

BC/27781
IB/80091

T/UNICAMP

Ar15_e

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

ESTUDO DA ORGANIZAÇÃO MOLECULAR
DO "CLUSTER" GÊNICO CYP21 E C4 EM
FAMÍLIAS COM A FORMA CLÁSSICA DE
DEFICIÊNCIA DA 21-HIDROXILASE NO
BRASIL

Fste exemplar corresponde à redação final
da tese de doutorado (ou candidato a)
Marcela de Araujo
e aprovada pela Comissão Julgadora.

2/5/96 Maricilda Palandi de Mello

MARCELA DE ARAUJO

Orientadora: Profa. Dra. MARICILDA PALANDI DE MELLO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Biológicas, área de concentração Genética Humana.

CAMPINAS
1996

CM-00088658-9

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	Ar 15e
V. F.	
TERMO B.	27.7.81
PROC.	667.196
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	22.05.96
N.º CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

Ar15e Araujo, Marcela de
Estudo da organização molecular do "cluster" gênico CYP21 e C4 em famílias com a forma clássica de deficiência da 21-hidroxilase no Brasil / Marcela de Araujo. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Maricilda Palandi de Mello.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

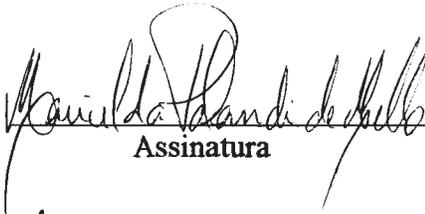
1. Hiperplasia. 2. Hormônios da hipófise. 3. Glândula pituitária. 4. Glicocorticóides. 5. Hormônios sexuais.
I. Mello, Maricilda Palandi de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 02 de maio de 1996

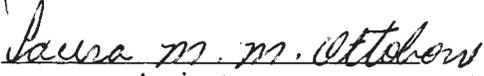
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

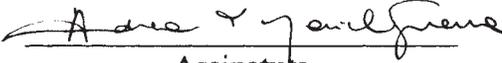
Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni


Assinatura

Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra


Assinatura

SUPLENTE:

Profa. Dra. Christine Hackel

Assinatura

APROVADA

ERRATA

Na página 80, lê-se C4A/C4B 6,4 em lugar de C4A/C4B 5,4.

Na página 88, lê-se 0 em lugar de 4. E, lê-se 22,2 em lugar de 0.

*ao meu irmão,
Maurício,
in memoriam*

À minha orientadora, Maricilda, por me acolher no Laboratório de pesquisa, pela amizade, incentivo e pela oportunidade de realização deste trabalho.

A Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni pelo entusiasmo na discussão do trabalho e por todas as sugestões apresentadas.

A Dra. Denise Pontes Cavalcanti pela leitura criteriosa do trabalho e pelas sugestões pertinentes.

A Dra. Christine Hackel pela disposição demonstrada na leitura da tese e pelas correções criteriosas.

A Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra por ter aceito participar da Banca de tese.

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

À minha amiguinha San-San Kátia-Carla pelo companheirismo, apoio moral, sentimental e tudo aquilo que eu sinto mas não consigo por no papel.

À praga que dizimou o Egito, EDMilson-Ricardo, desde nossos tempos da 'social' biblioteca até os dias de hoje como meu fiel companheiro.

Ao meu meio-irmão Lilão, pelas horas difíceis, pela amizade, pelo apoio dentro e fora do Lab, e em cima do micro (que digitou algumas partes do trabalho); e ao seu filho Branquinho, que nos levou para cima e para baixo (do morro do CBMEG).

À fada Madinha que embasou este trabalho com seus dotes alquímicos nas soluções mágicas que usei. E também ao seu delicioso e incomparável café - e o mais importante: ao seu amigo e fofinho ombro !

A Marinha por ter me ajudado em parte do trabalho, pela amizade, pela força que me deu durante esses anos que passamos juntas.

A Luzinha, pelas discussões frutíferas que tivemos, a Ivy, caçulinha do Lab e à mais nova componente da trupe, Jujuba, pela amizade e carinho.

A Isa e a Edi pelo apoio técnico que me deram logo após a minha chegada.

A amiga Rosângela pelas dicas e pelo apoio fotográfico e a Nair por sempre dar a "maior força".

Às meninas da secretaria, Claudinha, Sandra e Tânia, muito obrigada.

Às enfermeiras Márcia, Cristina, e Da. Lourdes pela atenção e pela coleta dos sangues no Ambulatório de Pediatria.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. E, em especial, àqueles que compartilharam as dificuldades para a sua conclusão.

Aos amigos Paulinho, Tereza, "Gordo", Eneida, Toninho, Nilma e Carlos do Departamento de Genética Médica, FCM, Unicamp.

A CAPES, e aos meus pais, pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, José Pereira e Azélia, que com amor e compreensão sempre me apoiaram.

A minha irmã Gisela, que sempre esteve comigo nas horas difíceis.

ABREVIACOES

$\Delta 4$ - Δ^4 androstenediona

3 β -HSD - 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase

17-HOP - 17- hidroxiprogesterona

21-OHase - enzima 21-hidroxilase

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

Amp - ampicilina

C4 - genes para o quarto componente da via clássica do complemento

cDNA - ácido desoxiribonucleico complementar

cen - centrmero

CRH - hormônio liberador de corticotrofina

CYP21A - pseudogene da enzima 21-hidroxilase

CYP21B - gene da enzima 21-hidroxilase

DHEA - desidroepiandrosterona

DNA - cido desoxiribonucleico

DOCA - desoxicorticosterona

dNTPs - desoxiribonucleotdeos trifosfatos

DO - densidade tica

EDTA - cido 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

RNA - cido ribonucleico

rpm - rotações por minuto

SDS - dodecil sulfato de sódio

STE - sódio/tris/EDTA

TAE - tris/cido/EDTA

TBE - tris/ácido bórico/EDTA

TE - tris-EDTA

Tel - telômero

tris - tris-(hidroximetil)- aminometano

UV - ultra-violeta

VS - virilizante simples

ÍNDICE

Introdução.....	1
1. Hiperplasia congênita da adrenal.....	2
1.1. A esteroidogênese.....	2
1.2. Distúrbios enzimáticos na HCA.....	4
1.2.1. Deficiência da 3 β -HSD.....	6
1.2.2. Deficiência da 17 α -hidroxilase.....	7
1.2.3. Deficiência da 21-hidroxilase (21-OHase).....	7
1.2.4. Deficiência da 11 β -hidroxilase.....	11
2. A HCA e sua ligação com o sistema HLA.....	12
3. O “cluster” gênico da enzima 21-OHase.....	13
3.1. A enzima 21-OHase.....	13
3.2. Mapeamento e clonagem do gene da 21-OHase.....	14
3.3. Mapa de restrição.....	17
4. Rearranjos no “cluster” do gene da 21-OHase e HCA.....	18
5. Tratamento da HCA e diagnóstico pré-natal.....	25
5.1. Tratamento.....	25
5.2. Diagnóstico pré-natal.....	26
Objetivos.....	29
Material e métodos.....	31
1. Casuística.....	32
2. Coleta das amostras.....	32
3. Extração de DNA genômico e a partir de sangue periférico.....	32
3.1. Extração com uréia.....	33
3.2. Extração com proteinase K a partir de sangue total.....	34
4. Sondas utilizadas.....	36
5. Transformação de bactérias.....	36
5.1. Preparo de células competentes.....	36
5.2. Transformação bacteriana.....	37
5.3. Preparo do estoque de bactérias.....	38
5.4. Mini-preparação de plasmídeo.....	38
6. Extração de DNA de plasmídeo em larga escala.....	39

6.1. Purificação do DNA plasmidial.....	40
7. Preparo do fragmento de interesse.....	41
7.1. Eletroeluição.....	41
7.2. Congelamento.....	42
7.3. Papel DEAE.....	42
8. Análise do DNA genômico pelo método de “Southern blot”.....	43
8.1. Digestão do DNA genômico com enzimas de restrição.....	43
8.2. Preparo do gel e eletroforese.....	44
8.3. Transferência do DNA do gel para suporte sólido.....	45
8.3.1. Transferência alcalina.....	45
8.3.2. Transferência salina.....	46
9. Marcação das sondas.....	47
10. Hibridização.....	48
10.1. Pré-hibridização.....	48
10.2. Hibridização.....	49
11. Lavagem dos filtros.....	50
12. Auto-radiografia.....	50
13. Densitometria.....	50
Resultados.....	51
1. Rearranjos gênicos no “cluster” C4/CYP21 em pacientes com a forma clássica de HCA.....	52
1.1. Análise dos padrões de restrição dos indivíduos afetados.....	54
1.2. Análise das intensidades relativas do padrão de bandas por densitometria.....	57
2. Variação no número de unidades gênicas nos indivíduos normais portadores obrigatórios.....	61
3. Caracterização de alelos afetados por estudo de famílias.....	64
4. Padrões de restrição diferentes.....	69
5. Distribuição dos rearranjos.....	74
Discussão.....	76
1. Haplótipos com rearranjos.....	77
2. Estudo de famílias.....	81
3. Famílias que discordam entre seus padrões de hibridização.....	83

4. Correlação do genótipo com fenótipo.....	85
5. Comparação com outras populações.....	87
Bibliografia.....	89
Resumo.....	107
Abstract.....	109
Apêndice.....	111

INTRODUÇÃO

1. Hiperplasia congênita da adrenal

1.1. A esteroidogênese

As glândulas supra-renais ou adrenais, situam-se nos pólos superiores de ambos os rins, são compostas pela medula (menor componente) e pelo córtex (80% da glândula). O córtex é formado por três camadas celulares: a glomerular que é a zona mais externa, a seguir encontra-se a zona fasciculada e a mais interna é a reticular. No córtex adrenal é produzido e secretado um grupo de hormônios, que são sintetizados a partir do esteróide colesterol, denominados corticoesteróides. 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 no córtex da adrenal podem ser secretados em grandes quantidades resultando, então, em efeitos masculinizantes (New e Speiser, 1989; Calliari, 1992; Miller, 1991; New, 1994).

Os mineralocorticóides afetam especificamente os eletrólitos (sódio e potássio) dos líquidos extracelulares, enquanto que os glicocorticóides mostram um importante efeito no controle da glicemia. A aldosterona, secretada pela zona glomerulosa do córtex da adrenal, é o mineralocorticóide mais importante e possui, principalmente, a atividade retentora de sal (Klouda e col., 1978; Gaunt, 1971); o cortisol, secretado na zona fascicular, é o principal glicocorticóide (New e Speiser, 1989). Logo abaixo da zona fascicular, localiza-se a zona reticular de onde são secretados os andrógenos (Guyton, 1986; Calliari, 1992).

A síntese do cortisol é controlada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), secretado pela hipófise e pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH), secretado pelo hipotálamo. O nível circulante de cortisol plasmático, por sua vez, efetua o controle de secreção de ACTH e CRH num processo chamado de retrocontrole ou “feedback” negativo exercido sobre o sistema hipotalâmico-hipofisário-adrenal (Gutai e col., 1977; White e col., 1987a; New, 1995; Calliari, 1992; New e Speiser, 1989). Desta forma, sempre que a concentração de cortisol se eleva demasiadamente, o retrocontrole reduz, automaticamente, a secreção de ACTH e CRH, reduzindo, assim,consequentemente a formação de cortisol (figura 1A). Do mesmo modo, caso o nível de cortisol seja muito reduzido, a falta do retrocontrole resulta em maior liberação de ACTH e CRH, aumentando o cortisol (Guyton, 1986; Calliari, 1992).

Do ponto de vista bioquímico o cortisol é sintetizado a partir do colesterol no córtex da adrenal através de várias reações catalisadas por cinco enzimas, são elas: colesterol 20,22- desmolase, 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD), 17 α -hidroxilase, 21-hidroxilase (21-OHase) e 11 β -hidroxilase (White e col., 1987a; Helmberg, 1993; New, 1994).

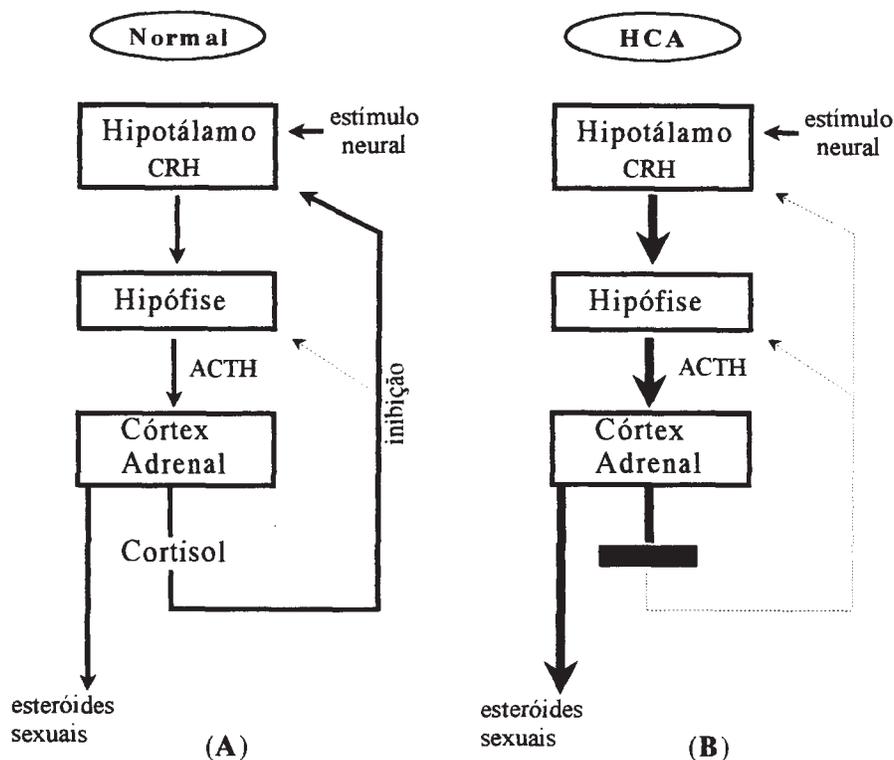


Figura 1 - Retrocontrole negativo do cortisol sobre o eixo hipotálamo-hipofisário em indivíduos normais e portadores de HCA.

A Hiperplasia Congênita da Adrenal (HCA) (*DeCrechio, 1865) é definida como um erro inato do metabolismo dos esteróides adrenais, no qual a produção de cortisol está prejudicada por uma deficiência de qualquer uma das enzimas do ciclo. Os baixos níveis de

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

cortisol provocam um aumento da secreção de ACTH e CRH decorrente da falta do sistema de retrocontrole que, por sua vez, acarretará uma hiperplasia da glândula e um grande acúmulo dos hormônios anteriores ao bloqueio (figura 1B). Assim, o quadro clínico relaciona-se tanto aos hormônios em excesso pré bloqueio enzimático quanto aos deficientes pós bloqueio (White e col., 1987a; New e Speiser, 1989; Migeon e Donohoue, 1991; White e New, 1992).

Deste modo o termo HCA, refere-se às alterações histológicas devidas à hiperatividade glandular crônica, resultante da impossibilidade do córtex adrenal em secretar níveis plasmáticos normais de cortisol como resposta ao estímulo do ACTH e CRH. Bioquimicamente, isso se origina da redução ou ausência de atividade enzimática em um dos estágios da síntese de esteróides. Cada deficiência enzimática produz uma alteração característica tanto no padrão de hormônios adrenais quanto nos níveis de precursores. Assim, graus variáveis de desequilíbrio hormonal, produzem ampla variação de defeitos clínicos evidenciáveis nos distúrbios metabólicos e, também nas anormalidades do desenvolvimento (Pang e col., 1979).

1.2. Distúrbios enzimáticos na HCA

Embora existam várias formas de HCA, todas têm uma etiologia comum: a deficiência de uma das enzimas necessárias para a biossíntese do cortisol. Para cada defeito enzimático há a diminuição da secreção de cortisol com aumento do ACTH e CRH (Migeon, 1989).

A figura 2 mostra um resumo do mecanismo da esteroidogênese da adrenal. Esse processo é ativado pela ligação do ACTH aos receptores da membrana externa das células do córtex adrenal ativando a adenil ciclase que, por sua vez, estimula uma proteína quinase dependente de AMP cíclico (cAMP), a qual fosforila a colesterol éster hidrolase, aumentando portanto, sua atividade. O colesterol das gotas lipídicas citoplasmáticas é imobilizado pela colesterol éster hidrolase e transportado para a mitocôndria por uma “proteína carregadora de esteróis” (White e col., 1987a). O colesterol é então metabolizado à pregnenolona pela primeira enzima da biossíntese do cortisol, a colesterol 20,22 desmolase (Pedersen e col., 1987). Esse passo é limitante para o ciclo e a pregnenolona é, assim, o precursor comum para síntese de mineralocorticóides, glicocorticóides e esteróides sexuais (New e Speiser, 1989; Chung e col., 1986).

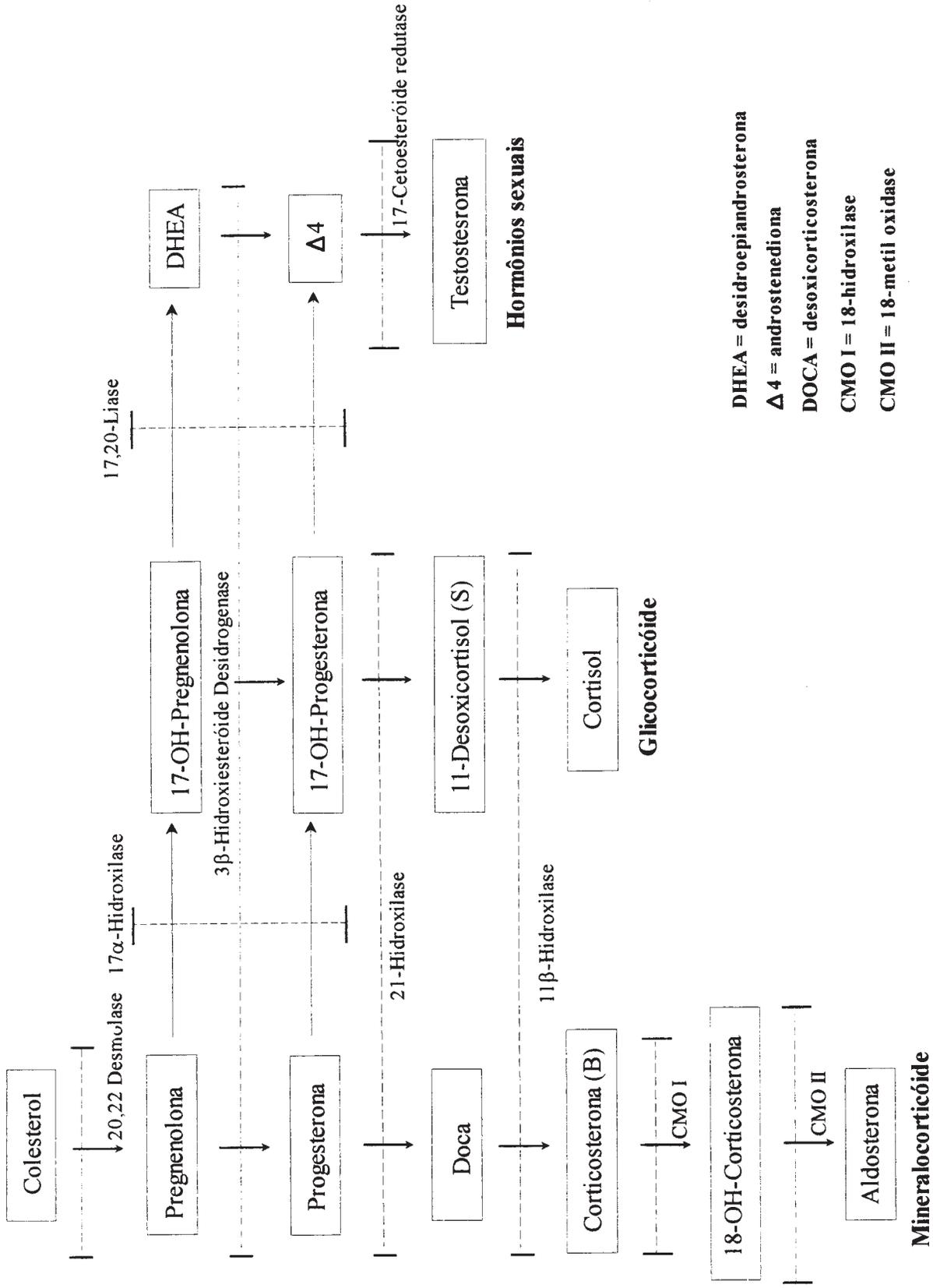


Figura 2 - Esteroidogênese da Adrenal. Caminhos da biossíntese do colesterol para mineralocorticóide (aldosterona), glicocorticóide (cortisol) e hormônios sexuais (testosterona).

Na via metabólica dos mineralocorticóides, a pregnenolona é convertida por vários passos enzimáticos até a aldosterona, fazendo parte desta via as enzimas 3β -HSD, 21-hidroxilase e 11β -hidroxilase e, ainda, as enzimas corticosterona metil oxidase tipos I (CMO I ou 18-hidroxilase) e II (CMO II ou 18-metil oxidase) (Gaunt e col., 1971; New e Speiser, 1989).

Na via metabólica dos glicocorticóides, a pregnenolona e a 17-OHP são convertidas a cortisol por quatro passos enzimáticos: 3β -HSD, 17α -hidroxilase, 21-hidroxilase e 11β -hidroxilase (Finkelstein e Shaefer, 1979; White e col., 1986; New e Speiser, 1989).

Na via metabólica dos esteróides sexuais, a desidroepiandrosterona (DHEA), resulta da clivagem da 17-hidroxipregnenolona pela $17,20$ -liase. A DHEA é convertida para $\Delta 4$ -androstenediona ($\Delta 4$) pela enzima 3β -HSD (Zuber e col., 1986). A $\Delta 4$ é reduzida para testosterona, pela enzima 17-cetoesteróide redutase (New e Speiser, 1989).

1.2.1 - Deficiência da 3β -HSD

A deficiência da 3β -HSD foi primeiro descrita por Bongiovanni em 1962 (*Bongiovanni, 1962). É uma doença rara sendo transmitida por herança autossômica recessiva. Como o bloqueio ocorre no início das três vias de síntese (figura 2), pode haver uma menor produção de aldosterona, cortisol e andrógenos (Bongiovanni, 1984).

Ocorre acúmulo predominante de DHEA que, pela sua fraca ação androgênica, pode não virilizar completamente o feto masculino, que nascerá com genitália ambígua (falo pequeno, criptorquidia, fusão lábio-escrotal incompleta e com graus variáveis de hipospádia). O feto feminino nascerá com alterações discretas geralmente restritas a uma clitoromegalia (Rhéaume e col., 1994; Pang e col., 1983; Miller, 1991). A razão da menor masculinização da genitália externa dos fetos de ambos os sexos, decorre do fato de a 3β -HSD ser uma enzima essencial nos primeiros passos da biossíntese dos esteróides inclusive nos testículos e nos ovários, pois ela é necessária à transformação da DHEA em androstenediona (Martin e col., 1980; Parks e col., 1971; Zachmann e col., 1979). A 3β -HSD também é necessária à transformação de pregnenolona em progesterona, nesta via a deficiência dessa enzima determina a diminuição acentuada de hormônios necessários à

*BONGIOVANNI, A. M., The adrenogenital syndrome with deficiency of 3-hydroxysteroid-dehydrogenase. *J. Clin. Invest.*, 41: 2086-2092 (1962), apud NEW, M. I. & SPEISER, P. W., 1989.

retenção de sódio, aumentando a taxa de óbitos decorrentes do desequilíbrio hidroeletrolítico. Dependendo do grau de comprometimento da atividade da enzima, a perda salina pode ou não estar presente (De Perettei e col., 1980; Jänne e col., 1970; Jänne e col., 1974; Kenny e col., 1971; Schneider e col., 1975; Sanchez e col., 1994; Chang e col., 1993). Pode apresentar-se também numa forma tardia que se caracteriza por sinais de virilização como hirsutismo, acne, aumento do clitóris e irregularidade menstrual (Calliari, 1992; Pang e col., 1985a; Pang e col., 1983; Rosenfield e col., 1980; Lobo e col., 1980).

1.2.2- Deficiência da 17 α -hidroxilase

A deficiência de 17 α -hidroxilase é uma forma rara de HCA, sendo que pouco mais de 120 casos têm sido relatados (para revisão: Yanase e col., 1991). É de herança autossômica recessiva. O bloqueio da 17 α -hidroxilase diminui a produção de todos os glicocorticóides e esteróides sexuais (Biglieri e col., 1966; Zachamann e Prader., 1984; Mantero e col., 1984), com isso o “feedback” negativo do hipotálamo e hipófise fica impossibilitado acarretando um excesso na secreção de ACTH. Há, então, um grau baixo de virilização em indivíduos do sexo masculino com freqüente ginecomastia. As meninas apresentam infantilismo sexual, que normalmente não é evidenciado até a adolescência, e além disso apresentam amenorréia primária (Alvarez e col., 1973; Goldsmith e col., 1976; Abad e col., 1980; Jones e col., 1982). Esse bloqueio causa um desvio para a via de síntese de mineralocorticóides resultando em níveis excessivos da DOCA e aldosterona o que leva à hipertensão (Mantero e col., 1984; White e col., 1987a).

1.2.3- Deficiência da 21-hidroxilase (21-OHase)

A deficiência da 21-OHase é causa mais freqüente de HCA contribuindo com, mais de 95% dos casos (White e col., 1987a, 1987b; Miller e Levine, 1987; New e col., 1989b; New e col., 1983). Essa enzima participa na síntese do cortisol e aldosterona na adrenal (White e col., 1989). Na falta da 21-OHase, a 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) não é convertida para 11-desoxicortisol, deixando de sintetisar o cortisol eficientemente. Em consequência, há perda do “feedback” negativo que resulta em elevados níveis de ACTH, levando à super produção e acúmulo dos compostos que antecedem o bloqueio: a progesterona (P) na via dos mineralocorticóides e a 17-OHP na via dos glicocorticóides

*BIGLIERI, E. G.; HERRON, M. A. & BRUST, N., 17-hydroxylation deficiency in man. *J. Clin. Invest.*, 45: 1946-1954 (1966), apud NEW, M. I. & SPEISER, P. W., 1989.

(*Kowarski e col., 1965); em resposta ao acúmulo destes compostos, há um desvio da síntese para o sentido de uma maior secreção de andrógenos: a DHEA e a androstenediona que são convertidas para a testosterona. Altas concentrações plasmáticas desses andrógenos no início da gestação causam virilização da genitália externa em fetos femininos (Calliari, 1992).

Essa deficiência é clinicamente classificada em duas formas: a **forma clássica**, na qual ocorre o bloqueio total ou parcial da atividade enzimática, e está presente ao nascimento e a **forma não clássica** (Speiser e New, 1985), que envolve somente bloqueio parcial da atividade enzimática, de aparecimento após o nascimento.

Em 1956, o grupo do Dr. Barton Childs (**Childs e col., 1956) demonstrou que a forma clássica de HCA devido à deficiência da 21-OHase ocorria frequentemente em irmãos, independentemente do sexo, sendo filhos de pais não afetados. Concluíram, então, que era uma doença genética transmitida de forma autossômica recessiva, e que os pacientes eram homozigotos para o gene mutante e seus pais, portadores obrigatórios. Naquela época, a frequência do gene mutante foi calculada como sendo de 1:125. Entretanto, este cálculo foi subestimado devido à ineficiência de caracterização de todos os casos. Levantamentos mais recentes nos têm demonstrado que a frequência do gene mutante é de 1:50 (Pang e col., 1988). Isto significa que a probabilidade de dois indivíduos heterozigotos se casarem é de 1 em 2.500. Como a probabilidade de uma família desse tipo ter uma criança homozigota (afetada) é de 1:4, a frequência calculada de HCA é de aproximadamente 1:10.000 a 1:15.000 nascimentos nas populações brancas (Pang e col., 1988). Entretanto, este cálculo exclui dois grupos, os Esquimós Yupik do Alasca com uma frequência de 1:700 (Speiser e col., 1992a) e uma população de Reunião, uma ilha Francesa no Oceano Índico leste de Madagascar com a incidência de 1:2.000, isto se deve provavelmente aos casamentos consanguíneos (**Hirschfeld e Fleshmen, 1969; Pang e col., 1982; Pang e col., 1988; White e col., 1987a; White e col., 1989; New e col., 1989a;

*KOWARSKI, A.; FINKELSTEIN, J. W.; SPAULDING, J. S.; HOLMAN, G. H. & MIGEON, C. J., Aldosterone secretion rate in congenital adrenal hyperplasia: a discussion of the theories on the pathogenesis of the salt-losing form of the syndrome. *J. Clin. Invest.*, 44: 1505 (1965), apud MIGEON, C. J. & DONOHOUE, P. A., 1991.

**CHILDS, B.; GRUMBACH, M. M. & VAN WYK, J. J., Virilizing adrenal hyperplasia: a genetic and hormonal study. *J. Clin. Invest.*, 35: 213 (1956). apud MIGEON, C. J. & DONOHOUE, A., 1991.

***HIRSCHFELD, A. J. & FLESHMEN, J. K., An unusually high incidence of congenital adrenal hyperplasia. *J. Pediatr.*, 75: 492-494 (1969). apud NEW, M. I. & SPEISER, P. W., 1989.

Helmberg, 1993). A forma não clássica tem sido observada em uma alta frequência em populações brancas (1:100), aumentando a frequência em grupos étnicos (1:27 em judeus Ashkenazi, 1:53 em hispânicos, 1:63 em iugoslavos e 1:333 em italianos) (Speiser e col., 1985; Sherman e col., 1988; Dumic e col., 1990).

A intensidade do bloqueio enzimático pode ser variável e portanto a genitália externa pode se apresentar com graus diferentes de virilização: desde uma clitoromegalia até uma fusão completa de pregas urogenitais, assemelhando-se a uma genitália do tipo masculina, porém com gônadas não palpáveis. Esses graus de virilização, mostrados na figura 3 foram descritos por Prader (1958) (Richards e col., 1978; Rumsby e col., 1986; Miller, 1991; Calliari, 1992). Em contraste, o desenvolvimento dos ovários, útero e porção superior da vagina, se processa normalmente, não sendo afetado por andrógenos. Em casos extremos, a masculinização da genitália externa pode fazer com que tais recém-nascidos do sexo feminino sejam consideradas como meninos criptorquídicos e criadas como tal, o que é altamente inapropriado para sua formação psicossocial (Mulaikal e col., 1987). 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, 1991; New, 1995).

TIPO DE GENITAL (PRADER)

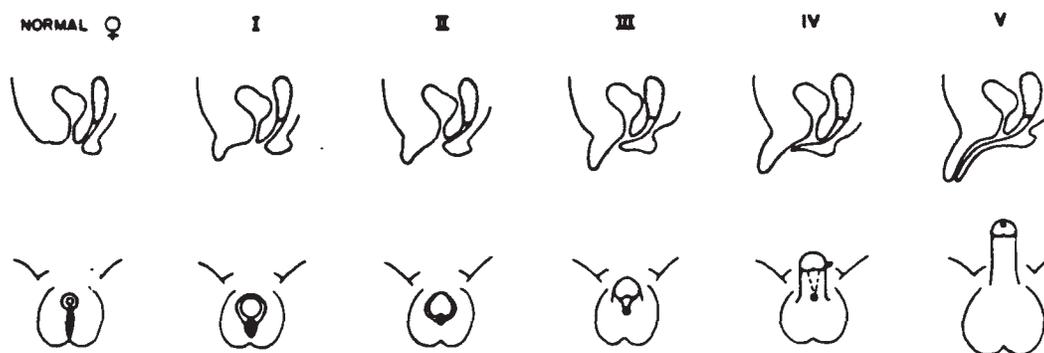


Figura 3 - Virilização da genitália externa. Um espectro contínuo é mostrado desde uma genitália feminina normal até uma masculina normal, em um corte sagital (acima) e uma visão perineal (abaixo). Os vários graus de virilização da genitália externa, são mostrados nos diagramas I-V. Obtido de MILLER, W. L., Congenital adrenal hyperplasias. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 20: 721-749 (1991).

Em ambos os sexos a secreção excessiva de andrógeno pela adrenal resulta em uma pseudo-puberdade precoce, rápido crescimento somático, com avanço da maturação esquelética durante os primeiros anos de vida, e conseqüentemente um adulto com baixa estatura, devido a fusão precoce das epífises quando não tratado precoce e corretamente. (DiMartino e col., 1986).

Indivíduos do sexo masculino e feminino quando não tratados, além dos problemas acima citados, podem 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 e col., 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 e col., 1978). No sexo masculino, altos níveis de andrógenos na adrenal podem suprimir a secreção de gonadotrofinas. Mas, embora os níveis totais de andrógenos circulantes sejam elevados, os níveis de testosterona nos testículos podem estar num nível subnormal, resultando em uma espermatogênese deficiente (Urban e col., 1978; Wischusen e col., 1981).

A forma clássica, por sua vez tem sido subdividida em duas variantes, uma delas é a **forma perdedora de sal (PS)**, na qual os indivíduos afetados, além da virilização, apresentam perda de sal devido à deficiência da síntese de aldosterona, na outra forma os pacientes não apresentam perda de sal, sendo chamada de **virilizante simples (VS)** (New e Levine, 1984; New, 1994).

O distúrbio clássico da deficiência da 21-OHase perdedora de sal, ocorre em cerca de 2/3 dos casos. Nessa forma, além dos efeitos virilizantes devidos ao excesso de andrógeno, ocorre uma poliúria osmótica por aumento de excreção de sódio urinário, conseqüente de uma produção deficiente de mineralocorticóide, principalmente da aldosterona (Fife e Rappaport, 1983). Muitas vezes a poliúria não é notada pelos pais e evolui com desidratação, vômitos e acidose metabólica (New, 1995; Calliari, 1989; Miller, 1991; White e col., 1987a). Pacientes não tratados podem ir a óbito nas primeiras semanas de vida pela incapacidade de reter o sódio (New e Levine, 1984). Cerca de 1/3 dos casos de deficiência da 21-OHase são da forma VS que podem sintetizar quantidades suficientes de aldosterona (Strachan, 1989; 1990). Isso é possível considerando-se que em base molar, a razão de síntese de aldosterona e cortisol é de 1 para 1.000, por isso a

redução parcial da atividade enzimática pode levar a apenas sintomas de deficiência de cortisol (Helmberg, 1993).

Pacientes com a deficiência da 21-OHase 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 e col., 1980; Kohn e col., 1982). Essas manifestações podem variar em gravidade, deste modo pode ser difícil distinguir clinicamente indivíduos masculinos com a doença virilizante simples de indivíduos masculinos com a forma não clássica da deficiência. Em contraste, alguns indivíduos, embora apresentem anormalidades bioquímicas semelhante da forma não clássica da deficiência, permanecem assintomáticos (forma “oculta” ou “críptica”) (Levine e col., 1981). Os pacientes com a forma não-clássica demonstram aparecimento de pilificação pubiana precoce, pêlos axilares, hirsutismo, acne, irregularidade menstrual e/ou infertilidade. Concomitantemente pode haver aceleração no ritmo de crescimento e avanço da idade óssea (Calliari, 1992; Migeon e col., 1980; Speiser e New, 1985; White e col., 1985; New e col., 1989a; Feldman, 1992; New, 1994).

