimorfismos intragênicos em relação aos haplótipos 7 e 8 da **tabela 23**.

Polimorfismos					Mutação <i>CYP21P/CYP21</i>	Duplicações, conversões e/ou deleções	Nº alelos	Frequência (%)
haplótipos	Leu	T/C	A/C	•C4B				
7 (tabela 23)	-	-	C	5,4	-	-	4 (117)	3,4
8 (tabela 23)	-	T	C	5,4	-	-	2 (117)	1,7
1 (tabela 16)	-	-	-	5,4	Q318X/R356W	-	1 (4)	25,0
2 (tabela 16)	-	-	C	5,4	Q318X/R356W	-	1 (4)	25,0
3 (tabela 16)	5	T	C	5,4	Q318X/R356W	-	1 (4)	25,0
4 (tabela 16)	5	T	C	5,4	Q318X/R356W/ F306+T	+	1 (4)	25,0
1 (tabela 21)	-	T	C	5,4	L143P	-	1	
2 (tabela 21)	5	T	C	5,4	L107R	-	1	

A **tabela 31** reúne os haplótipos afetados que permaneceram com os polimorfismos intragênicos indeterminados e por esse motivo não puderam ser comparados com os do grupo normal.

Tabela 31: Haplótipos afetados sem semelhança aos do grupo normal quanto aos polimorfismos intragênicos.

Polimorfismos					Mutação <i>CYP21P</i> / <i>CYP21</i>	Duplicação e/ou deleção	Nº alelos	Frequência (%)
haplótipos	Leu	T/C	A/C	•C4B				
4(tabela 13)	5	-	G	6,0	Sp2	-	1	3,7
1(tabela 15)	5	-	C	5,4	Q318X	-	1	11,1
7 (tabela 15)	-	-	C	6,0	Q318X	+	1	11,1
1(tabela 17)	4	T	C	3,9	R356W	-	1	20,0
1 (tabela 19)	-	-	G	5,4	Δ8/Sp2	-	1	33,3
2 (tabela 19)	-	-	A	6,0	Δ8	-	2	66,7

A **tabela 32** mostra os haplótipos com a mutação I172N que não foram correlacionados com nenhum haplótipo do grupo normal, assim como a **tabela 33** relaciona os haplótipos normais que não tiveram correspondentes no grupo afetado.

Tabela 32: Representação dos haplótipos afetados com a mutação I172N sem correspondente nos haplótipos normais.

Polimorfismos					Duplicação de <i>CYP21P/C4B</i>	Nº alelos	Frequência (%)
haplótipos	Leu	³⁹⁵ T/C	⁶⁵⁶ A/C	•C4B			
1	4	C	C	6,0	-	1	5,3
2	-	-	C	6,0	-	4	20,0
3	5	C	C	6,0	-	1	5,3
4	5	T	C	6,0	-	1	5,3
10	5	T	C	5,4	-	1	5,3
11	-	-	C	5,4	-	2	10,5

Tabela 33: Haplótipos não afetados nos heterozigotos obrigatórios sem correspondente nos haplótipos mutantes.

Polimorfismos					Mutação <i>CYP21P/CYP21</i>	Duplicações, conversões e/ou deleções	Nº alelos	Frequência (%)
haplótipos	Leu	T/C	A/C	•C4B				
2	5	C	A	5,4	-	-	9	8,0
3	5	C	C	5,4	-	-	5	5,0
4	-	-	C	6,0	-	-	8	6,9
9	5	-	A	5,4	-	-	2	1,7
11	4	T	A	5,4	-	-	3	2,56
12	4	T	C	5,4	-	-	1	0,85
13	4	C	A	6,0	-	-	1	0,85
15	4	C	C	5,4	-	CV de <i>CYP21P/CYP21</i>	1	0,85
16	5	-	A	6,0	-	Dup. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
17	-	T	C	6,0	-	Dup. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
22	5	-	C	6,0	-	Dup. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
19	-	-	C	6,0/5,4	-	Dup. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
20	4	T	A	6,0/5,4	-	Dup. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
21	4	-	C	6,0/5,4	-	Dup. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
23	5	T	A/C	5,4	Q318X*	Dup. <i>C4B/CYP21</i>	2	1,7
24	5	C	A	-	-	Del. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
26	5	T	A	-	-	Del. <i>CYP21P/C4B</i>	4	3,4
25	5	C	C	-	-	Del. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
27	-	-	C	-	-	Del. <i>CYP21P/C4B</i>	3	2,56
28	4	T	A	-	-	Del. <i>CYP21P/C4B</i>	1	0,85
29	5	-	A	5,4	-	Del. <i>C4A /CYP21P</i>	1	0,85
30	5	T	A	6,4	-	Del. <i>C4A/B/CYP21P</i>	1	0,85
31	-	-	C	6,4	-	Del. <i>C4A/B/CYP21P</i>	1	0,85
32	4	T	C	6,4	-	Del. <i>C4A/B/CYP21P</i>	1	0,85
33	5	T	C	6,4	-	Del. <i>C4A/B/CYP21P</i>	1	0,85
34	4	T	A	6,4/5,4	-	<i>C4A/B</i> (2 recombinações)	1	0,85

DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo principal a caracterização molecular de haplótipos do “cluster” gênico *CYP21/C4* para os alelos afetados responsáveis pela deficiência da enzima 21-hidroxilase. Para tanto, foram analisadas a variabilidade numérica do *locus CYP21/C4* e os polimorfismos inter e intragênicos.

Trocas de seqüências entre o pseudogene *CYP21P* e o gene *CYP21* ocorrem com frequência e acarretam uma grande variabilidade alélica para o *locus* (Koppens *et al.*, 2000). Por outro lado, há um alto grau de recorrência de determinadas mutações em todas populações estudadas (White e Speiser, 2000). Duas dessas microconversões, a Sp2 e a I172N, são as mais freqüentes nas formas perdedoras de sal e virilizante simples, respectivamente.

A população brasileira não foge à regra (Paulino *et al.*, 1999; Bachega *et al.*, 1999; Witchel *et al.*, 2000). Os resultados deste trabalho corroboram essa regra através da ampliação em cerca de 50% da casuística anterior (Paulino *et al.*, 1999). Mutações em geral mais raras como P30L e CL6 (White e Speiser, 2000) foram encontradas apenas em alelos com deleção ou com conversão gênicas.

A baixa freqüência da deleção de 30 kb (aproximadamente 9%) mais uma vez confirmou os dados anteriores para pacientes brasileiros (Bachega *et al.*, 1999; Araujo *et al.*, 1996), em relação à maioria das populações da Europa e dos Estados Unidos (Ezquieta *et al.*, 1995; Carrera *et al.*, 1993; Koppens *et al.*, 1992; Morel *et al.*, 1989; Speiser *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1995a). Baixas freqüências para este tipo de mutação também foram registradas nos indivíduos afetados do México e Japão (Tajima *et al.*, 1993; Tusie-Luna *et al.*, 1996).

O número de alelos portadores de deleção de 30 kb que engloba a região 3' do pseudogene *CYP21P*, todo o gene *C4B* e a região 5' do gene *CYP21*, foi 10 em 113 alelos afetados e foram divididos em 4 haplótipos diferentes. No geral, a variação alélica se dá pela composição do gene híbrido *CYP21P/CYP21* formado. Assim a divisão em 3 haplótipos foi segundo o ponto de recombinação (**tabela 11**). O haplótipo 4 da **tabela 11** foi diferenciado do haplótipo 3 pela presença do híbrido *C4A/C4B* reconhecido pelo fragmento *Taq I* de 6,4 kb cuja formação deva ter envolvido 3 passos de recombinação independentes (Araujo, 1996). Os três primeiros haplótipos da **tabela 11** foram caracterizados em mais de um alelo afetado não relacionado.

Estudando os tipos sorológicos de HLA-A, -B, -C, Bf, C4A, C4B e DR ligados às deleções de 30 kb do *CYP21* em pacientes não relacionados na Finlândia, onde a frequência deste tipo de alteração é de 34%, Levo e Partanen (1997) determinaram que 2 haplótipos deram origem a 7 outros recorrentes na população. No entanto, os sete haplótipos apresentavam apenas dois tipos de genes híbridos cujos pontos de recombinação se situavam entre duas regiões diferentes: um entre os éxons 3 e 4 e, o outro entre os éxons 7 e 8. No presente estudo, embora tenha sido encontrada uma frequência de deleções de 30 kb menor que o estudo na Finlândia, o número de genes híbridos diferentes nos haplótipos foi maior. É interessante ressaltar que o haplótipo de maior recorrência tanto no estudo de Levo e Partanen (1997) quanto no aqui descrito foi aquele que apresenta ponto de recombinação entre as mutações $\Delta 8$ e I172N (**tabela 11, haplótipo 2**) indicando que ambos possam ter uma origem comum; sendo introduzido no Brasil, representaria um efeito fundador para esse alelo. O fato de se observar recorrência também para os haplótipos 1 e 3 (**tabela 11**) pode indicar um efeito fundador independente para os mesmos, como sugerem Levo e Partanen (1997) para os haplótipos recorrentes no seu trabalho.

