UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



FERNANDA BORCHERS COELI

"Análise Molecular do Loco C4/CYP21: Impacto da Variabilidade

Alélica Provocada por Recombinações sobre os Métodos de Avaliação

de Mutações"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) BORCHERS COELI ENANDA anti a e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C650a	Coeli, Fernanda Borchers Análise molecular do loco C4/CYP21: impacto da variabilidade alélica provocada por recombinações sobre os métodos de avaliação de mutações / Fernanda Borchers Coeli. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.
	Orientadora: Maricilda Palandi de Mello. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Gene híbrido CYP21A1P/CYP21A2. Deficiência de 21 hidroxilase. Módulo RCCX. Deleção gênica. Conversão gênica. De Mello, Maricilda Palandi. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
	(scs/ib)

Título em inglês: Molecular analysis of C4/CYP21 *locus*: influence of allelic variability caused by recombinations on current methods of mutation detection.

Palavras-chave em inglês: CYP21A1P/CYP21A2 chimeric gene; RCCX module; Gene deletion; Gene conversion; 21-hydroxylase deficiency.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Maricilda Palandi de Mello, Maria de Fátima Sonati, Margaret de Castro, Ester Silveira Ramos, Mônica Barbosa de Melo.

Data da defesa: 30/01/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 30 de Janeiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello (Orientadora)

Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Profa. Dra. Margaret de Castro

Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

Profa. Dra. Maricene Sabha

Profa. Dra. Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno

Prof. Dr. Louis Bernard Klasczko

Assinatura Assinatura Assinatura

Assinatura

mile Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

"Quando você está trabalhando, o passar das horas deve soar como musica extraída de uma flauta. ...E o que é trabalhar com amor? É como tecer uma roupa com fios que vêm do coração como se fosse o seu bem amado a usá-la...."

Kalil Gibran

"Todos tem um propósito de vida...um dom singular ou um talento único para dar aos outros. E quando misturamos esse talento singular com benefícios aos outros, experimentamos o êxtase da exultação de nosso próprio espírito – entre todos o supremo objetivo."

Deepak Chopra

Aos meus pais

Wilma Regina Borchers Coeli e Fernando Collier Coeli dedico. À Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello, minha orientadora, agradeço pela confiança e participação efetiva para o meu crescimento profissional. Seu exemplo de caráter, força de vontade, determinação e sua amizade durante os anos em que juntas trabalhamos estarão sempre presentes em minha vida.

À Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato, por seu estimulo ao meu trabalho.

Aos membros titulares da banca: Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati; Profa. Dra. Margaret de Castro; Profa. Dra. Ester Silveira Ramos; Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo e aos suplentes: Dra. Maricene Sabah; Profa. Dra Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno e Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko por aceitarem avaliar meu trabalho.

À Profa. Dra. Laura Ottoboni e a Profa. Dra Andréa Maciel - Guerra que compuseram minha pré banca.

Aos professores Dr. Louis Bernard Klaczko e a Dra. Vera Solferini pela orientação durante os dois semestres de PED.

Agradeço aos pacientes e familiares que permitiram a realização deste trabalho de pesquisa.

À Dra. Sofia Lemos Marini por encaminhar os pacientes com diagnóstico de Hiperplasia Congênita da Adrenal por deficiência de 21- hidroxilase.

As enfermeiras do Hospital das Clínicas de Campinas que fizeram as coletas das amostras.

À Profa. Dra. Estela Rosseto, que durante a graduação me incentivou a continuar no meio acadêmico.

À Dra. Marcela de Araújo e a Dra. Juliana Assumpção por suas importantes contribuições em nossa área de pesquisa.

À secretária do curso de pos graduação Lourdes por sua colaboração.

À CAPEs e a FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não poderia ser desenvolvido.

À minha família por estar sempre presente em minha vida, pelo incentivo, pela confiança, pelo amor incondicional e pela paciência nos momentos difíceis. Ao meu pai Fernando, pelo exemplo de honestidade, caráter e superação. A minha mãe Wilma Regina, pela cumplicidade, por chorar e rir todas às vezes comigo e ao meu irmão Carlos Rudolfo, pelo carinho.

À minha *oma* Elisabeth por todo amor que me dedicou enquanto estivemos juntas, *in memorian*.

Aos meus padrinhos Francisca e Mario Albino Vieira pelo carinho e afeto.

Ao casal Caren e Luis Paulo, meus amigos de infância que sempre estiveram presentes em minha vida.

A Riccardo Lacchini por sua amizade, atenção e gentileza. Agradeço pelas sugestões na redação deste trabalho.

À Mada por sua alegria, disposição, carisma e aos seus fabulosos macetes...

As meninas da secretaria Sandra, Tânia, Andressa e Andreza por cuidarem da parte burocrática.

Aos amigos do PED: Marcos, Milana, Ayana, Leo, Mit pelos bons momentos.

À Fernanda Soardi por ter me ajudado no inicio de minha caminhada no Laboratório de Genética Molecular Humana CBMEG. Pelas nossas horas agradáveis de estudo com o saboroso miojo de galinha caipira...

À Cene que me trouxe até o CBMEG acreditando em meu potencial.

À Mariana pela amizade companheirismo, bom humor e por nossas longas conversas...

Ao pessoal do Laboratório de Genética Molecular Humana: Raquel, Eduardo Becker, Andrey, Luis Eduardo, Ericka, Fernanda Reis, Camila, Frau, Vanessa, Carol Paraná, Nathalia, Paulo, Zelo, Emerson, Renan, Francine, "Lucios Fabios", Flavia II, Diego, Daiane, Carol Xuxa, Denise, Débora, Paula, Jéssica, Sueli, Ana Letícia, Milena.

Aos amigos do Maranhão Ianik e Caio por suas gentilezas.

À Renata Lima pela amizade, ajuda e pelas oportunidades que me ofereceu.

Ao Daniel, Dany boy, por suas inúmeras e constantes perguntas... Obrigada pelo carinho e amizade.

À Fabiana Alexandrino por sua amizade e hospitalidade.

À Carolzinha, a sócia, pela alegria contagiante e pela forca nos momentos complicados.

À Mara por sua alegria e aos seus filhos Camila e Gustavo pelos lindos desenhos...

À minha companheira de MLPA, Carol Lincoln, pela paciência, bons momentos e horas e horas junto ao "elefantinho branco".

À Flavia Leme de Calais (Flor) pela amizade, momentos agradáveis e engraçados que passamos juntas.

A Reginaldo, um bom amigo sempre prestativo.

A Rodrigo, o químico capaz de resolver todos os problemas.

À Tia Lúcia Helena Peterline Lima, professora do primeiro ano primário, por ter siso responsável pelo inicio de minha educação formal.

À família Santos pelo apoio, orações e carinho. Obrigada!

Aos amigos do CBMEG por me ajudarem a superar os obstáculos encontrados nesta verdadeira "maratona" que juntos empreendemos.

Aos amigos da graduação: Daniela Mateika, Evandro Ricardo Marin, Leandro Moutinho, Camila Gil Neto, Juliana, obrigada pelos momentos agradáveis e de estudo.

Aos amigos Nelma e Ronaldo Blotta por me "ensinarem o caminho das pedras" além claro, das inesquecíveis conversas.

À Marilene e Robson pelo apoio nas horas mais difíceis que passei em minha vida.

Ao pessoal do ônibus Vera Lúcia, Sergio, Julio, Caca, Xande, Chicão, Mary, Dona Ana, Luis Barea, Luis, Sandra, Betão pelas horas agradáveis durante as viagens diárias.

À família Draganoff Torres, Alice, Janet e D. Olga agradeço pelas orações, torcida e sincera amizade.

À família Lo Prete pela amizade cultivada por longos anos, em especial ao patriarca Salvador.

À família Melo Meirelles pela hospedagem e pelos bons momentos compartilhados.

À Marisa Melo Meirelles que nos contagia com sua dinâmica, bom humor e com sua frase: "Agora ou nunca..."

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram com o meu trabalho.

Sumário

ABREVI	ATURAS	xxiii
RESUMO	D	xxix
ABSTRA	CT	xxxiii
INTROD	UÇÃO	
1.1-	Esteroidogênese	
1.2-	Hiperplasia Congênita da Adrenal	40
1.3-	Deficiência de 21-hidroxilase	42
1.4-	O Módulo RCCX (Organização do lócus)	44
1.5-	Gene CYP21A2	48
1.6-	O gene <i>C4</i>	51
1.7-	Gene TNX	
1.8-	Gene <i>RP</i>	
1.9-	Pseudogenes	53
1.10-	Deleção, Duplicação e Conversão Gênica	55
1.11-	Genes Híbridos	
1.12-	Polimorfismos do gene CYP21	58
OBJETI	VOS	63
Objetivos	Gerais	65
Objetivos	Específicos	65
CASUÍS	FICA E MÉTODO	67
1 – Casuí	ística	69
2 - Obten	ção das amostras de DNA e Extração de DNA genômico.	72
3 - Anális	se da variação numérica dos genes <i>CYP21</i> e <i>C4</i>	72
3.1 -	- Southern blot	72

Sumário

3.2 - Sondas utilizadas	73
3.3 - Marcação das sondas através de Random Priming	74
3.4- Purificação da sonda	74
3.5 - Hibridização	74
3.6 - Auto-radiografia e remoção da sonda das membranas	75
4 - Avaliação dos genes Híbridos CYP21A1P/CYP21A2	75
5 - Investigação dos polimorfismos intragênicos	77
6- Seqüenciamento da região 5' dos genes Híbridos CYP21A1P/CYP21A2	79
7- MLPA Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification	81
7.1 – Desnaturação do DNA genômico e hibridização com sondas SALSA MLPA	81
7.2 – Reação de Ligação	82
7.3 – Reação da PCR Multiplex	82
7.4 - Separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar	84
7.5 – Análise dos dados obtidos por MLPA	85
RESULTADOS	87
1 - Análise por RFLP com a enzima <i>Taq</i> I	89
1.1 - Alelos Monomodulares Com Genes Híbridos CYP21A1P/CYP21A2	89
1.2 - Alelos Bi e Trimodulares Com Conversão e Genes Híbridos	
<i>CYP21A1P/CYP21A2</i>	93
1.3 - Haplótipos com Genes Híbridos CYP21A1P/CYP21A2	97
2- Análise por MLPA	98
2.1 – Resultados de MLPA para o grupo 1.1	101
2.2 - Resultados de MLPA para o grupo 1.2	105
2.3 - Resultados de MLPA para o grupo 2.1	108

Sumário

2.4 - Resultados de MLPA para o grupo 2.2	110
3- Comparação dos resultados de Southern blot e MLPA	
4 - Polimorfismos e mutações nos genes CYP21A1P/CYP21A2	
4.1 - Análise por ASO-PCR	116
4.2 – Seqüenciamento	
5 - Combinação dos dados de ASO-PCR e seqüenciamento	
6 - Genótipos dos pacientes	

DISCUSSÃO	133
1 - O Módulo RCCX	135
2- Alelos monomodulares com a presença de genes híbridos CYP21A1P/CYP21A2	136
3-Alelos bimodulares e trimodulares com híbridos CYP21A1P/CYP21A2	141
4- Comparação dos genes híbridos CYP21A1P/CYP21A2 dos alelos mono, bi e trimo	odulares
	143

CONCLUSÕES	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149
ANEXO 1	
ANEXO 2	
ANEXO 3	
ANEXO 4	
ANEXO 5	

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

aa- aminoácido

- Δ 4- A Δ 4 and rostenidiona
- ACTH- hormônio adrenocorticotrófico
- BSA- albumina sérica bovina
- C4 gene que codifica o quarto componente do complemento
- CRH- hormônio liberador de corticotrofina
- CYP família do citocromo P450
- CYP21A2- enzima 21- hidroxilase
- CYP21A2 gene que codifica a enzima 21- hidroxilase
- *CYP21A1P* pseudogene de *CYP21A2*
- DHEA desidroepiandrosterona
- DOC desoxicorticosterona
- EDTA ácido etilenodiaminotetracetico
- g. posição gênica
- HCA Hiperplasia Congênita da Adrenal
- HLA complexo principal de histocompatibilidade
- IVS do inglês intervening sequence
- Módulo RCCX nomenclatura utilizada para designar alguns genes contidos em 6p
- MLPA do inglês Multiplex Ligation- dependent Probe Amplification
- NC forma não clássica da deficiência de CYP21A2
- p.- posição do aminoácido na proteína
- PCR reação da polimerase em cadeia (do inglês Polymerase Chain Reaction)
- RFLP do inglês Restriction Fragment Length Polymorphism
- PS perdedora de sal forma clássica da deficiência de 21- hidroxilase
- RP1- pseudogene de RP2
- RP2- ou gene STK19 (serina treonina kinase)
- rpm. rotação por minuto
- composto S 11- desoxicortisol
- SNP polimorfismo de um único nucleotídeo (do inglês single nucleotyde polymorphic)

ABREVIATURAS

- TNXA pseudogene de TNXB
- *TNXB* gene que codifica matrix extra celular
- UTR região não traduzida (do inglês untranslated region)
- VS virilizante simples forma clássica da deficiência de 21- hidroxilase

RESUMO

A hiperplasia congênita da adrenal é causada pela deficiência de uma das cinco enzimas responsáveis pela síntese do cortisol na esteroidogênese, sendo que mais de 90% dos casos ocorrem devido à deficiência de 21-hidroxilase (21-OH). O genoma haplóide humano possui duas cópias em tandem do gene que codifica para a 21-OH, denominados CYP21A2 e o CYP21A1P. Embora as duas cópias, CYP21A1P e CYP21A2, tenham aproximadamente 98% de homologia, CYP21A1P é classificado como um pseudogene, devido a algumas alterações deletérias em sua sequência. Foram mapeados no braço curto do cromossomo 6, assim como os genes RP, C4 e TNX também duplicados em tandem. Este loco é denominado modulo RCCX, onde cada letra representa um gene. Uma consequência esperada deste tipo de organização é que esta favorece eventos de crossingover desigual, produzindo cromátides irmãs assimétricas e pares de gametas com um número variável de unidades completas. O crossover desigual não gera somente um tipo definido de deleção (alelos monomodulares), de duplicação (alelo trimodular) ou de conversão (alelo bimodular), mas pode, dependendo da sua exata localização, produzir um grande número de alelos diferentes, com significados funcionais variáveis. O objetivo deste trabalho foi investigar a variabilidade dos genes híbridos CYP21A21P/CYP21A2 quanto à região de recombinação nos alelos monomodulares, bimodulares e trimodulares de indivíduos com deficiência de 21- hidroxilase. Foram incluídos 55 pacientes com deficiência de 21 - hidroxilase, que foram avaliados por Southern blot, Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), PCR - Alelo específico (ASO-PCR) e sequenciamento. Na triagem por Southern blot foram identificados 26 alelos mono-, 26 bi- e 5 trimodulares com prováveis genes híbridos. Foi identificado um alelo monomodular novo portador da variante $C4A^{[6,4 \text{ kb}]}$ que se mostrou único inclusive quanto à formação híbrida CYP21A21P/CYP21A2. Com a técnica de MLPA foi possível mapear três regiões principais de recombinação dos genes híbridos CYP21A21P/CYP21A2 nas três configurações alélicas. Além disso, foram identificados possíveis híbridos dos genes C4A e B, tanto nas configurações mono quanto nas bimodulares. Assim, ficaram definidos 5 haplótipos monomodulares, 7 bimodulares e 3 trimodulares. As técnicas de ASO-PCR e sequenciamento para análise dos híbridos CYP21A21P/CYP21A2 e dos CYP21A21P nos alelos bi e trimodulares refinaram a caracterização subdividindo estes haplótipos em 10 mono, 15 bi e 5 trimodulares. Dado o alto grau de variabilidade encontrado não foi possível se identificar efeito fundador de nenhum haplótipo específico para a deficiência de 21-hidroxilase. Por outro lado, um haplótipo novo correspondendo a cerca de 15% dos monomodulares foi caracterizado como portador das mutações p.P34L e p.H62L e um haplótipo igualmente não descrito portador da p.H62L foi encontrado entre os bimodulares. SNPs no terminal 5'UTR, no íntron 2 e no éxon 7 responderam pela diferenciação principal entre os híbridos tanto nos haplótipos de mesmo grupo como na comparação entre os de grupos diferentes. Este trabalho indica que a combinação de quatro técnicas e o estudo de segregação nas famílias foram fundamentais para o esclarecimento dos genótipos dos pacientes. Os genes híbridos podem estar relacionados às formas clínicas perdedora de sal, não perdedora de sal e não clássica dependendo da região onde ocorre a recombinação para sua formação.