1.2.4. Deficiência da 11 β -hidroxilase

A deficiência da 11 β -hidroxilase é a segunda causa mais freqüente de HCA, depois da deficiência da 21-OHase; é responsável por aproximadamente 5% a 8% dos casos. É de origem autossômica recessiva, ocorrendo aproximadamente 1 em 100.000 nascimentos na população branca em geral (Zachmann e col., 1983; Bongiovanni, 1978; New e col., 1983; Rosler e col., 1982; White e col., 1987b; Helmberg, 1993). O bloqueio enzimático determina uma redução da síntese de aldosterona e do cortisol, com acúmulo da desoxicorticosterona (DOCA), na via do mineralocorticóide, e de 11-desoxicortisol (composto S), na via do glicocorticóide. O acúmulo da DOCA promove uma retenção de sódio e água, levando ao aumento da volemia e hipertensão arterial em ambos os sexos (Kowarski e col., 1968; Zadik e col., 1984; Sonino e col., 1980). Os compostos acumulados anteriores ao bloqueio causam um desvio aumentando a produção de andrógenos que leva à virilização da genitália externa nos mesmos moldes que a deficiência da 21-OHase. A forma tardia da deficiência da 11 β -hidroxilase é caracterizada por leves anormalidades bioquímicas e sintomas de excesso de andrógenos, semelhantes aqueles observados na forma não clássica da deficiência da 21-OHase (Calliari, 1992).

Nesse trabalho iremos nos ater ao estudo da HCA devido à deficiência da 21-OHase pois se trata de uma das patologias endócrinas mais importantes, por sua alta frequência, gravidade e pelas complicações psicossociais da inadequação sexual em indivíduos do sexo feminino. Devido a estes motivos esse tipo de hiperplasia tem sido também o mais estudado ao nível molecular.

2. A HCA e sua ligação com o sistema HLA

O complexo principal de histocompatibilidade, designado complexo HLA (“Human Leukocyte Antigen”) ocupa um segmento de aproximadamente 3.500 quilobases (kb) no braço curto do cromossomo 6 (Dupont e col., 1977; Miller, 1988). O complexo HLA contém quatro principais *loci* contendo antígenos de transplantes. O complexo gênico HLA-A, -B e -C codifica as moléculas dos antígenos de classe I (Steinmetz and Hood, 1983), e as sub-regiões de genes HLA-DR, -DQ e -DP, determinam as moléculas dos antígenos de classe II (Kaufmann e col., 1984), cujos produtos gênicos são glicoproteínas de superfícies altamente polimórficas envolvidas na discriminação de “próprio” e “não-próprio” pelo sistema imune. A região de classe III (Chaplin e col., 1983; Carrol e col., 1983; Carrol e col., 1984a; Carrol e col., 1984b) do HLA, foi mapeada entre os antígenos das classes I e II (Olaisen e col., 1983) e contém genes para o segundo e o quarto componentes (C2 e C4) da via clássica do complemento e para o fator propedina B (Bf) (Robson e Lamm, 1984; O’Neill e col., 1978).

Os estudos de populações e de famílias afetadas com HCA devido à deficiência da 21-OHase demonstraram um desequilíbrio de ligação de certos haplótipos sorológicos do HLA e várias condições de doenças, incluindo alotipos característicos do complemento C4. A ligação entre o complexo HLA e a HCA devido à deficiência da 21-OHase foi inicialmente relatada por Dupont e col. em 1977 e subseqüentemente, confirmada em uma grande série de famílias (Levine e col., 1978; Klouda e col., 1980; Pollack e col., 1979b; Pucholtz e col., 1978). 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 e col., 1982). Esse haplótipo também carregava um alelo nulo em um dos *loci* C4, mas como não era possível distinguir eletroforeticamente entre os padrões C4A*Q0(nulo); C4B*3 e C4A*1; C4B*Q0, portanto não ficou claro se o alelo nulo era do *locus* C4A ou C4B. Algum tempo depois, foi demonstrado que esse alelo possuía uma deleção que incluía o gene para o citocromo P-450 específico para 21-OHase (White e col., 1984a). Assim, se presumiu que o gene 21-OHase era adjacente ao *locus* C4. Da mesma forma, as

duplicações no gene C4 também eram observadas particularmente associadas ao haplótipo HLA-B14;DR1 (Carrol e col., 1984a; Raum e col., 1984). Esse haplótipo mostrou forte associação com a forma tardia da deficiência da 21-OHase (Pollack e col., 1981), porém o papel dessa duplicação no desenvolvimento da doença é desconhecido. Por outro lado, o haplótipo HLA-A1;B8;DR3, que também tem sido associado a um alelo que carrega somente um gene C4 e um gene da 21-OHase, é considerado negativamente associado à doença (Awdeh e col., 1983). Esses estudos de associações combinadas às evidências de deleções nessa região já apontavam para a existência de dois genes, um ativo e um inativo, para a 21-OHase antes mesmo da sua caracterização (Price e col., 1978; Dupont e col., 1984; White e col., 1985; Carrol e col., 1985b; Garlepp e col., 1986; Strachan, 1990).

3. O “cluster” gênico da enzima 21-OHase

3.1. A enzima 21-OHase

Das cinco enzimas envolvidas nos principais passos para a síntese do cortisol a partir do colesterol na adrenal, quatro pertencem à família citocromo P-450. São elas: P-450_{scc} (20,22-Desmolase), P-450_{c17 α} (17 α -hidroxilase), P-450_{c21} (21-OHase) e P-450_{c11 β} (11 β -hidroxilase) (Miller, 1991). O Citocromo P-450 é um termo genérico dado a um grande número de enzimas oxidativas, todas elas apresentando aproximadamente 500 resíduos de aminoácidos e contendo um único grupo heme. São assim denominados (P-450-pigmento 450) pois têm a capacidade de absorver luz no comprimento de ondas de 450nm quando reduzidos com monóxido de carbono. Existem por volta de 200 tipos de citocromos P-450 (Gonzalez e Nebert, 1990). No entanto, a conversão no córtex da adrenal da 17-OHP para 11-desoxicortisol pela 21-OHase foi de fato a primeira função designada a um citocromo P-450 (Estabrook e col., 1963).

A enzima 21-OHase foi isolada por Kominami e col. (1980) e foi, então, designada P-450_{c21} ou P-450_{XXIA}, seguindo a nomenclatura usada para essa classe de proteínas. O citocromo P-450_{c21} é um polipeptídeo simples com um peso molecular de 52.000 D. Esta proteína é bastante conservada nas várias espécies (P-450_{c21} bovino tem 496 aminoácidos, na espécie de roedores tem 487 aminoácidos e na espécie humana 494 aminoácidos).

*ESTABROOK, R. W.; COOPER, D. Y.; & ROSENTHAL, O., The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C-21-hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem. Z.*, 338: 741-755 (1963), apud em KOMINAMI e col., 1980.

O isolamento e purificação da proteína P-450c21 bovina possibilitou o progresso no estudo molecular com subsequente localização e caracterização do gene do citocromo P-450c21 bovino (White e col., 1984b) e em seguida do gene humano (White e col., 1984b; White e col., 1985).

3.2. Mapeamento e clonagem do gene da 21-OHase

Como descrito acima, após o isolamento e caracterização da proteína P-450c21 a partir das glândulas adrenais de bovino, White e col. em 1984 (White e col., 1984b) construíram uma biblioteca de cDNA com mRNA da adrenal de bovino, a partir da qual isolaram um cDNA que foi fundamental para o isolamento do gene humano e para os estudos moleculares posteriores da HCA devido à deficiência da 21-OHase.

White e col. (1985) usaram o cDNA bovino como sonda para isolar o clone de cDNA de uma biblioteca de adrenal fetal humana. Esse clone foi chamado de pC21/3c e contém cerca de 2000 pb sendo um cDNA quase completo, faltando apenas 100-200 pb correspondentes ao terminal 5' do mRNA.

Como citado anteriormente, estudos de mapeamento genético já indicavam que o gene para a deficiência da 21-OHase se localizava entre os locos HLA-B e HLA-DR assim como os genes de histocompatibilidade da classe III, que são o segundo componente do complemento C2, o fator Bf e os genes que codificam para as duas formas do quarto componente do complemento (C4A e C4B) (Dupont e col., 1977; Dupont e col., 1980). Dessa forma, usando as sondas de cDNA do C4 e do pC21/3c, White e col. (1985) isolaram dois clones de cosmídeos que não eram sobreponíveis caracterizando, então, a existência de dois genes para a enzima 21-OHase. Paralelamente, Carrol e seu grupo na Inglaterra desenvolviam estudos de mapeamento da região do HLA, estudando a organização genômica dos genes para os componentes C4 do complemento (Carroll e col., 1984b). Usando uma estratégia diferente publicaram os resultados de seus estudos mostrando a organização dos genes C4 e 21-OHase duplicados e orientados em tandem (Carroll e col., 1985a). Portanto, dois grupos (White e col., 1985; Carroll e col., 1985a), quase que simultaneamente, estabeleceram que o genoma haplóide humano inclui dois genes que codificam para a 21-OHase, os genes foram denominados CYP21B e o CYP21A (CYP de "cytochrome P"). Esses genes estão localizados a aproximadamente 3 kb do terminal 3' dos dois genes que codificam para o complemento C4, o C4B e o C4A, que são altamente homólogos (99%) entre si (Strachan, 1989; Migeon, 1991; White e col., 1984b; White e

col., 1985; White e col., 1986; Rumsby e col., 1988; Carrol e col., 1985a; Werkmeister e col., 1986).

Todos esses estudos puderam então determinar que esses quatro genes CYP21B, C4B, CYP21A e C4A, estão contidos num segmento de DNA de aproximadamente 60 kb localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p22.3), dentro do complexo de histocompatibilidade na classe III do HLA, entre os antígenos leucocitários humanos HLA-B e HLA-DR e são transcritos numa mesma direção e, em ordem alternada. As figuras 4A e B ilustram esses achados (Dupont e col., 1980; Bias e col., 1981; Carrol e col., 1984a; White e New, 1992). Tal organização sugere que em algum momento durante a evolução tenha havido uma duplicação de um segmento contendo um gene ancestral de C4 e de CYP21 produzindo uma orientação em tandem de um segmento de DNA em questão (Strachan, 1989 e 1990; Dodds, 1990). A média de tamanho das unidades repetidas C4/CYP21 é cerca de 30 kb, mas unidades individuais podem ter até 33 kb (unidades longas) ou 26,5 kb (unidades curtas) em consequência de um polimorfismo no gene C4 (Paldosttir e col., 1987).

Após o isolamento do cDNA da 21-OHase humana de adrenal e a determinação de que havia dois genes codificando para essa enzima, os estudos moleculares avançaram rapidamente. A indicação de que somente uma cópia do gene era ativa (White e col., 1984a) se confirmou através do estudo de sequências dos dois clones genômicos isolados. Novamente, dois trabalhos foram publicados quase que simultaneamente descrevendo a estrutura genômica desses genes a partir de clones oriundos de bibliotecas genômicas diferentes (Higashi e col., 1986; White e col., 1986). Comparando as estruturas dos dois genes, ambos trabalhos concordam que o gene ativo é o CYP21B o qual é codificado num fragmento de 3,3 kb contendo 10 exons formando um quadro de leitura aberto de 494 amino-ácidos (Rodrigues e col., 1987).

Embora os dois genes, CYP21B e CYP21A, tenham aproximadamente 98% de homologia entre suas seqüências de nucleotídeos (exons), o gene CYP21A foi considerado um pseudogene, devido a algumas diferenças na sua seqüência. São elas: uma deleção de oito pares de base (pb) no 3º exon causando um “frameshift” que gera um codon de terminação logo abaixo; uma inserção de um par de base no 7º exon; e uma transição C-T no 8º exon, todas impediriam a síntese da proteína funcional (Rodrigues e col., 1987; Higashi e col., 1986; White e col., 1986). Na verdade, nenhum transcrito do gene CYP21A

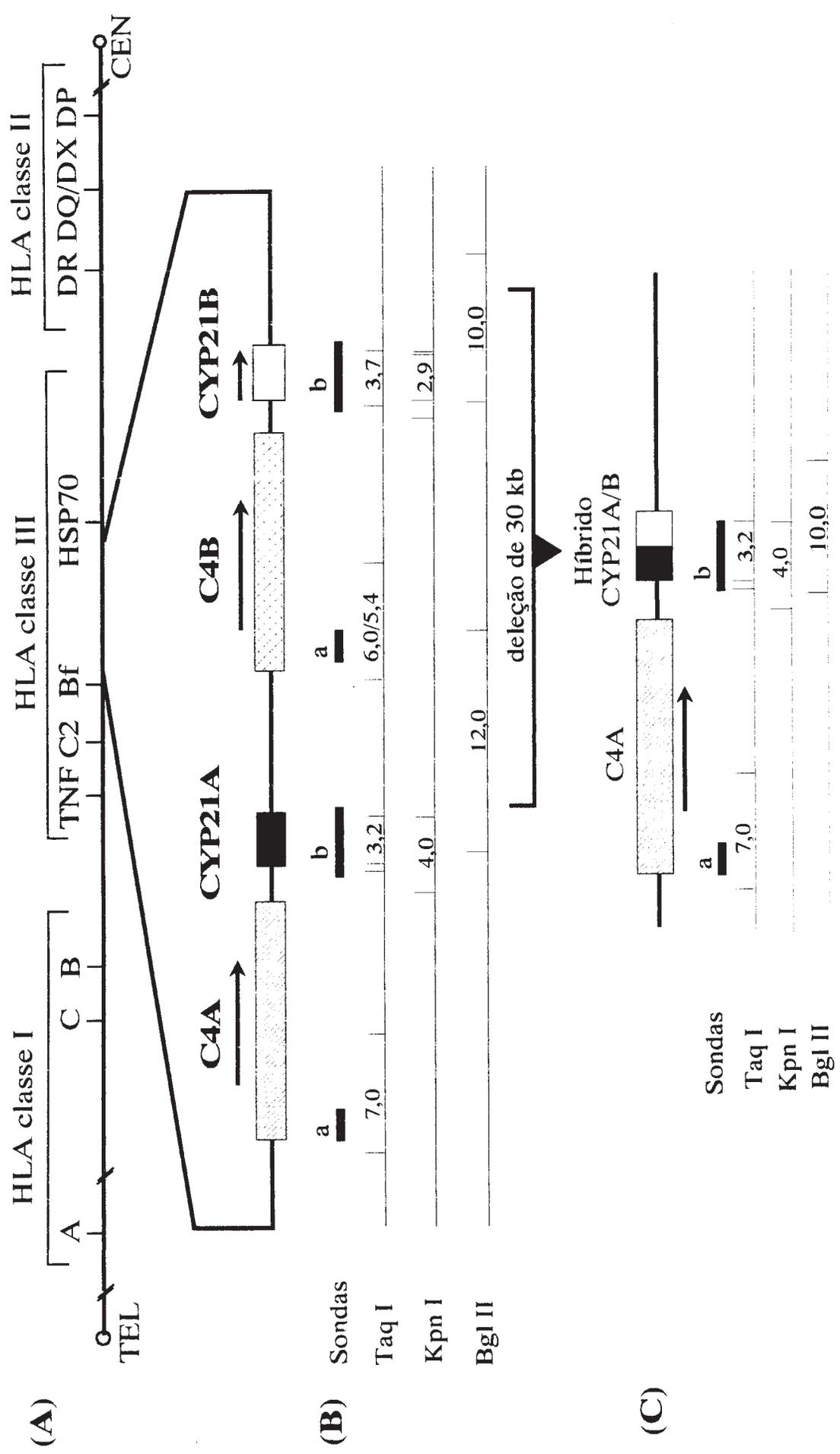


Figura 4 - Mapa da região do Complexo de Histocompatibilidade no braço curto do cromossomo 6. (A) mostra a organização dos *loci* HLA-A, B, C, TNF C2, HSP70 e HLA-D. A segunda linha ilustra a região dos genes CYP21 e C4 no cromossomo. C4A e C4B simbolizam genes estruturais dos fatores de complemento C4A e C4B. CYP21B é o gene da 21-hidroxilase funcional e o CYP21A, um pseudogene não funcional. (B) mostra sítios de restrição parcial dos genes C4 e CYP21 em um cromossomo normal. (C) mostra esses sítios em um cromossomo incluindo uma deleção do final 3' do CYP21A, C4B e 5' do CYP21B. As medidas são em kb. Barras acima dos fragmentos simbolizam sondas C4B550 (a) e pC21/3c (b).

foi detectado quando se hibridizou mRNA da adrenal com sonda específica do pseudogene (Higashi e col., 1986), assim não ficou claro se ele não é transcrito ou se produz uma proteína inativa cujo mRNA é muito instável para ser detectado. Além dessas, outras diferenças a nível de sequência foram encontradas do pseudogene e constituem mutações pontuais (White, 1989; Higashi e col., 1988b; Higashi e col., 1991; Haglund-Stengler e col., 1990; Tusie-Luna e col., 1990; Partanen e Campbell., 1991; Wedell e col., 1992; Wedell e Luthman., 1993; Speiser e col., 1992b; Owerbach e col., 1992; Helmsberg, 1993; New, 1994).

3.3. Mapa de restrição

Desde o isolamento do primeiro clone de 21-OHase bovina em 1984 sabe-se que o DNA genômico humano digerido com algumas enzimas de restrição e hibridizados com sondas de cDNA de 21-OHase de adrenal produzem duas bandas. White e col. (1984a) usaram dessa característica para estudar pacientes de HCA testando a hipótese de que o defeito ligado ao HLA envolvia o gene estrutural para a proteína. Esse estudo foi o primeiro de uma série de outros donde se concluiu que os genes CYP21B e CYP21A presentes no DNA genômico humano são distinguidos em análise de “Southern blot” pela presença de dois fragmentos de restrição característicos produzidos por digestão com várias enzimas de restrição (Higashi e col., 1986; Rumsby e col., 1988; Donohoue e col., 1986a; Mornet e col., 1986b). Assim, as deleções do gene ativo CYP21B responsáveis por HCA poderiam ser detectadas por um “Southern blot” onde o fragmento correspondente estaria ausente.

A enzima *Taq* I, por exemplo, detecta um polimorfismo de sítio de restrição muito próximo dos genes possibilitando a distinção entre CYP21A e CYP21B. Após digestão com *Taq* I, o gene CYP21A é caracterizado em um fragmento de 3,2 kb e o gene CYP21B, um fragmento de 3,7 kb, quando hibridizados com uma sonda de cDNA para o gene da 21-OHase. A diferença no tamanho dos fragmentos, deve-se a um sítio extra de *Taq* I na extremidade 5' da sequência do pseudogene CYP21A (Higashi e col., 1986; White e col., 1986). Existem dois outros fragmentos que são caracterizados com a enzima *Taq* I, um de 2,4 e 2,5 kb que correspondem às sequências de DNA próximas ao terminal 3' dos genes CYP21A e CYP21B, respectivamente, e que são fracamente detectados com a sonda de cDNA devido ao baixo grau de homologia (Garlepp e col., 1986). Outras enzimas que também detectam polimorfismos de sítio de restrição para uma distinção entre os dois genes CYP21 são encontradas. Da mesma forma que a enzima *Taq* I, a enzima *Kpn* I

distingue um sítio extra na extremidade 5' do gene CYP21B, caracterizando-o em um fragmento de 2,9 kb em oposição a um fragmento de 4,0 kb do pseudogene CYP21A (Higashi e col., 1986; White e col., 1986). A digestão com a enzima *Bgl* II produz um fragmento de 12 kb correspondente ao pseudogene CYP21A e um fragmento de 10 kb correspondente ao gene CYP21B, a diferença é causada por um sítio de *Bgl* II presente na extremidade 3' presente somente no CYP21B (figura 4B) (Donohoue e col. 1986a; White e col., 1988).

Embora o estudo dos *loci* CYP21 forneçam muitas informações com respeito à organização dos genes, o estudo complementar dos *loci* C4 constitui numa ferramenta bastante útil para esclarecimento de algumas situações. Utilizando a mesma enzima de restrição empregada para a análise dos *loci* CYP21, como por exemplo a enzima *Taq* I, e uma sonda de um cDNA correspondente ao terminal 5' dos genes C4, o gene C4A apresenta um fragmento de 7,0 kb e o C4B, um fragmento de 6,0 ou 5,4 kb (figura 4B) (Sinnott e col., 1989; Yu e Campbell, 1987; Yu, 1991), a variação dos tamanhos dos fragmentos de restrição para o C4B é devido a um polimorfismo descrito por Paldostir e col., (1987) nesse *locus*. O gene C4A tem 22 kb de comprimento e codifica um mRNA de 5 kb. O gene C4B existe em duas formas: uma longa (22kb) e uma curta (16 kb) devido à presença de um intron de 6,5 kb no terminal 5' do gene somente na forma longa. Como resultado desse polimorfismo, o terminal 5' do C4B é caracterizado por fragmentos *Taq* I de 6,0 e 5,4 kb, correspondendo aos genes C4B longo e curto, respectivamente, mas, o terminal 5' do gene C4A pode ser distinguido de ambos porque produz um fragmento *Taq* I de 7,0 kb.

4. Rearranjos no “cluster” do gene da 21-OHase e HCA

Uma consequência esperada da organização repetida em tandem dos genes CYP21 e C4 é que esta favorece eventos de “crossover” desigual nessa região (Strachan, 1989; Strachan, 1990; Strachan, 1991). Devido ao alto grau de homologia observado entre as duas unidades vizinhas C4B/CYP21B e C4A/CYP21A, há uma probabilidade significativamente alta de acontecer um emparelhamento cromossômico desigual durante a meiose I (Collier e col., 1989; Sinnott e col., 1990), quando podem ocorrer processos de quebra e regeneração de ligação entre cromátides mal emparelhadas produzindo cromátides irmãs assimétricas e gametas com um número variável de unidades completas (Werkmeister e col., 1986; Strachan, 1989; White e col., 1987b; Miller e Morel, 1989; White e New, 1992). Em consequência do emparelhamento desigual dos cromossomos,

podem acontecer vários rearranjos como os propostos por Helmberg e col. (1993) mostrados na figura 5. Os diferentes alelos encontrados nas populações estudadas e a localização dos eventos de “crossover” já mapeados, indicam que estes podem ocorrer em vários pontos da unidade gênica de 30 kb (C4/CYP21) tanto dentro do gene da 21-OHase (Helmberg e col., 1992 e 1993; Higashi e col., 1988a; White e col., 1988; Dunham e col., 1989; Collier e col., 1989; Haglund-Stengler e col., 1991; Bormann e col., 1992) bem como dentro do gene do C4 (figura 5 pontos b-f). Na figura 5b e 5c o “crossover” desigual produz alelos com duplicação de C4A/CYP21A e deleção dos mesmos dependendo se o “crossover” acontecer fora (b) ou dentro (c) dos genes para o C4, esses alelos são frequentemente encontrados na população normal indicando que essa possibilidade não se restringe somente a uma hipótese (Speiser e col., 1988). Apesar dos alelos com a deleção C4A/CYP21A não estarem relacionados com a doença, eles podem predispor o portador a gerar novos alelos deficientes da 21-OHase, por facilitar o emparelhamento cromossômico desigual na meiose, onde uma única unidade C4/CYP21 presente em um alelo confronta-se com duas unidades de um alelo normal, por essa razão foi considerado como sendo uma “pré-mutação” (Sinnott e col., 1990). O “crossover” próximo à extremidade 5' dos genes CYP21 gera dois gametas um com duplicação de uma unidade CYP21A/C4B e um com deleção de uma unidade CYP21A/C4B (figura 5d). Porém, de importância imediata é o “crossover” dentro ou, nas extremidades e 3' dos genes CYP21 (figura 5 e-f). No ponto f de “crossover” são gerados gametas com a duplicação e com a deleção de uma unidade C4B/CYP21B. No entanto, se o “crossover” ocorrer em um ponto dentro dos genes CYP21 (figura 5e), o haplótipo resultante da deleção de aproximadamente 30 kb, será portador de um gene de fusão proveniente da deleção que se estende desde a porção 3' do pseudogene CYP21A, envolve todo o gene C4B e a porção 5' do gene CYP21B funcional, formando um gene híbrido CYP21A/CYP21B não funcional com características 5' de CYP21A e 3' de CYP21B. Estes alelos geralmente são referidos com a expressão generalizada, porém erroneamente empregada, de “deleção de CYP21B” (Higashi e col., 1988a; Urabe e col., 1990; Helmberg e col., 1992; Bormann e col., 1992). White e col. 1988 descreveram uma forma de reconhecer essa estrutura híbrida em casos de HCA analisando o padrão de restrição das regiões 5' e 3' do gene (figura 4C). Cromossomos com múltiplas unidades C4-CYP21, por exemplo triplicados (Werkmeister e col., 1986) ou mesmo quadriplicados (Collier e col., 1989) têm sido identificados como resultados putativos de produtos de divisão complementares criados por mecanismos de emparelhamento desigual com subsequente cruzamento desigual.

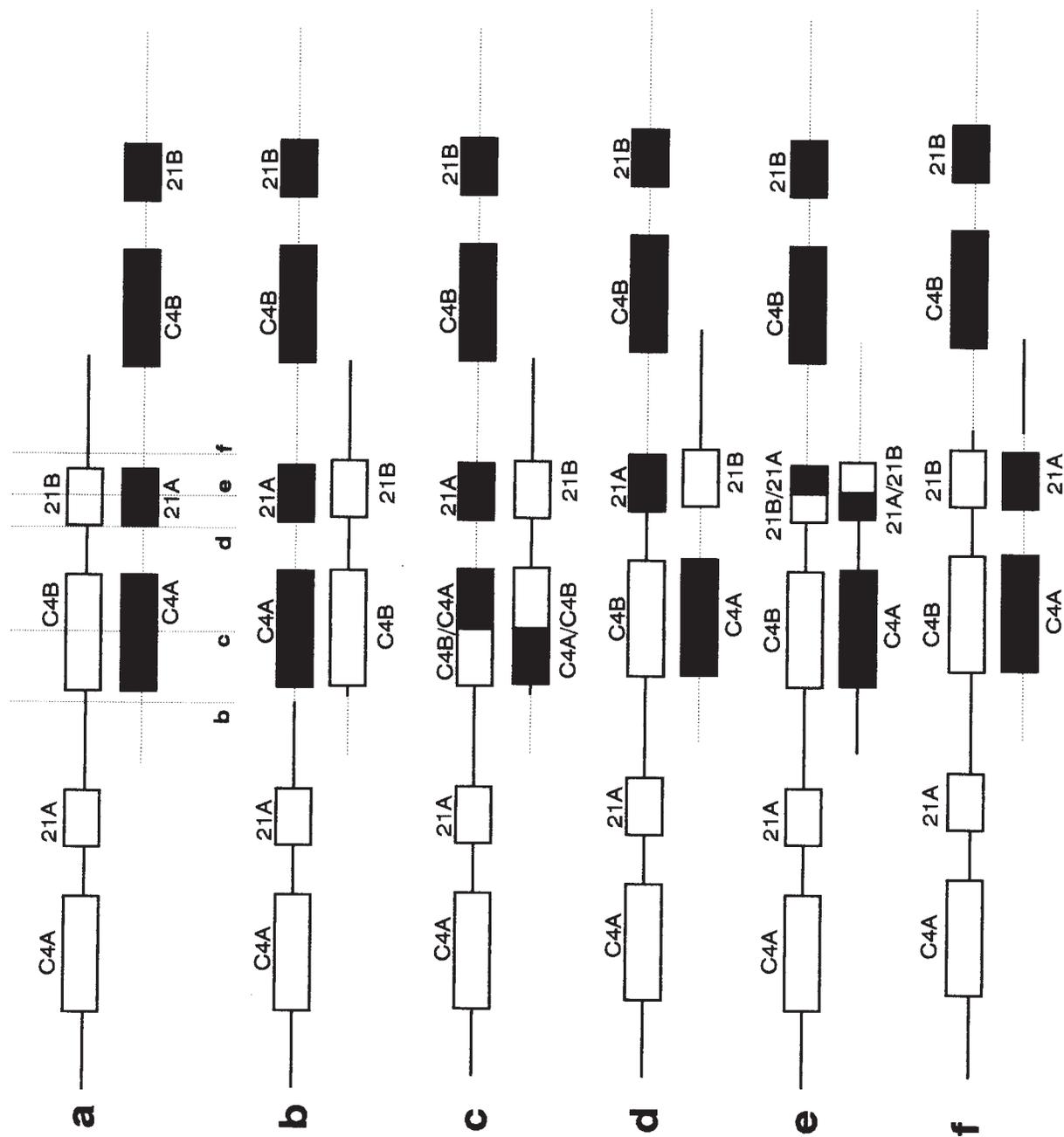


Figura 5 - Representação esquemática de eventos de "crossover" nas diferentes localizações dentro da unidade gênica C4/CYP21 de 30 kb. Os resultados de "crossover" formados a partir da figura 5-a, são mostrados nas figuras 5b-5f.

Desta forma, o “crossover” desigual não gera somente um tipo definido de deleção ou de duplicação, mas pode, dependendo da sua exata localização, produzir um grande número de alelos diferentes, com significados funcionais variáveis.

Assim, a deficiência da 21-OHase pode estar associada com a ausência completa ou de uma parcela crítica do gene funcional CYP21B (White e col., 1984b; Carroll e col., 1985b; Werkmeister e col., 1986; Donohue e col., 1986a; Rumsby e col., 1986; Schneider e col., 1986).

Todos esses rearranjos e à possibilidade de se detectá-los em “Southern blot” e ainda a ligação de eventos de deleção de CYP21B e C4B com a forma clássica perdedora de sal de HCA estimularam os estudos de análise desses *loci* em pacientes com HCA.

Os primeiros trabalhos publicados no final da década de 80, estudando as alterações moleculares em casos graves de HCA, descrevem uma frequência de deleções em casos de HCA de aproximadamente 30% indicando que outros rearranjos ou mutações poderiam ser responsáveis pelo fenótipo doente.

O trabalho de Werkmeister e col. (1986) descreve 25% de deleções nos alelos afetados encontrando também uma associação dos alelos com duplicações com a forma não clássica da doença e, ainda, Jospe e col. (1987) determinaram 32% de deleção da unidade C4B/CYP21B em seus pacientes com a forma clássica de HCA. Em contraposição, no começo do ano de 1986 Rumsby e col. (1986) fizeram uma análise do padrão de hibridização de 20 pacientes com HCA clássica e acharam a deleção incluindo o gene C4B em homozigose em um único paciente concluindo que o fenótipo clínico da deficiência da 21-OHase é devido à uma coleção heterogênea de defeitos e somente em alguns casos é devida a uma substancial deleção de DNA. Nenhum caso de deleção foi encontrado no estudo de Matteson e col. (1987). Os resultados acima descritos, aparentemente contraditórios, refletem, na verdade, uma heterogeneidade de fatores que contribuem para a formação de alelos afetados (Rumsby e col., 1988; White e col. 1988).

Donohue e col. (1986) foram um dos primeiros a descreverem casos de HCA com diminuição do fragmento de 3,7 kb *Taq* I correspondente à CYP21B com concomitante aumento do fragmento de 3,2 kb correspondente ao pseudogene e nenhuma alteração nos fragmentos correspondentes aos genes C4. Propuseram, então que o mecanismo responsável pela produção da mutação não era a deleção, mas sim uma conversão gênica,

pois a deleção somente do gene CYP21B não pode ser predita a partir de um “crossover” desigual. Harada e col. em 1987 confirmaram a hipótese de que alguns casos de HCA eram conseqüências de conversão gênica, pois obtiveram evidências que apontavam para esse mecanismo mutacional em dois pacientes japoneses, através de mapas de restrição e análises de sequenciamento parcial de nucleotídeos. O gene CYP21B funcional se apresentava convertido para o pseudogene CYP21A não funcional sem perda de DNA. Essa conversão envolvia o sítio *Taq* I localizado no terminal 5' do pseudogene, portanto o padrão de restrição ficava alterado uma vez que o gene funcional convertido aparece num fragmento de 3,2 kb idêntico ao do pseudogene. Desta forma uma alteração nas intensidades dos fragmentos é observada.

Assim, o processo de substituição de seqüências do gene CYP21B por seqüências do gene CYP21A sem o envolvimento da deleção tem sido descrita como conversão gênica (Morel e col., 1989a). Haplótipos convertidos geralmente contêm dois genes C4, um C4A e um C4B e dois genes 21-OHase, sendo que ambos assemelham-se ao pseudogene CYP21A, perdendo a capacidade de expressão gênica. Deste modo o gene CYP21B normalmente funcional foi "convertido" em uma grande parte (conversão gênica em larga escala), se não todo o gene, para gene inativo CYP21A.

Entretanto, foram encontrados haplótipos sem nenhuma alteração aparente do fragmento de CYP21B, que eram relacionados com a deficiência da 21-OHase (Strachan, 1990). Uma explicação é que, abordagens de mapeamento por sítios de restrição não são suficientemente sensíveis para se detectar uma mutação pontual no *locus* CYP21B. No entanto, a freqüência geral aproximada de haplótipos doentes carregando esse tipo de mutação pode ser inferida pelos estudos feitos com mapeamento de restrição, estimando-se a freqüência dos haplótipos que não apresentam indicações óbvias de deleção ou de conversão gênica que poderiam contribuir para a deficiência da 21-OHase. Estima-se que essa freqüência varie entre 60 e 80% (Jospe e col., 1988; Rumsby e col., 1988; Partanen e col., 1989; Morel e col., 1989a; Collier e col., 1989).

No entanto, o sequenciamento de DNA de clones de genes CYP21B mutantes (Rodrigues e col., 1987; Amor e col., 1988; Globerman e col., 1988; Higashi e col., 1988b; Speiser e col., 1988; Chiou e col., 1990) e a amplificação de genes mutantes por PCR (Collier e col., 1990) revelaram que em todos os casos os genes CYP21B mutantes carregam uma mutação patológica que é idêntica às mutações deletérias normalmente

encontradas no pseudogene CYP21A (Helmberg, 1993). Estas foram consideradas conversões gênicas em pequena escala, ou microconversões.

O mecanismo molecular de conversão gênica ainda não é bem compreendido, duas possíveis classes de mecanismos podem ser consideradas:

1 - mecanismo de conversão gênica envolvendo reparo do erro dentro da “heteroduplex” formada entre os genes CYP21A e CYP21B: por exemplo, depois do emparelhamento cromossômico desigual, enzimas envolvidas no sistema de reparo de DNA podem “corrigir” a sequência do gene CYP21B para a forma idêntica de seqüências que correspondem ao pseudogene CYP21A, as quais formavam a heteroduplex (figura 6A) (Strachan, 1989; 1990; Kourilsky, 1986);

2 - mecanismo de conversão gênica envolvendo eventos de recombinação sucessivos: este mecanismo inclui pelo menos dois “crossovers” desiguais onde primeiramente um cromossomo com haplótipo contendo uma unidade (CYP21A+C4B) extra é gerado, e numa meiose subsequente, este alelo pode recombinar com um cromossomo contendo a organização gênica convencional, e desta maneira gerar um haplótipo convertido com dois pseudogenes CYP21A (figura 6B) (Strachan, 1989; 1990; 1991; Speiser e col., 1992b).