De maneira semelhante à subdivisão em haplótipos com deleção, os alelos com conversão gênica foram primeiramente divididos em haplótipos segundo o ponto de recombinação na formação do híbrido *CYP21P/CYP21*. Dentro desse critério, foram observados quatro híbridos (**figura 15, A-D**). No entanto, dois outros critérios, os de duplicação e RFLP de *C4B*, subdividiram os alelos com conversão gênica num total de oito haplótipos. Dentre esses haplótipos, houve um (**tabela 12, haplótipo 1**) que se sobressaiu por representar 1/3 dos alelos com conversão (33,3%). O gene híbrido nesse haplótipo apresenta o ponto de recombinação entre as mutações P30L e Sp2 (**figura 15, híbrido A**). Normalmente, eventos de conversão gênica em larga escala estão correlacionados com o fenótipo PS (White e Speiser, 2000) devido ao fato da maioria dos alelos possuir genes híbridos apresentando atividade enzimática nula por ter a parte correspondente ao *CYP21P* se estendendo além da mutação $\Delta 8$ (Donohoue *et al.*, 1989; White *et al.*, 1988). Com relação ao fenótipo esperado para alelos com conversão gênica em larga escala, deve-se considerar a gravidade da alteração enzimática gerada pela mutação presente no gene híbrido. Nos haplótipos 1 e 2 da **tabela 12**, a única mutação

presente é a P30L que está relacionada com a forma não clássica de deficiência de 21-hidroxilase. No entanto, os pacientes portadores da conversão dos **haplótipos 1 e 2**, além de possuírem a mutação P30L, apresentam também a região promotora do pseudogene que produz uma atividade funcional de 10-20% da do gene funcional (Donohoue *et al.*, 1995; Bristow *et al.*, 1993). Assim os pacientes portadores destes haplótipos apresentam o fenótipo VS devido à soma dos efeitos da região promotora do *CYP21P* e da mutação P30L. A alta frequência do híbrido A (40%) entre as conversões gênicas faz com que o perfil da população estudada neste trabalho se diferencie das demais (Levo e Partanen, 1997; Wilson *et al.*, 1995b; Barbat *et al.*, 1995; Ezquieta *et al.*, 1995); além disso, sugere um efeito fundador para manutenção desse haplótipo entre alelos afetados. Dentro das conversões gênicas, vale ainda ressaltar que os haplótipos 4-7 possam ter tido uma origem comum dada a semelhança do polimorfismo de *C4B*. Isto é, todos compartilham do fragmento *Taq I* de 5,4 kb, sendo que os haplótipos 5-7 apresentam a duplicação *CYP21P+C4B*^[5,4]. O **haplótipo 7** se diferencia do 6 pelo fato de que o ponto de recombinação neste caso encontra-se entre a mutação V281L e a Q318X (**figura 15, híbrido D**).

Como descrito acima, a diferenciação entre alelos afetados portadores de deleções envolvendo *CYP21* foi possível apenas pelo estudo do ponto de recombinação do híbrido, ao passo que, para as conversões além do ponto de recombinação do híbrido, os alelos foram divididos por eventos de duplicação e RFLP de *C4B*. A análise dessas duas variações possibilitou o estudo da variabilidade do *locus* também em alelos portadores de microconversões, nos alelos normais de portadores obrigatórios (pais) e nos indivíduos controles (**tabela 4**). As frequências do polimorfismo de *C4B* de 6,0 e 5,4 kb foram praticamente idênticas nos indivíduos normais (36,2% e 40,3%, respectivamente) e controles (35,6% e 36,1%, respectivamente) e se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($0,2 < P < 0,3$). No entanto, a frequência do alelo *C4B* de 6,0 kb foi 1,5 vezes maior que a do alelo *C4B* de 5,4 kb entre os alelos afetados. Uma possível explicação para esta observação será apresentada mais adiante. Pode-se observar que a variabilidade numérica das cópias gênicas no *locus* é significativamente maior nos alelos normais e nos controles em comparação com os alelos afetados. A **tabela 33** ilustra este perfil, onde se verifica o número de haplótipos portando os diferentes tipos de duplicações e deleções

que não tiveram correspondência nos haplótipos afetados. Uma exceção se faz aos haplótipos contendo a duplicação *CYP21P+C4B*^[5,4] (**haplótipos 11 e 12, tabela 4**) que somente aparece ligado a haplótipos afetados. Isto está de acordo com outros trabalhos que consideram a hipótese de que alelos com duplicações ou com deleções de *CYP21P+C4B* mantenham uma relação negativa com alelos afetados (Sinnott *et al.*, 1990; Wedell *et al.*, 1994). Em nossa casuística essa ligação fica mais evidente quando se observa o haplótipo de número 7 (**tabela 4**), que possui a deleção de *CYP21P+C4B* e foi encontrado em apenas 1 alelo afetado, ao passo que foi determinado em 10 alelos normais e 9 controles. Para auxiliar a separação em haplótipos distintos, foram incluídos na **tabela 4** dois alelos portadores de mutações. O haplótipo de número 15 apresenta a duplicação de *CYP21+C4B*^[5,4] associada à mutação Q318X. Como esse haplótipo apresenta duas cópias do gene ativo e apenas uma cópia possui a mutação, não leva a um fenótipo de HCA. Por outro lado, foi encontrado em três alelos nos grupos normal e controle, perfazendo uma frequência de cerca de 1% de heterozigose na população (3:313). Essa frequência é bastante próxima da frequência de heterozigotos para as mutações em geral, estimada em 1,6% (Pang, 1988; Miller e Morel, 1989). Portanto, ao contrário do que supõem Wedell *et al.* (1994), para a população sueca, esse alelo não deve ser considerado raro entre brasileiros. Assim, este alelo constitui uma fonte de erros na interpretação da condição de afetados dentro de um estudo baseado apenas na técnica de PCR alelo-específico (De Mello *et al.*, 1998). O haplótipo de número 11 que apresenta a duplicação *CYP21P+C4B*^[5,4] associada à mutação V281L e é vinculado à forma não clássica de deficiência de 21-hidroxilase, foi incluído na **tabela 4** por ter sido determinado em 8 alelos controles; além desses, outros dois (**haplótipos 4 e 5**) apresentam a mutação V281L não vinculada à duplicação. Esses resultados indicam uma frequência de heterozigotos para a mutação V281L na população de 5%, significativamente elevada em relação ao estimado para as mutações da forma clássica; está, porém, dentro do esperado para heterozigotos da forma não clássica nas populações em geral (Sherman *et al.*, 1988; Dumić *et al.*, 1990).

Para a caracterização de haplótipos com microconversões, a análise de três polimorfismos intragênicos foi adicionada ao estudo da variabilidade intergênica. Antes

de se dividir os alelos afetados e normais em haplótipos, foram obtidas as frequências de cada polimorfismo.

O primeiro polimorfismo analisado foi a variação nucleotídica A→C na posição 656 no íntron 2, onde ocorre a mutação Sp2 quando a posição é ocupada por um G. Observa-se que a frequência do alelo A é 2,5 vezes maior que do alelo C no grupo normal. Por outro lado, no grupo afetado a diferença entre as frequências é de 1,4 vezes. No entanto, se forem somadas as frequências dos alelos A e G no grupo afetado, soma esta justificada por motivos que serão discutidos mais adiante, a proporção entre as frequências A+G e C se iguala à proporção observada no grupo normal, isto é 2,5 vezes (**tabela 8**). A frequência do alelo A de 2,5 vezes maior em relação ao alelo C também foi encontrada por Day *et al.* (1996).

