

BC/30961
IB/80653



UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas - Unicamp
Instituto de Biologia
Departamento de Genética e Evolução

**ANÁLISE DE MICROCONVERSÕES NO COMPLEXO GÊNICO DA
ENZIMA 21-HIDROXILASE EM FAMÍLIAS AFETADAS POR
HIPERPLASIA CONGÊNITA DA ADRENAL**

LUCIANA CAMPOS PAULINO

Orientadora: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Luciana Campos Paulino
e aprovada pela Comissão Julgadora

25/02/97
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.

Campinas, 1997



UNICAMP	IB
N.º DE REGISTRO	P283a
V.º	
N.º DE REGISTRO	30961
N.º DE REGISTRO	281/97
C.º	D.º
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02/07/97
N.º CPD	4.00098894-2

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

Paulino, Luciana Campos

P283a Análise de microconversões no complexo gênico da enzima
21-hidroxilase em famílias afetadas por hiperplasia congênita
da adrenal/ Luciana Campos Paulino. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.
118f.: ilus.

Orientadora: Maricilda Palandi de Mello

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Hiperplasia. 2. Hormônios adrenocórticos. 3. Genética
humana. I. Mello, Maricilda Palandi de. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 26 de fevereiro de 1997

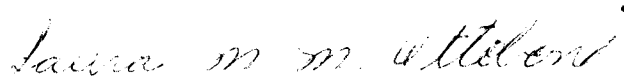
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello (orientadora)



Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni



Profa. Dra. Ana Elisa Correia Billerbeck



SUPLENTE

Profa. Dra. Christine Hackel

Quem alcança seu ideal, vai além dele.

F. Nietzsche

Ao Sergio

Que a cada momento de
minha vida me impulsiona
na busca pelos meus ideais,

dedico.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello, pela orientação, amizade e importante contribuição para a minha formação científica.

À Profa. Dra. Ana Elisa Correia Billerbeck, pela leitura minuciosa da tese e valiosas sugestões apresentadas e por fornecer os “primers” para análise da mutação $\Delta 8$.

À Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni, pela análise criteriosa, incentivo e entusiasmo na discussão do trabalho.

À Profa. Dra. Christine Hackel pela importante contribuição como membro da pré-banca examinadora e pelas sugestões pertinentes.

Às Profa. Dra. Vera Solferini, Laura Maria Mariscal Ottoboni e Denise Pontes Cavalcanti pela importante participação como membros da banca do exame de qualificação.

Ao Dr. Gil Guerra Jr. e à Dra. Sofia de Lemos Marini pela triagem dos pacientes analisados neste trabalho.

Aos companheiros do laboratório de Genética Humana e do CBMEG, pelo apoio, incentivo e amizade, compartilhando comigo as dificuldades e alegrias no decorrer deste trabalho.

À Marcela, Madá, Mara e Ivy pela realização dos experimentos de “Southern blotting”, que deram base a este trabalho, e a Madá, pelo preparo das soluções, cuidado com todo o material utilizado nos experimentos e apoio técnico em geral.

Às enfermeiras do ambulatório de Pediatria do HC-UNICAMP, pelo auxílio na coleta das amostras de sangue dos pacientes e seus familiares.

Às secretárias Tereza, Cláudia, Sandra e Tânia, pela atenção, eficiência e simpatia.

Aos meus amigos da Biologia, por tudo o que vivemos e aprendemos juntos nestes anos de convivência.

Ao Sergio, meu companheiro de todos os momentos, pelo seu amor, amizade e compreensão, e pelo importante auxílio nas figuras e esquemas da tese.

À minha família, pelo amor, estímulo e apoio em cada passo de minha vida.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu crescimento profissional.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

17-OHP - 17-hidroxiprogesterona
 $\Delta 4$ -A - $\Delta 4$ -androstenediona
ACTH - hormônio adrenocorticotrófico
BSA - soro albumina bovina
C4 - gene do quarto componente do sistema complemento
cAMP - adenosina monofosfato cíclica
cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar
cpm - contagens por minuto
CRH - hormônio liberador de corticotropina
CYP21 - gene da enzima 21-hidroxilase
DNA - ácido desoxirribonucleico
DHEA - desidroepiandrosterona
DMSO - dimetilsulfóxido
dNTP - conjunto de quatro desoxirribonucleotídeos
DOC - desoxicorticosterona
EDTA - desidroepiandrosterona
HCA - hiperplasia congênita da adrenal
HLA - antígenos leucocitários humanos
Kb - quilobase
mRNA - ácido ribonucleico mensageiro
NADPH - nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato reduzida
pb - pares de bases
PCR - reação em cadeia da polimerase
RFLP - polimorfismo de tamanho de sítios de restrição
RNA - ácido ribonucleico
rpm - rotações por minuto
SDS - dodecil sulfato de sódio
SSPE - tampão cloreto de sódio/fosfato de sódio/EDTA
TBE - tampão Tris/Borato/EDTA
TE - tampão Tris/EDTA

ABREVIATURAS UTILIZADAS

17-OHP - 17-hidroxiprogesterona
Δ4-A - Δ4-androstenediona
ACTH - hormônio adrenocorticotrófico
BSA - soro albumina bovina
C4 - gene do quarto componente do sistema complemento
cAMP - adenosina monofosfato cíclica
cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar
cpm - contagens por minuto
CRH - hormônio liberador de corticotropina
CYP21 - gene da enzima 21-hidroxilase
DNA - ácido desoxirribonucleico
DHEA - desidroepiandrosterona
DMSO - dimetilsulfóxido
dNTP - conjunto de quatro desoxirribonucleotídeos
DOC - desoxicorticosterona
EDTA - desidroepiandrosterona
HCA - hiperplasia congênita da adrenal
HLA - antígenos leucocitários humanos
Kb - quilobase
mRNA - ácido ribonucleico mensageiro
NADPH - nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato reduzida
pb - pares de bases
PCR - reação em cadeia da polimerase
RFLP - polimorfismo de tamanho de sítios de restrição
RNA - ácido ribonucleico
rpm - rotações por minuto
SDS - dodecil sulfato de sódio
SSPE - tampão cloreto de sódio/fosfato de sódio/EDTA
TBE - tampão Tris/Borato/EDTA
TE - tampão Tris/EDTA

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
1. Hiperplasia Congênita da Adrenal	2
1.1. Estrutura e função do córtex da adrenal	2
1.2. A esteroidogênese.....	2
2. Deficiência da enzima 21-hidroxilase	5
2.1. Características clínicas	5
2.2. Herança e incidência.....	6
2.3. Diagnóstico e tratamento	7
2.3.1. Importância do diagnóstico pré-natal	8
3. A enzima 21-hidroxilase	9
4. O complexo gênico da enzima 21-hidroxilase	9
4.1. Mapeamento e seqüenciamento.....	9
4.2. Complexidade do “cluster” gênico	12
4.3. Formação de rearranjos no complexo gênico	12
5. Mutações pontuais	15
5.1. Microconversões.....	15
5.2. Mutações ausentes em CYP21A.....	20
5.3. Polimorfismos neutros.....	21
6. Dificuldades na correlação entre genótipo e fenótipo	22
7. Métodos de análises moleculares	25
OBJETIVOS.....	28
MATERIAIS E MÉTODOS	30
1. Casuística	31
2. Obtenção das amostras	31
3. Extração de DNA genômico.....	31
4. Estratégias de amplificação por PCR.....	32
5. Condições de amplificação.....	36
5.1. Amplificação com os “primers” DP1 e DP2	36
5.1.1. Reação de amplificação	36
5.1.2. Ciclos de amplificação	37

5.2. Amplificação de CYP21A com os “primers” DP1 e P49.....	37
5.2.1. Reação de amplificação	38
5.2.2. Ciclos de amplificação	38
5.3. Amplificação com os “primers” DP3 e DP4	38
5.3.1. Reação de amplificação	39
5.3.2. Ciclos de amplificação	39
5.4. Amplificação de CYP21A com os “primers” P56 e P4.....	39
5.4.1. Reação de amplificação	40
5.4.2. Ciclos de amplificação	40
5.5. Análise da mutação $\Delta 8$ por PCR alelo-específico	40
5.5.1. Reação de PCR com “primers” G/CN e G/CM.....	41
5.5.2. Ciclos de amplificação	41
6. Eletroforese em gel de agarose.....	41
7. “Southern blotting”	42
8. Análise das mutações por hibridização alelo-específica	43
8.1. Sondas utilizadas	43
8.2. Pré-hibridização.....	44
8.3. Marcação das sondas	44
8.4. Purificação das sondas.....	45
8.5. Hibridização	45
8.6. Lavagens	45
8.7. Auto-radiografia	46
 RESULTADOS	 47
1. Famílias com microconversões nos dois alelos.....	50
2. Famílias com microconversões em heterozigose com deleções ou conversões gênicas.....	55
2.1. Famílias com padrões de hibridização incomuns	58
3. Famílias com mais de uma mutação no mesmo alelo	63
4. Análise da mutação $\Delta 8$	67
5. Tipos de alelos identificados	72
6. Alelos não determinados	72
7. Frequência das microconversões	74

DISCUSSÃO.....	76
1. Frequência das microconversões	78
2. Correlações entre genótipos e fenótipos	81
2.1. Extensão dos eventos de deleção e conversão gênica	84
3. Alelos com mais de uma mutação	89
4. Alelos não determinados	90
CONCLUSÕES.....	97
BIBLIOGRAFIA	99
RESUMO	116
ABSTRACT	118

INTRODUÇÃO

1. Hiperplasia Congênita da Adrenal

1.1. Estrutura e função do córtex da adrenal

As adrenais são duas glândulas situadas na porção superior dos rins, por isso também chamadas supra-renais. São divididas em duas camadas concêntricas: uma periférica, o córtex ou camada cortical e outra interna, a medula ou camada medular. O córtex da adrenal por sua vez é subdividido histologicamente em três zonas: glomerulosa (a mais externa), fasciculada e reticular (Dobbie *et al.*, 1968).

A partir do colesterol, são sintetizados no córtex da adrenal três grupos de hormônios: mineralocorticóides, glicocorticóides e esteróides sexuais, em especial os andrógenos. A aldosterona, o principal mineralocorticóide, é secretada pela zona glomerulosa e atua principalmente nos túbulos renais, estimulando a reabsorção de sódio. O cortisol é o glicocorticóide mais importante, sendo produzido nas zonas fasciculada e reticular. Age principalmente no catabolismo protéico, levando ao aumento de glicogênio e conseqüentemente da glicemia. Nas zonas fasciculada e reticular são produzidos também os esteróides androgênicos (Hornsby, 1987).

A produção do cortisol é estimulada através da liberação de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) pela hipófise anterior, que por sua vez é induzida pelo CRH (hormônio liberador de corticotropina), produzido pelo hipotálamo. Há um mecanismo de “feed-back” negativo entre a adrenal e o eixo hipotálamo-hipofisário, de forma que níveis altos de cortisol plasmático inibem a liberação de ACTH pela hipófise (figura 1A).

1.2. A esteroidogênese

O ACTH liga-se a receptores de membrana das células adrenocorticais, ativando a adenilato ciclase e aumentando os níveis intracelulares de cAMP. Assim, proteínas quinase dependentes de cAMP ativam a colesterol éster hidrolase, que mobiliza estoques de colesterol. O transporte do colesterol até as mitocôndrias é viabilizado por proteínas carreadoras de esteróides (Chanderbhan *et al.*, 1986). O cortisol é sintetizado através de cinco passos enzimáticos: clivagem do colesterol pela enzima 20,22 desmolase, desidrogenação pela 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase e sucessivas hidroxilações pelas enzimas 17 α -hidroxilase, 21-hidroxilase e 11 β -hidroxilase (figura 2).

Havendo algum bloqueio enzimático nesta via biossintética, ocorrerá diminuição dos níveis de cortisol plasmático, levando ao aumento da produção de ACTH pela hipófise, já que o

mecanismo de “feed-back” negativo estará reduzido (figura 1B). Deste processo resultará um superestímulo do córtex da adrenal, que sofrerá hiperplasia ou seja, aumento do número de células (New & Speiser, 1989).

Hiperplasia Congênita da Adrenal (HCA) (de Crecchio, 1865) é um termo genérico que designa patologias endócrinas resultantes da deficiência de uma ou mais enzimas que participam da síntese do cortisol, levando ao acúmulo de substratos no nível do bloqueio enzimático (Migeon & Donohoue, 1991).

Dentre as deficiências enzimáticas responsáveis pela HCA, a mais freqüente é a deficiência da 21-hidroxilase, sendo citada como responsável por 90 a 95% dos casos (White *et al.*, 1987; Miller & Levine, 1987; New *et al.*, 1989).

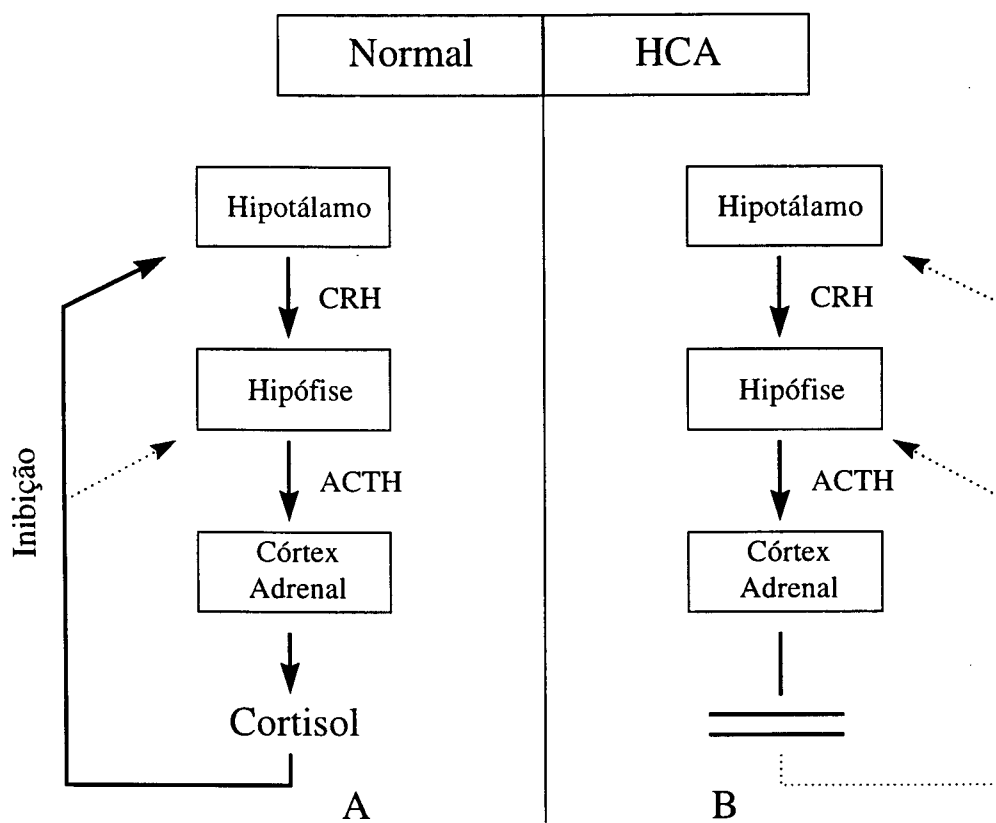


Figura 1: Regulação da produção de cortisol através do sistema de “feed-back” negativo sobre o eixo hipotálamo-hipofisário. A. Sob condições normais, o cortisol produzido no córtex da adrenal inibe a liberação dos hormônios CRH e ACTH. B. Em indivíduos afetados por HCA, não ocorre a inibição do eixo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

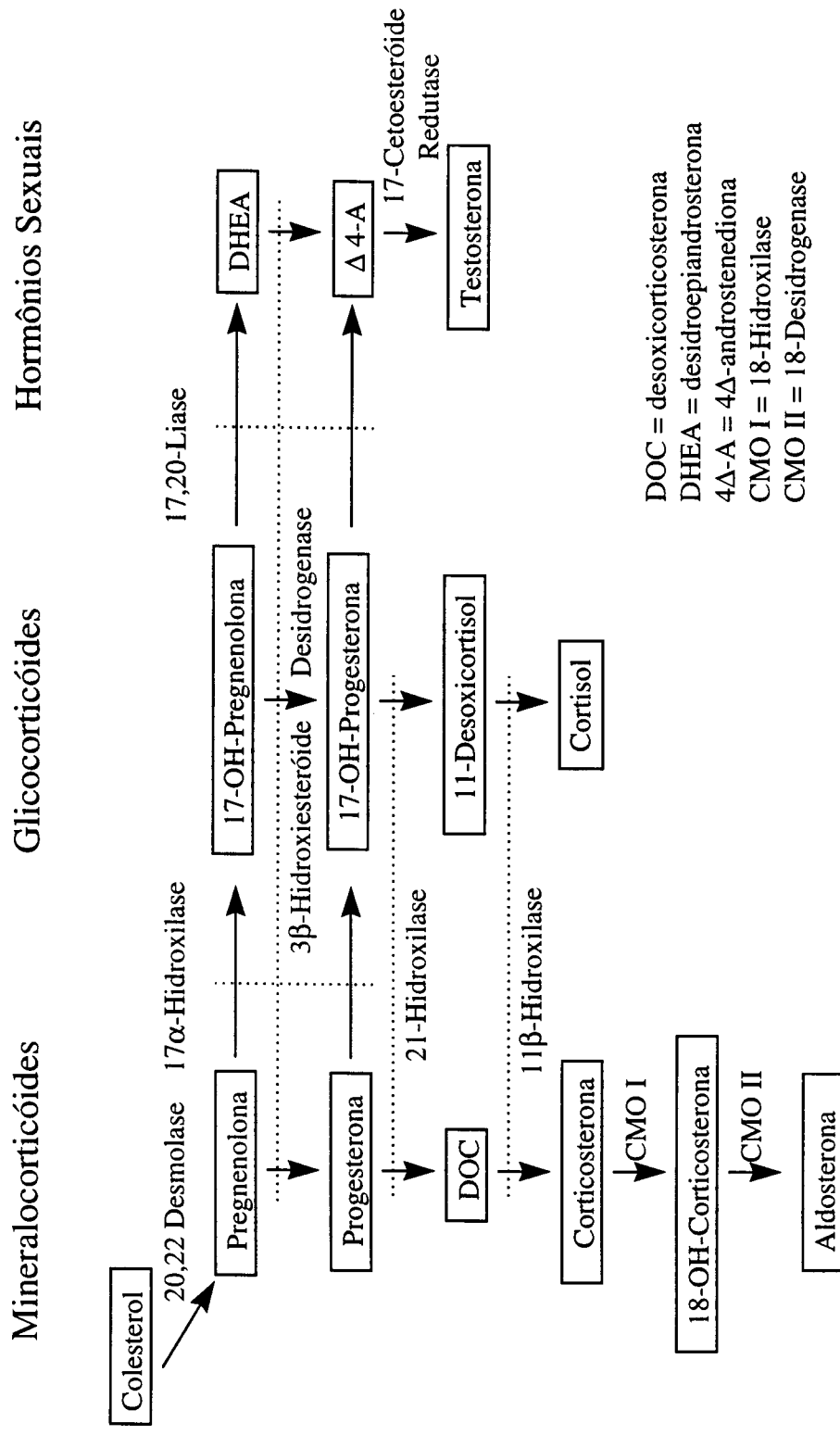


Figura 2: Vias metabólicas dos mineralocorticóides, glicocorticóides e hormônios sexuais produzidos no córtex da adrenal. Baseado em Calliari (1992).

2. Deficiência da enzima 21-hidroxilase

2.1. Características clínicas

A enzima 21-hidroxilase atua na via metabólica dos glicocorticóides convertendo 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) em 11-desoxicortisol e na via dos mineralocorticóides convertendo progesterona em desoxicorticosterona (DOC) (New *et al.*, 1989; Strachan, 1990) (figura 2).

Havendo deficiência da 21-hidroxilase, não será produzido 11-desoxicortisol a partir de 17-OHP, resultando em prejuízo para a síntese de cortisol. Consequentemente, os baixos níveis de cortisol plasmático atuarão como estímulo à secreção de ACTH pela hipófise, causando produção excessiva e acúmulo de precursores (Sydnor *et al.*, 1953). Assim, 17-hidroxipregnenolona é metabolizada pela enzima 17,20-liase em desidroepiandrosterona (DHEA) e esta em $\Delta 4$ -androstenediona ($\Delta 4$ -A). Sob ação da enzima 17-cetoesteróide redutase, $\Delta 4$ -A é convertida em testosterona.

A produção elevada de andrógenos é responsável pela ambigüidade genital em crianças de sexo feminino e virilização precoce no sexo masculino, observada em indivíduos afetados pela forma clássica de deficiência da 21-hidroxilase. No sexo feminino, a virilização da genitália externa ocorre ainda na vida intra-uterina e pode apresentar-se em diversos graus, dependendo da intensidade do bloqueio. É possível observar desde discreta clitoromegalia até a fusão completa das pregas labiais. O desenvolvimento dos ovários e genitália interna ocorre normalmente (New *et al.*, 1989).

Em ambos os sexos, o aumento na produção de andrógenos causa aceleração do crescimento somático, resultando em crianças com estaturas elevadas. Por outro lado, o fechamento precoce das epífises ósseas determina a baixa estatura na fase adulta (Migeon & Donohoue, 1991).

A deficiência da enzima 21-hidroxilase é normalmente dividida nas formas clássica e não clássica. A forma clássica, por sua vez, é subdividida nas formas perdedora de sal e virilizante simples (Miller & Morel, 1989; New *et al.*, 1989; Migeon & Donohoue, 1991; Miller, 1994).

A forma perdedora de sal corresponde a aproximadamente 70 % dos casos do tipo clássico (Strachan, 1990). Além dos sintomas de virilização e aceleração do crescimento, essa forma é agravada pela deficiência na produção de mineralocorticóides, o que acarreta dificuldade

de manutenção do balanço eletrolítico no organismo. Pode ocorrer então um quadro de desidratação, vômitos, acidose metabólica, choque hipovolêmico e óbito, caso não receba tratamento adequado.

A forma clínica clássica onde não ocorre perda de sal é denominada virilizante simples. Neste caso, a via metabólica de mineralocorticóides não é afetada, apenas a de glicocorticóides. Na verdade, o bloqueio enzimático acontece nas duas vias, mas dependendo da intensidade não resulta em prejuízo para a síntese de aldosterona (Fiet *et al.*, 1988). Em termos molares, a aldosterona normalmente é secretada em proporção aproximada de 1:1000 em relação ao cortisol. Assim, dependendo do tipo de mutação que afeta a enzima 21-hidroxilase, é possível que a zona glomerulosa ainda produza níveis suficientes de aldosterona quando estimulada, resultando em fenótipo sem perda de sal (Helmberg, 1993; Miller, 1994).

Na forma não clássica o bloqueio enzimático é menos intenso, manifestando sintomas geralmente em crianças maiores ou na puberdade. Pode ocorrer pilificação pubiana precoce, alterações menstruais, acne e hirsutismo. A forma não clássica apresenta uma grande variação fenotípica, podendo inclusive permanecer assintomática (forma críptica).

2.2. Herança e incidência

Em 1956, Childs *et al.* verificaram que a deficiência de 21-hidroxilase ocorria geralmente em irmãos e com frequências aproximadamente iguais nos dois sexos, sendo que os pais não eram afetados. Concluíram então que a deficiência tem herança autossômica recessiva, sendo os indivíduos afetados homozigotos para o gene alterado e seus pais portadores obrigatórios (Childs *et al.*, 1956).

Foram triados, através de dosagem de 17-OHP, pouco mais de 1 milhão de recém nascidos em seis países no período de 1978 a 1988, sendo identificadas 78 crianças afetadas pela forma clássica de deficiência de 21-hidroxilase. A incidência, calculada com base nesses dados é de aproximadamente 1 em 14.500 nascimentos, excluindo-se populações de esquimós Yupik do Alasca e da ilha de Rêunion, onde as incidências são muito elevadas provavelmente devido à endogamia (Pang *et al.*, 1988). De acordo com a equação de Hardy-Weinberg, a frequência de heterozigotos na população em geral seria de 1 em 61 indivíduos. Considerando-se apenas as populações brancas, calculou-se uma incidência de aproximadamente 1 em 13.500 nascimentos, com frequência de heterozigotos 1 em 59. (Pang *et al.*, 1988). A incidência da forma não clássica da deficiência de 21-hidroxilase é

bem mais elevada: foi calculado um valor médio de 1 em 100 nascimentos em populações brancas (Speiser *et al.*, 1985).

2.3. Diagnóstico e tratamento

Os principais sintomas clínicos da deficiência de 21-hidroxilase ao nascimento são a ambigüidade genital em meninas e quadros de perda de sal.

O diagnóstico laboratorial é feito principalmente através de dosagem hormonal, sendo que indivíduos com a forma clássica da deficiência de 21-hidroxilase apresentam aumento de 17-OHP sérica. Na forma perdedora de sal pode-se detectar hiponatremia, hipercalemia e baixos níveis de aldosterona no plasma e urina, além de atividade elevada de renina plasmática (Calliari, 1992).

Um procedimento importante para o diagnóstico é o teste de estímulo por ACTH intravenoso, no qual são dosados os níveis plasmáticos de pregnenolona, 17-OH-pregnenolona, DHEA, testosterona, 11-desoxicortisol, cortisol e principalmente 17-OHP. New *et al.* (1983) realizaram dosagens de 17-OHP basal e após estímulo por ACTH em pacientes das formas clássica e não clássica, indivíduos heterozigotos e população em geral, estabelecendo padrões característicos para cada grupo (New *et al.*, 1983). Esse teste permite também distinguir a deficiência de 21-hidroxilase de outras causas de HCA (Miller, 1994).

Pacientes com deficiência de 21-hidroxilase podem apresentar também elevação dos níveis de pregnanetriol na urina, o principal metabólito da 17-OHP (Butler & Marrian, 1937), além de 17-oxo(ceto)esteróides, produtos do metabolismo de DHEA, Δ^4 -A e testosterona (Mason & Kepler, 1945). Na forma não clássica, os níveis de 17-OHP são normais ou discretamente elevados, sendo o diagnóstico normalmente baseado no teste de estímulo por ACTH (Calliari, 1992).

Além dos exames laboratoriais, são úteis também a determinação do cariótipo de recém-nascidos para confirmação do sexo e ultra-sonografia pélvica para visualização dos órgãos genitais internos (Miller, 1994).

O tratamento é feito por substituição hormonal contínua a fim de suprir a falta de glicocorticóides e mineralocorticóides e impedir a produção excessiva de andrógenos. Administrando-se glicocorticóides, como por exemplo hidrocortisona, a secreção de ACTH pela hipófise é controlada, eliminando o estímulo excessivo sobre a adrenal. A forma

perdedora de sal requer também tratamento com mineralocorticóides, sendo utilizado normalmente 9 α - fluorohidroxycortisona (New *et al.*, 1989).

Havendo alterações na genitália externa, torna-se necessária intervenção cirúrgica, tentando minimizar problemas psicossociais que a doença poderá trazer ao indivíduo, além de possibilitá-lo uma vida sexual normal (Migeon & Donohoue, 1991; Calliari, 1992).

2.3.1. Importância do diagnóstico pré-natal

Muitos esforços têm sido concentrados para o desenvolvimento de métodos eficientes de diagnóstico e tratamento pré-natal (Speiser *et al.*, 1990, 1994; Rumsby & Honour, 1990; Owerbach *et al.*, 1992b; Forest *et al.*, 1993; Rumsby *et al.*, 1993). Com isso poderiam ser evitadas a ambigüidade genital nas meninas afetadas e a pseudopuberdade precoce nos meninos, assim como todos os conseqüentes distúrbios psicológicos e sociais (Migeon & Donohoue, 1991). O diagnóstico e tratamento pré-natal evitariam ainda os óbitos nos casos de forma perdedora de sal, que muitas vezes ocorrem antes mesmo do diagnóstico.

Normalmente, nos casos de risco de recorrência é administrada dexametasona à gestante após a confirmação da gravidez a fim de evitar os possíveis sintomas do excesso de andrógenos (Speiser *et al.*, 1990). A seguir, determina-se o sexo genético do feto através do cariótipo, realizando-se biópsia de vilosidades coriônicas (no primeiro trimestre de gravidez) ou amniocentese (no segundo trimestre). No caso de cariótipo 46,XY, a medicação é suspensa, já que não haverá risco de virilização anômala da genitália externa ao nascimento. Sendo o cariótipo 46,XX, a dexametasona é mantida até o final da gravidez ou até ser determinado que não é afetado (Calliari, 1992; Forest *et al.*, 1993).

O primeiro diagnóstico pré-natal de HCA foi realizado através da dosagem de 17-cetoesteróides e pregnanetriol no líquido amniótico (Jeffcoate *et al.*, 1965). A partir daí, este procedimento foi bastante utilizado no diagnóstico pré-natal, especialmente a dosagem de 17-OHP (Fraiser *et al.*, 1975; Nagamani *et al.*, 1978; Hughes & Laurence, 1979).

Além de dosagens hormonais no líquido amniótico, podem ser utilizados os métodos de tipagem de HLA a partir de cultura de células amnióticas (Coullin *et al.*, 1979; Pollack *et al.*, 1979) ou análises do gene responsável pela enzima 21-hidroxilase (Rumsby & Honour, 1990; Owerbach *et al.*, 1992b; Forest *et al.*, 1993; Speiser *et al.*, 1994).

3. A enzima 21-hidroxilase

Os citocromos P-450 compõem uma família de proteínas de membrana associadas ao grupamento heme, que metabolizam vários compostos lipofílicos (Nebert & Gonzalez, 1987). Dentre as cinco principais enzimas que participam da síntese do cortisol, quatro são citocromos P-450 (20,22-desmolase, 17 α -hidroxilase, 11 β -hidroxilase e 21-hidroxilase).

A enzima 21-hidroxilase foi purificada pela primeira vez a partir de córtex de adrenal bovina, sendo denominada P450c21. Em presença da NADPH-P450 redutase, P450c21 demonstrou, *in vitro*, atividade de 21-hidroxilação de 17-OHP e progesterona (Kominami *et al.*, 1980).

Seu peso molecular é de aproximadamente 52.000 daltons e na célula fica inserida na membrana do retículo endoplasmático (New & Crawford, 1994). Pode conter 494 ou 495 aminoácidos, devido a um polimorfismo de tamanho do exon 1 do gene que codifica para esta proteína: pode haver 4 ou 5 repetições das bases CTG a partir do codon 6 (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986; Rodrigues *et al.*, 1987).

4. O complexo gênico da enzima 21-hidroxilase

4.1. Mapeamento e seqüenciamento

O ponto de partida no mapeamento do complexo gênico da 21-hidroxilase foi a constatação da ligação genética com o sistema HLA (antígenos leucocitários humanos), através da tipagem dos haplótipos em seis famílias com pelo menos dois filhos afetados. Um dos pacientes apresentou um haplótipo recombinante, indicando que o gene determinante da deficiência de 21-hidroxilase estaria localizado próximo ao *locus* de HLA-B (Dupont *et al.*, 1977). Posteriormente, essa associação foi confirmada em um estudo com 34 famílias, incluindo 48 pacientes (Levine *et al.*, 1978). Dessa forma, foi estabelecido que o gene da 21-hidroxilase localiza-se no braço curto do cromossomo 6, na classe III do sistema HLA (figura 3A).

O clone que codifica a enzima 21-hidroxilase foi inicialmente isolado a partir de biblioteca de cDNA de adrenal bovina, determinando-se assim a base molecular da deficiência (White *et al.*, 1984a).

Posteriormente, verificou-se a existência de duas cópias gênicas de 21-hidroxilase, denominadas CYP21A e CYP21B (Nebert *et al.*, 1991), intercaladas aos genes que

codificam para o quarto componente do sistema complemento, C4A e C4B (White *et al.*, 1985; Carroll *et al.*, 1985a) (figura 3B). A ligação entre os genes CYP21 e C4 foi confirmada através de experimentos de hibridização de clones isolados de CYP21 com sondas correspondentes aos terminais 5' e 3' dos genes C4 (Higashi *et al.*, 1986).

White *et al.* (1984b) verificaram a ocorrência de deleções no gene que codifica para a enzima 21-hidroxilase. Até então, não era conhecida a atuação de cada uma das cópias gênicas. As observações iniciais de pacientes com deleções apenas em CYP21B levou a duas hipóteses: haveria regulação diferencial, sendo um deles expresso na zona glomerulosa e o outro na fasciculada ou CYP21A seria um pseudogene, sem expressão (White *et al.*, 1984b).

A verificação de deleções de CYP21A em indivíduos normais reforçou a hipótese de que seria um pseudogene (White *et al.*, 1985; Carroll *et al.*, 1985a). Posteriormente os dois genes foram seqüenciados, demonstrando que possuem aproximadamente 3,4 Kb e são compostos por 10 exons. As duas cópias gênicas apresentaram alta homologia entre si (98 % em exons e 96 % em introns), porém foram identificadas mutações deletérias em CYP21A, confirmando tratar-se de um pseudogene (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986).

A partir daí, tentou-se determinar se CYP21A é ou não transcrito. Nos primeiros experimentos não foram detectados transcritos de RNA correspondentes a CYP21A (Higashi *et al.*, 1986, 1988b; Al-Othman *et al.*, 1988). Por outro lado, é possível que o gene seja transcrito e o RNA rapidamente degradado, dificultando a sua detecção (Helmberg, 1993). De fato, identificou-se posteriormente transcritos de CYP21A, em quantidades muito menores em relação a CYP21B (Bristow *et al.*, 1993b; Chang & Chung, 1995).