A divisão entre conversões gênicas em larga escala e em pequena escala tende a ser uma divisão artificial, dependendo se esse evento de conversão se estendeu ao ponto de incluir o sítio *Taq* I localizado no terminal 5' do pseudogene ou não.

Desde modo, a partir das “informações” citadas acima, foi possível interpretar e caracterizar os rearranjos do complexo gênico da 21-OHase em famílias portadoras de HCA que foram triadas no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do HC-UNICAMP. Esse estudo é importante tanto para o entendimento dos mecanismos moleculares responsáveis pelo fenótipo quanto para o desenvolvimento de técnicas de diagnósticos mais precoces e mais precisas.

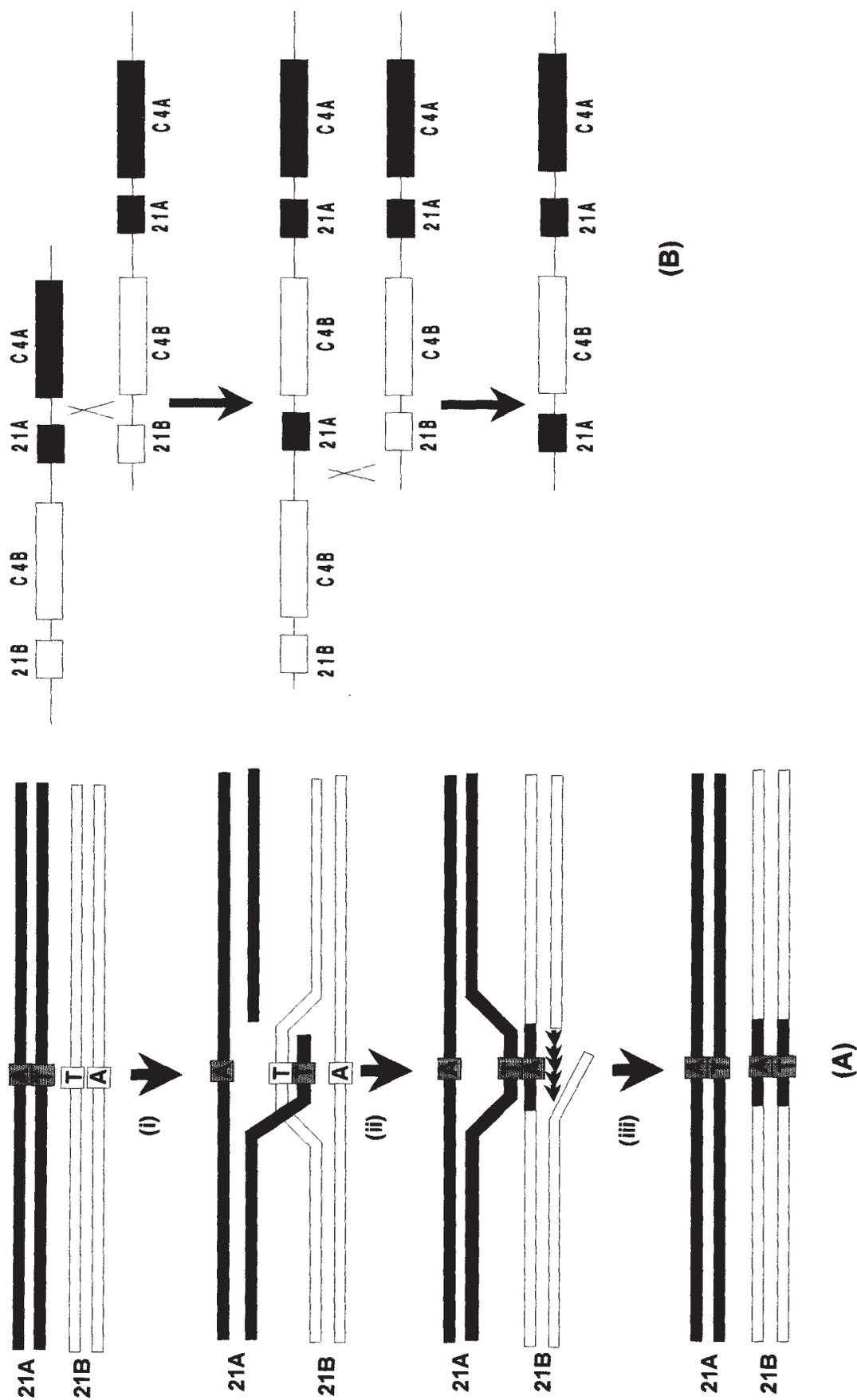


Figura 6 - Os esquemas representam dois possíveis mecanismos de conversão gênica. O esquema (A), mostra o mecanismo de conversão gênica por "mismatch repair", que pode ser da seguinte maneira: (i) primeiramente ocorre quebra de uma das fitas do CYP21A, esta invade o gene CYP21B, pareando com uma de suas fitas, formando a heteroduplex. (ii) em seguida o erro é reparado por enzimas de restrição que reconhecem o pareamento errado e utilizam a fita do CYP21A como molde. (iii) a substituição de ambas as fitas de DNA mostram evidências de que a conversão gênica ocorreu. O esquema (B), mostra o possível mecanismo de conversão gênica por envolvimento de eventos de múltiplas recombinações. A ocorrência de um primeiro "crossover" desigual, na posição indicada (X), gera um haplótipo de adição gênica ("triplicação") com dois pseudogenes CYP21A. Este haplótipo pode recombinar com um haplótipo normal, levando a formação de um haplótipo com dois pseudogenes CYP21A e nenhum gene CYP21B. Os genes CYP21A e CYP21B estão abreviados como 21A e 21B, respectivamente.

5. Tratamento da HCA e diagnóstico pré-natal

5.1. Tratamento

O tratamento da HCA tem como objetivo substituir o hormônio em falta, no caso o cortisol, diminuindo desta forma a secreção de ACTH e a estimulação exagerada sobre o córtex adrenal.

A instituição da terapêutica na deficiência da enzima 21-OHase e 11 β -hidroxilase normaliza a produção de andrógenos, diminuindo desta forma os sinais de virilização, a velocidade de crescimento, o avanço da idade óssea e a instalação normal da puberdade. O tratamento reverte os quadros de hipertensão arterial, observados na deficiência da 11 β -hidroxilase e 17 α -hidroxilase, pela normalização da secreção de ACTH e DOCA. A suplementação com mineralocorticóide fica reservada para as formas perdedoras de sal (Dichtchekenian, 1989).

Existem diversos esquemas de tratamento com vários tipos de corticóide, sendo que um deles geralmente é feito com a utilização de acetato de hidrocortisona. A reposição hormonal da deficiência da 21-OHase da forma clássica, geralmente é feita no período pós-natal e por toda a infância, sendo principalmente tratada com hidrocortisona para corrigir a deficiência de cortisol e suprimir o ACTH, levando à diminuição da 17-OHP e dos andrógenos da adrenal aos níveis normais (White e col., 1987a; Dichtchekenian, 1989).

Os níveis séricos da 17-OHP e androstenediona são bons índices de controle na deficiência da 21-OHase. As taxas de testosterona são importantes no sexo feminino e no pré-púbere do sexo masculino. Em resumo, a dosagem combinada 17-OHP/atividade da renina plasmática e os andrógenos séricos, assim como a evolução clínica, levando-se em consideração o ritmo de crescimento e os eventos puberais, devem ser valorizados no ajuste terapêutico. Vale lembrar que em todo paciente mal controlado, o córtex adrenal fica exposto a uma carga constante e elevada de ACTH que no decorrer do tempo poderá levar a uma malignização do tecido adrenal (Dichtchekenian, 1989).

A determinação do sexo nos casos que apresentam genitália ambígua é realizada através da análise do cariótipo. Sabe-se que nas deficiências da 21-OHase e 11 β -hidroxilase o sexo feminino apresenta-se com um quadro de pseudo-hermafroditismo e a definição do sexo nestes casos deve ser o feminino. O aumento do clitóris e as

anormalidades anatômicas da genitália devem ser tratados cirurgicamente antes dos dois anos de idade.

5.2. Diagnóstico pré-natal

O diagnóstico pré-natal em casos HCA com a deficiência da 21-OHase tem um significado importante devido à possibilidade de tratamento pré-natal, com o objetivo de prevenir a virilização da genitália externa de fetos femininos ainda no útero e, com isto diminuir as repercussões na esfera psíquica e social evitando as correções cirúrgicas (Miller, 1998; David e Forest, 1984; Karaviti e col., 1992; New, 1995).

Recomenda-se que o tratamento pré-natal deva ser iniciado logo no começo da gravidez, antes de qualquer possibilidade de diagnóstico uma vez que o desenvolvimento da genitália tem início por volta da 6ª a 7ª semanas. Para isso, tem sido utilizada a dexametasona (Forest e col., 1989; Speiser e col., 1990; Rumsby e col., 1993), que quando administrada atravessa a barreira placentária suprimindo a adrenal fetal e, com isso podendo evitar que a genitália externa se virilize num feto feminino afetado. A coleta de material para o diagnóstico pré-natal pode ser feita por: biópsia do viló corial, que é um procedimento realizado da 8ª a 10ª semana de gestação (primeiro trimestre), ou por amniocentese, realizada entre a 15ª e 18ª semana (segundo trimestre), a partir dos quais pode-se definir o sexo genético (46,XX ou 46,XY) (Pollack e col., 1979a; Forest, 1985; Pang e col., 1985b; Mornet e col., 1986a; Speiser e col., 1990). A partir desse material são realizados os testes laboratoriais especializados cujos resultados apoiam o protocolo a ser seguido na continuidade do tratamento. Nos casos de cariótipo 46,XX normal e 46,XY normal e/ou afetado o tratamento pode ser suspenso (Forest e col., 1993), sendo retomado ao nascimento nos casos de cariótipo 46,XY afetado. Se for determinado que a criança é 46,XX afetada, a dexametasona poderá ser mantida até o final da gestação (David e Forest., 1984; Forest e col., 1993; Appan e col., 1989).

Em uma determinada família onde haja um caso diagnosticado com HCA devido à deficiência da 21-OHase, a probabilidade de um novo filho apresentar a doença é de 25%, portanto há um grande interesse em se buscar técnicas de diagnóstico cada vez mais rápidas e precoces, inclusive o diagnóstico pré-natal (Speiser e col., 1994a; 1994b).

Esse procedimento foi beneficiado pelos avanços nos estudos endocrinológicos e da genética molecular. Para diagnóstico desta doença, três métodos independentes e/ou

combinados têm sido empregados incluindo, medidas hormonais (*Jeffcoate e col., 1965; Merkatz e col. 1969; Gueux e col., 1988), teste sorológico para HLA (Couillin e col., 1979; Pollack e col. 1979a; Pang e col. 1985b; Grosse-Wilde e col. 1988) e técnicas de genética molecular e/ou haplótipos de HLA por sondas moleculares (Mornet e col., 1986a; Speiser e col. 1990).

Em 1975, a primeira tentativa de diagnóstico pré-natal foi por medida da 17-OHP do líquido amniótico, no segundo trimestre da gravidez (Frasier e col., 1975). Entretanto, para a dosagem hormonal há necessidade de se suspender a medicação por um certo período de tempo com risco de virilização da genitália, para não interferir no nível da 17-OHP, caso já se tenha iniciado o tratamento. Além disso, os níveis de 17-OHP no líquido amniótico podem não estar significativamente elevados em casos da forma VS e da não clássica (Hughes e Laurence, 1979; Pang e col., 1985b; Hughes e col., 1987), podendo levar a um resultado impreciso. Outro problema a ser considerado é a limitação de que a amniocentese é recomendada somente para o segundo trimestre de gravidez (16-19 semanas), quando a genitália ambígua em fetos femininos já está estabelecida (Speiser e col., 1990).

Descobertas de ligação entre o *locus* do HLA e o da doença deram um outro avanço para o diagnóstico pré-natal (Dupont e col., 1977; Pollack e col., 1979b). Desde então a tipagem de HLA de culturas de células do líquido amniótico tem sido usada como um marcador de transmissão de HCA (Pollack e col., 1979a; c; Forest e col., 1981; Couillin e col., 1979; 1981). Esse segundo método para ser efetivo deve ser realizado em famílias completas com pelo menos uma criança afetada. O diagnóstico se baseia na comparação entre os haplótipos do afetado, dos pais e do obtido para o feto. Isto pode ser positivo, exceto quando ocorre recombinação entre os *loci* HLA e da HCA (Pang e col., 1985b). No entanto, a tipagem do HLA não é informativa em famílias onde existe haplótipos iguais entre os pais (Mauer e col., 1987; Mornet e col., 1986a).

Posteriormente, diagnósticos mais acurados foram obtidos por aplicação de técnicas da genética molecular (Mornet e col., 1986a; Reindollar e col., 1988; Speiser e col., 1990; 1994; Forest e col., 1993). Estudos do *locus* gênico da 21-OHase por “Southern blotting” e de mutações por hibridização alelo-específica tem fornecido ferramentas para simplificar

*JEFFCOATE, T. N. A.; FLEIGNER, J. R. H.; RUSSEL, S. H.; DAVIS, J. C. & WADE, A. P., Diagnosis of the adrenogenital syndrome before birth., *Lancet*, II: 553-555 (1965), apud FOREST e col., 1993.

os procedimentos de diagnóstico pré-natal, por analisar diretamente o gene mutado. A análise por “Southern blot” usando sonda do gene 21-OHase por si só não é recomendada para diagnóstico, por ser pouco informativa (Morel e Miller, 1991; Raux-Demay e col., 1989; Strachan e col., 1987). Por outro lado, a combinação de análises do *locus* HLA da classe I (Mornet e col., 1986a; Sood e col., 1981) e II (Raux-Demay e col., 1989) por sondas moleculares que reconhecem polimorfismos, pode ser útil, porém não exclui o problema de recombinação no *locus* do HLA e a homozigose (Pang e col., 1985b; White e col., 1989). Por estas razões e também na tentativa de se fazer um diagnóstico mais rápido, tem sido usada a estratégia de PCR específico (Owerbach e col., 1992; Collier e col., 1992) combinado à hibridização alelo-específica para detectar as mutações gênicas da deficiência da 21-OHase mais frequentes. Com este método a probabilidade de acerto poderá ser maior, mas não isento de erros (Rumsby e col., 1993).

OBJETIVOS

- Delinear o perfil do complexo gênico da enzima 21-hidroxilase em 23 famílias, com pelo menos um membro afetado com a forma clássica de Hiperplasia Congênita da Adrenal por deficiência da 21-hidroxilase.
- Determinar as frequências de haplótipos com deleções, conversões e duplicações gênicas através da técnica de "Southern blot" observando padrões gerados por várias enzimas de restrição e hibridização com sondas específicas para os genes C4 e CYP21.
- Identificar os haplótipos responsáveis pelo fenótipo de Hiperplasia Congênita da Adrenal através do estudo de famílias.
- Estimar e identificar as famílias informativas com respeito aos polimorfismos nos genes CYP21 e C4 para fins de diagnóstico e aconselhamento genético.
- Estabelecer uma correlação entre o genótipo e o fenótipo dos indivíduos afetados.
- Comparar as frequências encontradas para deleção e conversão do gene CYP21B nos indivíduos estudados com as descritas em outras populações.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Casuística:

Foram estudados 30 (23 não relacionados) pacientes (10M:20F, considerando o sexo genético) afetados pela forma clássica de Hiperplasia Congênita da Adrenal por deficiência da 21-OHase e 60 familiares saudáveis de 23 famílias. Uma história de recorrência positiva foi registrada em 12/23 casos e consanguinidade em 5/23 casos. Este grupo representa 42 haplótipos afetados não relacionados, porque em um caso o alelo afetado não era o consanguíneo. Esses pacientes são acompanhados no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas, Universidade Estadual de Campinas. A classificação foi baseada nos sintomas ao diagnóstico. Vinte e um pacientes (7M:14F) de 16 famílias foram classificados como sendo perdedores de sal. Esses pacientes geralmente dão entrada no hospital nas primeiras semanas de vida com sintomas clínicos de: hiponatremia, hipercalemia, desidratação, vômitos, choque, e uma deficiência em recuperar glicocorticóide e mineralocorticóide durante a terapia, associados a genitália ambígua nas meninas. Os outros 9 pacientes (3M:6F) de 7 famílias, não tinha história de crises de perda sal ou hipertensão e geralmente apresentam genitália externa ambígua nas meninas ou puberdade precoce nos meninos. Foram observadas também as dosagens laboratoriais como o aumento sérico de 17-hidroxiprogesterona, androstenediona, desidroepiandrosterona e testosterona e acidose metabólica, além de cariótipo nas crianças com ambiguidade genital.

2. Coleta das amostras:

A coleta de amostras de sangue dos pacientes, bem como de seus familiares foi realizada junto ao Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do HC-UNICAMP. Foram coletados entre 5 a 20 ml de sangue periférico, em tubo de centrifuga estéril de fundo cônico de 50 ml contendo 8 gotas de EDTA 10% como agente anti-coagulante.

3. Extração do DNA genômico a partir de sangue periférico:

No decorrer do trabalho foram utilizados dois métodos diferentes para extração de DNA:

3.1. Extração com uréia:

O DNA de cada indivíduo foi extraído a partir de 20 ml (adulto) ou 5 a 10 ml (criança) de sangue periférico. O plasma foi descartado após centrifugação a 2.000 rpm por 15 minutos, temperatura ambiente. Nessa etapa, o material foi estocado a -20°C ou foi processado em seguida, como conveniente para o momento. O protocolo seguido foi o descrito por Farah e col. (1991), transcrito a seguir.

As hemácias são eliminadas através de lise com 50 ml de “tampão de glóbulos vermelhos”, seguida de centrifugação a 2.500 rpm por 15 minutos, retira-se o sobrenadante. As etapas de lise e centrifugação são repetidas várias vezes até o “pellet” de leucócitos passar de rosa para incolor.

Procede-se, então a lise dos glóbulos brancos ressuspensando o “pellet” em 10 ml do “tampão de glóbulos brancos” e adicionando-se na hora do uso 4,2 g de uréia para cada 10 ml de tampão e 1 ml de SDS 20%. A mistura é incubada a 37°C por 1 hora. Em seguida, a solução é tratada duas vezes numa mesma proporção (v/v) com uma mistura de fenol\clorofórmio\álcool isoamílico (25:24:1), agita-se suavemente por inversão durante 10 minutos e, centrifuga-se a 2.500 rpm por 15 minutos. Retira-se a fase aquosa superior que, após a segunda extração é tratada (v/v) com uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 24:1.

Então, o DNA é precipitado adicionando-se 2,5x volume de etanol absoluto gelado e, estocado a -20°C por aproximadamente 18 h. Centrifuga-se o DNA a 10.000 rpm por 20 minutos. O “pellet” é, então, dissolvido em 500 µl de tampão TE. A concentração em µg/ml é determinada por leitura de absorção óptica a 260 nm em espectrofotômetro. Os DNAs são estocados a 4°C.

Solução tampão de glóbulos vermelhos

Tris-HCl	10 mM (pH 7,6)
MgCl ₂	5 mM
NaCl	10 mM

Conservar a 4°C.

Solução de lise de glóbulos brancos

NaCl	300 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl	10 mM (pH 7,5)

Conservar a 4°C.

Solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1)

Para 100 ml:

Fenol bidestilado (MERCK)	50 ml
Clorofórmio	48 ml
Álcool isoamílico	2 ml
Hidroxiquinolina	0,08%

Após a mistura, tampona-se com Tris-HCl 20 mM (pH 8,0) e conserva-se a 4°C.

Solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1)

Para 100 ml:

Clorofórmio	96 ml
Álcool isoamílico	4 ml

Conservar a 4°C.

Solução tampão Tris-EDTA (TE)

Tris-HCl	10 mM (pH 8,0)
EDTA	1 mM (pH 8,0)

Autoclavar

3.2. Extração com proteínase K a partir de sangue total

A extração de DNA genômico de sangue total com proteínase K (Boehringer Mannheim, Germany) foi feita segundo protocolo descrito por Owerbach (1990) (comunicação pessoal).

O DNA de cada indivíduo foi extraído a partir de 20 a 15 ml (adulto) ou 5 a 10 ml (criança) de sangue periférico. Ao sangue coletado, adiciona-se 35 ml de solução A. Após homogenização da mistura coloca-se no gelo por 30 minutos, para que as hemácias sejam lisadas. Centrifuga-se a 2.500 rpm por 10 minutos a 4°C e retira-se o sobrenadante. Ressuspende-se o “pellet” novamente em 20 ml da solução A, agitando-se por inversão até

o “pellet” se desprender do fundo do tubo, centrifuga-se novamente por 15 minutos a 2.500 rpm, o sobrenadante é desprezado. As etapas de lise e centrifugação são repetidas várias vezes até o “pellet” passar de rosa para incolor. Nessa etapa, o material pode ser estocado a -20°C ou ser utilizado em seguida.

Continuando o procedimento, ressuspende-se o “pellet” em 1 ml de solução B e adiciona-se 250 μl de solução C preparada na hora. Incuba-se em banho-maria a 37°C durante a noite. Após a incubação, trata-se a solução com 1,25 ml de fenol saturado com tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0, agita-se por inversão por 5 minutos e centrifuga-se a 2.500 rpm por 10 minutos. Em seguida, retira-se a camada aquosa e se repete a extração com fenol (a interface deve estar clara). Retira-se a fase superior que, após a segunda extração com fenol é tratada com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) (ver item 3.1).

O DNA é precipitado adicionando-se 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto. O precipitado de DNA é retirado da solução com auxílio de um bastão e, lava-se com etanol 70% para eliminar o excesso de sal. O DNA é, então, dissolvido em quantidade apropriada (200-500 μl) de TE (ver item 3.1) e a concentração é determinada por leitura de absorção óptica a 260 nm em espectrofotômetro.

Solução A

Triton-X	1%
MgCl ₂	5 mM
Sacarose	0,32 M (109,5g sacarose ultra pura/litro)
Tris-HCl	10 mM (pH 8,0)

Solução B (2x concentrada)

Na ₂ EDTA	20 mM
NaCl	20 mM
Tris-HCl	20 mM (pH 8,0)

Solução C

Para 1 ml = 0,5 ml de solução B, 1 mg de Proteinase K e 0,5 ml de SDS 10% (preparar na hora do uso).

Proteinase K (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany).

4. Sondas utilizadas

Os plasmídios contendo as sequências de DNA utilizadas como sondas foram gentilmente doados pelos pesquisadores, Drs. Perrin White (Division of Pediatric Endocrinology Cornell University Medical College, New York) e Tom Strachan (University Department of Medical Genetics, St. Mary's Hospital, Hathersage Road, Manchester) e são mantidos em bactérias. Essas bactérias são estocadas em meio apropriado a -70°C . Os plasmídios contendo as sondas de interesse foram recebidos numa quantidade de aproximadamente 10 μg e, foram inseridos em bactérias por transformação para manutenção e posterior amplificação. As sondas estão descritas a seguir.

SONDA	DESCRIÇÃO	VETOR	INSERTO	DOADOR
pC21/3c	cDNA completo obtido do mRNA da enzima 21-OHase da Adrenal Humana	pcD (3.0 kb) (White e col., 1985)	fragmento de 2,1 kb inserido nos sítios Bam HI	Dr. Perin White
pC4B550	cDNA do terminal 5' do gene C4B	pTZ18B (2,9 kb) (Strachan e col., 1987)	fragmento de 550 pb inserido nos sítios Bam HI/ Kpn I	Dr. Tom Strachan

5. Transformação de bactérias:

5.1. Preparo de células competentes:

Células competentes de *E. coli* da linhagem DH5 α (Apêndice I), foram preparadas conforme protocolo descrito por Sambrook e col., modificado (1989).

No primeiro dia, inocula-se uma colônia isolada da bactéria em 10 ml de meio líquido LB (apêndice I: item 1.1) em tubo de ensaio. Incuba-se durante a noite a 37°C sob agitação a 250 rpm.

No segundo dia, inocula-se 1 ml da cultura obtida na etapa anterior em 100 ml do mesmo meio. A cultura é mantida a 37°C sob agitação a 250 rpm e o crescimento é monitorado espectrofotometricamente a 550 nm em intervalos não regulares até atingir a $\text{DO}_{550} = 0,45\sim 0,55$.

A cultura acima é então distribuída em dois tubos de 50 ml e, estes são colocados em gelo por 7 minutos. As células são recolhidas por centrifugação a 3.750 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante é descartado e as células ressuspensas em metade do volume original (25 ml para cada “pellet”) com CaCl₂ 50 mM gelado e, mantidas em gelo por 30 minutos. No final deste intervalo, as células são submetidas à nova centrifugação nas mesmas condições e cada “pellet” ressuspensado com 3 ml (1/50 do volume original) da solução de CaCl₂ + glicerol gelado.

A suspensão de células competentes é distribuída em alíquotas de 100 µl, mantidas em gelo, logo em seguida foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas rapidamente a -70°C.

Solução de CaCl₂ + glicerol

CaCl ₂	50 mM
Glicerol	15%

Solução de CaCl 50 mM

A solução foi esterilizada por passagem em filtro de 0,45 micron e armazenada a 4°C.

5.2. Transformação bacteriana:

Para o plasmídeo contendo o inserto de interesse foi realizada a transformação na bactéria DH5α para posterior amplificação através do seguinte procedimento, segundo protocolo Sambrook e col modificado (1990):

Alíquotas de 100 µl de células competentes da bactéria DH5α são retiradas do freezer -70°C e colocadas em gelo para descongelar lentamente. A cada tubo adiciona-se aproximadamente 40 ng de DNA plasmidial. Esta mistura é mantida em gelo por 30 minutos.

Ao término deste período de incubação, cada preparação foi submetida ao choque térmico com o seguinte procedimento: 42°C por 90 segundos (tempo crítico) e imediatamente colocados no gelo por 1 minuto. Adicionou-se a estes tubos 700 µl de meio LB líquido (sem ampicilina), e foram mantidos a 37°C por 30 minutos.

Uma alíquota de 150 µl foi rapidamente vertida sobre placas de Petri individuais com meio LB sólido (apêndice I: item 1.2) contendo ampicilina para seleção. As placas foram transferidas para estufa e mantidas a 37°C por 16 h para que as colônias transformantes pudessem desenvolver.

Solução antimicrobiana (ampicilina)

Concentração estoque 25 mg/ml

Concentração final no meio deve ser de 100 µg/ml

A solução foi esterilizada por filtração em filtro de 0,45 µm, alíquotada e armazenada a -20°C.

5.3. Preparo do estoque de bactérias:

Uma das colônias transformantes obtidas pelo procedimento acima foi selecionada e inoculada em meio LB líquido contendo 100 µg/ml de ampicilina e incubada a 37°C por 18 h em “shaker” com agitação vigorosa. A cultura foi separada em alíquotas de 0,9 ml às quais foi adicionado 0,1 ml de meio HMFM (apêndice I: item 1.3) para congelamento. As amostras foram então colocadas em tubos apropriados e estocadas em freezer a -70°C.

5.4. Mini-preparação de plasmídeo:

A mini-preparação foi realizada com a finalidade de certificar se o fragmento de interesse estava presente no plasmídeo, antes de se proceder a extração em larga escala.

As colônias transformantes foram selecionadas e crescidas em tubo de ensaio contendo 5 ml de meio LB líquido e 100 µg/ml de ampicilina (ver item 5.2) a 37°C, durante a noite com agitação de 250 rpm.

Transferiu-se 1,5 ml da cultura para eppendorf o qual foi centrifugado em microcentrifuga por 2 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o “pellet” foi ressuscitado em 100 µl de “tampão de lise”. Em seguida, fez-se uma extração com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) (ver item 3.1), agitou-se em “vortex” por 15 segundos e se repetiu a centrifugação anterior. Retirou-se a fase aquosa e o DNA foi precipitado com 200 µl de etanol absoluto gelado. Imediatamente centrifugou-se por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, lavou-se o “pellet” com etanol gelado 70% e o DNA foi dissolvido em 50 µl

de TE (ver item 3.1). Foi feito um teste em gel de agarose 0,8% para confirmar a presença do plasmídio.

Solução de tampão de lise

LiCl	2,5 M
Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
Triton 100x	4%
EDTA	62,5 mM

6. Extração de DNA de plasmídio em larga escala:

Foi seguido basicamente o protocolo descrito por Sambrook e col. (1989), com algumas adaptações. Um inóculo de bactérias contendo o plasmídio de interesse foi feito em 5 ml de meio LB líquido com 100 µg/ml ampicilina (ver item 3.1) e mantidas durante a noite a 37°C sob agitação de 250 rpm. No dia seguinte, os 5 ml de cultura foram adicionados em 500 ml de meio LB líquido com 100 µg/ml de ampicilina e incubada a 37°C sob agitação vigorosa por aproximadamente 18 h.

A cultura foi dividida em 2 frascos de centrifuga de 250 ml e submetida à centrifugação em 5.000 rpm por 20 minutos sob refrigeração a 4°C. Desprezou-se o meio (sobrenadante) e o “pellet” foi lavado com 100 ml de STE, agitando em “vortex” para misturar bem, em seguida centrifugou-se à 5.000 rpm por 20 minutos a 4°C e desprezou-se o sobrenadante.

As células foram ressuspensas em 18 ml de Solução I e acrescentou mais 2 ml de lisozima (10 mg/ml em Tris-HCl 10 mM pH 8,0), preparada na hora. Adicionou-se 40 ml de Solução II, o conteúdo foi misturado repetidas vezes lentamente por inversão e mantido à temperatura ambiente por 10 minutos.

O DNA bacteriano foi precipitado com adição de 20 ml da Solução III, o conteúdo foi misturado lentamente por inversão e mantido em gelo por 10 minutos. O precipitado floculoso formado foi separado por centrifugação à 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi passado por 4 camadas de gaze e o filtrado foi dividido em dois tubos de centrifuga. O DNA plasmidial foi precipitado por adição de 0,6 vezes o volume de isopropanol. Após misturar bem, manteve-se à temperatura ambiente por 10 minutos. Centrifugou-se então, à 5.000 rpm por 20 minutos à temperatura ambiente. O sedimento foi

lavado uma vez com etanol 70% e depois de seco dissolvido em 3 ml de TE. A seguir, procedeu-se a purificação do DNA plasmidial.

Solução de STE

Tris-HCl	10 mM (pH 8,0)
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM (pH 8,0)

Solução I

Tris-HCl	25 mM
EDTA	10 mM
Glicose	50 mM

Conservar a 4°C.

Solução II

NaOH	0,2 N
SDS	1%

Preparar na hora do uso.

Solução III

Acetato de potássio	5 M (pH 4,8)
---------------------	--------------

Mistura de acetato de potássio e ácido acético glacial resultando numa concentração de 5 M com respeito aos íons acetato e 3 M com respeito aos íons potássio.

Conservar a 4°C.

6.1. Purificação do DNA plasmidial:

A purificação do DNA plasmidial iniciou-se com extração volume\volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) (ver item 3.1), realizada por duas vezes seguida de uma extração com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) (ver item 3.1).

O RNA contaminante foi eliminado adicionando-se o mesmo volume de acetato de amônio 7,5 M. Após a mistura por inversão foi incubado no gelo por 10 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 15.000 rpm por 10 minutos a 4°C (O “pellet” de RNA formado foi desprezado).

O sobrenadante com o DNA plasmidial foi transferido para outro tubo e precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado, deixado durante uma noite em freezer -20°C . Após esse período centrifugou-se a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C . Lavou-se por três vezes com 5 ml de etanol 70% gelado. O sobrenadante foi descartado e depois de seco, o “pellet” foi dissolvido em 200 a 500 μl de TE (ver item 3.1). A leitura da concentração foi realizada em espectrofotômetro.

7. Preparo do fragmento de interesse:

O fragmento contendo a seqüência homóloga àquela a ser estudada encontra-se inserido no plasmídio através de clonagem num sítio de reconhecimento de uma ou duas enzimas de restrição conhecidas. Assim, o fragmento pode ser liberado do vetor (plasmídio) por digestão com enzimas de restrição. Após a extração em larga escala dos plasmídios contendo os fragmentos de interesse, estes foram digeridos com enzimas de restrição. Para cada plasmídio, montou-se uma reação contendo de 10 a 30 μg de DNA de plasmídio, tampão adequado para cada enzima de restrição e, aproximadamente 10 a 30 unidades da enzima. Incubou-se na temperatura adequada para cada enzima durante no mínimo 3 h. O volume total da reação foi, então aplicado em um gel de agarose de 0,8% e o fragmento de interesse foi separado do vetor por diferença de tamanho através de eletroforese. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. A banda correspondente ao fragmento de interesse foi extraída da agarose por três métodos diferentes, elegendo-se o mais adequado para cada situação em particular, são eles:

7.1. Eletroeluição:

O pedaço de agarose, cortado com o auxílio de um bisturi estéril contendo o fragmento de DNA, foi colocado em uma bolsa de diálise contendo 2 a 3 ml de TAF e submetido a um campo elétrico como numa eletroforese normal. A eluição do DNA do gel foi acompanhada por observação em luz ultravioleta. Na próxima etapa, à solução tampão contendo o DNA foram adicionados 2,5 volumes de etanol e acetato de sódio pH 5,2 para uma concentração final de 0,3 M e, levado a -20°C . Após um período de aproximadamente 18 h, centrifugou-se o DNA a 10.000 rpm por 20 minutos que foi, então, dissolvido em aproximadamente 40 μl de TE (ver item 3.1) (Maniatis e col., 1990).

Solução tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)

concentrações finais:

Tris-acetato	0,04 M
EDTA	0,001 M

solução estoque 50 x :

Para cada litro de solução:

Tris-base	242 g
Ácido Acético Glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100 ml

Autoclavar.

7.2. Congelamento:

Esta técnica foi desenvolvida neste trabalho (ainda não publicada). A banda de interesse foi cortada do gel e transferida para uma seringa equipada com agulha 25 x 7. Passou-se a agarose através da agulha e se adicionou o mesmo volume de fenol saturado com TE pH 8,0, homogenizando a mistura em “vortex”. Congelou-se em N₂ líquido e, após o descongelamento, centrifugou-se por 10 minutos em microcentrífuga. Retirou-se a fase superior e procedeu-se uma extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) (ver item 3.1).seguida de uma extração com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) (ver item 3.1).

O DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto gelado e 0,5 volume de de acetato de amônio 7,5 M. Após incubação a -20°C por aproximadamente 18 h, centrifugou-se a 10.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” de DNA dissolvido em 20 µl de TE (ver item 3.1). A concentração foi estimada em gel de agarose.