Os outros dois polimorfismos, Leu+ ou Leu- (éxon 1) e ³⁹⁵T→C (íntron 2), estão localizados no fragmento que se estende do éxon 1 ao éxon 3. Uma vez que a técnica utilizada para análise desses polimorfismos intragênicos baseou-se inicialmente na amplificação do fragmento de 790 pb que engloba o íntron 2, levanta-se a possibilidade de ocorrência de um artefato da PCR que pode levar à amplificação preferencial dos alelos A e G quando em heterozigose com o alelo C na posição 656 (Lau, 2000, Van de Velde *et al.*, 1999; Day *et al.*, 1996; Witchel *et al.*, 1996). Esse artefato é conhecido com “dropout” de alelos e tem sido considerado como responsável por frequências alélicas que fogem ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para polimorfismos presentes em posições 5’ ao éxon 3 (Ozturk *et al.*, 2000; Day *et al.*, 1996). Para se evitar tal efeito neste estudo, os indivíduos que sabidamente eram heterozigotos A/C ou G/C, que apresentavam homozigose para os dois polimorfismos e, que não puderam ser determinados por análise da família, foram considerados indeterminados, evitando-se assim o favorecimento dos homozigotos.

Dessa forma, observou-se que as frequências dos polimorfismos Leu+/Leu-, ³⁹⁵T→C e ⁶⁵⁶A→C entre indivíduos afetados e normais encontram-se dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg (**tabela 34**). Os valores de *P* encontrados mostram que um possível favorecimento de homozigotos causado por efeito de “dropout” de alelos foi eliminado pelo critério adotado. Este resultado indica que o uso destes polimorfismos como marcadores para a definição de haplótipos é adequada.

Tabela 34. Frequência dos polimorfismos intragênicos segundo o teorema de Hardy-Weinberg.

Contagem do polimorfismo de Leucinas			
	Homozigota (Leu+/Leu+)	Heterozigota (Leu+/Leu-)	Homozigota (Leu-/Leu-)
Nº de indivíduos	35	19	4
ND (total)	64		
X ² (2graus de liberdade) 0,55			
0,7 < P < 0,8			
Contagem para o polimorfismo de 656A→C			
	Homozigota (A/A)	Heterozigota (A/C)	Homozigota (C/C)
Número de indivíduos	20	30	9
ND (total)	59		
X ² (2graus de liberdade) 0,19			
0,9 < P < 0,95			
Contagem para o polimorfismo de 395T→C			
	Homozigota (T/T)	Heterozigota (T/C)	Homozigota (C/C)
Número de indivíduos	32	20	6
ND (total)	64		
X ² (2graus de liberdade) 1,12			
0,5 < P < 0,7			

Leu+, 5 códons para leucinas; Leu-, 4 códons para leucinas, X^2 , qui-quadrado. Todos os valores de P foram maiores que 0,05 indicando que os polimorfismos encontram-se dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A partir da determinação dos polimorfismos individuais, foram obtidos haplótipos para os alelos portadores de mutações e para os alelos normais dos indivíduos portadores obrigatórios. Foram determinados 58 haplótipos em 107 do total de 113 alelos afetados, ao passo que, na análise de 117 alelos normais, foram determinados 34 haplótipos diferentes. Deve-se ressaltar que alguns haplótipos, tanto entre os afetados como entre os normais, permaneceram com um ou dois polimorfismos indeterminados, o que aumentou o número de haplótipos nos dois grupos; esse número será com certeza reduzido à medida que se esclarecerem esses haplótipos.

Para mutação Sp2, por ser a encontrada em maior frequência em todas as populações estudadas, inclusive na casuística deste trabalho (30,7%), muitos autores aventam a hipótese de haver um efeito fundador através da propagação de um alelo

afetado surgido há muitas gerações. Essa hipótese foi demonstrada como verdadeira para populações pequenas e homogêneas como as da Finlândia e Sibéria (Polyakov *et al.*, 1996; Narko *et al.*, 1995; Speiser *et al.*, 1992; Hejtmancik *et al.*, 1992). No entanto, para nossa população, altamente miscigenada, deve-se esperar uma variabilidade maior de haplótipos. Avaliando-se 4 fontes de variabilidade no *locus*, os alelos para a mutação Sp2 dividiram-se em 9 haplótipos diferentes, mostrados na **tabela 13**. O haplótipo de número 6 representa 1/3 de todos os alelos. Sem considerarmos a presença da mutação, esta alta frequência pode estar refletindo a alta frequência do haplótipo na população em geral, como demonstra o haplótipo 5 da **tabela 23**. Pode-se sugerir que a origem do haplótipo 6 (**tabela 13**) tenha sido o haplótipo 5 (**tabela 23**) e que, através de um efeito fundador, o alelo mutante esteja sendo mantido na população. Acredita-se também que o haplótipo 5 e 9 (**tabela 13**) tenham se originado do 6 através de uma recombinação por pareamento desigual, resultando na deleção da unidade *CYP21P+C4B*; no primeiro, inclusive, houve a formação do híbrido *C4A/B* evidenciado pelo fragmento *Taq* I de 6,4 kb que sabidamente se forma a partir de *C4B* de 5,4 kb (Paldostir *et al.*, 1987). O mesmo raciocínio pode ser aplicado ao haplótipo 7, onde a única diferença em relação ao 6 é no polimorfismo Leu. Este pode ter sido modificado durante a propagação do haplótipo. Outra suposição que pode ser levantada em relação ao haplótipo 7 é a de poder ser derivado do haplótipo 11 (**tabela 23**); este, porém, apresenta uma baixa frequência entre os alelos normais (3/117). Com relação ao haplótipo 8, este se diferencia do 6 apenas por não ter sido possível a determinação do polimorfismo $^{395}\text{T}\rightarrow\text{C}$; possivelmente, ele irá se igualar ao 6 quando se verificar a base que ocupa a posição 395 neste alelo. Em resumo, sugere-se que os haplótipos 5 e 7-9, por terem apenas 1 alelo cada um, sejam originários do haplótipo 6, evidenciando seu efeito fundador para a mutação Sp2 na forma clássica de deficiência de 21-hidroxilase. O resumo da origem desses haplótipos afetados com a mutação Sp2 encontra-se na **tabela 25**. Por outro lado, os haplótipos 1-3 para a mutação Sp2 se diferenciaram dos demais e cada um foi recorrente de forma independente. Na **tabela 23**, verifica-se que os haplótipos normais 1, 6 e 10 correspondem aos 3, 2 e 1 da **tabela 13**, respectivamente, e são igualmente frequentes na população. Portanto, sugere-se que cada um desses haplótipos afetados com a mutação Sp2 tenham um efeito fundador independente. O resumo destes dados encontram-se nas **tabelas 26-28**. Para

finalizar a discussão dos haplótipos com a mutação Sp2, é interessante ressaltar que todos os haplótipos normais (**tabela 23, haplótipos 1, 5, 6 e 10**) que provavelmente deram origem aos haplótipos mutantes apresentam a base A na posição 656, que foi substituída por uma G para gerar a mutação. Os resultados da comparação entre os haplótipos normais e mutantes, neste caso, deu suporte para que se efetuasse a soma das frequências dos alelos A e G na comparação das frequências alélicas entre o grupo normal e mutante apresentada acima.

A segunda mutação mais freqüente é a I172N, que no presente trabalho aparece com uma frequência de 21,6%. Para esta mutação foram encontrados 12 haplótipos em 19 alelos afetados, conforme a **tabela 14**.

Nesse caso a distribuição de alelos nos diferentes haplótipos não apresentou diferenças significativas. No entanto, deve-se ressaltar o fato da maioria dos haplótipos (cerca de 80%) apresentar o fragmento *Taq* I de 6,0 kb para o gene *C4B* (**tabela 14, haplótipos de 1-9**), configurando claramente um desequilíbrio de ligação entre o polimorfismo e a mutação, visto que a distribuição alélica dos fragmentos *C4B* de 6,0 e 5,4 kb nos alelos normais e controles é equivalente (**tabela 4, haplótipos 1 e 2**), ao passo que para os alelos afetados com I172N a proporção do fragmento de 6,0 kb é cerca de 4 vezes maior que a de 5,4 kb; a proporção distorcida para alelos com a mutação I172N faz com que o número de alelos afetados com *C4B* de 6,0 kb seja 1,4 vezes maior que o de 5,4 kb (**tabela 4, haplótipos 1 e 2**). Isso pode ser sugestivo de que a mutação possa ter surgido primeiramente em um alelo ancestral com essa característica e que posteriormente foram se diferenciando através da aquisição das outras variações, principalmente aquelas localizadas no íntron 2. Esse íntron apresenta vários outros polimorfismos além desses aqui estudados e tem sido considerado um “hot spot” para o surgimento de SNPs (Killeen *et al.* 1998; Bobba *et al.*, 1997; Wedell *et al.*, 1992). Vale ressaltar que para o haplótipo 2 não foi possível determinar o polimorfismo de Leu+/Leu- e o ³⁹⁵T→C, porque a técnica utilizada foi limitada pelo artefato da PCR do “dropout”. Ao contrário da mutação Sp2, os haplótipos observados para a mutação I172N não são freqüentes entre os alelos normais, indicando que provavelmente os haplótipos foram introduzidos em cromossomos que já portavam a mutação (**tabela 32**). Essa diferença de característica em relação à Sp2 pode estar relacionada à localização de cada mutação. A Sp2 situa-se no

íntron 2, que, como já citado, está sujeito à maior variabilidade, ao passo que a I172N se localiza no éxon 4, ou seja, em uma região muito conservada.