ABSTRACT

xxxiii

Congenital adrenal hyperplasia is caused by deficiency of one of the five enzymes responsible for cortisol synthesis in the steroidogenesis. More than 90% of the cases occur due to deficiency of 21-hidroxilase (21-OH). The haploid human genome bears two copies in tandem of 21-OH coding gene, CYP21A2 and CYP21A1P. Although the two copies are approximately 98% homologous, CYP21A1P is a pseudogene, due to some deleterious mutations. They map to the short arm of chromosome 6, as well as RP, C4 and TNX genes which are also duplicated in tandem. This *locus* is called RCCX module, each letter representing one gene. An expected consequence of such organization is that it favors events of unequal crossing-overs, producing pairs of gametes with different number of complete units. The aim of this investigation was to estimate the variability of CYP21A21P/CYP21A2 chimeric genes based on the region of recombination in the monomodular, bimodular and trimodular alleles in patients with 21-hydroxylase deficiency. Fifty-five patients were included for Southern blot, Multiplex ligationdependent probe amplification (MLPA), Allele-specific PCR (ASO-PCR) and sequencing analyses. Southern blot identified alleles which were: mono (n = 26), bi (n = 26)26) and trimodular (n = 5) with chimeric genes. A novel monomodular allele was identified that carry $C4A^{[6,4 \text{ kb}]}$ variant and also bore an unique CYP21A21P/CYP21A2 formation. MLPA technique mapped three main recombination regions in CYP21A21P/CYP21A2 chimerical genes in the three RCCX configurations. Moreover, it indicated possible chimeric C4A and B genes in both mono- and bimodular configurations. Therefore, five mono-, seven bi- and three trimodular haplotypes had been defined. Both ASO-PCR and sequencing techniques for CYP21A21P/CYP21A2 and CYP21A21P analysis had refined the characterization subdividing these haplotypes in ten mono-, fifteen bi- and five trimodular. Considering the high degree of variability observed it was not possible to identify a founder effect of any specific haplotype for the deficiency of 21-hidroxilase. Conversely, a novel haplotype corresponding to about 15% of the monomodular alleles was characterized as carrying the mutations p.P34L and p.H62L and, similarly one haplotype carrying the p.H62L was found among bimodular alleles. SNPs in the 5 ' UTR, intron 2 and exon 7 were responsible for the main differentiation among chimerical genes within a group as well as upon comparison between different groups. The results presented here indicate that the combination of four different techniques and the study of segregation in the families had been essential for defining the genotypes of the patients. It is also shown that CYP21A21P/CYP21A2 chimeric genes can be related to different clinical forms: salt losing, non-salt losing and non-classical depending on the region where the recombination for its formation occurs.

INTRODUÇÃO

1.1- Esteroidogênese

O córtex da adrenal secreta dois tipos principais de hormônios adrenocorticais, os mineralocorticóides e os glicocorticóides. Além desses hormônios, são secretadas pequenas quantidades de hormônios sexuais, sobretudo hormônios androgênicos, que exercem efeitos semelhantes aos do hormônio sexual masculino, a testosterona. Em condições normais, tais hormônios têm pouca importância; mas, em certas anormalidades do córtex da adrenal, observam-se secreções de quantidades elevadas, podendo resultar em efeitos masculinizantes. O córtex da glândula adrenal apresenta três camadas distintas e cada uma produz uma categoria de hormônio esteróide. Na zona glomerulosa são produzidos os mineralocorticóides, onde o principal é a aldosterona que regula a retenção de sódio renal, influencia tanto o balanço de eletrólitos quanto o volume e pressão sanguíneos. Na zona fasciculada são produzidos os glicocorticóides onde o principal é o cortisol, que determina uma grande variedade de funções orgânicas. Finalmente, na zona reticular há produção de andrógenos adrenais desidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona, bem como pequenas quantidades de estrogênios e alguns glicocorticóides que são responsáveis pelo desenvolvimento de caracteres sexuais secundários. Estes andrógenos adrenais podem, quando em excesso, causar virilização em indivíduos do sexo feminino (KEEGAN, C.E. e KILLEEN, A.A., 2001, MILLER, W.L., 2008).

O transporte do colesterol para as células adrenais é regulado pelo ACTH por mecanismo de retroalimentação negativa que pode alterar acentuadamente a quantidade disponível para a síntese de esteróides. O ACTH, que estimula a síntese adrenal de esteróides, aumenta o número de receptores de LDL nas células adrenocorticais, e aumenta também a atividade das enzimas que liberam o LDL. Uma vez no interior da célula, o colesterol é levado para as mitocôndrias, onde é clivado pela enzima colesterol desmolase para formar pregnenolona. Esta etapa limita a intensidade da síntese subseqüente dos esteróides adrenais. Em todas as três zonas do córtex da adrenal, essa etapa inicial da síntese de esteróides é estimulada pelos diferentes fatores que controlam a secreção dos principais produtos hormonais, a aldosterona e o cortisol (Figura 1) (MILLER, W.L., 2008).

O eixo hipotalâmico - hipofisário é regulado por retroalimentação negativa pelo cortisol (Figura 1). Quando o cortisol não está presente, ou está disponível em menor quantidade ocorre um super-estímulo da glândula adrenal tornando-a hiperplásica.



Figura 1: A) Processo normal de inibição do eixo hipotálamo-hipófise exercida pela presença do cortisol circulante; B) Liberação do eixo hipotálamo-hipófise causada pela ausência de cortisol circulante levando à hiperplasia da glândula adrenal.

1.2- Hiperplasia Congênita da Adrenal

Hiperplasia Congênita da Adrenal (HCA) é uma doença autossômica recessiva, definida como um erro inato do metabolismo na síntese de cortisol a partir do colesterol.

A prevalência da HCA ocorre entre 1:5.000 e 1:15.000 nascimentos (WHITE, P.C. e SPEISER, P.W., 2000). A HCA pode ser ocasionada por deficiência de pelo menos uma das cinco enzimas envolvidas na esteroidogênese no córtex da glândula adrenal (Figura 2). Citocromo P450 é a denominação para a família de enzimas oxidativas. Recebem este nome por absorverem luz a 450 nm, todas possuem cerca de 500 aminoácidos e contém um grupo heme (KEEGAN, C.E. e KILLEEN, A.A., 2001, MILLER, W.L., 2008).



Figura 2: Esteroidogênese no córtex da adrenal - via metabólica dos mineralocorticóides e glicocorticóides e dos hormônios androgênicos.

1.3- Deficiência de 21-hidroxilase

A deficiência de 21-hidroxilase é responsável por 95% dos casos de HCA (KEEGAN, C.E. e KILLEEN, A.A., 2001, WHITE, P.C. e SPEISER, P.W., 2000). Essa enzima participa da síntese do cortisol e aldosterona no processo de esteroidogênese da glândula adrenal. Na diminuição ou ausência de sua atividade, as conversões de progesterona (P) e de 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) para desoxicorticosterona e 11-desoxicortisol, respectivamente, são alteradas deixando de sintetizar a aldosterona e o cortisol eficientemente (Figura 2). Em conseqüência da falta do cortisol, há perda do *feedback* negativo, o que resulta em elevados níveis de ACTH (Figura 1), levando à super produção e ao acúmulo dos compostos que antecedem o bloqueio: a P na via dos mineralocorticóides e a 17-OHP na via dos glicocorticóides; em resposta ao acúmulo destes compostos, há um desvio da síntese para o sentido de uma secreção de andrógenos: a DHEA e Δ 4-A (Androstenediona), que é convertido em testosterona (Figura 2). Altas concentrações plasmáticas desses andrógenos no início da gestação causam virilização da genitália externa em fetos femininos (NEW, M.I., 2003).

Essa deficiência é clinicamente classificada em duas formas: a **forma clássica**, na qual ocorre o bloqueio total ou parcial da atividade enzimática, estando presente no nascimento e a **forma não clássica** (SPEISER, P.W. *et al.*, 1985), que envolve somente bloqueio parcial da atividade enzimática, manifestando-se geralmente na infância ou no início da adolescência. A forma clássica de HCA pode ser do tipo virilizante simples (VS) ou perdedora de sal (PS), sendo estes dois tipos distinguidos pela capacidade de sintetizar ou não quantidade suficiente do mineralocorticóide aldosterona (FIFE, D. e RAPPAPORT, E.B., 1983, NEW, M.I., 1995).

A incapacidade de sintetizar aldosterona leva a crises de perda de sal associadas a graves hiponatremia, hipercalemia e hipovolemia com acidose metabólica, perda do tônus vascular e choque hipovolêmico, que em muitos casos pode ser fatal (MILLER, W.L., 1991, NEW, M.I., 1995). Pacientes não tratados podem ir a óbito nas primeiras semanas de vida pela incapacidade de reter sódio (NEW, M.I. e LEVINE, L.S., 1984). Os sintomas de

perda de sal podem ocorrer a qualquer instante após os primeiros dias de vida, enquanto que a virilização costuma se tornar evidente após um ano e meio de vida. Níveis elevados de andrógenos afetam o desenvolvimento da genitália externa (MILLER, W.L., 1991). Deste modo, a criança com o genótipo 46,XX portadora da forma clássica, apresenta virilização já na vida intra-uterina. Como a intensidade do bloqueio enzimático pode ser variável, a genitália externa pode se apresentar com graus diferentes de virilização: desde uma leve clitoromegalia até uma fusão completa de pregas labiais, assemelhando-se a uma genitália do tipo masculino, porém com gônadas não palpáveis (Figura 3). No genótipo 46,XY pode haver macrogenitossomia neonatal, porém o mais comum é a criança desenvolver sinais de hiperandrogenismo após os primeiros 6 a 12 meses de vida (MILLER, W.L., 1991, NEW, M.I., 1995).

Em ambos os sexos a secreção excessiva de andrógenos pela adrenal também resulta em rápido crescimento somático, com avanço da idade óssea durante os primeiros anos de vida, mas desenvolve um adulto com estatura baixa devido à fusão precoce das epífises, quando há tratamento inadequado ou ausência de tratamento. Entretanto a diferenciação dos órgãos internos é sempre normal, não sendo afetada por andrógenos (HOMMA *et al.*,2004).



Figura 3: Representação dos 5 graus de diferenciação anormal das genitálias femininas definido por Prader. A genitália normal, passando por uma genitália ambígua até completa virilização.

1.4- O Módulo RCCX (Organização do *lócus*)

O gene que codifica a enzima CYP21A2 está localizado no cromossomo 6p21.3 entre os locos HLA-B e HLA-DR assim como os genes de histocompatibilidade da classe III, que são o segundo componente do complemento C2, o fator Bf e os genes que codificam para as duas formas do quarto componente do sistema complemento sangüíneo (C4A e C4B) (DUPONT, B. *et al.*, 1977, KEEGAN, C.E. e KILLEEN, A.A., 2001). Dois grupos de pesquisa (CARROLL, M.C., CAMPBELL, R.D. e PORTER, R.R., 1985, WHITE, P.C. *et al.*, 1985), estabeleceram que o genoma haplóide humano inclui duas cópias do gene que codifica para a CYP21A2, denominados *CYP21A2* e o *CYP21A1P*. Esses genes estão, respectivamente, localizados a aproximadamente 3 kb do terminal 3' dos dois genes que codificam para o complemento C4, o *C4B* e o *C4A*, que são altamente homólogos (99%) (MIGEON, C.J. e DONOHOUE, P.A., 1991, RUMSBY, G. *et al.*, 1988, STRACHAN, T., 1989, WHITE, P.C., *et al.*, 1985, WHITE, P.C., NEW, M.I. e DUPONT, B., 1986).

Da mesma forma as duas cópias, *CYP21A2* e *CYP21A1P*, guardam aproximadamente 98% de similaridade entre suas seqüências de nucleotídeos (éxons), sendo *CYP21A1P* um pseudogene resultante de algumas alterações deletérias na sua seqüência (HIGASHI, Y. *et al.*, 1986, KEEGAN, C.E. e KILLEEN, A.A., 2001, WHITE, P.C., NEW, M.I. e DUPONT, B., 1986). Além destes, dois outros genes, TNXA e TNXB, são transcritos a partir da fita oposta e sobrepõem o terminal 3' dos *CYP21A1P* e *CYP21A2*, respectivamente (GITELMAN, S.E., BRISTOW, J. e MILLER, W.L., 1992, MOREL, Y. *et al.*, 1989). Dois genes não traduzidos, YA e YB, são também codificados e transcritos na mesma direção e em sobreposição aos genes *CYP21A1P* e *CYP21A2* (BRISTOW, J. *et al.*, 1993a). Devido a esse acúmulo de genes o loco recebeu o nome de módulo RCCX (Figura 4), que inclui os genes *RP*, *C4*, *CYP21* e *TNX* (LEE, H.H., 2005, YANG, Z. *et al.*, 1999).



Figura 4: Representação esquemática da configuração do loco RCCX e dos genes que o compõem; A e B são fitas de DNA complementares; as setas indicam o sentido da transcrição.

Tal complexidade na organização do loco favorece eventos de recombinação com emparelhamento desigual (KOPPENS, P.F. et al., 2003, LEE, H.H., 2005, YOSHINO, M. et al., 1994 HUGHES, A.L., 1999), produzindo gametas com diferentes números de cópias gênicas e, consequentemente, uma variabilidade alélica significativa. No geral, existem duas unidades repetidas C4/CYP21A2 cuja média de tamanho é cerca de 30 kb, mas unidades individuais podem ter até 33 Kb (unidades longas - L) ou 26,5 Kb (unidades curtas - S) em conseqüência de um polimorfismo no gene C4B (PALSDOTTIR, A. et al., 1987, YANG, Z., et al., 1999). Portanto, se for considerado o módulo RCCX podem ser encontradas unidades monomodulares, bimodulares ou trimodulares com as respectivas variações longas e curtas. As freqüências desses rearranjos na população em geral são, respectivamente, 17%, 69% e 14% (BLANCHONG, C.A. et al., 2000). Como a organização bimodular parece ser conservada em muitas espécies, considera-se que as unidades monomodulares e trimodulares sejam resultantes de eventos de recombinação com emparelhamento desigual (STRACHAN, T., 1989, STRACHAN, T., 1990, STRACHAN, T. e WHITE, P.C., 1991). Os alelos encontrados nas diversas populações estudadas indicam que os rearranjos podem ocorrer em vários pontos da unidade gênica de 30 kb (C4/CYP21A2) tanto dentro do gene CYP21A2 (COLLIER, S. et al., 1989, DUNHAM, I. et al., 1989, HAGLUND-STENGLER, B. et al., 1991, HELMBERG, A., 1993, HIGASHI, Y. et al., 1988, WHITE, P.C. et al., 1988) como dentro dos genes C4. Dentre alelos trimodulares e monomodulares, são mais freqüentes os que envolvem a unidade CYP21A1P+C4B (Figura 5) (DE-ARAUJO, M. et al., 1996, LOBATO, M.N.,

ALEDO, R. e MESEGUER, A., 1998, PAULINO, L.C. *et al.*, 1999, SPEISER, P.W., NEW, M.I. e WHITE, P.C., 1988) e, apesar de não estarem relacionados com a deficiência de 21-hidroxilase, eles predispõem o portador a gerar novos alelos afetados, por facilitar o emparelhamento cromossômico desigual na meiose I (SINNOTT, P. *et al.*, 1990). Apenas o *crossover* dentro ou, nas extremidades das cópias *CYP21A2* gerando gametas com a deleção de uma unidade *C4B/CYP21A1P* é de importância para indivíduos com deficiência de 21-hidroxilase. Se o *crossover* ocorrer em um ponto dentro das seqüências de *CYP21A2*, o gameta resultante da deleção de aproximadamente 30 kb será portador de um gene híbrido formado pela porção 3' do pseudogene *CYP21A1P* e a porção 5' do gene *CYP21A2* funcional, *CYP21A1P/CYP21A2* não funcional. Estes alelos são referidos geralmente com a expressão generalizada, porém inadequada, de "deleção de *CYP21A2*" (BORMANN, M. *et al.*, 1992, HELMBERG, A. *et al.*, 1992).



Figura 5: Conformação alélica do loco C4/CYP21. A) alelo monomodular com deleção da unidade gênica C4B+CYP21A1P; B) alelo bimodular a forma mais freqüente encontrada em humanos; C) Alelo trimodular duplicação da unidade gênica C4B+CYP21A1P.