7.3. Papel DEAE:

Extração do fragmento segundo protocolo Sambrook e col. modificado (1989). A banda a ser eluída do gel de agarose 0,8% já contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio e corrido em tampão TAE (ver item 7.1), foi localizada com luz UV. Com um bisturi fez-se uma incisão no gel, à frente da banda, e com ajuda de pinças inseriu-se o papel DEAE (DE81, Whatman) de tamanho adequado, até que o mesmo tocasse o fundo da cuba.

A eletroforese prosseguiu até que todo o DNA migrasse para o papel DEAE. O papel foi cuidadosamente removido com auxílio de uma pinça e transferido para um tubo eppendorf com 400 µl de tampão de eluição esterilizado por filtração, e mantido por 30 minutos a 68°C. O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf após uma centrifugação de 15 minutos. O DNA foi precipitado com 4 µl de MgCl₂ 1 M e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. Após incubação a -20°C por aproximadamente 18 h, centrifugou-se a 10.000 rpm por 20 minutos e o DNA foi dissolvido em 20 µl (ver item 3.1) de TE. A concentração foi estimada em gel de agarose.

Solução estoque de brometo de etídio 10 mg/ml

Brometo de etídio	1,0g
H ₂ O Milli-Q q.s.p	100 ml

Solução de brometo de etídio (0,5 ug/ml)

Solução estoque de brometo de etídio 10mg/ml	5 µl
H ₂ O Milli-Q q.s.p	100 ml

Armazenado em frasco escuro a 4^oC.

Solução de tampão de eluição

Tris-HCl	1 M (pH 8,0)
EDTA	0,5 M (pH 8,0)
NaCl	5 M

A solução foi esterilizada por passagem em filtro de 0,45 micron e armazenada a 4^oC.

8. Análise do DNA genômico pelo método de “Southern blot”:

O DNA genômico de cada indivíduo extraído pelos métodos descritos nos itens 4.1 e 4.2 foram utilizados em “Southern blots” preparados da seguinte maneira:

8.1. Digestão do DNA genômico com enzimas de restrição:

O DNA genômico foi clivado com as enzimas de restrição *Taq* I, *Kpn* I e *Bgl* II. As reações foram preparadas em um volume final de 150 µl, contendo de 10 a 15 µg de DNA genômico, tampão de restrição recomendado pelo fabricante (muitas vezes esses tampões são fornecidos juntamente com as enzimas de restrição, numa concentração 10 vezes maior que a final na reação, como é o caso das firmas Gibco-BRL e Boeringer-Mannhein), 4 mM

de espermidina, enzima de restrição apropriada numa proporção de 3 U de enzima para cada μg de DNA e água Milli-Q para completar o volume.

As reações foram incubadas em banho-maria durante uma noite a 37°C , com exceção feita para a enzima *Taq* I, cuja temperatura de incubação foi de 65°C . Antes das reações de digestão com *Taq* I serem levadas ao banho-maria, adicionou-se duas gotas de óleo para evitar evaporação durante a incubação.

O DNA foi precipitado com acetato de sódio pH 5,2 para uma concentração final de 0,3 M e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado, por 18 h a -20°C . Centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos em microcentrifuga e lavou com etanol 70%. As amostras de DNA foram ressuspendidas com 15 μl de TE (ver item 3.1) aos quais foram acrescentados 3 μl de azul de bromofenol em seguida foram aplicadas em um gel de agarose 0,8%.

Solução tampão de amostra 6x (azul de bromofenol)

Glicose	50%
Azul de Bromofenol	25%
TBE 10x pH 8,0	10,0 ml

Aliquotar em eppendorf e estocar a 4°C .

8.2. Preparo do gel e eletroforese:

Preparou-se um gel de agarose 0,8%, dissolvido em tampão TBE em cuba de acrílico. A eletroforese foi feita a uma voltagem média de 40 volts, em tampão TBE. Como marcador de peso molecular utilizou-se o DNA “ladder” de 1 kb. A eletroforese prosseguiu por tempo adequado para cada enzima dependendo do tamanho de fragmento a ser estudado. Em seguida o gel foi corado com brometo de etídio (ver item 7.3), por 30 minutos.

Foi tirada uma fotografia em câmera Polaroid sob iluminação de luz ultravioleta (transiluminador), colocando uma régua fluorescente ao lado do gel para poder reconhecer o tamanho dos fragmentos detectados pela sonda.

Solução estoque de tampão Tris-Borato (TBE 10x)

Para 1 litro:

Tris-Base	108 g
-----------	-------

Ácido Bórico	55 g
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	40 ml

Autoclavar.

Solução de uso do tampão Tris-Borato (TBE 1x)

Tris-Base	0,089 M
Ácido Bórico	0,089 M
EDTA (pH 8,0)	0,002 M

Solução estoque do marcador de peso molecular - 1 kb LADDER (GiBco-BRL)

Para 1.240 µl:

DNA LADDER	40 µl
TBE 10x	100 µl
Azul de Bromofenol	200 µl
H ₂ O estéril	900 µl

Armazenar 4°C.

8.3. Transferência do DNA do gel para suporte sólido:

Para da transferência dos fragmentos de DNA contidos no gel para a membrana de nylon (Hybond-N+ da Amersham) pelo método “Southern” (Southern, 1975 - modificado), foram utilizados dois métodos: transferência alcalina ou transferência salina.

8.3.1. Transferência alcalina

O gel foi tratado com a solução de depurinação por 15 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, tratou-se duas vezes com a solução de desnaturação por 20 minutos cada uma à temperatura ambiente, sob agitação. Para a transferência preparou-se um sistema de “Southern blot” utilizando-se a própria solução de desnaturação como veículo de transferência. A membrana de nylon foi neutralizada após a transferência com solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M por 30 minutos.

Solução de depurinação

HCl	0,25 N
-----	--------

Fazer na capela.

Solução de desnaturação

NaOH	0,4 N
NaCl	1 M

Solução tampão fosfato de sódio 0,1 M

Estoque 1 M: Prepara-se uma solução de tampão fosfato de sódio monofásico 1 M e com esta solução ajusta o pH da solução 1 M do bifásico para pH 7,2.

8.3.2. Transferência salina

O gel foi tratado primeiramente com uma solução de despurinação (ver item 8.3.1) por 15 minutos à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida foi transferido para a solução de desnaturação por 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação.

Depois da desnaturação, procedeu-se duas etapas de 15 minutos de lavagem do gel com solução de neutralização. A transferência foi realizada com solução de 20x SSC.

Solução de desnaturação

NaOH	0,5 N
NaCl	1,5 M

Solução de neutralização

Tris-HCl	0,5M (pH 8,0)
NaCl	1,5 M

Solução de SSC 20x

NaCl	3 M
Citrato de sódio	0,3 M

Autoclavar.

Nos dois casos, após o sistema de “Southern blot” ter sido montado, a transferência prosseguiu por 18 h. A membrana foi retirada e incubada por 2 h em forno a 80°C. A membrana foi estocada seca em saco plástico selado.

9. Marcação das sondas:

As sondas utilizadas foram obtidas por excisão de plasmídios sendo portanto fragmentos de DNA de fita dupla para serem empregados nas hibridizações de “Southern blots”. A marcação das sondas foi feita pelos métodos de “Nick-Translation” descrito por Rigby e col. (1977) e o de “Random-Priming” descrito por Feinberg e Volgstein (1983), ambos empregam a incorporação de um nucleotídeo marcado radioativamente no fragmento de DNA. Os nucleotídeos radioativos foram adquiridos da Amersham Internacional.

A reação de “Nick-Translation” consiste em se produzir “nicks” no DNA por ação da enzima DNase I e, em seguida, corrigi-los por ação da enzima DNA polimerase I. A reação se processou incubando 200 a 500 ng do DNA da sonda em tampão contendo 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP quando se usou o α -³²P-dCTP; ou, dTTP, dGTP, dCTP, quando se usou o α -³²P-dATP), 10 μ l do nucleotídeo marcado e 5 μ l da mistura de enzimas (0,4 U/ μ l de DNA polimerase I, 40 μ g/ μ l de DNase I) num volume total de 50 μ l a 14°C, por 1,5 h.

Solução tampão “Nick Translation”

Tris-HCl	500 mM (pH 7,8)
MgCl ₂	50 mM
2-mercaptoetanol	100 mM
BSA	100 g/ml

Armazenado em freezer a 20°C.

Os reagentes utilizados estavam disponíveis em “Kits” da BRL-Bethesda Research Laboratories Life Technologies, com exceção do α -³²P-dCTP e do α -³²P-dATP que foram adquiridos mensalmente devido à curta vida média do isótopo ³²P (14,5 dias).

A reação de “Random Priming” consiste em uma polimerização do DNA por ação do fragmento Klenow da DNA polimerase I a partir de “primers” (hexameros) aleatórios. Em geral, a reação se processou num volume final de 50 μ l da seguinte forma: desnaturou-se primeiramente por aquecimento a 100°C por 10 minutos 25 a 50 ng do DNA em volume variável de H₂O para completar 23 μ l, deixando, em seguida, em gelo por 5 minutos. Centrifugou-se rapidamente em microcentrifuga, acrescentou-se 15 μ l de tampão, 5 μ l do α -³²P-dCTP (3.000 Ci/mmol) e 3 unidades da enzima. Incubou-se à temperatura ambiente

por no mínimo 2 h. Da mesma forma que o método anterior, os reagentes utilizados também estão disponíveis em “Kits” - Gibco BRL ou Promega.

Solução tampão “Random Priming”

HEPES	0,67 M
Tris-HCl	0,17 M
MgCl ₂	17 mM
2-mercaptoetanol	33 mM
BSA	1,33 mg/ml
dNTPs	0,001 mM
18 OD260 Unidades/ml dos “primers” [hexameros, pH 6,8]	

Nos dois casos, após a reação, completou-se o volume para 100 µl com TE (ver item 3.1), os nucleotídeos não incorporados foram, então, eliminados através da passagem por uma coluna de Sephadex G-50. Em seguida, contou-se a radioatividade de 1 µl em um contador de cintilação líquida e, calculou-se a eficiência da incorporação. Todo o trabalho com radioisótopos foi realizado acompanhando com um monitor de radiação do tipo Geiger.

Quando possível, foi sempre elegido o método de “random priming” por ser o mais eficiente em produzir sondas com alta atividade específica (cpm/µg de DNA).

10. Hibridização

Após a transferência pelo método de “Southern”, os filtros obtidos contendo o DNA genômico de cada indivíduo digerido com a enzima de restrição de interesse, foram hibridizados com a sonda desejada marcada adequadamente. As condições de reação variaram conforme a sonda, porém de uma maneira geral esse processo se deu em duas etapas, segundo protocolo de Mornet e col. (1986b), modificado:

10.1. Pré-hibridização: os filtros foram incubados em solução de pré-hibridização por 18 h a 42°C em tubos apropriados e postos em incubadora.

Solução de pré-hibridização

Formamida	50%
SSC	5x

Tris-HCl	20 mM (pH 7,5)
Denhardt's	10x
SDS	1%
ssDNA	200 µl/ml

Desnaturar e adicionar o ssDNA na hora do uso.

Conservar a 4^oC em frasco com papel alumínio.

Solução 100x Denhardt's

Ficoll 400	2,0g
Polyvinilpyrrolidone (PVP)	2,0g
Soro bovino fetal (BSA) sigma	2,0g
H ₂ O destilada	100 ml

Solução estoque des ssDNA

ssDNA	10 mg/ml
-------	----------

Como preparar: em um becker dissolver o ssDNA com H₂O bidestilada, sobre um agitador magnético por 2 a 4 h, a temperatura ambiente. Em seguida é sonicado no aparelho ULTRASONIC Homogenizer 47 series. Aliquotar e armazenar a -20^oC. Na hora do uso desnaturar o ssDNA por 10 minutos em água fervente.

10.2. Hibridização: a solução acima foi trocada pela de hibridização contendo aproximadamente 2 x 10⁶ cpm/ml da sonda, incubou-se cerca 18 h a 42^oC.

Solução de hibridização

Formamida	50%
SSC	5x
Tris-HCl	20 mM (pH 7,5)
Denhardt's	2x
SDS	1%
Sulfato de dextrana	25%
ssDNA	200 µl/ml

Desnaturar e adicionar o ssDNA na hora do uso.

Conservar a 4^oC em frasco com papel alumínio.

Solução de sulfato de dextrana 50x

Sulfato de dextrana	10 g
H ₂ O bidestilada	13 ml

11. Lavagem dos filtros:

Após a hibridização os filtros foram lavados uma vez em uma condição de baixa estringência à temperatura ambiente para retirada do excesso de sonda, por 15 minutos e, duas vezes em condições de alta estringência a 65°C, por 20 minutos.

Solução de lavagem baixa estringência

SSC	2x
SDS	0,1%

Solução de lavagem alta estringência

SSC	0,1x
SDS	0,1%

12. Autoradiografia:

Os filtros lavados foram expostos a filmes de raio-X (Kodak X-OMAT AR) em cassetes apropriados com intensificador de sinal ("Lightning Plus" da Dupont), a -70°C por um período adequado. Após a revelação os filtros foram lavados para a retirada da sonda, com uma solução de Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5, EDTA 0,001 M e SDS 0,1% em volume final de 990 ml, a 100°C.

13. Densitometria:

A intensidade relativa dos fragmentos correspondentes aos genes CYP21B e CYP21A foram determinada por análises densitométricas das bandas nas autoradiografias por um densitômetro a laser LKB 222-020 Ultrosan XL. A quantificação dos fragmentos foi feita através da razão da área sob as respectivas curvas. Vários filmes foram expostos por diferentes períodos de tempo para obtenção de uma média de intensidade para uma correta análise.

RESULTADOS

Foram estudadas, como citado anteriormente, 23 famílias num total de 92 cromossomos. Iremos aqui considerar cromossomos separadamente devido ao alto grau de heterozigose encontrada. Dentre as 23 famílias estudadas (mostradas na Tabela 1 no apêndice) 5 são de casamentos consanguíneos, sendo que em uma delas o alelo afetado não é o compartilhado pelos pais. Assim sendo, em todos os 87 cromossomos (42 afetados, 45 não-afetados) foram observados padrões nítidos de restrição da região gênica da 21-OHase. A intensidade de hibridização dos fragmentos relacionados ao gene ativo da 21-OHase (CYP21B), comparada com a dos relativos ao pseudogene inativo (CYP21A) foi analisada nos 23 (total de 30) pacientes não relacionados e em seus parentes não afetados (pais e irmãos). No total de pacientes estão representadas as duas formas da deficiência clássica da 21-OHase, sendo 70% (21/30) da forma perdedora de sal e 30% (9/30) da forma virilizante simples.

Devido à variação no número de unidades (CYP21+C4) encontrada tanto nos cromossomos afetados quanto nos normais, a descrição dos resultados para cada um foi feita separadamente.

1. Rearranjos gênicos no "cluster" C4/CYP21 em pacientes com a forma clássica de HCA:

Os defeitos genéticos foram detectados nos "blots" por redução de intensidade (heterozigotos) ou ausência (homozigotos) dos fragmentos relativos ao gene e ao pseudogene obtidos na digestão com três enzimas de restrição, a saber: *Taq* I, *Kpn* I e *Bgl* II de acordo com o esquema mostrado na figura 4B. A intensidade relativa de cada fragmento de restrição foi determinada por comparação entre as intensidades dos fragmentos na mesma linha de eletroforese. Os fragmentos de DNA correspondentes aos genes CYP21B e CYP21A foram localizados e identificados por tamanho pela hibridização com a sonda pC21/3c e, os fragmentos dos genes C4A e C4B com a sonda do complemento C4, C4B550.

A ausência ou a diminuição da intensidade das bandas *Taq* I de 3,7 kb e das de 6,0/5,4 kb indicam, respectivamente, homozigose ou heterozigose para a deleção de 30 kb (C4B+CYP21B). Foram considerados eventos de conversão gênica aqueles que envolvem uma suposta substituição em larga escala do gene CYP21B por seqüências do pseudogene CYP21A, incluindo o sítio *Taq* I e *Kpn* I, localizados próximos do terminal 5' do pseudogene e do gene, respectivamente. Neste caso, o fragmento correspondente ao gene

CYP21B gerado pela enzima *Taq* I é também de 3,2 kb e o produzido pela enzima *Kpn* I é de 4,0 kb, portanto a intensidade relativa das bandas CYP21A:CYP21B deve ser de 3:1 nos casos de heterozigose. Ainda, nesse tipo de conversão não se observa nenhuma alteração nas bandas de C4B. Como será discutido mais adiante, foi encontrada uma frequente variação de intensidade dos fragmentos refletindo eventos de duplicação ou deleção dos genes C4A e B e o pseudogene CYP21A associados ou não com os alelos afetados. Assim, os padrões de hibridização para as deleções e conversões heterozigotas do gene CYP21B e duplicações do pseudogene CYP21A, parecem bastante similares em “blots” com *Taq* I, onde todas aparecem com diminuição da intensidade relativa do fragmento de 3,7 kb. A enzima *Kpn* I, que caracteriza o gene CYP21B num fragmento de 2,9 kb e o pseudogene CYP21A num fragmento de 4,0 kb foi usada para confirmação dos resultados, pois o padrão de hibridização segue o mesmo da enzima *Taq* I. Para uma melhor análise e distinção entre as similaridades dos padrões de restrição, foram feitos “blots” com a enzima *Bgl* II.

Através da análise de digestos de *Bgl* II pode-se distinguir entre eventos de deleções gênicas, conversões em larga escala e duplicações do pseudogene CYP21A. Os sítios de corte de *Bgl* II localizam-se fora da unidade CYP21 (figura 4B), normalmente um fragmento de 12 kb refere-se ao pseudogene CYP21A e o fragmento de 10 kb ao gene CYP21B. O fragmento de 12 kb de *Bgl* II não aparece no caso de deleção de CYP21A ou CYP21B. Em caso de deleção do gene CYP21B, ocorre uma deleção de aproximadamente 30 kb que inclui o final 3' do pseudogene CYP21A, todo o gene para o complemento C4B e o final 5' do gene CYP21B, gerando um gene híbrido CYP21A/B, não funcional (figura 4C). Assim, a extremidade 5' do produto da recombinação apresenta características de restrição do pseudogene CYP21A. Isto se torna evidente a partir da persistência do fragmento de 3,2 kb no “blot” com *Taq* I e do fragmento de 4,0 kb no “blot” com *Kpn* I, entretando o final 3' apresenta características do gene CYP21B, onde se localiza o sítio *Bgl* II, portanto o fragmento gerado pela digestão do híbrido com essa enzima é de 10 kb. Então, a ausência, na homozigose ou, diminuição da intensidade, na heterozigose, do fragmento de 12 kb com *Bgl* II e dos fragmentos *Taq* I de 6,0/5,4 kb referentes ao gene C4B indicam perda de DNA, podendo ser deleção de uma das duas unidades (CYP21A+C4B) ou (C4B+CYP21B). Em conversões gênicas de larga escala, o gene CYP21B adquire o sítio extra de *Taq* I do terminal 5' do pseudogene, então, o fragmento de 3,7 kb desaparece (homozigotos) ou permanece com a intensidade diminuída (heterozigotos), mas os fragmentos *Taq* I de C4 e *Bgl* II de CYP21 permanecem inalterados (Harada e col., 1987; Strumberg e col., 1992; White e col., 1986). Em duplicações

envolvendo o pseudogene CYP21A e o gene C4B ocorre aumento da intensidade do fragmento de 12 kb com *Bgl* II e das bandas referentes ao pseudogene CYP21A e C4B com *Taq* I. Deve-se ressaltar ainda, que o padrão com a enzima *Bgl* II permite a distinção entre conversão e deleção por ser “insensível” à conversão.

1.1. Análise dos padrões de restrição dos indivíduos afetados:

Os diferentes padrões de restrição encontrados por “Southern blot” para os genes CYP21 e C4 nos indivíduos afetados estão representados na figura 7.

O padrão de restrição mostrado no painel A representa intensidades iguais com todas as enzimas e foi achado em 17 pacientes (11 famílias). Dentro desse padrão, três diferentes haplótipos podem ser distinguidos devido ao polimorfismo de restrição do gene C4B. Deve-se ressaltar que esse polimorfismo foi utilizado para predizer a origem do alelo afetado no estudo das famílias (painel A, linhas 1-3). Devido às intensidades não diferirem do padrão normal, o fenótipo afetado deve ser justificado pela presença de mutações que não são detectáveis por "Southern blot" nas duas cópias do gene CYP21B.

As deleções bem como as duplicações do pseudogene CYP21A não são consideradas diretamente como causa da deficiência da 21-OHase. Entretanto, um caso de deleção e quatro casos de duplicação do CYP21A foram encontrados em alelos afetados (painel B). O padrão de restrição visto na linha 1 indica deleção de uma unidade (CYP21A+C4B) e foi encontrado no paciente da família 17, como não se observa alteração na banda de CYP21B com as enzimas *Taq* I e *Kpn* I, podemos inferir que os dois genes CYP21B são afetados com mutações não determinadas. Nesse padrão podemos também observar a presença do fragmento *Taq* I pouco comum de 6,4 kb para o C4. Este fragmento é resultante da junção por um processo de deleção do final 5' do C4A com final 3' do C4B curto (ou de 5,4 kb), formando um híbrido C4A/C4B, que é considerado como marcador de deleção para o pseudogene CYP21A (Palsdottir e col.1987, Schneider, e col., 1986). O padrão mostrado na linha 2 indica a duplicação de uma unidade (CYP21A+C4B^[5,4]) em um dos alelos afetados e foi encontrado em dois indivíduos afetados (pacientes 13 e 28). A paciente da família 22 apresenta um padrão de duplicação quanto aos genes C4 igual ao mostrado na linha 2, porém em relação ao genes CYP21 o padrão será mostrado separadamente. O padrão mostrado na linha 3 foi encontrado no paciente 43. Podemos inferir pelo estudo da família que será discutido mais adiante, que o paciente apresenta a duplicação de uma unidade (CYP21A+C4B^[5,4]) em um alelo e de uma unidade

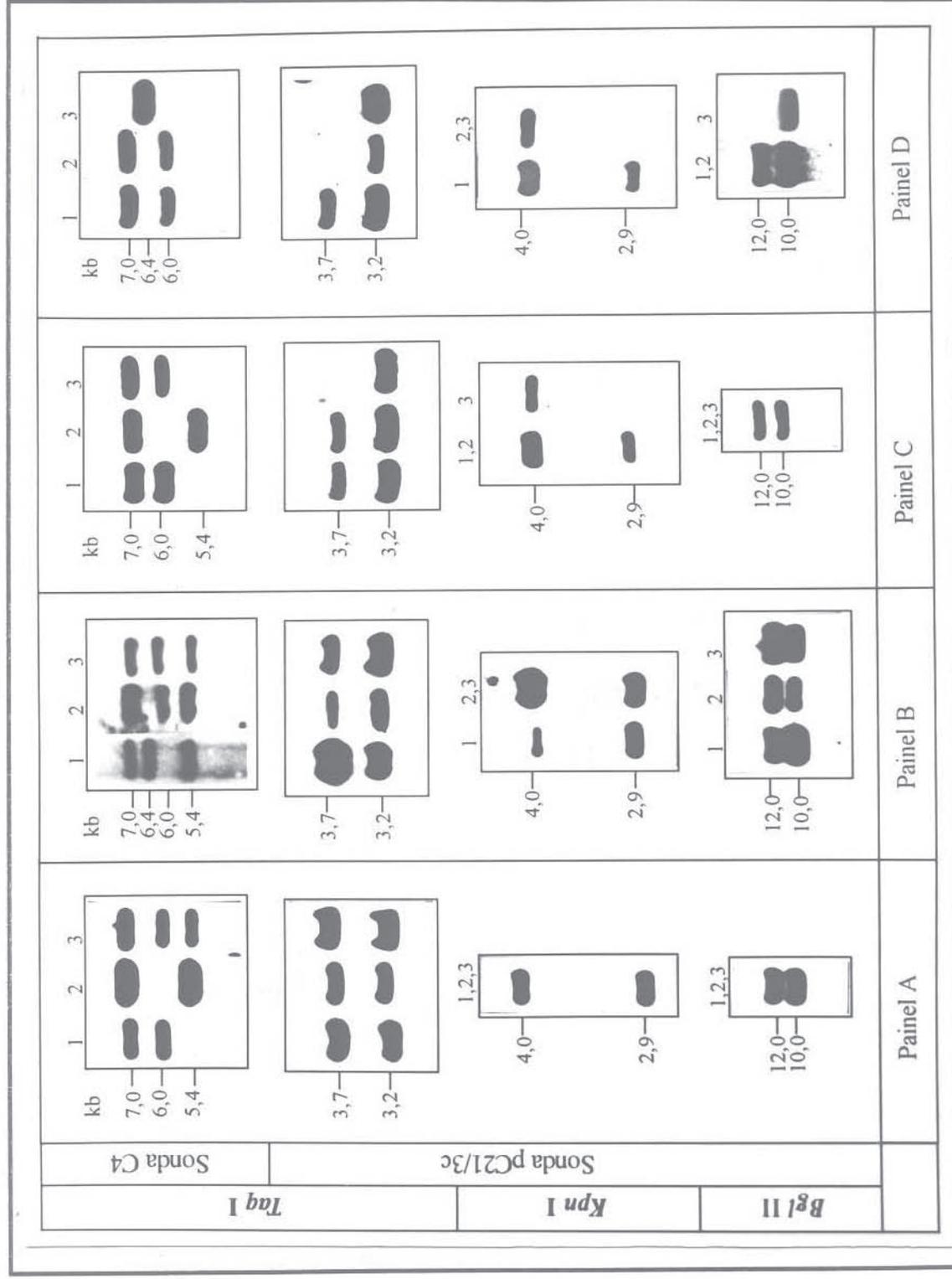


Figura 7 - Análises de hibridização dos "blots" dos pacientes com deficiência da 21-OHase. Painel A: padrões de DNA que não diferem do normal, entretanto devem ser afetados por mutações não detectadas por essa metodologia. Linhas 1-3 mostram polimorfismos de C4. Painel B: padrões de DNA que mostram deleção (linha 1) e duplicação (linhas 2 e 3) do pseudogene CYP21A. Painel C: padrões de DNA em heterozigose (linha 1 e 2) e homozigose (linha 3) para conversão gênica. Painel D: padrões de DNA para deleção gênica/mutação desconhecida (linha 1), deleção gênica/conversão gênica (linha 2) e deleção gênica em homozigose (linha 3).

(CYP21B+C4B^[6,0]) no outro. Quanto à duas cópias do gene CYP21B, deduzimos que provavelmente são afetados com uma mutação não determinada.

A detecção direta em “Southern blot” dos defeitos genéticos em CYP21B responsáveis por HCA foi possível em 10 dos 42 cromossomos afetados não relacionados (23,8%). Nove pacientes apresentam um dos padrões de restrição mostrados nos painéis C e D da figura 7. Estes padrões indicam rearranjos do gene ativo CYP21B.

Os padrões no painel C são compatíveis com uma conversão do final 5' onde se localizam os sítios *Taq* I no pseudogene e o *Kpn* I no gene, fazendo com que no padrão de restrição para essas duas enzimas o gene CYP21B tenha aparência de CYP21A, tais padrões foram encontrados em 4 pacientes. O padrão mostrado na linha 3 foi encontrado em indivíduos homocigotos (pacientes 20a e 20b) para essa conversão gênica dita “em larga escala” onde os fragmentos de 3,7 kb *Taq* I e 2,9 kb *Kpn* I desapareceram, enquanto o padrão de bandas de *Bgl* II com a sonda pC21/3c e o de *Taq* I para o gene C4B permaneceram inalterados. Nos heterocigotos observa-se a intensidade diminuída das bandas *Taq* I de 3,7 kb e *Kpn* I de 2,9 kb (linhas 1, 2, pacientes 19 e 4, respectivamente), enquanto que as bandas de *Bgl* II de CYP21 e as de *Taq* I do C4 também nesse caso permaneceram sem alteração. Como os pacientes 4 e 19 apresentam a conversão em apenas um cromossomo, inferimos que deva possuir uma mutação não detectável pelo método de “Southern” no outro cromossomo afetado.

O painel D da figura 7 ilustra os padrões onde se encontrou a deleção de 30 kb de extensão, incluindo o final 3' do CYP21A, todo o gene C4B e o final 5' do CYP21B. Neste caso, os fragmentos de 3,7 kb *Taq* I e 2,9 kb *Kpn* I também desapareceram (linhas 2 e 3) ou estavam presentes com uma intensidade diminuída (linha 1). Esta deleção extensiva foi achada em quatro indivíduos afetados, em três dos quais aparece em composição heterocigota associada com outras mutações. Os pacientes 23 e 25 apresentaram o padrão da linha 1 indicando a heterocigose para a deleção. Assim, o outro gene afetado nesses dois casos deve ser portador de uma mutação não determinada por esse método. O padrão mostrado na linha 2 foi o encontrado na paciente 12. A ausência das bandas *Taq* I de 3,7 kb e *Kpn* I de 2,9 kb indicariam a deleção homocigota, porém a intensidade diminuída da banda de 6,0 kb em relação à de 7,0 kb com *Taq* I referentes aos genes C4 e da banda *Bgl* II de 10 kb em relação à de 12 kb referentes aos genes CYP21, demonstram a deleção somente em um dos alelos sendo o outro portador de uma conversão em larga escala. Na linha 3 é mostrado o padrão encontrado na paciente 30, filha de casamento consanguíneo.

Verifica-se a ausência dos fragmentos *Taq* I de 3,7 kb, *Kpn* I de 2,9 kb, *Bgl* II de 12 kb configurando a deleção de 30 kb de comprimento formando um gene híbrido CYP21A/B em homozigose. Fato inédito nessa família é a presença do fragmento *Taq* I de 6,4 kb associado à deleção de CYP21B.

Como a variação no número de cópias do pseudogene CYP21A e C4B encontrada foi relativamente alta, as análises qualitativas de “Southern blot” de heterozigotos para esses casos foram de difícil interpretação, porém a inclusão da análise de densitometria das autoradiografias e do estudo de segregação familiar ajudaram na definição dos alelos.

1.2. Análise das intensidades relativas do padrão de bandas por densitometria:

Devido ao grande número de variações de intensidade possíveis, apenas a análise visual das autorradiografias torna-se pouco determinada. Uma forma mais precisa de se calcular a intensidade relativa dos fragmentos correspondentes aos genes da 21-OHase e dos genes do C4, consiste na análise densitométrica das autoradiografias. As amostras sem nenhuma alteração apresentam intensidades numa razão de: 1:1 para a relação das bandas de CYP21A:CYP21B; 1:1 para a relação das bandas de C4A:C4B (no caso de homozigose de C4B para os fragmentos de 6,0 kb ou 5,4 kb); e, 2:1:1 para a relação C4A:C4B (no caso de heterozigose de C4B com os fragmentos de 6,0 kb e 5,4 kb), considerando-se a presença de duas cópias de cada gene, as relações 1:1 representam na verdade uma razão de 2:2. Com o intuito de se ilustrar esse procedimento, são mostradas três figuras (8, 9, 10) onde se vêem as autoradiografias e os gráficos das densitometrias correspondentes. Cada painel à direita da autoradiografia apresenta o gráfico de densitometria que foi obtido para a linha correspondente. A área relativa sob as curvas é dada em porcentagem e a razão entre as porcentagens foi obtida por dividindo-se a maior pela menor.

Na figura 8 são mostrados os resultados obtidos para uma família onde os indivíduos afetados não apresentam variação no padrão de intensidades (linhas 4 e 5). Essa família foi escolhida por ilustrar também um evento de duplicação. Na linha 1, a intensidade aumentada das bandas de CYP21B e C4B apresentam uma razão de 2:3 para os genes CYP21A:CYP21B e, 2:3 para os genes C4A:C4B^[5,4] e, na linha 3 a razão para os genes CYP21 é a mesma que da linha 1 ao passo que para os genes C4 a razão é de 2:1:2 para C4A:C4B^[6,0]:C4B^[5,4]. Isso indica a duplicação de uma unidade (C4B^[5,4]+CYP21B) no alelo normal do pai herdado pelo filho não afetado. Pode-se dizer que nos casos de duplicação (CYP21A+C4B) as intensidades foram geralmente de 3:2.

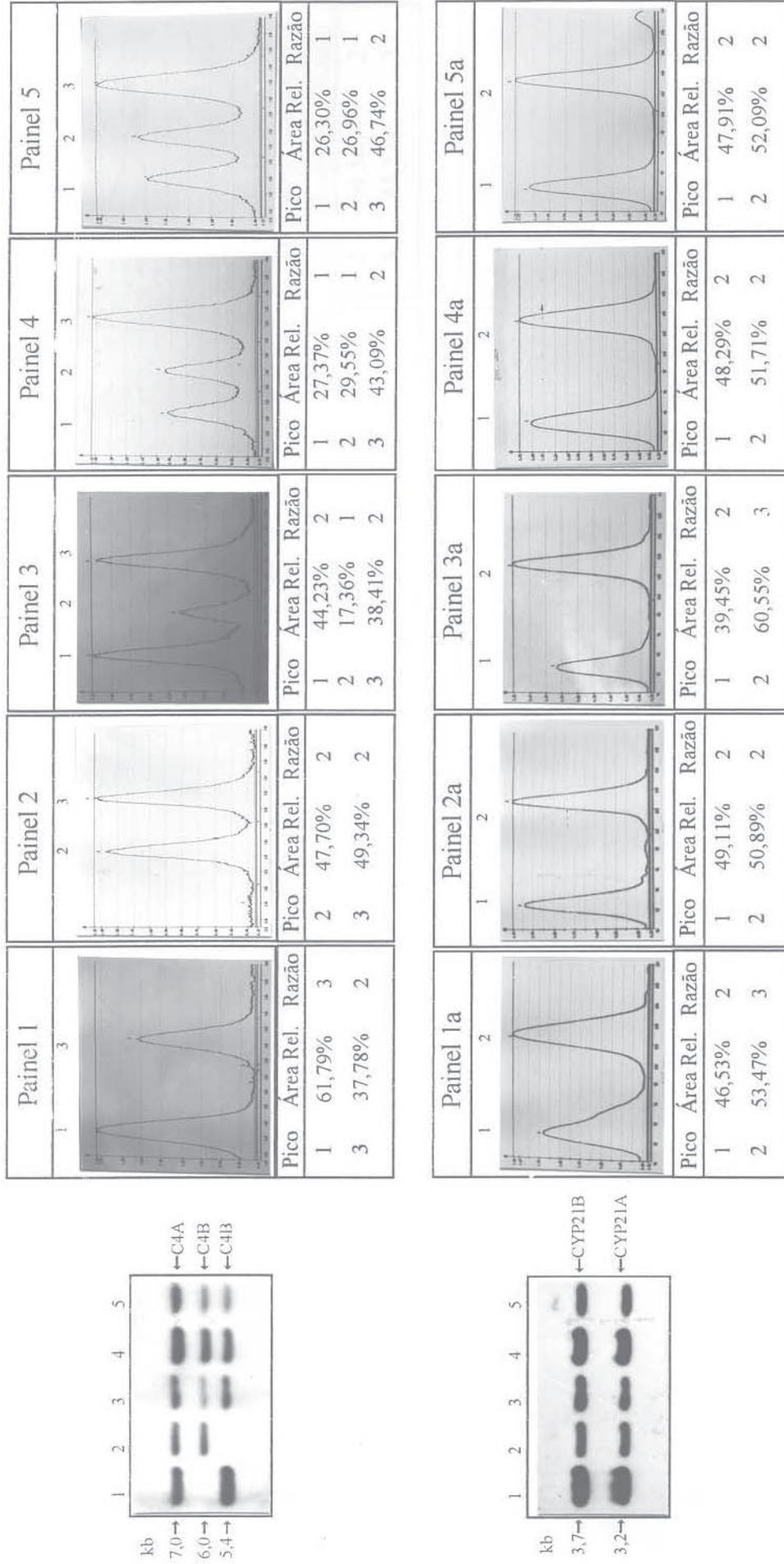


Figura 8 - Autoradiografia e gráficos mostrando as medidas de densitometria das bandas obtidas no "blot" de *Taq I* da família 8. Esta família é constituída por 5 indivíduos, a saber: Pai (linha 1), Mãe (linha 2), Filho normal (linha 3), Filhos afetados linhas 4 e 5. Nos painéis 1, 2, 3, 4 e 5 os picos 1, 2, e 3 correspondem às bandas de 5,4 kb (C4B), 6,0 kb (C4B) e 7,0 kb (C4A), respectivamente. Nos painéis 1a, 2a, 3a, 4a e 5a os picos 1 e 2 correspondem às bandas de 3,2 kb (CYP21A) e 3,7 kb (CYP21B), respectivamente. Os painéis 1 e 1a mostram os gráficos obtidos para o pai. Os painéis 2 e 2a mostram os gráficos obtidos para a mãe. A filha normal é mostrada nos painéis 3 e 3a. Os painéis 4, 4a e 5, 5a mostram gráficos obtidos para os filhos afetados.