A terceira mutação mais freqüente é a Q318X, presente em 10,2% dos alelos afetados. Sete haplótipos foram determinados para esta mutação e estão apresentados na **tabela 15**. Neste caso, observou-se uma distribuição mais homogênea de alelos entre os diferentes haplótipos, embora possamos considerar que os haplótipos 2, 3 e 4 possam ter uma origem comum. Os haplótipos 2 e 3 são os únicos recorrentes na amostra. Por sua vez o haplótipo 3 corresponde ao haplótipo 5 da **tabela 23**, que é o que apresenta a maior freqüência entre os haplótipos do grupo normal (**tabela 25**).

Mutações mais raras foram também avaliadas quanto aos polimorfismos inter e intragênicos, gerando diferentes haplótipos (**tabelas 16-21**).

No entanto, alelos carregando as duas mutações Q318X e R356W, embora mais raros entre os alelos afetados, estão presentes em 4 haplótipos com características muito semelhantes entre si (**tabela 16**), o que sugere um efeito fundador marcante, uma vez que estes haplótipos não são encontrados entre os normais (**tabela 23**). Ressalva-se apenas que dois haplótipos normais, que permaneceram com polimorfismos não determinados (haplótipos 7 e 8), poderão vir a corresponder ao haplótipo que carrega as mutações Q318X e R356W (**tabela 30**). A presença de mutações raras recorrentes no gene *CYP21* foi anteriormente descrita por outros autores (Billerbeck *et al.*, 1999; Ezquieta *et al.*, 1999), os quais sugerem um efeito fundador para alelos raros dentro de determinados grupos étnicos. Além disso, esse resultado fornece um dado a mais para confirmar a suposição de que, devido às mutações Q318X e R356W serem contíguas na sequência do pseudogene *CYP21P*, elas podem ter sido originadas no gene *CYP21* através de um único evento de conversão (Paulino *et al.*, 1999).

A mutação V281L é característica da forma não clássica da doença, porém aparece aqui em alelos da forma clássica, em associação com mutações mais graves. Esse fato é um reflexo da alta freqüência de alelos afetados com a mutação V281L na população em geral. Neste estudo, estimamos esta freqüência em 5%, estudando 198 alelos de indivíduos controles não relacionados. A **tabela 18** mostra os haplótipos para essa mutação nos alelos da forma clássica de deficiência de 21-hidroxilase. Nota-se que os haplótipos com a mutação V218L e duplicação de *CYP21P/C4B* de 5,4 kb (**tabela 18**)

são conservados na população, porém foram classificados em 3 haplótipos distintos devido às mutações “secundárias”. Acredita-se que as mutações Sp2 e I172N tenham sido adquiridas após a formação do haplótipo duplicado *CYP21P+C4B*^[5,4] +V281L. Além da duplicação, verifica-se na área sombreada da **tabela 18** a igualdade dos polimorfismos Leu, ³⁹⁵T→C e ⁶⁵⁶A/C→G nos haplótipos 1, 2 e 3, reforçando a evidência de uma origem comum para os 3 haplótipos. No entanto, com base nos polimorfismos intragênicos, mais uma vez se observa que essa alta recorrência reflete a alta frequência do haplótipo 5 da **tabela 23 (tabela 25)**; nenhum haplótipo com a duplicação *CYP21P+C4B*^[5,4] foi, porém, observado entre os haplótipos normais (**tabela 23**).

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho indicam duas características principais para a recorrência de haplótipos afetados com as mutações para a deficiência de 21-hidroxilase: as mutações I172N e Q318X/R356W apresentam um efeito fundador para haplótipos que são raros entre os haplótipos normais, enquanto que as mutações Sp2 e V281L apresentam também um efeito fundador, porém o haplótipo recorrente em ambos os casos corresponde ao haplótipo normal mais frequente (**tabela 23, haplótipo 5**). Por outro lado, alguns haplótipos afetados recorrentes parecem ter origens independentes.

Muitos trabalhos avaliam a variabilidade do *locus C4/CYP21* estudando polimorfismos moleculares e haplótipos usando como marcadores os antígenos sorológicos de HLA e proteínas do *C4* (Levo e Partanen, 1997; Donohoue *et al.*, 1995; Chu *et al.*, 1992; Helmberg *et al.*, 1992) e, também, microssatélites de DNA localizados fora do *locus* (Ezquieta *et al.*, 1997). Neste trabalho, no entanto, foram utilizados marcadores moleculares intragênicos como uma ferramenta adicional para caracterização dos haplótipos, o que faz com que se diferenciem dos demais para determinação haplotípica. Deste modo, não foi possível estabelecer uma comparação dos resultados deste trabalho, em relação à variabilidade e ao efeito fundador de alguns haplótipos, com os de outros trabalhos, tornando esses dados inéditos dentro dos estudos que envolvem o *locus C4/CYP21*.

CONCLUSÕES

- Foi encontrada uma variabilidade numérica das cópias gênicas no *locus C4/CYP21* significativamente maior nos alelos normais e nos controles em comparação com os alelos afetados, com exceção dos haplótipos contendo a duplicação *CYP21P+C4B*^[5,4].
- Os alelos com a mutação V281L e duplicação de *CYP21P/C4B* de 5,4 kb representam 5% dos alelos de indivíduos controles não relacionados, o que indica uma alta frequência de heterozigotos na população em geral.
- Eliminando-se o artefato do alelo “dropout” no favorecimento do homozigoto, os polimorfismos intergênicos e intragênicos utilizados na caracterização dos haplótipos encontraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.
- Os haplótipos afetados pela deficiência da 21-hidroxilase com as mutações I172N e Q318X/R356W, sugerem um efeito do fundador.
- Os haplótipos com as mutações Sp2 e V281L sugerem também um efeito do fundador, o haplótipo recorrente, em ambos os casos, corresponde ao haplótipo normal mais frequente.
- Os haplótipos afetados com mutações raras e recorrentes parecem ter tido origens independentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMOR M, PARKER KL, GLOBERMAN H, NEW MI, WHITE PC, Mutation in the CYP21 Gene (Ile172-Asn) Causes Steroid 21-Hydroxylase Deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1600-1604 (1988).
- ARAUJO M, Estudo da organização molecular do "cluster" gênico CYP21 e C4 em famílias com a forma clássica da deficiência da 21- hidroxilase no Brasil. Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (1996).
- ARAUJO M, SANCHES MR, SUZUKI LA, GUERRA JR. G, FARAH SB, DE MELLO MP, Molecular Analysis of CYP21 and C4 Genes in Brazilian Families the Classical Congenital Adrenal Hyperplasia. *Braz J Med Biol Res* 29:1-13 (1996).
- BACHEGA TA, BILLERBECK AE, MADUREIRA G, MARCONDES JA, LONGUI CA, LEITE MV, ARNHOLD IJ, MENDONCA BB, Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 83(12):4416-4419 (1998).
- BACHEGA TA, BILLERBECK AE, MADUREIRA G, ARNHOLD IJ, MEDEIROS MA, MARCONDES JA, LONGUI CA, NICOLAU W, BLOISE W, MENDONCA BB, Low frequency of CYP21B deletions in Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Hered* 49(1):9-14 (1999).
- BARBAT B, BOGYO A, RAUX-DEMAY MC, KUTTENN F, BOUE J, SIMON-BOUY B, SERRE JL, MORNET E, Screening of cyp21 gene mutations in 129 French patients affected by steroid 21-hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* 5:126-131 (1995).
- BERENBAUM SA, Effects of early androgens on sex-typed activities and interests in adolescents with congenital adrenal hyperplasia. *Horm Behav* 35(1):102-110 (1999).
- BOBBA A, IOLASCON A, GIANNATTASIO S, ALBRIZIO M, SINISI A, PRISCO F, SCHETTINI F, MARRA E, Characterization of CAH alleles with non-radioactive DNA single strand conformation polymorphism analysis of the CYP21 gene. *J Med Genet* 34(3):223-228 (1997).
- BORNANN M, KOCHHAN L, KNORR D, BIDLINGMAIER F, OLEK K, Clinical heterogeneity of 21-hydroxylase deficiency of sibs with identical 21-hydroxylase genes. *Acta Endocrinol* 126:7-9 (1992).