A organização do complexo gênico sugere que durante a evolução tenha ocorrido duplicação em “tandem” dos genes ancestrais da 21-hidroxilase e C4 (Strachan, 1989, 1990; Gitelman *et al.*, 1992).

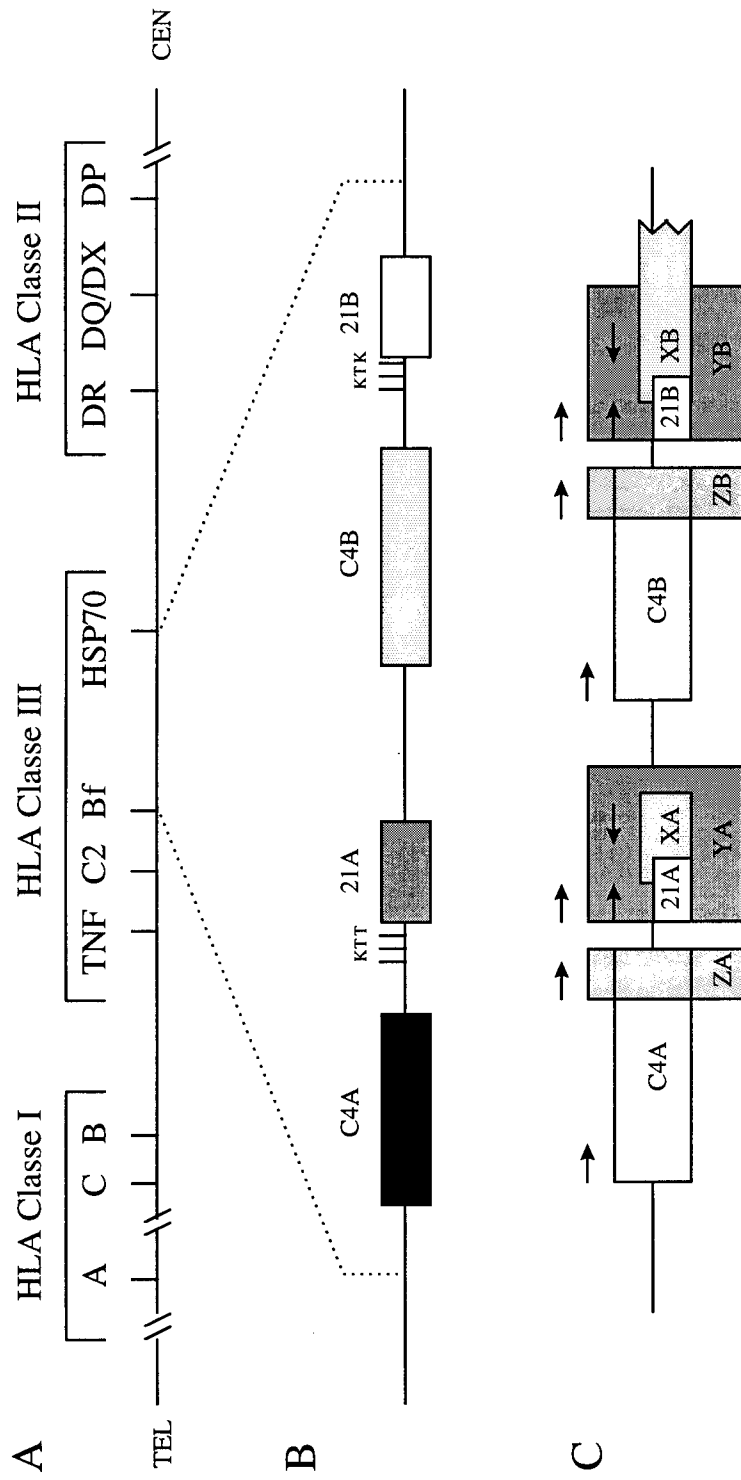


Figura 3: Mapa do braço curto do cromossomo 6, representando o sistema HLA e o complexo gênico da enzima 21-hidroxilase.

A. Genes principais do sistema HLA classes I, II e III. TEL = telômero, CEN = centrômero **B.** Organização dos genes C4 e CYP21. T = sítio de restrição *Taq* I, K = sítio de restrição *Kpn* I. Estão representados os sítios utilizados na distinção entre CYP21A e CYP21B. Baseado em Araujo *et al.* (1996). **C.** Representação dos genes X, Y e Z, mapeados no complexo gênico da 21-hidroxilase. As setas indicam o sentido de transcrição dos genes. Baseado em Tee *et al.* (1995).

4.2. Complexidade do “cluster” gênico

Além de CYP21 e C4, foram identificados dois genes duplicados, denominados XA e XB, em sobreposição a CYP21A e CYP21B, respectivamente (Morel *et al.*, 1989b) (figura 3C). Sua transcrição ocorre na direção oposta a CYP21 e C4. O cDNA produzido codifica a proteína tenascina-X, membro de uma família de proteínas que parecem mediar interações entre as células e a matriz extracelular (Chiquet-Ehrisman *et al.*, 1988; Rüegg *et al.*, 1989; Bristow *et al.*, 1993a).

Posteriormente, verificou-se mRNAs correspondentes aos genes YA e YB, transcritos na mesma orientação de CYP21 e oposta a X (Bristow *et al.*, 1993b) (figura 3C). A transcrição de YA utiliza o promotor de CYP21A. Apesar disso, foram observadas diferenças substanciais na abundância de transcritos dos dois genes, sugerindo a existência de mecanismos de regulação pós-transcrição (Bristow *et al.*, 1993b).

Um terceiro par de genes foi identificado por Tee *et al.* (1995), sendo denominados ZA e ZB (figura 3C). São transcritos na mesma direção dos genes CYP21, C4 e Y; utilizando como promotores seqüências contidas no intron 35 de C4.

A identificação desses genes, em sobreposição aos *loci* de CYP21 e C4, reafirma a complexidade deste “cluster”, formando uma estrutura até o momento única em eucariotos superiores (Bristow *et al.*, 1993b).

4.3. Formação de rearranjos no complexo gênico

A presença de cópias gênicas duplicadas e altamente homólogas entre si aumenta a probabilidade de emparelhamento e “crossing-over” desigual na meiose. Deste modo, podem ser formados gametas com organização dos genes CYP21/C4 alterada, incluindo deleções e duplicações das unidades gênicas (White *et al.*, 1985; Higashi *et al.*, 1986; Werkmeister *et al.*, 1986; Collier *et al.*, 1989; Sinnott *et al.*, 1990).

Deleções no gene CYP21B foram inicialmente observadas por White *et al.* (1984b) em pacientes afetados pela deficiência da 21-hidroxilase. Mais tarde, verificou-se a associação entre a deleção de CYP21B e o fenótipo perdedor de sal (Morel *et al.*, 1989a; Mornet *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992).

Por outro lado, estudos em populações de vários países mostraram que a maioria dos alelos dos indivíduos afetados não apresentavam deleções de CYP21B (Carroll *et al.*, 1985b;

Rumsby *et al.*, 1986; Harada *et al.*, 1987; Matteson *et al.*, 1987; Sinnott *et al.*, 1992; Wedell *et al.*, 1994c; Ezquieta *et al.*, 1995).

Foi proposto então que além de deleções, a deficiência de 21-hidroxilase poderia ser determinada também por eventos de conversão gênica (Donohoue *et al.*, 1986a), definida como a transferência de uma sequência de um gene para outro, sendo que o gene doador permanece inalterado e não há perda de material genético (Kourilsky, 1986).

Estudos posteriores confirmaram essa hipótese (Harada *et al.*, 1987; Higashi *et al.*, 1988a; Urabe *et al.*, 1990). Os eventos de conversão gênica têm extensões variáveis, podendo abranger desde pequenas porções (microconversão) até a totalidade do gene (conversão gênica em larga escala) (Higashi *et al.*, 1988a).

Há duas hipóteses principais para explicar o mecanismo da conversão gênica, aplicadas ao caso da 21-hidroxilase. Uma delas envolve a atuação de enzimas do sistema de reparo. Ocorrendo emparelhamento desigual entre as duas cópias gênicas durante a meiose, uma fita simples de um cromossomo invade o outro, e enzimas envolvidas nos sistemas de reparo reconheceriam as bases erradas e efetuariam a correção, tomando como molde uma das fitas (“mismatch repair”) (figura 4A). Caso o gene CYP21A atue como molde, haveria uma conversão gênica de CYP21B para CYP21A. A segunda explicação pressupõe a ocorrência de pelo menos dois “crossing-overs” desiguais entre os genes, formando-se primeiro um cromossomo com duplicação de CYP21A e posteriormente uma segunda recombinação eliminando CYP21B e formando um alelo com dois pseudogenes. As hipóteses não são exclusivas: é possível que mais de um mecanismo seja responsável pelos eventos de conversão gênica (Kourilsky, 1986; Strachan, 1990, 1994) (figura 4B).

Recentemente, Tusie-Luna & White (1995) investigaram as frequências de deleções e conversões gênicas *de novo* em amostras de sêmen e sangue de indivíduos normais. As conversões gênicas foram observadas na mesma frequência em gametas e células somáticas, sugerindo que eventos de conversão gênica podem ocorrer não só na meiose mas também na mitose, portanto sem a ocorrência de emparelhamento desigual. Em contrapartida, deleções ocorreram apenas em gametas, indicando que estes eventos ocorrem exclusivamente na meiose.

Podem ocorrer também conversões gênicas de CYP21A para CYP21B, tendo sido observados alelos CYP21A que não possuem as mutações características do pseudogene (Helmberg *et al.*, 1992b).

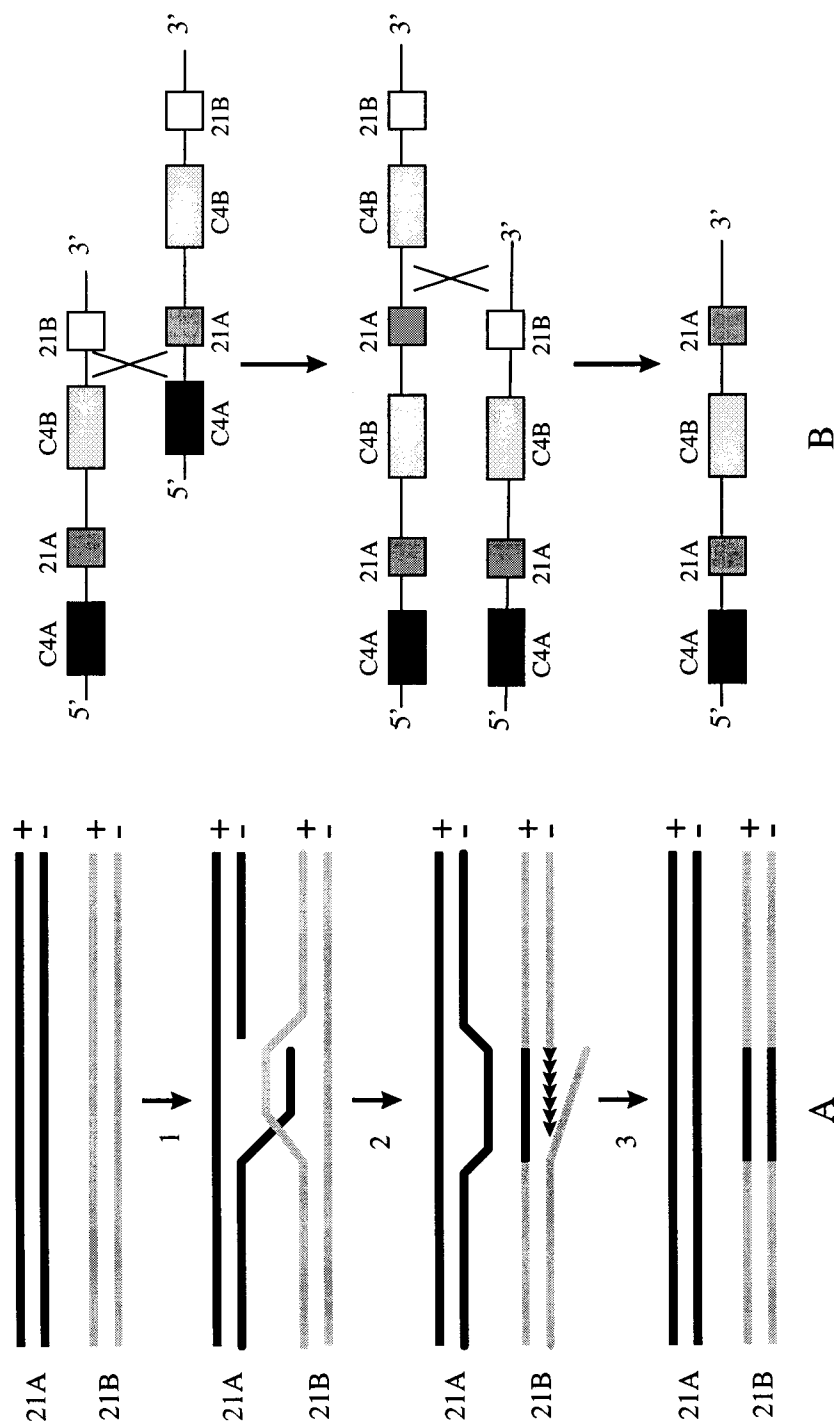


Figura 4: Dois possíveis mecanismos de conversão gênica. **A.** Mecanismo de conversão gênica por “mismatch repair”. Ocorre pareamento desigual na meiose entre os genes CYP21A e CYP21B (1). Uma das fitas de CYP21A sofre uma quebra e paraia com CYP21B, formando um “heteroduplex” (2). Enzimas envolvidas nos sistemas de reparo reconhecem o pareamento errado e efetuam a correção (3). Baseado em Strachan (1994). **B.** Mecanismo de conversão gênica por duplo “crossing-over”. Após o pareamento desigual na meiose, ocorrem dois eventos de “crossing-over” nas posições indicadas (X), gerando um alelo com duas cópias de CYP21A e nenhum CYP21B. Baseado em Strachan (1990).

Haplótipos com deleções ou duplicações de CYP21A não estão diretamente relacionados à deficiência de 21-hidroxilase, entretanto podem atuar como pré-mutações, aumentando a probabilidade de emparelhamentos desiguais (Sinnott *et al.*, 1990).

A alta probabilidade de formação de alelos com deleções ou conversões gênicas em consequência da homologia entre CYP21A e CYP21B e C4A e C4B pode ser determinante da grande incidência da deficiência de 21-hidroxilase (Higashi *et al.*, 1988a).

Em contrapartida, estudos populacionais demonstraram que a maioria dos alelos não apresenta deleções ou conversões gênicas em larga escala. A frequência destes eventos geralmente fica em torno de 25 a 30 % dos alelos (Jospe *et al.*, 1987; White *et al.*, 1988; Morel *et al.*, 1989a; Higashi *et al.*, 1991; Mornet *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992; Wedell *et al.*, 1994c; Wilson *et al.*, 1995a, 1995b).

5. Mutações pontuais

A deficiência de 21-hidroxilase pode também ser causada por mutações pontuais no gene CYP21B. Até o momento, as mutações mais frequentes associadas à doença são sequências normalmente encontradas no gene CYP21A, sugerindo que sua eventual presença no CYP21B poderia ter sido originada por um processo de conversão gênica em pequena escala (Amor *et al.*, 1988; Globerman *et al.*, 1988; Mornet *et al.*, 1991; Higashi *et al.*, 1988b). Recentemente, têm sido descritas também mutações aparentemente exclusivas de CYP21B, estando ausentes nos pseudogenes estudados (Owerbach *et al.*, 1992c; Wedell *et al.*, 1992; Wedell & Luthman, 1993a) (tabela 1).

5.1. Microconversões

As conversões gênicas em pequena escala, também denominadas microconversões, são geralmente citadas como as causas mais frequentes de deficiência de 21-hidroxilase (Higashi *et al.*, 1991; Mornet *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992; Wedell *et al.*, 1994c; Wilson *et al.*, 1995a, 1995b). Devido aos eventos de microconversão, mutações características de CYP21A podem ocorrer no CYP21B, determinando alterações funcionais na proteína.

As mutações podem ser transversões (substituição de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa), transições (troca de bases do mesmo tipo), inserções e deleções de bases, causando substituições de aminoácidos (mutações “missense”), modificações no quadro de leitura (mutações “frameshift”, geralmente inserções ou deleções de bases), criação de codons de terminação (mutações “nonsense”) ou ainda alterações em sítios de “splicing”.

Haplótipos com deleções ou duplicações de CYP21A não estão diretamente relacionados à deficiência de 21-hidroxilase, entretanto podem atuar como pré-mutações, aumentando a probabilidade de emparelhamentos desiguais (Sinnott *et al.*, 1990).

A alta probabilidade de formação de alelos com deleções ou conversões gênicas em consequência da homologia entre CYP21A e CYP21B e C4A e C4B pode ser determinante da grande incidência da deficiência de 21-hidroxilase (Higashi *et al.*, 1988a).

Em contrapartida, estudos populacionais demonstraram que a maioria dos alelos não apresenta deleções ou conversões gênicas em larga escala. A frequência destes eventos geralmente fica em torno de 25 a 30 % dos alelos (Jospe *et al.*, 1987; White *et al.*, 1988; Morel *et al.*, 1989a; Higashi *et al.*, 1991; Mornet *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992; Wedell *et al.*, 1994c; Wilson *et al.*, 1995a, 1995b).

5. Mutações pontuais

A deficiência de 21-hidroxilase pode também ser causada por mutações pontuais no gene CYP21B. Até o momento, as mutações mais frequentes associadas à doença são sequências normalmente encontradas no gene CYP21A, sugerindo que sua eventual presença no CYP21B poderia ter sido originada por um processo de conversão gênica em pequena escala (Amor *et al.*, 1988; Globerman *et al.*, 1988; Mornet *et al.*, 1991; Higashi *et al.*, 1988b). Recentemente, têm sido descritas também mutações aparentemente exclusivas de CYP21B, estando ausentes nos pseudogenes estudados (Owerbach *et al.*, 1992c; Wedell *et al.*, 1992; Wedell & Luthman, 1993a) (tabela 1).

5.1. Microconversões

As conversões gênicas em pequena escala, também denominadas microconversões, são geralmente citadas como as causas mais frequentes de deficiência de 21-hidroxilase (Higashi *et al.*, 1991; Mornet *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992; Wedell *et al.*, 1994c; Wilson *et al.*, 1995a, 1995b). Devido aos eventos de microconversão, mutações características de CYP21A podem ocorrer no CYP21B, determinando alterações funcionais na proteína.

As mutações podem ser transversões (substituição de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa), transições (troca de bases do mesmo tipo), inserções e deleções de bases, causando substituições de aminoácidos (mutações “missense”), modificações no quadro de leitura (mutações “frameshift”, geralmente inserções ou deleções de bases), criação de codons de terminação (mutações “nonsense”) ou ainda alterações em sítios de “splicing”.

Os diversos tipos de mutações possivelmente estão associados a diferentes graus de prejuízo à atividade da proteína e conseqüentemente à severidade do fenótipo. Tenta-se de uma forma geral relacionar a ocorrência das mutações em pacientes das diversas formas clínicas de HCA com a gravidade da alteração que provocam na proteína, determinando maior ou menor dano à atividade enzimática. Nesse sentido, têm sido realizados estudos onde é medida a atividade enzimática *in vitro* de proteínas mutantes, correlacionando-as com a frequência destas mutações em pacientes afetados pelas formas perdedora de sal, virilizante simples e não clássica (Chiou *et al.*, 1990; Tusie-Luna *et al.*, 1990; Wu & Chung, 1991; Higashi *et al.*, 1991).

Speiser *et al.* (1992) agruparam as mutações em três conjuntos, de acordo com o grau de comprometimento enzimático e as características fenotípicas a que estavam associadas. Assim, no grupo A foram incluídas mutações que determinam a perda total da atividade enzimática, no grupo B aquelas que resultam em comprometimento severo (2 % da atividade normal) e no grupo C aquelas responsáveis por alterações moderadas (10 a 20 % da atividade normal). Os três grupos de mutações estão em associação com as formas clínicas perdedora de sal, virilizante simples e não clássica, respectivamente; embora haja pacientes portadores de mutações não relacionadas ao seu fenótipo.

Em geral, mutações “frameshift” e “nonsense” estão associadas ao fenótipo mais grave, o perdedor de sal, pois são responsáveis por alterações drásticas na estrutura e na atividade da proteína. É este o caso da mutação Q318X*, uma substituição de base alterando o codon de glutamina e criando um codon de terminação no exon 8 (Globerman *et al.*, 1988). Experimentos de clonagem e transfecção de seqüências portadoras desta mutação em células Y1 de adrenal de camundongos mostraram decréscimo da produção de mRNA, quando comparada a seqüências normais (Globerman *et al.*, 1988).

Dois exemplos de mutações que alteram o quadro de leitura são $\Delta 8$ e F306+. Assim como Q318X, foram identificadas primeiramente em CYP21A, sendo consideradas como responsáveis pela ausência de atividade enzimática desta cópia gênica (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986). A primeira é caracterizada por uma deleção de 8 pares de bases envolvendo as posições 110 a 112 no exon 3, resultando em um codon de terminação na posição 130. Já F306+ é uma inserção da base timina no codon 306 no exon 7. Posteriormente à verificação dessas mutações em CYP21A, foram encontradas em alelos de

* A numeração dos codons adotada nesta revisão corresponde ao menor alelo encontrado, com 4 repetições CTG a partir do codon 6. Os símbolos que representam cada mutação não são necessariamente os mesmos adotados nos trabalhos citados.

CYP21B, sendo ambas relacionadas com a forma clínica perdedora de sal (Higashi *et al.*, 1988a; Mornet *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992).

Há ainda mutações “missense” normalmente correlacionadas ao fenótipo perdedor de sal. Uma delas, a mutação CL6, é composta por três substituições de aminoácidos no exon 6: Ile²³⁶→Asn; Val²³⁷→Glu e Met²³⁹→Lys (Higashi *et al.*, 1988b). Para analisar o efeito desta mutação, foram clonados o gene CYP21B de paciente portador de CL6 e seqüências de cDNA normal alterada por mutagênese sítio-dirigida, avaliando-se a expressão das proteínas mutantes através do sistema de células COS. Não foi detectada atividade enzimática em nenhum dos experimentos, demonstrando que a mutação CL6 leva à inativação da 21-hidroxilase (Higashi *et al.*, 1988b, 1991; Tusie-Luna *et al.*, 1990), o que seria esperado considerando-se que ocorre mais freqüentemente em pacientes perdedores de sal (Higashi *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992).

Outro exemplo de mutação “missense” normalmente associada à forma perdedora de sal é R356W, uma substituição de arginina por triptofano no exon 8 (Chiou *et al.*, 1990). A expressão de seqüências contendo esta mutação foi analisada em células COS, através de clonagem de DNA genômico de pacientes (Higashi *et al.*, 1991) ou mutagênese sítio-dirigida em cDNA normal (Chiou *et al.*, 1990). Os dois experimentos demonstraram que a mutação R356W resulta em prejuízo drástico para a atividade enzimática. Tem sido sugerido que R356W estaria situada dentro do domínio de ligação da enzima com os substratos (Picado-Leonard & Miller, 1988; Chiou *et al.*, 1990), o que poderia contribuir para a explicação dos resultados obtidos.

Ao contrário das mutações citadas até então, a mutação Sp2 não afeta um exon: ela consiste em uma substituição de base (A/C→G) no intron 2, 13 pb antes do exon 3, causando “splicing” anormal (Higashi *et al.*, 1988b). A mutação Sp2 figura em muitos estudos como a mais freqüente nos indivíduos afetados pela forma clássica da deficiência da enzima 21-hidroxilase, tendo sido observada preferencialmente na forma perdedora de sal, embora também ocorra na virilizante simples (Higashi *et al.*, 1988b; Owerbach *et al.*, 1990, 1992a; Mornet *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992; Tajima *et al.*, 1993b; Wedell *et al.*, 1994c; Ezquieta *et al.*, 1995; Schulze *et al.*, 1995).

Vários trabalhos analisaram o efeito de Sp2 sobre a atividade da enzima 21-hidroxilase. Em um deles, foram clonados CYP21B híbridos com seqüências normais e portadoras da mutação e analisada a expressão em células COS. Como resultado, não foi detectada nenhuma atividade enzimática (Higashi *et al.*, 1988b). Posteriormente, o mesmo experimento foi repetido, utilizando-se um maior tempo de incubação, no qual foi

verificada uma pequena atividade (Higashi *et al.*, 1991). Além da atividade enzimática, é possível avaliar a quantidade de proteína produzida. Através de imunoprecipitação de proteínas mutantes expressas em células COS, verificou-se que a mutação Sp2 não leva à produção de proteína detectável por antissoro de 21-hidroxilase, ao contrário de outras mutações testadas, entre elas CL6 e R356W (Higashi *et al.*, 1991). Através de estudos de mRNA verificou-se que a mutação Sp2 cria um sítio alternativo de “splicing”, localizado 7 pb antes da posição da mutação. O “splice” alterado leva à criação de um codon de terminação na posição Lys¹⁰², resultando em uma proteína truncada (Owerbach *et al.*, 1992a).

Com relação à forma virilizante simples, a mutação I172N parece ser a mais freqüente. É resultado de uma substituição G→T no exon 4 levando à troca de isoleucina por asparagina (Amor *et al.*, 1988). Esta mutação foi encontrada em aproximadamente 40 % dos alelos de pacientes afetados pela forma virilizante simples (Higashi *et al.*, 1991). Além deste, outros trabalhos obtiveram alta incidência de I172N na forma virilizante simples (Amor *et al.*, 1988; Mornet *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992). Análises de expressão de proteínas mutantes em células COS demonstraram que I172N inativa parcialmente a enzima, resultando em menos de 10 % da atividade da proteína selvagem (Chiou *et al.*, 1990; Tusie-Luna *et al.*, 1990; Higashi *et al.*, 1991), o que está de acordo com a correlação entre I172N e o fenótipo virilizante simples. Através de comparações com outras espécies, tem sido proposto que a região dos aminoácidos 167 a 178 seria responsável pelo ancoramento na membrana celular. A substituição de um aminoácido apolar (Ile) por um polar (Asn) alteraria as propriedades hidrofóbicas do domínio, levando à inativação parcial da enzima (Chiou *et al.*, 1990).

Algumas mutações determinam alterações menos graves à proteína, sendo geralmente responsáveis pelo fenótipo não clássico de HCA. Dentre elas, a mais comum é V281L, uma substituição de valina por leucina no exon 7 (Speiser *et al.*, 1988). A valina da posição 281 mostrou-se conservada em quatro espécies de mamíferos, o que é indicativo da importância funcional deste resíduo (Speiser *et al.*, 1988). Verificou-se que V281L está fortemente correlacionada à forma não clássica e ao haplótipo de HLA B14, DR1 (Speiser *et al.*, 1988; Mornet *et al.*, 1991). Análises de expressão de proteínas mutantes em células COS demonstraram que a mutação V281L leva a uma perda moderada da atividade da 21-hidroxilase, variando entre 20 e 50 % da atividade normal (Tusie-Luna *et al.*, 1990; Wu & Chung, 1991; Higashi *et al.*, 1991).

Tabela 1 : Mutações identificadas no gene CYP21B e associadas com a deficiência de 21-hidroxilase.

mutação ^(a)	localização	efeito	FC ^(b)	A ^(c)	referência
-4	4 pb antes do início de tradução	C→T	NC	?	Wedell <i>et al.</i> , 1992
W22X	exon 1	Trp→term	VS	?	Lajic & Wedell, 1996
P30L	exon 1	Pro→Leu	NC	sim	Tusie-Luna <i>et al.</i> , 1991
Sp1	intron 1	AG→GG “splice” anormal	PS	?	Lajic & Wedell, 1996
Sp2	intron 2	A/C→G “splice” anormal	PS	sim	Higashi <i>et al.</i> , 1988b
Δ8	exon 3	deleção 8 pb (“frameshift”)	PS	sim	Higashi <i>et al.</i> , 1986; White <i>et al.</i> , 1986
P105L	exon 3	Pro→Leu	NC	?	Wedell <i>et al.</i> , 1992
I172N	exon 4	Ile→Asn	VS	sim	Amor <i>et al.</i> , 1988
CL6	exon 6	Ile ²³⁶ →Asn; Val ²³⁷ →Glu; Met ²³⁹ →Lys	PS	sim	Higashi <i>et al.</i> , 1988b
V281L	exon 7	Val→Leu	NC	sim	Speiser <i>et al.</i> , 1988
G291S	exon 7	Gly→Ser	PS	não	Wedell <i>et al.</i> , 1992
F306+	exon 7	inserção T (“frameshift”)	PS	sim	Higashi <i>et al.</i> , 1986; White <i>et al.</i> , 1986
Sp7	intron 7	G→C “splice” anormal	PS	não	Wedell & Luthman, 1993a
Q318X	exon 8	Gln→term	PS	sim	Globerman <i>et al.</i> , 1988
R339H	exon 8	Arg→His	NC	não	Helmberg <i>et al.</i> , 1992a
R356W	exon 8	Arg→Trp	PS	sim	Chiou <i>et al.</i> , 1990
W405X	exon 9	Trp→term	PS	não	Wedell & Luthman, 1993a
P453S	exon 10	Pro→Ser	NC	não	Owerbach <i>et al.</i> , 1992c; Wedell <i>et al.</i> , 1992; Helmberg <i>et al.</i> , 1992a
R483P	exon 10	Arg→Pro	VS	1/26 ^(d)	Wedell & Luthman, 1993b
R483Δ	exon 10	GG→C (“frameshift”)	PS	3/26 ^(d)	Wedell <i>et al.</i> , 1992

(a) a nomenclatura utilizada não corresponde necessariamente àquela adotada nas referências citadas; (b) FC = forma clínica; PS = perdedor de sal; VS = virilizante simples; NC = não clássica; (c) presença da mutação em CYP21A. (d) número de alelos CYP21A onde a mutação foi identificada / número de alelos CYP21A estudados.

Além de V281L, foi descrita também P30L, uma substituição de prolina por leucina no exon 1, associada à forma não clássica (Tisue-Luna *et al.*, 1991). A atividade enzimática resultante de alelo contendo esta mutação varia de 20 a 60 % do normal, dependendo da metodologia e do substrato utilizado (Tisue-Luna *et al.*, 1991; Higashi *et al.*, 1991). Por comparação com outras enzimas, foi proposto que P30L afetaria a orientação da proteína em relação à membrana microsomal (Tisue-Luna *et al.*, 1991).

5.2. Mutações ausentes em CYP21A

Até então, as mutações relatadas ocorrem normalmente no CYP21A, surgindo em CYP21B possivelmente por eventos de microconversão. Por outro lado, têm sido observadas também mutações presentes apenas em CYP21B, não sendo então originárias de processos de conversão gênica (Owerbach *et al.*, 1992c; Wedell *et al.*, 1992; Wedell & Luthman, 1993a, 1993b). Entretanto, apesar dessas mutações estarem ausentes em todos ou na maioria dos pseudogenes estudados, é preciso considerar que há polimorfismos entre os alelos CYP21A, sendo possível que em alguns casos as mutações estejam presentes no pseudogene e ocorram em CYP21B por processos de microconversão (Strachan, 1994). De fato, as mutações R483Δ e R483P foram encontradas respectivamente em 1 e 3 alelos CYP21A, dentre 26 analisados (Wedell & Luthman, 1993b).

A mutação P453S está também associada à forma não clássica de HCA, tendo sido observada em 46,2 % dos pacientes com este fenótipo (Owerbach *et al.*, 1992c). A mutação consiste em uma substituição de prolina por serina no exon 10 de CYP21B, estando aparentemente ausente no pseudogene (Owerbach *et al.*, 1992c; Helmberg *et al.*, 1992a). Testes de atividade enzimática utilizando transfecção e expressão em células COS demonstraram que a mutação P453S determina atividade 66 % a 50 % do normal, dependendo do substrato utilizado (Helmberg *et al.*, 1992a).

P453S foi encontrada também por Wedell *et al.* (1992) em um alelo de um paciente afetado pela forma não clássica, juntamente com outras duas mutações: uma substituição (C→T), localizada 4 bases antes do início de tradução; e uma alteração de prolina para leucina (P105L). Essa mutação não foi encontrada em 26 alelos CYP21A investigados (Wedell & Luthman, 1993b), reafirmando os resultados obtidos por Owerbach *et al.* (1992c).

A substituição de arginina por histidina (R339H) no exon 8 é outra mutação observada em pacientes afetados pela forma não clássica da doença. Verificou-se que seu efeito na atividade enzimática da proteína é semelhante ao causado por P453S e, a exemplo desta, não foi observada nos alelos de CYP21A estudados (Helmberg *et al.*, 1992a).

Wedell *et al.* (1992) identificaram uma substituição de glicina por serina no exon 7 (G291S) e uma mutação “frameshift” devido à substituição GG→C (R483Δ) em pacientes com fenótipo perdedor de sal. A mutação G291S ocorreu em hemizigose e R483Δ em heterozigose com R356W. Os autores ressaltam que os aminoácidos glicina da posição 291 e arginina da posição 483 são conservados entre quatro espécies, o que provavelmente indica seu importante papel na atividade da enzima 21-hidroxilase. A presença dessas mutações foi investigada em 26 alelos CYP21A, sendo que G291S não foi encontrada e R483Δ ocorreu em 3 alelos (Wedell & Luthman, 1993b).