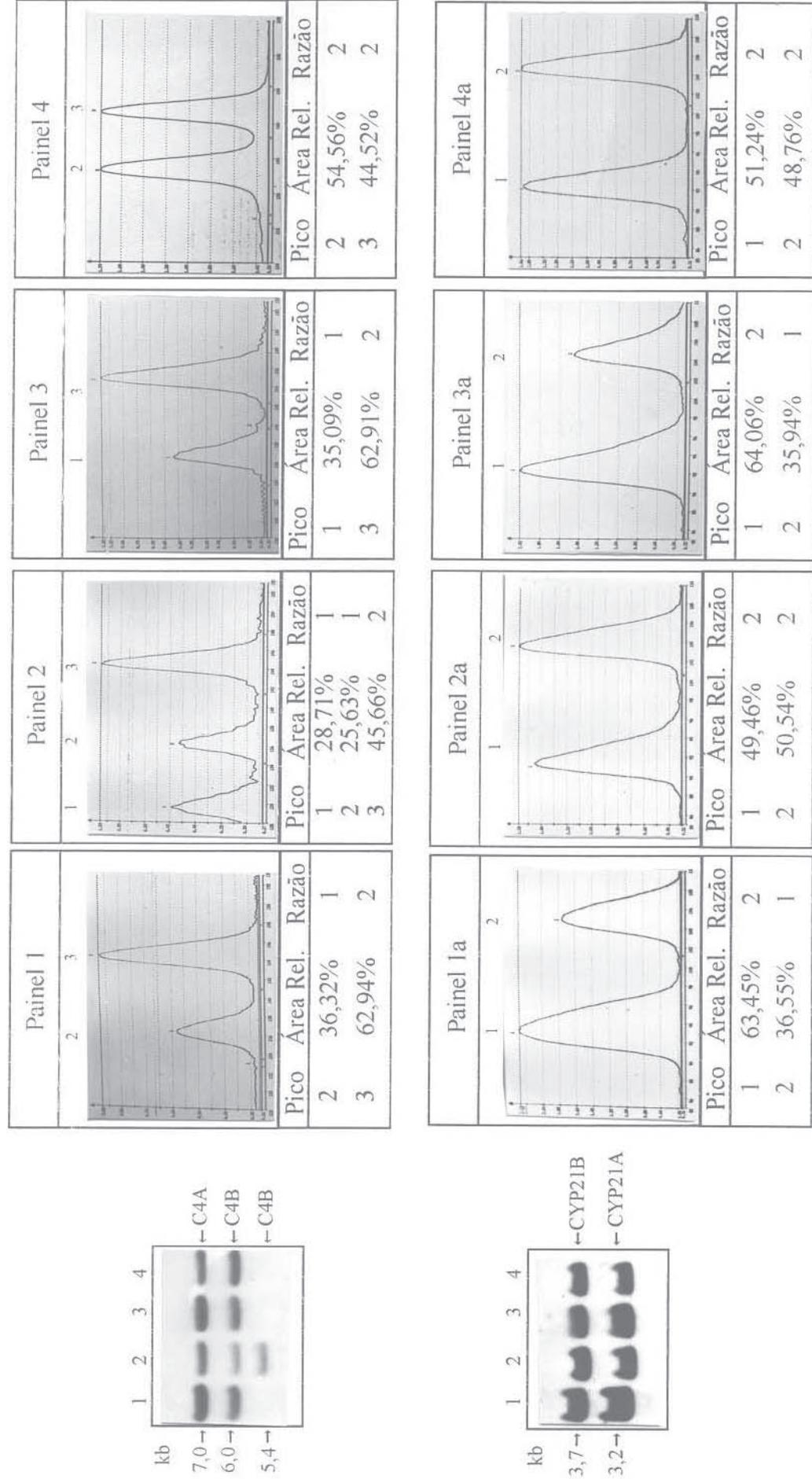


Figura 9 - Autoradiografia e gráficos mostrando as medidas de densitometria das bandas obtidas no "blot" de *Tug I* da família 23. Esta família é constituída por 4 indivíduos, a saber: Pai (linha 1), Mãe (linha 2), Filha afetada (linha 3), Filha normal (linha 4). Nos painéis 1, 2, 3 e 4 os picos 1, 2, e 3 correspondem às bandas de 5,4 kb (C4B), 6,0 kb (C4B) e 7,0 kb (C4A), respectivamente. Nos painéis 1a, 2a, 3a e 4a os picos 1 e 2 correspondem às bandas de 3,2 kb (CYP21A) e 3,7 kb (CYP21B), respectivamente. Os painéis 1 e 1a mostram os gráficos obtidos para o pai. A filha afetada é mostrada nos painéis 3 e 3a. A mãe e a filha normal são mostradas nos painéis 2, 2a e 4, 4a, respectivamente.

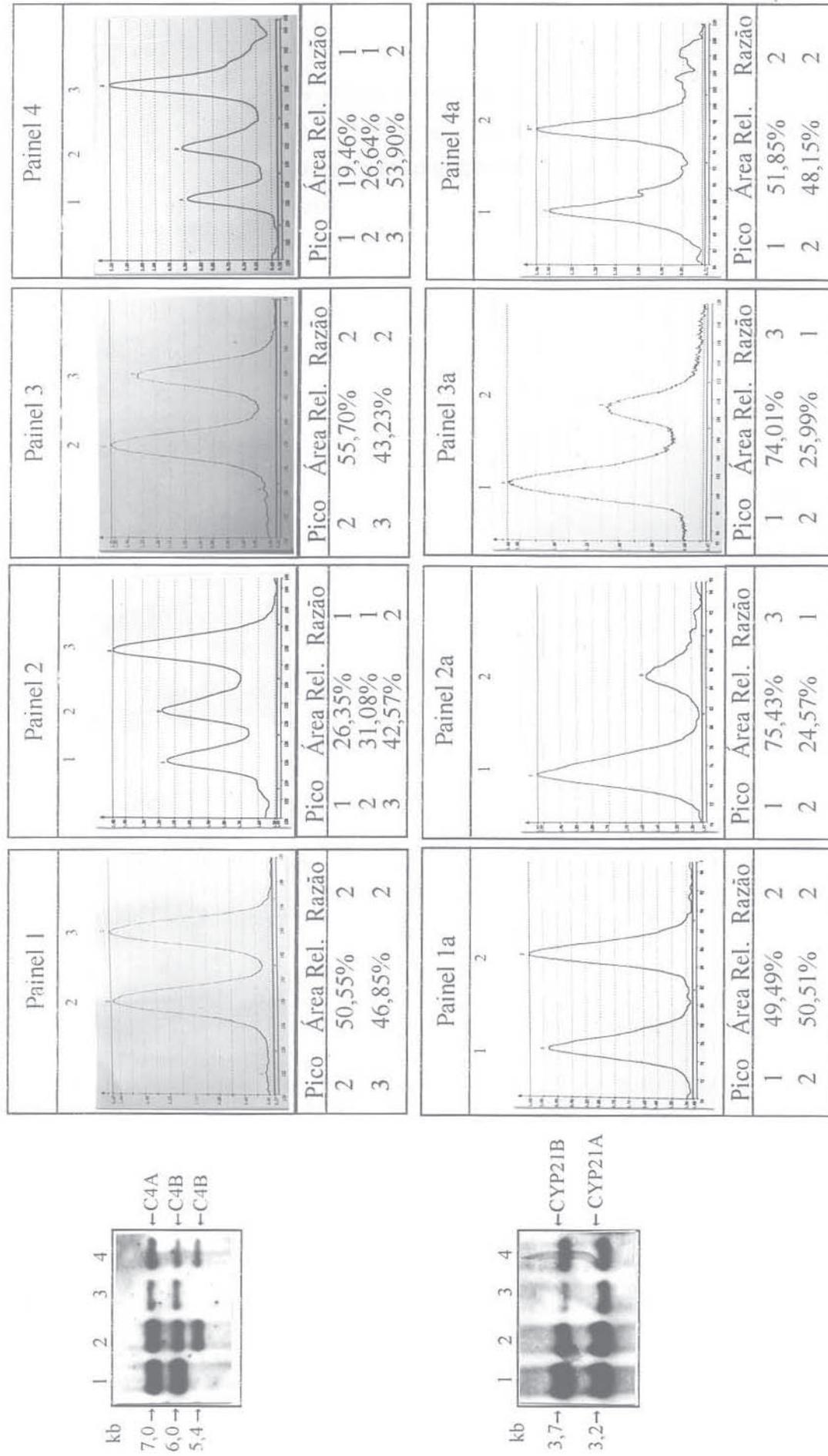


Figura 10 - Autoradiografia e gráficos mostrando as medidas de densitometria das bandas obtidas no "blot" de *Taq I* da família 19. Esta família é constituída por 4 indivíduos, a saber: Pai (linha 1), Mãe (linha 2), Filha afetada (linha 3), Filho normal (linha 4). Nos painéis 1, 2, 3 e 4 os picos 1, 2, e 3 correspondem às bandas de 5,4 kb (C4B), 6,0 kb (C4B) e 7,0 kb (C4A), respectivamente. Nos painéis 1a, 2a, 3a e 4a os picos 1 e 2 correspondem às bandas de 3,2 kb (CYP21A) e 3,7 kb (CYP21B), respectivamente. Os painéis 2 e 2a mostram os gráficos obtidos para a mãe. A filha afetada é mostrada nos painéis 3 e 3a. O pai e o filho normal são mostrados nos painéis 1, 1a e 4, 4a, respectivamente.

Nos casos de deleção gênica envolvendo (CYP21B+C4B) foi obtida a razão de 2:1 tanto para as bandas CYP21A:CYP21B quanto para as de C4A:C4B, quando esse evento foi determinado em heterozigose com mutações não determinadas. A figura 9 ilustra uma família com esse tipo de padrão.

Nos casos de conversão gênica de CYP21B para CYP21A em heterozigose com mutações não determinadas, uma razão de 3:1 para as bandas de CYP21A:CYP21B foi obtida, enquanto que para as bandas de C4 a razão foi igual ao normal, isto é 2:2. A figura 10 mostra o resultado para o estudo de uma família com esse tipo de alteração.

Todas as autoradiografias obtidas nesse estudo foram submetidas a esse tipo de análise e os resultados para os indivíduos afetados estão mostrados na tabela 2. Para esse cálculo, foram medidas as densidades de bandas de autoradiografias com diferentes tempos de exposição, para se obter uma média de cada amostra. Com base nesses resultados, a interpretação para as mutações responsáveis pelo fenótipo em cada caso particular é dada na última coluna da tabela.

2. Variação no número de unidades gênicas nos indivíduos normais portadores obrigatórios

A avaliação da frequência de deleções e conversões responsáveis pela deficiência da 21-OHase foi dificultada pela verificação da alta frequência de duplicações e deleções do pseudogene combinadas com duplicações e deleções de C4B nos alelos não afetados. Na figura 11 são mostrados os diferentes padrões de restrição encontrados nos indivíduos normais, portadores obrigatórios.

O padrão de restrição do painel A, mostra intensidades relativas de 1:1 para todas as enzimas, sendo encontrado em 73,3% dos haplótipos de heterozigotos obrigatórios para a deficiência da 21-OHase. Da mesma forma que para os indivíduos afetados, três diferentes haplótipos são distinguidos devido ao polimorfismo do C4 (linhas 1-3).

As deleções das unidades gênicas (CYP21A+C4B) e (CYP21A+C4A) foram encontradas em 6,7% e 2,2% dos cromossomos normais em quatro famílias, respectivamente (painel B). Os padrões dos heterozigotos obrigatórios das famílias 13 e 17, apresentam a deleção da unidade (CYP21A+C4A) (painel B, linhas 1 e 2, respectivamente). Nos dois padrões pode-se observar a presença do fragmento de 6,4 kb

Tabela 2 - Dados clínicos dos pacientes, intensidades dos fragmentos de DNA e interpretação dos rearranjos moleculares nos cromossomos com HCA.

pacientes	sexo	tipo de HCA	intensidade relativa das bandas (c)				haplótipos (d)
			CYP21A:CYP21B (fragmentos - kb)			Complemento C4 (fragmento - kb)	
			Kpn I 4,0:2,9	Taq I 3,2:3,7	Bgl II 12:10	Taq I 7,0:6,4:6,0:5,4	
25	M	PS	2:1	2:1	1:2	2:0:1:0	del/mut
12	F(IV)*	PS	3:0	3:0	1:2	2:0:1:0	del/cv
28	F(V)*	PS	4:1	4:1	3:2	2:0:1:2	cv(duA)/mut
4	F(III)*	PS	3:1	3:1	2:2	2:0:2:0	cv/mut
17	F(II)*	PS	1:2	1:2	1:2	1:1:0:1	mut(delA)/mut
14	M	PS	nd	2:2	2:2	2:0:0:2	mut/mut
29a	F(II)*	PS	nd	2:2	nd	2:0:2:0	mut/mut
29b	M	PS	nd	2:2	nd	2:0:2:0	mut/mut
31	F(V)*	PS	2:2	2:2	2:2	2:0:2:0	mut/mut
26	F(IV)*	PS	nd	2:2	nd	2:0:2:0	mut/mut
8	F(I)*	PS	nd	2:2	nd	2:0:1:1	mut/mut
8	M	PS	nd	2:2	nd	2:0:1:1	mut/mut
11a	F(III)*	PS	nd	2:2	nd	2:0:1:1	mut/mut
11b	F(III)*	PS	nd	2:2	nd	2:0:1:1	mut/mut
11c	M	PS	nd	nd	nd	nd	nd
24	F(II)*	PS	2:2	2:2	2:2	2:0:1:1	mut/mut
7a	F(II)*	PS	2:2	2:2	2:2	2:0:2:1	mut/mut
7b	M	PS	2:2	2:2	2:2	2:0:0:2	mut/mut
43	M	PS	4:2	4:2	4:2	2:0:2:2	cv(duA)/mut(duB)
30	F	PS	2:0	2:0	0:2	0:2:0:0	del/del
22	F	PS	nd	2:2	nd	2:0:1:2	mut/mut(duA)
23	F(III)*	VS	2:1	2:1	1:2	2:0:1:0	del/mut
20a	F(III)*	VS	nd	4:0	2:2	2:0:2:0	cv/cv
20b	M	VS	nd	4:0	2:2	2:0:2:0	cv/cv
19a	F(III)*	VS	3:1	3:1	2:2	2:0:2:0	cv/mut
13	F(III)*	VS	4:1	4:1	3:2	2:0:1:2	mut(duA)/cv
27	F(II)*	VS	2:2	2:2	2:2	2:0:2:0	mut/mut
10a	M	VS	2:2	2:2	2:2	2:0:1:1	mut/mut
10b	F(III)*	VS	2:2	2:2	2:2	2:0:1:1	mut/mut
2	M	VS	nd	2:2	2:2	2:0:1:1	mut/mut

(a) M= masculino, F= feminino; (b) ps= perdedor de sal, vs= virilizante simples; (c) 2:2= razão normal, 1:2= deleção do CYP21A em heterozigose, 3:1= conversão CYP21B em heterozigose, 4:0= conversão do CYP21B em homozigose, 2:1= deleção do CYP21B em heterozigose, 2:0= deleção do CYP21B em homozigose, 3:2= duplicação do CYP21A em heterozigose, 3:0= deleção do CYP21B e conversão do CYP21B, 4:1=duplicação do CYP21A e conversão do CYP21B; 4:2= duplicação de CYP21A associado à conversão e duplicação de CYP21B, nd= não determinado; (d) del, deleção de CYP21B e C4B; cv, conversão gênica (CYP21B para CYP21A); mut, mutação desconhecida no CYP21B; delA, deleção de CYP21A e C4A; duA, duplicação de CYP21A e C4B.

* graus de Prader (nestes pacientes determinados pela Dr. Andréa Treves Maciel Guerra- FCM/UNICAMP).

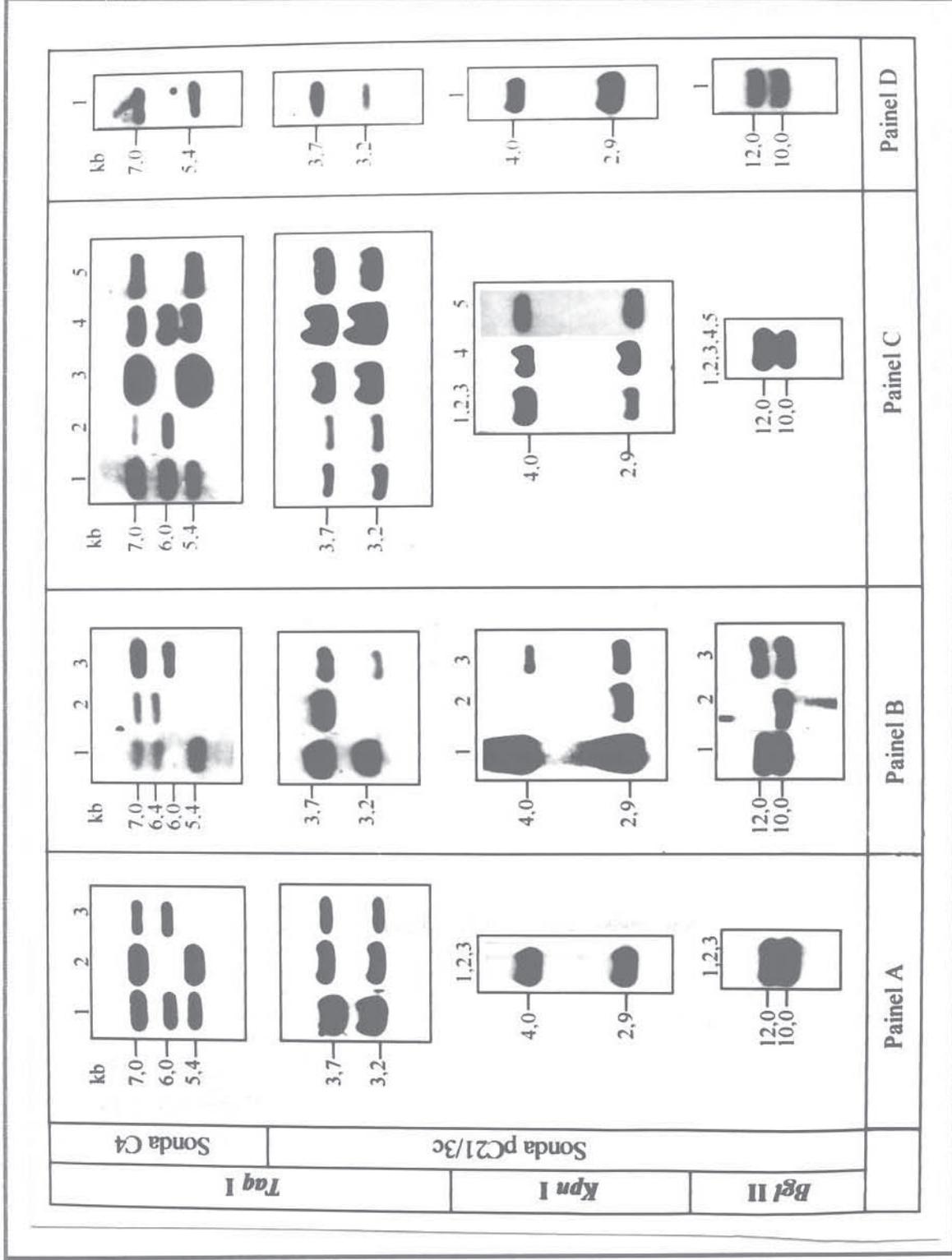


Figura 11 - Análises de hibridizações dos "blots" dos cromossomos normais dos heterozigotos obrigatórios portadores da deficiência da 21-OHase. Painel A: padrões de DNA normais, sem nenhuma alteração no número de unidades gênicas. Linhas 1-3 mostram polimorfismos de C4. Painel B: padrões de DNA que mostram deleção da unidade (C4A+CYP21A[6,4]) (linhas 1 e 2) e deleção da unidade (C4B+CYP21A[6,0]) (linha 3). Painel C: padrões des DNA com duplicação das unidades de (CYP21A+C4B[6,0] e CYP21A+C4B[5,4]) (linhas 1-4) e duplicação da unidade (CYP21B+C4B[5,4]) (linha 5). Painel D: padrão de DNA com conversão gênica de CYP21A para CYP21B em heterozigose (linha 1).

para o gene C4, frequentemente associado à deleção (CYP21A+C4A). A diferença entre os dois padrões deve-se aos alelos afetados. No caso da linha 1 o alelo afetado é portador de duplicação (CYP21A+C4B^[5,4]) e, no caso da linha 2, é o alelo afetado que carrega a deleção (CYP21A+C4A), sendo que no alelo normal a deleção é de (CYP21A+C4B). Nos alelos normais de um dos heterozigotos obrigatórios em duas outras famílias (14 e 31), observa-se a deleção da unidade (CYP21A+C4B) (linha 3).

A duplicação da unidade gênica (CYP21A+C4B^[6,0] ou C4B^[5,4]) foi encontrada em 13,4% dos cromossomos normais, nos heterozigotos obrigatórios de seis famílias (painel C). Os alelos normais dos heterozigotos obrigatórios das famílias 7 e 10 (linha 1), 25 e 24 (linha 2) apresentam duplicação da unidade de (CYP21A+C4B^[6,0]). Na família 24, o outro indivíduo heterozigoto obrigatório apresenta uma duplicação da unidade de (CYP21A+C4B^[5,4]) no cromossomo normal (linha 3). Já na família 43, em um dos indivíduos portadores obrigatórios, o alelo normal, apresenta a duplicação da unidade de (CYP21A+C4B^[5,4]) (linha 4), porém nesse caso o alelo afetado possui também uma duplicação (C4B^[6,0]+CYP21B) produzindo intensidades de 1:1:1 para as bandas de C4, isso será discutido mais adiante no estudo de famílias. Neste mesmo painel, na linha 5, é mostrado um padrão de hibridização onde o cromossomo normal do heterozigoto obrigatório apresenta uma duplicação de (CYP21B+C4B^[5,4]).

Uma última alteração no número de unidades gênicas foi encontrada no cromossomo normal de um heterozigoto obrigatório da família 14. Essa alteração foi deduzida como sendo uma conversão gênica do CYP21A para CYP21B (figura 11, painel D, linha 1).

3. Caracterização de alelos afetados por estudo de famílias

Devido à variabilidade nas intensidades de bandas, ficaria difícil de se prever a organização gênica dos alelos individuais pela observação apenas dos padrões de indivíduos afetados. Nesse sentido o estudo de famílias completas foi essencial para a identificação dos alelos. Por exemplo, os pacientes 28 e 13 apresentam o mesmo padrão de intensidade dos fragmentos de restrição (figura 7, painel B, linha 2). Estudando as respectivas famílias completas (figura 12) ficou evidente que a paciente 28 (linha 3) carrega no mesmo cromossomo uma duplicação da unidade (CYP21A+C4B^[5,4]) e uma conversão em larga escala. Isso foi possível de ser determinado observando o padrão de sua mãe (linha 2) que apresenta intensidades relativas características de duplicação para os

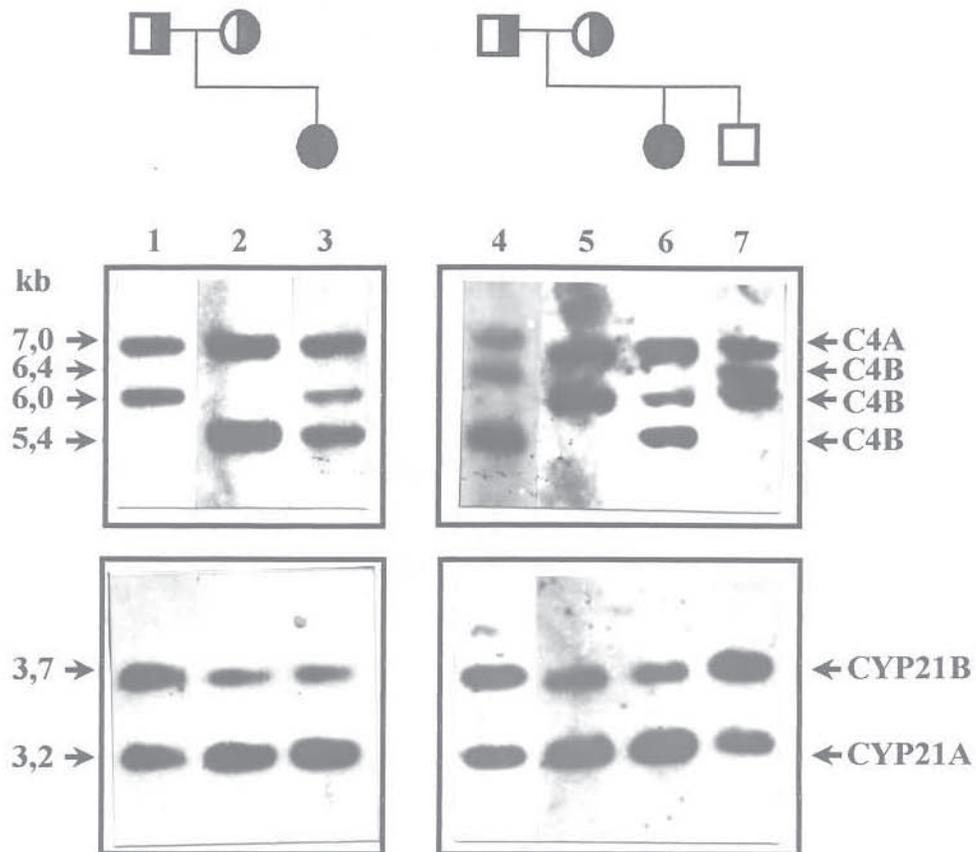


Figura12 - Heredograma e "Southern" de análises das família 28 e 13. Os "blots" de DNA genômico são digeridos com *Taq I* e hibridizados com as sondas pC21/3c (abaixo) e C4B550 (acima). A família 28 possui 3 indivíduos, a saber: Pai (linha 1), Mãe (linha 2), Filha afetada (linha 3) e a família 13 possui 4 indivíduos, Pai (linha 4), Mãe (linha 5), filha afetada (linha 6) e filho normal (linha 7). O tamanho (em kb) das bandas e os referidos genes estão indicados nos lados esquerdo e direito das fotos, respectivamente.

genes C4 e uma razão de 4:1 para os fragmentos *Taq* I de 3,2 kb:3,7 kb, a mesma observada na filha. O padrão apresentado pelo pai era aparentemente normal (linha 1), assim foi inferido que cromossomo herdado de seu pai provavelmente porta uma mutação não detectada pelo método usado aqui. No padrão do paciente 13 (linha 6), o cromossomo duplicado com uma unidade (CYP21A+C4B^[5,4]) extra vem do pai (linha 4), o qual também tem uma deleção de uma unidade (CYP21A+C4A) no alelo não afetado herdado pela criança normal (linha 7). O alelo afetado herdado da mãe (linha 5) apresenta uma conversão gênica em larga escala do gene CYP21B com um pseudogene normal.

Outro exemplo que pode ser citado é o do indivíduo afetado da família 43 (figura 13, linha 3). Observa-se um padrão de hibridização difícil de se analisar considerando-se somente o afetado. O resultado com a sonda C4 mostra as três bandas de intensidades iguais, enquanto que para a sonda pC21/3c a intensidade relativa é de 2:1 para os fragmentos 3,2 kb:3,7 kb. Observando-se o pai (linha 1) verifica-se um padrão de hibridização característico de uma duplicação de (CYP21A+C4B^[5,4]) e uma conversão em larga escala, com intensidade de 4:1 para os fragmentos de CYP21 e de 2:1:2 para os de C4. A mãe (linha 2) apresenta intensidades iguais das bandas relativas aos genes C4 e também para os de CYP21, isso sugere que possua um cromossomo com duplicação de uma unidade (CYP21A+C4B) e um cromossomo afetado com duplicação da unidade de (CYP21B+C4B). Uma interpretação para o padrão de bandas do filho afetado (linha 3) é considerar que tenha herdado o cromossomo afetado do pai com a duplicação de (CYP21A+C4B^[5,4]) associado à conversão e, da mãe o cromossomo afetado seria o que carrega a duplicação de (CYP21B+C4B^[6,0]), explicando assim a intensidade relativa de 2:1 observada para os fragmentos 3,2 kb:3,7 kb e, 1:1:1 para os fragmentos 7,0 kb:6,0 kb:5,4 kb, respectivamente. Considerando os 2 alelos as proporções provavelmente são: 4:2 para os genes CYP21 e 2:2:2 para os do C4. Deve-se esclarecer aqui que nessa família é ainda difícil de prever a organização correta dos genes porque a técnica empregada não permite o cálculo correto do número de cópias presentes em cada fragmento, temos apenas intensidades relativas.

A análise da família combinada com a utilização da sonda para C4 e, ainda a obtenção de padrão de restrição com outras enzimas foi, também, essencial para o esclarecimento da organização gênica dos afetados da família 20 (figura 14). Observando somente o padrão de bandas para os genes CYP21 dos dois indivíduos afetados (linhas 3 e 4), tem-se a impressão de que eles apresentam deleção em homozigose do gene CYP21B no “blot” com *Taq* I. Estudando-se os padrões do pai (linha 1) e da mãe (linha 2),

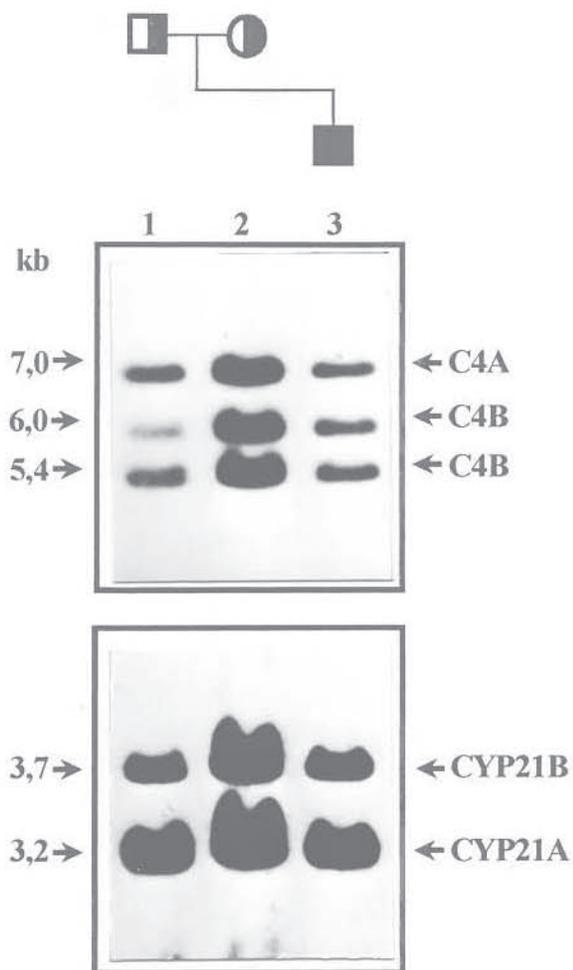


Figura 13 - Heredograma e "Southern" de análises da família 43. O "blot" de DNA genômico digerido com *Taq* I e hibridizados com as sondas pC21/3c (abaixo) e C4B550 (acima). Esta família possui 3 indivíduos, a saber: Pai (linha 1), Mãe (linha 2), Filho afetado (linha 3). O tamanho (em kb) das bandas e os referidos genes estão indicados nos lados esquerdo e direito das fotos, respectivamente.