Outro evento mutacional que forma um gene híbrido é o que se convencionou denominar de conversão gênica em larga escala (SPEISER, P.W. *et al.*, 1992, STRACHAN, T., 1989, STRACHAN, T., 1990, STRACHAN, T. e WHITE, P.C., 1991). O gene híbrido neste caso pode surgir pela ocorrência de dois eventos de *crossing-over* desiguais entre as fitas emparelhadas incorretamente (Figura 6), não havendo perda de DNA. No entanto, o *crossing-over* desigual não gera somente um tipo definido de deleção, de duplicação ou de conversão, mas pode, dependendo da sua exata localização, produzir um grande número de alelos diferentes, com significados funcionais variáveis.



Figura 6: Eventos de recombinação durante a meiose I, devido a emparelhamentos desiguais. Os retângulos em azul evidenciam as formações alélicas que serão o foco deste trabalho. Os retângulos vermelhos e laranjas representam os genes híbridos CYP21A1P/CYP21A2. As letras minúsculas a, b, c, d indicam diferentes regiões de recombinação e as setas mostram o produto gerado em cada recombinação não homóloga.

1.5- Gene *CYP21A2*

O gene *CYP21A2* é composto por 10 éxons e codifica uma enzima microssomal CYP21A2 de 494 ou 495 aminoácidos com 55 kDa e tem atividade de 21 hidroxilase sobre os substratos de progesterona (P) e 17-hidroxiprogesterona (17-OH P) nas vias mineralocorticóide e glicocorticóide, respectivamente (Figura 2). *CYP21A2* apresenta duplicado em tandem um pseudogene, *CYP21A1P*. A Hiperplasia Congênita da Adrenal por deficiência de 21-hidroxilase não é devida exclusivamente a alterações provenientes do pseudogene (*CYP21A1P*), conhecidas como microconversões, mas também por mutações raras e grandes rearranjos gênicos, que explicam de 20 a 30% dos casos (TAJIMA, T., FUJIEDA, K. e FUJII-KURIYAMA, Y., 1993).



Figura 7: Oito alterações provenientes do pseudogene CYP21A1P – microconversões. Os retângulos verdes representam os genes C4A e C4B, os retângulos vermelhos e laranjas representam CYP21A1P e CYP21A2, respectivamente. T = sítio de reconhecimento da enzima de restrição Taq I. Cada uma das oito alterações está representada pelos aminoácidos alterados em CYP21A1P e pelos aminoácidos da proteína normal em CYP21A2, no caso das mutações missense e, por N e M nas alterações de splicing, deleção e cluster de mutações para as seqüências normais e mutantes, respectivamente.

Cerca de 75% das alterações de CYP21A2 são devidos a microconversões, ou seja, mutações pontuais ou conjuntos de mutações que na maioria das vezes são provenientes do

seu pseudogene *CYP21A1P*. São nove as principais alterações provenientes do pseudogene (Figura 7). A alteração ivs2-13 A/C>G, que cria um sito de *splice* alternativo no intron 2, é a mais freqüente nas 15 nacionalidades diferentes apresentadas na Tabela 1. A segunda mais freqüente é a p.I172N no éxons 4, seguida da p.V218L no éxons 7. As outras alterações se distribuem de maneira mais uniforme (RAMAZANI, A. *et al.*, 2008).

No terminal 5' existe uma variação polimórfica no sítio reconhecido pela enzima de restrição *Taq* I, com esta variação é possível distinguir o gene *CYP21A2* de seu pseudogene *CYP21A1P*. Após *Southern blot* seguido de hibridização com sonda específica, são observados fragmentos de 3,7 kb correspondente ao gene ativo e de 3,2 kb correspondente ao pseudogene (KOPPENS, P.F. *et al.*, 1992). Desta forma é possível detectar os grandes rearranjos gênicos, ou seja, duplicações, deleções e a formação de alelos com conversão gênica. Alelos com deleção e com conversão gênica apresentam genes híbridos que são constituídos pela região 5' de *CYP21A1P* e o terminal 3' de *CYP21A2* (JAATINEN, T. *et al.*, 2002, LEE, H.H. *et al.*, 2002).

	Número		Ivs2 -13	g.706-						
Nacionalidade	de alelos	p.P30L	A/C>G	713del8	p.I172N	Cl6 ¹	p.V281L	p.Q318X	p.R356W	Referências
EUA	394	2%	31%	4%	10%	4%	9%	4%	4%	SPEISER, P. W. et al, 1992b
Suécia	400	2%	27%	1%	20%	5%	6%	2%	4%	WEDELL, A. et al, 1994
Inglaterra	284	0%	40%	0%	7%	0%	0%	0%	10%	LAKO, M. et al, 1999
França	258	nd	21%	4%	9%	6%	17%	4%	nd	BARBAT, B. et al, 1995
Italia	146	4%	20%	nd	6%	12%	11%	8%	nd	CARRERA, P. et al, 1996
Japão	102	0%	29%	0%	14%	4%	1%	0%	14%	HIGASHI, Y. et al, 1991
China	40	nd	25%	nd	28%	5%	nd	8%	10%	KO, T. M. et al, 1998
Turquia	31	0%	22%	3,2%	11,4%	3,2%	0%	8%	9,6%	TUKEL, T. et al, 2003
Espanha	58	2%	26%	5%	2%	5%	17%	4%	4%	EZQUIETA, B. et al, 1995
Chile	126	nd	19%	nd	7%	10%	nd	9%	11%	FARDELLA, C. E. et al, 1998
México	94	9%	48%	2%	12%	1%	9%	4%	7%	ORDONEZ- SANCHES, M. L. et al, 1998
Argentina	72	nd	18%	4%	15%	nd	nd	14%	6%	DARDIS, A. et al, 1997
Finlândia	102	nd	12%	nd	29%	10%	3%	2%	nd	LEVO, A. et al, 1997
Iran	100	0%	28%	13%	9%	3%	3%	9%	5%	RAMAZANI, A. et al, 2008
Brasil	74	nd	25%	1%	19%	5%	4%	11%	8%	PAULINO, L. C. et al, 1999
Brasil	91	1%	14%	1%	20%	nd	18%	1%	6%	TORRES, N et al., 2003
Brasil	228	2%	20%	1,3%	14%	nd	18%	5,7%	7%	BACHEGA, T. A. et al., 1998

Tabela 1: Distribuição das oito mutações mais freqüentes em 15 populações diferentes

Tabela adaptada de Ramazani *et al.* (2008). nd = não descrita, $Cl6^{1}$ = p.L236N, p.V237Q, p.M239K.

1.6- O gene *C4*

O quarto componente do sistema de complemento sanguíneo, C4, é um fator essencial para a resposta imunológica humoral. Ao contrário dos outros genes que compõem o modulo RCCX, que apresentam um gene e um pseudogene, os dois genes *C4* são funcionais (SZILAGYI, A. *et al.*, 2006). O número total de cópias do gene C4 em organismos diplóides pode variar de zero a seis copias (SZILAGYI, A., *et al.*, 2006).

Os genes C4 são denominados de C4A e C4B. Cada gene C4 é composto por 41 éxons e o tamanho gênico é dicotômico variando entre 14.6 e 21 kb. Deleção ou duplicação dos genes C4A e C4B ocorrem, geralmente, com deleção e duplicação de CYP21A1P e CYP21A2 (LEE, H.H., 2005, YANG, Z., et al., 1999). Observa-se para o gene C4A fragmentos de 7,0 kb ou o fragmento de 6,4 kb. Para o gene C4B são observados fragmentos de 6,0 kb e ou fragmentos de 5,4 kb. Esta variação de tamanho é devida à presença de retrovírus endógeno HERV-K(C4) no intron 9, quando ele está presente no gene C4A ou no gene C4B gera os fragmentos maiores (YANG, Y. et al., 2003, YU, C.Y., 1991). O significado fisiológico desta família de retrovírus endógeno ainda não foi esclarecido. A forma mais freqüente de C4A é a que possui a integração do retrovírus, ou seja, os fragmentos de 7,0 kb (a forma 6,4 kb é mais rara na população humana). Os genes C4A e C4B duplicados em tandem produzem proteínas distintas tanto fisiologicamente quanto imunologicamente. A presença ou ausência do retrovírus endógeno é devido a eventos de recombinação nestes genes. Quando é detectada a presença do gene C4A em um fragmento de 6,4 kb (através de RFLP do sítio Taq I), o que ocorre na realidade é a presença de um gene híbrido formado pelo terminal 5' do gene C4A (7,0 kb) e pelo terminal 3' do gene C4B que não tem o retrovirus endógeno em seu intron 9 (5,4 kb)). O terminal 3' do gene C4B localiza-se a 2.466 pb antes do sítio de inicio de transcrição (start codon) do gene CYP21A2. Sequências promotoras necessárias para a transcrição do gene CYP21A2 estão contidas no intron 35 do gene C4B (WIJESURIYA, S.D. et al., 1999).

1.7- Gene *TNX*

Um outro par de genes, *XA* e *XB*, também duplicados em tandem como os genes *C4* e *CYP21* são transcritos no sentido oposto ao destes genes (Figura 4). O último éxon dos genes *XA* e *XB* sobrepõem o terminal 3' da região do éxons 10 de *CYP21A1P* e *CYP21A2*, respectivamente. O gene *XB* tem 68,2 kb de DNA, é composto por 45 éxons e codifica um mRNA de 12 kb e o gene *XA* é um pseudogene. Quando avaliados por RFLP do sítio da enzima de restrição *Taq* I, assim como *CYP21* e *C4*, também apresentam variação. O genee *TNXB* apresenta fragmento de 2,5 kb e o pseudogene *TNXA* fragmento 2,4 kb (KOPPENS, P.F., *et al.*, 2003). A identificação de um paciente com deleção de *CYP21A2* e *XB* que apresentava deficiência de colágeno sugeriu que o gene *XB* estaria envolvido com a produção de colágeno (BRISTOW, J. *et al.*, 1993b). Como a estrutura da proteína predita pelo gene *XB* apresentava semelhança com a de tenascinas, assim foi renomeado tenascin-X (BRISTOW, J., *et al.*, 1993b). BURCH, G.H. *et al.*, (1997) relacionaram a deficiência de *TNX* com a síndrome de Ehlers-Danlos.

Os 4,5 kb do gene *TNXA* truncado e duplicado correspondem à região do intron 32 ao éxons 45 do *TNXB* (JAATINEN, T., *et al.*, 2002). O gene *TNXA* contém uma deleção de 120 pb no limite éxons/intron 36 gerando um codon de parada prematuro (*frameshift*), desta forma é considerado um gene não funcional (MOREL, Y., *et al.*, 1989, YANG, Z., *et al.*, 1999). Entretanto o transcrito de TNXA é detectado no cortéx da adrenal apesar de não ter sido observada a produção de proteína. (TEE, M.K. *et al.*, 1995), identificaram transcritos menores de *TNXB* (XB-S), na glândula adrenal. Estes transcritos eram gerados devido a uma seqüência promotora presente no intron 26 do gene *TNXB*. Esta sequencia é identica à região promotora presente no gene *TNXA*. A função da proteína XB-S da família da tenascina ainda não é conhecida.

1.8- Gene *RP*

Shen, *et al* .(1994) isolaram o cDNA que codifica a STK19, que recebeu o nome de RP em homenagem ao ganhador do prêmio Nobel de Imunoquímica *Sir* Rodney R. Porter. Shen, *et al* .(1994) descobriram que o gene *STK19* (serina treonina kinase) contém 9 éxons e localiza-se 611 pb antes do gene *C4A*. O gene *RP2* contém 913 pb que corresponde à duplicação dos últimos dois éxons e meio de *RP1* (YANG, Z., *et al.*, 1999). As cinco primeiras regiões do gene *STK19* são ricas em seqüências CpG e existem também 8 elementos *Alu* no intron 4. Foram detectados alguns transcritos com 1,6 kb e com 1,8 kb. O gene *RP1* codifica uma proteína nuclear que provavelmente é uma serina/treonina kinase. A proteína é composta por 364 aa e possui uma extremidade hidrofílica N-terminal e uma C-terminal que por sua vez apresenta regiões hidrofílicas e hidrofóbicas alternadas. STK19 contém um possível sítio de ligação para sinalização intranuclear, múltiplos sítios potenciais de fosforilação (YANG, Z., *et al.*, 1999).

1.9- Pseudogenes

Pseudogenes são seqüências de DNA que derivaram de um gene funcional, mas adquiriram mutações que impedem sua tradução em proteína. As comparações entre seqüências revelaram evidências de homogeneização intra-específica (em conjunto com a evolução) dos genes CYP21, provavelmente durante o processo de expansão e redução, que são resultados de freqüentes e desiguais crossing-overs. As unidades gênicas sofrem alterações pontuais e estas mudanças podem introduzir variabilidade gênica. Um dos fatores evolutivos mais importantes é a mutação, onde seqüências de DNA podem ser alteradas. As unidades gênicas sofrem alterações pontuais causadas por estas mutações, resultando em variabilidade gênica Sendo assim, existe um grande interesse no campo da evolução molecular em determinar padrões de mutações espontâneas (BEALE, D. e LEHMANN, H., 1965, ZUCKERKANDL, E., DERANCOURT, J. e VOGEL, H., 1971). As mutações são definidas como erros na replicação ou na correção da seqüência de DNA. Podem ser classificados em: 1 - substituição; 2 - recombinação; 3 - deleção; 4 - inserção; e. 5 - inversão. Quando inseridas em um gene funcional podem torná-lo não funcional. A Figura 1 mostra um simples método para inferir uma substituição em uma seqüência de pseudogene (GOJOBORI, T., LI, W.H. e GRAUR, D., 1982, LI, W.H., WU, C.I. e LUO, C.C., 1984).. A sequência 1 é um pseudogene, a sequência 2 é a funcional equivalente da mesma espécie e a seqüência 3 é a seqüência funcional que divergiu antes de surgir o pseudogene.



Figura 8: Uma árvore para inferir a parte de substituição nucleotídica em uma seqüência de pseudogene. A linha pontilhada representa a seqüência não funcional (pseudogene) (LI, W.H., WU, C.I. e LUO, C.C., 1984).

As alterações observadas são randômicas e as taxas de mutações variam de nucleotídeo para nucleotídeo. As seqüências gênicas podem derivar de um ancestral comum e em momentos diferentes divergirem ou para outro gene funcional ou, então, quando associadas a alterações que modificam o quadro de leitura, divergirem para genes não funcionais (Figura 8). *CYP21A1P* em humanos é um pseudogene devido a três alterações deletérias: deleção de 8 pb no éxon 3, inserção de 1 pb no éxon 7 e, uma alteração pontual no éxon 8. As duas primeiras causam alteração do quadro de leitura (mutação *frameshift*) originando um transcrito truncado e a última causa uma terminação prematura do transcrito (mutação *nonsense*) (HIGASHI, Y., *et al.*, 1986, WHITE, P.C., NEW, M.I. e DUPONT, B., 1986). Kawaguchi *et al.* (1992) demonstraram que a deleção de 8 pb também estava presente em chimpanzé, entretanto as duas outras alterações não foram encontradas em chimpanzé, gorila ou orangotango. Em gorila e orangotango, entretanto, cópias extras de *CYP21* são inativas por outras alterações de modo que o número de cópias funcionais é reduzido em cada espécie. A deleção de 8 pb observada em chimpanzé, sugere que esta espécie também tenha um pseudogene. É possível que o gene *CYP21A1P* tenha sido
silenciado entre 5 e 7 milhões de anos atrás (KAWAGUCHI, H. *et al.*, 1990). Uma possível alternativa é, entretanto que ambos os cromossomos com unidades mono- ou bimodulares sejam formas polimórficas de um único ancestral (KAWAGUCHI, H., O'HUIGIN, C. e KLEIN, J., 1992).

1.10- Deleção, Duplicação e Conversão Gênica

O número de cópias dos genes C4 e CYP21 presentes em humanos não é constante. Pode ocorrer aumento ou diminuição das cópias. Bontrop *et al.*, (1991) estudaram polimorfismos dos genes *C4* e *CYP21* em algumas espécies de primatas. Após RFLP com a enzima *Taq* I foram observados apenas um haplótipo para chimpanzés, um para gorilas, três para orangotangos, cinco para macacos Rhesus e sete diferentes haplótipos para humanos. Destes sete o haplótipo mais freqüente em humanos foi o bimodular RCCX/RCCX (BLANCHONG, C.A., *et al.*, 2000, BONTROP, R.E. *et al.*, 1991). Já o gene híbrido C4A/C4B 6,4 kb, detectado por RFLP da enzima *Taq* I, foi encontrado em humanos, chimpanzés, gorilas e macacos Rehus, estando ausente em orangotangos (BONTROP, R.E., *et al.*, 1991).