Na mesma posição 483 foi observada posteriormente uma transversão G→C, determinando uma alteração de arginina para prolina (R483P). A mutação ocorreu em heterozigose com I172N, em dois irmãos afetados pela forma virilizante simples. De 26 alelos CYP21A estudados, R483P foi verificado em apenas um alelo (Wedell & Luthman, 1993b).

Wedell & Luthman (1993a) descreveram em um paciente com a forma clínica perdedora de sal duas mutações: Sp7, uma substituição de base (G→C) que altera o sítio de “splicing” no intron 7 e W405X, uma mutação “nonsense” no exon 9, convertendo o codon de triptofano da posição 405 para um codon de terminação. Estas mutações parecem estar ausentes no CYP21A, não tendo sido observadas em 34 pseudogenes estudados (Wedell & Luthman, 1993a).

A mutação Sp1 consiste em uma substituição de base (AG→GG) no sítio acceptor de “splice” no intron 1, e foi observada em heterozigose com a mutação Sp2, em um paciente perdedor de sal. Foi verificada também a mutação W22X, que leva a criação de um codon de terminação, em heterozigose com I172N em um indivíduo com fenótipo virilizante simples. Considerando as alterações causadas na proteína, possivelmente ambas mutações resultem na perda total da atividade enzimática (Lajic & Wedell, 1996).

5.3. Polimorfismos neutros

Foi descrita uma substituição de serina por treonina na posição 268 no exon 7 (Rodrigues *et al.*, 1987), ausente em CYP21A, ocorrendo em desequilíbrio de ligação com Sp2 (Higashi *et al.*, 1988b; Owerbach *et al.*, 1990; Mornet *et al.*, 1991). Análises de pacientes por RFLP, utilizando polimorfismo do sítio de *Nco* I, concluíram que S268T não tem influência na determinação da doença (Donohoue *et al.*, 1990). Estudos de atividade enzimática reafirmaram este resultado, demonstrando que S268T não determina perda de função da enzima, sendo portanto um polimorfismo neutro (Chiou *et al.*, 1990; Wu & Chung, 1991).

A substituição de asparagina por serina na posição 493 no exon 10 (N493S) foi também encontrada em pacientes afetados pela deficiência de 21-hidroxilase (Harada *et al.*, 1987; Rodrigues *et al.*, 1987; Wedell & Luthman, 1993b). Entretanto, comparações com as seqüências de aminoácidos em outras espécies de mamíferos demonstraram que a posição 493 não é conservada, assim como a posição 268. Estas observações, aliadas à baixa frequência de N493S e a sua ocorrência em associação com mutações conhecidas são indícios de que se trata de um polimorfismo neutro (New & Crawford, 1994).

A presença de uma leucina extra (codon CTG) na posição 6 do exon 1 foi verificada na seqüência gênica de CYP21B descrita por Rodrigues *et al.* (1987), ao contrário das seqüências descritas anteriormente (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986). Comparações com outras espécies revelaram também uma leucina nessa mesma posição, indicando possivelmente um polimorfismo de tamanho na enzima 21-hidroxilase, entre 494 e 495 aminoácidos (Rodrigues *et al.*, 1987). De fato, posteriormente foi confirmado que a inserção de leucina não tem efeito sobre a atividade enzimática. Pode ser normalmente encontrada em CYP21A (New & Crawford, 1994).

Outra variação na seqüência descrita por Rodrigues *et al.* (1987) em relação a publicações anteriores (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986) está na posição 102 no exon 3, onde verificou-se uma alteração de lisina para arginina (K102R). Já na posição 426, foram identificados os aminoácidos arginina (White *et al.*, 1986; Rodrigues *et al.*, 1987) e prolina (Higashi *et al.*, 1986). Tais observações sugerem que tanto o gene CYP21B como a proteína codificada por ele podem ser polimórficos (Rodrigues *et al.*, 1987).

6. Dificuldades na correlação entre genótipo e fenótipo

As mutações em geral estão associadas a uma das formas clínicas de HCA. Esta correlação entretanto não é absoluta, sendo descritos vários casos de indivíduos que apresentam determinado fenótipo e são portadores de mutações normalmente não relacionadas a ele (Mornet *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992; Wedell *et al.*, 1994c; Wilson *et al.*, 1995b).

Deve-se levar em conta a expressão dos dois alelos, no caso de indivíduos heterozigotos compostos (Higashi *et al.*, 1991; Mornet *et al.*, 1991). Normalmente, considera-se que o fenótipo é determinado pelo alelo menos afetado ou seja, com a mutação menos prejudicial à atividade enzimática. Assim, a forma clínica perdedora de sal seria determinada pela combinação de duas mutações graves, a virilizante simples por uma grave e uma intermediária ou por duas intermediárias e a não clássica por duas mutações brandas ou

uma branda combinada com uma grave ou uma intermediária. Há entretanto vários pacientes que discordam deste padrão (New *et al.*, 1989; Mornet *et al.*, 1991; Miller, 1994).

Há casos descritos de irmãos com os mesmos haplótipos de HLA e fenótipos diversos, inclusive sendo um deles perdedor de sal e o outro virilizante simples ou mesmo apenas um deles afetado (Sinnott *et al.*, 1989, 1990; Bormann *et al.*, 1992; Collier *et al.*, 1993; Tajima *et al.*, 1993a).

Possíveis explicações para essas observações podem ser diferenças nas seqüências gênicas herdadas pelos irmãos explicadas por mutações *de novo*, ou alelos iguais mas com expressões alteradas por fatores externos ao *locus* da 21-hidroxilase, por exemplo regulação diferencial através de outras vias metabólicas (Sinnott *et al.*, 1989, 1990; Collier *et al.*, 1993).

A primeira situação foi evidenciada por alguns autores. Por exemplo, Collier *et al.* (1993) observou a ocorrência de uma conversão gênica *de novo* em uma família com dois irmãos que divergiam nos sintomas clínicos, embora apresentassem os mesmos haplótipos de HLA. A conversão gênica verificada em um dos irmãos ocorreu na meiose materna e envolveu 390 nucleotídeos, incluindo a mutação I172N, relacionada com a forma clínica virilizante simples (Amor *et al.*, 1988).

Outra evidência de mutação *de novo* foi encontrada em uma família com três irmãos com os mesmos haplótipos de HLA, sendo dois normais e um afetado pela forma clínica virilizante simples. Observou-se que todos os irmãos eram portadores da mutação I172N, sendo que o afetado apresentava também a mutação Sp2, que teria ocorrido na meiose materna (Tajima *et al.*, 1993a).

Um caso de deleção *de novo* foi descrito em família com dois filhos normais e um afetado. Todos herdaram o mesmo haplótipo de HLA paterno, sendo que o afetado aparentemente recebeu da mãe um haplótipo recombinante. Análises de 21-hidroxilase e C4 demonstraram que o filho afetado possui deleção de CYP21B e C4B, embora a mãe apresente apenas deleção de CYP21A e C4A. Os autores ressaltam que haplótipos como este podem atuar como pré-mutações, aumentando a probabilidade de emparelhamento desigual na meiose (Sinnott *et al.*, 1990).

Outro exemplo de deleção *de novo* foi verificado em tipagem de HLA para diagnóstico pré-natal, onde os antígenos paternos de HLA A, B, C, DR e DQ não foram encontrados no feto. Análises por RFLP confirmaram a ocorrência de uma deleção envolvendo os *loci* de

21-hidroxiase e HLA na gametogênese paterna (Hejtmancik *et al.*, 1992). Neste estudo, assim como nos exemplos anteriores, a hipótese de paternidade alternativa foi excluída após vários testes.

Em contrapartida, foi relatado um caso de irmãos afetados por formas clínicas diferentes e com os mesmos haplótipos de HLA, onde o sequenciamento não revelou diferenças entre os alelos. Os dois irmãos apresentam uma deleção total de CYP21B em heterozigose com um híbrido CYP21A/CYP21B, cujo ponto de quebra está entre os exons 1 e 3. (Bormann *et al.*, 1992).

Analisando-se pacientes com diagnóstico de deficiência da 21-hidroxiase forma perdedora de sal, foram observadas diferentes respostas à privação de sódio por indivíduos com mesmo genótipo. Além disso, uma paciente que apresentou crises de perda de sal ao nascimento interrompeu o tratamento aos 19 anos e apesar disto manteve níveis normais de aldosterona, mesmo sendo portadora de deleção de CYP21B em homozigose (Speiser *et al.*, 1991).

Schulze *et al.* (1995) observaram que entre familiares normais de pacientes, havia indivíduos homozigotos ou hemizigotos para a mutação Sp2. Todos eram assintomáticos para HCA, e testes de estimulação por ACTH em dois indivíduos resultaram em aumentos de 17-OHP comparáveis apenas a heterozigotos. Para tentar explicar estes achados, os autores propõem que alguns alelos portadores da mutação Sp2 podem produzir níveis altos de mRNA normal, contrariando os estudos de atividade enzimática *in vitro*. Os dados obtidos *in vitro* não estariam então refletindo as condições *in vivo*, onde há influência de fatores de transcrição e regulação por ACTH. Outra hipótese apresentada é a existência de uma segunda mutação desconhecida, que poderia reverter os efeitos da mutação Sp2.

Outro fator relevante para a correlação entre genótipo e fenótipo é uma possível atividade de 21-hidroxiase extra-adrenal (Mellon & Miller, 1989; Speiser *et al.*, 1991). Através de experimentos de hibridização de RNA de diversos tecidos humanos com sondas de 21-hidroxiase, foi demonstrado que esta enzima não é sintetizada em outros tecidos que não adrenal. Postulou-se então que uma suposta atividade de 21-hidroxiase extra-adrenal seja mediada por outras enzimas (Mellon & Miller, 1989).

Verificou-se que o citocromo hepático P450IIC5 é capaz de catalisar *in vitro* a conversão de progesterona para deoxicorticosterona (DOC) em taxas similares a 21-hidroxiase (Bumpus & Dus, 1982). Posteriormente, foi construída uma proteína quimérica a partir dos

citocromos P450H5 e P450H1, que apresentou também atividade de 21-hidroxilase (Kronbach *et al.*, 1991).

Em ratos, a DOC é produzida no fígado, através de 21-hidroxilação. Foi demonstrado que em cultura primária de hepatócitos de ratos a atividade de 21-hidroxilase é estimulada por estrógenos e inibida por andrógenos (Endoh *et al.*, 1995).

Outros fatores que podem dificultar a correlação entre genótipo e fenótipo são os problemas no diagnóstico, tais como condições ambientais que possam afetar as manifestações da doença, dificuldade no diagnóstico de meninos, variação de características clínicas no caso da forma não clássica e diferenças nos limites entre as formas clínicas (Wedell *et al.*, 1992).

7. Métodos de análises moleculares

Após o mapeamento e sequenciamento do complexo da 21-hidroxilase (White *et al.*, 1985, 1986; Carroll *et al.*, 1985a; Higashi *et al.*, 1986) foram construídos mapas de restrição, identificando-se enzimas que produziam fragmentos característicos de cada uma das cópias gênicas (White *et al.*, 1984b; Mornet *et al.*, 1986; Donohoue *et al.*, 1986b).

Sendo assim, as deleções e conversões gênicas em larga escala podem ser analisadas através de digestão com enzimas de restrição adequadas, como por exemplo *Taq* I, *Bgl* II, *Kpn* I e *Eco* RI, que permitem a distinção entre as unidades CYP21A + C4A e CYP21B + C4B pelos tamanhos dos fragmentos de restrição produzidos em “Southern blotting” e hibridização com sondas dos genes CYP21 e C4 (White *et al.*, 1988; Rumsby *et al.*, 1988; Mornet *et al.*, 1986; Donohoue *et al.*, 1986b) (figura 3B).

A eletroforese em campo pulsado pode ser também utilizada, em complemento à técnica de “Southern blotting”, para esclarecer rearranjos envolvendo determinadas alterações no número de cópias gênicas. Neste caso utilizam-se enzimas de restrição que reconhecem sítios raros, como por exemplo *Bss* HII, abrangendo-se todo o “cluster” gênico em um mesmo fragmento de restrição (Collier *et al.*, 1989; Dunhan *et al.*, 1989; Partanen *et al.*, 1989).

As mutações pontuais, entretanto, não podem ser detectadas por “Southern blotting” e hibridização com sondas de CYP21 e C4, fazendo-se necessário o emprego de outras estratégias para a análise. A hibridização alelo-específica diretamente no “Southern blotting” tem sido utilizada para investigar tanto as mutações preexistentes no pseudogene CYP21A e que foram introduzidas no gene ativo CYP21B, como as posições de início das

conversões gênicas (Higashi *et al.*, 1988a; Amor *et al.*, 1988; Globerman *et al.*, 1988). Posteriormente, a técnica de PCR foi aliada à hibridização alelo-específica para estudar as mutações no CYP21B (Owerbach *et al.*, 1990, 1992a; Mornet *et al.*, 1991; Collier *et al.*, 1992; Speiser *et al.*, 1992).

A análise de mutações é dificultada devido à presença das mutações deletérias também no CYP21A. Há necessidade de primeiramente se selecionar o gene CYP21B. Porém, a amplificação específica para o gene CYP21B é também difícil pelo alto grau de homologia entre o gene e o pseudogene. É necessário, portanto, o emprego de estratégias que permitam a amplificação específica de CYP21B para posterior análise das mutações.

Alguns métodos têm sido sugeridos para esta amplificação. Um deles foi descrito por Collier *et al.* (1992) no qual desenharam-se “primers” inespecíficos, isto é, “primers” que se anelam tanto no CYP21A e CYP21B, sendo o gene ativo selecionado através da digestão do DNA genômico com a enzima *Taq* I, antes da amplificação. Uma vez que somente o pseudogene apresenta um sítio para esta enzima dentro da região a ser amplificada, na reação de PCR o gene CYP21B é selecionado.

Já as estratégias utilizadas por Owerbach *et al.* (1990, 1992a); Mornet *et al.* (1991) e Speiser *et al.* (1992) lançam mão de diferenças nas seqüências nucleotídicas entre as duas cópias gênicas: os “primers” utilizados na amplificação contêm seqüências específicas do gene ativo, impossibilitando o anelamento no pseudogene. As seqüências escolhidas podem ser mutações potencialmente responsáveis pela doença, como a deleção de 8 pares de bases no exon 3 (Owerbach *et al.*, 1990, 1992a; Speiser *et al.*, 1992) ou as 3 substituições de bases no exon 6 (Owerbach *et al.*, 1990, 1992a). Nestes casos, não é possível averiguar a presença destas mutações, a não ser quando ocorrerem em homozigose ou hemizigose (associada com deleção ou conversão gênica em larga escala); pois aí não haverá amplificação. Ocorrendo em heterozigose, situação mais freqüente, o outro alelo será amplificado. Estas mutações devem então ser estudadas através de um método complementar. Por outro lado, as seqüências utilizadas por Mornet *et al.* (1991) não constituem potenciais mutações, amplificando-se o gene em um único fragmento onde as mutações podem ser analisadas diretamente.

Além dos métodos de amplificação específica de CYP21B e posterior análise das mutações através de hibridização alelo-específica, há também estratégias que utilizam amplificação inespecífica de CYP21A e CYP21B. No procedimento descrito por Partanen & Campbell (1991) a amplificação das duas cópias gênicas é seguida pela clonagem seletiva de CYP21B, através da digestão com a enzima de restrição *Asp*718 (isoesquizômero de *Kpn* I)

que produz fragmentos diferenciados para CYP21A e CYP21B. Outra possibilidade é a clonagem de todos os fragmentos obtidos e posterior triagem utilizando-se oligonucleotídeos específicos para as mutações (Helmberg *et al.*, 1992b).

A técnica de PCR-SSCP (“single strand conformation polymorphism”) foi também empregada no diagnóstico das mutações (Tajima *et al.*, 1993a; 1993b). Amplificam-se por PCR pequenas regiões do gene onde se pretende averiguar a presença de mutações e submetem-se os produtos obtidos a eletroforese em gel desnaturante, na qual diferentes seqüências resultam em mobilidades alteradas. Em complemento, é feito seqüenciamento direto para a caracterização das alterações detectadas.

Wilson *et al.* (1995a) utilizaram o método de PCR alelo-específico. Este procedimento utiliza duas reações de PCR e três “primers” diferentes, sendo um deles comum às duas reações e específico para CYP21B. Os outros “primers” são alelo-específicos, sendo desenhados para anelarem exclusivamente na seqüência contendo a mutação ou na correspondente normal.

OBJETIVOS

- Pesquisar a presença de 8 mutações no gene da enzima 21-hidroxilase em 37 famílias com pelo menos um indivíduo afetado, provavelmente geradas por eventos de microconversão entre o gene ativo e o pseudogene.
- Determinar os genótipos dos indivíduos afetados e seus familiares, correlacionando-os com os fenótipos.
- Identificar nos pacientes os alelos responsáveis pela deficiência da enzima 21-hidroxilase e verificar sua ocorrência nas formas clínicas perdedora de sal e virilizante simples.
- Determinar as frequências das microconversões em nossa amostra, comparando-as com outros estudos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Casuística

Foram estudadas 37 famílias com pelo menos um indivíduo afetado, totalizando 68 alelos afetados pela forma clássica da deficiência de 21-hidroxilase, já que 4 famílias são constituídas por casamentos consangüíneos e 3 são aparentadas entre si. 26 famílias apresentam a forma clínica perdedora de sal e 11 a forma virilizante simples. Foram estudados ao todo 43 pacientes, sendo 30 do sexo feminino (22 perdedores de sal e 8 virilizantes simples) e 13 do sexo masculino (9 perdedores de sal e 4 virilizantes simples). Além dos indivíduos afetados, foram analisados também seus pais e irmãos normais.

2. Obtenção das amostras

Foram utilizadas amostras de DNA genômico extraídas a partir de sangue total dos pacientes e seus familiares. Para tanto, no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do HC-UNICAMP coletou-se de 5 a 20 ml de sangue periférico de cada indivíduo, em tubos de fundo cônico contendo 8 gotas de EDTA 10 % como anti-coagulante.

3. Extração de DNA genômico (Araujo *et al.*, 1996)

Acrescentou-se aproximadamente 30 ml de solução A nos tubos contendo sangue periférico (15 a 20 ml de sangue no caso de adultos e 5 a 10 ml no caso de crianças), mantendo-os em gelo por 30 min para possibilitar a lise das hemáceas. A seguir, centrifugou-se a 2.000 rpm por 10 min a 4 °C, em centrífuga Beckman GPR, rotor horizontal GH-3.7. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado ressuspensionado em 20 ml de solução A. Este procedimento foi repetido até o precipitado tornar-se rosado, geralmente 2 ou 3 vezes. Após as centrifugações, acrescentou-se ao precipitado 1 ml de solução B 1x concentrada, além de 250 µl de solução C, para digestão das proteínas. As amostras foram incubadas durante a noite, a 37°C.

Após o período de incubação, acrescentou-se 1,25 ml de TE 1x (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) e 3 ml de fenol (Applied Biosystems), saturado com tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0. A mistura foi cuidadosamente agitada manualmente por inversão durante 5 min e centrifugada a 2.500 rpm por 10 min, à temperatura ambiente. Recuperou-se a fase aquosa, e repetiu-se o procedimento 2 ou 3 vezes. Após a última extração com fenol, a fase aquosa recuperada foi tratada com clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1, v:v), centrifugando-se novamente nas condições anteriores.

À fase aquosa, adicionou-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M e em seguida 2,5 volumes de etanol absoluto. O DNA precipitado foi recuperado com auxílio de um bastão, sendo então lavado com uma ou duas gotas de etanol 70 % e ressuspendido em 200 µl a 500 µl de TE 1x, dependendo da quantidade de precipitado obtida.

A concentração de DNA foi calculada através de leitura de absorbância a 260 nm e 280 nm em espectrofotômetro.

Solução A (lise de hemáceas)

Tris-HCl pH 8,0 10 mM
MgCl₂..... 5 mM
Sacarose 0,32 M
Triton X-100 1 %

Solução B (2 x concentrada)

NaCl 20 mM
EDTA pH 8,0..... 20 mM
Tris-HCl pH 8,0 20 mM

Solução C (preparada no momento do uso)

Para preparo de 1 ml: 0,5 ml de solução B 1x concentrada, 0,5 ml SDS 10 % e 1,0 mg de proteinase K (Boehringer).

4. Estratégias de amplificação por PCR

Uma das maiores dificuldades no estudo das mutações do gene CYP21B é a presença das mesmas mutações no pseudogene CYP21A, já que provavelmente são resultados de processos de microconversão. Por outro lado, as duas cópias gênicas apresentam 98 % de homologia ao nível de exons (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986), o que dificulta o desenho de “primers” adequados para a amplificação específica do gene ativo. Foi necessário, portanto, em primeiro lugar definir uma estratégia que possibilitasse a amplificação específica de CYP21B, para posteriormente investigar a presença de mutações já conhecidas.

O método descrito por Speiser *et al.* (1992), que toma vantagem da presença de uma deleção de 8 nucleotídeos no exon 3 do pseudogene CYP21A, denominada $\Delta 8$, foi adotado no presente trabalho. O método baseia-se no desenho de um dos “primers” homólogo à sequência que no pseudogene é deletada, portanto só é possível o anelamento no gene CYP21B e, consequentemente, o pseudogene não é amplificado (figura 5).

Do mesmo modo, é possível a amplificação específica de CYP21A, utilizando-se como “primers” sequências da região contendo a deleção $\Delta 8$ (figura 5). Tal procedimento foi empregado para a obtenção de controles positivos para as mutações, uma vez que todas aqui estudadas estão normalmente presentes no pseudogene.

Utilizando-se esse método de amplificação específica de CYP21B, somente são amplificados os alelos com a sequência $\Delta 8$ normal isto é, sem a deleção. Já que alelos de CYP21B com a deleção $\Delta 8$ causam HCA, faz-se necessária a utilização de uma estratégia complementar que permita a verificação da presença da mutação $\Delta 8$ nos indivíduos afetados. A estratégia empregada para tanto foi descrita por Wilson *et al.* (1995a) e consiste em um PCR alelo-específico (figura 6), no qual são feitas duas reações de PCR: em uma delas o “primer” é complementar à sequência normal e na outra complementar à sequência mutante. O segundo “primer” do par é comum para as duas reações e consiste de uma sequência específica para o gene ativo. A análise é feita com base na amplificação ou não de fragmentos em cada uma das reações: se o indivíduo testado for homozigoto para a sequência normal, será obtido produto de PCR apenas com o “primer” normal. No caso de um indivíduo homozigoto para a mutação $\Delta 8$, haverá produto apenas com o “primer” mutante. Sendo o indivíduo heterozigoto, será visualizado produto de PCR com os “primers” normal e mutante.

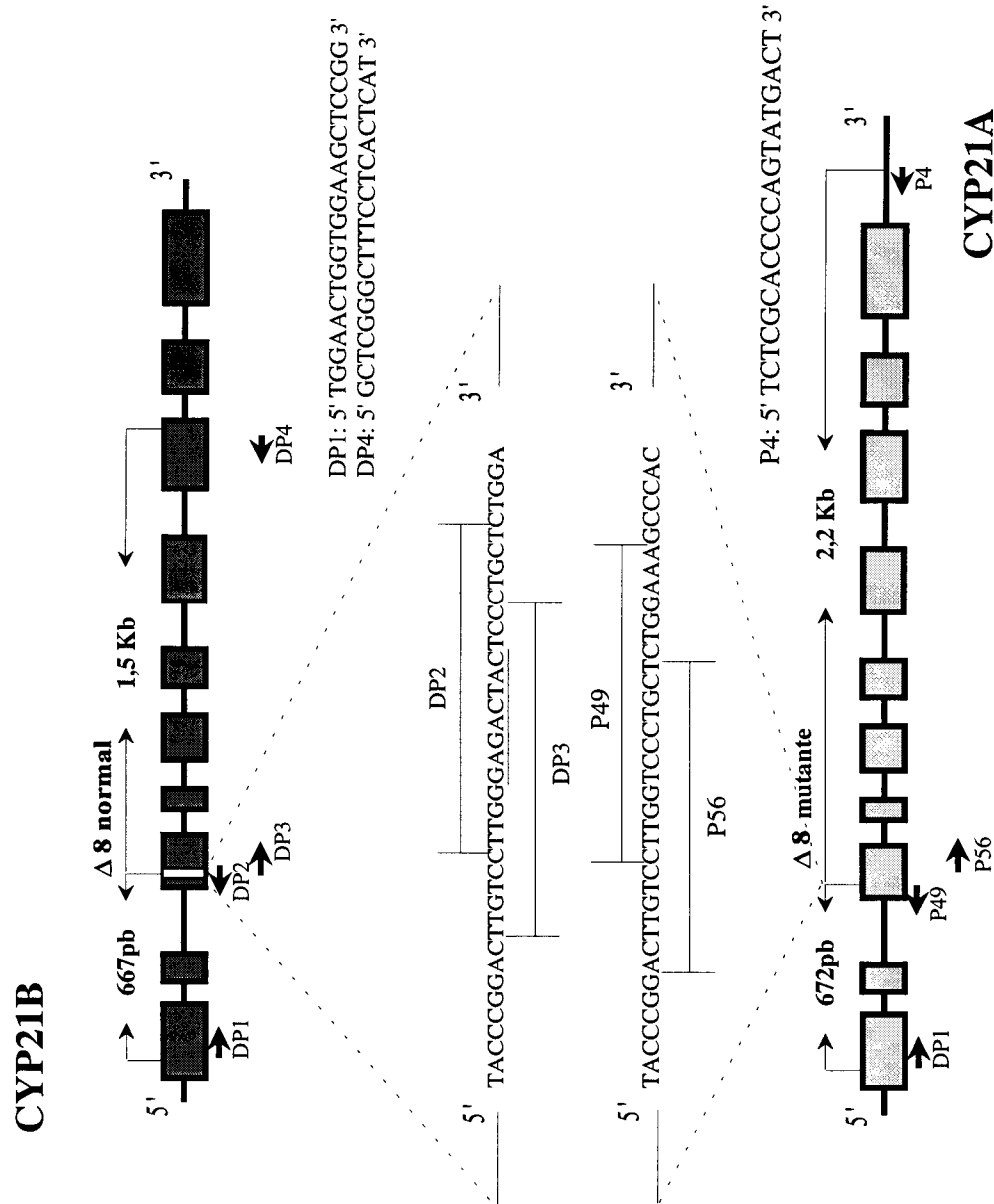


Figura 5: Estratégias de amplificação específica de CYP21B e CYP21A. Os produtos de PCR obtidos a partir de CYP21B são testados quanto à presença das mutações. CYP21A é utilizado como controle positivo para as mutações. Os retângulos representam os exons e as linhas, os introns. As setas indicam a posição de anelamento e a orientação dos “primers”. As bases sublinhadas correspondem à sequência Δ8 (retângulo branco), deleção de 8 pb normalmente presente no CYP21A. Os “primers” DP2 e DP3 são específicos para amplificação de CYP21B, P49 e P56 são específicos para CYP21A e DP1, DP4 e P4 são inespecíficos.

CYP21B

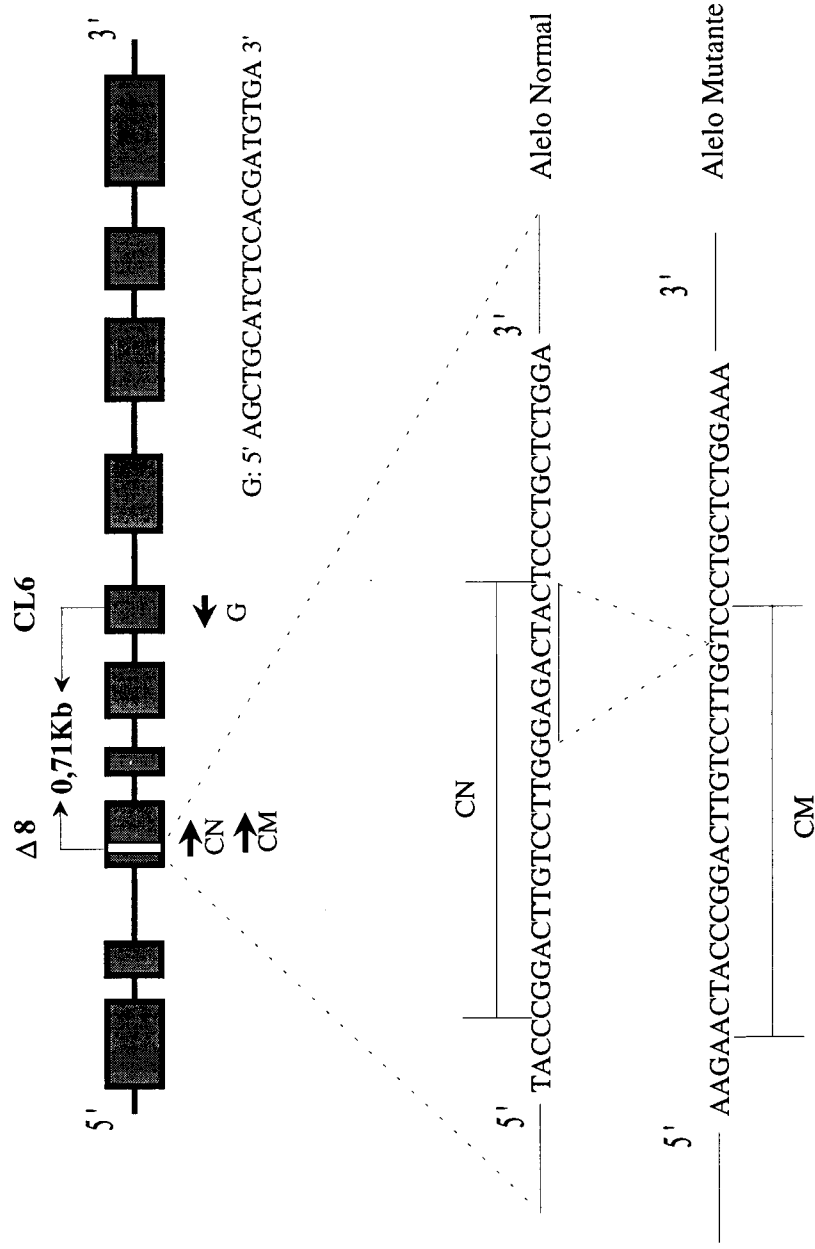


Figura 6: Estratégia de PCR alelo-específico para detecção da mutação $\Delta 8$ (bases sublinhadas). Os retângulos representam os exons de CYP21B e as linhas, os introns. A posição de $\Delta 8$ é representada pelo retângulo branco. As setas indicam a posição de anelamento e a orientação dos "primers". O par de "primers" CN/G amplifica os alelos normais quanto a $\Delta 8$ e o par CM/G os alelos que contém a deleção de 8 pb.

5. Condições de amplificação

Para a amplificação de todas as regiões de CYP21B a ser analisadas quanto à presença de mutações, foi necessário o emprego de dois pares de “primers”, uma vez que a sequência $\Delta 8$ localiza-se no exon 3. Assim, utilizou-se o par DP1/DP2 para amplificação de um fragmento envolvendo parte do exon 1 até o exon 3. O par DP3/DP4 foi empregado na amplificação de um fragmento entre os exons 3 e 8.

O mesmo procedimento foi utilizado na obtenção de produtos de amplificação do pseudogene. Nesse caso, os “primers” utilizados foram DP1/P49 e P56/P4.

Os “primers” são oligonucleotídeos sintéticos (NBI-National Biosciences Inc.; Gibco-BRL). A partir do material inicialmente leufiltrado, foram produzidas soluções estoques a 100 pmoles/ μ l em água (120 pmoles/ μ l no caso dos “primers” DP3 e DP4). Pequenos volumes dos estoques foram então diluídos 10 x e armazenados em alíquotas.

O método de PCR alelo-específico foi utilizado para a análise da mutação $\Delta 8$, amplificando-se um fragmento do exon 3 ao 6 através dos “primers” CN/G para os alelos normais e CM/G para os mutantes.

5.1. Amplificação com os “primers” DP1 e DP2 (Speiser *et al.*, 1992 - modificado)

Os produtos de PCR obtidos com os “primers” DP1 e DP2, que amplificam um fragmento de ~ 667 pb, foram utilizados para testar a mutação Sp2 (tabela 1).

5.1.1. Reação de amplificação

DNA genômico	0,5 μ g
tampão “Collier” (10x concentrado)	10 μ l
dNTP (0,5 mM de cada nucleotídeo)	5 μ l
DMSO	6 μ l
“primer” DP1 (10 pmoles/ μ l)	5 μ l
“primer” DP2 (10 pmoles/ μ l)	5 μ l
enzima Taq polimerase (Pharmacia) 5 U/ μ l	0,5 μ l
Volume final	100 μ l

A enzima Taq polimerase foi diluída em 10 µl de tampão 1x e adicionada à reação após a desnaturação inicial, durante o ciclo de 85 °C. Este procedimento favorece o anelamento dos “primers” nas regiões específicas.

Tampão “Collier” 10x concentrado (Collier *et al.*, 1992)

Tris-HCl pH 8,4	670 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	166 mM
MgCl ₂	67 mM
BSA	0,17 %

5.1.2. Ciclos de amplificação

94 °C5 min - 1 ciclo (desnaturação inicial)

85 °C5 min - 1 ciclo (adição da enzima)

93 °C1 min

65 °C2 min - 30 ciclos

72 °C3 min

93 °C1 min

65 °C2 min - 1 ciclo

72 °C10 min

5.2. Amplificação de CYP21A, com os “primers” DP1 e P49 (Speiser *et al.*, 1992; Wedell & Luthman, 1993b - modificados)

Os produtos de PCR obtidos a partir de CYP21A foram utilizados como controles positivos de hibridização, já que as mutações testadas estão normalmente presentes no pseudogene. Os “primers” DP1 e P49 produzem um fragmento de ~ 672 pb, análogo ao obtido a partir de CYP21B com os “primers” DP1 e DP2. A sequência de P49 contém a região complementar à mutação Δ8 de CYP21A e DP1 é inespecífico, podendo amplificar as duas cópias gênicas. Este fragmento foi utilizado como controle positivo na hibridização com a mutação Sp2.