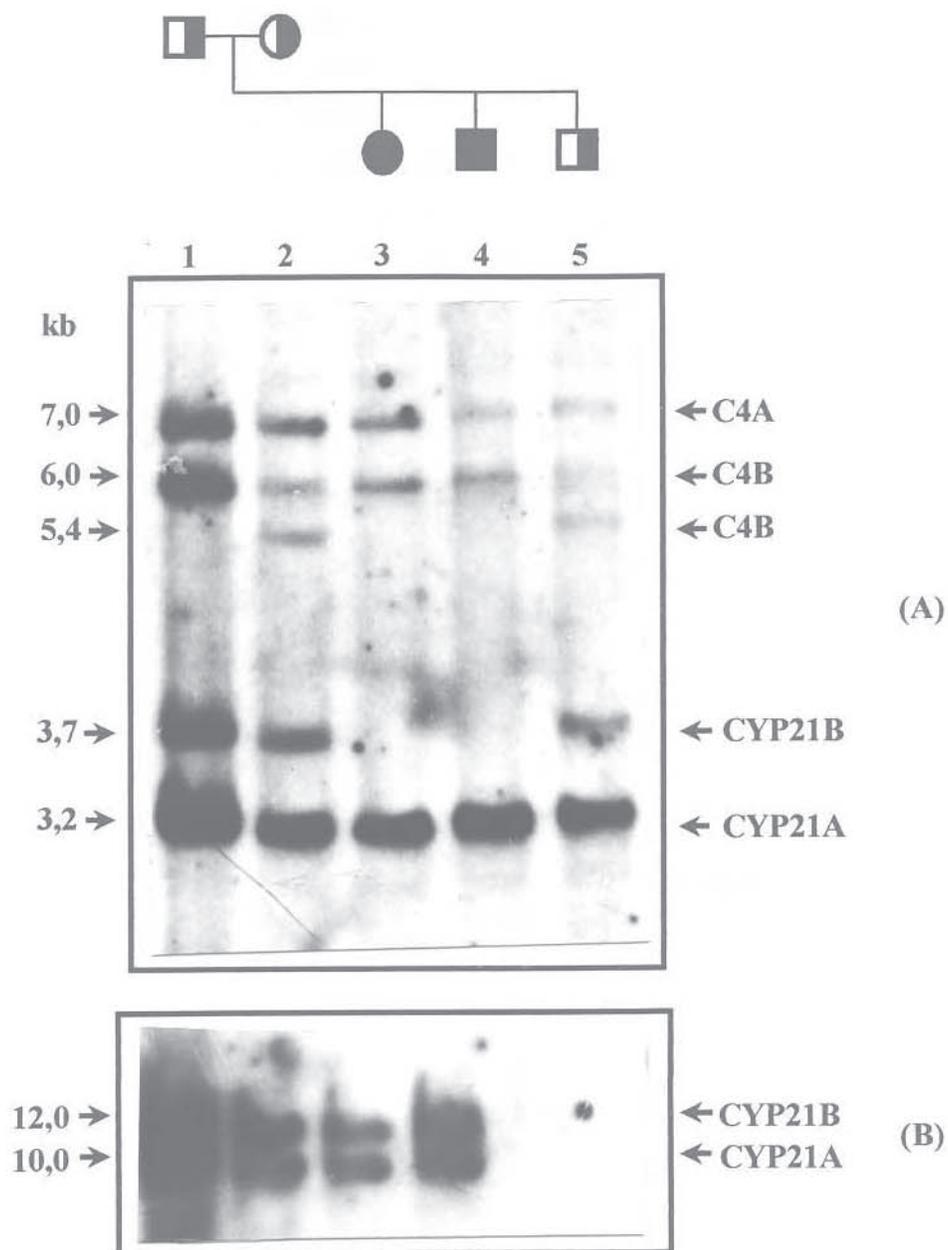


Figura 14 - Heredograma e "Southern" de análises da família 20. (A) "blot" de DNA genômico digerido com *Taq* I e hibridizados com as sondas pC21/3c (abaixo) e C4B550 (acima). (B) "blot" de DNA genômico digerido com *Bgl* II e hibridizado com a sonda pC21/3c. Esta família possui 5 indivíduos, a saber: Pai (linha 1), Mãe (linha 2), Filha afetada (linha 3), Filho afetado (linha 4) e Filho normal (linha 5). No "blot" (B), linha 5 não ocorreu hibridização, devido quantidade insuficiente de DNA. O tamanho (em kb) das bandas e os referidos genes estão indicados nos lados esquerdo e direito das fotos, respectivamente.

ambos apresentam diminuição da banda de 3,7 kb em relação à de 3,2 kb. Porém, na hibridização do “blot” *Taq* I com a sonda para C4, observaram-se as bandas relativas aos genes C4B e C4A sem alteração para todos indivíduos, bem como no padrão de hibridização da sonda pC21/3c com “blot” *Bgl* II também não se observa nenhuma alteração nas intensidades de bandas. Esse resultado é compatível com o evento de conversão em larga escala. Os indivíduos afetados (linhas 3 e 4) herdaram dois alelos com conversão gênica em larga escala, o do pai e o da mãe, apresentando assim padrão de hibridização em homozigose para conversão gênica em larga escala. Como a intensidade relativa dos fragmentos 3,2 kb:3,7 kb nos pais é de 3:1, característica de conversão em larga escala, pode-se inferir que a intensidade relativa das bandas dos indivíduos afetados é de 4 (3,2 kb): 0 (3,7 kb) para os genes CYP21 e 2 (7,0 kb): 2 (6,0 kb) para os genes do complemento C4 (Tabela 2, pacientes 20a e 20b).

4. Padrões de restrição diferentes

Dentre os padrões de restrição para as 23 famílias estudadas foram encontrados dois com alterações não só nas intensidades de bandas, mas apresentam fragmentos com diferentes tamanhos. A família 22 (figura 15), citada anteriormente, é uma delas. O pai (linha 1, painéis A e B) apresenta um padrão característico de duplicação de uma unidade (CYP21A+C4B^[5,4]). Na mãe (linha 2, painéis A e B) observa-se o seguinte: quando os filtros de *Taq* I são hibridizados com a sonda de C4 (painel A) aparecem três fragmentos: 7,0, 6,0 e 5,4 kb, numa intensidade de, respectivamente, 2:2:1. Observado isoladamente, esse padrão seria característico de uma duplicação de C4B^[6,0]. Porém, quando se analisa as bandas para a sonda pC21/3c (painel B), o que se verifica é a presença das duas bandas características de 3,7 e 3,2 kb numa mesma intensidade, contudo, se observa adicionalmente um fragmento de 5,4 kb. Pelo resultado da filha afetada (linha 3, painéis A e B) verifica-se que possui o alelo com a duplicação (CYP21A+C4B^[5,4]) do pai e, portanto, esse alelo deve portar uma mutação não determinada no gene CYP21B. O alelo afetado herdado da mãe é justamente aquele que possui um fragmento extra para a sonda de 21-OHase e que é portador de um C4B^[6,0], fato esse concluído pela intensidade as bandas 7,0, 6,0 e 5,4 kb para C4 que é respectivamente, 2:1:2 (painel A, linha 3). Aparentemente, o cromossomo que vamos chamar de anômalo, apresenta, então um fragmento de 5,4 kb que aparece quando hibridizado tanto com a sonda pC21/3c como com a sonda C4B550. Isso porque se considerássemos isoladamente a intensidade relativa dos fragmentos 7,0 e 6,0 para C4 na mãe (painel A, linha 2) teríamos uma intensidade de 2:2. O fragmento de 5,4 kb aparece com intensidade relativa de 1 comparado com os outros dois o

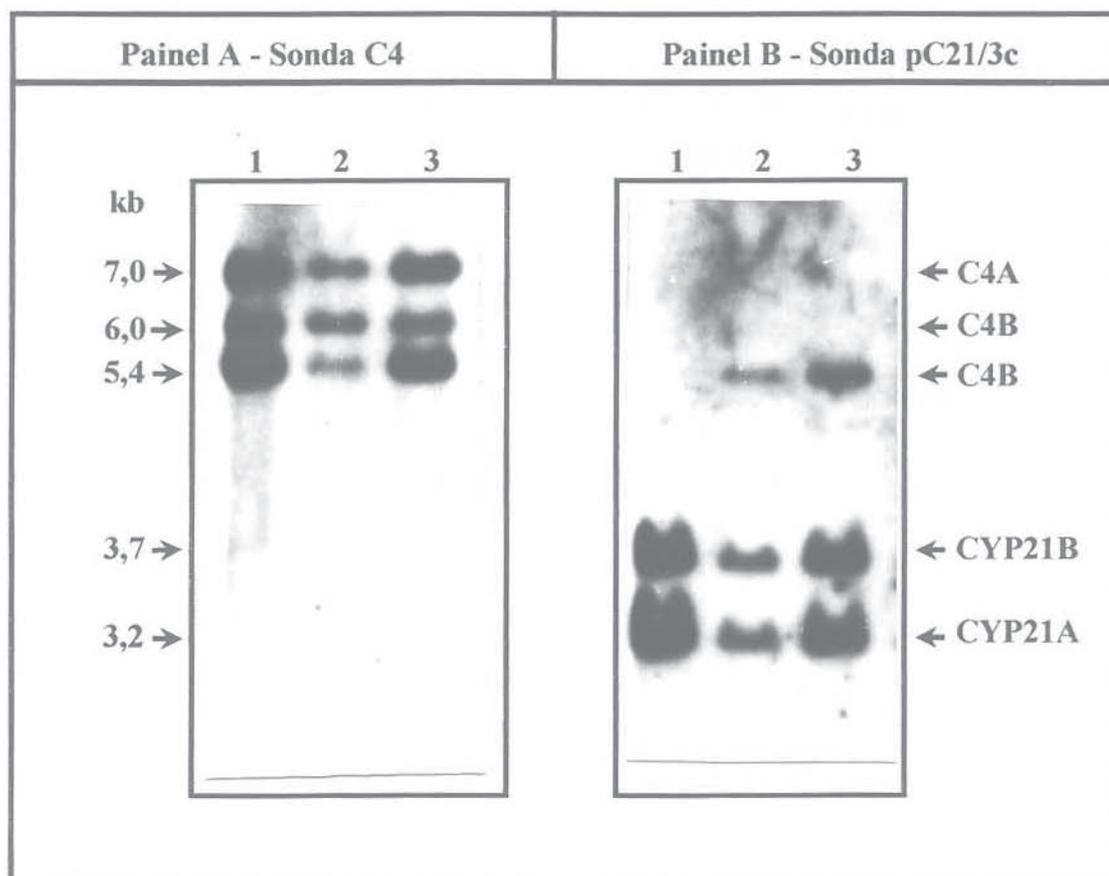


Figura 15 - Análise dos "blots" da família 22. Os "blots" de DNA genômico digerido com *Taq I* são hibridizados com as sondas pC21/3c (Painel A) e C4B550 (Painel B). Esta família possui 3 indivíduos saber: Pai (linha 1), Mãe (linha 2) e Filha afetada (linha 3). O tamanho (em kb) das bandas e os referidos genes estão indicados nos lados esquerdo e direito das fotos, respectivamente.

que nos leva a concluir que não se trata de uma duplicação de C4B^[6,0], mas de um fragmento extra de 5,4 kb. Desta forma, este fragmento anômalo pode estar sendo reconhecido tanto pela sonda de 21-OHase quanto pela de C4. Porém, deve-se considerar a possibilidade de ser apenas uma coincidência de tamanho de fragmento. Até o momento, está sendo considerado que o alelo anômalo é afetado por possuir mutação desconhecida no gene CYP21B correspondente ao fragmento de 3,7 kb. Os resultados dessa família exemplificam a dificuldade de se analisar alelos com múltiplas unidades (CYP21+C4) e aponta para a necessidade de um estudo mais profundo ao nível de sequências de nucleotídeos.

Outro exemplo de padrão de hibridização anômalo é o da família 26 (figura 16). O pai (linha 1, painéis A e B) apresenta os dois cromossomos com padrão normal de hibridização, sendo que um deles, o afetado, deve ser portador de uma mutação ainda não determinada. A mãe (linha 2, painéis A e B) e a filha afetada (linha 3, painéis A e B), apresentam o mesmo padrão de hibridização, inclusive uma banda anômala de 3,7 kb que aparece quando o “blot” *Taq* I é hibridizado separadamente com a sonda para o complemento C4. Seguindo o mesmo raciocínio da discussão acima, não podemos afirmar se esse fragmento de 3,7 kb seria o mesmo que hibridiza com as duas sondas, ou se é apenas uma coincidência de tamanho. De qualquer modo, o cromossomo com o rearranjo anômalo quanto ao C4, provavelmente possui uma mutação no gene CYP21B que combinado com o alelo afetado do pai produziu o fenótipo HCA na filha.

Uma terceira família chamou a atenção quanto ao padrão de hibridização. No “blot” de *Taq* I, a paciente da família 30 apresenta um cromossomo com um rearranjo gênico nunca descrito antes (figura 17). Por ser uma família de casamento consanguíneo (primos em primeiro grau), o pai (linha 1) e a mãe (linha 2) apresentam o cromossomo com este mesmo rearranjo gênico, conseqüentemente a filha afetada é homocigota para esse alelo. Este cromossomo possui a conhecida deleção de 30 kb, formando um gene híbrido de CYP21A/B apresentando o padrão de restrição já descrito. Fato inédito é a presença do fragmento de 6,4 kb referente ao híbrido de C4 que normalmente é formado por eventos de “crossover” desigual envolvendo a deleção do pseudogene CYP21A (figura 5c). Deduz-se que para o afetado, a intensidade relativa das bandas para os genes CYP21A e CYP21B é de, respectivamente, 2 (3,2 kb):0 (3,7 kb) e, de 0:2:0:0 para os fragmentos de 7,0 kb, 6,4 kb, 6,0 kb e 5,4 kb, respectivamente (Tabela 2, paciente 30).

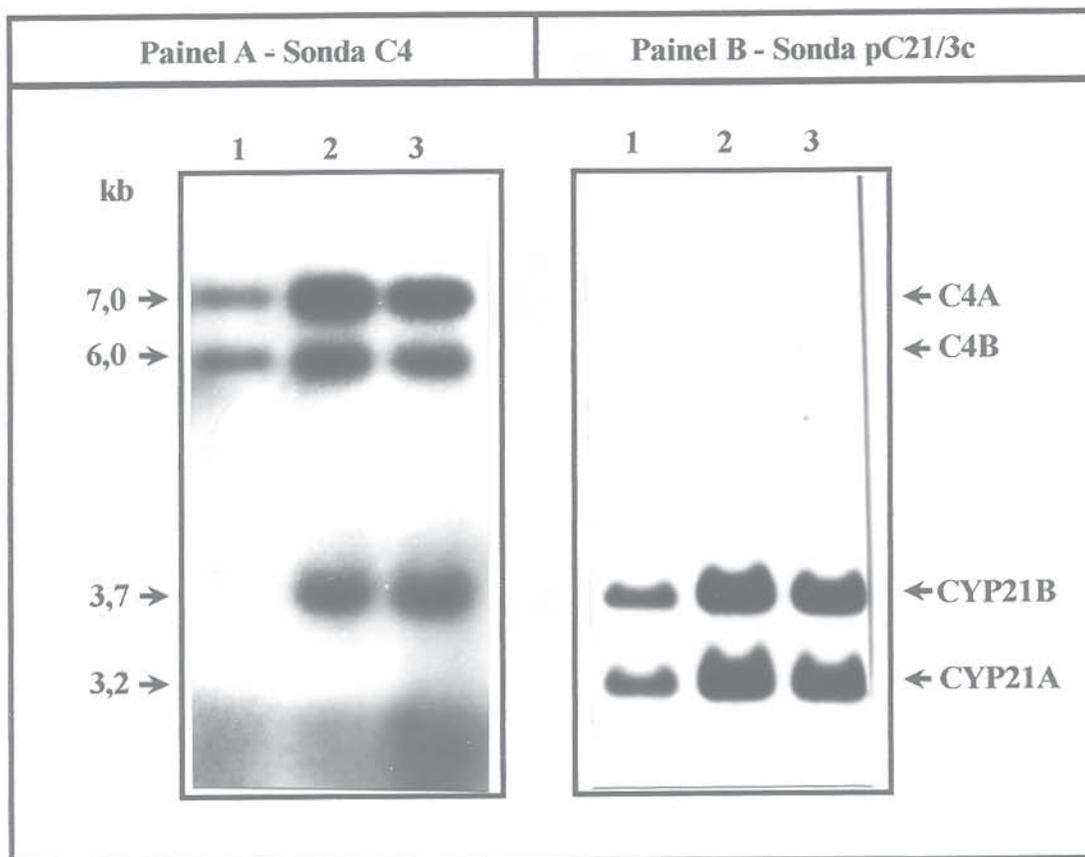


Figura 16 - "Southern blot" de análises da família 26. O "blot" de DNA genômico digerido com *Taq* I e hibridizado com as sondas pC21/3c (Painel A) e C4B550 (Painel B). Esta família possui 3 indivíduos, a saber: Pai (linha 1), Mãe (linha 2) e Filha afetada (linha 3). O tamanho (em kb) das bandas e os referidos genes estão indicados nos lados esquerdo e direito das fotos, respectivamente.

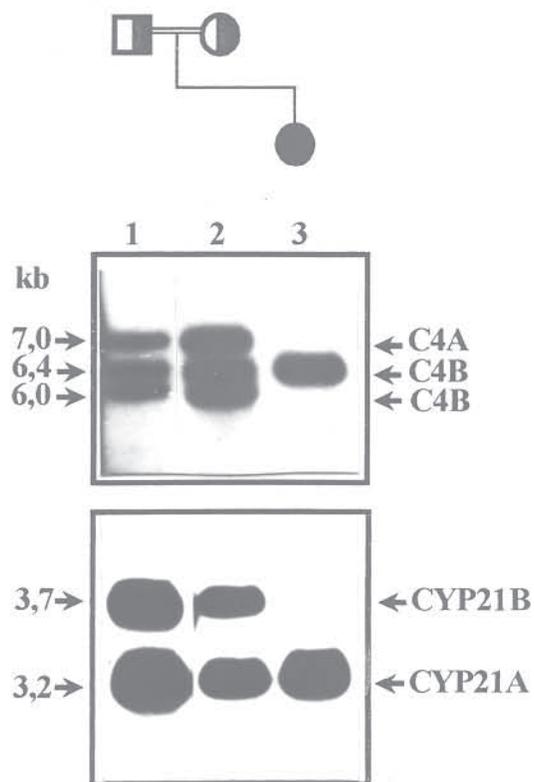


Figura 17 - Heredograma e "Southern" de análises da família 30. O "blot" de DNA genômico digerido com *Taq* I e hibridizados com as sondas pC21/3c (abaixo) e C4B550 (acima). Esta família possui 3 indivíduos, a saber: Pai (linha 1), Mãe (linha 2), Filha afetada (linha 3). O tamanho (em kb) das bandas e os referidos genes estão indicados nos lados esquerdo e direito das fotos, respectivamente.

5. Distribuição dos rearranjos:

No presente estudo descreve-se a distribuição de deleção e conversão gênica em larga escala no *locus* CYP21B em pacientes com Hiperplasia Congênita da Adrenal devido à deficiência da enzima 21-hidroxilase, no Brasil. A frequência dos rearranjos genéticos obtida pelo estudo do padrão de intensidade de bandas dos fragmentos de restrição nos haplótipos afetados e não afetados e suas associações com as diferentes formas da deficiência da 21-OHase são mostradas na Tabela 3. Eventos de conversão gênica em larga escala foram encontrados em 19% dos haplótipos afetados, ao passo que a deleção gênica foi achada somente em 9,5%. Esses rearranjos não foram encontrados em cromossomos não afetados de heterozigotos obrigatórios. Além disso, em 71,5% dos haplótipos afetados não foi encontrada nenhuma alteração no gene CYP21B detectável pela metodologia utilizada.

Como citado anteriormente, as deleções e/ou duplicações do pseudogene CYP21A não causam diretamente a deficiência da 21-OHase. Entretanto, podem aparecer como polimorfismo na população. Assim, uma porcentagem de 6,7% dos cromossomos normais de portadores obrigatórios apresentaram deleção de (CYP21A+C4B); 2,2%, deleção de (C4A+CYP21A); 13,4%, duplicação de (CYP21A+C4B); e, 2,2%, duplicação de (C4B+CYP21B). Um caso de conversão gênica de CYP21A para CYP21B foi encontrado entre os haplótipos não afetados (2,2%). Porém, um caso (2,4%) de deleção da unidade (C4A+CYP21A) e dois casos (4,7%) de duplicação da unidade (CYP21A+C4B) estão associados com mutações desconhecidas no gene ativo nos cromossomos afetados. Ainda, dois casos (4,7%) de duplicação de (CYP21A+C4B) dos alelos afetados estão associados à conversão gênica em larga escala.

Tabela 3 - Frequência dos defeitos genéticos em 23 famílias brasileiras com Hiperplasia Congênita da Adrenal.

Os haplótipos não afetados são obtidos de heterozigotos obrigatórios. PS, perdedor de sal; VS, virilizante simples.

	Haplótipos afetados			Haplótipos não afetados
	PS	VS	n (%)	n (%)
Deleção de 30 kb	3	1	4 (9,5)	
Conversão gênica	2	4	6 (14,3)	
Deleção de (C4B+CYP21A)				3 (6,7)
Deleção de (C4A+CYP21A)				1 (2,2)
Duplicação de (C4B+CYP21A)				6 (13,4)
Duplicação de (C4B+CYP21B)				1 (2,2)
Conversão associada à duplicação de (C4B+CYP21A)	2	0	2 (4,7)	
Mutação desconhecida associada à duplicação de (C4B+CYP21A)	1	1	2 (4,7)	
Mutação desconhecida associada à duplicação de (C4B+CYP21B)	1	0	1 (2,4)	
Mutação desconhecida associada à deleção de (C4A+CYP21A)	1	0	1 (2,4)	
Conversão gênica de CYP21A para CYP21B				1 (2,2)
Variações não detectáveis	18	8	26 (62,0)	33 (73,3)
Total	28	14	42 (100)	45 (100)

DISCUSSÃO

1. Haplótipos com rearranjos

Foram analisadas famílias com pelo menos um membro afetado com a forma clássica da deficiência da enzima 21-OHase com o objetivo de se obter a distribuição de deleção e conversão gênica envolvendo os sítios *Taq* I e *Kpn* I no locus CYP21B. Foram estudados os genes da enzima 21-hidroxilase e do complemento C4. Vários haplótipos puderam ser definidos em termos dos rearranjos gênicos por observação dos fragmentos de restrição revelados com as sondas pC21/3c e C4B550 tanto nos alelos afetados quanto nos não afetados. Para facilitar a compreensão, a organização gênica dos alelos afetados encontrados nos pacientes com HCA, é mostrado aqui esquemas representando os genes da 21-OHase, CYP21B e CYP21A e do complemento C4, C4A e C4B (figura 18). Foram observados quinze diferentes haplótipos incluindo deleções, duplicações, conversões, e variantes dos genes C4 (unidades “longas” e “curtas”), muitos dos quais já descritos por outros autores (Carrol e col., 1985b; Garlepp e col., 1986; Donohoue e col., 1986c; Collier e col., 1989; Partanen e col., 1989; White, 1989; Morel e col., 1989b; Schneider, 1990; Koppens e col., 1992). Dos trabalhos citados acima, o de Koppens e col., (1992) apresenta o estudo mais detalhado onde foram analisadas 29 famílias holandesas nas quais foram encontrados rearranjos representados em dez diferentes haplótipos que aparecem em combinação nos indivíduos afetados. Desses dez, nove são igualmente encontrados nos pacientes aqui analisados (figura 18, haplótipos a-f, h-j). Todos rearranjos encontrados nos alelos ligados à HCA podem ser explicados por mecanismos de recombinação entre o gene funcional e o pseudogene (White e col., 1987b; Miller e col., 1989; White e New, 1992).

A hibridização dos “blots” *Kpn* I com a sonda 21-OHase produziu uma razão entre os fragmentos 4,0 kb e 2,9 kb sempre igual à encontrada para os fragmentos *Taq* I de 3,2 kb e 3,7 kb. Esses resultados indicam que todos os genes da 21-OHase estudados têm ou o sítio *Taq* I (característico do CYP21A) ou o *Kpn* I (característico do CYP21B) no final 5' da sequência gênica, mas nunca os dois ao mesmo tempo. Na abordagem aqui usada considera-se que uma conversão gênica pode ter ocorrido quando originalmente um fragmento de *Taq* I de 3,7 kb é transformado para 3,2 kb por aquisição do sítio presente na região 5' do pseudogene e, concomitantemente, um fragmento de *Kpn* I de 2,9 kb é transformado em um fragmento de 4,0 kb pelo desaparecimento do sítio presente no gene ativo. Em relatos anteriores, têm-se referido a esse tipo de conversão como “conversão gênica em larga escala” (Harada e col., 1987; Matteson e col., 1987; Urabe e col., 1990; Strachan e White, 1991; Strachan, 1994), pois além de converter a extremidade 5' do gene ativo para o inativo, normalmente se estende até o exon 3 incluindo na cópia ativa do gene

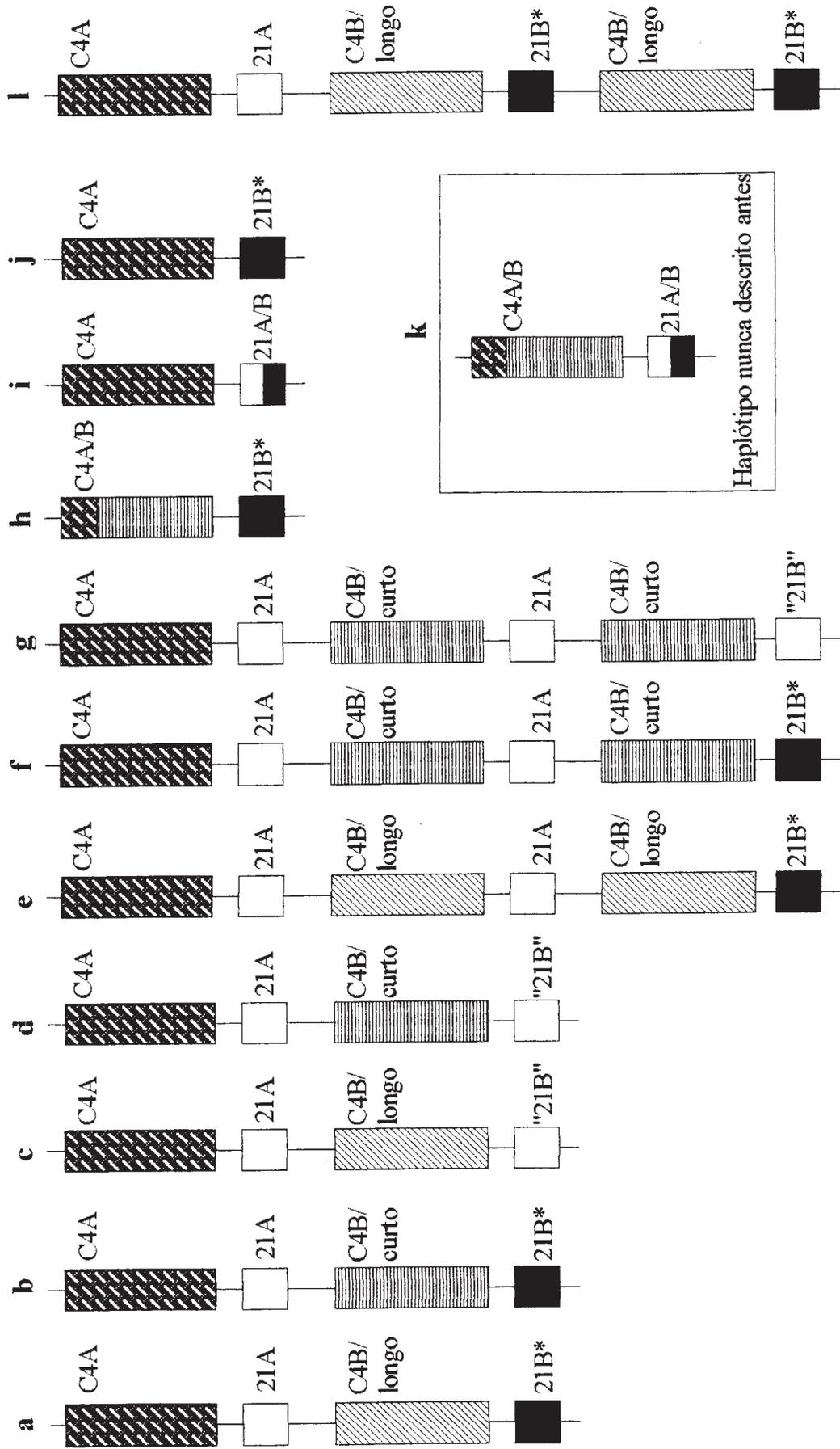


Figura 18 - Esquema de todos os tipos de haplótipos achados nos cromossomos dos indivíduos afetados, definidos por fragmentos de restrição com *Taq* I. (a-b)- haplótipos sem nenhuma alteração das unidades gênicas; (c-d)- haplótipos com conversão gênica; (e-f)- haplótipos com duplicação (CYP21A+C4B); (g)- haplótipo com duplicação (CYP21A+C4B) e conversão gênica; (h)- haplótipo com deleção gênica de CYP21A; (i-j)- haplótipos com deleção gênica de CYP21B; (k)- haplótipo com deleção de CYP21B, nunca descrito antes; (l)- haplótipo com duplicação de (CYP21B+C4B). 21B*- conversão gênica de CYP21B para CYP21A; C4B/longo- gene de 6,0 kb; C4B/curto- gene de 5,4 kb; 21A/B- gene híbrido de CYP21A e CYP21B; C4A/B- gene híbrido de C4A e C4B.

algumas mutações deletérias, tais como a do sítio de “splice” no intron 2 e a deleção de oito pares de base no exon 3 (Higashi e col., 1988; White e col., 1988). Apesar disso, a presença de um sítio extra de *Taq* I e a ausência de um sítio de *Kpn* I não necessariamente implica que o gene CYP21B foi inteiramente convertido para o pseudogene CYP21A (Koppens e col., 1992). No entanto, não se tem informações de atividade biológica normal de um gene CYP21B caracterizado por um fragmento *Taq* I de 3,2 kb ou por um fragmento *Kpn* I de 4,0 kb; sendo que sempre que se observa a ausência completa dos fragmentos *Taq* I de 3,7 kb ou *Kpn* I de 2,9 kb o fenótipo apresentado pelo paciente é o de perdedor de sal (Koppens e col., 1992; Speiser e col., 1992b).

Três haplótipos adicionais (figura 18, haplótipos g, l, k) foram encontrados nos pacientes estudados neste trabalho, em comparação com o trabalho de Koppens e col. (1992). O haplótipo k apresenta um rearranjo gênico nunca descrito antes em humanos. Este haplótipo foi encontrado em homozigose numa paciente com a forma perdedora de sal (paciente 30), tendo sido herdado de ambos os pais por se tratar de um casamento consanguíneo (primos em 1º grau). Na tentativa de se explicar a formação desse haplótipo deve-se imaginar que tenha sido formado em gerações anteriores por alguns “crossovers” sucessivos. Teoricamente, devemos considerar pelo menos três eventos independentes de “crossover” desigual (figura 19). Um, onde é gerado um cromossomo com a deleção de CYP21A com formação do híbrido C4A/C4B (A), outro, onde forma-se um cromossomo com deleção de C4B com o híbrido CYP21A/CYP21B (B). E, o último onde esses dois cromossomos são emparelhados e há o cruzamento juntando o híbrido de C4 com o híbrido de CYP21 (C). Os haplótipos g e l representam alelos portadores de duplicação de uma unidade (CYP21A+C4B) associada ao gene CYP21B afetado por conversão gênica e por mutação não determinada, respectivamente.

Haplótipos de conversão e deleção gênica com perda do gene CYP21 funcional são sempre associados com a deficiência da 21-OHase e não foram encontrados em nenhum haplótipo não afetado. No entanto, além dos haplótipos sem nenhuma alteração aparente, os com deleção de (CYP21A+C4A) ou (CYP21A+C4B), e os com duplicação de (CYP21A+C4B) ou (CYP21B+C4B) são encontrados na população em geral e, somente são associados com a deficiência da 21-OHase se os genes CYP21B presentes carregarem mutações deletérias.

Os alelos normais analisados neste trabalho mostraram uma variação no número das unidades gênicas, tais como: deleção das unidades (CYP21A+C4A) e (CYP21A+C4B),

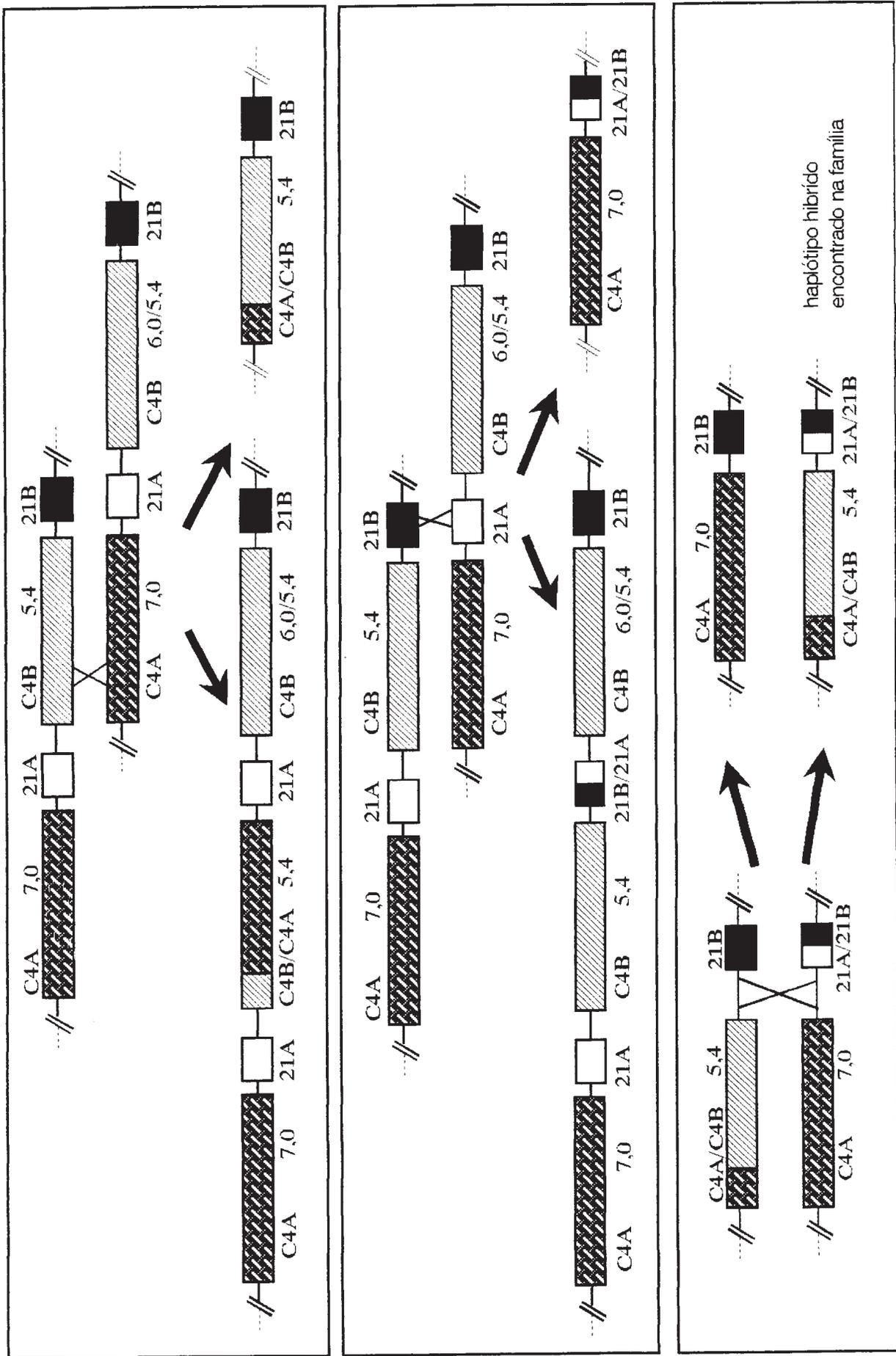


Figura 19 - Esquema de três eventos de "crossover" que foram propostos para tentar explicar o haplótipo híbrido para os genes

duplicação das unidades (CYP21A+C4B) e (CYP21B+C4B) e conversão gênica de CYP21A para CYP21B. Foram considerados alelos normais aqueles não relacionados com o fenótipo doente, presentes nos heterozigotos obrigatórios. Foram observados sete haplótipos diferentes nos alelos normais dos indivíduos heterozigotos obrigatórios (figura 20, haplótipos a-g).