A similaridade entre as seqüências dos genes *C4A* e *C4B*, assim como a dos genes *CYP21A2* e *CYP21A1P* sugerem que eventos de duplicação ocorreram recentemente no processo evolutivo (KAWAGUCHI, H., *et al.*, 1990).

Esta variação da unidade gênica C4/CYP21 é devida a eventos que promovem introdução de variabilidade genética. Existem dois mecanismos de recombinação homóloga: *crossing-over* ou recombinação recíproca e conversão gênica, também denominada de recombinação não recíproca. Deleções ou inserções podem ocorrer por uma série de mecanismos, sendo que um destes mecanismos pode ser o *crossing-over* desigual, gerando deleção ou duplicação de um fragmento de DNA (KOPPENS, P.F., *et al.*, 2003). Devido a este mecanismo de recombinação o módulo RCCX pode ganhar ou perder a unidade gênica C4/CYP21. Quando ocorre ganho de uma unidade, temos alelos trimodulares; quando há perda de uma unidade gênica observamos alelos monomodulares (Figura 6). A conversão gênica é uma troca não recíproca de informações genéticas

homólogas e este fenômeno tem sido estudado amplamente em eucariotos inferiores devido à facilidade de reconhecimento e análise dos produtos da meiose (KAWAGUCHI, H., O'HUIGIN, C. e KLEIN, J., 1992).

Conversão gênica foi postulada em outros grupos de famílias gênicas, incluindo globinas, imunoglobinas, pigmento visual verde-vermelho, entre outros. Alguns genes que causam doenças, como o gene *GBA* (ácido beta glucosidase) responsável pela doença de Gaucher, exemplificam um desarranjo causado por eventos de conversão gênica a qual ocorre entre o gene funcional (*GBA*) e seu pseudogene (*GBAP*) que é seu vizinho (TAYEBI, N. *et al.*, 2003).

A evidência de conversão gênica em humanos do gene da 21-hidroxilase foi circunstancial até que a descrição de COLLIER, S. *et al.*, (1993), permitiu a direta comparação entre um alelo convertido e um alelo original. Collier *et al.* (1993) após analise de segregação, constataram que havia ocorrido um evento de recombinação *de novo*, uma vez que a alteração encontrada na filha não estava presente no alelo materno. Esta recombinação transferia 390 nucleotídeos do pseudogene para o gene ativo contendo a mutação p.1173N. Este tipo de conversão envolvendo um grande segmento de DNA denomina-se conversão em larga escala. Também são observadas perdas de DNA, ou seja, deleção da unidade gênica *CYP21A1P* + *C4B*.

No genoma humano também são encontrados outros tipos de variações como genes que possuem vários quadros de leitura (*ORF, Open Reading Frame*), originando diferentes tipos de mRNA. Este é o caso do gene *TNXB* que possui dois quadros de leitura (TEE, M.K., *et al.*, 1995). Além disso, os genes *TNXA* e *TNXB* que compõem o módulo RCCX (Figura 4), estão sobrepostos ao terminal 3' de *CYP21A1P* e *CYP21A2*, respectivamente. Estes genes possuem sentido oposto de transcrição em relação aos genes que compõem o modulo RCCX. Embora *TNXA* seja um pseudogene assim como *CYP21A1P*, sabe-se que ambos são transcritos e estes transcritos são detectáveis no córtex da glândula adrenal (BRISTOW, J., *et al.*, 1993a, JAATINEN, T., *et al.*, 2002).

1.11- Genes Híbridos

Os genes híbridos são produtos de recombinação não homologa entre genes ativos e pseudogenes (*CYP21* e *TNX*) e no caso dos genes C4 esta recombinação ocorre entre dois genes ativos (*C4A* e *C4B*) (JAATINEN, T., *et al.*, 2002, KOPPENS, P.F., HOOGENBOEZEM, T. e DEGENHART, H.J., 2002, LEE, H.H., 2005, LEE, H.H., *et al.*, 2002). Para que ocorra o emparelhamento desigual, os genes envolvidos precisam ter alta homologia entre suas seqüências nucleotídicas. Como o *crossing over* não ocorre sempre na mesma região, a variabilidade dos genes híbridos formados é alta (LEE, H.H., 2005).

O gene *TNXB* pode se emparelhar com seu pseudogene *TNXA* e durante a meiose I recombinar. Esta recombinação desigual pode dar origem a várias formações híbridas *TNXA/TNXB* (LEE, H.H., 2005). Em chineses o gene híbrido *TNXA/TNXB* encontrado era formado por seqüências do pseudogene *TNXA* até o intron 44 (LEE, H.H., 2004). *Gitelman, et al* 1992 descreveram um gene híbrido *TNXA/TNXB* onde a seqüência do pseudogene *TNXA* se extendia até o éxons 36. *Yang, et al.* em 1999 descreveram um outro gene híbrido *TNXA/TNXB* onde a seqüência do pseudogene *TNXA* se estendia até a região do intron 31. Mais tarde Koppens, *et al.* (2002) encontraram o mesmo híbrido *TNXA/TNXB*, com pequenas variações, mas com a mesma região de recombinação observada por *Yang, et al.* em 1999. Os genes híbridos *TNXA/TNXB* estão relacionados com a síndrome de Ehlers-Danlos (Bruch, *et al.*, 1997 ; Schalkwijk, *et al.* 2001).

Koppens *et al.*, (2002) descreveram um gene híbrido *C4A/C4B* contido em um alelo trimodular. Este gene híbrido gera um fragmento de 6,4 kb, quando avaliado pela enzima de restrição *Taq* I. Este gene híbrido também foi encontrado em macacos (BONTROP, R.E., *et al.*, 1991).

Existem vários estudos que identificaram genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2* com deleção de 30 kb entre *CYP21A1P* e *CYP21A2* em caucasianos (LEVO, A. e PARTANEN, J., 1997, SINNOTT, P., et al., 1990, WHITE, P.C., et al., 1988). (FRIAES, A. et al., 2006) descreveram quatro haplótipos diferentes para genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2* em portugueses. Os dois primeiros genes híbridos eram compostos pela região 5' UTR do pseudogene (*CYP21A1P*), apenas divergindo na região de recombinação que em um

ocorreu entre os éxons 7 e 8; e no outro entre os éxons 3 e 4. Os outros dois genes híbridos apresentavam a região 5'UTR do gene ativo, mas a partir do éxon3 apresentaram seqüências do pseudogene (*CYP21A1P*). Estes híbridos divergiram, pois um apresentou seqüência do pseudogene até o éxon 7 e o outro apresentou seqüência do pseudogene até o éxon 7 e o outro apresentou seqüência do pseudogene até o éxon 8. Em chineses foram descritos três haplótipos diferentes para genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2* (LEE, H.H., 2004, LEE, H.H. *et al.*, 2003). Os três genes híbridos apresentaram a região 5'UTR do pseudogene, divergindo quanto a região de recombinação que pode ter ocorrido no éxon 3 ou no éxon 5, ou na alteração p.Q318X no éxon 8, respectivamente. O haplótipo para o híbrido *CYP21A1P/CYP21A2* formado pela região 5'UTR até a alteração p.P30L no éxon 1 foi encontrado em caucasianos e relacionado com a forma não clássica de HCA (KILLEEN, A.A., SANE, K.S. e ORR, H.T., 1991, L'ALLEMAND, D. *et al.*, 2000).

1.12- Polimorfismos do gene CYP21

Polimorfismos de nucleotídio único (SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms*) têm sido relatados tanto em *CYP21A2* quanto no *CYP2A1P* e também são observados nas cópias do gene *C4* (HIGASHI, Y., *et al.*, 1986, RODRIGUES, N.R. *et al.*, 1987). A análise de SNPs contribui para os estudos genéticos e, em famílias com indivíduos afetados com deficiência de 21-hidroxilase este estudo contribui para a análise segregacional dos alelos responsáveis pela doença. Além disso, podem oferecer um novo enfoque para estimativa das taxas relativas de mutações nesses genes (JIDDOU, R.R. *et al.*, 1999).

Com o seqüenciamento dos genes *CYP21A2* e *CYP21A1P*, foram encontrados vários SNPs intragênicos. A presença de um códon CTG (Leu) extra foi verificada em *CYP21A2* (RODRIGUES, N.R., *et al.*, 1987), em uma região do éxon 1 descrita previamente com 4 códons para Leucina nos resíduos 6-10 da proteína (HIGASHI, Y., *et al.*, 1986, WHITE, P.C., NEW, M.I. e DUPONT, B., 1986). Comparações entre espécies revelaram a presença de leucinas nessas mesmas posições, indicando possivelmente um polimorfismo de tamanho na enzima 21-hidroxilase humana, podendo ser composta de 494

ou 495 aminoácidos (RODRIGUES, N.R., *et al.*, 1987). Posteriormente foi confirmado que a inserção de leucina não acarretava alteração da atividade enzimática e que pode ser normalmente encontrada no *CYP21A1P*. Mas este polimorfismo causa certa confusão na numeração de códons para a localização de mutações no gene *CYP21A2* uma vez que a seqüência geralmente usada como referência foi descrita com 4 leucinas (HIGASHI, Y., *et al.*, 1986)

Outros polimorfismos na seqüência protéica de CYP21A2 podem ser encontrados como as seguintes trocas de aminoácidos: p.K102R e p.S268T (RODRIGUES, N.R., *et al.*, 1987) que, da mesma forma que a variação do número de Leucinas, não alteram a atividade enzimática. Além destas variações na proteína, pode-se encontrar outros SNPs, especialmente dentro do íntron 2. Este íntron contém um grande número de seqüências polimórficas sendo considerado um *hot spot* para variações. Na região intrônica 2 são encontradas variações nas posições nucleotídicas 395 e 453 (T>C) e 601 (A>C), além da alteração na posição 656 que não altera a atividade protéica quando a troca é de A>C, mas quando a variante é G gera um sítio *splice* alternativo alterando a atividade (HIGASHI, Y., *et al.*, 1988, HIGASHI, Y., *et al.*, 1986, JIDDOU, R.R., *et al.*, 1999, RODRIGUES, N.R., *et al.*, 1987).

Esses polimorfismos são suficientemente freqüentes para serem seguidos na segregação dos alelos de *CYP21A2* mutantes em famílias afetadas por deficiência da 21-hidroxilase e, encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população em geral (KILLEEN, A.A., JIDDOU, R.R. e SANE, K.S., 1998). A determinação de haplótipos afetados através do estudo de SNPs auxilia a caracterização dos alelos afetados e, a avaliação da ocorrência de alelos fundadores para as mutações mais freqüentes.

O estudo de SNPs para composição de haplótipos pode colaborar para o entendimento dessa variação fenotípica, uma vez que para certas doenças algumas seqüências intragênicas variantes que constituem variações comuns podem se relacionar com manifestações clínicas mais ou menos graves (HEGELE, R.A., HUFF, M.W. e YOUNG, T.K., 2001). Assim, a determinação de haplótipos afetados através do estudo de SNPs auxilia a caracterização dos alelos afetados e, a avaliação da ocorrência de alelos fundadores para as mutações mais freqüentes.

Desde as décadas de 70 e 80, estudos de populações e de famílias afetadas com HCA devido à deficiência da 21-hidroxilase demonstraram um desequilíbrio de ligação com certos haplótipos do HLA (DUPONT, B., et al., 1977, LEVINE, L.S. et al., 1978), incluindo alótipos característicos do complemento C4 (FLEISCHNICK, E. et al., 1983, O'NEILL, G.J. et al., 1982). A ligação entre o complexo HLA e a HCA devido à deficiência da 21-hidroxilase foi inicialmente relatada por Dupont et al. em 1977 e subseqüentemente confirmada em uma grande série de famílias ((KLOUDA, P.T., HARRIS, R. e PRICE, D.A., 1980, LEVINE, L.S., et al., 1978, POLLACK, M.S. et al., 1979). A forma grave PS de HCA, por exemplo, foi encontrada em associação com o haplótipo HLA-A3;Bw47;Bf*F;C2*C;DR7 com uma alta freqüência (FLEISCHNICK, E., et al., 1983, O'NEILL, G.J., et al., 1982). Esse haplótipo também carregava um alelo nulo em um dos loci C4. Algum tempo depois, foi demonstrado que esse alelo possuía uma deleção que incluía o gene CYP21A2 e C4B (WHITE, P.C., DUPONT, B. e NEW, M.I., 1984). Da mesma forma, as duplicações CYP21A1P+C4 também eram particularmente observadas em associação com o haplótipo HLA-B14;DR1 (CARROLL, M.C. et al., 1984) e, na sua grande maioria, este haplótipo carrega a mutação V281L ((DONDI, E. et al., 1994, SPEISER, P.W., NEW, M.I. e WHITE, P.C., 1988), sendo freqüentemente associado com a forma não clássica da HCA (POLLACK et al., 1981). Além desses haplótipos, o HLA A1;B8;C4AQ0,C4B1;DR3 está ligado à deleção do pseudogene CPY21A1P (WHITE, P.C., NEW, M.I. e DUPONT, B., 1986). A combinação de haplótipo-mutação, embora achada em muitas populações, é particularmente enriquecida na população judaica Ashkenazi (LEVO, A. e PARTANEN, J., 1997), a qual apresenta uma alta taxa de casamento consangüíneo. Nesta população endogâmica temos a fixação alélica.

Existem poucos relatos sobre o desequilíbrio de ligação entre os diferentes haplótipos de HLA e as várias mutações no gene *CYP21A2*. Em populações heterogêneas, uma dada mutação pode ter origens independentes. (AMOR, M. *et al.*, 1988) observaram que a mutação I172N na população de Nova Iorque não está associada com nenhum haplótipo de HLA em particular. Embora a maioria dos estudos de genotipagem em várias populações tenha focado apenas a determinação de mutações, a possibilidade de um efeito fundador para as mutações mais freqüentes no gene *CYP21A2* tem sido aventada em

populações com alto grau de miscigenação sem o estudo de haplótipos (DARDIS, A. *et al.*, 1997, FARDELLA, C.E. *et al.*, 1998). Por outro lado, fortes associações têm sido observadas em populações pequenas e bem definidas, como as da Irlanda (SINNOT *et al.*, 1991) e dos Esquimos Yupik (SPEISER, P.W., *et al.*, 1992).

Em um trabalho realizado na Finlândia, que envolve uma população bem definida e etnicamente homogênea, Levo e Partanen (1997) analisaram alelos portadores das dez mutações mais freqüentes no gene *CYP21A2* e determinaram haplótipos característicos para cada mutação associada com a deficiência da 21-hidroxilase em 51 famílias não relacionadas. O principal achado desse estudo foi a baixa variação de haplótipos com a deficiência de 21-hidroxilase. Anteriormente, (PARTANEN, J. *et al.*, 1989) havia indicado que um pequeno número de haplótipos poderia contribuir para a maioria dos cromossomos afetados naquela população, sendo que 82,4% de todos os haplótipos afetados foram observados mais de uma vez.

Cada haplótipo estaria ligado especificamente a uma aberração no gene *CYP21A2*, sugerindo que cada um deles represente um alelo fundador. Comparando-se estes dados com os publicados em populações de outras origens, fica evidente que muitas das combinações dos haplótipos mutantes na Finlândia, são de fato achadas em pacientes de origem Européia e Americana, sugerindo que esses haplótipos possuem uma origem comum (CHU, X. *et al.*, 1992, DONOHOUE, P.A. *et al.*, 1995, HELMBERG, A., *et al.*, 1992). Recentemente, (EZQUIETA, B. *et al.*, 2002) usando microssatélites do cromossomo 6 avaliaram a contribuição dos eventos de conversão e o efeito fundador de mutações freqüentes no *CYP21A2* em famílias da Espanha. Seus achados indicaram que ambos mecanismos contribuem para os alelos afetados. A mutação IVS2-13A/C>G, por exemplo, parece ser resultado de eventos de conversão recente, ao passo que a mutação p.Q318X parece ser devida à disseminação de alelos mutantes gerados há várias gerações.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

- Caracterizar alelos relacionados com a deficiência de 21-hidroxilase portadores de deleção e conversão em larga escala avaliando:
 - o número de unidades RCCX presentes nos alelos;
 - a estrutura molecular dos pares de genes C4A e B e, CYP21A1P e CYP21A2.
- Estudar os rearranjos no módulo RCCX investigando a variabilidade genética dos híbridos CYP21A1P/CYP21A2 e dos CYP21A1P através da determinação da região de recombinação delimitada por mutações e SNPs intra-gênicos.