5.2.1. Reação de amplificação

DNA genômico	0,5 µg
tampão Taq polimerase (10x concentrado).....	10 µl
dNTP (0,5 mM de cada nucleotídeo)	5 µl
“primer” DP1 (10 pmoles/µl)	5 µl
“primer” P49 (10 pmoles/µl)	5 µl
enzima Taq polimerase (Pharmacia) 5 U/ µl	0,5 µl
Volume final	100 µl

Tampão Taq polimerase 10x concentrado (Pharmacia)

Tris-HCl pH 9,0	100 mM
MgCl ₂	15 mM
KCl	500 mM
gelatina	1 mg/l

5.2.2. Ciclos de amplificação

96 °C3 min - 1 ciclo (desnaturação inicial)

96 °C1 min

56 °C 30 s - 30 ciclos

72 °C3 min

96 °C1 min

56 °C 30 s - 1 ciclo

72 °C 15 min

5.3. Amplificação com os “primers” DP3 e DP4 (Speiser *et al.*, 1992 - modificado)

Os produtos de PCR obtidos com os “primers” DP3 e DP4, que amplificam um fragmento de ~ 1,5 Kb, foram utilizados para testar as mutações I172N, CL6, V281L, F306+, Q318X e R356W (tabela 1).

5.3.1. Reação de amplificação

DNA genômico	1,0 µg
tampão Taq polimerase (10x concentrado)	10 µl
dNTP (0,5 mM de cada nucleotídeo)	5 µl
DMSO	6 µl
“primer” DP3 (12 pmoles/µl)	4 µl
“primer” DP4 (12 pmoles/µl)	4 µl
enzima Taq polimerase (Pharmacia) 5 U/ µl	0,5 µl
Volume final 100 µl	

5.3.2. Ciclos de amplificação

94 °C 5 min - 1 ciclo

93 °C 1 min

60 °C 2 min - 5 ciclos

72 °C 3 min

93 °C 1 min

55 °C 2 min - 25 ciclos

72 °C 3 min

93 °C 1 min

55 °C 2 min - 1 ciclo

72 °C 10 min

5.4. Amplificação de CYP21A, com os “primers” P56 e P4 (Wedell & Luthman, 1993b - modificado)

Os “primers” P56 e P4 produzem um fragmento de ~ 2,2 Kb a partir de CYP21A, utilizado como controle positivo na hibridização com as mutações I172N, CL6, V281L, F306+, Q318X e R356W. P56 é homólogo à região Δ8 de CYP21A e P4 é inespecífico.

5.4.1. Reação de amplificação

DNA genômico	1,0 µg
tampão Taq polimerase (10x concentrado).....	10 µl
dNTP (0,5 mM de cada nucleotídeo).....	5 µl
“primer” P56 (10 pmoles/µl)	5 µl
“primer” P4 (10 pmoles/µl)	5 µl
enzima Taq polimerase (Pharmacia) 5 U/ µl	0,5 µl
Volume final 100 µl	

5.4.2. Ciclos de amplificação

94 °C 5 min - 1 ciclo

93 °C 1 min

60 °C 2 min - 5 ciclos

72 °C 3 min

93 °C 1 min

55 °C 2 min - 25 ciclos

72 °C 3 min

93 °C 1 min

55 °C 2 min - 1 ciclo

72 °C 10 min

5.5. Análise da mutação $\Delta 8$ por PCR alelo-específico (Wilson *et al.*, 1995a - modificado)

Para a análise da mutação $\Delta 8$ foram utilizados os “primers” CN/G para amplificação dos alelos normais e CM/G, que amplificam os alelos mutantes. Os dois pares de “primers” produzem fragmentos de ~ 0,71 Kb.

5.5.1. Reação de PCR com “primers” G/CN e G/CM

DNA genômico	0,5 µg
tampão Taq polimerase (10x concentrado).....	5 µl
dNTP (0,5 mM de cada nucleotídeo).....	5 µl
“primer” CN ou CM (10 pmoles/µl)	1,5 µl
“primer” G (10 pmoles/µl)	1,5 µl
enzima Taq polimerase (Pharmacia) 5 U/ µl	0,2 µl
Volume final 50 µl	

5.5.2. Ciclos de amplificação

94 °C 5 min - 1 ciclo

91 °C 1 min

70 °C 1 min e 30 s - 5 ciclos

72 °C 10 min

94 °C 1 min

70 °C 1 min e 30 s - 30 ciclos

72 °C 4 min

94 °C 1 min

70 °C 1 min e 30 s - 1 ciclo

72 °C 10 min

6. Eletroforese em gel de agarose (Sambrook *et al.*, 1989)

Após as reações de amplificação, os fragmentos obtidos por PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8 % ou 1 %, preparado segundo Sambrook *et al.* (1989). Este procedimento objetivou verificar a eficiência da amplificação, possibilitar a transferência das amostras para membranas de nylon ou, no caso da mutação $\Delta 8$, visualizar a presença ou ausência do fragmento e conseqüentemente da própria mutação.

Foram aplicados no gel 10 µl da reação de PCR de cada uma das amostras (“primers” DP1/DP2 e DP3/DP4), juntamente com 2 µl de azul de bromofenol. No caso das reações de

PCR para análise da mutação $\Delta 8$ foram utilizados 5 μ l, com 1 μ l de azul de bromofenol. Foi utilizado o marcador de peso molecular 1 Kb ladder (Gibco-BRL).

Tampão utilizado na corrida eletroforética e preparação do gel: TBE 1x.

TBE 10x (solução estoque)

ácido bórico 55,0 g
 trizma-base 108 g
 EDTA 0,5 M pH 8,0 40 ml
 Volume final 1000 ml

Azul de bromofenol 6x

glicose 50 %
 azul de bromofenol 25 %
 TBE 10x pH 8,0 10 ml
 Estocar a 4 °C

Aplicou-se entre os pólos uma diferença de potencial de 60 a 80 V, por aproximadamente 30 min. O gel foi então corado em solução de brometo de etídio 0,5 μ g/ml por aproximadamente 15 min e o resultado visualizado em transluminador com luz ultra-violeta. A seguir, o gel foi fotografado com câmera Polaroid.

7. “Southern blotting” (Sambrook *et al.*, 1989)

Os fragmentos amplificados por PCR foram submetidos a eletroforese conforme descrito anteriormente (item 6). Para a hibridização alelo-específica, as amostras aplicadas nos géis foram transferidas utilizando o método de capilaridade com solução alcalina para desnaturação. Desta forma, a mesma alíquota usada para a verificação da eficiência da reação pode ser utilizada para a análise de mutações. Várias membranas foram produzidas a partir de uma única reação de PCR para se efetuar as várias hibridizações com os oligonucleotídeos normais e mutantes. O sistema de transferência para membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham) foi montado de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Antes da transferência, os géis foram mantidos por aproximadamente 10 min em solução desnaturante (NaOH 0,4 N; NaCl 1 N), o mesmo tampão utilizado na transferência.

Transcorridas aproximadamente 18 h de transferência, a membrana foi neutralizada em solução fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2; e fixada a 80 °C por 2 h.

8. Análise das mutações por hibridização alelo-específica

8.1. Sondas utilizadas (Speiser *et al.*, 1992)

As sondas são oligonucleotídeos sintéticos (NBI-National Biosciences Inc.; Gibco-BRL; Operon Technologies Inc.), correspondentes às seqüências mutadas e às equivalentes normais (tabela 2).

Tabela 2: Seqüências nucleotídicas das sondas utilizadas no trabalho.

Sondas ^(a)	Seqüências nucleotídicas ^(b)
Sp2 N	5' CAG(C/G)CCCCA(<u>A</u> /C)CTCCTCCTG 3'
Sp2 M	5' CAGGAGGAGCTGGGG(C/G)CTG 3'
I172 N	5' TGCAGCATCA <u>T</u> CTGTTACCTC 3'
I172 M	5' TGCAGCATCA <u>A</u> CTGTTACCTC 3'
CL6 N	5' GCTGCATCTCC <u>A</u> CGATGTG 3'
CL6 M	5' CACA <u>A</u> CGAGGAGA <u>A</u> GCAGC 3'
V281 N	5' GGAAGGGCACG <u>T</u> GCACATGGC 3'
V281 M	5' GGAAGGGCACT <u>T</u> GCACATGGC 3'
F306 N	5' CCGTGGTTTTTTTTGCTTCA 3'
F306 M	5' CCGTGGTTTTTTTT <u>T</u> GCTTC 3'
Q318 N	5' GAGCGACTGC <u>A</u> GGAGGAGCTA 3'
Q318 M	5' GAGCGACTGT <u>A</u> GGAGGAGCTA 3'
R356 N	5' CTGCGCCTGC <u>G</u> GCCCGTTGTG 3'
R356 M	5' CTGCGCCTGT <u>G</u> GCCCGTTGTG 3'

(a) N: sonda correspondente à seqüência normal; M: sonda correspondente à seqüência mutante. (b) As bases sublinhadas são as diferenças entre as seqüências normal e mutante. As bases entre parênteses são polimorfismos.

8.2. Pré-hibridização

As membranas obtidas por “Southern blotting” foram incubadas em solução de pré-hibridização (SSPE 1x; 0,1% de SDS; 0,05 % de leite desnatado desidratado) a 60°C, sob agitação, durante a noite.

tampão SSPE 20 x (solução estoque)

NaCl 3 M
 NaH₂PO₄ 0,2 M
 EDTA 20 mM
 pH 7,4

8.3. Marcação das sondas

Fez-se marcação terminal com a enzima T4 polinucleotídeo quinase, incorporando-se γ -[³²P]-ATP aos oligonucleotídeos utilizados como sonda.

Reação de marcação

oligonucleotídeo (10 pmoles/ μ l) 1 μ l
 tampão T4 quinase 10x 2 μ l
 γ -[³²P]-ATP (10 μ Ci/ μ l) (Amersham) 5 μ l
 T4 polinucleotídeo quinase 10 U/ μ l (Gibco-BRL) 2 μ l
 Volume final 20 μ l

A reação foi incubada a 37 °C por 1 hora. Para interromper a reação, manteve-se a 70 °C por 10 min. A seguir, acrescentou-se 80 μ l de TE 1x.

Tampão T4 quinase 10x (Gibco-BRL)

Tris-HCl pH 7,6 0,5 M
 MgCl₂..... 0,1 M
 DTT 50 mM
 espermidina 1 mM
 EDTA pH 8,0 1 mM

8.4. Purificação das sondas

Os oligonucleotídeos marcados com γ -[^{32}P]-ATP foram purificados através de colunas de Sephadex G-50 (Pharmacia), preparadas de acordo com o descrito em Sambrook *et al.* (1989), para eliminação dos nucleotídeos radioativos não incorporados.

Em seguida, retirou-se 1 μl da solução para a contagem do nível de incorporação radioativa em contador de cintilação líquida. Normalmente foram obtidos 10^7 cpm/pmol de sonda.

8.5. Hibridização

A solução de pré-hibridização foi eliminada, sendo substituída pela de hibridização (SSPE 1x; 0,1% de SDS; 0,05 % de leite desnatado desidratado; 100 μl de solução contendo a sonda marcada).

Como a sonda mutante deve reconhecer no DNA “alvo” a diferença de apenas um nucleotídeo e na maioria dos casos o indivíduo carrega também o alelo normal (mutação em heterozigose), foi adotada uma estratégia para se evitar a ocorrência de falsos positivos: na hibridização com a sonda do alelo normal foi adicionado o oligonucleotídeo mutante correspondente não marcado, num excesso de 25x em relação à sonda marcada. Na hibridização das seqüências mutantes foi feito o inverso. Os oligonucleotídeos frios competem com os marcados, que somente hibridizam nos locais com total homologia. Este procedimento mostrou-se necessário no caso das mutações Sp2, I172N, V281L, F306+, Q318X e R356W, nas quais a diferença entre o normal e o mutante é de apenas um nucleotídeo.

Incubou-se sob agitação a 60 °C, durante a noite.

8.6. Lavagens

Uma vez que a diferença ao nível de seqüências entre os oligonucleotídeos usados como sonda é grande, a estringência das lavagens para cada par correspondente aos alelos normal e mutante variou dependendo da seqüência nucleotídica de cada sonda. O ponto de partida para a determinação da temperatura de lavagem foi o valor de T_m da sonda (temperatura de “melting”, calculada através da fórmula $2x(A+T) + 4x(C+G)$). A partir daí, foram determinadas experimentalmente as condições de temperatura e concentração salina mais adequadas para cada caso, conforme tabela 3.

Tabela 3: Soluções salinas e temperaturas utilizadas nas lavagens das hibridizações com as sondas alelo-específicas.

Sondas ^(a)	Condições de lavagem
Sp2 N / Sp2 M	SSPE 1x, SDS 0,5 %; 65°C
I172 N / I172 M	SSPE 1x, SDS 0,5 %; 65°C
CL6 N / CL6 M	SSPE 2x, SDS 0,5 %; 60°C
V281 N / V281 M	SSPE 2x, SDS 0,5 %; 60°C
F306 N	SSPE 0,5x, SDS 0,5 %; 60°C
F306 M	SSPE 1x, SDS 0,5 %; 60°C
Q318 N	SSPE 2x, SDS 0,5 %; 55°C
Q318 M	SSPE 3x, SDS 0,5 %; 55°C
R356 N / R356 M	SSPE 0,5x, SDS 0,5 %; 65°C

(a) N: sonda correspondente à sequência normal; M: sonda correspondente à sequência mutante.

Os filtros foram lavados sob agitação, até diminuição da radioatividade (verificando-se com auxílio de contador Geiger).

8.7. Auto-radiografia

Os filtros lavados foram expostos a filmes de raio-X sensíveis à emissão do tipo β (Kodak X-Omat AR) em cassetes apropriados com intensificador de sinal (“Lightning Plus”, Dupont), a -70 °C por períodos de 6 h a 3 dias, dependendo da intensidade do sinal radioativo. Após a hibridização, os filtros foram reutilizados, tratando-os com solução para “stripping” de sondas.

Solução “stripping”

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA 1,0 mM

SDS 0,1 %

A solução é aquecida até a fervura, sendo então acrescentado SDS.

As membranas de nylon ficam imersas na solução até seu resfriamento.

RESULTADOS

No presente trabalho, foram analisadas quanto a mutações pontuais 37 famílias com pelo menos um indivíduo afetado, totalizando 68 alelos afetados pela forma clássica da deficiência de 21-hidroxilase, já que 4 famílias são constituídas por casamentos consanguíneos e 3 são aparentadas entre si. Vinte e seis famílias (70,3 %) apresentam a forma clínica perdedora de sal e 11 (29,7 %) a forma virilizante simples. Foram estudados ao todo 43 pacientes, sendo 30 do sexo feminino (22 perdedores de sal e 8 virilizantes simples) e 13 do sexo masculino (9 perdedores de sal e 4 virilizantes simples). Além dos indivíduos afetados, foram estudados também seus pais e irmãos normais.

Estudos baseados em “Southern blotting” e hibridização com sondas de cDNA correspondentes aos genes CYP21 e C4 mostraram que dentre os 68 alelos, 10 (14,7 %) são portadores de rearranjos relacionados com a deficiência de 21-hidroxilase, ou seja, possuem deleção ou conversão gênica em larga escala envolvendo os sítios de restrição *Taq* I e *Kpn* I; portanto, 58 alelos (85,3 %) afetados nessas famílias devem possuir mutações pontuais ou outras alterações não detectadas por “Southern blotting” como fatores determinantes para a doença (dados parciais em Araujo *et al.*, 1996).

As mutações testadas correspondem a seqüências normalmente presentes no pseudogene, ocorrendo no gene ativo provavelmente devido a processos de microconversões entre as duas seqüências gênicas.

Para averiguar a presença das microconversões nos pacientes e em seus familiares, o gene CYP21B foi amplificado por PCR em dois fragmentos, utilizando-se dois pares de “primers” (Speiser *et al.*, 1992). Os “primers” DP1 e DP2 geram um produto de PCR de ~ 667 pb, envolvendo parte do exon 1 até o exon 3, utilizado para testar a presença da mutação Sp2. Já o par de “primers” DP3/DP4 amplifica um fragmento de ~1,5 Kb entre os exons 3 e 8, com o qual foram testadas as mutações I172N, CL6, V281L, F306+, Q318X e R356W.

Uma vez que as mutações testadas estão normalmente presentes no CYP21A, adotou-se um procedimento semelhante para obtenção de controles positivos para as mutações. Neste caso, foram utilizados os “primers” DP1/P49 e P56/P4, amplificando-se o CYP21A de um indivíduo normal e gerando produtos de PCR de 672 pb e 2,2 Kb, análogos aos obtidos a partir de CYP21B. A figura 7 ilustra essas estratégias.

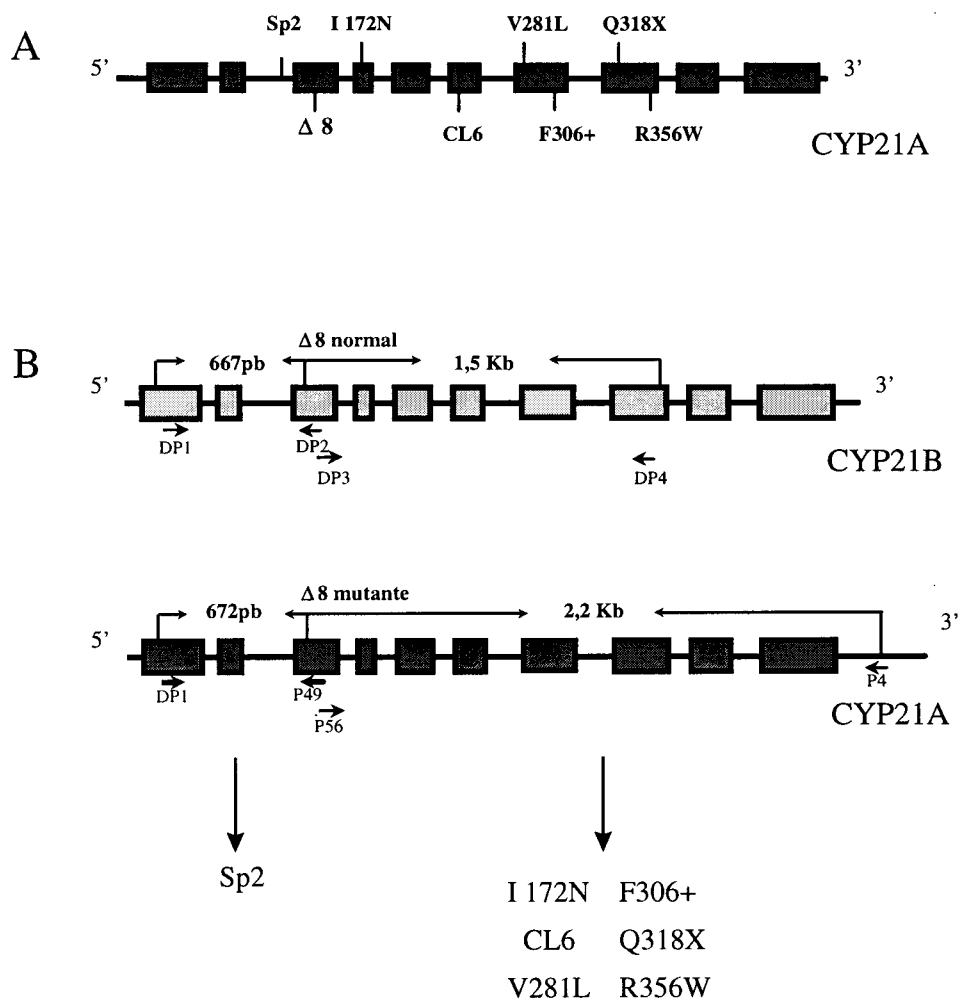


Figura 7: Estratégia para análise de mutações por PCR e hibridização alelo-específica. **A.** Gene CYP21A, mostrando a localização das mutações estudadas neste trabalho. **B.** Fragmentos gerados por PCR a partir dos genes CYP21A e CYP21B, e as mutações analisadas em cada um deles. Os retângulos representam os exons e as linhas, os introns. As setas pequenas indicam a posição de anelamento e a orientação dos “primers”. A mutação $\Delta 8$ foi estudada através da metodologia de PCR alelo-específico.

A presença das mutações nos indivíduos afetados e em seus familiares foi testada através de hibridizações alelo-específicas com sondas de oligonucleotídeos para cada mutação e para as regiões normais correspondentes, comparando-se os sinais de hibridização em cada dupla de sondas. Todos os membros das 37 famílias incluídas neste estudo foram analisadas com os 7 pares de sondas alelo-específicas. Para que não restassem dúvidas, as hibridizações foram realizadas no mínimo duas vezes para cada mutação, alternando-se as membranas utilizadas em cada experimento.

O método de PCR e hibridização alelo-específica utilizado não permite a análise da mutação $\Delta 8$, já que somente são amplificados os alelos normais para esta mutação. Sendo assim, o estudo de $\Delta 8$ exigiu uma metodologia complementar. Foi empregado então o método de PCR alelo-específico (Wilson *et al.*, 1995a), amplificando-se um fragmento do exon 3 ao 6 através dos “primers” CN/G, que amplificam os alelos normais quanto a $\Delta 8$ e CM/G que amplificam os alelos mutantes.

1. Famílias com microconversões nos dois alelos

Em 16 famílias, dentre as 37 estudadas, foram identificadas mutações originadas por processos de microconversão nos alelos provenientes dos dois progenitores. A tabela 4 mostra os genótipos obtidos para estas famílias, assim como as formas clínicas dos indivíduos afetados. A mutação $\Delta 8$ foi identificada em uma família mas, por ter sido estudada através de metodologia diferenciada, será abordada separadamente.

No caso da família 65, por exemplo, (figura 8) verificou-se a presença da mutação Sp2 no pai (figura 8A, amostra 3); e da mutação Q318X na mãe (figura 8B, amostra 4). Assim, o filho afetado é heterozigoto para cada uma dessas mutações, o que é demonstrado pela presença de sinais de hibridização tanto com as sondas normais como com as mutantes (figuras 8A e 8B, amostra 5). Os progenitores são heterozigotos para uma das mutações.

Na figura 9, vemos os resultados de hibridização de uma família com um indivíduo homozigoto para a mutação Sp2, onde se observa uma banda na hibridização com a sonda mutante e nenhum sinal positivo correspondente à sequência normal (amostra 5). Os dois progenitores são heterozigotos para a mutação (amostras 3 e 4). Dentre os casos de homozigose para mutações, 3 famílias são constituídas por casamentos consanguíneos (famílias 2, 7 e 14, tabela 4), tratando-se então de um único alelo herdado de um ancestral comum.

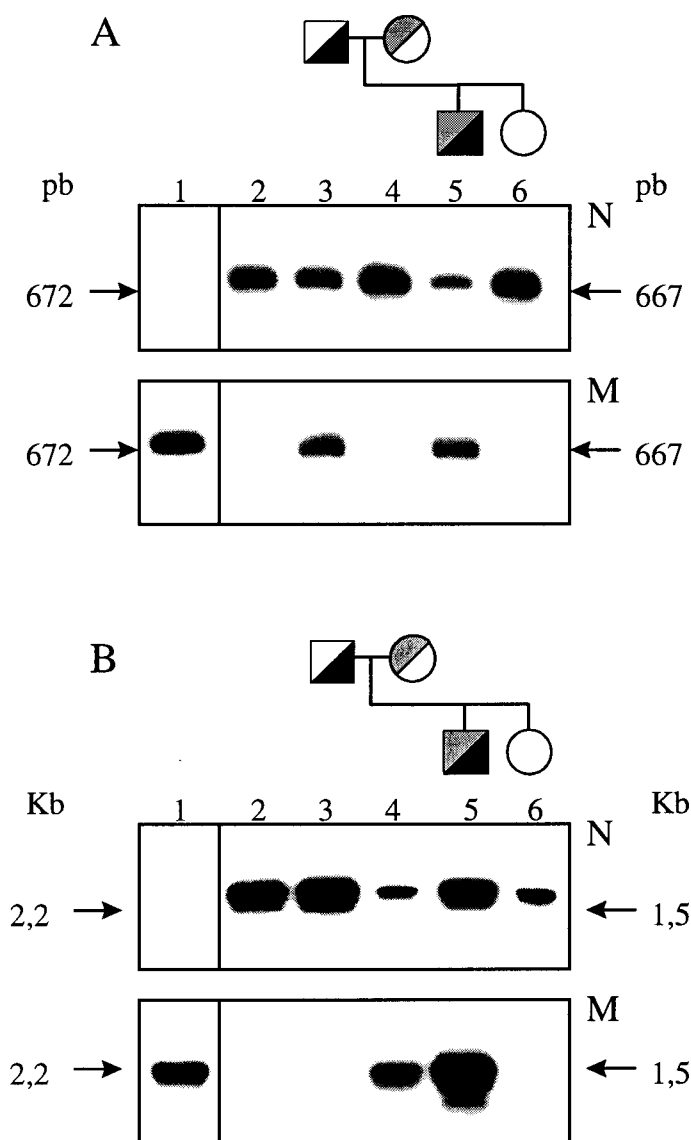


Figura 8: Heredograma e análises por hibridização alelo-específica da família 65. Imagem digitalizada das autorradiografias obtidas pela hibridização de fragmentos amplificados com os “primers” DP1/DP2 e DP3/DP4, com sondas correspondentes às mutações Sp2 (A) e Q318X (B), respectivamente. N = hibridização com sonda para alelos normais; M = hibridização com sonda para alelos mutantes. O heredograma representa dados obtidos através da análise de microconversões e “Southern blotting”. 1. controle mutante; 2. controle normal; 3. pai; 4. mãe; 5. filho afetado; 6. filha normal.

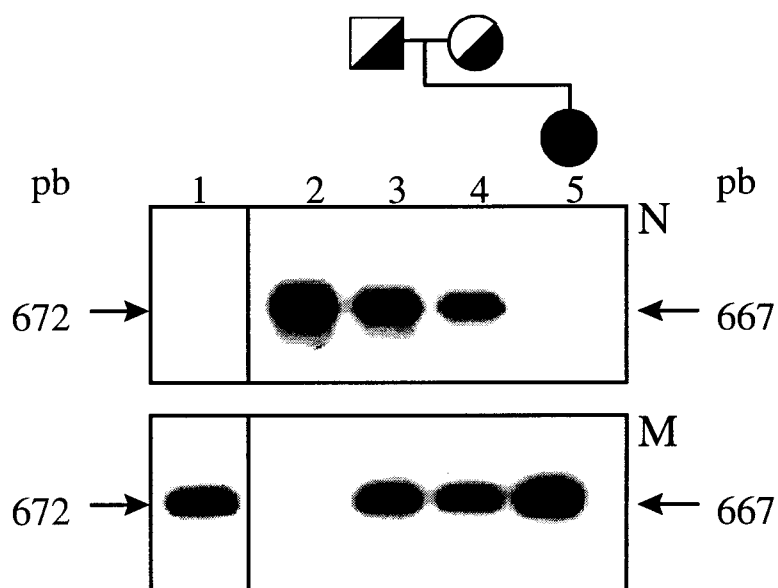


Figura 9: Heredograma e análises por hibridização alelo-específica da família 52. Imagem digitalizada das autorradiografias obtidas pela hibridização de fragmentos amplificados com os “primers” DP1/DP2, com sondas correspondentes à mutação Sp2. N = hibridização com sonda para alelos normais; M = hibridização com sonda para alelos mutantes. O heredograma representa dados obtidos através da análise de microconversões e “Southern blotting”. 1. controle mutante; 2. controle normal; 3. pai; 4. mãe; 5. filha afetada.

Tabela 4: Genótipos de 16 famílias onde foram identificadas microconversões nos dois alelos.

família	indiv ^(a)	genótipo ^(b)	forma clín de HCA ^(c)
2	P	normal / Sp2*	PS
	M	normal / Sp2*	
	F-A	Sp2* / Sp2* (por dedução)	
	M-N	normal / Sp2*	
7	P	normal / Q318X*	PS
	M	normal (dupl 21A+C4B) / Q318X*	
	F-N	normal (dupl 21A+C4B) / Q318X*	
	F-A	Q318X* / Q318X*	
	M-A	Q318X* / Q318X*	
14	P	normal(del.21A+C4B) / Q318X, R356W*	PS
	M	normal(cv 21A→21B) / Q318X, R356W*	
	M-N	normal(cv 21A→21B) / Q318X, R356W*	
	M-A	Q318X, R356W* / Q318X, R356W*	
	M-N	normal(cv 21A→21B) / Q318X, R356W*	
29	P	normal / I172N	PS
	M	normal / Q318X	
	M-A	I172N / Q318X	
	M-N	normal / Q318X	
	F-A	I172N / Q318X	
	M-N	normal / I172N	
42	P	normal / I172N	VS
	M	normal / R356W	
	F-A	I172N / R356W	
47	P	normal / Sp2	PS
	M	normal / Δ8	
	F-N	normal / Sp2	
	F-A	Sp2 / Δ8	
48	P	normal / I172N (por dedução)	VS
	M	normal / Q318X, R356W	
	F-N	normal / normal	
	F-A	I172N / Q318X, R356W	
51	P	normal (del 21A+C4B) / I172N	VS
	M	normal / F306+	
	F-N	normal / F306+	
	M-A	I172N / F306+	
	F-N	normal / F306+	
52	P	normal / Sp2	PS
	M	normal / Sp2	
	F-A	Sp2 / Sp2	

Continuação tabela 4

família	indiv ^(a)	genótipo ^(b)	forma clín de HCA ^(c)
53	P	normal / I172N	PS
	M	normal / V281L	
	M-N	normal / V281L	
	F-A	I172N / V281L	
54	P	normal / Sp2 (por dedução) ^(d)	PS
	M	normal / Q318X (por dedução)	
	F-N	normal / Sp2	
	F-A	Sp2 / Q318X	
	M-N	normal / Sp2	
55	P	normal (del 21A+C4B) / Sp2	VS
	M	normal (del 21A+C4B) / I172N	
	M-A	Sp2 / I172N (por dedução)	
	M-N	normal (del 21A+C4B) / Sp2	
62	P	normal (dupl 21A+C4B) / Sp2	PS
	M	normal / Sp2	
	F-A	Sp2 / Sp2	
63	P	normal / F306+	PS
	M	normal / F306+	
	F-A	F306+ / F306+	
64	P	normal / Sp2	PS
	M	normal / Sp2	
	F-A	Sp2 / Sp2	
65	P	normal (dupl 21A+C4B) / Sp2	PS
	M	normal / Q318X	
	M-A	Sp2 / Q318X	
	F-N	normal(dupl 21A+C4B) / normal	

(a) Abreviaturas utilizadas: P = pai; M = mãe; M-N = filho normal do sexo masculino; M-A = filho do sexo masculino afetado por HCA; F-N = filho normal do sexo feminino; F-A = filho do sexo feminino afetado por HCA. (b) Resultados obtidos pela análise de 8 mutações e por estudos de "Southern blotting" e hibridização com sondas de CYP21 e C4. Dupl = duplicação de uma unidade especificada entre parênteses; del = deleção de uma unidade especificada entre parênteses; cv = conversão gênica envolvendo os sítios *Taq* I e *Kpn* I; (*) = consangüinidade. (c) Formas clínicas: PS = perdedor de sal; VS = virilizante simples. (d) Este indivíduo não foi analisado quanto à mutação Sp2. Verificou-se que Q318X está ausente, por isso deduziu-se a presença de Sp2.

Os dois exemplos citados (figuras 8 e 9) ilustram os resultados obtidos nas hibridizações em todos os casos de famílias heterozigotas para duas microconversões diferentes ou homozigotas para uma única microconversão, reunidas na tabela 4.

Através do estudos de famílias foi possível verificar a segregação dos alelos afetados pelas microconversões. De maneira geral, observa-se que os alelos mutantes encontrados nas crianças afetadas são também detectados nos progenitores. Não foram portanto identificadas mutações *de novo*. Apenas nas famílias 48 e 54 não foi possível a análise dos alelos de um dos pais para confirmar a presença das mutações verificadas nos filhos. Nas famílias 2 e 55 não pudemos estudar diretamente os indivíduos afetados. Seus genótipos foram então deduzidos a partir do estudo dos progenitores (tabela 4).

2. Famílias com microconversões em heterozigose com deleções ou conversões gênicas

Estudos baseados em “Southern blotting” e hibridização com sondas de cDNA correspondentes aos genes CYP21 e C4 detectaram eventos de deleção ou conversão gênica em larga escala envolvendo os sítios de restrição *Taq* I e *Kpn* I em 12 famílias, dentre as 37 estudadas (Araujo, 1996).

A heterozigose para deleção foi encontrada nos indivíduos afetados das famílias 23, 25 e 56 e para conversão gênica nas famílias 4, 13, 19, 28, 43, 50, 59, 60 e 61 (tabela 5). Além das 37 famílias analisadas neste trabalho, foram estudadas previamente outras 4, nas quais foram encontrados dois alelos afetados por deleção (famílias 30 e 32), conversão gênica (famílias 20) ou ainda deleção e conversão gênica associadas (família 12) (Araujo, 1996). Estes casos não foram portanto estudados quando à presença de mutações pontuais.