Koppens e col. (1992) fizeram a análise da frequência dos diferentes haplótipos em indivíduos controle e concluíram que a frequência de cada haplótipo nos controles não deva ser diferente da dos alelos não afetados dos portadores obrigatórios, devido à alta frequência de heterozigotos na população (1:60 a 1:50). Assim, podemos considerar que a frequência de duplicações e deleções envolvendo os genes C4 e o pseudogene CYP21A encontradas nos alelos não afetados dos portadores obrigatórios represente a frequência da população em geral. Devido a esses rearranjos aparecerem frequentemente, a interpretação dos resultados através de “Southern blot” torna-se mais difícil porque as combinações dos vários haplótipos, afetados ou normais, podem produzir o mesmo padrão de hibridização.

Embora eventos de deleção e/ou duplicação do pseudogene CYP21A sejam encontrados como um polimorfismo na população em geral e, portanto não são responsáveis pela manifestação da doença, em famílias com indivíduos afetados, as deleções de CYP21A podem ser consideradas como uma pré-mutação, aumentando a susceptibilidade para desenvolver uma mutação causadora de deficiência de 21-OHase por facilitar o emparelhamento cromossômico desigual (Sinnott e col., 1990).

2. Estudo de famílias

Como citado acima, mas raramente mencionado na literatura, combinações de alguns haplótipos com número de unidades gênicas (C4+CYP21) diferente de dois, produzem o mesmo padrão de hibridização quando analisados por “Southern blot”. Um exemplo disso é a combinação dos haplótipos (a e g) e (c e f) (figura 18) que, presentes simultaneamente em um indivíduo, apresentam o mesmo padrão de hibridização. Essas combinações foram encontradas nos pacientes das famílias 28 e 13, respectivamente (figura 12, linhas 3 e 6). Embora, o estudo de famílias reduza esse problema, tais complicações limitam o número de famílias para as quais se possa atribuir com certeza um haplótipo. Considerando-se que vários haplótipos incomuns possam ocorrer, tais como: haplótipos portando dois CYP21B e nenhum CYP21A; três CYP21A; um CYP21B e três CYP21A; ou, quatro CYP21A, a determinação deve ser realizada por uma análise de

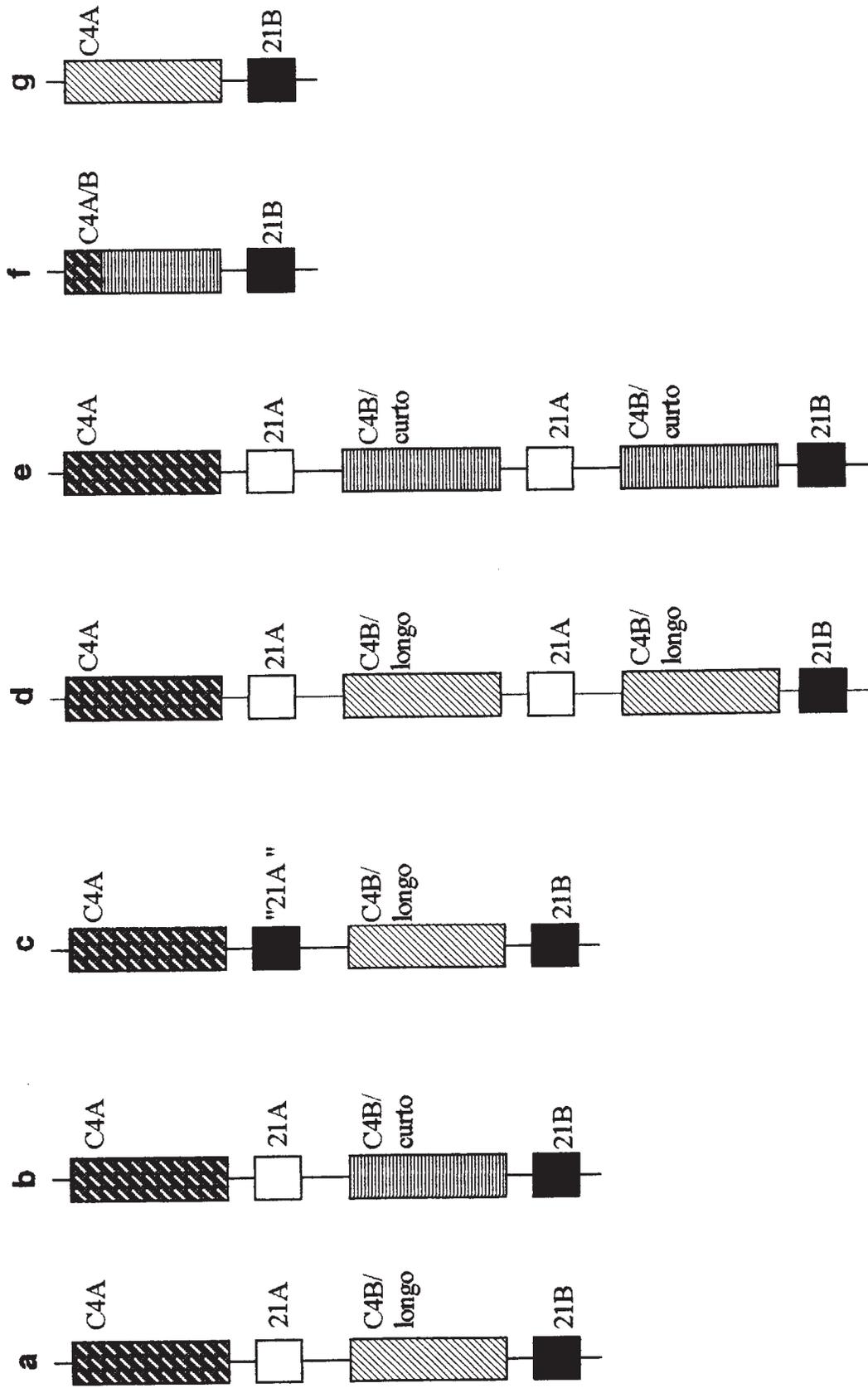


Figura 20 - Esquema de todos os tipos de haplótipos encontrados nos cromossomos normais dos indivíduos heterozigotos obrigatórios, definidos por fragmentos de restrição com *Taq I*. (a-b)- haplótipos normais sem nenhuma alteração das unidades gênicas; (c)- haplótipo com conversão gênica de CYP21A para CYP21B; (d-e)- haplótipos normais com duplicação (CYP21A+C4B); (f-g)- haplótipos normais com deleção gênica de CYP21A e CYP21B, respectivamente. "21A" - conversão gênica de CYP21A para CYP21B; C4B/longo-gene de 6,0 kb; C4B/curto-gene de 5,4 kb; C4A/B-gene híbrido de C4A e C4B.

digestão do DNA com enzimas de restrição de sítios raros onde os fragmentos gerados são da ordem de 30 kb e podem ser separados por eletroforese de campo pulsado (Collier e col., 1989; Sinnott e col., 1992). Nesse sentido, deve-se ressaltar que o polimorfismo de tamanho de fragmento *Taq* I do gene C4B foi considerado para ajudar na diferenciação dos haplótipos afetados no estudo de famílias. Deste modo, foi possível determinar o padrão de haplótipos de todas as 23 famílias estudadas, apresentando um total de 42 haplótipos afetados com a deficiência da 21-OHase e 45 haplótipos normais (Tabela 3).

Este estudo foi voltado principalmente para a caracterização dos haplótipos (afetados e não afetados) nas famílias com HCA, porém pode-se dizer que, uma vez determinado se a família é ou não informativa, essa metodologia pode ser usada para o diagnóstico e para identificar a condição de portador ou não dos irmãos não afetados. Mais uma vez, Koppens e col., (1992) no seu estudo em 29 famílias holandesas fez uma distinção entre portadores e não portadores em 16 famílias (55%). Das 23 famílias estudadas aqui, 12 famílias apresentam irmãos não afetados, destas, foi possível a distinção entre irmãos portadores e não portadores em 8 famílias (66%), sendo que 5 irmãos são portadores e 3 não portadores. Nas 11 famílias restantes esta distinção não foi possível. Com o estudo de famílias, foi possível também identificar a presença de cromossomos com rearranjos anômalos (famílias 22 e 26).

3. Famílias que discordam entre seus padrões de hibridização

No início deste trabalho foram encontradas duas famílias com discordâncias entre as características clínicas e seus padrões de DNA. Na família 17 (figura 21) foram analisados dois irmãos, um afetado e outro normal, que apresentaram o mesmo genótipo demonstrado pelo padrão de hibridização idêntico. A mãe possui deleção do pseudogene nos dois alelos. Embora não tenhamos determinado nenhuma alteração no pai a possibilidade de portar uma mutação pontual deve ser considerada. Essa criança foi encaminhada para tratamento com uma dosagem hormonal alterada, sendo que na família já havia registros de vários casos anteriores de óbitos de primos por parte do pai. As alterações encontradas na mãe não são suficientes para explicar o fenótipo afetado. Paralelamente, a equipe clínica que acompanha os pacientes observou que a criança afetada atualmente apresenta um quadro estável, portanto deve-se ponderar a possibilidade de não ser doente. No caso da família de número 19 (figura 10), foram analisadas duas crianças consideradas afetadas com a forma virilizante simples. As duas apresentaram

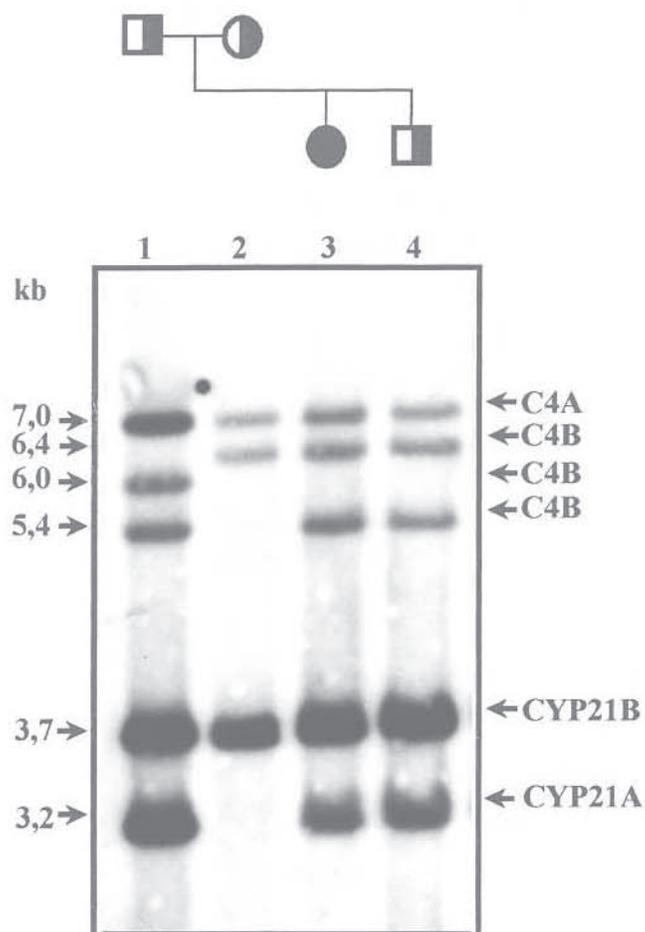


Figura 21 - Heredograma e "Southern" de análises da família 17. O "blot" de DNA genômico digerido com *Taq* I e hibridizados com as sondas pC21/3c (abaixo) e C4B550 (acima). Esta família possui 4 indivíduos, a saber: Pai (linha 1), Mãe (linha 2), Filha afetada (linha 3) e Filho normal (linha 4). O tamanho (em kb) das bandas e os referidos genes estão indicados nos lados esquerdo e direito das fotos, respectivamente.

genótipos diferentes (linhas 3 e 4). Embora as duas crianças apresentem níveis de 17-OH-progesterona alterados, a dosagem do menino mais novo é menor que a da filha afetada e menor que da média dos pacientes afetados pela forma virilizante simples. A equipe clínica, então, questionou a condição de afetado do menino e suspendeu a medicação. O menino respondeu positivamente a esse procedimento e é agora considerado não afetado.

4. Correlação do genótipo com o fenótipo

Em geral, enzimas 21-OHase mutantes carregando substituições específicas de aminoácidos normalmente presentes no pseudogene e identificadas nos pacientes com a deficiência da 21-OHase, revelam atividades que a grosso modo correspondem com a gravidade clínica da doença e com as anormalidades bioquímicas a ela associadas (Tusie-Luna e col., 1990; 1991; Chiou e col., 1990; Higashi e col., 1991; Wu e Chung, 1991). Seguindo esse raciocínio, a deleção em homozigose ou a deleção em *trans* com uma mutação que confere atividade enzimática zero *in vitro*, são consideradas como responsáveis por uma atividade total de 0% da 21-OHase *in vivo* bem como pelo fenótipo severo de perda de sal. Entretanto, a distinção entre as duas formas clássicas da deficiência da 21-OHase não é absoluta. Há registros de irmãos com HLA-idêntico, no qual um irmão demonstra perda de sal enquanto o outro irmão tem uma síntese suficiente de aldosterona (Stoner e col., 1986). Recentemente, Speiser e col. (1992b) classificaram 90 pacientes em três grupos de mutação, baseando-se no grau de comprometimento enzimático. O grupo A (sem atividade enzimática) consistiu principalmente de pacientes perdedores de sal, o grupo B (2% de atividade) com pacientes virilizantes simples, e o grupo C (10-20% de atividade) com pacientes da forma não clássica. Os grupos de mutação correlacionaram-se com o diagnóstico clínico, mas cada grupo continha pacientes com fenótipos mais ou menos grave do que o predito pela combinação de mutações.

A associação entre o fenótipo clínico e a classe de mutação patológica discutida em trabalhos recentes (Higashi e col., 1991; Sinnott e col., 1992; Speiser e col., 1992; Wedell e col., 1994) é geralmente concordante. Em particular, haplótipos de deleção e conversão gênica na forma homozigota são frequentemente associados com o fenótipo de perda de sal. Entretanto, devido ao alto grau de heterozigose para as mutações, uma correlação entre o fenótipo clínico e uma categoria específica de mutação é difícil de se estabelecer. Esse é o caso da maioria dos pacientes de HCA analisados neste estudo.

Foram encontrados apenas três pacientes com homozigose para a ausência do fragmento de *Taq* I de 3,7 kb. Uma delas é a paciente com a forma perdedora de sal portadora de deleção homozigota numa família consanguínea positiva (família 30). Outra, também classificada como perdedora de sal, possui uma deleção e uma conversão em larga escala (família 12). Nesses dois casos, a ausência completa do fragmento 3,7 kb corresponde ao fenótipo predito de perdedor de sal. No entanto, de alguma forma os resultados dos pacientes da família 20 (pacientes 20a e 20b) se contrapõem ao fenótipo, onde ambos possuem um padrão de hibridização para conversão gênica (em larga escala) em homozigose, porém com um fenótipo virilizante simples. Na tentativa de explicar tal achado, podemos supor que nesta família a conversão gênica encontrada nos haplótipos afetados não tenha atingido um intervalo grande do segmento do gene CYP21B, conseqüentemente pode ter adquirido somente uma pequena porção da extremidade 5' do CYP21A, inclusive o sítio de *Taq* I. Caso essa conversão não tenha atingido seqüências importantes para a formação da proteína a forma virilizante simples poderá ser justificada. Embora estes sítios se localizem fora da seqüência codificadora, a manutenção de uma estrutura semelhante ao CYP21B na seqüência 5' pode ser necessária para expressão gênica. Muitos elementos regulatórios têm sido descritos no final 5' dos genes 21-OHase de camundongos (Rice e col., 1990), revelando a importância dessa região para a expressão. Dados obtidos por Killeen e col. (1991) mostram que a extremidade 5' da região gênica do CYP21A, apesar de conter um número grande de seqüências divergentes de CYP21B, pode sustentar transcrição do gene CYP21, embora contenha um promotor mais fraco. Esta observação dá suporte à idéia de que a conversão gênica em questão provavelmente tenha afetado o gene ativo atingindo somente a região promotora do gene, causando com isto apenas uma diminuição na produção da enzima. Como a aldosterona é normalmente secretada numa razão de 100-1000 vezes menor do que o cortisol, torna-se evidente que a atividade da 21-OHase terá que diminuir a níveis muito baixos para que a falta de aldosterona seja manifestada. Assim, com apenas 1% de atividade normal da 21-OHase a síntese de aldosterona acontece, evitando a perda de sal, resultando num fenótipo virilizante simples (White e New, 1992). Encontra-se na literatura o registro de apenas um caso de ausência completa do gene 21-OHase com síntese normal de aldosterona (Speiser e col., 1991). Nesse trabalho os autores consideram que se trata de um caso de deleção em homozigose, embora não descrevam a metodologia usada para essa determinação. A conclusão desse estudo foi que embora pacientes com a forma perdedora de sal possuam mutações no gene CYP21B que são equivalentes em termos da sua função isso pode variar de um para outro e a sua capacidade de produzir mineralocorticóides pode

eventualmente ser variável. Especula-se se essa variação pode ser atribuída a uma outra enzima da adrenal com atividade de 21-hidroxilase.

5. Comparação com outras populações

Nesses últimos anos, várias informações de haplótipos da 21-OHase e sua ocorrência em diferentes populações tem sido publicada (Tabela 4). Em quase todas as populações estudadas a frequência de deleção gênica é mais alta que a de conversão gênica

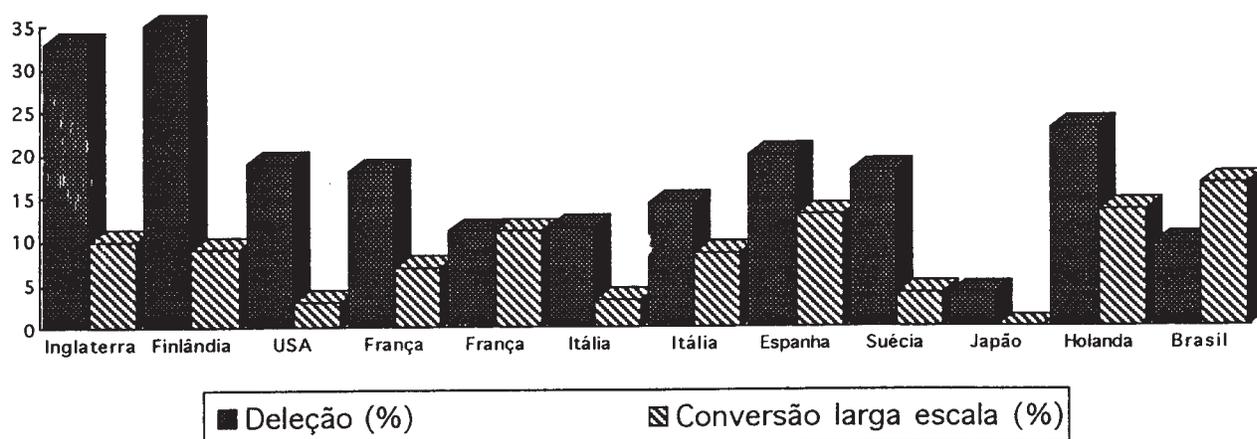
em larga escala, exceto na população da França (Morel e col., 1989a), na qual as frequências são as mesmas em ambas as mutações e no Japão (Harada e col., 1987) onde não se encontrou nenhuma deleção. Entretanto, em dois diferentes estudos na Itália a frequência de deleção gênica foi significativamente mais baixa do que de outras populações, no entanto a frequência de conversão gênica em larga escala foi ainda mais baixa. O presente estudo mostra frequência mais alta de conversão gênica em larga escala (16,6%) do que deleção gênica (9,5%) nos pacientes estudados no Brasil. Além disso, a maioria dos casos de deleção gênica são heterozigotos compostos, sendo apenas um de deleção em homozigose. Muitos desses estudos na Tabela 4 comparam haplótipos da 21-OHase com diferentes abordagens. Basicamente, eles usaram análises de “Southern blot” com no mínimo duas enzimas de restrição e sonda da 21-OHase, exceto por Collier e col., (1989) que também usou análises de eletroforese de campo pulsado com a enzima *Bss*H II. Nossos estudos combinam haplótipos da 21-OHase/complemento C4 com algumas enzimas de restrição para minimizar um erro de avaliação dos haplótipos portadores de conversão gênica em larga escala. Apesar das dificuldades na interpretação, está claro que diferenças étnicas têm contribuído para a controvérsia com respeito ao número de deleções de CYP21B em famílias com HCA.

As diferenças no fenótipo, a baixa frequência de deleção gênica, e alta frequência de conversão gênica comparada com estudos de outras populações, constituem em fatores indicativos de que a deficiência da 21-OHase pode envolver diferentes rearranjos e/ou mutações pontuais moleculares na população brasileira. Estas frequências diferentes podem ser explicadas devido a variabilidade entre as populações mas também por diferentes interpretações.

Tabela 4 - Comparação das freqüências de deleção e conversão gênica em larga escala em diferentes trabalhos publicados.

País	Número de famílias	Deleção gênica (%)	Conversão gênica em larga escala (%)	Referências
Inglaterra	32	33	10	Collier e col., 1989
Finlândia	17	35	9	Partanen e col., 1989
USA	35	19	3	White e col., 1988
França	91	18	7	Mornet e col., 1991
França	57	11,2	11,2	Morel e col., 1989b
Itália	33	11,7	3,3	Sinnott e col., 1992
Itália	70	11,4	8,6	Carrera e col., 1993
Espanha	38	20	13	Ezquieta e col., 1995
Suécia	41	18	4	Wedell e col., 1994
Japão	9	4	0	Harada e col., 1987
Holanda	29	23	13,5	Koppens e col., 1992
Brasil	22	9,5	16,6	presente trabalho

GRÁFICO DE VÁRIAS POPULAÇÕES



BIBLIOGRAFIA

- ABAD, L.; PARILLA, J. J.; MARCOS, J.; GIMENO, F. & BERNAL, A. L., Male pseudohermaphroditism with 17 α -hydroxylase deficiency. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 87: 1162 (1980).
- ALVAREZ, M. N.; CLOUTIER, M. D. & HAYLES, A. B., Male pseudohermaphroditism due to 17 α -hydroxylase deficiency in two siblings. *Pediatr. Res.*, 7: 325 (1973).
- AMOR, M.; PARKER, K L.; GLOBERMAN, H.; NEW, M.I. & WHITE, P.C., Mutation in the CYP21B gene (Ile172-Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 1600-1604 (1988).
- APPAN, S.; HINDMARSH, P. C. & BROOK, C. H., Monitoring treatment in congenital adrenal hyperplasia. *Arch. Dis. Child.*, 64 (9):1235-1239 (1989).
- AWDEH, Z. L.; RAUM, D.; YUNIS, E. J. & ALPER, C. A., Extended HLA complement allele haplotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 259-263 (1983).
- BIAS, W. B.; URBAN, M. D.; MIGEON, C. J.; HSU, S. H. & LEE, P. A., Intra-HLA recombinations localizing the 21-hydroxylase deficiency gene within the HLA complex. *Hum. Immunol.*, 2: 139 (1981).
- BONGIOVANNI, A. M. (1978). Congenital adrenal hyperplasia and related conditions. In: STANBURY J. B.; WYNGARDEN J. B. & FREDRICKSON D. S. (Editores), *The metabolic basis of inherited disease*, 4^a ed., New York: McGraw-Hill, 868.
- BONGIOVANNI, A. M., Congenital adrenal hyperplasia due to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Pediatr. Adolesc. Endocrinol.*, 13: 72-78 (1984).
- CALLIARI, L. E. P. (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.; ZAMUSSI, 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).
- CARROL, M. C. & PORTER, R. R., Cloning of a human complement component C4 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 264-267 (1983).
- CARROL, M. C.; CAMPBELL, R. D.; BENTLEY, D. R. & PORTER, R. R., A molecular map of the human major histocompatibility region linking complement genes C4, C2 and factor B. *Nature, London*, 307: 237-241 (1984a).
- CARROL, M. C.; BELT, T.; PALSDOTTIR, A. & PORTER, R. R., Structure and organization of the C4 genes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, 306: 379-388 (1984b).

- CARROL, M. C.; CAMPBELL, R. D. & PORTER, R. P., Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 521-525 (1985a).
- CARROL, M. C.; PALSDOSTTIR, A.; BELT, K. T. & PORTER, P. R., Deletion of complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes in the HLA class III region. *EMBO J.*, 4: 2547-2552 (1985b).
- CHANG, Y. T.; KAPPY, M. S.; IWAMOTO, K.; WANG, J.; YANG, X. & PANG, S., Mutations in the type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene in a patient with classic salt-wasting 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr. Res.*, 34: 698-700 (1993).
- CHAPLIN, D. D.; WOODS, D. E.; WHITEHEAD, A. S.; GOLDBERGER, G.; COLTON, H. R. & SEIDMAN, J. G., Molecular map of the murine S region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 6947-6951 (1983).
- CHUNG, B.; MATTESON, K. J.; VOUTILAINEN, R.; MOHANDAS, T. K. & MILLER, W. L., Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 8962-8966 (1986).
- COLLIER, S.; SINNOTT, P. J.; DYER, P. A.; PRICE, D. A.; HARRIS, R. & STRACHAN, T., Pulsed field gel 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).
- COLLIER, S.; TASSABEHJI, M. & STRACHAN, T., A Method for specific amplification and PCR sequencing of individual members of multigene families: application to the study of steroid 21-hydroxylase deficiency. *PCR Methods and Applications*, 1: 181-186 (1992)
- COULLIN, P.; NICOLAS, H.; BOUE, J. & BOUE, A., HLA typing of amniotic-fluid cells applied to prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Lancet*, 1: 1107 (1979).
- COULLIN, P.; BOUE, J.; NICOLAS, H.; CHERUY, C. & BOUE, A., Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (21-OH deficiency type) by HLA typing. *Prenatal Diagn.*, 1: 25 (1981).
- DAVID, M. & FOREST, M. G., Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia resulting from 21-hydroxylase deficiency. *J. Pediatr.*, 105: 799-803 (1984).
- DICHTCHEKENIAN, V. (1989), Hiperplasia congênita das supra-renais. Em SETIAN, N. (Editor), *Endocrinologia pediátrica*, Sarvier, São Paulo, 304-309.
- DIMARTINO-NARDI, J.; STONER, E. O'CONNELL A. & NEW, M. I., The effect of treatment on final height in classical congenital adrenal hyperplasia (CAH). *Acta Endocrinol.*, 113/suppl 279: 305-314 (1986).

- DODDS, A. W. & LAW, S. K. A., The complement component C4 of mammals. *Biochem. J.*, 265: 495-502 (1990).
- DONOHOU, P. A.; JOSPE, N.; MIGEON, C. J.; McLEAN, R. H.; BIAS, W. B.; WHITE, P. C. & VAN DOP, C., Restriction maps and restriction fragment length polymorphisms of the human 21-hydroxylase genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 136(2): 722-729 (1986a).
- DONOHOU, P. A.; VAN DOP, C.; McLEAN, R. H.; WHITE, P. C.; JOSPE, N. & MIGEON, J. C., Gene conversion in salt-losing congenital adrenal hyperplasia with absent complement C4B protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 62: 995-1002 (1986b).
- DONOHOU, P. A.; VAN DOP, C.; JOSPE, N.; MIGEON, C. J., Congenital adrenal hyperplasia: molecular mechanisms resulting in 21-hydroxylase deficiency. *Acta Endocrinol.*, 113 [Suppl. 279]: 315-320 (1986c).
- DUMIC, M.; BRKLJACIC, L.; SPEISER, P. W.; WOOD, E.; CRAWFORD, C.; PLAVSIC, M.; RADMANOVIC, S.; RADICA, A.; KASTELAN, A. & NEW, M. I., An update on the frequency of nonclassic deficiency of adrenal 21-hydroxylase in the Yugoslav population. *Acta Endocrinol.*, 122: 703-710 (1990).
- DUPONT, B.; OBERFIELD, S. E.; SMITHWICK, E. M.; LEE, T. S. & LEVINE, I. S., Close genetic linkage between HLA and congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *Lancet*, II: 1309-1311 (1977).
- DUPONT, B.; POLLACK, M. S.; LEVINE, L. S.; O'NEILL, G. J.; HAWKINS, B. R. & NEW, M. I. (1980). In: TERASAKI, P. I. (Editor), *Histocompatibility testing 1980*, Univ. of California at Los Angeles, Los Angeles, 693-706.
- DUPONT, B.; VIRDIS, R.; LERNER, A. J.; NELSON, C.; POLLACK, M. S. & NEW, M. I. (1984). In: ALBERT, E. D. (Editor), *Histocompatibility testing 1984*, Springer, Berlin, 660.
- EZQUIETA, B.; OLIVER, A.; GRACIA, R. & GANCEDO, P. G., Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Hum. Genet.*, 96: 198-204 (1995).
- FARAH, S. B.; GARMES, H. M.; CAVALCANTI, D. P.; De MELLO, M. P.; PORELLI, R. N.; RAMOS, C. F. & SARTORATO, E. L., Use of Y chromosomal DNA probes to evaluate an XX male. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 24:149-156 (1991).
- FEDERMAN, D. D., Psychosexual adjustment in congenital adrenal hyperplasia. *N. Engl. J. Med.*, 316: 209-211 (1987).
- FEINBERG, A. P. & VOGELSTEIN, B. A., Technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132: 6-9 (1983).

- FELDMAN, S.; BILLAUD, L.; THALABARD, J. C.; RAUX-DEMARY, 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, E. B., Prevalence of salt-losing among congenital adrenal hyperplasia patients. *Clin. Endocrinol.*, 19: 259 (1983).
- FINKELSTEIN, M. & SHAEFER, J. M., Inborn errors of steroid biosynthesis. *Physiol. Rev.*, 59: 353-406, (1979).
- FOREST, M. G.; BÉTUÉL, H.; COUILLIN, P. & BOUÉ, A., Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency by steroid analysis in the amniotic fluid of mid-pregnancy; comparison with HLA-typing in 17 pregnancies at risk for CAH. *Prenatal Diagn.*, 1: 197-207 (1981).
- FOREST, M. G., Pitfalls in prenatal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency by amniotic fluid steroid analysis? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 458: 130-147 (1985).
- FOREST, M. G.; BÉTUÉL, H. & DAVID, M., Prenatal treatment in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr. Res.*, 15: 277-301 (1989).
- FOREST, M. G.; DAVID, M. & MOREL, Y., Prenatal diagnosis and treatment of 21-hydroxylase deficiency. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 45: 75-82 (1993).
- FRASIER, S. D.; THORNEYCROFT, I. H.; WEISS, B. A. & HORTON, R., Elevated amniotic fluid concentration of 17-hydroxyprogesterone in congenital adrenal hyperplasia. *J. Pediatr.*, 86: 310-312 (1975).
- GARLEPP, M.J.; WILTON, A. M. & WHITE, P. C., Rearrangements of 21-hydroxylase genes in disease-associated MHC supratypes. *Immunogenetics*, 23: 100-105 (1986).
- GAUNT, R. (1971). Action of adrenal cortical steroids on electrolyte and water metabolism. In: CHRISTY, N. (Editor), *The human adrenal cortex*, N. Y., 273-302.
- GLOBERMAN, H.; AMOR, M.; PARKER, K. L.; NEW, M. I. & WHITE, P. C., Nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Invest.*, 82: 139 (1988).
- GOLDSMITH, O.; SOLOMON, D. H. & HORTON, R., Hypogonadism and mineralocorticoid excess: The 17 α -hydroxylase deficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 277: 673-677 (1976).
- GROSSE-WILDE, H.; VALENTINE-THON, E.; VOGELER, U.; PASSARGE, E.; LORENZEN, F.; SIPPELI, W. G.; BIDLINGMAIER, F. & KNORR, D., HLA-A, B, C, DR typing and 17-OHP determination for second trimester prenatal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency CAH. *Prenatal Diagn.*, 8: 131-143 (1988).

- GRURMBACK, M. M. & CONTE, F. A. (1985). Disorders of sexual differentiation. In: WILSON, J. D.; FOSTER, D. W., (Editores), *Williams textbook of endocrinology*, 7^a ed, Philadelphia, 312-401.
- GUEUX, B.; FIET, J.; COUILLIN, P.; RAUX-DEMAY, M. C.; MORNET, E.; GALONS, H.; VILETTE, J. M.; BOUÉ, J. & DREUX, C., Prenatal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia by simultaneous radioimmunoassay of 21-deoxycortisol and 17-hydroxyprogesterone in amniotic fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 66: 534-537 (1988).
- GUYTON, A. C. (1986). *Tratado de Fisiologia Médica*, 6^a ed, Rio de Janeiro, Guanabara, 817-829.
- GUTAI, J. P.; KOWARSKI, A. A. & MIGEON, C. J., The detection of the heterozygous carrier for congenital virilizante adrenal hyperplasia. *J. Pediatr.*, 90: 924 (1977).
- 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).
- HELMBERG, A.; TABARELLI, M.; FUCHS, M. A.; LELLER, E.; DOBLER, G. & SCHNEGG, I., Identification of molecular defects causing congenital adrenal hyperplasia by cloning and differential hybridization of polymerase chain reaction-amplified 21-hydroxylase (CYP21) genes. *DNA Cell Biol.*, 11: 359-368 (1992).
- HELMBERG, A., Twin Genes and Endocrine Disease: CYP21 and CYP11B Genes. *Acta Endocrinol.*, 129: 97-108 (1993).
- HENIKOFF, S., Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analyses, *Methods Enzymol.*, 155: 156-165 (1987).
- HIGASHI, Y.; YOSHIOKA, H.; YAMANE, M.; GOTOH, O. & FUJI-KURUYAMA, 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. & FUJII-KURIYAMA, Y., Evidence for frequent gene conversions in the steroid 21-hydroxylase (P-450c21) gene: Implications for steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, 42: 17-25 (1988a).

- HIGASHI, Y.; TANAE, A.; INOUE, H.; HIROSAMA, T. & FUJII-KURIYAMA, Y., Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P-450(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., Tokyo*, 109: 638-644 (1991).
- HUGHES, I. A. & LAURENCE, K. M., Antenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Lancet*, II: 7 (1979).
- HUGHES, I. A.; DYAS, J.; RIAD-FAHMY, D. & LAURENCE, K. M., Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia; reliability of amniotic fluid analysis. *J. Med. Genet.*, 24: 344-347 (1987).
- JÄNNE, O.; PERHEENTUPA, J. & VIHKO, R., Plasma and urinary steroids in an light year old with 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenase deficiency. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, 31: 162-165 (1970).
- JÄNNE, O.; PERHEENTUPO, J.; VIINIKKA, L. & VIHKO, R., Testicular endocrine function in a pubertal boy with 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, 39: 184 (1974).
- JONES, H. W.; LEE, P. A.; ARCHER, D. F. & MIGEON, C. J., A genetic male patient with 17 α -hydroxylase deficiency. *Obstet. Gynecol.*, 59: 254 (1982).
- JOSPE, N.; DONOHOUE, P. A.; VAN DOP, C.; McLEAN, R. H.; BIAS, W. B. & MIGEON, C. J., Prevalence of polymorphic 21-hydroxylase gene (CA21HB) mutations in salt-losing congenital adrenal hyperplasia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142: 798-804 (1987).
- JOSPE, N.; DONOHOUE, P. A.; VAN DOP, C. & MIGEON, C. J., Crossing-over sites within the 21-hydroxylase (CYP21) genes causing salt-losing congenital adrenal hyperplasia (CAH). *Pediatr. Res.*, 23: 279 (1988).
- KARAVITI, L. P.; MERCADO, A. B.; MERCADO, M. B.; SPEISER, P. W.; BUEGELEISEN, M.; CRAWFORD, C.; ANTONIAN, L.; WHITE, P. C. & NEW, M. I., Prenatal diagnosis/treatment in families at risk for infants with steroid 21-hydroxylase deficiency (congenital adrenal hyperplasia). *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 41: 445-451 (1992).
- KAUFMANN, J. F.; AUFRAY, C.; KORMAN, A. J.; SHACKLEFORD, D. A., & STROMINGER, J., *Cell*, 36: 1-13 (1984).