Objetivos Específicos

- Montar haplótipos com base nas características moleculares encontradas.
- Estimar a freqüência de haplótipos idênticos.
- Avaliar a possibilidade de um efeito fundador para haplótipos com freqüências maiores.
- Avaliar o impacto dos métodos de genotipagem normalmente empregados na acuidade de caracterização dos haplótipos aqui investigados.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1- Casuística

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM – UNICAMP com Parecer de número 870/2007, 27 de novembro de 2007 (Anexo 1).

Foram incluídos no trabalho 56 pacientes portadores de Hiperplasia Congênita da Adrenal devido à deficiência de 21hidroxilase. Após o exame clínico e a confirmação por testes bioquímicos (Tabela 2), foram coletadas as amostras de sangue periférico total para a realização da avaliação molecular no Laboratório de Genética Molecular Humana – CBMEG. As amostras foram provenientes de Campinas – SP; Rio de Janeiro - RJ; Uberlândia – MG; Uberaba - MG e Fortaleza - CE.

Paciente ¹	Sexo ²	Idade ao	Dados Clínicos	170HP ⁴	Na ⁺ / K ^{+ 5}	Fenótipo ⁶
		Diagnóstico		(ng/mL)	(mEq/L)	
4Xa1	F	0,6	genitália ambígua, Prader III	NI	NI	PS
12Xa1	F	0,5	genitália ambígua, Prader IV encaminhada sexo	52	120/7,4	PS
			masculino			
13Xa1	F	0,7	genitália ambígua, Prader III	> 20	134/5	NPS
16Xa3	F	2	genitália ambígua, Prader III/IV, desnutrição e	NI^7	108/6,6	PS
			desidratação			
19Xa1	F	16	genitália ambígua, Prader IV, encaminhada como sexo	NI	154/6,2	NPS
			masculino			
20Xa2	F	5	genitália ambígua, Prader III	19	137/4,8	NPS
20Ya3	Μ	2,4	irmã com HCA	> 20	139/4,7	NPS
23Xa1	F	1,2	genitália ambígua, Prader III	> 20	136/5,7	NPS
25Ya1	Μ	1,4	puberdade precoce	> 20	NI	NPS
28Xa1	F	1,5	genitália ambígua, Prader V, encaminhada como sexo	999,9	129/6,6	PS
			masculino			

Tabela 2 - Dados clínicos e bioquímicos dos pacientes com hiperplasia congênita da adrenal por deficiência de 21-hidroxilase.

_

Paciente ¹	Sexo ²	Idade ao	Dados Clínicos	170HP⁴	Na ⁺ / K ^{+ 5}	Fenótipo ⁶
		Diagnóstico ³		(ng/mL)	(mEq/L)	•
30Xa1	F	0,4	genitália ambígua, Prader III, baixo ganho de peso	> 20	137/6,2	PS
32Ya1	Μ	1,8	desidratação, choque e desnutrição	NI	129/6,2	PS
36Xa1	F	> 120	Prader V, registrada como sexo masculino	NI^{8}	NI	NPS
50Ya1	Μ	14	pubarca e hiperpotassemia	96	131/6,7	PS
56Xa2	F	10	genitália ambígua, Prader III	> 25	142/5	NPS
59Ya3	Μ	0,5	hipoglicemia e hiperpotassemia	> 20	123/7,6	PS
60Ya1	Μ	89	puberdade precoce	> 25	142/3,9	NPS
61Xa2	F	12	Genitália ambigua, Prader III	NI	NI	NPS
70Ya1	Μ	13	Desidratação e desnutrição	> 25	120/6,8	PS
86Ya1	Μ	78	puberdade precoce	12,2	NI	NPS/NC
91Xa2	F	0,5	genitália ambígua, Prader IV/V e Desnutrição	210	124/6,4	PS
91Xa3	F	0,1	genitália ambígua, Prader III/IV	186	130/5,7	PS
99Xa1	F	64	genitália ambígua, Prader IV	238	NI	NPS
102Xa1	F	78	pubarca desde 4 a 6 m	> 25	NI	NC
108Xa1	F	0,5	genitália ambígua, Prader III/IV, desnutrição e	> 220	120/7,6	PS
			desidratação			
114Xa1	F	0,5	genitália ambígua, Prader IV e desnutrição	> 20	119/5,3	PS
115Ya1	Μ	1,1	desidratação, choque e desnutrição	NI	116/8,8	PS
117Xa1	F	0,3	genitália ambígua, Prader III e baixo ganho de peso	> 20	128/4,1	PS
122Xa2	F	NI	NI	NI	NI	NPS
123Ya1	Μ	72	puberdade precoce	> 20	NI	NPS
136Ya1	Μ	1,8	desidratação e baixo ganho peso	> 20	120/9,5	PS
139Ya1	Μ	2,2	desidratação e desnutrição	> 200	121/6,8	PS
141Ya1	Μ	NI	desidratação e desnutrição	NI	NI	PS
159Xa1	F	0,4	genitália ambígua, Prader III e desnutrição	> 20	121/6,5	PS
163Xa1	F	0,5	genitália ambígua, Prader III/IV e baixo ganho peso	> 200	123/7,4	PS
165Ya1	Μ	2,8	desidratação e desnutrição	49,3	116/9,2	PS
168Xa1	F	NI	NI	NI	NI	PS

-

Paciente ¹	Sexo ²	Idade ao	Dados Clínicos	170HP ⁴	Na ⁺ / K ^{+ 5}	Fenótipo ⁶
		Diagnóstico ³		(ng/mL)	(mEq/L)	-
180Ya1	М	45	Puberdade precoce	183	NI	NPS
198Xa1	F	NI	NI	NI	NI	NC
196Xa1	F	0,4	genitália ambígua, Prader IV e desnutrição	33	120/6,6	PS
203Xa1	F	4	genitália ambígua, Prader IV e desnutrição, encaminhada como sexo masculino	> 200	113/5,4	PS
209Xa1	F	0,3	genitália ambígua, Prader III, baixo ganho peso	> 100	121/6,2	PS
Nor2Ya1	Μ	0,5-1	Irmão foi a óbito com quadro semelhante	17,6	105/9,9	PS
Ube3Xa1	F	NI	genitália ambígua ao nascimento	NI	NI	PS
Ube6Xa1	F	NI	genitália ambígua ao nascimento	NI	NI	PS
Ube7Xa1	F	48	pubarca precoce	NI	NI	NC
Ubl1Xa1	F	NI	com ambigüidade genital evoluindo com perda de sal, Irmão foi a óbito por insuficiência adrenal	114	127/6,7	PS
Ubl6Xa1	F	NI	ambigüidade genital ao nascimento evoluindo com perda de sal	2.32	NI	PS
Ubl7Xa1	F	NI	ambigüidade genital ao nascimento evoluindo com perda de sal no período neonatal	145,52	NI	PS
Ubl8Xa1	F	NI	ambigüidade genital ao nascimento evoluindo com perda de sal	16,10	123,9/7,7	PS
Rio1Ya1	Μ	NI	NI	NI	NI	NPS
Rio3Xa1	F	NI	NI	NI	NI	PS /NPS
Rio6Xa1	F	NI	NI	NI	NI	PS
HAT-	F	~72	quadro de pubarca precoce, clitoromegalia	>25 ⁶	-	NC
1Xa1				7		
CI-13	F	NI	hirsutismo facial / irregularidade menstruais	19'	-	NC

¹código padronizado no laboratório: 1° número = número da família; X = sexo genético feminino; Y = sexo genético masculino; a = afetado; 2° número = ordem na irmandade, Ube= Uberaba, Ubl= Uberlândia, Rio= Rio de Janeiro, Nor= Nordeste, HAT= hiperplasia adrenal com manifestação tardia, CI = caso isolado. ²F = feminino; M = Masculino; ³Meses; ⁴17OHP= 17hidroxiprogeterona; faixa de normalidade para crianças 1-13 ng/ml; ⁵faixa de normalidade para crianças 138-146 (Na⁺) e 4,1-5,3 (K); ⁶resultado de 60' sob estímulo com ACTH, resultado basal e 30' = 7,59/ 20,34; ⁷resultado de 60' sob estímulo com ACTH, resultado basal e 30' = 1,2/ >25. NI= não informado.

2 - Obtenção das amostras de DNA e Extração de DNA genômico

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de sangue total periférico colhido com EDTA (aproximadamente 15 mL em adultos e 10 mL em crianças). A metodologia de extração de DNA utilizada é a de lise com Proteinase K (Boehringer Mannhein, Germany) padronizada no laboratório de Genética Molecular Humana-CBMEG (De Araújo *et al.*, 1996). As amostras de DNA genômico foram quantificadas em espectrofotômetro *DU-65 Spectrophotometer* (Beckman, Estados Unidos). A concentração das amostras foi obtida por:

 $[DNA (\mu g/mL)] = 50 x$ absorbância 260nm x fator de diluição

3 - Análise da variação numérica dos genes CYP21 e C4

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

3.1 - Southern blot:

Foram digeridos 12 μ g de DNA genômico com a enzima de restrição *Taq* I (10 U) (Invitrogen Corporation, Estados Unidos) em um volume total de 200 μ L segundo o protocolo descrito pelo fabricante da enzima. As reações foram incubadas em banho a 65°C por 18h. Após a incubação, a eficiência da reação foi testada separando as amostras em gel de agarose 0,8%. Em seguida, o DNA foi precipitado com 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado, por 2 h a -20 °C. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos em microcentrífuga e, o precipitado contendo DNA digerido foi lavado com etanol 70%. Após centrifugação (13.000 rpm por 10 minutos), o DNA foi ressuspendido em 20 μ L de TE, e aplicado em gel de agarose de baixa

eletroendosmose (Sigma Chem. Corporation) a 0,8% em tampão\TBE para separação dos fragmentos; a corrida eletroforética durou em média 18h a 50V. Depois de fotografado, o conteúdo do gel foi transferido para uma membrana de nylon (Hybond N⁺, Amersham Biosciences), seguindo-se as especificações do fabricante da membrana. Antes da transferência o gel foi despurinado em HCl 0,25 N por 12 min, e em seguida desnaturado em NaOH 0,4 N, NaCl 1N por 30 min. O DNA foi transferido para a membrana por capilaridade durante aproximadamente 18 h, como descrito em Sambrook *et al.* (1989). Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de neutralização (tampão fosfato de sódio 0,1 M) durante 30 min. A membrana foi secada em papel de filtro e colocada em forno a 80° C por 2h.

3.2 - Sondas utilizadas:

A sonda para a detecção do gene *CYP21A2* e do pseudogene *CYP21A1P* (pC21/3c) foi gentilmente cedida pelo Dr. Perrin White, Cornell University Medical College, New York, EUA. A sonda pC21/3c corresponde ao cDNA de *CYP21* (2 kb) isolado das glândulas adrenais humanas, clonado em sítio *BamH* I no vetor pcD. A sonda correspondente ao gene *C4* do Sistema Complemento foi gentilmente cedida pelo Dr. Tom Strachan, Depto. of Medical Genetics, St. Mary's Hospital, Manchester, Inglaterra. A sonda C4 é um fragmento de cDNA (550 bp) correspondente à região 5' do gene, clonado nos sítios *BamH* I (Invitrogen Corporation, Estados Unidos) e *Kpn* I (Invitrogen Corporation, Estados Unidos) no vetor pTZ18B. Os plasmídios contendo os fragmentos de *CYP21* e *C4* foram digeridos com enzimas apropriadas e os produtos das digestões foram separados em gel de agarose 0,8%. Os fragmentos de DNA correspondentes às seqüências *C4* e *CYP21* foram extraídos do gel e purificados utilizando-se o protocolo "Wizard SV Gel and PCR clean-up system" (Promega Corporation, Estados Unidos). Os fragmentos da sonda foram mantidos a -20°C.

3.3 - Marcação das sondas através de Random Priming:

As sondas e DNA foram marcadas com α^{32} P-dCTP (Amersham Biosciences) pelo método de *Random Priming*, seguindo-se o protocolo do fabricante do kit *Random Primers DNA Labeling System* (Invitrogen Corporation, Estados Unidos).

3.4 - Purificação da sonda:

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

3.5 - Hibridização:

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

3.6 - Autorradiografia e remoção da sonda das membranas:

Os filtros lavados foram expostos a filmes de raios-X (Hyperfilm MP-Amersham) em cassetes de exposição contendo intensificador de sinal (*Lightning Plus* - Dupont), a - 70°C por 2 dias. Após esse período, os filmes foram revelados. A sonda foi removida dos filtros incubando-se os mesmos em solução Tris-HCl 5 mM, pH 8,0, 0,04% de EDTA e 0,1% de SDS, a 100°C, até que a solução atingisse a temperatura ambiente. Os filtros tratados foram selados em saco plástico, armazenados a 4°C e posteriormente rehibridizados.

As intensidades dos *blots*, foram avaliadas visualmente e/ou pelo *software Kodak Digital Science, Electrophoresis Documentation and Analysis System* 120 (KodaK).

4 - Avaliação dos genes híbridos CYP21A1P/CYP21A2

Nos eventos de deleção e conversão gênica geralmente ocorre a formação de um gene híbrido não funcional, com a porção 5' do pseudogene *CYP21A1P* e a porção 3' do gene *CYP21A2*. Dependendo do ponto de recombinação, o gene híbrido pode apresentar porções variáveis pertencentes ao pseudogene *CYP21A1P* e do gene *CYP21A2*. Para mapear as regiões pertencentes ao gene e ao pseudogene nos híbridos *CYP21P/CYP21*, utilizou-se a técnica de PCR. Pares de *primers*, normais e mutantes (Tabela 4), foram utilizados em conjunto com *primers* ancoradores específicos (Tabela 3). Os *primers* normais detectaram seqüências do *CYP21A2*, enquanto as respectivas versões mutantes detectaram mutações pontuais mais freqüentes provenientes do *CYP21A1P*.

Tabela 3: Seqüências dos primer ancoradores utilizados.

Primer	Seqüência (5'-3')	Tm(°C)	Localização	Especifidade
Ex6ns	AG GGA TCA CAT CGT GGA GAT G	64,0	Éxons 6	CYP21A2
Ex6na	GC TGC ATC TCC ACG ATG TGA	72,0	Éxons 6	CYP21A2
Ex6ms	AG GGA CCA CAA CGA GGA GAA	60,6	Éxons 6	CYP21A1P
Ex6ma	TCA GCT GCT TCT CCT CGT TGT GG	70,0	Éxons 6	CYP21A1P

*- mutação do cluster (L236N,V237Q, M239K) no éxon 6

Primer	Seqüência (5'-3')	Mutação	$T_m (^{o}C)$	Local
Ex1ns	TCC GGA GCC TCC ACC TCC C		72	Éxon 1
Ex1ms	TCC GGA GCC TCC ACC TCC T	p.P30L	72	Éxon 1
In2ns	TTC CCA CCC TCC AGC CCC CAA		72	Íntron 2
In2ms	TTC CCA CCC TCC AGC CCC CAG	IVS2-13A/C>G	72	Íntron 2
In2cs	TTC CCA CCC TCC AGC CCC CAC		72	Íntron 2
Ex3ns	CGG ACC TGT CCT TGG GAG ACT AC		70	Éxon 3
Ex3ms	ACT ACC CGG ACC TGT CCT TGG TC	del. 8 pb	70	Éxon 3
Ex3na	TCC AGA GCA GGG AGT AGT CTC		70	Éxon 3
Ex4ns	TTC TCA CCT GCA GCA TCA T		68	Éxon 4
Ex4ms	CTC TCC TCA CCT GCA GCA TCA A	p.I172N	70	Éxon 4
Ex7na	TCC ACT GCA GCC ATG TGC AC		68	Éxon 7
Ex7ma	TCC ACT GCA GCC ATG TGC AA	p.V281L	68	Éxon 7
Ex8.2na	CTA AGG GCA CAA CGG GCC G		72	Éxon 8
Ex8.2ma	CTA AGG GCA CAA CGG GCC A	p.R356W	72	Éxon 8

Tabela 4: Sequência dos primers utilizados para o PCR alelo-específico.

os *primers* das mutações p.P30L, A/C \rightarrow G (656), deleção de 8 pb e I172N foram usados com o Ex6na ou Ex6ma como âncora. Os *primers* das mutações p.V281L e p.R356W foram usados com o *primers* Ex6ns ou Ex6ms como âncora. As letras em negrito indicam a troca nucleotídica. No íntron 2 foi utilizado o *primer* Int2Cs para detectar o polimorfismo A>C existente na posição 656. n = normal, m = mutante ; s = *primer sense*, a = *primer antissense*, a seqüência sublinhada do *primer* Ex3ns indica a deleção de 8 pares de base do gene *CYP21P*.