Um resultado de hibridização semelhante ao da família 52 (figura 9) é apresentado na figura 10, porém sua interpretação é diferenciada. Neste caso, apesar de haver no filho afetado apenas a banda correspondente à mutação Sp2 e não à sequência normal (amostra 5), não se pode afirmar que seja homozigoto para a mutação. Dados anteriores, obtidos por “Southern blotting”, demonstraram que esta família é portadora de conversão gênica em larga escala. O alelo convertido não é amplificado por PCR, restando apenas um alelo a ser analisado. Estas observações são reafirmadas pelo fato de que a mutação é encontrada somente na mãe e não no pai (amostras 3 e 4). O pai, de acordo com os dados de “Southern blotting”, transmitiu a conversão gênica. A mutação neste caso não ocorreu em homozigose como na situação anterior, mas em hemizigose.

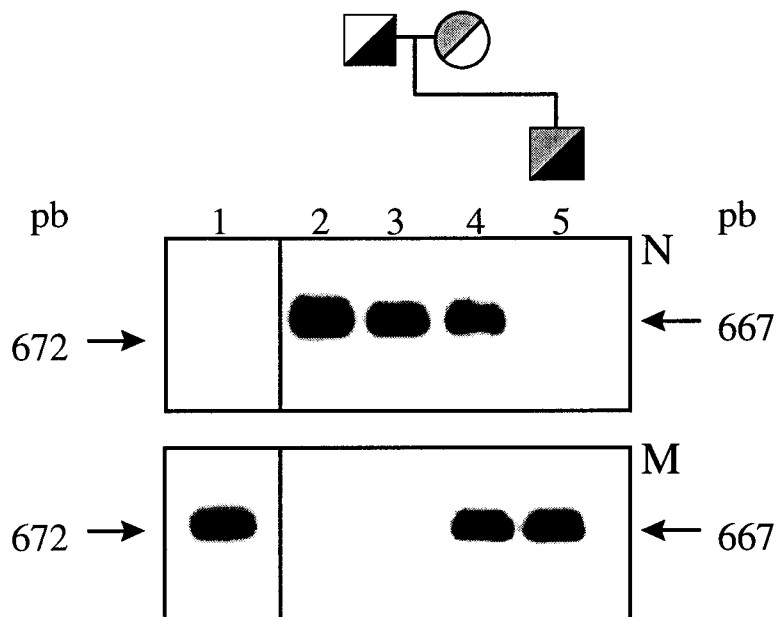


Figura 10: Heredograma e análises por hibridização alelo-específica da família 50. Imagem digitalizada das autorradiografias obtidas pela hibridização de fragmentos amplificados com os “primers” DP1/DP2, com sondas correspondentes à mutação Sp2. N = hibridização com sonda para alelos normais; M = hibridização com sonda para alelos mutantes. O heredograma representa dados obtidos através da análise de microconversões e “Southern blotting”. 1. controle mutante; 2. controle normal; 3. pai; 4. mãe; 5. filho afetado.

Tabela 5: Genótipos de 12 famílias onde foram identificadas microconversões em heterozigose com deleções ou conversões gênicas.

família	indiv ^(a)	genótipo ^(b)	forma clín de HCA ^(c)
4	P	normal / cv	PS
	M	normal / F306+, Q318X, R356W	
	F-A	cv / F306+, Q318X, R356W	
13	P	normal (del.C4B+21A)/ I172N, V281L (dupl.C4B+21A)	VS
	M	normal / cv	
	M-N	normal (del.C4B+21A) / normal	
	F-A	I172N, V281L (dupl.C4B+21A) / cv	
19	P	normal / Sp2	VS
	M	normal / cv	
	F-A	Sp2 / cv	
	M-N	normal / normal	
23	P	normal / del (21B+C4B)	VS
	M	normal / Sp2	
	F-A	del (21B+C4B) / Sp2	
	F-N	normal / Sp2	
25	P	normal (dupl 21A+C4B) / I172N	PS
	M	normal / del (21B+C4B)	
	M-A	del (21B+C4B) / I172N	
28	P	normal / Sp2	PS
	M	normal / cv	
	F-A	cv / Sp2	
43	P	normal / cv, (dupl 21A+C4B) Sp2, V281L	PS
	M ^(d)	(dupl 21A+C4B) / (dupl 21B+C4B) R356W (Q318X)	
	M-A	cv, (dupl 21A+C4B) Sp2, V281L / R356W (dupl 21B+C4B)	
50	P	normal (dupl 21A+C4B) / cv	PS
	M	normal (del 21A+C4B) / Sp2	
	M-A	cv / Sp2	
	F-N	normal (dupl 21A+C4B) / normal (del 21A+C4B)	
56	P	normal / I172N	VS
	M	normal / del (21B+C4B)	
	M-N ^(e)	normal / ?	
	F-A	del (21B+C4B) / I172N (por dedução)	

Continuação tabela 5

família	indiv ^(a)	genótipo ^(b)	forma clín de HCA ^(c)
59	P	normal / cv	PS
	M	normal / Q318X	
	M-N	normal / Q318X	
	M-N	normal / normal	
	M-A	cv / Q318X	
60	P	normal / cv	VS
	M	normal / I172N	
	M-A	cv / I172N	
61	P	normal / cv	VS
	M ^(f)	normal(del 21A+C4B) / I172N (por dedução)	
	M-N	normal(del 21A+C4B) / normal	
	F-A	cv / I172N	

(a) Abreviaturas utilizadas: P = pai; M = mãe; M-N = filho normal do sexo masculino; M-A = filho do sexo masculino afetado por HCA; F-N = filho normal do sexo feminino; F-A = filho do sexo feminino afetado por HCA. (b) Resultados obtidos pela análise de 8 mutações e por estudos de “Southern blotting” e hibridização com sondas de CYP21 e C4. Dupl = duplicação de uma unidade especificada entre parênteses; del = deleção de uma unidade especificada entre parênteses; cv = conversão gênica envolvendo os sítios *Taq* I e *Kpn* I; (c) Formas clínicas: PS = perdedor de sal; VS = virilizante simples. (d) Não foi possível determinar em qual alelo está a mutação Q318X, uma vez que não foi detectada no filho. Os genótipos desta família não estão ainda elucidados e serão abordados separadamente. (e) Este indivíduo ainda não foi testado quanto à mutação I172N. (f) Foi deduzida a presença da mutação I172N.

Assim como nos casos de famílias afetadas por duas mutações do tipo microconversão, aqui também foi possível verificar a segregação dos alelos afetados pelas mutações. Os alelos mutantes identificados nas crianças afetadas foram também detectados nos progenitores, com exceção da família 61, onde a mãe não foi estudada quanto à mutação I172N; e da família 56, cuja filha afetada não foi diretamente analisada (tabela 5).

2.1. Famílias com padrões de hibridização incomuns

Foram observados casos de famílias portadoras de deleções e conversões gênicas cujas crianças afetadas apresentam sinais positivos de hibridização tanto para a sonda normal como para a mutante. A família 23 é um exemplo onde experimentos de “Southern blotting” detectaram a presença de deleção de CYP21B no pai e na filha afetada (tabela 5). Por outro lado, a hibridização com sondas correspondentes a Sp2 revelaram sinais positivos tanto com a sonda normal como com a mutante (figura 11, amostra 5). Resultados semelhantes foram observados nas famílias 19, 60 e 61 (aparentadas entre si) e na 13, todas portadoras de conversões gênicas envolvendo os sítios *Taq* I e *Kpn* I (figuras 12, 13 e 14).

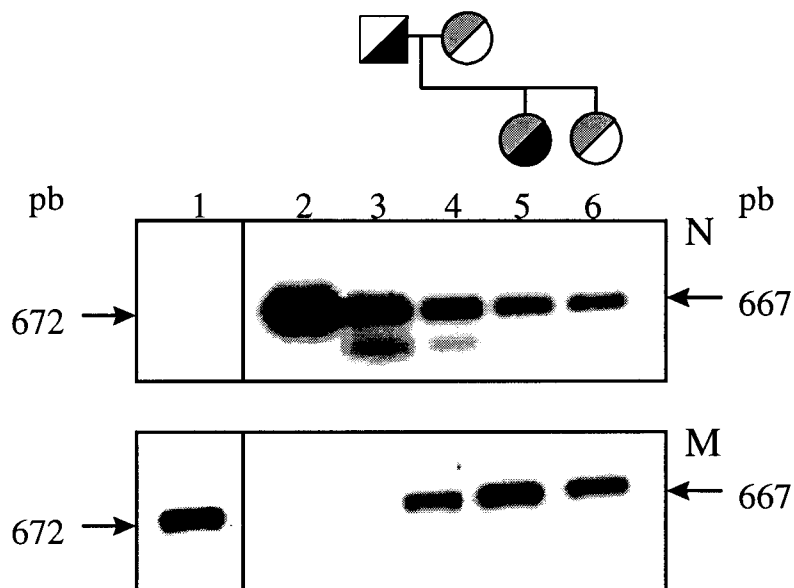


Figura 11: Heredograma e análises por hibridização alelo-específica da família 23. Imagem digitalizada das autorradiografias obtidas pela hibridização de fragmentos amplificados com os “primers” DP1/DP2, com sondas correspondentes à mutação Sp2. N = hibridização com sonda para alelos normais; M = hibridização com sonda para alelos mutantes. O heredograma representa dados obtidos através da análise de microconversões e “Southern blotting”. 1. controle mutante; 2. controle normal; 3. pai; 4. mãe; 5. filha afetada; 6. filha normal.

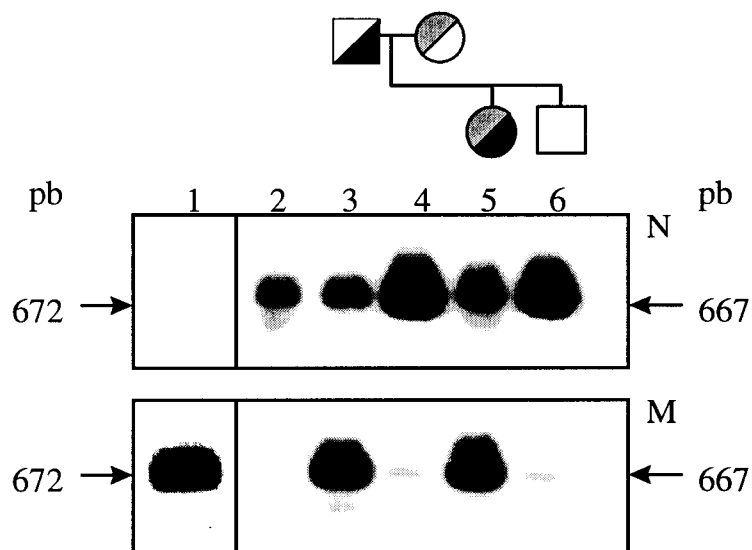


Figura 12: Heredograma e análises por hibridização alelo-específica da família 19. Imagem digitalizada das autorradiografias obtidas pela hibridização de fragmentos amplificados com os “primers” DP1/DP2, com sondas correspondentes à mutação Sp2. N = hibridização com sonda para alelos normais; M = hibridização com sonda para alelos mutantes. O heredograma representa dados obtidos através da análise de microconversões e “Southern blotting”. 1. controle mutante; 2. controle normal; 3. pai; 4. mãe; 5. filha afetada; 6. filho normal.

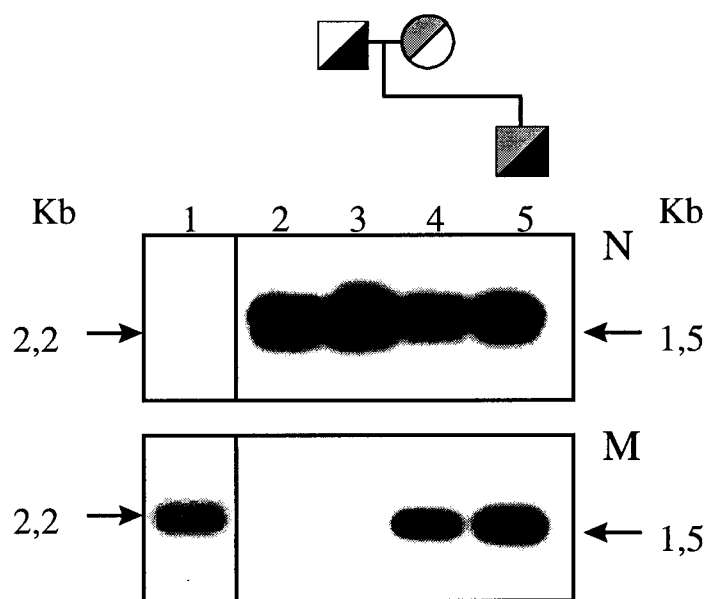


Figura 13: Heredograma e análises por hibridização alelo-específica da família 60. Imagem digitalizada das autorradiografias obtidas pela hibridização de fragmentos amplificados com os “primers” DP3/DP4, com sondas correspondentes à mutação I172N. N = hibridização com sonda para alelos normais; M = hibridização com sonda para alelos mutantes. O heredograma representa dados obtidos através da análise de microconversões e “Southern blotting”. 1. controle mutante; 2. controle normal; 3. pai; 4. mãe; 5. filho afetado.

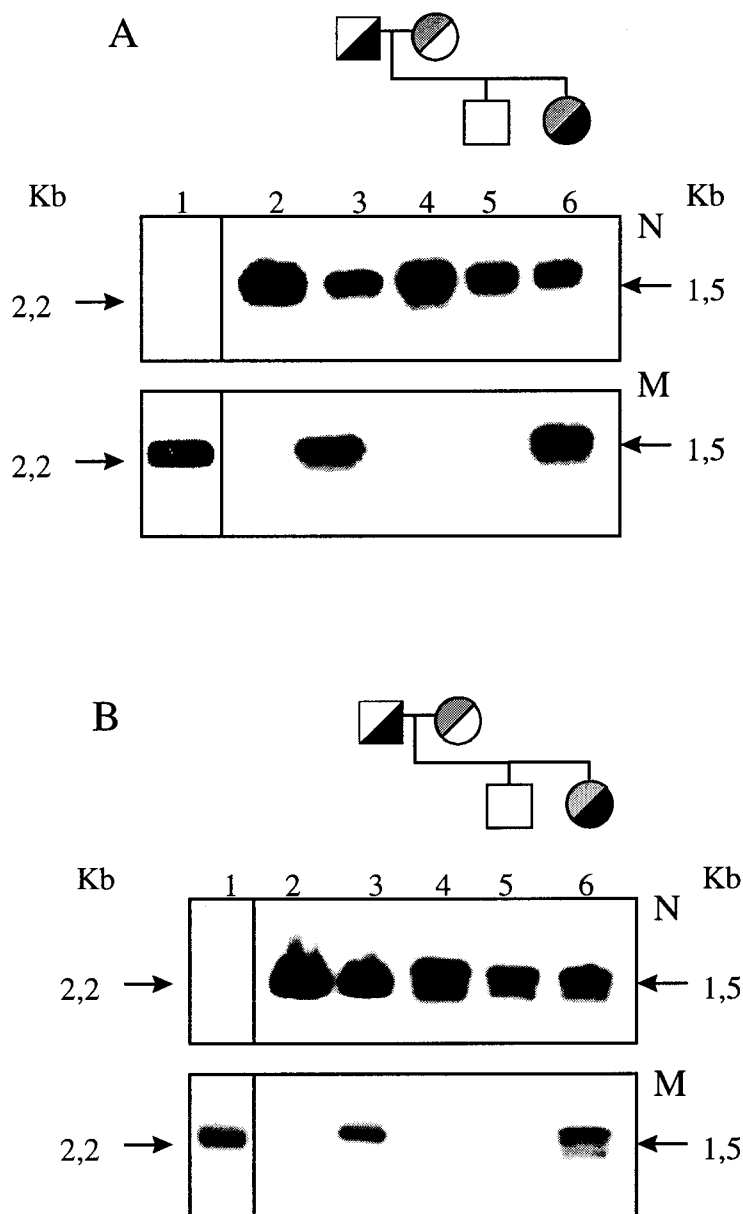


Figura 14: Heredograma e análises por hibridização alelo-específica da família 13. Imagem digitalizada das autorradiografias obtidas pela hibridização de fragmentos amplificados com os “primers” DP3/DP4, com sondas correspondentes às mutações I172N (A) e V281L (B). N = hibridização com sonda para alelos normais; M = hibridização com sonda para alelos mutantes. O heredograma representa dados obtidos através da análise de microconversões e “Southern blotting”. 1. controle mutante; 2. controle normal; 3. pai; 4. mãe; 5. filho normal; 6. filha afetada.

3. Famílias com mais de uma mutação no mesmo alelo

Em algumas famílias verificaram-se alelos com mais de uma mutação, em geral localizadas próximas entre si. A confirmação de que duas mutações identificadas provêm de um mesmo alelo foi possível pelo estudo das famílias completas, onde observa-se a segregação das mutações. As famílias 14 e 48 possuem alelos com as mutações Q381X e R356W, ambas situadas no exon 8 (tabela 4, figura 15). Já na família 4 foi identificado um alelo com as mutações Q381X, R356W e F306+, esta última localizada no exon 7 (tabela 5, figura 16).

As famílias 13 e 43 apresentaram também mais de uma mutação em um mesmo alelo mas, ao contrário dos casos anteriores, as mutações identificadas não estão localizadas em posições vizinhas. Na família 13, por exemplo, verificou-se a presença das mutações I172N (exon 4) e V281L (exon 7) no pai e na filha afetada (tabela 5, figura 14, amostras 3 e 6). Por outro lado, a hibridização com sonda correspondente à mutação CL6, localizada entre as mutações I172N e V281L, foi negativa.

Já na família 43 foram identificadas as mutações Sp2 (intron 2) e V281L (exon 7), herdadas do pai, no mesmo alelo de uma conversão gênica envolvendo os sítios *Taq* I e *Kpn* I (tabela 5, figura 17). Estranhamente, a hibridização no pai revela a presença da mutação Sp2 em homozigose ou hemizigose, uma vez que não foi detectado sinal positivo com a sonda normal (figura 17A, amostra 3). Nesta família, também a mãe apresenta duas mutações, Q381X e R356W (figuras 17C e 17D, amostra 4), porém aparentemente o filho herdou apenas R356W (figuras 17C e 17D, amostra 5), o que indicaria que estão em cromossomos diferentes. A família 43 constitui portanto um caso bastante complexo, que será discutido adiante.

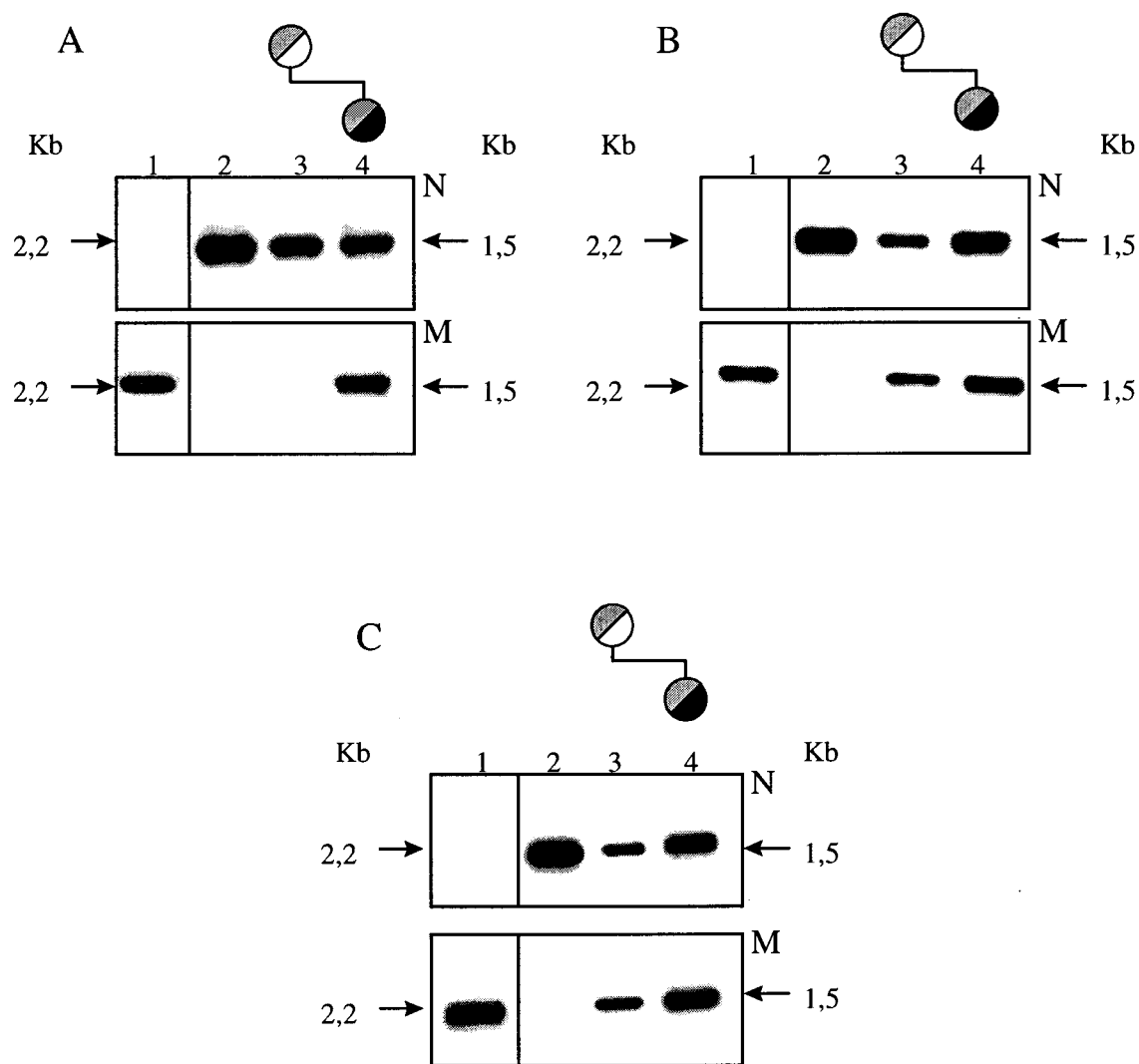


Figura 15: Heredograma e análises por hibridização alelo-específica da família 48. Imagem digitalizada das autorradiografias obtidas pela hibridização de fragmentos amplificados com os “primers” DP3/DP4, com sondas correspondentes às mutações I172N (A), Q318X (B) e R356W (C). N = hibridização com sonda para alelos normais; M = hibridização com sonda para alelos mutantes. O heredograma representa dados obtidos através da análise de microconversões e “Southern blotting”. 1. controle mutante; 2. controle normal; 3. mãe; 4. filha afetada. Não foi possível analisar o pai nesta família.

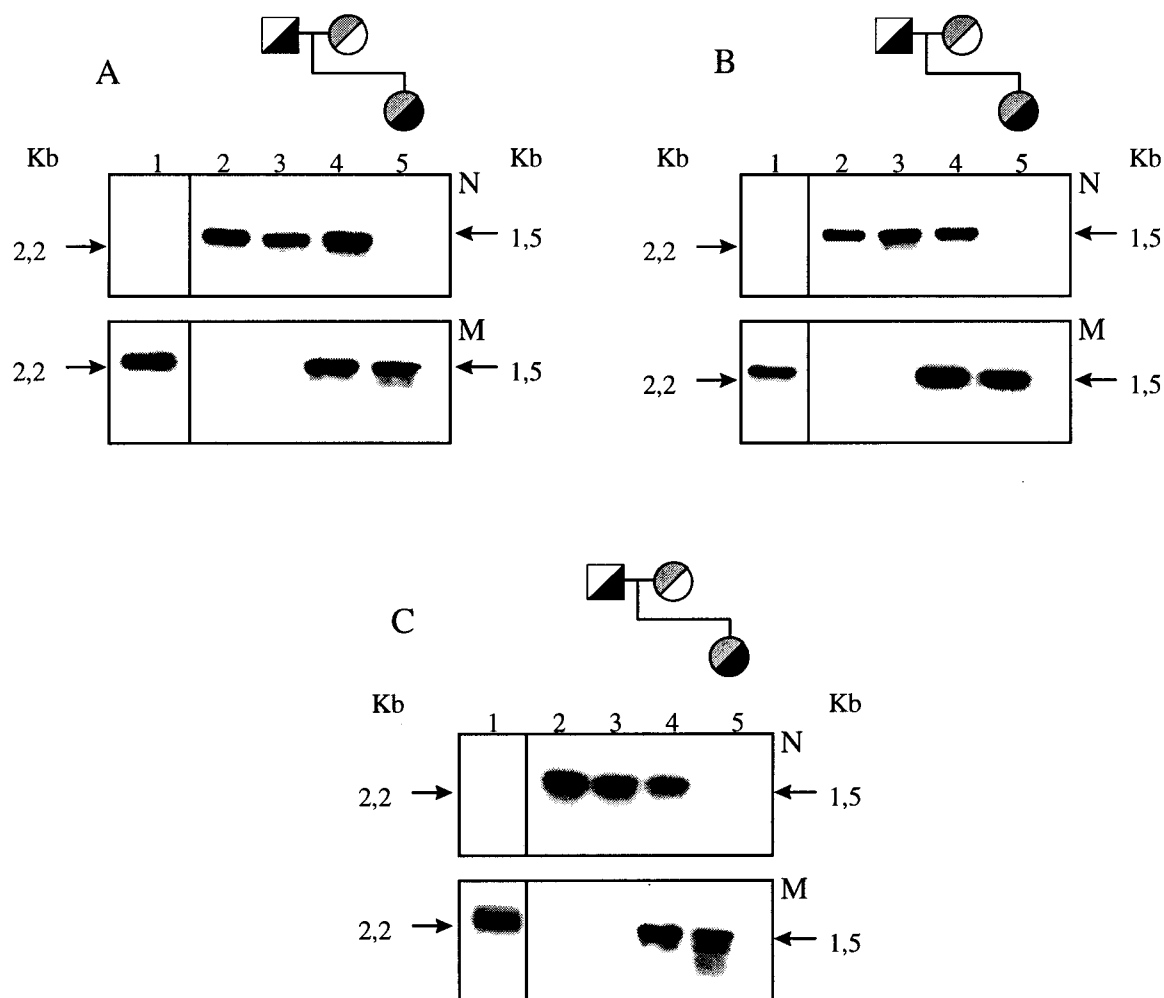


Figura 16: Heredograma e análises por hibridização alelo-específica da família 4. Imagem digitalizada das autorradiografias obtidas pela hibridização de fragmentos amplificados com os “primers” DP3/DP4, com sondas correspondentes às mutações F306+ (A), Q318X (B) e R356W (C). N = hibridização com sonda para alelos normais; M = hibridização com sonda para alelos mutantes. O heredograma representa dados obtidos através da análise de microconversões e “Southern blotting”. 1. controle mutante; 2. controle normal; 3. pai; 4. mãe; 5. filha afetada.

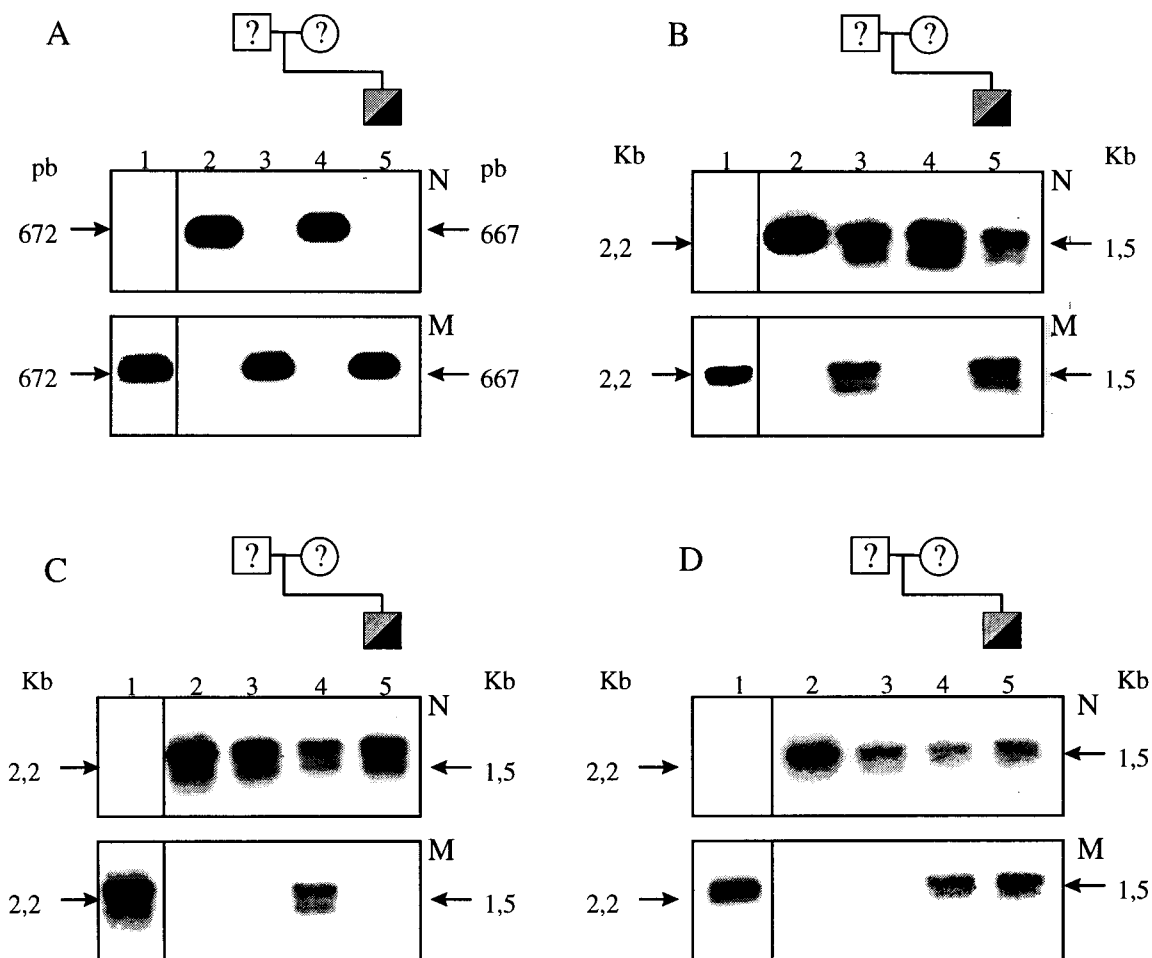


Figura 17: Heredograma e análises por hibridização alelo-específica da família 43. Imagem digitalizada das autorradiografias obtidas pela hibridização de fragmentos amplificados com os “primers” DP1/DP2 e DP3/DP4, com sondas correspondentes às mutações Sp2 (A), V281L (B), Q318X (C) e R356W (D). N=hibridização com sonda para alelos normais; M = hibridização com sonda para alelos mutantes. (?) = genótipo não determinado. O heredograma representa dados obtidos através da análise de microconversões e “Southern blotting”. 1. controle mutante; 2. controle normal; 3. pai; 4. mãe; 5. filho afetado.

4. Análise da mutação $\Delta 8$

A análise da mutação $\Delta 8$ recebeu uma abordagem diferenciada, pelo fato da estratégia de PCR utilizada para as análises por hibridização alelo-específica das outras mutações amplificar exclusivamente os alelos normais para $\Delta 8$. Dessa forma, é possível determinar quais indivíduos não podem ser portadores da sequência mutada: aqueles que na análise para as outras mutações apresentam hibridização para os dois alelos (heterozigoto para uma dada mutação).

Sendo assim, foram testados quanto a $\Delta 8$ apenas aqueles indivíduos que não puderam ser excluídos por esse método ou seja, com alguma possibilidade de serem heterozigotos para $\Delta 8$. Aí se incluem aqueles que hibridizaram com sondas de uma mutação e não com a correspondente normal, sendo que a mutação foi herdada apenas de um progenitor, e ao mesmo tempo não foram detectados por “Southern blotting” eventos de deleção ou conversão gênica em larga escala (famílias 11, 26 e 47; figuras 18, 19 e 20). Foram considerados também os casos de indivíduos com dois alelos negativos para todas as mutações testadas (famílias 8 e 44). Dentre essas, apenas a família 47 foi positiva para $\Delta 8$, que ocorre em heterozigose com a mutação Sp2. Resultados obtidos por PCR alelo-específico para a mutação $\Delta 8$ são apresentados na figura 21.

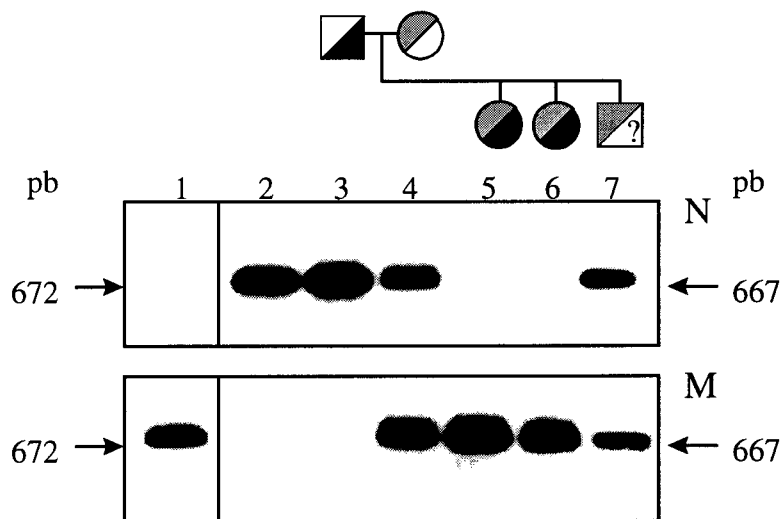


Figura 18: Heredograma e análises por hibridização alelo-específica da família 11. Imagem digitalizada das autorradiografias obtidas pela hibridização de fragmentos amplificados com os “primers” DP1/DP2, com sondas correspondentes à mutação Sp2. N = hibridização com sonda para alelos normais; M = hibridização com sonda para alelos mutantes. (?) = genótipo não determinado. O heredograma representa dados obtidos através da análise de microconversões e “Southern blotting”. 1. controle mutante; 2. controle normal; 3. pai; 4. mãe; 5. filha afetada; 6. filha afetada; 7. filho afetado.