- BRISTOW J, GITELMAN SE, TEE MK, STAELS B, MILLER WL, Abundant Adrenal-Specific Transcription of the Human P450c21A. *J Biol Chem* 268:12919- 12924 (1993).
- CALLIARI LEP, (1992). Hiperplasia adrenal congênita, Em: MONTE, O. & CARLOS, A. (Editor), *Endocrinologia para o Pediatra*, Livraria Atheneu, Editora Rio de Janeiro, 115-124.
- CARRERA P, FERRARI M, BECCARO F, SPIGA I, ZANUSSI M, RIGON F, BRAGGION F, ZACCHELLO F, GREGGIO N, Molecular Characterization of 21-Hydroxylase Deficiency in 70 Italian Families. *Hum Hered* 43:190-196 (1993).
- CARRERA P, BORDONE L, AZZANI T, BRUNELLI V, GARANCINI MP, CHIU-MELLO G, FERRARI M, Point mutations in Italian patients with classic, non-classic, and cryptic forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet* 98:662-665 (1996).
- CARROL MC, CAMPBELL RD, BENTLEY DR, PORTER RR, A Molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B. *Nature* 307:237-241 (1984).
- CARROL MC, CAMPBELL RD, PORTER RR, Mapping the steroid 21-hydroxylase adjacent complement component c4 genes in hla major histocompatibility complex in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:521-525 (1985a).
- CARROL MC, PALDOSTTIR A, BELT KT, PORTER PR, Deletion of complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes in the HLA class III region. *EMBO J* 4:2547-2552 (1985b).
- CHANG YP, MAIER-REDELSPERGER M, SMITH KD, CONTU L, DUCROCO R, DE MONTALEMBERT M, BELLOY M, ELION J, DOVER GJ, GIROT R, The relative importance of the X-linked FCP locus and beta-globin haplotypes in determining haemoglobin F levels: a study of SS patients homozygous for beta S haplotypes. *Br J Haematol* 96(4):806-14 (1997).
- CHIOU, SH, HU MC, CHUNG B, A missense mutation at Ile¹⁷² -Asn or Arg³⁵⁶ -Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biol Chem* 265:3549-3552 (1990).

- CHU X, BRAUN-HEIMER L, RITTNER L, SCHNEIDER PM, Identification of the recombination site within the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) of the HLA-B47,DR7 haplotype. *Exp Clin Immunogenet* 9:80-85 (1992).
- CHUNG B, MATTESON KJ, VOUTILAINEN R, MOHANDAS TK, MILLER WL, Human cholesterol side-chain cleavage enzyme P450scc. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8962-8966 (1986).
- COLLIER S, SINNOT PJ, DYER PA, PRICE DA, HARRIS R, STRACHAN, T, Pulsed field electrophoresis identifies a high degree of variability in the number of tandem 21-hydroxylase and complement C4 gene repeats in 21-hydroxylase deficiency haplotypes. *EMBO J* 8:1393-1402 (1989).
- COSTA EM, MENDONÇA BB, INÁCIO M, ARNHOLD IJ, SILVA FA, LODOVICI O, Management of ambiguous genitalia in pseudohermaphrodites: new perspectives on vaginal dilation. *Fertil Steril* 67(2):229-232 (1997).
- DARDIS A, BERGADA I, BERGADA C, RIVAROLA M, BELGOROSKY A, Mutations of the steroid 21-hydroxylase gene in an argentinian population of 36 patients with classical congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab* 10(1):55-61 (1997).
- DAY JD, SPEISER PW, SCHLZE E, BETTENDORF M, FITNESS H, BARANY F, WHITE PC, Identification of non-amplifying CYP21 genes when using PCR-bases diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia (CAH) affected pedigrees. *Hum Mol Gene* 5:2039-2048 (1996).
- De MELLO MP, PAULINO LC, ARAUJO M, Restrictions To Allele-Specific PCR-Based Diagnosis In The 21-Hidroxilase Deficiency. In: XII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE LATINO-AMERICANA DE ENDOCRINOLOGIA PEDIÁTRICA, 1998, Águas de São Pedro. Anal do Congresso. São Paulo, SP, Brasil: Sociedade Latino-Americana de Endócrinologia Pediátrica, p.106-106.
- DONDI E, CUCCIA M, KELLER E, MARTINETT M, LARIZZA D, ALBERT ED, Molecular analysis of CYP21 gen mutations carried on HLA-B14 positive haplotypes. *Eur J Immunogenet* 21:341-350 (1994).

- DONOHOU PA, JOSPE N, MIGEON CJ, McLEAN RH, BIAS WB, WHITE PC, VAN DOP C, restriction maps and restriction fragment length polymorphisms of the human 21-hydroxylase genes. *Biochem Biophys Res Commun* 136 : 722-729, (1986).
- DONOHOU PA, JOSPE N, MIGEON CJ, VAN DOP C, Two distinct areas of unequal crossingover within the steroid 21-hydroxylase gene produce absence of CYP21B. *Genomics* 5:395-406 (1989).
- DONOHOU PA, GUETHLEIN L, COLLINS MM, DOP C VAN, MIGEON CJ, BIAS WB, SCHEMCKPEPER BJ, "The HLA-A3,Cw6,B47,DR7 extended haplotypes in salt losing 21-hydroxylase deficiency and in the old order Amish: identical class I antigens and class II alleles with at least two crossover sites in the class III region. *Tissue Antigens* 46:163-173 (1995).
- DUMIC M, BRKLJACIC L, SPEISER PW, WOOD E, CRAWFORD C, PLAVSIC M, RADMANOVIC S, RADICA A, KASTELAN A, NEW MI, An update on the frequency of nonclassic deficiency of adrenal 21-hydroxylase in the Yugoslav population. *Acta Endocrinol* 122: 703-710 (1990).
- DUNHAM I, SARGENT CA, TROWSDALE J, CAMPBELL RD, Molecular map of the human major histocompatibility complex in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7237-7241 (1989).
- DUPONT B, OBERFIELD SE, SMITHWICK EM, LEE TD, LEVINE LS, Close genetic linkage between hla and congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency), *The Lancet* 24-31, 1309-1312, (1977).
- DUPONT B, POLLACK MS, LEVINE LS, O'NEILL GJ, HAWKINS BR, NEW MI, (1980). In: TERASAKI, P. I. (Editor), *Histocompatibility testing*, Univ. of California at Los Angeles, Los Angeles, 693-706, (1980).
- EZQUIETA B, OLIVER A, GRACIA R, GANCEDO PG, Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Hum Genet* 96:198-204 (1995).
- EZQUIETA B, JARIGO C, VARELA JM, OLIVER A, GRACIA R, Microsatellite markers in the indirect analysis of the steroid 21-hydroxylase gene. *Prenatal Diagnosis* 17(5):429-434 (1997).

- FARDELLA CE, POGGI H, PINEDA P, SOTO J, TORREALBA I, CATTANI A, OESTREICHER E, FORADORI A. Salt-wasting congenital adrenal hyperplasia: detection of mutations in CYP21B gene in a Chilean population. *J Clin Endocrinol Metab* 83(9):3357-3360 (1998).
- FELDMAN S, BILLAUD L, THALABARD JC, RAUX-DEMAY M, MOWSZOWICZ I, KUTTENN F, MAUVAIS-JARVIS P, Fertility in women with late-onset adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 635-639 (1992).
- FIFE D, RAPPAPORT EB, Prevalence of salt-losing among congenital adrenal hyperplasia patients. *Clin Endocrinol* 19: 259 (1983).
- FLEISCHNICK E, AWDEH ZL, RAUM D, GRANADOS J, ALOSCO SM, CRIGLER JF JR, GERALD PS, GILES CM, YUNIS EJ, ALPER CA, Extended MHC haplotypes in 21-hydroxylase-deficiency congenital adrenal hyperplasia: shared genotypes in unrelated patients. *Lancet* 22(1):152-156 (1983).
- GITELMAN SE, BRISTOW J, MILLER WL, Mechanism and consequences of the duplication of the human C4/P450c21/gene X locus. *Mol Cell Biol* 12(5):2124-2134 (1992).
- GLOBERMAN H, AMOR M, PARKER KL, NEW MI, WHITE PC, Nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 82:139-144, (1988).
- GONZALEZ FJ, NEBERT DW, Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet* 6(6):182-186 (1990).
- GRUMBACH MM, CONTE FA, Disorders of sexual differentiation. In Wilson JD, Foster DW (eds.) 1985, Williams textbook of endocrinology, 7^a. ed., Philadelphia, 312-401.
- GUDNASON V, SIGURDSSON G, NISSEN H, HUMPHRIES SE, Common founder mutation in the LDL receptor gene causing familial hypercholesterolaemia in the Icelandic population. *Hum Mutat* 10(1):36-44 (1997).
- GUTAI JP, KOWARSKI AA, MIGEON CJ, The detection of the heterozygous carrier for congenital virilizante adrenal hyperplasia. *J Pediatr* 90: 924 (1977).