- KILLEEN, A. A.; SANE, K. S. & ORR, H. T., Molecular and endocrine characterization of a mutation involving a recombination between the steroid 21-hydroxylase functional gene and pseudogene. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 38 (6): 677-686 (1991).
- KLOUDA, P. T.; HARRIS, R. & PRICE, D. A., HLA and congenital adrenal hyperplasia. *Lancet, II*: 1046 (1978).
- KLOUDA, P. T.; HARRIS, R. & PRICE, D. A., Linkage and association between HLA and 21-hydroxylase deficiency. *J. Med. Genet.*, 17: 337-341 (1980).
- KOHN, B.; LEVINE, L. S.; POLLACK, M. S.; PANG, S.; LORENZEN, F.; LEVY, D.; LERNER, A.; RONDANINI, F.; DUPONT, B. & NEW, M. I., Late-onset steroid 21-hydroxylase deficiency: a variant of classical congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51: 817-827 (1982).
- KOMINAMI, S.; OCHI, H.; KOBAYASHI, Y. & TAKEMORI, S., Studies on the steroid hydroxylation system in adrenal cortex microsomes, purification and characterization of cytochrome P-450 specific for steroid C-21 hydroxylation. *J. Biol. Chem.*, 255: 3386 (1980).
- KOURILSKY, P., Molecular mechanisms for gene conversion in higher cells. *Trends Genet.*, 2: 60-63 (1986).
- KOWARSKI, A.; RUSSELL, A. & MIGEON, C. J., Aldosterone secretion rate in the hypertensive form congenital adrenal. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 28: 1445-1449 (1968).
- KOPPENS, P. F. J.; HOOGENBOEZEM, T.; HALLEY, D. J. J.; BARENDSE, C. A. M.; OOSTENBRINK, A. J. & DEGENHART, H. J., 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).
- LARON, Z.; POLLACK, M. S. & 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).
- LEVINE, I. S.; ZACHMANN, M.; NEW, M. I.; PRADER, A.; POLLACK, M. S.; O'NEILL, G.; YANG, S. Y.; OBERFIELD, S. E. & DUPONT, B., Genetic mapping of the 21-hydroxylase deficiency gene within the HLA linkage group. *N. Engl. J. Med.*, 299: 911-915 (1978).
- LEVINE, L. S.; DUPONT, B.; LORENZEN, F.; PANG, S.; POLLACK, M.; OBERFIELD, S. E.; KOHN, B.; LERNER, A.; CACCIARI, E.; MANTERO, F.; CASSIO, A.; SCARONI, C.; CHIUMELLO, G.; RONDANINI, G. F.; GARGANTINI, L.; GIOVANNELLI, G.; VERDIS, R.; BARTOLOTTA, E.; MIGLIORI, C.; PINTOR, C.; TATO, L.; BARBONI, F. & NEW, M. I., Genetic and hormonal characterization of cryptic 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 53: 1193-1198 (1981).

- LOBO, R. A.; GOEBELSMANN, U., Evidence for reduced 3β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in some hirsute women thought to have polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 53: 394-400 (1980).
- MANIATIS, T.; FRITISCH, E. F. & SAMBROCK, J., *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, (1990).
- MANTERO, F. & SCARONI, C., Enzymatic defects of steroidogenesis: 17α -hydroxylase. *Pediatr. Adolesc. Endocrinol.*, 13: 83-94 (1984).
- MATTESON, K. J.; PHILLIPS, J. A.; MILLER, W. R.; CHUNG, B.; ORLANDO, P.J.; FRISCH, H.; FERRANDEZ, A. & BURR, I. M., P450XXI (steroid 21-hydroxylase) gene deletions are not found in family studies of congenital adrenal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5858-5862 (1987).
- MAUER, D. H.; HANKE, J. H.; MICKELSON, E.; RICH, R. R. & POLLACK, M. S., Differential presentation of HLA- DR, DQ, and DP restriction elements by interferon-gamma-treated dermal fibroblasts. *J. Immunol.*, 139: 715-723 (1987).
- MIGEON, C. J.; ROSENWASK, Z.; LEE, P. A.; URBAN, M. D. & BIAS, W. B., The attenuated form of congenital adrenal hyperplasia as an allelic form of 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51: 647-649 (1980).
- MIGEON, C. J. (1989). Diagnosis and treatment of adrenogenital disorders. In: DeGroot L. J. (Editor), *Endocrinology*, 2^a ed., Philadelphia, WB Saunders, 1676.
- MIGEON, C. J. & DONOHOUE, P. A., Congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 20: 277-296 (1991).
- MILLER, W. L. & LEVINE, L. S., Molecular and clinical advances in congenital adrenal hyperplasia. *J. Pediatr.*, 111: 1-17 (1987).
- MILLER, W. L., Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.*, 9: 295-318 (1988).
- MILLER, W. L. & MOREL, Y., The molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. *Annu. Rev. Genet.*, 23: 371-393 (1989).
- MILLER, W. L., Congenital adrenal hyperplasias. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 20: 721-749 (1991).
- MOREL, Y.; DAVID, M.; FOREST, M. G.; BETUEL, H.; HAUPTMANN, G.; ANDRE, J.; BERTRAND, J.; MILLER, W. L., Gene conversions and rearrangements cause discordance between inheritance of forms of 21-hydroxylase deficiency and HLA types. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 68: 592-599 (1989a).

- MOREL, Y.; ANDRÉ, J.; URING-LAMBERT, B.; HAUPTAMANN, G.; BÉTUEL, H.; TOSSI, M.; FOREST, M. G.; DAVID, M.; BERTRAND, J. & MILLER, W. L., 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 (1989b).
- MOREL, Y. & MILLER, W. I. (1991). Clinical and molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase. In: HARRIS, H. & HIRSCHHORN, K. (Editors), *Advances in Human Genetics 20*, Plenum Press, New York 20, 1-68.
- MORNET, E.; BOUÉ, J.; RAUX-DEMAY, M.; COUILLIN, P.; OURY, J. F.; DUMEZ, Y.; DAUSSET, J.; COHEN, D. & BOUÉ, A., First trimester prenatal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency by linkage analysis to HLA-DNA probes and by 17-hydroxyprogesterone determination. *Hum. Genet.*, 73: 358-364 (1986a).
- MORNET, E.; COUILLIN, P.; KUTTEN, F.; RAUX, M. C.; WHITE, P. C.; 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 (1986b).
- MORNET, E.; CRETE, P.; KUTTEN, F.; RAUX-DEMAY, M. C.; BOUÉ, J. & WHITE, P. C.; BOUÉ, A., Distribution of deletion and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, 48: 79-88 (1991).
- MULAIKAL, R. M.; MIGEON, C. J. & ROCK, J. A., Fertility rates in female patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency, *N. Engl. J. Med.*, 316: 178-182 (1987).
- NEW, M. I.; DUPONT, B.; GRUMBACH, K. & LEVINE, L. S. (1983). Congenital adrenal hyperplasia and related conditions. In: Stanbury J. B.; WYNGARDEN J. B.; GOLDSTEIN, J. F. & BROWN, M. S. (Editors), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 5^a ed., New York, McGraw-Hill, 973-1391.
- NEW, M. I. & LEVINE, L. S., Recent advances in 21-hydroxylase deficiency. *Annu. Rev. Med.*, 35: 649-663 (1984).
- NEW, M. I. & SPEISER, P. W. (1989). Congenital adrenal hyperplasia. *Pediatric Endocrinology*, Chailer Brook, Chapter 21, 441-462.
- NEW, M. I.; GERTNER, J. M.; SPEISER, P. W. & DEL BALZO, P., Growth and final height in classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J. Endocr. Invest.*, 12: 91-95 (1989a).

- NEW, M. I.; WHITE, P. C.; PANG, S.; DUPONT, B. & SPEISER, P. W., Congenital adrenal hyperplasia and related conditions. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. C.; SLY, W. S. & VALLE, D., *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, 6^a ed., McGraw-Hill, New York, 1881-1997. (1989b).
- NEW, M. I., 21- hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 48: 15-22 (1994).
- NEW, M. I., Steroid 21-hydroxylase deficiency (congenital adrenal hyperplasia). *Am. J. Med.*, 98, (suppl 1A): 2s-8s (1995).
- OLAISEN, B.; TEISBERG, R.; JONASSEN, R.; THORSBY, E. & GEDDE-DAHL, T., Gene order and gene distances in the HLA regions studied by the haplotype method. *Ann. Hum. Genet.*, 47: 285-292 (1983).
- O'NEILL, G. J.; YANG, S. Y.; TEGOLI, J.; BERGER, R. & DUPONT, B., Chido and Rodgers blood groups are distinct antigenic components of human complement C4. *Nature, London*, 273: 668-670 (1978).
- O'NEILL, G. J.; DUPONT, B.; POLLACK, M. S.; LEVINE, L. S. & NEW, M. I., 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).
- OWERBACH, D.; CRAWFORD, Y. M. & DRAZNIN, M. B., Direct analysis of CYP21B genes in 21-hydroxylase deficiency using polymerase chain reaction amplification. *Mol. Endocrinol.*, 4: 125-131 (1990).
- OWERBACH, D.; BALLARD, A. L. & DRAZNIN, M. B., 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).
- 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.; LEVINE, L.S.; CHOW, D. FAIMAN, C. & NEW, M. I., Serum androgen concentrations in neonates and young infants with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Clin. Endocrinol.*, 11: 575-584 (1979).
- PANG,S.; MURPHY, W.; LEVINE, L. S.; SPENCE, D.; LEON, A.; LaFRANCHI, S.; SURVER, A. & NEW, M. I., A pitot newborn screening program for congenital adrenal hyperplasia in Alaska. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55: 413 (1982).

- PANG, S.; LEVINE, L. S.; STONER, E.; OPITZ, J. M.; POLLACK, M. S.; DUPONT, B. & NEW, M. I., Nonsalt-losing congenital adrenal hyperplasia due to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency with normal glomerulosa function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 56: 808-818 (1983).
- PANG, S.; LERNER, A. J.; STONER, E.; LEVINE, L. S.; OBERFIELD, S. E. & NEW, M. I., Late onset adrenal 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. a cause of hirsutism in pubertal and postpubertal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 60: 428-439 (1985a).
- PANG, S.; POLLACK, M. S.; LOO, M.; GREEN, O.; NUSSBAUM, R.; CLAYTON, G., DUPONT, B. & NEW, M. I., Pitfalls of prenatal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 61: 89-97 (1985b).
- PANG, S.; WALLACE, M. A.; HOFMAN, L.; THULINE, H. C.; DORCHE, C.; LYON, I. C.; DOBBINS, R. H.; KLING, S.; FUJIEDA, K. & SUWA, S., Worldwide experience in newborn screening for classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase. *Pediatrics*, 81: 866-874 (1988).
- PARTANEN, J.; KOSHIMIES, S.; SIPILÄ, 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).
- PARTANEN, J. & CAMPBELL, R. D., Substitution of Ile-172 to Asn in the steroid 21-hydroxylase B (P450c21B) gene in a Finnish patient with the simple virilizing form of congenital adrenal hyperplasia. *Hum. Genet.*, 87: 716-720 (1991).
- PEDERSEN, R. C. & BROWNIE, A. C., Steroidogenesis-activator polypeptide isolated from a rat Leydig cell tumor. *Science*, 236: 188-190 (1987).
- POLLACK, M. S.; MAURER, D.; LEVINE, L. S.; NEW, M. I.; PANG, S.; NITOWSKY, H. M.; SACHS, G.; DUCHON, M.; MERKATZ, I.; OWENS, R. P. & DUPONT, B., Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) by HLA typing. *Lancet*, I: 1107 (1979a).
- POLLACK, M. S.; LEVINE, L. S.; ZACHMANN, M.; PRADER, A.; NEW, M. I.; OBERFIELD, S. & DUPONT, B., Possible genetic linkage disequilibrium between HLA and the 21-hydroxylase deficiency gene (congenital adrenal hyperplasia), *Trans. Proc.*, 11: 1315-1316 (1979b).
- POLLACK, M. S., LEVINE, L. S. & O'NEILL, G. J., HLA linkage and B14,DR1,Bf5 haplotype association with the genes for late onset and cryptic 21-hydroxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, 33: 540-550 (1981).
- PRICE, D. A.; KLOUDA, P. T. & HARRIS, H., HLA and congenital adrenal hyperplasia linkage confirmed. *Lancet*, I: 930-931 (1978).

- PUCHOLTZ, V.; FITZSIMMONS, J. S.; GELSTHORPE, K.; PRATT, R.F. & DOUGHTY, R. W., HLA and congenital adrenal hyperplasia. *Lancet, II*: 1046-1047 (1978).
- RAUX-DEMAY, M.; MORNET, E.; BOUÉ, J.; COUILLIN, P.; OURY, L. F.; RAVISE, N.; DELUCHAT, C. & BOUÉ, A., Early prenatal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency using amniotic fluid 17-hydroxyprogesterone determination and DNA probes. *Prenatal diagn.*, 9: 457-466 (1989).
- RHÉAUME, E.; SANCHEZ, R.; SIMARD, J.; CHANG, Y. T.; WANG, J.; PANG, S. & LABRIE, F., Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia in two siblings with classical nonsalt-losing 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 79: 1012-1018 (1994).
- RICE, D. A.; KRONENBERG, M. S.; MOUW, A. R.; AITKEN, L. D.; FRANDLIN, A.; SCHIMMER, D. P. & PARKER, K. L., Multiple regulatory elements determine adrenocortical expression of steroid 21-hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, 265: 8052-8058 (1990).
- RICHARDS, G. E.; GRUMBACH, M. M.; KAPLAN, S. L. & CONTE, F. A., The effect of long acting glucocorticoids on menstrual abnormalities in patients with virilizing congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 47: 1208-1215 (1978).
- RIGBY, P. W. J.; DIECKMANN, M.; RHODES, C. & BERG, P., Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.*, 113: 237-240 (1977).
- ROBSON, E. B. & LAMM, L. U., Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 6, cytogenet. *J. Cell Genet.*, 37: 47-70 (1984).
- RODRIGUES, N. R.; DUNHAN, I.; YUNG, Y. C.; CARROL, M. C.; PORTER, R.R. & CAMPBELL, R. D., Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. *EMBO J.*, 6: 1653-1661 (1987).
- ROSLER, A.; LEIBERMAN, E.; SACK, J.; LANDAU, H.; BENDERLY, A.; MOSES, S. W. & COHEN, T., Clinical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. *Horm. Res.*, 16: 133-141 (1982).
- RUMSBY, G.; CARROLL, M. C.; PORTER, R. R.; GRANTS, D. B. & HJELM, M., Deletion of the Steroid 21-hydroxylase and complement C4 genes in congenital adrenal hyperplasia. *J. Med. Genet.*, 23: 204 (1986).
- RUMSBY, G.; FIELDER, A. H. L.; HAGUE, W. M. & HONOUR, J. W., Heterogeneity in the gene locus for steroid 21-hydroxylase deficiency. *J. Med. Genet.*, 25: 596-599 (1988).

- RUMSBY, G.; HONOUR, J. W. & RODECK, C., Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia by direct detection of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene. *Clin. Endocrinol.*, 38: 241-425 (1993).
- SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F. & MANIATIS, T. E., Molecular cloning: a laboratory manual, 2^a ed., *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).
- SANCHEZ, R.; RHÉAUME, E.; LAFLAMME, N.; ROSENFELD, R. L.; LABRIE, F. & SIMARD, J., Detection and functional characterization of the novel missense mutation Y254D in II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) gene of a female patient with nonsalt-losing 3 β -HSD deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 78: 561-567 (1994).
- SCHNEIDER, G.; GENEL, M.; BONGIOVANNI, A. M.; GOLDMAN, A. S. & ROSENFELD, R. L., Persistent testicular Δ 5-isomerase-3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (Δ 5-3 β -HSD) deficiency in the Δ 5-3 β -HSD form of congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Invest.*, 55: 681-690 (1975).
- SCHNEIDER, P. M.; CARROL, M. C.; APER, A.; RITTNEI, C.; WHITEHEAD, A. S.; YUNIS, E. J. & COLTEN, H. R., Polymorphism of the human complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes. *J. Clin. Invest.*, 78: 650-657 (1986).
- SCHNEIDER, P. M., C4 DNA RFLP reference typing report. *Complement. Inflamm.*, 7: 218-224 (1990).
- SHERMAN, S. L.; ASTON, C. E.; MORTON, N. E.; SPEISER, P. W. & NEW, M. I., A segregation and linkage study of classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, 42: 830-838 (1988).
- SINNOTT, P.; DYER, P.; PRICE, D.; HARRIS, R. & STRACHAN, T., 21-hydroxylase deficiency families with HLA identical affected and unaffected sibs. *J. Med. Genet.*, 26: 10-17 (1989).
- SINNOTT, P.; COLLIER, S.; COSTIGAN, C.; DYER, P. A.; 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, P. J.; 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).
- SONINO, N.; LEVINE, L. S.; VESCI, P.; VECSEI, P. & NEW, M. I., Parallelism of 11 β - and 18-hydroxylation demonstrated by urinary free hormones in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51: 557-560 (1980).
- SOOD, A. K.; PEREIRA, D. & WEISSMAN, S. M., Isolation and partial nucleotide sequence of a cDNA clone for human histocompatibility antigen HLA-B by use of an oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 616-620 (1981).

- SOUTHERN, E. M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel eletroforeseis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503-517 (1975).
- SPEISER, P. W. & NEW, M. I., Genetics of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Trends Genet.*, 1: 275-278 (1985).
- SPEISER, P. W.; DUPONT, B.; RUBINSTEIN, P.; PIAZZA, A .; KASTELAN, A. & NEW, M. I., High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, 37: 650-557 (1985).
- SPEISER, P. W.; NEW, M. I. & WHITE, P. C., Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14, DR1. *N. Engl. J. Med.*, 319: 19-23 (1988).
- SPEISER, P. W.; LAFORGIA, N.; KATO, K.; PAREIRA, J.; KHAN, R.; YANG, S. Y.; WHORWOOD, C.; WHITE, P. C.; ELIAS, S.; SCHRIOCK. E.; SCHRIOCK, E.; SIMPSON, J.L.; TASLIMI, M.; NAJJAR, J.; MAY,S.; MILLS, G.; CRAWFORD, C. & NEW, M. I., First trimester prenatal treatment and molecular genetic diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 70: 838-848 (1990).
- SPEISER, P. W.; AGDERE, L.; UESHIBA, H.; WHITE, P. C. & NEW, M. I., Aldosterona synthesis in salt-wasting congenital adrenal hyperplasia with complete absence of adrenal 21-hydroxylase. *N. Engl. J. Med.*, 324: 145-149 (1991).
- SPEISER, P. W.; NEW, M. I.; TANNIN, G. M.; PICKERING, D.; YANG, S. Y. & WHITE, P. C., Genotype of Yupik Eskimos with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum. Genet.*, 88: 647-648 (1992a).
- SPEISER, P. W.; DUPONT, J.; ZHU, D.; SERRAT, J.; BUEGELEISEN, M.; TUSIE-LUNA, M. T.; LESER, M.; NEW, M. I. & WHITE, P. C., Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Invest.*, 90: 584-595 (1992b).
- SPEISER, P. W.; WHITE, P. C.; DUPOINT, J.; ZHU, D.; MERCADO, A. B.; NEW, M. I., Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency by allele-specific hybridization and Southern blot. *Hum. Genet.*, 93: 424-428 (1994a).
- SPEISER, P. W.; WHITE, P. C.; DUPOINT, J.; ZHU, D.; MERCADO, A. B. & NEW, M. I., Molecular genetic prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency by allele-specific hybridization. *R. Prog. Horm. Res.*, 49: 367-371 (1994b).
- STEINMETZ, M. & HOOD, L., Genes of the major histocompatibility complex in mouse and man. *Science*, 222: 727-733 (1983).

- STONER, E.; DIMARTINO-NARDI, J.; KUHNLE, U.; LEVINE, L. S.; OBERFIELD, S. E. & NEW, M. I., Is salt-wasting in congenital adrenal hyperplasia due to the same gene as the fasciculata defect? *Clin. Endocrinol.*, 24: 9-20 (1986).
- STRACHAN, T.; SINNOTT, P. J.; SMEATON, I. S.; DYER, P. A. & HARRIS, R., Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Lancet*, II: 1272-1273 (1987).
- STRACHAN, T., Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Trends Endocrinol. Metab.*, 1: 68-72 (1989).
- STRACHAN, T., Molecular pathology of congenital adrenal hyperplasia. *Clin. Endocrinol.*, 32: 373-393 (1990).
- STRACHAN, T. & WHITE, P.C., 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).
- STRUMBERG, D., HAUFFA, B. P.; HORSTHEMKE, B. & GROSSE-WILDE, H., Molecular detection of genetic defects in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency : a study of 27 families. *J. Pediatr.*, 151: 821-826 (1992).
- TUSIE-LUNA, M. I.; TRAKTMAN, P. & WHITE, P. C., 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, M. T.; SPEISER, P. W.; DUMIC, M.; NEW, M. I. & WHITE, P. C., A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol. Endocrinol.*, 5: 685-692 (1991).
- 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).
- URBAN, M. D.; LEE, P. A. & MIGEON, C. J., Adult height and fertility in men with congenital virilizing adrenal hyperplasia, *N. Engl. J. Med.*, 299: 1392-1396 (1978).
- WEDELL, A.; RITZEN, E. M.; 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 (P450c21): a new allele and spread of mutations through the pseudogene. *Hum. Genet.*, 91: 236-240 (1993).

- WEDELL, A.; THEILÉN, 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).
- WERKMEISTER, J.W.; NEW, M. I.; DUPONT, B. & WHITE, P.C., Frequent deletion and duplication of the steroid 21-hydroxylase genes. *Am. J. Hum. Genet.*, 39: 461-469 (1986).
- WHITE, P. C.; NEW, M. I. & DUPONT, B., HLA-linkage 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, P. C.; NEW, M. I. & 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, P.C.; GROSSBERGER, D.; ONUFER, B.J.; CHAPLIN, D.D.; NEW, M. I.; DUPONT, B. & STRMINGER, J. L., Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth complement in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 1089-1093 (1985).
- WHITE, P. C.; NEW, M. I. & DUPONT, B., Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 5111-5115 (1986).
- WHITE, P. C.; NEW, M. I. & DUPONT, B., Congenital adrenal hyperplasia. Part I, *N. Engl. J. Med.*, 316: 1519-1524 (1987a).
- WHITE, P. C.; NEW, M. I.; DUPONT, B., Congenital adrenal hyperplasia. Part II, *N. Engl. J. Med.*, 316: 1580-1586 (1987b).
- WHITE, P.C.; VILEK, A.; DUPONT, B. & NEW, M. I., Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4436-4440 (1988).
- WHITE, P. C., Analysis of mutations causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Endocr. Res.*, 15: 239-256 (1989).
- WHITE, P.C.; CRAWFORD, C. & NEW, M. I., Steroid 21-hydroxylase deficiency. *Curr. Opinion Pediat.*, 1: 436-440 (1989).
- WHITE, P. C. & NEW, M. I., Genetic basis of endocrine disease 2: congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 74: 6-11 (1992).
- WISCHUSEN, J.; BAKER, H. W. G. & HUDSON, B., Reversible male infertility due to congenital adrenal hyperplasia. *Clin. Endocrinol.*, 14: 571-577 (1981).

- Wu DA & CHUNG, B. C.; 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).
- YANASE, T.; SIMPSON, E. R. & WATERMAN, M. R., 17 α -hydroxylase/17,20 lyase deficiency: from clinical investigation to molecular definition, *Endocr. Rev.* 12: 91-108 (1991).
- YU, C. Y.; CAMPBELL, R. D.; Definitive RFLPs to distinguish between the human complement C4A/C4B isotopes and the major Rodrges/Chido determinants: application to the study of C4 null alleles, *J. Immunol.*, 25: 383-390 (1987).
- YU, C. Y., The complete exon-intron struture of a human complement compoment C4A gene: DNA sequences, polymorphism, and linkage to the 21-hydroxylase gene. *J. Immunol.*, 146: 1057-1066 (1991).
- ZACHMANN, M.; FOREST, M. G. & De PERETTI, E., 3 β -hydroxylase dehydrogenase deficiency, Follow-up study in a girl with pubertal bone age. *Horm. Res.*, 11: 292-302 (1979).
- ZACHMANN, M.; TASSINRI, S. & PRADER, A., Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency: a study of 25 patientes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 56: 222-229 (1983).
- ZACHMANN, M. & PRADER, A., 17,20-desmolase deficiency. *Pediatr. Adolesc. Endocrinol.*, 13: 95-109 (1984).
- ZADIK, Z.; KAHANA, L.; KAUFMAN, H.; BENDERLI, A. & HOCHBERG, Z., Salt loss in hypertensive form of congenital adrenal hyperplasia (11 β -hydroxylase deficiency). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 58: 384-387 (1984).
- ZUBER, M. X.; JOHN, M. E.; OKAMURA, T.; SIMPSON, E. R. & WATERMAN, M. R., Bovine a adrenocortical cytochrome P-45017: regulation of gene expression by ACTH and elucidation of primary sequence. *J. Biol. Chem.*, 261: 2475 (1986).

RESUMO

O defeito enzimático mais comum na síntese de esteróide é a deficiência da 21-hidroxilase da esteroidogênese da adrenal. A inibição da formação do cortisol faz com que o ACTH produzido na pituitária, estimule o córtex da adrenal à super produção de androgénos. Este estado hormonal afeta o desenvolvimento genético feminino indiretamente na diferenciação da genitália externa, em direção ao tipo masculino. Desde que o gene da enzima da 21-hidroxilase foi isolado (1984), deleção gênica, conversão gênica em larga escala, e microconversões foram determinadas como responsáveis pela doença. Neste trabalho, nós mostramos um estudo desse defeito genético em 23 famílias com um ou mais indivíduos afetados, tendo a forma clássica da Hiperplasia Congênita da Adrenal. O DNA de 30 pacientes foi analisado com três enzimas de restrição. As hibridizações com a sonda de cDNA da 21-hidroxilase e com o final 5' da sonda genômica de C4 revelaram deleção gênica em 9,5% (4/42) dos cromossomos afetados. A taxa de conversão gênica em larga escala foi de 19% (8/42), e um padrão de hibridização normal foi observado em 62% (26/42) dos alelos afetados. A densitometria das autoradiografias foi usada para determinar a taxa relativa de intensidade do gene da 21-hidroxilase (CYP21B) pelo do pseudogene (CYP21A). As diferenças no fenótipo, a baixa frequência de deleção gênica, e a alta frequência de conversão gênica comparada com outros estudos em diferentes populações, indicou que a deficiência da 21-hidroxilase na população Brasileira pode envolver diferentes mutações moleculares.

ABSTRACT

The most common enzymatic defect of steroid synthesis is deficiency of the adrenal steroid 21-hydroxylase. Inhibition of the formation of cortisol results in an increased pituitary release of ACTH which in turn drives the adrenal cortex to overproduce androgens. This hormonal setting affects the development of genetic females by misdirecting the differentiation of external genitalia towards the male type. Since the isolation of the gene encoding 21-hydroxylase enzyme in 1984, gene deletions, large gene conversions, and microconversions have been reported to be responsible for the disease. In this work, we report a study of this genetic defect in 23 families with one or more affected offspring diagnosed as having the classical form of congenital adrenal hyperplasia. The DNA from 30 patients was analyzed with three restriction enzymes. Hybridization with a 21-hydroxylase cDNA probe and the 5' end of a C4 genomic probe disclosed gene deletion in 9,5% (4/42) of the disease-related chromosomes. The rate of large gene conversion was 19% (8/42), and no abnormality in the hybridization pattern was observed in 62% (26/42) of the disease alleles. Densitometry of the autoradiographs was used to determine the ratio of the copy-number of the 21-hydroxylase gene (CYP21B) to the copy-number of its pseudogene (CYP21A). Differences in phenotype, the low frequency of gene deletion, and the high frequency of gene conversion compared with other studies in different populations indicated that 21-hydroxylase deficiency in the Brazilian population may involve different molecular mutations.

APÊNDICE

1. Meios de Cultura

Na preparação dos meios de cultura foram utilizados reagentes da DIFCO. Os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 20 minutos e, em seguida mantidos à temperatura ambiente para resfriamento. Tendo em vista o experimento a ser realizado, o meio foi acrescido do antimicrobiano necessário. No caso de crescimento em meio de cultura sólido, o meio adequado foi distribuído em placas de Petri esterilizadas e mantidas à temperatura ambiente até total gelificação.

1.1. Meio LB (Luria-Bertani)

Para 1 l:

Bactotripton	10g
Extrato de levedura	5g
NaCl	10g

O pH 7,5 final foi ajustado com NaOH 10N.

1.2. Meio LB sólido (Luria-Bertani ágar)

Ágar bacteriológico	15g
Meio LB pH7,5	100ml

O pH7,5 final foi ajustado com NaOH 10N.

1.3. Meio Hogness Modified Freezing Medium 10 x (HMFM)

K ₂ HPO ₄	6,3 g
NaCitrato	0,45 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,09 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,9 g
KH ₂ PO ₄	1,8 g
Glicerol	44,0 g
H ₂ O destilada para	100,0 ml

Mistura: 900 µl de cultura e 100 µl do meio HMFM 10x

2. Linhagem da bactéria utilizada:

2.1. Bactéria DH5 α : esta linhagem é defectiva em recombinação (*Rec A1*). A deleção de genes do operom *lac* ($\Delta lacU16a$) e a presença do fragmento *lacZAM15* no profago $\phi 80$ permite a utilização de α -complementação na seleção dos recombinantes. A ausência de superprodução do repressor do operon *lac* (*lacI^q*) possibilita a realização na ausência de IPTG.

Genótipo relevante: *F- supE44 $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 ($\phi 80 lacZAM15$) hsdR17 rec A1 end A1 gyrA96 thi-relA1.*

3. Tabela 1 - Relação completa das famílias estudadas com HCA e a interpretação dos rearranjos moleculares nos cromossomos.

Famílias N ^o	indivíduos estudados	tipo de HCA	interpretação dos haplótipos
25	Pai Mãe Filho afetado Filha normal	PS	mut/(duA)nor del/nor del/mut mut/nor
12	Pai Mãe Filha afetada Filha normal	PS	del/nor cv/nor del/cv nor/nor
28	Pai Mãe Filha afetada	PS	mut/nor cv(duA)/nor cv(duA)/mut
4	Pai Mãe Filha afetada Filho normal Filho normal	PS	cv/nor mut/nor cv/mut nd/nor nd/nor
17	Pai Mãe Filha afetada Filho normal	PS	mut/nor mut(delA)/(delA)nor mut(delA)/mut ?
14	Pai Mãe Filho afetado Filho normal	PS	*mut/(delA)nor *mut/cv(Ap/B) *mut/mut* *mut/cv(Ap/B)

continuação (Tabela 1)

29	Pai		mut/nor
	Mãe		mut/nor
	Filho afetado	PS	mut/mut
	Filha afetada	PS	mut/mut
	Filho normal		nd/nd
31	Pai		*mut/(delA)nor
	Mãe		*mut/nor
	Filha afetada	PS	*mut/mut*
	Pai		mut/nor
	Mãe		mut/nor
26	Filha afetada	PS	mut/mut
	Pai		mut/(duB)nor
	Mãe		mut/nor
8	Filho normal		nd/(duA)nor
	Filho afetado	PS	mut/mut
	Filha afetada	PS	mut/mut
	Pai		mut/nor
11	Mãe		mut/nor
	Filha afetada	PS	mut/mut
	Filha afetada	PS	mut/mut
	Filho afetado	PS	nd
	Pai		mut/(duA)nor
24	Mãe		mut/(duA)nor
	Filha afetada	PS	mut/mut
	Pai		*mut/nor
7	Mãe		*mut/(duA)nor
	Filha normal		nd/(duA)nor
	Filha afetada	PS	*mut/mut*
	Filho afetado	PS	*mut/mut*
43	Pai		cv(duA)/nor
	Mãe		mut(duB)/nor(duA)
	Filho afetado	PS	cv(duA)/mut(duB)
30	Pai		*del/nor
	Mãe		*del/nor
	Filha afetada	PS	*del/del*
22	Pai		mut(duA)/nor
	mãe		mut/nor
23	Filha afetada	PS	mut/mut(duA)
	Pai		del/nor
	Mãe		mut/nor
23	Filha afetada	VS	del/mut
	Filha normal		mut/nor

continuação (Tabela 1)

20	Pai		cv/mut
	Mãe		cv/mut
	Filha afetada	VS	cv/cv
	Filho afetado	VS	cv/cv
	Filho normal		cv/mut
19	Pai		mut/nor
	Mãe		cv/nor
	Filha afetada	VS	cv/mut
	Filho normal		nd/nor
13	Pai		mut(duA)/(delA)nor
	Mãe		cv/nor
	Filha afetada	VS	mut(duA)/cv
	Filho normal		nor/nor
27	Pai		mut/nor
	Mãe		mut/nor
	Filha afetada	VS	mut/mut
10	Pai		mut/nor
	Mãe		mut/(duA)nor
	Filha afetada	VS	mut/mut
	Filho afetado	VS	mut/mut
2	Pai		mut/nor*
	Mãe		mut/nor*
	Filho afetado	VS	mut/mut

ps= perdedor de sal, vs= virilizante simples; nd= não determinado; nor= haplótipo normal; del, deleção de CYP21B e C4B; cv, conversão gênica (CYP21B para CYP21A); mut, mutação desconhecida no CYP21B; delA, deleção de CYP21A e C4A e/ou C4B; duA, duplicação de CYP21A e C4B; duB, duplicação de CYP21B e C4B; cv(Ap/B)= conversão gênica (CYP21A para CYP21B).

* marca os haplótipos consangüíneos

OBS: A contagem dos haplótipos mostrada na Tabela 3 (página 75) foi feita levando em consideração somente os haplótipos normais e afetados dos pais.