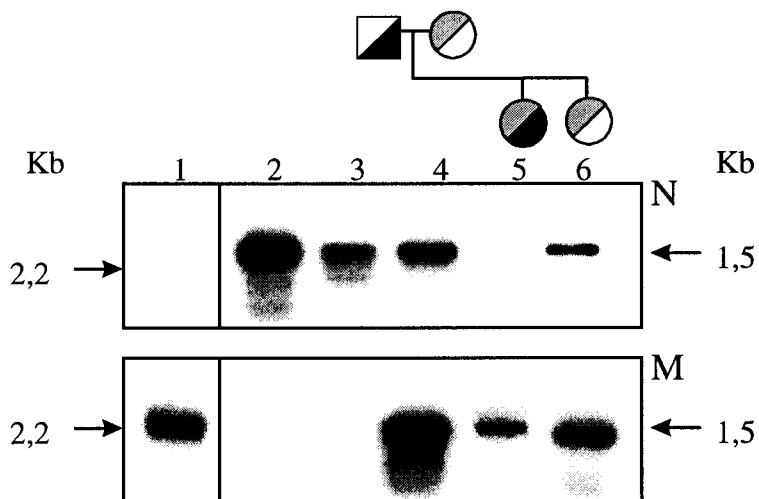


Figura 19: Heredograma e análises por hibridização alelo-específica da família 26. Imagem digitalizada das autorradiografias obtidas pela hibridização de fragmentos amplificados com os “primers” DP3/DP4, com sondas correspondentes à mutação R356W. N = hibridização com sonda para alelos normais; M = hibridização com sonda para alelos mutantes. O heredograma representa dados obtidos através da análise de microconversões e “Southern blotting”. 1. controle mutante; 2. controle normal; 3. pai; 4. mãe; 5. filha afetada; 6. filha normal.

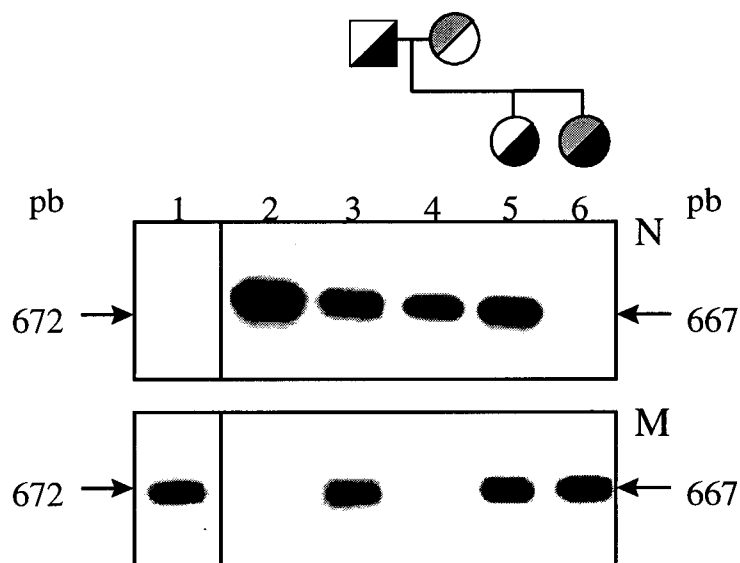


Figura 20: Heredograma e análises por hibridização alelo-específica da família 47. Imagem digitalizada das autorradiografias obtidas pela hibridização de fragmentos amplificados com os “primers” DP1/DP2, com sondas correspondentes à mutação Sp2. N = hibridização com sonda para alelos normais; M = hibridização com sonda para alelos mutantes. O heredograma representa dados obtidos através da análise de microconversões e “Southern blotting”. 1. controle mutante; 2. controle normal; 3. pai; 4. mãe; 5. filha normal; 6. filha afetada.

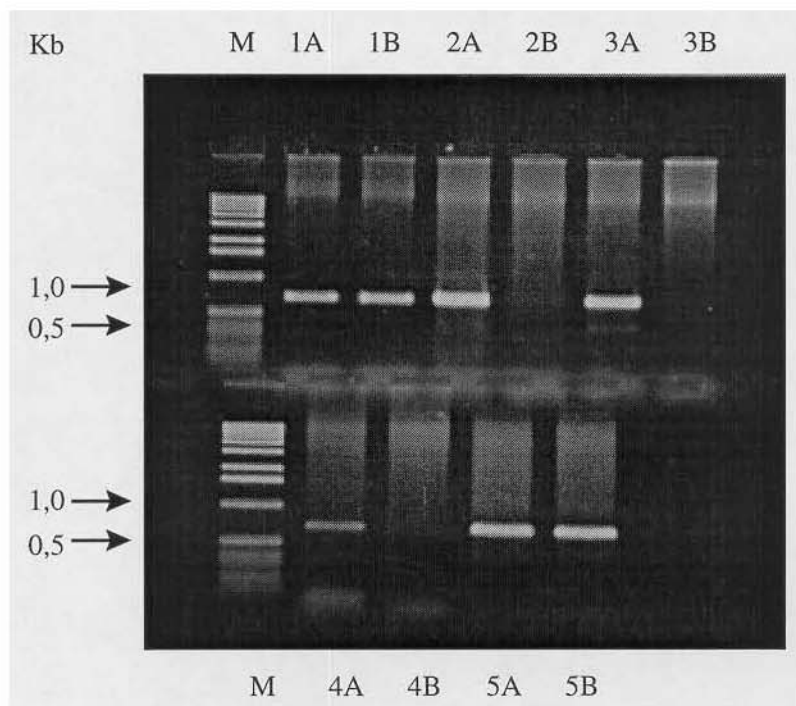


Figura 21: Eletroforese em gel de agarose 1 % dos produtos de PCR obtidos com os “primers” CN/G (A) e CM/G (B). 1. controle heterozigoto para $\Delta 8$; 2. controle homozigoto normal; 3. filha afetada família 11; 4. filha afetada família 26; 5. filha afetada família 47; M = marcador de peso molecular 1 Kb ladder (Gibco-BRL).

5. Tipos de alelos identificados

Partindo-se do princípio que 58 alelos seriam afetados por microconversões, 37 famílias foram estudadas, identificando-se 11 tipos de alelos diferentes. A maioria deles é afetado por uma mutação, porém há também alelos com 2 ou 3 mutações. Em um deles, presente na família 43 (tabela 5, figura 17), as microconversões aparentemente localizam-se no mesmo alelo que a conversão gênica. Dessa forma, consideramos 59 o número de alelos afetados por microconversões. A tabela 6 reúne os alelos identificados.

Tabela 6: Ocorrência dos diferentes alelos com microconversões em pacientes afetados pelas formas clínicas perdedora de sal e virilizante simples.

Tipos de alelos ^(a)	PS ^(b)	VS ^(c)	Total
Sp2	14	3	17
Δ8	1	-	1
I172N	5	8	13
V281L	1	-	1
F306+	2	1	3
Q318X	5	-	5
R356W	1	2	3
Q318X, R356W	1	1	2
F306+, Q318X, R356W	1	-	1
cv, Sp2, V281L ^(d)	1	-	1
I172N, V281L	-	1	1
não determinados	10	1	11

(a) Foram considerados apenas os alelos dos indivíduos afetados. (b) N°. de ocorrências em pacientes perdedores de sal. (c) N°. de ocorrências em pacientes virilizantes simples. (d) Alelo onde ocorreram simultaneamente microconversões e conversão gênica (cv) envolvendo os sítios *Taq* I e *Kpn* I.

6. Alelos não determinados

Foi possível identificar pelo menos uma mutação, das 8 investigadas, em 48 alelos afetados (81,35 %). Em 28 famílias foram observados genótipos condizentes com a presença da doença ou seja, dois alelos afetados por microconversões ou uma microconversão associada a deleção ou conversão gênica envolvendo os sítios *Taq* I e *Kpn* I. Por outro lado, em 6 famílias não foi identificada mutação em um dos alelos e em 3 famílias (uma delas consangüínea) nenhuma mutação foi encontrada. Isso resulta em 18,64 % (11/59) de alelos não determinados. A tabela 7 mostra os genótipos parciais destas famílias.

Tabela 7: Genótipos de 9 famílias onde pelo menos um dos alelos não foi determinado.

família	indiv ^(a)	genótipo ^(b)	forma clín de HCA ^(c)
8	P	Q318X (dupl. C4B+21B) / ?	
	M	normal / ?	
	F-N	Q318X (dupl. C4B+21B) / ?	
	M-A	? / ?	PS
	F-A	? / ?	PS
10	P	normal / I172N	
	M	normal(dupl. C4B+21A) / ?	
	M-A	I172N / ?	VS
	F-A	I172N / ?	VS
11	P	normal / ?	
	M	normal / Sp2	
	F-A	Sp2 ?	PS
	F-A	Sp2 / ?	PS
	M-A	Sp2 / ?	PS
24	P	normal (dupl 21A+C4B) / I172N	
	M	V281L (dupl 21A+C4B) / ?	
	F-A	I172N / ?	PS
26	P	normal / ?	
	M	normal / R356W	
	F-A	R356W / ?	PS
	F-N	normal / R356W	
27	P	normal / Sp2	
	M	normal / ?	
	F-A	Sp2 / ?	PS
39	P	normal / ?	
	M	normal / I172N	
	F-A	I172N / ?	PS
41	P	normal / ?*	
	M	normal / ?*	
	M-N	normal / ?	
	F-A	?* / ?*	PS
44	P	normal (dupl 21B+C4B) / ?	
	M	normal / ?	
	F-N	normal (dupl 21B+C4B) / ?	
	F-A	? / ?	PS

(a) Abreviaturas utilizadas: P = pai; M = mãe; M-N = filho normal do sexo masculino; M-A = filho do sexo masculino afetado por HCA; F-N = filho normal do sexo feminino; F-A = filho do sexo feminino afetado por HCA. (b) Resultados obtidos pela análise de 8 mutações e por estudos de "Southern blotting" e hibridização com sondas de CYP21 e C4. Dupl = duplicação de uma unidade especificada entre parênteses; (*) = consanguinidade; (?) = alelos não determinados. (c) PS = perdedor de sal; VS = virilizante simples.

As famílias 11 e 26 constituem situações particulares: a hibridização com sondas correspondentes a Sp2 (no caso da família 11) e R356W (no caso da família 26) revelaram sinais positivos com as sondas mutantes mas não com as normais nos indivíduos afetados (figura 18, amostras 5 e 6; figura 19, amostra 5). Além disso, somente um dos alelos parentais apresenta a mutação (figura 18, amostra 4; figura 19, amostra 4), que portanto não ocorre em homozigose. Por outro lado, experimentos de “Southern blotting” e hibridização de sondas de CYP21 e C4 não revelaram deleções ou conversões gênicas que possam justificar esses resultados. O mais plausível seria a ocorrência da mutação $\Delta 8$, o que não se confirmou após experimentos de PCR alelo-específico (figura 21, amostras 3 e 4). No caso da família 11, verificou-se ainda que um dos filhos apresenta padrão de hibridização com sondas Sp2 diferente dos demais, embora todos sejam considerados afetados (figura 18, amostra 7). Hipóteses serão sugeridas adiante para tentar explicar esses resultados.

7. Frequência das microconversões

Foram determinadas as frequências das 8 microconversões estudadas, em 59 alelos. Embora os dados de “Southern blotting” indiquem eventos de deleções ou conversões gênicas em 10 alelos de um total de 68, restando portanto 58 a serem analisados quanto a microconversões, foi identificado um alelo afetado simultaneamente por microconversões e conversão gênica envolvendo os sítios *Taq* I e *Kpn* I. Sendo assim, consideramos 59 alelos estudados quanto a microconversões.

A tabela 8 resume os resultados obtidos. A mutação Sp2 foi a mais freqüente em nossa amostragem, seguida por I172N. Por outro lado, a mutação CL6 não foi encontrada em nenhum dos alelos estudados e $\Delta 8$ ocorreu em apenas um alelo.

Tabela 8: Análise de 8 microconversões em 59 alelos.

mutações/nº de alelos ^(a)	positivos	negativos	neg. por exclusão ^(b)	não testados	total determ.	frequência ^(c)
Sp2	18	40	-	1	58	31,03 % (18/58)
Δ8	1	8	50	-	59	1,69 % (1/59)
I172N	14	45	-	-	59	23,72 % (14/59)
CL6	-	56	-	3	56	- (0/56)
V281L	3	56	-	-	59	5,08 % (3/59)
F306+	4	54	-	1	58	6,89 % (4/58)
Q318X	8	48	-	3	56	14,28 % (8/56)
R356W	6	52	-	1	58	10,34 % (6/58)

(a) Foram considerados apenas os alelos dos indivíduos afetados. (b) A estratégia empregada na amplificação específica de CYP21B permite determinar alelos que são necessariamente negativos para Δ8. São testados apenas aqueles que não puderam ser excluídos (vide materiais e métodos, item 4). (c) A frequência foi calculada com base no número de alelos determinados, o que pode eventualmente superestimar os valores.

DISCUSSÃO

A presença de microconversões foi investigada em 59 alelos não relacionados de 37 famílias afetadas pela forma clássica de deficiência de 21-hidroxilase, sendo que 26 famílias (70,3 %) apresentam a forma clínica perdedora de sal e 11 (29,7 %) a forma virilizante simples.

Em estudos anteriores, baseados em “Southern blotting” e hibridização com sondas de cDNA correspondentes aos genes CYP21 e C4, foram detectados eventos de deleção ou conversão gênica envolvendo os sítios de restrição *Taq* I e *Kpn* I em 14,7 % do total de 68 alelos (dados parciais em Araujo *et al.*, 1996). Assim, foi pressuposto que em 58 alelos (85,3 %) as mutações pontuais seriam os fatores preponderantes para a deficiência de 21-hidroxilase. Entretanto, foi identificado um alelo afetado simultaneamente por conversão gênica e 2 mutações pontuais. Dessa forma, consideramos 59 o número de alelos afetados com mutações pontuais.

As 8 mutações estudadas foram escolhidas por serem seqüências normalmente presentes no pseudogene, ocorrendo no gene ativo provavelmente devido a processos de microconversões entre as duas cópias gênicas. Por isso é esperado que sejam mais freqüentes do que as mutações ausentes no pseudogene.

Outro critério foi a correlação entre as mutações e as formas clínicas de deficiência de 21-hidroxilase: como a nossa casuística inclui somente famílias afetadas pela forma clássica, a maioria das mutações estudadas está relacionada a esta forma da doença. As mutações Sp2, CL6, F306+, Q318X e R356W são consideradas geralmente associadas à forma perdedora de sal (Mornet *et al.*, 1991; Higashi *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992), que afeta 26 famílias estudadas, e a mutação I172N é normalmente correlacionada à forma virilizante simples (Amor *et al.*, 1988; Mornet *et al.*, 1991; Higashi *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992), que ocorre em 11 casos. A mutação V281L constitui uma exceção, já que é a mutação mais freqüente relacionada normalmente à forma não clássica da doença (Speiser *et al.*, 1988; Mornet *et al.*, 1991). O estudo dessa mutação partiu do pressuposto de que seria possível a sua ocorrência em heterozigose com mutações clássicas, resultando em fenótipo perdedor de sal ou virilizante simples, embora geralmente considere-se que o fenótipo seja determinado pela mutação menos severa, como será discutido adiante (item 2). Há ainda a possibilidade da ocorrência de V281L juntamente com uma das mutações clássicas em um mesmo alelo. Realmente, V281L foi

verificada em 3 pacientes, sendo 2 afetados pela forma perdedora de sal e um virilizante simples.

1. Frequência das microconversões

A tabela 9 reúne as frequências das 8 microconversões estudadas neste trabalho e em outros estudos publicados anteriormente.

A mutação Sp2 foi a mais freqüente em nossa amostragem, correspondendo a aproximadamente 26,5 % do total de 68 alelos (incluindo os alelos com deleções e conversões gênicas envolvendo os sítios *Taq* I e *Kpn* I). Foi identificada principalmente em alelos de pacientes afetados pela forma clínica perdedora de sal. Estes resultados estão de acordo com dados obtidos em outros estudos, como pode ser visto na tabela 9.

A segunda mutação mais freqüente em nossa amostra foi I172N, que ocorreu em 20,5 % (14/68) dos alelos, a maioria deles provenientes de indivíduos afetados pela forma virilizante simples, o que está de acordo com o esperado considerando-se os estudos de expressão *in vitro* de proteínas mutantes (Chiou *et al.*, 1990; Tusie-Luna *et al.*, 1990; Higashi *et al.*, 1991). A ocorrência desta mutação descrita na literatura é em geral mais baixa, conforme mostra a tabela 9 (com exceção de Wedell *et al.*, 1994c). Esses dados podem estar refletindo diferenças nas quantidades de famílias com a forma virilizante simples nos diversos estudos, embora a proporção entre as duas formas clínicas em nossa amostra não seja discrepante em relação ao geralmente citado na literatura. Os trabalhos de Owerbach *et al.* (1990) e Ezquieta *et al.* (1995) são exceções, pois foram estudados apenas 2 indivíduos virilizantes simples nos dois casos, e um número bem maior de perdedores de sal (respectivamente 26 e 21 indivíduos); o que pode justificar as baixas frequências de I172N. Deve-se considerar que o estudo realizado por Wedell *et al.* (1994c) inclui pacientes das formas clássica e não clássica, o que provavelmente subestima as frequências das mutações relacionadas à forma clássica.

Tabela 9: Comparação das frequências de microconversões obtidas em seis estudos populacionais.

estudos / % mutações ^(a)	Sp2	$\Delta 8$	I172N	CL6	V281L	F306+	Q318X	R356W	ND ^(b)	n°. total ^(c)
Owerbach <i>et al.</i> , 1990	34	3,5	3,5	-	3,5	NT	5,5	NT	25	56
Mornet <i>et al.</i> , 1991	26	9	5	12	3	2	NT	NT	13	116
Wedell <i>et al.</i> , 1994c ^(d)	30	1	21	1	7	NT	3,5	4,5		186
Wilson <i>et al.</i> , 1995b	35,5	10	10,7	-	2	0,6	5	5	5	334
Ezquieta <i>et al.</i> , 1995	30	6	2	-	2	2	4	4	11	46
este estudo ^(e)	26,5	1,4	20,5	-	4,5	6	12	9	16	68

(a) Foram consideradas apenas as mutações analisadas neste trabalho. Os alelos com deleções e conversões gênicas em larga escala também foram contabilizados, porém suas frequências não foram incluídas. (b) Alelos não determinados. (c) Alelos de pacientes afetados pela forma clássica, com exceção de Wedell *et al.* (1994c), que inclui também a forma não clássica. (d) Alelos das formas clássica e não clássica. (e) Para efeito de comparação com os outros estudos, as frequências foram calculadas em relação ao total de alelos, por isso diferem das frequências mostradas na tabela 8. Os valores das frequências foram aproximados. NT = não testado.

A mutação V281L ocorreu em pequenas proporções, tanto no nosso estudo como em outros trabalhos descritos na literatura (tabela 9). As baixas frequências verificadas provavelmente foram causadas pela exclusão dos pacientes com a forma não clássica da doença, já que V281L está normalmente relacionada a esta forma clínica (Speiser *et al.*, 1988). Em nossa amostragem, a mutação V281L ocorreu em 2 pacientes afetados pela forma perdedora de sal e em um virilizante simples, além de um alelo não relacionado à doença e por isso não contabilizado (família 24, tabela 7). Nos 4 alelos, V281L ocorreu em associação com duplicação de CYP21A, reafirmando o desequilíbrio de ligação entre a mutação V281L e duplicação de CYP21A descrito na literatura (Garlepp *et al.*, 1986).

As frequências de F306+, Q318X e R356W parecem não diferir significativamente em comparação com outros estudos, embora as proporções encontradas sejam baixas para permitir análises estatísticas adequadas.

Chama a atenção o fato da mutação $\Delta 8$ ocorrer em apenas um alelo e a mutação CL6 em nenhum dos alelos testados. Baixas frequências foram obtidas em outras amostras para a mutação $\Delta 8$. Além dos dados mostrados na tabela 9, há também o estudo realizado por Carrera *et al.* (1993), que identificaram $\Delta 8$ em apenas 2 alelos dentre 108 estudados. Por outro lado, Higashi *et al.* (1991) revelaram a presença de $\Delta 8$ em 20 % dos alelos em pacientes perdedores de sal. Conforme mostra a tabela 9, as frequências da mutação $\Delta 8$ obtida por Mornet *et al.* (1991) e Wilson *et al.* (1995b) foram respectivamente 9 % e 10 % dos alelos da forma clássica. Tais valores não chegam a ser tão elevados quanto o citado por Higashi *et al.* (1991) (embora estes autores considerem apenas pacientes perdedores de sal, fato que por si só deve superestimar a frequência), porém é bem mais alto em comparação com nosso estudo, no qual a mutação $\Delta 8$ foi identificada em 1 alelo dentre 59 estudados (1,7 %).

A exemplo do nosso estudo, a mutação CL6 não foi identificada em nenhum dos alelos analisados por Ezquieta *et al.* (1995) e Wilson *et al.* (1995b). Em contrapartida, CL6 foi encontrada em proporções razoavelmente elevadas por Mornet *et al.* (1991) (tabela 9).

A mutação V281L ocorreu em pequenas proporções, tanto no nosso estudo como em outros trabalhos descritos na literatura (tabela 9). As baixas frequências verificadas provavelmente foram causadas pela exclusão dos pacientes com a forma não clássica da doença, já que V281L está normalmente relacionada a esta forma clínica (Speiser *et al.*, 1988). Em nossa amostragem, a mutação V281L ocorreu em 2 pacientes afetados pela forma perdedora de sal e em um virilizante simples, além de um alelo não relacionado à doença e por isso não contabilizado (família 24, tabela 7). Nos 4 alelos, V281L ocorreu em associação com duplicação de CYP21A, reafirmando o desequilíbrio de ligação entre a mutação V281L e duplicação de CYP21A descrito na literatura (Garlepp *et al.*, 1986).

As frequências de F306+, Q318X e R356W parecem não diferir significativamente em comparação com outros estudos, embora as proporções encontradas sejam baixas para permitir análises estatísticas adequadas.

Chama a atenção o fato da mutação $\Delta 8$ ocorrer em apenas um alelo e a mutação CL6 em nenhum dos alelos testados. Baixas frequências foram obtidas em outras amostras para a mutação $\Delta 8$. Além dos dados mostrados na tabela 9, há também o estudo realizado por Carrera *et al.* (1993), que identificaram $\Delta 8$ em apenas 2 alelos dentre 108 estudados. Por outro lado, Higashi *et al.* (1991) revelaram a presença de $\Delta 8$ em 20 % dos alelos em pacientes perdedores de sal. Conforme mostra a tabela 9, as frequências da mutação $\Delta 8$ obtida por Mornet *et al.* (1991) e Wilson *et al.* (1995b) foram respectivamente 9 % e 10 % dos alelos da forma clássica. Tais valores não chegam a ser tão elevados quanto o citado por Higashi *et al.* (1991) (embora estes autores considerem apenas pacientes perdedores de sal, fato que por si só deve superestimar a frequência), porém é bem mais alto em comparação com nosso estudo, no qual a mutação $\Delta 8$ foi identificada em 1 alelo dentre 59 estudados (1,7 %).

A exemplo do nosso estudo, a mutação CL6 não foi identificada em nenhum dos alelos analisados por Ezquieta *et al.* (1995) e Wilson *et al.* (1995b). Em contrapartida, CL6 foi encontrada em proporções razoavelmente elevadas por Mornet *et al.* (1991) (tabela 9).

2. Correlações entre genótipos e fenótipos

Os diversos tipos de mutações possivelmente estão associados a diferentes graus de prejuízo à atividade da proteína e conseqüentemente à severidade do fenótipo. Tenta-se de uma forma geral relacionar a ocorrência das mutações em pacientes das diversas formas clínicas de HCA com a gravidade da alteração que provocam na proteína, determinando maior ou menor dano à atividade enzimática. Nesse sentido, têm sido realizados estudos onde é medida a atividade enzimática *in vitro* de proteínas mutantes, correlacionando-as com a frequência destas mutações em pacientes afetados pelas formas perdedora de sal, virilizante simples e não clássica (Chiou *et al.*, 1990; Tusie-Luma *et al.*, 1990; Wu & Chung, 1991; Higashi *et al.*, 1991).

Speiser *et al.* (1992) agruparam as mutações em três conjuntos, de acordo com o grau de comprometimento enzimático e as características fenotípicas a que estão associadas. Assim, no grupo A foram reunidas as mutações que determinam perda total ou quase total da atividade enzimática (Sp2, Δ 8, CL6, F306+, Q318X, R356W, além de deleção e conversão gênica em larga escala), no grupo B foi incluída a mutação I172N, que resulta em comprometimento severo (2 % da atividade normal) e no grupo C aquelas responsáveis por alterações moderadas (10 a 20 % da atividade normal), como V281L e P30L. Os três grupos de mutações estão em associação com as formas clínicas perdedora de sal, virilizante simples e não clássica, respectivamente; embora haja pacientes portadores de mutações não relacionadas ao seu fenótipo.

De fato, em nossa amostragem alelos normalmente correlacionados à forma virilizante simples foram identificados em pacientes perdedores de sal, e vice-versa (tabela 6). Por exemplo, dentre os 14 alelos identificados com a mutação I172N (associada à forma virilizante simples), 5 provêm de pacientes perdedores de sal (tabela 6). Já a mutação R356W, normalmente relacionada à forma perdedora de sal, esteve presente em 3 alelos de indivíduos virilizantes simples, do total de 6 alelos onde foi identificada. Por outro lado, a mutação V281L ocorreu em 2 pacientes perdedores de sal, embora esteja normalmente relacionada à forma não clássica.

Algumas dessas exceções provavelmente podem ser explicadas pela ocorrência das mutações em heterozigose composta: deve-se levar em conta a expressão dos dois alelos. Normalmente, considera-se que o fenótipo é determinado pelo alelo menos afetado ou seja, com a mutação menos prejudicial à atividade enzimática. Assim, as três formas clínicas da deficiência de 21-hidroxilase seriam determinadas pela combinação de seis tipos de genótipos, conforme mostra a tabela 10 (Higashi *et al.*, 1991; Mornet *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992; Wedell *et al.*, 1994c).

Tabela 10: Tipos de genótipos determinantes das formas clínicas de deficiência da 21-hidroxilase.

Forma clínicas	Genótipos ^(a)
perdedor de sal	PS / PS
	VS / PS
virilizante simples	VS / VS
	NC / PS
não clássica	NC / VS
	NC / NC

(a) PS = mutação associada à forma perdedora de sal, VS = mutação associada à forma virilizante simples, NC = mutação associada à forma não clássica. As relações entre mutações e formas clínicas são baseadas principalmente em estudos de atividade enzimática *in vitro* de proteínas mutantes (Chiou *et al.*, 1990; Tusie-Luma *et al.*, 1990; Wu & Chung, 1991; Higashi *et al.*, 1991).

Com o objetivo de verificar a correlação entre genótipos e fenótipos em nossa amostragem, os genótipos dos indivíduos afetados foram reunidos na tabela 11, comparando-se seus fenótipos (formas clínicas diagnosticadas) com os fenótipos previstos de acordo com as considerações feitas acima.

A tabela 11 mostra que há 3 famílias com fenótipos e genótipos discordantes. Por exemplo, a criança afetada da família 53 apresenta um fenótipo mais grave que o previsto pelo genótipo: a associação das mutações V281L e I172N (normalmente relacionadas às formas não clássica e virilizante simples da doença, respectivamente) resultou em fenótipo perdedor de sal. Assim como este, casos de fenótipos e genótipos discordantes têm sido descritos na literatura (New *et al.*, 1989; Mornet *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992; Miller, 1994; Wilson *et al.*, 1995b).

Tabela 11: Comparação entre as formas clínicas reais e as previstas pelos genótipos, em pacientes pertencentes a 28 famílias.

forma clín esperada ^(a)	família ^(b)	genótipo ^(c)	forma clín de HCA
PS	2	Sp2* / Sp2*	PS
	4	cv / F306+, Q318X, R356W	PS
	7	Q318X* / Q318X*	PS
	14	Q318X, R356W* / Q318X, R356W*	PS
	19	Sp2 / cv	VS
	23	del (21B+C4B) / Sp2	VS
	28	cv / Sp2	PS
	43	cv, (dupl 21A+C4B) Sp2, V281L / R356W (dupl 21B+C4B)	PS
	47	Sp2 / Δ8	PS
	50	cv / Sp2	PS
	52	Sp2 / Sp2	PS
	54	Sp2 / Q318X	PS
	59	cv / Q318X	PS
	62	Sp2 / Sp2	PS
	63	F306+ / F306+	PS
	64	Sp2 / Sp2	PS
	65	Sp2 / Q318X	PS
VS	13	I172N, V281L (dupl.C4B+21A) / cv	VS
	25	I172N / del (21B+C4B)	VS
	29	I172N / Q318X	VS
	42	I172N / R356W	VS
	48	I172N / Q318X, R356W	VS
	51	I172N / F306+	VS
	55	I172N / Sp2	VS
	56	I172N / del (21B+C4B)	VS
	60	I172N / cv	VS
	61	I172N / cv	VS
NC	53	V281L / I172N	PS

(a) PS = perdedor de sal; VS = virilizante simples; NC = não clássica. (b) Famílias onde os dois alelos foram determinados. (c) Resultados obtidos pela análise de 8 mutações e por estudos de "Southern blotting" e hibridização com sondas de CYP21 e C4. Dupl = duplicação da unidade especificada entre parênteses; del = deleção da unidade especificada entre parênteses; cv = conversão gênica envolvendo os sítios *Taq* I e *Kpn* I; (*) = consangüinidade.

Uma das possibilidades para explicar estes achados é a ocorrência de mutações raras ainda não identificadas nos mesmos alelos onde foram encontradas as mutações I172N e V281L. Esta hipótese já foi anteriormente sugerida para explicar casos semelhantes (Strachan, 1994; Wilson *et al.*, 1995b). Entretanto, para explicar a discordância entre genótipos e fenótipos na família 53, é necessário que as supostas mutações sejam responsáveis por alterações graves na proteína, justificando assim o fenótipo perdedor de sal verificado nessas famílias. No caso da família 53, cujo genótipo indicaria a forma não clássica da doença, seria preciso a ocorrência de mutações nos dois alelos. O sequenciamento completo dos alelos provavelmente permitirá a confirmação ou exclusão dessa hipótese.

Para explicar as discrepâncias entre genótipos e fenótipos, alguns autores propõem o envolvimento de outros genes que atuam na via metabólica do cortisol (Bormann *et al.*, 1992) inclusive enzimas com função de 21-hidroxilase produzidas em outros tecidos que não a adrenal (Mellon & Miller, 1989; Speiser *et al.*, 1991; Kronbach *et al.*, 1991; Endoh *et al.*, 1995).

Como ressaltam Mornet *et al.* (1991), variações individuais nos níveis de síntese proteica ou nas taxas de catabolismo e excreção dos hormônios esteróides também podem exercer papéis importantes na determinação do fenótipo.

As famílias 19 e 23 apresentam a mutação Sp2, em heterozigose respectivamente com conversão gênica e deleção de CYP21B. Ao contrário do esperado, o fenótipo dos indivíduos afetados é virilizante simples. Conforme já mencionado (resultados, item 2.1) essas famílias demonstraram padrões de hibridização incomuns com as sondas correspondentes a Sp2, sendo por isso discutidas separadamente.

2.1. Extensão dos eventos de deleção e conversão gênica

Uma provável explicação para a discordância entre genótipos e fenótipos nas famílias 19 e 23 é a extensão dos eventos de deleção e conversão gênica encontrados nestas famílias.

Nos primeiros estudos moleculares da deficiência da 21-hidroxilase, considerava-se que eventos de deleção e conversão gênica envolvendo os sítios de restrição *Taq* I e *Kpn* I estendiam-se por grandes porções do gene CYP21B. Por este motivo, eram considerados

eventos em larga escala (White *et al.*, 1984b, 1985, 1986; Higashi *et al.*, 1986; Donohoue *et al.*, 1986a; Werkmeister *et al.*, 1986; Harada *et al.*, 1987).