As amplificações foram executadas no Temociclador da Perkin-Elmer 9700 e os ciclos dependeram do fragmento a ser amplificado e dos pares de *primers* utilizados (tempo de extensão e anelamento variam segundo a T_m de cada par de *primers*). As condições gerais para a reação de amplificação por PCR alelo-específica utilizada para a caracterização das mutações estão na Tabela 5.

Ao término das reações, as amostras foram separadas em gel de agarose 1% (Invitrogen Corporation, Estados Unidos) e fotografadas.

Para o estudo da alteração p.Q318X no éxon 8, o produto da amplificação gerada pelos *primers* Ex8.2 normal ou mutante (Tabela 4) associados com o *primer* ancora Ex6s (Tabela 3) foi digerido com a enzima de restrição *Pst* I (Invitrogen Corporation, Estados Unidos). O protocolo utilizado seguiu normas do fabricante para o volume final da reação de 30 μ L a 37°C durante 2h. O produto da digestão foi separado em gel de agarose 1,2% (Invitrogen Corporation, Estados Unidos) e fotografado.

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

 Tabela 5: Condições gerais das concentrações de reagentes da PCR e dos ciclos de temperatura.

*T_m para cada *primers* encontra-se na Tabela 4.

5 - Investigação dos polimorfismos intragênicos:

As técnicas descritas a seguir foram empregadas para a separação de haplótipos com base em marcadores intragênicos. Foram avaliados sete polimorfismos intragênicos:

- Polimorfismo 1 no éxon 1: presença de um códon CTG (leu) extra, nas posições p.L6p.L10 no éxon 1, este polimorfismo indica uma variação de tamanho na enzima 21 hidroxilase entre 494 e 495 aminoácidos. Não altera a atividade enzimática e pode ser encontrado em *CYP21A1P* (RODRIGUES, *et al.*, 1987);
- Polimorfismo 2 no éxon 1: troca nucleotídica T>C na posição 115 a partir do códon ATG de início da tradução; este polimorfismo não provoca a troca do aminoácido L39, sendo considerado silencioso. Está presente tanto no gene ativo quanto no pseudogene;
- Polimorfismo 3 no éxon 1: troca nucleotídica A>C na posição 138 a partir do códon ATG de início da tradução; este polimorfismo não provoca a troca do aminoácido P45, sendo considerado silencioso. Está presente tanto no gene ativo quanto no pseudogene;

- Polimorfismo 4 no íntron 2: troca nucleotídica T>C na posição 395 a partir do códon ATG de início da tradução e, ocorre tanto no gene ativo quanto no pseudogene;
- Polimorfismo 5 no íntron 2: troca nucleotídica A>C na posição 656 a partir do códon ATG de início da tradução. Esta variação é normalmente avaliada nos alelos normais para a mutação IVS2-13A/C>G, pois nos alelos afetados com essa mutação, a base nessa posição é uma guanina. Este polimorfismo será estudado por PCR aleloespecífico, juntamente com a análise da mutação (descrita acima). A numeração dos nucleotídeos usada aqui é baseada na seqüência publicada por Higashi *et al.*, (1986). A variante 656G está presente no pseudogene;
- Polimorfismo 6 no éxon 3: troca nucleotídica G>A na posição 683 a partir do códon ATG de início da tradução; este polimorfismo provoca a troca de aminoácido K102 para R102; porém não altera a atividade enzimática (RODRIGUES *et al.*, 1987). Este polimorfismo ocorre tanto no gene ativo quanto no pseudogene;
- Polimorfismo 7 no éxon 7: troca nucleotídica C>G na posição 1586 a partir do códon ATG de início da transcrição; este polimorfismo não provoca a troca de aminoácido L248. Este polimorfismo aparece nas seqüências do pseudogene descritas.
- Polimorfismo 8 no éxon 7: troca nucleotídica G>C na posição 1645 a partir do códon ATG de início da transcrição; este polimorfismo provoca a troca de aminoácido S268 para T268; porém não altera a atividade enzimática (RODRIGUES *et al.*, 1987). Este polimorfismo não aparece nas seqüências do pseudogene descritas.

Para o estudo dos polimorfismos acima descritos foram utilizados os *primers* da Tabela 3 como âncoras (*sense* ou *antissense*, de acordo com a posição do polimorfismo) para amplificação seletiva do gene *CYP21A2* e, os *primers* da Tabela 6 para seleção do alelo desejado. Para os polimorfismos das posições 115 e 395, será necessário repetir a genotipagem utilizando o *primer* âncora CYP21-656Cas em todos portadores do alelo 656C, devido ao efeito de *dropout* alélico da variante 656C.

As médias das freqüências dos alelos para cada polimorfismo que constam do banco de *Single Nucleotide Polymorphisms* do *National Institute of Health* estão listadas na Tabela 6.

	Posição	Aminoácido	Variação	ref. SNP	Freqüência
Éxon 1	g.27-30	p.Leu10 + ou -	4>5 codons	rs61338903	-
Éxon 1	g.115	p.L38L	T > C	rs33986168	0,800 (T) 0,200 (C)
Éxon 1	g.138	p.P44P	A > C	rs33947354	0,971(A) 0,029 (C)
Intron 2	g.395	-	T > C	rs6462	0,675 (T) 0,325 (C)
Éxon 3	g.683	p.R101K	G > A	rs6474	0,725 (G) 0,492 (A)
Éxon 7	g.1587	p.L247L	C > G	rs6477	0,675 (C) 0,325 (G)
éxon 7	g.1645	p.S267T	G > C	rs6472	0,941(G) 0,059 (C)

Tabela 6: Polimorfismos presente em CYP21A2.

(g.)= posição genômica; (p.)= posição na proteína.

Tabela	7:	Seqüência	dos	primers	utilizados	para	0	PCR	alelo-específica	no	estudo	dos
		SNPs exôr	nicos	e intrôni	icos.							

Primer	Seqüência (5'-3')	SNP	Aminoácido	T _m	Local
			na	(°C)	
			proteína		
CYP21-115Cs	CCC CGG GCT TCT TGC ACC	Posição 115 C	L39	67	Éxon 1
CYP21-115Ts	CCC CGG GCT TCT TGC ACT	Posição 115 T	L39	64,5	Éxon 1
CYP21-138As	TGC AGC CCG ACC TCC CAA	Posição 138 A	P45	66,0	Éxon 1
CYP21-138Cs	TGC AGC CCG ACC TCC CCA	Posição 138 C	P45	68,0	Éxon 1
CYP21-395Cs	AG <u>T</u> CACTTACCTGTAAGGGCC	Posição 395 C	-	57,3	Íntron 2
CYP21-395Ts	AG <u>T</u> CACTTACCTGTAAGGGCT	Posição 395 T	-	54,6	Íntron 2
CYP21-656Ans	CCA CCC TCC AGC CCC CAA	Posição 656 A	-	67,1	Íntron 2
CYP21-656Cns	CCA CCC TCC AGC CCC CAC	Posição 656 C	-	66.4	Íntron 2
CYP21-656Gms	CCA CCC TCC AGC CCC CAG	Posição 656 G	-	66,6	Íntron 2
CYP21-683As	TGC <u>CCT</u> CAA GCT GGT GTC TAA	Posição 683 A	K102	62,4	Éxon 3
CYP21-683Gs	TGC $\underline{\text{CCT}}$ CAA GCT GGT GTC TAG	Posição 683 G	R102	61,9	Éxon 3
CYP21-1586Cs	TCC ACT GGC CTG CCA CG	Posição 1586 C	L248	62,0	Éxon 7
CYP21-1586Gs	TCC ACT GGC CTG CCA CC	Posição 1586 G	L248	61,0	Éxon 7
CYP21-1645Gas	TCC AGA GCC CTC TTC CAT GC	Posição 1645 G	S268	63,7	Éxon 7
CYP21-1645Cas	T <u>T</u> C AGA GCC CTC TTC CAT G G	Posição 1645 C	T268	61,3	Éxon 7

As letras em negrito indicam o sítio onde ocorre o SNP; s = *primer sense*, as = *primer antissense*, as seqüências sublinhadas indicam modificações da seqüência original introduzidas para evitar formação de dímeros ou *hairpins* de alta estabilidade nos oligonucleotídeos.

6- Seqüenciamento da região 5' dos genes Híbridos CYP21A1P/CYP21A2:

O fragmento 5' éxon 6 normal foi amplificado com as seqüências de *primers* da Tabela 7, as condições de amplificação seguiram as da Tabela 5 e a Tm de cada *primer* esta relacionada na Tabela 7. Posteriormente à amplificação as amostras foram separadas em gel de agarose 1%, fotografadas e purificadas com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega Corporation, Estados Unidos). A reação de seqüenciamento foi realizada no termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient, os ciclos de amplificação e as condições da reação estão representados na Tabela 6 e os *primers* utilizados estão listados na Tabela 7.

Reação	[] final		
		Ciclo geral	
Produto da PCR	1 µg	1 ciclo de:	94°C, 5 min
Tampão (10x)	1x		
"*primer"	0,6 pmoles	30 ciclos de:	94°C, 1 min
Big Dye – Applied Bisystem- v3.1	2 µL		*T _m do "primer", 1min 30 seg 72°C, 5 min
Água qsp	10µL	1 ciclo de: 72°C, 5 min	

Tabela 8: Esquema da reação de seqüenciamento.

*as seqüências dos primers utilizados para o seqüenciamento estão listadas na tabela 5.

Tabela 9: Primers utilizados para reação de seqüenciamento da região 5' dos geneshíbridos CYP21A1P/CYP21A2

Primer	Seqüência (5'-3')	Localização	Especificidade
5'21B1s	GAG TGA GTG CCC ACA AAG C	Região 5' UTR	CYP21A2- CYP21A1P
Int1s	TAG GAG GGG GCG GAG GTG A	Íntron 1	CYP21A2-CYP21A1P
Éxon 3na	TCC AGA GCA GGG AGT AGT CTC	Éxons 3	CYP21A2
Ex6na	GC TGC ATC TCC ACG ATG TGA	Éxons 6	CYP21A2

(s)= primer sense, (as) = primer antisense.

A reação de seqüenciamento foi purificada com etanol 80% gelado, seguida de 45 minutos de centrifugação a 3700 rpm, o sobrenadante foi descartado e acrescentado etanol 70%, seguido de 10 minutos de centrifugação a 3700 rpm, o sobrenadante foi descartado. As amostras foram ressuspendidas em 10 μ L formamida Hi-Di (*Applied biosystem*), desnaturadas a 95°C por 5 minutos e imediatamente colocadas em gelo. Foram

seqüenciadas no *ABI PRISM 3700 DNA Analyser* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Estados Unidos). Os *softwers* utilizados para a análise das seqüências foram: *Chromas* e *Gene Runner*.

7- MLPA Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

O kit utilizado para a realização deste experimento foi o SALSA MLPA kit P050B1, composto por 33 sondas que geraram fragmentos de 130 pb a 391 pb (Figura 10), divididas em 18 sondas referências, 1 sonda para a região UTY (cromossomo Y) e 14 sondas para o braço curto do cromossomo 6 e os genes *CYP21A1P*, *CYP21A2*, *C4A* e *C4B* (Figura 9) (MRC-Holland, Amsterdã, Holanda; (http://www.mrc-holland.com).



Figura 9: Localização das sondas de MLPA em 6p 21.3. As setas indicam o sentido da transcrição dos genes; b, c, d indicam grandes deleções que podem ser detectadas por MLPA. Copyright MRC – Holland (www.mrc-holland.com).

7.1 – Desnaturação do DNA genômico e hibridização com sondas SALSA

MLPA

O DNA genômico foi diluído com TE 1X para que atingisse a concentração final de 400 ng em 5µL. Estas diluições foram aquecidas a 98°C e resfriadas a 25°C, em seguida foi adicionada a mistura de SALSA *probe mix* e tampão em cada tubo. Foram misturadas

cuidadosamente e incubadas a 95°C por 1 mim e 16 horas a 60°C no termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* Figura 11 itens a e b.

7.2 – Reação de Ligação

A temperatura do termociclador foi reduzida a 54°C, quando 32 μ l de *Mix Ligase*-65 foram acrescentados a cada amostra, com posterior ressuspensão. Para a obtenção do *Mix Ligase* foram misturados 3 μ l de Ligase-65 *buffer* A, 3 μ l Ligase-65 *buffer* B, 25 μ l de H₂O e 1 μ l Ligase-65.

Em seguida, as amostras permaneceram incubadas a uma temperatura de 54°C por 15 minutos e a 98°C por 5 minutos (Figura 11).

7.3 – Reação da PCR Multiplex

Foram adicionados 4 μ L 10X SALSA PCR *buffer*, 26 μ l de H₂O, 10 μ l da reação de ligação de MLPA a novos tubos, que foram mantidos em termociclador a 60°C.

Em seguida, 10 μ l de *Mix Polymerase* foram acrescentados a cada tubo, para assim inicializar a reação de PCR, segundo o protocolo de 30 segundos a 95°C; 30 segundos 60°C; 60 segundos 72°C, por 35 ciclos. Por fim, as amostras foram incubadas a 72°C, durante 20 minutos.

Para o *Mix Polymerase* foram necessários 2 μ l de SALSA PCR-*primers*, 2 μ l SALSA *Enzyme Dilution buffer*, 5,5 μ l de H₂O e 0,5 μ l de SALSA *Polymerase*.



Figura 11: Na Parte I: Representação esquemática das sondas de MLPA. Para cada região a ser analisada são desenhadas duas sondas: a esquerda e a direita que se anelam de maneira adjacente. Cada sonda tem a região que é reconhecida por *primers* universais. A sonda direita tem uma seqüência denominada coringa que varia de

tamanho diferenciando os pares de sonda e permitindo a visualização dos fragmentos por eletroforese capilar. Na Parte II: A) Oligonucleotídeos sintéticos que compõem o kit P050-B1 e DNA genômico; B) Hibridização adjacentes dos pares de sondas de MLPA nas seqüências alvo; C) Reação de Ligação onde ocorre a união das sondas adjacentes com a enzima ligase; D) Reação de PCR Multiplex: amplificação com *primers* universais gerando 33 fragmentos de tamanhos diferentes, onde somente o *primer* direto é marcado com o corante FAM; E) Separação por eletroforese Capilar dos fragmentos únicos amplificados. Adaptado de BARBARO, M. 2008.

7.4 - Separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar

Os produtos de PCR foram identificados utilizando o equipamento *ABI PRISM* 3700 DNA Analyser (Applied Biosystem-Applera Corporation, Estados Unidos), com filtros de fluorescência específicos, seguindo o protocolo desenvolvido por *MRC Holland* b. v2; 1-6-2007: Salsa 6-FAM PCR primer-dNTP mix.

Posteriormente à reação de PCR foram misturados às amostras $0,75 \ \mu$ l da reação de PCR, $0,75 \ \mu$ L de água, $0,5 \ \mu$ L de 500 ROX, 13,5 μ l Formamida Hi-Di, em seguida, desnaturados a 94°C por 2 minutos e resfriados em gelo. A leitura foi realizada no equipamento de eletroforese capilar ABI-Prism 310 *Genetic Analyzer* (1 capilar) com as seguintes configurações:

- Padrão Interno: conjunto de filtros D 500ROX* (ABI nr. 401734)
- Comprimento do capilar: 47 cm (ABI nr. 402839);
- Polímero: POP-4
- Tempo de corrida: 30 min;
- Voltagem de corrida: 15 kV;
- Temperatura de corrida: 60 °C;
- Volume de preenchimento do capilar: 184 vezes;
- Voltagem de pré-corrida: 15 kV;
- Tempo de pré-corrida: 180 s;
- Voltagem de injeção: 3.0 kV;
- Tempo de injeção: 10-30 s;

• Tempo de espera: 1 s.

Os tamanhos dos fragmentos foram visualizados utilizando o *Software GeneScan* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Estados Unidos) Figura 3 item E.

7.5 – Análise dos dados obtidos por MLPA

Foi utilizado o *software Coffalyser* MLPA DAT desenvolvido e recomendado pelo fabricante especialmente para a análise de várias amostras. É um software baseado no excel que pode ser usado com a versão 2003+ ou superior do *Microsoft Office version* 2003+. Em todos os passos para a normalização dos dados estão incluídas correções para efeitos característicos da maioria das misturas de sondas que é o decréscimo na altura/área do pico dependente da sonda. Este software é constantemente aprimorado e pode ser obtido gratuitamente no sitio WEB da empresa.