- GUYTON AC, Tratado de fisiologia médica, 6^a ed, Rio de Janeiro, Guanabara, 817-829 (1986).
- HAGLUND-STENGLER, B.; RITZÉN, E. M.; LUTHMAN, H., 21-hydroxylase deficiency: Disease-causing mutations categorized by densitometry of 21-hydroxylase specific deoxyribonucleic acid fragments., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 70:43-48, (1991).
- HARADA F, KIMURA A, IWANAGA T, SHIMOZAWA K, YATA J, SASAZUKI T, Gene conversion-like events cause steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8091-8094 (1987).
- HARDING JP, HAMM LR, EHSANULLAH RS, HEATH AT, SORRELLS SC, HAW J, DUKES GE, WOLFE SG, MANGEL AW, NORTHCUTT AR, Use of a novel electronic data collection system in multicenter studies of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 11(6):1073-1076 (1997).
- HARTEVELD KL, LOSEKOOT M, HEISTER AJ, VAN DER WIELEN M, GIORDANO PC, BERNINI LF, alpha-Thalassemia in The Netherlands: a heterogeneous spectrum of both deletions and point mutations. *Hum Genet* 100(3-4):465-471 (1997).
- HEJTMANCIK JF, BLACK S, HARRIS S, WARD PA, CALLAWAY C, LEDBETTER D, MORRIS J, LEECH SH, POLLACK MS, Congenital 21-hydroxylase deficiency as a new deletion mutation. Detection in a proband during subsequent prenatal diagnosis by HLA typing and DNA analysis. *Hum Immunol* 35:246-252 (1992).
- HELMBERG A, TUSIE-LUNA MT, TABARELLI M, KOFLER R, WHITE PC, R339H and P453: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. *Mol Endocrinol* 6:1318-1322, (1992).
- HELMBERG A, Twin Genes and Endocrine Disease: CYP21 and CYP11B Genes. *Acta Endocrinol* 129: 97-108 (1993).
- HIGASHI Y, YOSHIOKA H, YAMANE M, GOTOH O, FUJI-KURIYAMA Y, Complete nucleotide sequence of 2 steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2841-2845 (1986).

- HIGASHI Y, TANAE A, INOUE H, FUJI-KURIYAMA Y, Evidence for frequent conversion in the steroid 21-hydroxylase p-450 (c21) gene: implications for steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 42:17-25 (1988a).
- HIGASHI Y, TANAE A, INOUE H, HIROSAMA T, FUJI-KURIYAMA Y, Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [p450(c21)] deficiency in humans: possible gene conversion products. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7486-7490, (1988b).
- HIGASHI Y, HIROMASA T, TANAE A, MIKI T, NAKURA J, KONDO T, OHURA T, OGAWA E, NAKAYAMA K, FUJII-KURIYAMA Y, Effects of individual mutations in the P-450 (C21) pseudogene the P-450(C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biochem* 109:638-644 (1991).
- HOBBS HH, BROWN MS, RSSELL DW, DAVIGNON J, GOLDSTEIN JL, Deletion en the gene for the low-density-lipoprotein receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 317:734-737 (1978).
- HUMA Z, CRAWFORD C, NEW MI, Congenital adrenal hyperplasia. Clinical pediatric endocrinology, Cap 30, p.536, 3rd Edition, Blackwell Science, (1995).
- JIDDOU RR, WEI WL, SANE KS, KILLEEN AA, Single-nucleotide polymorphisms in intron 2 of CYP21P: evidence for a higher rate of mutation at CpG dinucleotides in the functional steroid 21-hydroxylase gene and application to segregation analysis in congenital adrenal hyperplasia. *Clin Chem* 45(5):625-629 (1999).
- KAPELARI K, GHANAATI Z, WOLLMANN H, VENTZ M, RANKE MB, KOFLER R, PETERS H, A rapid screening for steroid 21-hydroxylase mutations in patients with congenital adrenal hyperplasia. Mutations in brief no. 247. Online. *Hum Mutat* 13:505 (1999).
- KECLARD L, ROMANA M, LAVOCAT E, SAINT-MARTIN C, BERCHEL C, MERAULT G, Sick cell disorder, beta-globin gene cluster haplotypes and alpha-thalassemia in neonates and adults from Guadeloupe. *Am J Hematol* 55(1):24-27 (1997).
- KHACHADURIAN AK, UTHMAN SB, Experiences with the homozygous cases of familial

- hypercholesterolaemia. *Nutr Metabol* 15:132-140 (1973).
- KILLEEN AA, JIDDOU RR, SANE KS, Characterization of frequent polymorphisms in intron 2 of CYP21: application to analysis of segregation of CYP21 alleles *Clin Chem* 44:2410-2415 (1998).
- KLOUDA PT, HARRIS R, PRICE DA, HLA and congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* II: 1046 (1978).
- KLOUDA PT, HARRIS R, PRICE DA, Linkage an association between HLA and 21-hydroxylase deficiency. *J Med Genet* 17: 337-341 (1980).
- KOHN B, LEVINE LS, POLLACK MS, PANG S, LORENZEN F, LEVY D, LERNER A, RONDANINI F, DUPONT B, NEW MI, Late-onset steroid 21-hydroxylase deficiency: a variant of classical congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 51: 817-827 (1982).
- KOPPENS PF, HOOGENBOEZEM T, HALLEY DJ, BARENDSE CA, OOSTENBRINK AJ, DEGENHART HJ, Family studies of the steroid 21-hydroxylase and complement C4 genes define 11 haplotypes in classical congenital adrenal hyperplasia in the Netherlands. *Eur J Pediatr* 151:885-892 (1992).
- KOPPENS PF, HOOGENBOEZEM T, DROP SL, DE MUINCK-KEIZER-SCHRAMA SM, DEGENHART HJ, Aldosterone production despite absence or defectiveness of the CYP21 genes in two patients with salt-losing congenital adrenal hyperplasia caused by steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49(6):815-822 (1998).
- KOPPENS PF, HOOGENBOEZEM T, DEGENHART HJ, CYP21 and CYP21P variability in steroid 21-hydroxylase deficiency patients and in the general population in the Netherlands. *Eur J Hum Genet* 8(11):827-836 (2000).
- KRONE N, BRAUN A, ROSCHER AA, KNORR D, SCHWARZ HP, Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 85(3):1059-1065 (2000).
- KUHNLE U, BULLINGER M, Outcome of congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Surg Int* 12(7):511-515 (1997).

- LAJIC S, WEDELL A, An intron 1 splice mutation and a nonsense mutation (W23X) in CYP21 causing severe congenital adrenal hyperplasia. *Hum Genet* 98:182-184 (1996).
- L'ALLEMAND D, TARDY V, GRUTERS A, SCHNABEL D, KRUDE H, MOREL Y, How a patient homozygous for a 30-kb deletion of the C4-CYP21 genomic region can have a nonclassic form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 85(12):4562-4567 (2000).
- LARON Z, POLLACK MS, ZAMIR R, Late onset 21-hydroxylase deficiency and HLA in the Ashkenazi population: a new allele at the 21-hydroxylase locus. *Hum Immunol* 1: 55-66 (1980).
- LAU IF, Análise molecular de alelos mutantes raros no complexo gênico da enzima 21-hidroxilase. Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (2000).
- LEITERSDORF E, VAN der WESTHUYZEN DR, COETZEE GA, HOBBS HH, Two common low density lipoprotein receptor gene mutations cause familial hypercholesterolemia in Afrikaners. *J Clin Invest* 84:954-961 (1989).
- LEVINE LS, ZACHMANN M, NEW MI, PRADER A, POLLACK MS, O'NEIL GJ, YANG SY, OBERFIELD SE, DUPONT B, Genetic mapping of the 21-hydroxylase deficiency gene within the HLA linkage group. *New Engl J Med* 299:911-915 (1978).
- LEVINE LS, DUPONT B, LORENZEN F, PANG S, POLLACK M, OBERFIELD SE, KOHN B, LERNER A, CACCIARI E, MANTERO F, CASSIO A, SCARONI C, CHIUMELLO G, RONDANINI GF, GARGANTINI L, GIOVANNELLI G, VERDIS R, BARTOLOTTA E, MIGLIORI C, PINTOR C, TATO L, BARBONI F, NEW MI, Genetic and hormonal characterization of cryptic 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 53: 1193-1198 (1981).
- LEVO A, PARTANEN J, Mutation-haplotype analysis of steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency in Finland. Implications for the population history of defective alleles. *Hum Genet* 99:488-497 (1997).
- MEINER V, LANDSBERGER D, BERKMAN N, RESHEF A, SEGAL P, SEFTTEL HC, VAN DER WESTHUYZEN DR, JEENAH MS, COETZEE GA, LEITERSDORF E, A common Lithuanian mutation causing familial hypercholesterolemia in Ashkenazi Jews.