Em nossa amostragem, entretanto, foram observados casos que possivelmente fogem a esta regra. Nas famílias 19, 60 e 61, aparentadas entre si, e na 13 foi detectado por “Southern blotting” um alelo com conversão gênica envolvendo os sítios de *Taq* I e *Kpn* I. No caso da família 23, verificou-se uma deleção de CYP21B. Por outro lado, na família 19 o fragmento obtido na amplificação com os “primers” DP1/DP2, com anelamento na região do $\Delta 8$ (exon 3), hibridizou com os alelos normal e mutante em relação à mutação Sp2 na filha afetada (figura 12, amostra 5), indicando que um alelo mutante viria do pai e o outro normal seria proveniente do alelo convertido da mãe. Estas observações possivelmente indicam que este último alelo também foi amplificado porque a conversão não teria atingido o sítio de anelamento do “primer” DP2 no exon 3 (figura 22A).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório utilizaram o método de análise descrito por Collier *et al.* (1992), no qual a amplificação específica de CYP21B é conseguida pela digestão prévia com a enzima *Taq* I (vide introdução, item 7). Neste caso, somente o alelo paterno foi amplificado na filha afetada da família 19, onde a hibridização com a sonda Sp2 normal foi negativa. Tal observação reafirma a hipótese de que a conversão gênica da família 19 é diferente das que têm sido descritas até agora e que produz um fenótipo menos grave porque não atinge pontos de mutações responsáveis por danos drásticos à proteína. Provavelmente, apenas a porção 5' do gene foi atingida, entre o sítio *Taq* I e a região de Sp2 (figura 22A), portanto a região alterada seria a promotora.

Embora os promotores dos genes CYP21A e CYP21B apresentem alta homologia entre si, foram detectadas diferenças significativas nas taxas de transcrição das duas cópias gênicas, sendo CYP21A transcrito em quantidades menores (Bristow *et al.*, 1993b; Chang & Chung, 1995). As regiões promotoras de CYP21A e CYP21B têm sido analisadas, caracterizando-se elementos regulatórios e fatores de transcrição (Donohoue & Collins, 1992; Kagawa & Waterman, 1992; Watanabe *et al.*, 1993; Chang & Chung, 1995). Foram identificadas alterações nas seqüências nucleotídicas nas regiões de ligação de fatores de transcrição em CYP21A e CYP21B, apontadas como responsáveis pelas diferenças nas taxas de transcrição observadas entre as duas cópias gênicas (Chang & Chung, 1995).

Kyllo *et al.* (1995) compararam a atividade dos promotores de CYP21A e CYP21B, através da expressão do gene da luciferase como gene repórter. Regiões promotoras de CYP21A e CYP21B foram amplificadas por PCR e os fragmentos obtidos foram clonados em plasmídios contendo o gene da luciferase, sendo posteriormente transfectados em culturas de células esteroideogênicas (Y-1) e não esteroideogênicas (COS-1). Em células Y-1, foi detectada uma atividade de luciferase significativamente maior nas construções com o promotor de CYP21B. Por outro lado, verificou-se em células COS-1 uma expressão constitutiva dos dois promotores, sem diferença significativa entre eles, o que indicaria a importância de fatores de regulação na expressão gênica, tais como ACTH e AMPc.

Além da região promotora, é possível que a conversão gênica no alelo em questão tenha atingido o exon 1 (figura 22A). Desta forma, a mutação P30L, normalmente presente em CYP21A, ocorreria no alelo convertido. Análises da atividade enzimática de proteínas mutantes demonstraram que P30L resulta em 20 - 60 % da atividade normal, estando associada à forma não clássica da deficiência de 21-hidroxilase (Tisue-Luna *et al.*, 1991; Higashi *et al.*, 1991). Considerando-se o efeito desta mutação, seria esperado que o indivíduo afetado da família 19 apresentasse a forma clínica não clássica, já que em geral o fenótipo é determinado pelo alelo com a mutação menos severa. Por outro lado, é possível que a suposta mutação P30L, associada com a região promotora de CYP21A, determine uma perda de atividade enzimática compatível com a forma clínica virilizante simples. Futuramente, a presença da mutação P30L será averiguada nas famílias onde a conversão gênica provavelmente não se estendeu por todo o gene, o que auxiliará na correlação entre genótipos e fenótipos nestas famílias.

Nas famílias 60 e 61, aparentadas à família 19, observou-se a mutação I172N em heterozigose no filho afetado (figura 13, amostra 5). Em outras palavras, aqui também ocorreu amplificação de ambos alelos. Com base nestes resultados, pode-se dizer a princípio que o ponto de quebra da conversão gênica está entre os sítios *Taq* I e *Kpn* I e a região de anelamento dos “primers” no exon 3. Considerando-se que essas famílias são aparentadas à família 19, pode-se inferir que a conversão não atingiu a região da mutação Sp2 (figura 22A). A extensão exata da conversão poderá ser determinada através de sequenciamento, que será efetuado posteriormente. As famílias 60 e 61 não apresentam entretanto discordância entre genótipos e fenótipos pois são portadoras da mutação I172N. Considerando-se que esta mutação está relacionada à forma clínica virilizante simples (Chiou *et al.*, 1990; Tusie-Luna *et al.*, 1990; Higashi *et al.*, 1991) e que conforme

discutido acima, a atividade enzimática do alelo convertido é também compatível com esta forma clínica, o fenótipo esperado para as famílias 60 e 61 seria de fato virilizante simples.

Eventos de conversão gênica que provavelmente não se estendem por todo o gene foram observados também na família 20, que não entrou nessa casuística por apresentar conversão gênica em homozigose, mas será citada aqui por ilustrar essa discussão. A detecção por “Southern blotting” de conversão gênica envolvendo os sítios *Taq* I e *Kpn* I em ambos os pais e em homozigose na filha afetada nos levou à conclusão de que a doença nesse caso seria causada pela ausência completa de alelos CYP21B, embora estranhamente o fenótipo apresentado fosse virilizante simples. Posteriormente, pensou-se em utilizar o DNA da filha afetada da família 20 como controle negativo de amplificação, já que supostamente não possuiria nenhuma cópia de CYP21B. Contrariando o esperado, obteve-se produtos de amplificação tanto com os “primers” DP1/DP2 como com os “primers” DP3/DP4. A presença de mutações foi investigada, mas nenhuma delas foi encontrada.

Na família 13 foi também detectada por “Southern blotting” uma conversão gênica envolvendo os sítios *Taq* I e *Kpn* I na mãe e na filha afetada. Por outro lado, a hibridização com sondas correspondentes às mutações I172N e V281L revelaram sinais positivos tanto com as sondas normais como com as mutantes (figura 14, amostra 6). Como nos casos anteriores, estes resultados também nos permitiram concluir que o alelo convertido proveniente da mãe também foi amplificado, pois a conversão não teria atingido o sítio de anelamento do “primer” DP2 no exon 3. Neste caso, o ponto de quebra estaria entre os sítios *Taq* I e *Kpn* I e a região de anelamento do “primers” no exon 3.

Embora as famílias 13, 19 e 20 não tenham relatado parentesco entre si, é provável que se trate do mesmo alelo, pois em todas elas o alelo convertido está ligado ao alelo de HLA-DR8 (Ramos *et al.*, 1994). As famílias 13, 19 e 20 provêm da mesma região geográfica (sul do estado de Minas Gerais), o que pode indicar a existência de um ancestral comum entre elas, do qual teria sido herdado o alelo convertido associado ao HLA-DR8.

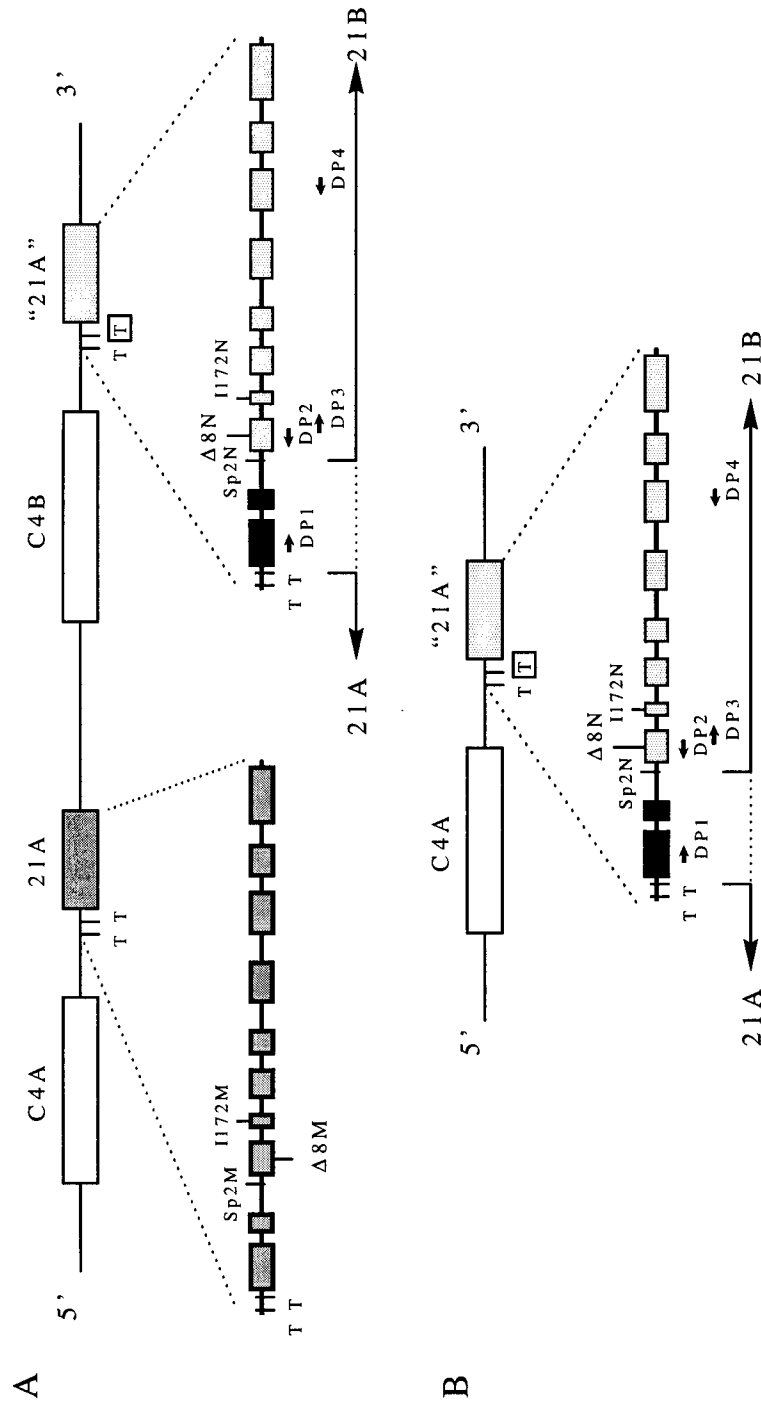


Figura 22: Esquema representando os alelos convertidos das famílias 19, 60 e 61 (A) e 23 (B), onde os eventos de conversão gênica e deleção não se estenderam por todo o gene CYP21B. T = sítio de restrição *Taq I*. Os sítios representados permitem a distinção entre CYP21A e CYP21B (sítio em destaque é característico de CYP21A, indicando a conversão gênica). Nas ampliações, os retângulos representam os exons e as linhas os introns dos genes. As setas pequenas indicam a posição de anelamento e a orientação dos “primers”. N = sequências normais, M = sequências mutadas. Tanto na família 19 como na 23, a presença da sequência Δ8 normal possibilitou o anelamento dos “primers” DP2 e DP3, amplificando os alelos. O ponto de quebra entre as sequências correspondentes a CYP21A e CYP21B está na região escura.

Observações semelhantes aos casos das famílias 13, 19, 20, 60 e 61 repetiram-se com a família 23, mas aqui experimentos de “Southern blotting” detectaram deleção da unidade C4B+CYP21B no alelo proveniente do pai. A exemplo dos casos de conversão gênica, obteve-se produtos de amplificação com os “primers” DP1/DP2 provavelmente a partir dos dois alelos da filha afetada, que hibridizaram com os alelos normal e mutante em relação à mutação Sp2 (figura 11, amostra 5). A partir daí concluiu-se que a deleção não atingiu o sítio de anelamento do “primer” DP2 no exon 3.

Normalmente, nos casos de deleção forma-se um gene híbrido com extremidade 5' de CYP21A e 3' de CYP21B (White *et al.*, 1988). Na família 23, provavelmente o híbrido seja formado somente pela região promotora do pseudogene e o restante são seqüências do gene ativo (figura 22B). O seqüenciamento do alelo poderá revelar com exatidão o ponto de quebra entre as porções características de CYP21A e CYP21B.

3. Alelos com mais de uma mutação

Em algumas famílias, verificaram-se alelos com mais de uma mutação. A confirmação de que duas mutações identificadas provêm de um mesmo alelo é possível pelo estudo das famílias completas, onde observa-se a segregação das mutações.

A ocorrência em um mesmo alelo de duas ou mais mutações em posições vizinhas no gene pode ser entendida como eventos de microconversão que se estenderam por regiões maiores do gene CYP21B. As famílias 14 e 48 possuem alelos com as mutações Q381X e R356W, ambas situadas no exon 8 (tabela 4, figura 15). Já na família 4 o evento de microconversão foi mais abrangente, originando um alelo com as mutações Q381X, R356W e F306+, esta última localizada no exon 7 (tabela 5, figura 16).

As famílias 13 e 43 apresentam também mais de uma mutação em um mesmo alelo mas, ao contrário dos casos anteriores, as mutações identificadas não estão localizadas próximas entre si. Na família 13, por exemplo, verificou-se a presença das mutações I172N (exon 4) e V281L (exon 7) no pai e na filha afetada (tabela 5, figura 14, amostras 3 e 6). Por outro lado, a mutação CL6, localizada no exon 6 entre as mutações I172N e V281L, está ausente neste alelo. Sendo assim, a ocorrência das mutações I172N e V281L não pode ser atribuída a um único evento de microconversão: provavelmente é resultado de dois eventos independentes.

Na família 43 foram identificadas as mutações Sp2 (intron 2) e V281L (exon 7), transmitidas do pai para o filho afetado (tabela 5, figura 17). Estranhamente, a hibridização no pai revela a presença de Sp2 em homozigose ou hemizigose, uma vez que não foram detectados sinais positivos com a sonda normal (figura 17A, amostra 3). Nesta família, também a mãe apresenta duas mutações, Q381X e R356W (figuras 17C e 17 D, amostra 4), porém aparentemente o filho herdou apenas R356W (figuras 17C e 17 D, amostra 5), o que indicaria que estão em cromossomos diferentes. A família 43 constitui portanto um caso bastante complexo, que será discutido adiante.

Alelos com mais de uma mutação foram verificados também em outros estudos (Speiser *et al.*, 1992; Wedell *et al.*, 1994a, 1994b, 1994c; Wilson *et al.*, 1995b). Os alelos descritos por Wedell *et al.* (1994b) apresentam duplicações de CYP21B, sendo que as mutações localizam-se nas duas cópias gênicas. Este caso é semelhante ao alelo encontrado na mãe da família 43, embora a metodologia empregada em nosso estudo não permita determinar com certeza se as mutações encontram-se em cópias gênicas diferentes.

Conforme ressaltam Wedell *et al.* (1994a), a ocorrência de alelos com mais de uma mutação torna muito importante o estudo da segregação das mutações nas famílias, para possibilitar uma avaliação correta do genótipo e conseqüentemente do diagnóstico.

4. Alelos não determinados

Em 11 alelos não foi identificada nenhuma das 8 microconversões analisadas, o que corresponde a aproximadamente 16 % do total de alelos não relacionados de 37 famílias ou 18,6 % dos alelos estudados quanto a mutações pontuais. Em 6 famílias diagnosticou-se apenas um dos alelos e em 3 (famílias 8, 41 e 44) nenhuma alteração foi verificada. A família 41 é constituída por casamento consanguíneo, assim apresenta um só alelo. Já nas famílias 8 e 44 o esperado seria a identificação de dois alelos afetados.

Essa proporção não difere muito em relação a outros estudos populacionais descritos na literatura (tabela 9). As porcentagens obtidas provavelmente dependem da amostra, do número de mutações analisadas e da metodologia empregada. Nesses estudos foram investigadas também as deleções e conversões gênicas envolvendo os sítios *Taq I* e *Kpn I*.

Algumas hipóteses podem ser propostas para tentar explicar estas observações. Em primeiro lugar, é possível que esses alelos sejam afetados por mutações não testadas neste trabalho. As mutações estudadas foram escolhidas por serem geralmente citadas como freqüentes nas populações (Mornet *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992; Wedell *et al.*, 1994c; Wilson *et al.*, 1995a, 1995b). Estão normalmente presentes no CYP21A, ocorrendo no CYP21B provavelmente por eventos de microconversão. Além disso, estão correlacionadas com a forma clássica da deficiência de 21-hidroxilase (formas perdedoras de sal e virilizante simples) (Higashi *et al.*, 1988b, 1991; Tusie-Luna *et al.*, 1990; Chiou *et al.*, 1990; Mornet *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992), na qual foram enquadrados os pacientes analisados. A única exceção é a mutação V281L, relacionada com a forma não clássica (Speiser *et al.*, 1988), que foi estudada para verificar sua possível ocorrência em heterozigose com mutações clássicas, embora geralmente considere-se que o fenótipo seja determinado pela mutação menos severa.

Por outro lado, outras mutações têm sido descritas em baixas freqüências, geralmente ausentes nos alelos CYP21A (Owerbach *et al.*, 1992c; Wedell *et al.*, 1992; Wedell & Luthman, 1993a) (vide introdução, item 5.2). Algumas destas eventualmente podem estar ocorrendo nos alelos não diagnosticados. Há ainda a possibilidade de se tratarem de mutações ainda não descritas na literatura. O sequenciamento dos alelos provavelmente poderá confirmar ou excluir essas hipóteses, e será realizado futuramente.

Outra questão a ser considerada, em especial nos casos onde nenhuma mutação foi identificada, é a possibilidade das famílias não serem afetadas por deficiência de 21-hidroxilase, e sim por deficiências de outras enzimas envolvidas na esteroidogênese e portanto determinantes de HCA. Dificuldades enfrentadas no diagnóstico podem levar a estas dúvidas. De fato, uma possível deficiência da enzima 11 β -hidroxilase foi cogitada no caso da família 8, com base em características fenotípicas dos irmãos afetados. Para a confirmação desta hipótese, seria importante a dosagem laboratorial de 11-desoxicortisol, que é precursor da enzima 11 β -hidroxilase e portanto apresentaria níveis elevados no caso de deficiência desta enzima. Entretanto, tais exames não foram possíveis, dificultando o diagnóstico. O *locus* que codifica a enzima 11 β -hidroxilase, mapeado no cromossomo 8 (Chua *et al.*, 1987), será então estudado na família 8. As demais serão submetidas a novos exames diagnósticos e, dependendo dos resultados, serão estudadas quanto a enzima 11 β -hidroxilase ou outras supostas causas de HCA.

Mesmo nos casos onde uma mutação foi encontrada, não se pode excluir essa hipótese: pela alta frequência de heterozigotos na população em geral (Pang *et al.*, 1988), é possível que um indivíduo seja afetado pela deficiência de outra enzima da esteroidogênese e por coincidência seja heterozigoto para 21-hidroxilase. A família 8 inclusive é portadora da mutação Q318X, que ocorre apenas no pai e na filha normal. Este mesmo alelo apresenta uma duplicação de CYP21B, havendo então uma cópia gênica provavelmente normal.

Nos casos onde a mutação identificada ocorre nos indivíduos afetados, e ao mesmo tempo o gene CYP21B não está duplicado, a probabilidade de se tratar de deficiência de outra enzima é menor, porém não pode ser excluída. Na família 24, por exemplo, foram identificadas as mutações I172N no pai e na filha afetada e V281L, apenas na mãe (tabela 7). Caso o alelo da mãe que foi transmitido à filha apresente alguma mutação ainda não identificada, a mãe possuiria dois alelos afetados e portanto seria doente, o que na verdade não ocorre. Deste modo, estes resultados são indicativos de que a família 24 pode ser afetada por deficiência de outra enzima, que não 21-hidroxilase.

Outra possibilidade é a existência de apenas uma mutação, determinando a elevação nas dosagens de 17-OHP e levando ao diagnóstico da doença. Tal hipótese pode ser apoiada pelas observações de Tusie-Luna *et al.* (1990), que verificaram que indivíduos heterozigotos para alelos mutantes apresentam diminuição da atividade enzimática em relação aos homozigotos normais, além de aumento de 17-OHP. Alterações nas dosagens de 17-OHP foram realmente observadas no segundo filho da família 2. Baseando-se no histórico de deficiência de 21-hidroxilase na família (primeiro filho afetado), foram realizadas dosagens hormonais e diagnosticada a doença nesse indivíduo, que foi então medicado durante alguns anos conforme o procedimento utilizado para crianças afetadas. Posteriormente, a determinação do genótipo (heterozigoto para a mutação Sp2) e novos testes laboratoriais indicaram que a suspensão do tratamento provavelmente não causaria danos ao indivíduo, como de fato ocorreu.

Hoffman *et al.* (1996) descreveram o caso de uma paciente com a forma clínica perdedora de sal diagnosticada ao nascimento. Aos 17 anos de idade, o tratamento foi interrompido, sem que houvesse manifestação dos sintomas. Estudos moleculares demonstraram que a paciente é heterozigota para a mutação Sp2. É possível que casos como esses possam ser repetidos com outras crianças.

Deve-se também considerar a hipótese da heterozigose para uma mutação resultar em fenótipo alterado. Por exemplo, Wilson *et al.* (1995b) descreveram dois pacientes de uma mesma família afetados pela deficiência de 21-hidroxilase, onde apenas uma mutação foi identificada. O seqüenciamento dos alelos não revelou nenhuma outra alteração que pudesse justificar a doença, embora a região promotora não tenha sido completamente seqüenciada.

As famílias 11 e 26 constituem situações particulares, onde foi diagnosticada apenas uma mutação (respectivamente Sp2 e R356W), aparentemente em hemizigose nos indivíduos afetados (figura 18, amostras 5 e 6; figura 19, amostra 5). Nas duas famílias, as mutações foram transmitidas pela mãe, sendo que nos pais não foram encontradas nenhuma das mutações testadas. Já que os experimentos de “Southern blotting” e hibridização de sondas de CYP21 e C4 não revelaram deleções ou conversões gênicas que pudessem justificar a doença, pensou-se imediatamente na possibilidade de se tratar da mutação $\Delta 8$. Os alelos afetados por esta mutação não são amplificados pela estratégia de PCR utilizada, o que explicaria os resultados obtidos. Tal hipótese entretanto não se confirmou após experimentos de PCR alelo-específico nas duas famílias (figura 21, amostras 3 e 4). A possibilidade de tratar-se de paternidade alternativa foi afastada após análises em *loci* do sistema HLA.

Embora as análises por “Southern blotting” não tenham revelado deleções ou conversões gênicas, é possível que uma suposta alteração numérica eventualmente esteja encoberta. Por exemplo, havendo no mesmo indivíduo uma deleção gênica e uma duplicação, o padrão observado na hibridização será normal. Caso uma suposta cópia gênica duplicada seja um híbrido entre CYP21B e CYP21A, como de fato pode ocorrer (Helmberg, 1993), o alelo em questão terá alterações que possam explicar os resultados obtidos.

Uma segunda possibilidade, principalmente para o caso da família 26, é a ocorrência da mutação R356W na meiose paterna. Este evento resultaria em homozigose para R356W na filha afetada, e por outro lado a mutação não seria detectada no pai, o que é compatível com os resultados de hibridização obtidos (figura 19, amostras 3 e 5). Na família 11 esta hipótese é menos provável, já que há duas filhas com o mesmo padrão de hibridização com sondas para Sp2. Sendo assim, seria necessário ocorrer duas vezes o evento de mutação *de novo* na meiose paterna.

No caso da família 26, foi verificado por “Southern blotting” e hibridização com sondas de C4 um padrão não convencional: em “blots” produzidos por digestão com a enzima *Taq* I, a sonda reconhece um fragmento com o mesmo peso molecular dos correspondentes a CYP21B (Araujo, 1996). A clonagem e seqüenciamento deste fragmento serão efetuados para se determinar sua natureza: é possível que por alguma razão a sonda correspondente a C4 esteja reconhecendo parte do gene CYP21B, ou pode tratar-se de uma coincidência de pesos moleculares. De qualquer modo, o padrão alterado ocorreu na mãe e foi herdado pela filhas afetada e normal. Sendo assim, está presente no mesmo alelo da mutação R356W e portanto é provável que não esteja diretamente relacionado à doença.

A filha afetada da família 26, além da deficiência de 21-hidroxilase, apresenta síndrome de Turner (Maciel-Guerra *et al.*, 1997). Outros estudos têm correlacionado síndrome de Turner com deficiência de 21-hidroxilase, sugerindo que a frequência de heterozigotos para o *locus* CYP21 seja maior entre pacientes afetados pela síndrome de Turner do que na população em geral (Larizza *et al.*, 1994).

Um ponto interessante na família 11 é o fato de um dos filhos apresentar resultados de hidridização com as sondas Sp2 diferentes dos irmãos, embora todos sejam considerados afetados (figura 17, amostra 7). Os resultados indicariam que esse filho seria apenas portador. Situações onde irmãos apresentam genótipos e fenótipos discordantes foram descritas por vários autores, sendo algumas delas esclarecidas com a constatação de mutações *de novo* (Tajima *et al.*, 1993a; Collier *et al.*, 1993). A ocorrência de uma mutação *de novo* foi então cogitada para explicar este caso, porém nenhuma das mutações estudadas, com exceção de Sp2, está presente neste indivíduo. Este resultado não permite entretanto a exclusão da hipótese, já que é possível tratar-se de alguma mutação rara e por isso não incluída neste estudo.

A família 43 também apresentou resultados curiosos. Embora tenham sido identificadas nos dois alelos alterações associadas à doença (mutações e conversão gênica envolvendo os sítios *Taq* I e *Kpn* I), os genótipos dos indivíduos desta família ainda não foram elucidados. Foram identificadas as mutações Sp2 e V281L no pai e no filho afetado (tabela 5, figuras 17A e 17B). De acordo com estudos baseados em “Southern blotting”, o pai também transmitiu ao filho uma conversão gênica envolvendo os sítios *Taq* I e *Kpn* I e uma duplicação da unidade CYP21A+C4B, que estariam portanto no mesmo alelo das mutações. Contrariando o esperado, as hibridizações com sondas correspondentes a Sp2

no pai revelaram a presença desta mutação em homozigose ou hemizigose (figura 17A, amostra 3), o que não é compatível com seu fenótipo considerado normal.

Schulze *et al.* (1995) descreveram observações semelhantes: entre familiares normais de seus pacientes, havia indivíduos homozigotos ou hemizigotos para a mutação Sp2. Todos eram assintomáticos para HCA, e testes de estimulação por ACTH em dois indivíduos resultaram em aumentos de 17-OHP comparáveis apenas a heterozigotos. Embora os estudos *in vitro* indiquem que a mutação Sp2 resulta em dados severos à proteína (Higashi *et al.*, 1988b, 1991), os autores propõem que estes dados não estejam refletindo as condições *in vivo*, onde há influência de fatores de transcrição e regulação por ACTH. Assim, alguns alelos portadores da mutação Sp2 poderiam produzir níveis altos de mRNA normal. Uma segunda possibilidade é a ocorrência de uma mutação ainda não determinada, que poderia reverter os efeitos da mutação Sp2.

Na família 43, também a mãe apresenta duas mutações, Q381X e R356W (figuras 17C e 17D, amostra 4), porém aparentemente o filho herdou apenas R356W (figuras 17C e 17D, amostra 5), o que indicaria que estão em cromossomos diferentes. Considerando que Q318X esteja no alelo que não foi transmitido ao filho, a cópia duplicada de CYP21B deveria garantir ao filho um fenótipo normal. Por outro lado, se considerarmos que o alelo CYP21B duplicado seja na verdade um híbrido CYP21B/CYP21A (Helmberg, 1993), a mãe também seria afetada e provavelmente não seria fértil.

A ocorrência de pais com duas mutações foi também descrita por Witchel *et al.* (1996), que verificaram em pais pertencentes a duas famílias diferentes a mutação Sp2 em heterozigose com Q318X, esta última não herdada pelos filhos afetados. Dosagens de 17-OHP nos pais em questão revelaram taxas compatíveis com indivíduos heterozigotos ou pacientes afetados pela forma não clássica da doença, embora as mutações Sp2 e Q318X estejam normalmente relacionadas à forma clínica perdedora de sal.

Não se pode descartar a hipótese de artefatos do método: é possível que as várias cópias gênicas existentes nos alelos sejam por alguma razão amplificadas diferencialmente na reação de PCR. Além disso, os experimentos de “Southern blotting” podem não estar revelando o número real de cópias desses alelos.

Day *et al.* (1996) apontam os artefatos de técnica como as explicações mais prováveis para a ocorrência de indivíduos homozigotos para Sp2 e fenotipicamente normais.

Análises da segregação das mutações através do estudo de microssatélites, aliadas a cálculos da frequência Sp2 na população em geral e a ampliações por PCR com diversos pares de “primers” indicam que possivelmente alguns alelos normais quanto a Sp2 por algum motivo não são amplificados na região do intron 2.

Esta família está sendo atualmente estudada através de eletroforese em campo pulsado (vide introdução, item 7), na tentativa de elucidar os rearranjos numéricos.

CONCLUSÕES

Após a análise de microconversões em 59 alelos de indivíduos afetados pela forma clássica da deficiência de 21-hidroxilase, foi identificada pelo menos uma microconversão, dentre as 8 investigadas, em 48 alelos (81,35 %).

A mutação Sp2 foi a mais freqüente em nossa amostra, correspondendo a aproximadamente 31 % dos alelos afetados por microconversões. A mutação CL6, por outro lado, não foi identificada em nenhum dos alelos e a mutação $\Delta 8$ em apenas um alelo.

As mutações Sp2 e Q318X ocorreram em maior proporção em alelos de pacientes afetados pela forma clínica perdedora de sal e I172N foi a mutação mais freqüente na forma virilizante simples.

Foram identificados 11 alelos diferentes nos indivíduos afetados, pela combinação das 7 microconversões encontradas.

Foram identificados alelos com mais de uma mutação em 5 famílias, sendo que em 3 delas as mutações estão em posições vizinhas e portanto foram geradas por eventos únicos de microconversão e em 2 as mutações provavelmente ocorreram por eventos independentes.

Na maioria das 37 famílias estudadas, os fenótipos estão de acordo com os genótipos identificados pela análise das microconversões e por estudos anteriores baseados em “Southern blotting”, embora haja famílias com padrões discordantes.

A análise de microconversões permitiu a reinterpretação dos estudos baseados em “Southern blotting”: em 5 famílias (3 delas aparentadas entre si) os eventos de deleção e conversão gênica envolvendo os sítios *Taq* I e *Kpn* I não se estenderam por todo o gene.