Tecnicamente, os dados foram normalizados dividindo-se a área do pico de cada sonda pela soma dos picos de todas as sondas na amostra. Em seguida, esse valor normalizado foi dividido pela área do pico da sonda correspondente, obtida a partir do DNA controle. Quando houve presença de deleções e duplicações em heterozigose, os valores foram, respectivamente, de 0,5 e 1,5, se comparados com o valor normal de 1,0.

RESULTADOS

1- Análise por RFLP com a enzima Taq I

Inicialmente todos os pacientes portadores de HCA e seus familiares foram avaliados quanto ao número de cópias dos genes C4 (A e B) e dos CYP21A1P e CYP21A2 presentes nos alelos causadores de deficiência de 21-hidroxilase. Quando hibridizados com a sonda pC21/3c, os fragmentos de DNA produzidos com a enzima Taq I correspondentes aos genes CYP21A2 e CYP21A1P foram localizados e identificados por tamanho de 3,7 e 3,2 kb, respectivamente e, os fragmentos de 7,0 ou 6,4 kb e 6,0 ou 5,4 kb, correspondendo respectivamente aos genes C4A e C4B, foram reconhecidos com a sonda do complemento C4, C4B550. Além dos tamanhos diferentes para cada gene, esta avaliação indicou o número de cópias de cada um através da variação de intensidade das bandas produzidas nos *blots.* Por exemplo, as deleções foram indicadas por redução de intensidade (heterozigotos) ou ausência (homozigotos) dos fragmentos relativos tanto aos genes C4A ou C4B quanto ao gene CYP21A2 ou ao pseudogene CYP21A1P obtidos na digestão com a enzima de restrição Taq I. Já nas conversões as variações de intensidade foram observadas apenas para os CYP21A2 e CYP21A1P. Por outro lado, as duplicações foram reconhecidas por aumento nas intensidades dos respectivos fragmentos. Deve-se ressaltar aqui que nos alelos portadores de deleção e conversão a cópia do gene CYP21 pode ser híbrida formada pelo terminal 5° do CYP21A1P e o terminal 3° do CYP21A2. Desta forma, seguindo a classificação proposta por Blanchong et al. (2000) que se baseia no número de módulos RCCX presentes no cromossomo, os alelos, causadores de deficiência de 21-hidroxilase, foram divididos em três grupos: alelos monomodulares (deleção), alelos bimodulares (conversão) e alelos trimodulares (duplicação).

1.1 - Alelos Monomodulares Com Genes Híbridos CYP21A1P/CYP21A2

Foram identificados genótipos homozigotos e heterozigotos de alelos monomodulares (n = 26), com deleção de 30 kb da unidade RCCX envolvendo o terminal 3` de *CYP21A1P* o gene *C4B* e o terminal 5` do *CYP21A2*. Nos casos de heterozigose,

foram observados vários genótipos com associação a alelos bimodulares, trimodulares e até um raro tetramodular (Figura 11).

Assim, os genótipos heterozigotos de alelos monomodulares e genes híbridos apresentaram combinações com alelos bimodulares, onde o gene *C4B* foi o delimitador dos genótipos, apresentando os seguintes fragmentos *Taq* I: 6,0 kb (n = 14), 5,4 kb (n = 1) e 3,9 kb (n = 1); com alelo trimodular, onde o gene *C4B* apresentava o fragmento de 5,4 kb (n = 2); com alelo tetramodular, onde o *C4B* apresentava o fragmento de 6,0 kb (n = 1). Foram identificados também genótipos com heterozigose composta de alelos monomodulares e bi ou trimodulares, ambos com híbridos, com as seguintes composições do gene *C4B*: 6,0 kb (n = 2), 5,4 kb (n = 1), 2x5,4 kb (n = 1).



Figura 11: Padrões de *Southern blot* para genótipos de indivíduos com alelos monomodulares e gene híbrido *CYP21A1P/CYP21A2*. Imagens obtidas após hibridização com sondas específicas para os genes *C4* e *CYP21* e autorradiografia.

Nos genótipos onde o gene híbrido estava presente nos dois alelos, pacientes 12Xa1, 165Ya1, Rio3Xa1 e Ubl8Xa1, a presença de deleção e conversão foi indicada pela ausência do fragmento 3,7 kb e intensidades diminuídas ou inalteradas dos fragmentos de 6,0 ou 5,4 kb (Figura 11 C, D, H). Estes alelos bimodulares portadores de gene *CYP21A1P/CYP21A2* híbrido divergiram quanto ao tamanho de fragmento do gene *C4B*, 2 indivíduos apresentaram gene *C4B* de 6,0 kb e 1 indivíduo o gene *C4B* de 5,4 kb.

Nestes e, nos casos de heterozigose composta com alelos tri e tetramodulares, a identificação de um alelo monomodular no genótipo só foi possível pelo estudo segregacional nas famílias (Figura 12). Ao se observar os indivíduos afetados das famílias 12 e 165, nota-se que apresentaram genótipos idênticos porém, o alelo monomodular + híbrido CYP21A1P/CYP21A2 da primeira família é de origem paterna e no segundo caso é de origem materna. Na família Ubl8 as intensidades dos fragmentos do indivíduo afetado poderiam sugerir que seu genótipo fosse composto por alelo bimodular + híbrido CYP21A1P/CYP21A2 em homozigose. No entanto, ao se avaliar a família, ficou claro que a mãe apresentava um alelo trimodular + híbrido CYP21A1P/CYP21A2 e o pai um alelo monomodular + híbrido CYP21A1P/CYP21A2 e, estes alelos eram os que compunham o genótipo da filha. Finalmente, ao observar as intensidades dos fragmentos do indivíduo afetado da família 196 nota-se um aumento do fragmento correspondente ao gene C4B (6,0 kb) acompanhada de aumento da intensidade do fragmento correspondente ao pseudogene CYP21A1P (3,2 kb) sugerindo uma duplicação da unidade C4B+CYP21A1P. Ao avaliarmos os genótipos dos pais observamos que este aumento é de origem paterna sugerindo a presença de um alelo tetramodular e, de origem materna, foi observado um alelo monomodular + híbrido CYP21A1P/CYP21A2 (Figura 12).

Três pacientes apresentaram genótipos homozigotos devido à consangüinidade de seus pais, mas divergiram quanto ao tamanho em pares de bases apresentado pelo gene *C4A* (Figura 11). Nestes três casos temos alelos autozigotos, ou seja, alelos de mesma origem.



Figura 12: Análise de Southern blot para a segregação em cinco famílias. Onde P = pai; M= mãe; FA= filha afetada; FN= filha normal; MA=filho afetado; mono=alelo monomodular; bi=alelo bimodular; tri= alelo trimodular e tetra=alelo tetramodular.

Os pacientes 32Ya1 e Rio6Xa1 apresentaram o fragmento do gene *C4A* de 7,0 kb e o gene híbrido *CYP21A1P/CYP21A2* de 3,2 kb em seus dois alelos monomodulares. A paciente 30Xa1, por outro lado apresentou o fragmento *Taq* I de 6,4 kb, considerado como indicativo de um gene híbrido de *C4A/C4B* e o de 3,2 kb indicativo também do gene híbrido *CYP21A1P/CYP21A2*, esta conformação alélica é aparentemente rara, pois ainda não havia sido descrita. A segregação deste alelo foi verificada em três gerações da família (Figura 13).



Figura 13: Heredograma da família 30, evidenciando a segregação do alelo monomodular por três gerações.

1.2 - Alelos Bi e Trimodulares Com Conversão e Genes Híbridos CYP21A1P/CYP21A2

Os indivíduos (n = 33) que apresentaram gene híbrido em alelos sem alteração ou com ganho de material genético, considerados portadores da chamada conversão em larga escala, foram classificados da mesma forma que os anteriores quanto ao módulo RCCX.

No padrão de *Southern blot* com a enzima *Taq* I os genótipos dos indivíduos homozigotos de alelos bimodulares + híbridos divergiram apenas quanto aos tamanhos do gene *C4B*, que foram de 5,4 kb (n = 3) e 6,0 kb (n = 1) (Figura 14 A, B). Além dos já descritos heterozigotos monomodulares/bi e trimodulares + híbrido (n = 4) (Figura 11, C, D, H), os indivíduos heterozigotos foram divididos em: bimodular/bimodular + híbrido que apresentaram três genótipos diferentes com o gene *C4B* de 5,4 kb em homozigose (n = 2), de 6,0 kb em homozigose (n = 5) e 6,0 + 5,4 kb (n = 5) (Figura 14, C, D, E). Além destes, foram identificados genótipos dos tipos trimodular/bimodular + híbrido (n = 5) cujos padrões variaram também de acordo com os fragmentos correspondentes ao gene *C4B* (Figura 14, F, G) e bimodular/trimodular + híbrido (n = 4) com genes *C4B* de 6,0 e duas cópias de 5,4 kb (Figura 14, H).



Figura 14: Genótipos de indivíduos com alelos bi-e trimodulares com gene híbrido *CYP21A1P/CYP21A2*. Imagens obtidas após hibridização com sondas específicas para os genes *C4* e *CYP21* e autorradiografia.

Três pacientes (168Xa1, Ube3Xa1 e Ube7Xa1) apresentaram alelos bimodulares com genes híbridos, cujos genótipos sob a perspectiva de *Southern blot* não evidenciava a conversão em larga escala (Figura 15). Os genes híbridos nestes casos só ficaram esclarecidos mediante as análises de PCR alelo-específica e de seqüenciamento que serão apresentadas nos próximos tópicos. Os genótipos A e B (Figura 15) sugeriam dois alelos bimodulares e o C, heterozigose bi e trimodulares.



Figura 15: Genótipos de indivíduos com alelos bi- e trimodulares com gene híbrido *CYP21A1P/CYP21A2*. Imagens obtidas após hibridização com sondas específicas para os genes *C4* e *CYP21* e autorradiografia.

Assim como no caso dos indivíduos portadores de alelos monomodulares, para a identificação dos alelos que compunham cada genótipo apresentado nas Figuras 14 e 15 foi fundamental a análise de segregação nas famílias. Através desta análise foi possível a distinção entre genótipos trimodulares/bimodulares+híbrido (Figura 16, famílias 13 e 198) dos bimodulares/trimodulares+híbrido (Figura 16, famílias 189 e 28).

No entanto, houve casos como o da família 86 no qual o genótipo não era evidente pela análise de *Southern blot*; a identidade dos alelos neste caso foi possível somente após as análises de PCR alelo-específica e de seqüenciamento, o que também ocorreu nos casos das famílias 168, Ube3 e Ube7. Nas famílias Ube3 e Ube7 a segregação observada no *Southern blot* sugeria um alelo bimodular com híbrido, mas com uma configuração diferente (Figura 17).

Resultados



Figura 16: Genótipos de cinco famílias com alelos bi- e trimodulares com gene híbrido *CYP21A1P/CYP21A2*. Imagens obtidas após hibridização com sondas específicas para os genes C4 e CYP21 e autorradiografia. Onde P = pai; M= mãe; FA= filha afetada; FN= filha normal; MA=filho afetado; MN=filho normal; mono= alelo monomodular; bi= alelo bimodular; tri= alelo trimodular e tetra= alelo tetramodular.

Já na família 168 o *Southern blot* não demonstrou nenhuma evidência de gene híbrido em seus genótipos. Ao invés da configuração *C4A-CYP21A1P-C4B-CYP21A2* normalmente observada, estes pacientes poderiam apresentar a *C4A-CYP21A2-C4B-CYP21A1P/CYP21A2*, para cuja formação serão apresentadas evidências adicionais mais adiante.


Figura 17: Genótipos de famílias com gene híbrido CYP21A1P/CYP21A2. Imagens obtidas após hibridização com sondas específicas para os genes C4 e CYP21 e autorradiografia. Onde P = pai; M= mãe; FA= filha afetada; FN= filha normal; MA=filho afetado; MN=filho normal; mono= alelo monomodular; bi= alelo bimodular; tri= alelo trimodular e tetra= alelo tetramodular.

1.3 - Haplótipos com Genes Híbridos CYP21A1P/CYP21A2

Com base nesta primeira análise por RFLP do sítio Taq I e intensidade de fragmentos foi possível então identificar seis haplótipos que divergiram principalmente com base nas variações polimórficas do gene C4A e do gene C4B e no número de blocos gênicos RCCX que compõem os alelos (Tabela 10).

Devido à consangüinidade nas famílias 30, 32, Rio6, Ubl6 e Ubl7 e como os casos índices 19, 60 e 61 pertencem ao mesmo núcleo familiar, o total de alelos portadores de genes híbridos é de 57.

Hanlótino	Alelo		Frag	gmento	s <i>Taq</i> I (kb)	- Número de Alelos
impiotipo	Afetado	C4A	CYP21A1P	C4B	CYP21A1P/CYP21A2	
А	Monomodular	7,0	-	-	3,2	25
В	Monomodular	6,4	-	-	3,2	1
С	Bimodular	7,0	3,2	6,0	3,2	14
D	Bimodular	7,0	3,2	5,4	3,2	9
Е	Bimodular	7,0	3,7	6,0	3,2	3
F	Trimodular	7,0	2x3,2	2x5,4	3,2	5

Tabela 10 – Classificação dos alelos segundo o número de cópias presente do *Loco* C4/CYP21 e tamanho dos fragmentos no RFLP com a enzima *Taq* I.

(-) significa ausência dos fragmentos correspondentes tanto ao pseudogene *CYP21A1P* quanto ao gene *C4B*.

2- Análise por MLPA

Os indivíduos portadores de alelos mono (n = 26), bi (n = 26) e trimodulares (n = 5) com genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2* foram avaliados com a técnica de MLPA quanto à sua formação e também quanto ao número de cópias gênicas no loco RCCX. Os experimentos com MLPA foram detalhados em Material e Métodos. Além de permitir o estudo de deleções e duplicações, como o *Southern blot*, com esta técnica é possível delinear a região de recombinação entre o pseudogene *CYP21A1P* e o gene *CYP21A2*, devido a localização das sondas que compõem o kit P050B. Estas sondas, ao contrário do estudo com a enzima *Taq* I, não envolvem somente o terminal 5'UTR, mas também regiões exônicas e intrônicas baseadas nas diferenças de nucleotídeos entre gene e pseudogene. As sondas para *CYP21A1P* estão localizadas nas regiões: 5' UTR do éxon 1, íntron 2 e 3'UTR do éxon 10; as do *CYP21A2*, estão em: 5'UTR do éxon 1, éxon 3 (na região onde no *CYP21A1P* há a deleção de 8 nucleotídeos, g.707_714delGAGACTAC),éxon4 (na região

onde no *CYP21A1P* há a mutação p.I172N), éxon 6 (na região onde no *CYP21A1P* há as mutações p. L236N, p.V237Q, p.M239K, conhecidas como Cl6) e éxon 8 (na região onde no *CYP21A1P* há a mutação p.Q318X). Como a região de recombinação entre o pseudogene *CYP21A1P* e o gene *CYP21A2* varia ao longo dos éxons que os compõem, esta técnica consegue identificar a variabilidade desta região nos genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2* formados após a recombinação.

Os fragmentos únicos gerados após a hibridização com a mistura de sondas experimentais e controles são ligados e amplificados por PCR de forma a gerarem fragmentos com tamanhos distintos. O produto desta reação é então submetido à eletroforese capilar para separação, o que gera um gráfico como mostra a Figura 18 no *software GeneScan* v.3.7.



Figura 18: Eletroforese Capilar dos fragmentos obtidos por MLPA. No eletroferograma, cada pico surge na posição correspondente ao tamanho em pares bases do fragmento amplificado relativo a uma sonda, em num total de 33 sondas presentes no kit P050 B. A área sob cada pico é proporcional ao número de cópias presentes no genoma daquela determinada sonda. As setas indicam: 1-sonda do éxon 3 do gene *CYP21A2*, que se anela na seqüência onde no pseudogene há a mutação g.707_714delGAGACTAC; 2 - sonda da região 5'UTR do gene *CYP21A2*; 3 - sonda do éxon 4 do gene *CYP21A2*, que se anela na seqüência onde no pseudogene há a mutação p.1172N; 4 - sonda do éxon 6 do gene *CYP21A2*, que se anela na seqüência onde no pseudogene há as mutações p.1236N/ p.V237E/ p.M239K conhecidas como *cluster 6*; 5 - sonda

UTY do cromossomo Y; **6** - sonda do éxon 8 do gene *CYP21A2*, que se anela na seqüência onde no pseudogene há a mutação p.Q318X. A- Paciente 108Xa1, heterozigota monomodular + híbrido / trimodular, onde se observa a diminuição relativa dos picos 1- 4 relativos ao gene *CYP21A2* ; a ausência da sonda 5 confirma o cariótipo 46,XX. B- Paciente 115Ya1, heterozigoto modular + híbrido / modular, onde se observa a diminuição relativa dos picos 1- 2 relativos ao gene *CYP21A2*; a presença da sonda 5 confirma o cariótipo 46,XY. C - Paciente Ubl7Xa1, onde se observa a ausência dos picos 1- 4 relativos ao gene *CYP21A2*; a ausência da sonda 5 confirma o cariótipo 46,XY.