- Am J Hum Genet* 49(2):443-449 (1991).
- MERGHOU B, PERICHON B, MAIER-REDELSPERGER M, DIBENEDETTO SP, SAMPERI P, DUCROCQ R, FEINGOLD N, ELION J, SCHILIRO G, LABIE D, KRISHNAMOORTHY R, Dissection of the association status of two polymorphisms in the beta-globin gene cluster with variations in F-cell number in non-anemic individuals. *Am J Hematol* 56(4):239-243 (1997).
- MIGEON CJ, DONOHUE PA, Congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency. *Endocrinol Metab Clin North Am* 20: 277-296 (1991).
- MILLER WL, LEVINE LS, Molecular and clinical advances in congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr* 111:1-17 (1987).
- MILLER WL, MOREL Y, The molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. *Annu Rev Genet* 23:371-393 (1989).
- MILLER WL, Genetics diagnosis and management of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metabol* 78:241-246 (1991a).
- MILLER WL, Congenital adrenal hyperplasias. *Endocrinol Metabol Clin North Am* 20:721-749 (1991b).
- MILLER WL, Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia: a promising experimental therapy of unproven safety. *Trends Endocrinol Metab* 9:290-292 (1998).
- MOREL Y, ANDRÉ J, URING-LAMBERT B, HAUPTAMANN G, BÉTUEL H, TOSSI M, FOREST MG, DAVID M, BERTRAND J, MILLER WL, Rearrangements and point mutations of P450c21 genes are distinguished by five restriction endonuclease haplotypes identified by a new probing strategy in 57 families with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Invest* 83:527-536 (1989).
- MORNET E, COUILLIN P, KUTTEN F, RAUX MC, WHITE PC, COHEN D, BOUÉ A, DAUSSET J, Associations between restriction fragment length polymorphisms detected with a probe for human 21-hydroxylase (21-OH) and two clinical forms of 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet* 74: 402-408 (1986).
- MORNET E, CRÉTÉ P, KUTTENN F, RAUX-DEMAI MC, BOUÉ J, WHITE PC, BOUÉ A, Distribution of deletions and seven point mutations on cyp21 genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Hum Genet* 48:79-88 (1991).

- MUKHERJEE MB, LU CY, DUCROCQ R, GANGAKHEDKAR RR, COLAH RB, KADAM MD, MOHANTY D, NAGEL RL, KRISHNAMOORTHY R, Effect of alpha-thalassemia on sickle-cell anemia linked to the Arab-Indian haplotype in India. *Am J Hematol* 55(2):104-910 (1997).
- NEW MI, WHITE PC, PANG S, DUPONT B, SPEISER PW, Congenital adrenal hyperplasia and related conditions. In: SCRIVER CR, BEAUDET AC, SLY WS, VALLE D, *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, 6^a ed., McGraw-Hill, New York, 1881-1997. (1989a).
- NEW MI, GERTNER JM, SPEISER PW, DEL BALZO P, Growth and final height in classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Endocr Invest* 12: 91-95 (1989b).
- NEW MI, SPEISER PW, Congenital adrenal hyperplasia. *Paediatric Endocrinology* Charles Book, ed., 441-462 (1989).
- NEW MI, Nonclassical congenital adrenal hyperplasia and the polycystic ovarian syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 687:193-205 (1993).
- NEW MI, CRAWFORD C, Molecular genetics of steroid 21-hydroxylase deficiency, molecular genetics of sex determination. p. 399-438 (1994).
- NEW MI, Steroid 21-hydroxylase deficiency (congenital adrenal hyperplasia). *Am J Med* 98:2S-8S, (1995).
- NEW MI, Diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia. *Annu Ver Med* 49:311-328 (1998).
- NEW MI, WILSON RC, Steroid disorders in children: congenital adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22):12790-12797 (1999).
- O'NEILL GJ, DUPONT B, POLLACK MS, LEVINE LS, NEW MI, Complement C4 allotypes in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: further evidence for different allelic variants at the 21-hydroxylase locus. *Clin Immunol Immunopathol* 23: 312-322 (1982).
- ORDONEZ-SANCHEZ ML, RAMIREZ-JIMENEZ S, LOPEZ-GUTIERREZ AU, RIBA L, GAMBOA-CARDIEL S, CERRILLO-HINOJOSA M, ALTAMIRANO

- USTAMANTE N, CALZADA-LEON R, ROBLES-VALDES C, MENDOZA-ORFIN F, TUSIE-LUNA MT, Molecular genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population: identification of possible new mutations and high prevalence of apparent germ-line mutations. *Hum Genet* 102:170-177 (1998).
- OWERBACH D, CRAWFORD YM, DRAZNIN MB, Direct analysis of CYP21B genes in 21-hydroxylase deficiency using polymerase chain reaction amplification. *Mol Endocrinol* 4: 125-131 (1990).
- OWERBACH D, BALLARD AL, DRAZNIN MB, Salt-wasting congenital Adrenal hyperplasia: detection and characterization of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene, CYP21, using the polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 553-558 (1992).
- OZTURK C, WEI W, PALANIAPPAN L, RUBENFIRE M, , KILLEN AA, Analysis of CYP21 coding polymorphisms in three ethnic populations: further evidence of nonamplifying CYP21 alleles among whites. *Mol Diagn* 5:47-52 (2000).
- PALDOSTTIR, A.; FOSSDAL, R.; ARNASON, A.; EDWARDS, J.H.; JENNSON, O., Heterogeneity of Human C4 Gene Size. A Large intron (6.6 Kb) Is Present in all C4A Genes and Some C4B Genes, *Immunogenetics*, 25:299-304 (1987).
- PANG S, WALLACE MA, HOFMAN L, THULINE HC, DORCHE C, LYON IC, DOBBINS RH, KLING S, FUJIEDA K, SUWA S, Worldwide experience in newborn screening for classic as congenital adrenal hyperplasi due to 21-hydroxylase. *Pediatrics* 81: 866-874 (1988).
- PARTANEN J, KOSHIMIES S, SIPIÄ I, LIPSANEN V, Major-histocompatibility-complex gene markers and restriction-fragment analysis of steroid 21-hydroxylase (CYP21) and complement C4 genes in classical congenital adrenal hyperplasia patients in a single population. *Am J Hum Genet* 44:660:670 (1989).
- PAULINO LC, DE ARAUJO M, GUERRA JR G, MARINI SHLV, DE MELLO MP, Mutation distribution and CYP21/C4 locus variability in Brazilian families with the classical form of the 21-hydroxylase deficiency. *Acta Paediatr* 88:275-283 (1999).

- POLLACK MS, LEVINE LS, ZACHMANN M, PRADER A, NEW MI, OBERFIELD S, DUPONT B, Possible genetic linkage disequilibrium between HLA and the 21-hydroxylase deficiency gene (congenital adrenal hyperplasia). *Trans Proc* 11: 1315-1316 (1979).
- POLLACK MS, LEVINE LS, O'NEILL GJ, HLA linkage and B14,DR1,Bfs haplotype association with the genes for late onset and cryptic 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 33: 540-550 (1981).
- POLYKOV AV, DZENIS IG, BAHAREV VA, EVGRAFOV OV, High frequency of a splice mutation in intron 2 of the 21-hydroxylase gene in Russia could be partly explained by a founder effect. *Hum Mutation* (1996).
- PRENTICE HL, SCHNEIDER PM, STROMINGER JL, C4B gene polymorphism detected in a human cosmid clone. *Immunogenetics* 23(4):274-276 (1986).
- PUCHOLTZ V, FITZSIMMONS JS, GELSTHORPE K, PRATT RF, DOUGHTY RW, HLA and congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* II: 1046-1047 (1978).
- RICHARDS GE, GRUMBACH MM, KAPLAN SL, CONTE FA, The effect of long acting glucocorticoids on menstrual abnormalities in patients with virilizing congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 47(6):1208-1215 (1978).
- RITZÉN EM, Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia: a commentary. *TEM* 9:293-295 (1998).
- RODRIGUES NR, DUNHAN I, YUNG YC, CARROL MC, PORTER RR, CAMPBELL RD, Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. *EMBO J* 6:1653-1661 (1987).
- RUMSBY G, CARROLL MC, PORTER RR, GRANT DB, HJELM M, Deletion of the steroid 21-hydroxylase and complement C4 genes in congenital adrenal hyperplasia. *J Med Genet* 23:204-209 (1986).
- RUMSBY G, FIELDER AHL, HAGUE WM, HONOUR JW, Heterogeneity in the gene locus for steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Med Genet* 25:596-599 (1988).
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2º ed., (1989).