BIBLIOGRAFIA

- AL-OTHMAN, A.N.; DOCHERTY, K.; MAKGOBA, M.W.; SHEPPARD, M.C.; LONDON, D.R., DNA and RNA analysis of cytochrome P-450 21-hydroxylase: transcriptional activity in congenital adrenal hyperplasia . *J. Mol. Endocr. 1*: 157-164 (1988)
- 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)
- ARAUJO, M., Estudo da organização molecular do “cluster” gênico CYP21 e C4 em famílias com a forma clássica de deficiência da 21-hidroxilase no Brasil, Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (1996)
- ARAUJO, M.; SANCHES, M.R.; SUZUKI, L.A.; GUERRA JR., G.; FARAH, S.B.; DE MELLO, M.P., Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29: 1-13 (1996)
- BORNANN, M.; KOCHHAN, L.; KNORR, D.; BIDLINGMAIER, F.; OLEK, K., Clinical heterogeneity of 21-hydroxylase deficiency of sibs with identical 21-hydroxylase genes, *Acta Endocrinol.* 126: 7-9 (1992)
- BRISTOW, J.; TEE, M.K.; GITELMAN, S.E.; MELLON, S.H.; MILLER, W.L., Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B, *J. Cell Biol.* 122: 265-278 (1993a)
- BRISTOW, J.; GITELMAN, S.E.; TEE, M.K.; STAELS, B.; MILLER, W.L., Abundant adrenal-specific transcription of the human P450c21A “pseudogene”, *J. Biol. Chem.* 268: 12919-12924 (1993b)
- BUMPUS, J.A. & DUS, K.M., *J. Biol. Chem.* 257: 12696 (1982), apud Kronbach *et al.* (1991)
- BUTLER, G.C. & MARRIAN, G.F., The isolation of pregnane -3, 17, 20-triol from the urine of women showing the adrenogenital syndrome, *J. Biol. Chem.* 119: 565 (1937), apud New *et al.* (1989)

- CALLIARI, L.E.P., Hiperplasia adrenal congênita, em *Endocrinologia para a pediatria*, Monte, O. & Carlos, A. (ed.), Editora Rio de Janeiro, p. 115-124 (1992)
- CARRERA, P.; FERRARI, M.; BECCARO, F.; SPIGA, I.; ZANUSSI, M.; RIGON, F.; BRAGGION, F.; ZACCHELLO, F.; GREGGIO, N., Molecular characterization of 21-hydroxylase deficiency in 70 Italian families, *Hum. Hered.* 43: 190-196 (1993)
- CARROLL, M.C.; CAMPBELL, R.D.; PORTER, R.R., Mapping the steroid 21-hydroxylase adjacent complement component C4 genes in HLA major histocompatibility complex in man, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 521-525 (1985a)
- CARROLL, M.C.; PALSDOTTIR, A.; BELT, K. T.; PORTER, R.R., Deletion of complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes in the HLA class III region, *EMBO J.* 4: 2547-2552 (1985b)
- CHANDERBHAN, R.F.; KHARROUBI, A.T.; NOLAND, B.J.; SCALLEN, T.J.; VAHOUNY, G.V., Sterol carrier protein: Further evidence for its role in steroidogenesis, *Endocr. Res.* 12: 351 (1986), apud New *et al.* (1989)
- CHANG, S.F. & CHUNG, B.C., Difference in transcriptional activity of two homologous CYP21A genes, *Mol. Endocrinol.* 9: 1330-1336 (1995)
- CHILDS, B.; GRUMBACH, M.M.; VAN WYK, J.J., Virilizing adrenal hyperplasia: genetic and hormonal studies, *J. Clin. Invest.* 35: 213-222 (1956), apud Donohoue & Migeon (1991)
- CHIOU, S.H.; HU, M.C.; CHUNG, B., A missense mutation at Ile¹⁷² → Asn or Arg³⁵⁶ → Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency, *J. Biol. Chem.* 265: 3549-3552 (1990)
- CHIQUET-EHRISMAN, R.; KALLA, P.; PEARSON, C.A.; BECK, K.; CHIQUET, M., Tenascin interferes with fibronectin action, *Cell* 53: 383-390 (1988), apud Bristow *et al.* (1993a)
- CHUA, S.C.; SZABO, P.; VITEK, A.; GRZESCHIK, K.H.; JOHN, M.; WHITE, P.C., Cloning of cDNA encoding steroid 11-beta-hydroxylase (P450C11), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84: 7193-7197 (1987)

- COLLIER, S.; SINNOTT, P.J.; DYER, P.A.; PRICE, D.A.; HARRIS, R.; STRACHAN, T., Pulsed field electrophoresis identifies a high degree of variability in the number of tandem 21-hydroxylase and complement C4 gene repeats in 21-hydroxylase deficiency haplotypes, *EMBO J.* 8: 1393-1402 (1989)
- 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)
- COLLIER, S.; TASSABEHJI, M.; STRACHAN, T., A *de novo* pathological point mutation at the 21-hydroxylase *locus*: implications for gene conversion in the human genome, *Nature Genetics* 3: 260-265 (1993)
- COULLIN, P.; NICOLAS, H.; BOUE, J.; BOUE, A., HLA typing of amniotic fluid cells applied to prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia, *Lancet* 1: 1076 (1979), apud New *et al.* (1989)
- DAY, D.J.; SPEISER, P.W.; SCHULZE, E.; BETTENDORF, M.; FITNESS, J.; BARANY, F.; WHITE, P.C., Identification of non-amplifying CYP21 genes when using PCR-based diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia (CAH) affected pedigrees, *Hum. Molec. gen.* 5: 2039-2048 (1996)
- De CRECHIO, L., Sopra un caso di apparenze virili in una donna, *Morgagni* 7: 151 (1865), apud Helmberg (1993)
- DOBBIE, J.W.; MACKAY, A.M.; SYMINGTON, T., The structure and functional zonation of the human cortex, in James VHT, Landon J (eds): *The Investigation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Function (Mem Soc Endocrinol*, vol 17) Cambridge, Cambridge University Press, p. 103 (1968), apud New *et al.* (1989)
- DONOHOU, P.A. & COLLINS, M.M., The human complement C4B/steroid 21-hydroxylase (CYP21) and complement C4A/21-hydroxylase pseudogene (CYP21P) intergenic sequences: comparison and identification of possible regulatory elements, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 256-262 (1992)

- DONOHOU, P. A.; VAN DOP, C.; McLEAN, R.H.; WHITE, P. C.; JOSPE, N.; MIGEON, C.J., Gene conversion in salt-losing congenital adrenal hyperplasia with absent complement C4 protein, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 62: 995-1002 (1986a)
- 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: 722-729 (1986b)
- DONOHOU, P.A.; NETO, R.S.; COLLINS, M.M.; MIGEON, C.J.; Exon 7 *Nco* I restriction site within CYP21B (steroid 21-hydroxylase) is a normal polymorphism, *Molec. Endocrinol.* 4: 1354-1362 (1990)
- DUNHAM, I.; SARGENT, C.A.; TROWSDALE, J.; CAMPBELL, R.D., Molecular map of the human major histocompatibility complex in man, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7237-7241 (1989)
- DUPONT, B.; OBERFIELD, S.E.; SMITHWICK, E.M.; LEE, T.D.; LEVINE, L.S., Close genetic linkage between HLA and congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency), *The Lancet* 31: 1309-1312 (1977)
- ENDO, A.; NATSUME, H.; IGARASHI, Y., Dual regulation of 21-hydroxylase activity by sex steroid in rat hepatocytes, *J. Steroid Mol. Biol.* 54: 163-165 (1995)
- 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)
- FIET, J.; GUEUX, B.; GOURMELEN, M., Comparison of basal and adrenocorticotrophin-stimulated plasma 21-deoxycortisol and 17-hydroxiprogesterone values as biological markers of late-onset adrenal hyperplasia, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 66: 659-667 (1988), apud Miller (1994)
- 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.; WELL, B.A.; HORTON, R., Elevated amniotic fluid concentration of 17-hydroxyprogesterone in congenital adrenal hyperplasia, *J. Pediatr.* 86: 310 (1975), apud New *et al.* (1989)
- GARLEPP, M.J.; WILTON, A.N.; DAWKINS, R.L.; WHITE, P.C., Rearrangement of 21-hydroxylase genes in disease-associated MHC supratypes, *Immunogenetics* 23: 100-105 (1986)
- GITELMAN, S.E.; BRISTOW, J.; MILLER, W.L., Mechanism and consequences of the duplication of the human C4/P450c21/gene X locus, *Mol. Cell Biol.* 12: 2124-2134 (1992)
- GLOBERMAN, H.; AMOR, M.; PARKER, K.L.; NEW, M.I.; WHITE, P.C., Nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency, *J. Clin. Invest.* 82: 139-144 (1988)
- 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. Nat. Acad. Sci. USA* 84: 8091-8094 (1987)
- HELMBERG, A., Twin genes and endocrine disease: CYP21 and CYP11B genes, *Acta Endocrinol.* 129: 97-108 (1993)
- HELMBERG, A.; TUSIE-LUNA, M.T.; TABARELLI M.; KOFLER, R.; WHITE, P.C., R339H and P453: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions, *Mol. Endocrinol.* 6: 1318-1322 (1992a)
- HELMBERG, A.; TABARELLI, M.; FUCHS, M.A.; KELLER, E.; DOBLER, G.; SCHNEGG, I.; KNORR, D.; ALBERT, E.; KOFLER, R., 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 (1992b)
- HEJTMANCIK, J.F.; BLACK, S.; HARRIS, S.; WARD, P.A.; CALLAWAY, C.; LEDBETTER, D.; MORRIS, J.; LEECH, S.H.; POLLACK, M.S., Congenital 21-hydroxylase deficiency as a new deletion mutation: detection in a proband during subsequent prenatal diagnosis by HLA typing and DNA analysis, *Hum. Immunol.* 35: 246-252 (1992)

- HIGASHI, Y; YOSHIOKA, H.; YAMANE, M.; GOTOH, O.; FUJI-KURIYAMA, Y., Complete nucleotide sequence of 2 steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2841-2845 (1986)
- HIGASHI, Y; TANAE, A.; INOUE, H.; FUJI-KURIYAMA, Y., Evidence for frequent conversion in the steroid 21-hydroxylase P-450 (C21) gene: implications for steroid 21-hydroxylase deficiency, *Am. J. Hum. Genet.* 42: 17-25 (1988a)
- HIGASHI, Y; TANAE, A.; INOUE, H.; HIROSAMA, T.; FUJI-KURIYAMA, Y., Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P450(C21)] deficiency in humans: possible gene conversion products, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7486-7490 (1988b)
- HIGASHI, Y; HIROSAMA, T.; TANAE, A.; MIKI, T.; NAKURA, J.; KONDO, T.; OHURA, T.; OGAWA, E.; NAKAYAMA, K. & FUJI-KURIYAMA, Y., Effects of individual mutations in the P- 450 (C21) pseudogene on the P-450 (C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency, *J. Biochem.* 109: 638 - 644 (1991)
- HOFFMAN, W.H.; SHIN, M.Y.; DONOHOUE, P.A.; HELMAN, S.W.; BROWN, S.L.; ROSCULET, G.; MAHESH, V.B., Phenotypic evolution of classic 21-hydroxylase deficiency, *Clin. Endocrinol.* 45: 103-109 (1996)
- HORNSBY, P.J., Physiological and pathological effects of steroids on the function of the adrenal cortex, *J. Steroid Biochem.* 27: 1161 (1987), apud New *et al.* (1989)
- HUGHES, I.A. & LAURENCE, K.M., Antenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia, *Lancet* 2: 7 (1979), apud New *et al.* (1989)
- JEFFCOATE, T.N.A.; FLEIGNER, J.R.H.; RUSSELL, S.H.; DAVIS, J.C.; WADE, A.P., Diagnosis of adrenogenital syndrome before birth, *Lancet* 2: 553 (1965), apud New *et al.* (1989)

- 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)
- KAGAWA, N. & WATERMAN, M.R., Purification and characterization of a transcription factor which appears to regulate cAMP responsiveness of the human CYP21B gene, *J. Biol. Chem.* 267: 25213-25219 (1992)
- KILLEEN, A.A.; SANE, K.S.; ORR, H.T., Molecular and endocrine characterization of mutation involving a recombination between the steroid 21-hydroxylase functional gene and pseudogene, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 38: 677-686 (1991)
- KOMINAMI, S.; OCHI, H.; KOBAYASHI, Y.; TAKEMORI, S., Studies on the steroid hydroxylation system in adrenal cortex microsomes, *J. Biol. Chem.* 255: 3386-3394 (1980)
- KOURILSKY, P., Molecular mechanisms for gene conversion in higher cells, *Trends Genet.* 2: 60-63 (1986)
- KRONBACH, T.; KEMPER, B.; JOHNSON, E.F., A hypervariable region of P450IIC5 confers progesterone 21-hydroxylase activity to P450IIC1, *Biochemistry* 30: 6097-6102 (1991)
- KYLLO, J.H.; COLLINS, M.M.; DONOHOUE P.A., Constitutive human steroid 21-hydroxylase promoter gene and pseudogene activity in steroidogenic and nonsteroidogenic cells wit the luciferase gene as a reporter, *Endocrinol. Res.* 21: 777-791 (1995)
- LAJIC, S. & WEDELL, A., An intron 1 splice mutation and a nonsense mutation (W23X) in CYP21 causing severe congenital adrenal hyperplasia, *Hum. Genet.* 98: 182-184 (1996)
- LARIZZA, D.; CUCCIA, M.; MARTINETTI, M.; MAGHNIE, M.; DONDI, E.; SALVANESCHI, L.; SEVERI, F., Adrenocorticotrophin stimulation and HLA polymorphisms suggest a high frequency of heterozygosity for steroid 21-hydroxylase deficiency in patients with Turner's syndrome and their families, *Clin. Endocrinol.* 40: 39-45 (1994)

- LEVINE, L.S.; ZACHMANN, M.; NEW, M.I.; PRADER, A.; POLLACK, M.S.; O'NEIL, G.J.; YANG, S.Y.; OBERFIELD, S.E.; DUPONT, B., Genetic mapping of the 21-hydroxylase deficiency gene within the HLA linkage group, *New Engl. J. Med.* 299: 911-915 (1978)
- MACIEL-GUERRA, A.T.; GUERRA Jr. G.; MARINI, S.H.V.L.; BAPTISTA, M.T.M.; MARQUES-de-FARIA, A.P., Female pseudohermaphroditism due 21-hydroxylase deficiency in a girl with Turner syndrome, *Clin. Genet.* (no prelo) (1997)
- MASON, H.L. & KEPLER, E.J., Isolations of steroids from urine of patients with adrenal cortical tumors and adrenal cortical hyperplasia: a new 17-keto-steroid, androstane-3, 11-diol-17-one, *J. Biol. Chem.* 161: 235 (1945), apud New *et al.* (1989)
- MATTESON, K. J.; PHILLIPS, J.A., III.; MILLER, W.L.; CHUNG, B.-C.; 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. Nat. Acad. Sci. USA* 84: 5858-5862 (1987)
- MELLON, S. & MILLER, W.L., Extradrenal steroid 21-hydroxylation is not mediated P450c21, *J. Clin. Invest.* 84: 1497-1502 (1989)
- 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., Genetics, diagnosis and management of 21-hydroxylase deficiency, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 78: 241-246 (1994)
- MILLER, W.L. & LEVINE, L.S., Molecular and clinical advances in congenital adrenal hyperplasia, *J. Pediatr.* 111: 1-17 (1987)
- MILLER, W.L. & MOREL, Y., The molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency, *Annu. Rev. Genet.* 23: 371-393 (1989)
- MOREL, Y.; ANDRE, J.; URING-LAMBERT, B.; HAUPTMANN, G.; BETUEL, H.; TOSSI, M.; FOREST, M.G.; DAVID, M.; BERTRAND, J.; MILLER, W.L., Rearrangements and point mutations of P450c21 genes are distinguished in five restriction endonuclease haplotypes identified by a new probing strategy in 57 families with congenital adrenal hyperplasia, *J. Clin. Invest.* 83: 527-536 (1989a)

- MOREL, Y.; BRISTOW, J.; GITELMAN, S.E.; MILLER, W.L., Transcript encoded on the opposite strand of the human steroid 21-hydroxylase/complement component C4 gene locus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6582-6586 (1989b), apud Gitelman *et al.* (1992)
- MORNET, E.; COULLIN, P.; KUTTEN, F.; RAUX-DEMAY, 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-OH deficiency, *Hum. Genet.* 74: 402-408 (1986)
- MORNET, E.; CRÉTÉ, P.; KUTTENN, F.; RAUX-DEMAY, M.-C.; BOUÉ, J.; WHITE, P.C.; BOUÉ, A., Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency, *J. Hum. Genet.* 48: 79-88 (1991)
- NAGAMANI, M.; MCDONOUGH, P.G.; ELLEGOOD, J.O.; MAHESH, V.B., Maternal and amniotic fluid concentration of 17-hydroxiprogesterone levels during pregnancy: diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in utero, *Am. J. Obstret. Gynecol.* 130: 791 (1978), apud New *et al.* (1989)
- NEBERT, D.W. & GONZALEZ, F.J., P450 genes: Structure, evolution, and regulation, *Annu. Rev. Biochem.* 56: 945 (1987), apud New *et al.* (1989)
- NEBERT, D.W.; NELSON, D.R.; COON, M.J.; ESTABROOK, R.W.; FEYEREISEN, R.; FUJII-KURIYAMA, Y.; GONZALEZ, F.J.; GUENGERICH, F.P.; GUNSALUS, I.C.; JOHNSON, E.F.; LOPER, J.C.; SATO, R.; WATERMAN, M.R.; WAXMAN, D.J., The P450 superfamily : Update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* 10: 1-14 (1991), apud Tee *et al.* (1995)
- NEW, M.I. & CRAWFORD, C., Molecular genetics of steroid 21-hydroxylase deficiency, in *Molecular genetics of sex determination*, p. 399-438 (1994)
- NEW, M.I. & SPEISER, P.W., Congenital adrenal hyperplasia, in *Pediatric Endocrinology*, Book, C. (ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 441-462 (1989)
- NEW, M.I.; LORENZEN, F.; LERNER, A.J.; KOHN, B.; OBERFIELD, S.E.; POLLACK, M.S.; DUPONT, B.; STONER, E.; LEVY, D.J.; PANG, S.; LEVINE, L.S., Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J. Clin. Endocr. Metab.* 57: 320-326 (1983), apud New *et al.* (1989)

- MOREL, Y.; BRISTOW, J.; GITELMAN, S.E.; MILLER, W.L., Transcript encoded on the opposite strand of the human steroid 21-hydroxylase/complement component C4 gene locus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6582-6586 (1989b), apud Gitelman *et al.* (1992)
- MORNET, E.; COULLIN, P.; KUTTEN, F.; RAUX-DEMAY, 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-OH deficiency, *Hum. Genet.* 74: 402-408 (1986)
- MORNET, E.; CRÉTÉ, P.; KUTTENN, F.; RAUX-DEMAY, M.-C.; BOUÉ, J.; WHITE, P.C.; BOUÉ, A., Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency, *J. Hum. Genet.* 48: 79-88 (1991)
- NAGAMANI, M.; MCDONOUGH, P.G.; ELLEGOOD, J.O.; MAHESH, V.B., Maternal and amniotic fluid concentration of 17-hydroxiprogesterone levels during pregnancy: diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in utero, *Am. J. Obstret. Gynecol.* 130: 791 (1978), apud New *et al.* (1989)
- NEBERT, D.W. & GONZALEZ, F.J., P450 genes: Structure, evolution, and regulation, *Annu. Rev. Biochem.* 56: 945 (1987), apud New *et al.* (1989)
- NEBERT, D.W.; NELSON, D.R.; COON, M.J.; ESTABROOK, R.W.; FEYEREISEN, R.; FUJII-KURIYAMA, Y.; GONZALEZ, F.J.; GUENGERICH, F.P.; GUNSALUS, I.C.; JOHNSON, E.F.; LOPER, J.C.; SATO, R.; WATERMAN, M.R.; WAXMAN, D.J., The P450 superfamily : Update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* 10: 1-14 (1991), apud Tee *et al.* (1995)
- NEW, M.I. & CRAWFORD, C., Molecular genetics of steroid 21-hydroxylase deficiency, in *Molecular genetics of sex determination*, p. 399-438 (1994)
- NEW, M.I. & SPEISER, P.W., Congenital adrenal hyperplasia, in *Pediatric Endocrinology*, Book, C. (ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 441-462 (1989)
- NEW, M.I.; LORENZEN, F.; LERNER, A.J.; KOHN, B.; OBERFIELD, S.E.; POLLACK, M.S.; DUPONT, B.; STONER, E.; LEVY, D.J.; PANG, S.; LEVINE, L.S., Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J. Clin. Endocr. Metab.* 57: 320-326 (1983), apud New *et al.* (1989)

- NEW, M.I; WHITE, P.C.; PANG, S.; DUPONT, B.; SPEISER, P.W., The Adrenal hyperplasias, in *The metabolic basis of inherited diseases*, 6th ed. Edited by Scriver, C.R.; Beaudet, A.C.; Sly, W.S.; Valle, D., p. 1881-1917, McGraw-Hill, New York (1989)
- OWERBACH, D.; CRAWFORD, Y.M.; DRAZNIN, M.B., Direct analysis of CYP21B genes in 21-hydroxylase deficiency using polymerase chain reaction amplification, *Molec. Endocrinol.* 4: 125-131 (1990)
- OWERBACH, D.; BALLARD, A.L.; DRAZNIN, M.B, Salt congenital adrenal hyperplasia: detection and characterization of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene, CYP21, using the polymerase chain reaction, *J. Clin. Endocr. Metabol.* 74: 553-558 (1992a)
- OWERBACH, D.; DRAZNIN, M.B.; CARPENTER, R.J.; GREENBERG, F., Prenatal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia using the polymerase chain reaction, *Hum. Genet.* 89: 109-110 (1992b)
- OWERBACH, D.; SHERMAN, L.; BALLARD, A.-L.; AZZIZ, R., Pro 453-to-Ser mutation in CYP21 is associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency, *Molec. Endocrinol.* 6: 1211-1215 (1992c)
- PANG, S.Y.; 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 classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency, *Pediatrics* 81: 866-874 (1988)
- PARTANEN, J. & CAMPBELL, 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)
- PARTANEN, J.; KERE, J.; WESSBERG, S.; KOSKIMIES, S., Determination of deletion sizes in MHC-linked complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes by pulsed field gel electrophoresis, *Genomics* 5: 345-349 (1989)
- PICADO-LEONARD, J. & MILLER, W.L., Homologous sequences in steroidogenic enzymes, steroid receptors and a steroid binding protein suggest a consensus steroid-binding site, *Molec. Endocrinol.* 2: 1145-1150 (1988) apud Killeen *et al.* (1991)

- POLLACK, M.S.; LEVINE, L.S.; PANG, S.; OWENS, R.P.; NITOWSKY, H.M.; MAURER, D.; NEW, M.I.; DUCHON, M.; MERKATZ, I.R.; SACHS, G.; DUPONT, B., Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) by HLA typing, *Lancet I*: 1107-1108 (1979) apud New *et al.* (1989)
- PRICE, D.A.; KLOUDA, P.T.; HARRIS, R., HLA and congenital adrenal hyperplasia linkage confirmed, *The Lancet II*: 1309-1312 (1978)
- RAMOS, C.F.; ARAUJO, M.; GUERRA JR., G.; FARAH, S.B.; DE MELLO, M.P., Allogentotypes of congenital adrenal hyperplasia family members using HLA-DR DNA probe, *Braz. J. Genet.* 17 (3-suppl.): 76 (1994)
- RODRIGUES, N.R.; DUNHAM, I.; YU, C.Y.; CARROLL, 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)
- RÜEGG, C.R.; CHIQUET-EHRISMAN, R.; ALKAN, S.S., Tenascin, an extracellular matrix protein, exerts immunomodulatory activities interferes with fibronectin action, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7437-7441 (1989), apud Bristow *et al.* (1993a)
- RUMSBY, G. & HONOUR, J.W., *In Vitro* gene amplification for prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia, *J. Med. Genet.* 27: 676-678 (1990)
- RUMSBY, G.; CARROLL, M.C.; PORTER, R.R.; GRANT, D.B.; HJELM, M., Deletion of the steroid 21-hydroxylase and complement C4 genes in congenital adrenal hyperplasia, *J. Med. Genet.* 23: 204-209 (1986)
- RUMSBY, G.; FIELDER, 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: 421-425 (1993)
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1989)

- SCHULZE, E.; SCHARER, G.; ROGATZKI, A.; PRIEBE, L.; LEWICKA, S.; BETTENDORF, M.; HOEPFFNER, W.; HEINRICH, U.E.; SCHWABE, U, Divergence between genotype and phenotype in relatives of patients with the intron 2 mutations of steroid 21-hydroxylase, *Endocr. Res.* 21: 359-364 (1995)
- SINNOTT, P.J.; DYER, P.A.; PRICE, D.A.; HARRIS, R.; STRACHAN, T., 21-hydroxylase deficiency families with HLA identical affected and unaffected sibs, *J. Med. Genet.* 26: 10-17 (1989)
- SINNOTT, P.J.; COLLIER, S.; COSTIGAN, C.; DYER, P.A.; HARRIS, R.; STRACHAN, T., Genesis 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 organization in Italian 21-hydroxylase deficiency families, *Hum. genet.* 88: 545-551 (1992)
- 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: 650-667 (1985) apud Speiser *et al.* (1988)
- SPEISER, P.W.; NEW, M.I.; WHITE, P.C., Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14, DR1, *New Engl. J. Med.* 319: 19-23 (1988)
- SPEISER, P.W.; LAFORDIA, N.; KATO, K.; PAREIRA, J.; KHAN, R.; YANG, S.Y.; WHORWOOD, C.; WHITE, P.C.; ELIAS, S.; SCHRIOCK, E.; SIMPSOM, J.L.; TASLINI, M.; NAJJAR, J.; MAY, S.; MILLS, G.; CRALFORD, C.; NEW, M. I., First trimester prenatal treatment and molecular genetic diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency), *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 70: 838-848 (1990)
- SPEISER, P.W.; AGDERE, L.; UESHIBA, H.; WHITE, P.C.; NEW, M.I., Aldosterone synthesis in salt-wasting congenital adrenal hyperplasia with complete absence of adrenal 21-hydroxylase, *New Engl. J. Med.* 324: 145-149 (1991)

- SPEISER, P.W.; DUPONT, J.; ZHU, D.; SERRAT, J.; BUEGELEISEN, M.; TUSIE-LUNA, M. T.; LESSER, M.; NEW, M. I.; WHITE, P.C., Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due 21-hydroxylase deficiency, *J. Clin. Invest.* 90: 584-595 (1992)
- SPEISER, P.W.; WHITE, P.C.; DUPONT, J.; ZHU, D.; MERCADO, A.; NEW, M. I., Molecular genetic prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency by allele-specific hybridization, *Rec. Prog. Horm. Res.* 49: 367-371 (1994)
- STRACHAN, T., Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia, *Trends Endocrinol.* 32: 68-72 (1989)
- STRACHAN, T., Molecular pathology of congenital adrenal hyperplasia, *Clin. Endocrinol.* 32: 373-393 (1990)
- STRACHAN, T., Molecular pathology of 21-hydroxylase deficiency, *J. Inher. Metab. Dis.* 17: 430-441 (1994)
- SYDNOR, K.L.; KELLEY, V.C.; RAILE, R.B.; ELY, R.S.; SAYERS, G., Blood adrenocorticotrophin in children with congenital adrenal hyperplasia, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 82: 695 (1953), apud New *et al.* (1989)
- TAJIMA, T.; FUJIEDA, K.; FUJII-KURIYAMA, Y., *De novo* mutation causes steroid 21-hydroxylase deficiency in one family of HLA-identical affected and unaffected siblings, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 77: 86-89 (1993a)
- TAJIMA, T.; FUJIEDA, K.; NAKAYAMA, K.; FUJII-KURIYAMA, Y., Molecular analysis of patient and carrier genes with congenital steroid 21-hydroxylase deficiency by using polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism, *J. Clin. Invest.* 92: 2182-2190 (1993b)
- TEE, M.K.; BABALOLA, G.O.; AZA-BLANC, P.; SPEEK, M.; GITELMAN, S.E.; MILLER, W.L., A promoter within intron 35 of the human C4A gene initiates abundant adrenal-specific transcription of a 1 Kb RNA: location of a cryptic CYP21 promoter element ? *Hum. Molec. Genet.* 4: 2109-2116 (1995)

- TUSIE-LUNA, M.T. & WHITE, P.C., Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92: 10796-10800 (1995)
- TUSIE-LUNA, M.T.; TRAKTMAN, P.; WHITE, P.C, Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus, *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)
- WATANABE, N.; KITAZUME, M.; FUJISAWA, J.; YOSHIDA, M.; FUJII-KURIYAMA, Y., A novel cAMP-dependent regulatory region including a sequence like the cAMP responsive element, far upstream of the human CYP21A2 gene, *Eur. J. Biochem.* 214: 521-531 (1993)
- WEDELL, A. & LUTHMAN, H., Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations, *Hum. Molec. Genet.* 2: 499-504 (1993a)
- WEDELL, A. & LUTHMAN, H., Steroid 21-hydroxylase (P450c21): a new allele and spread of mutations through the pseudogene, *Hum. Genet.* 91: 236-240 (1993b)
- WEDELL, A.; RITZEN, E.M.; HAGLUND-STENGLER, B.; LUTHMAN, H., Steroid 21-hydroxylase deficiency: three additional mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7232-7236 (1992)
- WEDDEL, A.; CHUN, X.; LUTHMAN, H., A steroid 21-hydroxylase allele concomitantly carrying four disease-causing mutations is not uncommon in the Swedish population, *Hum. Genet.* 93: 204-206 (1994a)

- WEDELL, A.; STENGLER, B.; LUTHMAN, H., Characterization of mutations on the rare duplicated C4/CYP21 haplotype in steroid 21-hydroxylase deficiency, *Hum. Genet.* 94: 50-54 (1994b)
- WEDELL, A.; THILEN, A.; RITZEN, E. M.; STENGLER, B.; LUTHMAN, H., Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease malformation, *J. Clin. Endocr. Metab.* 78: 1145-1152 (1994c)
- 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., Cloning and expression of cDNA encoding a bovine adrenal cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1986-1990 (1984a)
- 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 (1984b)
- WHITE, P.C.; GROSSBERGER, D.; ONUFER, B.J.; CHAPLIN, D.D.; NEW, M.I.; DUPONT, B.; STROMINGER, J.L., Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1089-1093 (1985)
- WHITE, 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., Medical progress: congenital adrenal hyperplasia, *New Eng. J. Med.* 316: 1519-1524 (1987)
- WHITE, P.C.; VITEK, A.; DUPONT, B.; NEW, M.I., Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85: 4436-4440 (1988)

- WILSON, R.C.; WEI, J.Q.; CHENG, K.C.; MERCADO, A.B.; NEW, M.I., Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the 21-hydroxylase gene, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 1635-1640 (1995a)
- WILSON, R.C.; MERCADO, A.B.; CHENG, K.C.; NEW, M.I., Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 2322-2329 (1995b)
- WITCHEL, S.S.; LEE, P.A.; TRUCCO, M., Who is a carrier? Detection of unsuspected mutations in 21-hydroxylase deficiency, *Am. J. Med. Genet.* 61: 2-9 (1996)
- WU, D.A. & CHUNG, B., 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)

RESUMIO

A deficiência da enzima 21-hidroxilase é a causa mais freqüente de hiperplasia congênita da adrenal. O *locus* que codifica para a enzima 21-hidroxilase foi mapeado no braço curto do cromossomo 6, dentro da região abrangida pelo sistema HLA. Há duas cópias gênicas de 21-hidroxilase no genoma humano, denominadas CYP21A e CYP21B, intercaladas com os genes C4A e C4B, que codificam para o quarto componente do sistema complemento. Embora CYP21A e CYP21B apresentem grande homologia entre si (98 % ao nível de exons), CYP21A é inativo devido a mutações deletérias, sendo por isso considerado um pseudogene. A alta homologia entre as cópias gênicas favorece a ocorrência de “crossing-overs” desiguais, resultando em eventos de deleção ou conversão gênica. Estes últimos podem ser responsáveis pela transferência de mutações de CYP21A para CYP21B e podem abranger desde grandes porções do gene (conversão gênica em larga escala) até pequenas regiões (microconversões). As deleções e conversões gênicas em larga escala podem ser estudadas através de “Southern blotting” e hibridização com sondas correspondentes aos genes CYP21 e C4. Estudos anteriores não detectaram alterações nos padrões de hibridização em aproximadamente 85 % dos alelos de indivíduos afetados. No presente estudo, foram analisadas 37 famílias quanto à presença de mutações pontuais, provavelmente introduzidas em CYP21B por eventos de microconversão. Oito mutações foram analisadas: Sp2, uma mutação “frameshift” no intron 2 responsável por “splicing” anormal do mRNA; $\Delta 8$, uma deleção de 8 pb no exon 3; I172N, uma mutação “missense” no exon 4; CL6, um “cluster” de três substituições de aminoácidos no exon 6; V281L, uma substituição do aminoácido 281 no exon 7; F306+, uma inserção de base no exon 7; Q318X, uma substituição de base formando um codon de terminação no exon 8 e R356W, uma mutação “missense” no exon 8. Essas mutações são geralmente citadas como sendo as mais freqüentes em indivíduos afetados pela deficiência de 21-hidroxilase. O DNA genômico dos pacientes e seus familiares foi amplificado em duas reações de PCR, utilizando-se “primers” específicos para CYP21B. Os produtos de PCR obtidos foram hibridizados com sondas correspondentes às mutações e às seqüências normais (hibridização alelo-específica). A mutação $\Delta 8$ foi analisada através de PCR alelo-específico. Foi detectada pelo menos uma mutação em aproximadamente 81 % dos alelos afetados por mutações pontuais. Foram identificados 11 tipos diferentes de alelos, formados pela combinação de 7 mutações. As mutações mais comuns em nossa amostra foram Sp2, em aproximadamente 31 % dos alelos e I172N, em 24 %. Por outro lado, a mutação CL6 não foi encontrada em nenhum dos alelos analisados. Na maioria das famílias estudadas, o genótipo determinado está de acordo com o fenótipo, embora alguns casos apresentem padrões discordantes.

ABSTRACT

Deficiency of adrenal steroid 21-hydroxylase is the most common form of Congenital Adrenal Hyperplasia. This monogenic autosomal recessive disorder is closely linked to the HLA major histocompatibility complex on the short arm of chromosome 6. In the human genome, there are two copies of 21-hydroxylase gene (CYP21A and CYP21B), 98 % identical in exons, located adjacent of the two genes for the fourth component of the complement system, C4A and C4B. CYP21A is a pseudogene due to deleterious mutations. The close homology between CYP21A and CYP21B appears to generate frequent mutations in CYP21B by unequal crossing-over during meiosis, resulting in a complete deletion of CYP21B, and gene conversion events that result in the transfer of mutations from CYP21A to CYP21B. Gene deletions and large conversion events have been studied by Southern blot hybridization with CYP21 and C4 specific cDNA probes. Early studies have been demonstrated that about 85 % of the alleles have no alterations detectable by this methodology. In the present study, we genotyped 37 families affected by the classic form of 21-hydroxylase deficiency, for point mutations that may be introduced into CYP21B from CYP21A by microconversion events. Eight mutations were analyzed: Sp2, a frameshift mutation in intron 2 that causes abnormal RNA splicing; $\Delta 8$, a 8 bp deletion in exon 3; I172N, a missense mutation at residue 172 in exon 4; CL6, a cluster of three missense mutations in exon 6; V281L, a missense mutation in exon 7; F306+, a T insertion in exon 7, Q318X, a base substitution determining a stop codon in exon 8 and R356W, a missense mutation in exon 8. These mutations have been reported to occur frequently in affected individuals. Genomic DNA was amplified in two segments by PCR using selective primers for CYP21B. Hybridizations were performed with allele-specific normal and mutant oligonucleotide probes. The $\Delta 8$ mutation was analyzed by allele-specific PCR. At least one mutation was detected in about 81 % of alleles affected by point mutations. We identified 11 different disease-causing alleles, by combination of 7 point mutations. The most common mutations were Sp2, in about 31 % of alleles and I172N, in about 24 % of alleles. CL6 was not found in the tested alleles. In the most number of families, the genotypes were concordant with the phenotypes, but there were families with discordant patterns.