- SCHNEIDER PM, CARROL MC, APER A, RITTNEI C, WHITEHEAD AS, YUNIS EJ, COLTEN HR, Polymorphism of the human complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes. *J Clin Invest* 78: 650-657 (1986).
- SHERMAN SL, ASTON CE, MORTON NE, SPEISER PW, NEW MI, A segregation and linkage study of classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 42: 830-838 (1988).
- SINNOTT P, COLLIER S, COSTIGAN C, DYER PA, HARRIS R, STRACHAN T, Genes by meiotic unequal crossover of a de novo deletion that contributes to steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2107-2111 (1990).
- SINNOTT PJ, COSTIGAN C, DYER PA, HARRIS R, STRACHAN T, Extended MHC haplotypes and CYP21/C4 gene organization in Irish 21-hydroxylase deficiency families. *Hum Genet* 87:361-366 (1991).
- SINNOTT PJ, LIVIERI C, SAMPIETRO M, MARCONI M, HARRIS R, SEVERI F, STRACHAN T, CYP21/C4 gene organisation in Italian 21-hydroxylase deficiency families. *Hum Genet* 88:545-551 (1992).
- SPEISER PW, NEW MI, Genetics of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Trends Genet* 1: 275-278 (1985).
- SPEISER PW, NEW MI, WHITE PC, Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14, DR1. *N Engl J Med* 319:19-23 (1988).
- SPEISER PW, NEW MI, TANNIN GM, PICKERING D, YANG SY, WHITE PC, Genotype of Yupik Eskimos with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet* 88:647-648 (1992a).
- SPEISER P, DUPONT J, ZHU D, SERRAT J, BUEGELEISEN M, TUSIÉ-LUNA M, LESSER M, NEW M, Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 90:584-595 (1992b).
- STOCCO DM, "Intramitochondrial cholesterol transfer". *Biochim Biophys Acta* 1486(1):184-97 (2000).
- STOCCO DM, CLARK BJ, "Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis". *Biochem Pharmacol* 51(3):197-205 (1996).

- STRACHAN T, Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Trends Endocr* 32:68-72 (1989).
- STRACHAN T, Molecular pathology of congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol* 32:373-393 (1990).
- STRACHAN T, WHITE PC, Molecular pathology of steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Steroid Biochem Molec Biol* 40:537-543 (1991).
- STRACHAN T, Molecular pathology of 21-hydroxylase deficiency. *J Inher Metab Dis* 17:430-441 (1994).
- TAJIMA T, FUJIEDA K, NAKAYAMA K, FUJII-KURIYAMA Y, Molecular análisis of patient and carrier genes with congenital steroid 21-hydroxylase deficiency by using polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism. *J Clin Invest* 92:2182-2190 (1993).
- TEE MK, THOMSON A, BRISTOW J, MILLER W, Sequences promoting the transcription of the human XA gene overlapping P450c21A correctly predict the presence of a novel, adrenal-specific, truncated form of tenascin-X. *Genomics* 28:171-178 (1995).
- TUSIE-LUNA MT, TRAKTMAN P, WHITE PC, Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *J Biol Chem* 265:20916-20922 (1990).
- TUSIE-LUNA MT, SPEISER PW, DUMIC M, NEW MI, WHITE PC, A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol Endocrinol* 5: 685-692 (1991).
- TUSIE-LUNA MT, RAMIREZ-JIMENEZ S, ORDONEZ-SANCHEZ ML, CABELLO-VILLEGAS J, ALTAMIRANO-BUSTAMANTE N, CALZADA-LEON R, ROBLES-VALDES C, MENDOZA-MORFIN F, MENDEZ JP, TERAN-GARCIA M, Low frequency of deletion alleles in patients with steroid 21-hydroxylase deficiency in a Mexican population. *Hum Genet* 98:376-379 (1996).
- URABE K, KIMURA A, HARADA F, IWANAGA T, SASAZUKI T, Gene conversion in steroid 21-hydroxylase genes. *Am J Hum Genet* 46:1178-1186 (1990).

- VAN de VELDE H, SERMON K, DE VOS A, LISSENS W, JORIS H, VANDERVORST M, VAN STEIRTEGHEM A, LIEBARES I, Fluorescent diagnosis for 21-hydroxylase in congenital adrenal hyperplasia. *Mol Hum Reprod* 5:691-696 (1999).
- VILLALOBOS-ARAMBULA AR, BUSTOS R, CASAS-CASTANEDA M, GUTIERREZ E, PEREA FJ, THEIN SL, IBARRA B, Beta-thalassemia and beta[A] globin gene haplotypes in Mexican mestizos. *Hum Genet* 99(4):498-500 (1997).
- WEDELL A, RITZEN EM, HAGLUND-STENGLER B, LUTHMAN H, Steroid 21-hydroxylase deficiency: three additional mutated allele and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7232-7236, (1992).
- WEDELL A, LUTHMAN H, Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. *Hum Molec Genet* 2:499-504 (1993).
- WEDELL A, THILÉN A, RITZÉN E M, STENGLER B, LUTHAMAN H, Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab* 78:1145-1152 (1994).
- WEDELL A, STENGLER B, LUTHMAN H, Characterization of mutations on the rare duplicated C4/CYP21 haplotype in steroid 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet* 94:50-54 (1994).
- WEDELL A, Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency): implications for diagnosis, prognosis and treatment. *Acta Paediatr* 87:159-164 (1998).
- WERKMEISTER JW, NEW MI, DUPONT B, WHITE PC, Frequent deletion and duplication of the steroid 21-hydroxylase genes. *Am J Hum Genet* 39:461-469 (1986).
- WHITE PC, NEW MI, DUPONT B, HLA-likeage congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:7505-7509, (1984a).

- WHITE PC, NEW MI, DUPONT B, Cloning and expression of cDNA encoding a bovine adrenal cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1986, (1984b).
- WHITE PC, GROSSBERGER D, ONUFER BJ, CHAPLIN DD, NEW MI, DUPONT B, STROMINGER JL, Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:1089-1093, (1985).
- WHITE PC, NEW MI, DUPONT B, Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5111-5115, (1986).
- WHITE PC, NEW MI, DUPONT B, Congenital adrenal hyperplasia. Part I. *N Engl J Med* 316:1519-1524 (1987a).
- WHITE PC, NEW MI, DUPONT B, Congenital adrenal hyperplasia. Part II. *N Engl J Med* 316:1580-1586 (1987b).
- WHITE PC, VITEK A, DUPONT B, NEW MI, Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4436-4440, (1988).
- WHITE PC, CRAWFORD C, NEW MI, Steroid 21-hydroxylase deficiency. *Curr Opinion Pediat* 1:436-440, (1989).
- 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, Genetic diseases of steroid metabolism. *Vitamins and Hormones* 49:131-195 (1994).
- WHITE PC, SPEISER PW, “Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency”. *Endocrine Reviews* 21(3):245-291 (2000).
- WILSON RC, WEI JQ, CHENG KC, MERCADO AB, NEW MI, Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the 21-hydroxylase gene. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1635-1640 (1995a).
- WILSON R, MERCADO A, CHENG K, NEW M, Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2322-2329 (1995b).

- WITCHEL SF, BHAMIDIPATI DK, HOFFMAM EP, COHEN JF, Phenotypic heterogeneity associated with the splicing mutation in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4081-4088 (1996).
- WITCHEL SF, SMITH R, CRIVELLARO CE, MANNA TD, DICHTCHEKENIAN V, SETIAN N, DAMIANI D, *CYP21* mutation in brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet* 106:414-419 (2000).
- WU DA, CHUNG BC, Mutations of P450c21 (steroid 21-hydroxylase) at Cys428, Val281, and Ser268 result in complete, partial, or no loss of enzymatic activity, respectively. *J Clin Invest* 88:519-523 (1991).
- ZUBER MX, JOHN ME, OKAMURA T, SIMPSON ER, WATERMAN MR, Bovine a adrenocortical cytochrome P-45017: regulation of gene expression by ACTH and elucidation of primary sequence. *J Biol Chem* 261: 2475 (1986).