Os pacientes 108Xa1 e 115Ya1 apresentam redução dos picos correspondentes às sondas de 1 a 4 e 1 a 3, respectivamente, indicando ausência em heterozigose das seqüências compreendidas entre o terminal 5' e os éxons 6 e 3, respectivamente. Já a ausência dos picos de 1 a 4 na paciente Ubl7Xa1 sugere a completa ausência das seqüências correspondentes ao terminal 5' até o éxon 6, do gene ativo *CYP21A2* (Figura 18). A sonda 6 nos três indivíduos apresenta-se aumentada, indicando uma cópia extra da seqüência normal correspondente à mutação p.Q318X.

Os dados brutos analisados no *software GeneScan* v.3.7 foram normalizados por comparação a cinco indivíduos normais, analisados previamente por *Southern blot*, e a 18 sondas controles internas. Esta normalização foi realizada tanto com a planilha denominada Coffalyser v. 8.0, disponibilizada na internet pelo fabricante, como com uma planilha construída no *software Microsoft Excel*. Desta forma, com base nos resultados apresentados, foi possível dividir os pacientes nos seguintes grupos:

- grupo 1: indivíduos que apresentaram em seu genótipo pelo menos um alelo monomodular
 - 1. e gene híbrido com éxon 6 mutante
 - 2. e gene híbrido com éxon 6 normal
- grupo 2: indivíduos que apresentaram em seu genótipo pelo menos um alelo bi ou trimodular
 - 1. e gene híbrido com éxon 6 mutante
 - 2. e gene híbrido com éxon 6 normal

2.1 - Resultados de MLPA para o grupo 1.1

Os dados brutos obtidos da técnica de MLPA normalizados em planilhas *Excel* geraram gráficos onde podem ser observadas as regiões de recombinação dos genes híbridos. Os gráficos apresentados na Figura 19 relacionam os resultados da análise para 15 sondas (numeradas de 1 a 15) e os valores das áreas relativas integradas dos picos. As alturas das barras correspondem proporcionalmente ao número de cópias das seqüências das sondas encontradas no genoma. Alturas entre 0,8 e 1,2 correspondem a duas cópias, alturas superiores a 1,2 e alturas inferiores a 0,8 indicam aumento e redução ou ausência de cópias, respectivamente.

Na parte A da Figura 19 temos a análise dos dois indivíduos homozigotos para alelos monomodulares (Figura 11 A e B). O paciente 32Ya1 apresenta alturas das barras para os genes C4 iguais e com o valor de 1,2 que sugere a presença duas cópias de cada gene C4 (C4A e C4B). Este indivíduo quando avaliado por Southern blot apresentou apenas o fragmento correspondente ao gene C4A (7,0 kb). As sondas de MLPA para estes genes estão nas regiões exônicas (éxons 17 e 19, respectivamente para C4A e C4B) e a avaliação por Southern blot é referente à região 5'UTR, então o gene C4 deste indivíduo também pode ser um híbrido (C4A/C4B) indicado pela altura das barras. Já a paciente 30Xa1 apresenta ausência da barra referente ao gene C4B. A avaliação por Southern blot havia indicado anteriormente para o gene C4 apenas o fragmento de 6,4 kb, raro em casos de deficiência de 21-hidroxilase. A ausência das barras de 6 a 9 em ambos os casos sugerem que os genes híbridos CYP21A1P/CYP21A2 não apresentam as seqüências normais do gene CYP21A2 para a região 5` e éxons 3, 4 e 6 e, sim as seqüências mutantes do CYP21A1P. O valor equivalente a duas cópias da seqüência normal para a sonda número 10, referente à região da mutação p.Q318X no éxon 8, e, a ausência da sonda número 5 referente à seqüência do terminal 3` do pseudogene sugerem que as formações híbridas nestes pacientes apresentem a região de recombinação entre os éxons 6 e 8.

A parte B da Figura 19 mostra os padrões de MLPA para os pacientes que são heterozigotos de alelos monomodulares e bimodulares, ambos portadores de genes híbridos.



Figura 19: Dados normalizados obtidos por analise com MLPA dos genes: C4A e C4B (verde); CYP21A1P (laranja), CYP21A2 (azul), TNXB e CREBL1 (violeta). Os números 1-15 abaixo de cada gráfico representam as sondas de MLPA: (1) éxon 17 do C4A; (2) éxon 19 do C4B; 5'UTR, íntron 2 e 3'UTR do pseudogene CYP21A1P (3-5, respectivamente); 5'UTR, éxon 3, éxon 4, éxon 6 e éxon 8 do gene CYP21A2 (6-10, respectivamente); 11-13 são sondas para os éxons 32, 15 e 1 do gene TNXB respectivamente e, 14 é a sonda para o gene CREBL1. A presença ou ausência da sonda 15 identifica 46,XY ou 46,XX, uma vez que esta sonda reconhece a região do cromossomo Y (UTY). As alturas das barras correspondem à normalização dos dados obtidos por eletroforese capilar onde os valores entre 0,8 – 1,2 indicam duas cópias do fragmento, valores superiores indicam aumento no número de cópias e inferiores redução do número de cópias.

As setas vermelhas indicam presença da mutação I172N na paciente 56Xa2 e Cl6 na paciente Ube6Xa1 em heterozigose composta com a deleção de 30 kb.

Na parte C da Figura 19 estão dispostos três pacientes (136Ya1, 139Ya1 e 56Xa1) heterozigotos de alelos monomodulares e bimodulares. Nos três casos os resultados indicam que a região de recombinação do gene híbrido CYP21A1P/CYP21A2 deva também estar localizada entre os éxons 6 e 8. As alturas das barras 6 a 9 estão abaixo de 0,8 indicando a presença de uma única cópia destas seqüências no genoma dos pacientes. A sonda 8 na paciente 56Xa1 está ausente porque é heterozigota composta de deleção de 30 kb e a mutação p.1172N, onde a sonda se anela. Os genes híbridos CYP21A1P/CYP21A2, portanto, apresentam as seqüências do gene CYP21A1P para a região 5` e éxons 3, 4 e 6. Aqui, novamente, os valores entre 0,8 e 1,2 para a sonda número 10 equivalem a duas cópias da seqüência normal referente à região da mutação p.Q318X no éxon 8, e, a ausência da sonda número 5 referente à sequência do terminal 3` do pseudogene sugerem que nestes pacientes a região de recombinação na formação do híbrido seja semelhante aos anteriores. Desta forma o híbrido CYP21A1P/CYP21A2 nos dois casos é formado por seqüências do CYP21A1P até o éxon 6 (inclusive) e a partir do éxon 8 por seqüência do CYP21A2. Da mesma forma, deve-se ressaltar a semelhança destes pacientes com o 32Ya1 no que diz respeito às sondas de C4A e C4B. Mais uma vez observa-se a presença de duas cópias de cada uma, sendo que se esperaria uma delecão de C4B mostrada no Southern blot.

Para finalizar o grupo dos monomodulares com genes híbridos portadores doéxon6 mutante, a parte D da figura 19 mostra quatro pacientes cujas análises de MLPA sugerem a presença de um *CYP21A1P* completo como cópia remanescente no alelo deletado. Observam-se nestes casos as alturas das sondas 6 – 10 abaixo de 0,8, indicando a presença de apenas uma cópia de cada no genoma. Para os pacientes Nor2Ya1, Ube6Xa1 e 163Xa1 as alturas relativas a duas cópias para a sonda 5, sugerem que a recombinação na formação destes alelos deva ter ocorrido além do éxon 10 de *CYP21A2*, dentro do gene *TNXB*. No paciente Ub11Ya1, a sonda 5 apresenta também altura relativa a uma cópia, o que indica que, neste caso, o ponto de recombinação possa estar localizado entre o éxon 8 e o terminal 3`.

Para esclarecer as formações híbridas nos casos da Figura 19 B foi feita a análise de MLPA dos pais. Pelo estudo de segregação na família por Southern blot havia sido verificado que para as pacientes 12Xa1 e Ubl8Xa1 o alelo monomodular é de origem paterna e para o paciente 165Ya1 é de origem materna (Figura 12). Como os padrões de MLPA para gene e pseudogene CYP21 dos pacientes 12Xa1 e 165Ya1 se mostraram idênticos, investigou-se os pais para definição das regiões correspondentes ao CYP21A1P e CYP21A2 em cada um dos híbridos. Como mostra a Figura 20, a análise do pai, doador do alelo monomodular da paciente 12Xa1, sugere a presença de um CYP21A1P inteiro com seqüências que se estendem até o terminal 3', indicada pela altura das barras 6-10 abaixo de 0,8 e, a da barra 5 correspondente a duas cópias da região 3' do pseudogene. Assim, o alelo bimodular desta paciente carrega um híbrido coméxon6 normal, uma vez que no MLPA se observa a ausência das barras 6 e 7, e alturas reduzidas das barras 7-10. Já o alelo monomodular do paciente 165Ya1 apresenta seqüências CYP21A1P até o éxon 3 demonstradas pelas alturas abaixo de 0,8 das barras 6 e 7 na análise da mãe. Portanto, o alelo bimodular, neste caso de origem paterna, carrega uma cópia completa do CYP21A1P. A paciente Ubl8Xa1, por outro lado, apresenta o resultado de MLPA que concorda com a condição de portadora de um alelo monomodular de origem paterna e um trimodular de origem materna, ambos com gene híbrido CYP21A1P / CYP21A2. Neste caso não foi realizado o estudo dos pais por MLPA, porém pelas análises de PCR alelo-específicas que serão apresentadas mais adiante, foi possível identificar que o alelo monomodular herdado do pai apresenta o híbrido coméxon6 mutante. Logo, pelas alturas das barras na análise de MLPA, o alelo trimodular de origem materna carrega um híbrido que tem seqüências de *CYP21A1P* apenas na região 5' e provavelmente até o éxon1.



Figura 20: Dados normalizados obtidos por analise com MLPA dos genes: C4A e C4B (verde); CYP21A1P (laranja), CYP21A2 (azul), TNXB e CREBL1 (violeta). Os números 1-15 abaixo de cada gráfico representam as sondas de MLPA que correspondem: (1) C4A éxon 17; (2) C4B éxon 19; 5'UTR, íntron 2 e 3'UTR do pseudogene CYP21A1P (3-5, respectivamente); 5'UTR, éxon 3, éxon 4, éxon 6 e éxon 8 do gene CYP21A2 (6-10, respectivamente); 11-13 são sondas para os éxons 32, 15 e 1 do gene TNXB respectivamente e 14 é a sonda para o gene CREBL1 . A presença ou ausência do sinal da sonda 15 identifica pacientes 46,XY ou 46,XX, uma vez que esta sonda reconhece a região do cromossomo Y (UTY). As alturas das barras correspondem à normalização dos dados obtidos por eletroforese capilar onde os valores entre 0.8 - 1.2 indicam duas cópias do fragmento. As setas vermelhas indicam: na 12P, deleção de todas as seqüências de CYP21A2 mostrando que o alelo monomodular, neste caso é portador do pseudogene inteiro, inclusive da região 3'UTR indicada pela seta alaranjada (sonda 5 correspondendo à 2 cópias, tanto no 12P como 12Xa1); na 165M, mostram que o alelo monomodular herdado da mãe é portador deleção das seqüências dos éxons 1 e 3 de CYP21A2; as setas verdes indicam a presença de dos éxons 4, 6 e 8 de CYP21A2. Por outro lado, a paciente 12Xa1 é portadora de um alelo monomodular com estrutura de CPY21 semelhante à do 165Ya1 e o último de um bimodular com um pseudogene inteiro à semelhança do 12Xa1.

2.2 - Resultados de MLPA para o grupo 1.2

Na Figura 21 são mostradas as análises para o grupo de pacientes heterozigotos compostos de alelos monomodulares e bi, tri ou tetramodulares, cujas cópias gênicas híbridas nos alelos monomodulares apresentam o éxon 6 normal. Do total de 12 pacientes

incluídos neste grupo, 9 apresentam a região de recombinação para o híbrido *CYP21A1P/CYP21A2* localizada entre os 3 e 4 (Figura 21, A, B e C). Na parte A foram reunidos os pacientes que apresentaram heterozigose composta de alelos monomodulares e tri ou tetramodulares. Esta heterozigose produziu nos três pacientes deste grupo alturas acima de 1,2 para as sondas 2 do gene *C4B*, 3 e 4, ambas do *CYP21A1P*. Na paciente 196Xa1 o aumento das alturas das barras referentes à sonda 2 do gene *C4B* e à sonda 3 do *CYP21A1P* é devido à presença de um alelo provavelmente tetramodular sem gene híbrido que é de origem paterna como se vê no *Southern blot* (Figura 12). Por outro lado, para o paciente 70Ya1 era esperada uma diminuição da barra 10 uma vez que o alelo trimodular sem híbrido herdado do pai é portador da mutação p.Q318X no gene *CYP21A2*. Ao invés disso foi observado o aumento, que pode ser decorrente de uma seqüência p.Q318X normal presente em uma das duas cópias *CYP21A1P* presentes neste alelo. Esta suposição foi confirmada pela análise de MLPA da família e pelos experimentos de PCR alelo-específica cujos resultados serão descritos mais adiante.

Nas partes B e C da Figura 21 são mostrados os resultados de MLPA para os pacientes que foram heterozigotos compostos de alelos monomodulares com genes híbridos e bimodulares com outras mutações no gene *CYP21A2*. Da mesma forma que a paciente 56Xa1 (Figura 19 C), a barra 8 está diminuída no paciente 25Ya1 porque é heterozigoto composto de deleção de 30 kb e a mutação p.I172N, onde a sonda se anela. No grupo da figura 19C, as proporções 2:2 das barras correspondentes às sondas 1 e 2 não se deve à presença de um gene híbrido C4 no alelo monomodular como no caso 32Ya2 mas este híbrido está presente nos alelos bimodulares que compõem estes genótipos, dados confirmados pela análise de MLPA das famílias.

Na parte D da figura 14 os três indivíduos (23Xa1, 99Xa1 e 123Ya1) apresentaram a região de recombinação do gene híbrido *CYP21A1P/CYP21A2* entre o éxon1 e o éxon 3. O paciente 123Ya1 apresentou também a redução da barra correspondente à sonda 10 devido à presença da alteração p.Q318X em heterozigose composta com a deleção de 30 kb. A paciente 99Xa1 apresentou redução da barra referente à sonda 8 devida à presença da mutação p.I172N no genótipo. A paciente 23Xa1, por sua vez apresentou ausência completa da barra correspondente ao gene *C4B*; como no *Southern blot* foi observado o fragmento de 6,0 kb indicativo deste gene no alelo bimodular materno, supõe-se que esta cópia seja híbrida *C4B/C4A* com o éxon 19 (sonda 2) correspondente ao *C4A*.





Figura 21: Dados normalizados obtidos por analise com MLPA dos genes: C4A e C4B (verde); CYP21A1P (laranja), CYP21A2 (azul), TNXB e CREBL1 (violeta). Os números 1-15 abaixo de cada gráfico representam as sondas de MLPA que correspondem: (1) C4A éxon 17; (2) C4B éxon 19; 5'UTR, íntron 2 e 3'UTR do pseudogene CYP21A1P (3-5, respectivamente); 5'UTR, éxon 3, éxon 4, éxon 6 e éxon 8 do gene CYP21A2 (6-10, respectivamente); 11-13 são sondas para os éxons 32, 15 e 1 do gene TNXB respectivamente e 14 é a sonda para o gene CREBL1. A presença ou ausência do sinal da sonda 15 identifica pacientes 46,XY ou 46,XX, uma vez que esta sonda reconhece a região do cromossomo Y (UTY). As alturas das barras correspondem à normalização dos dados obtidos por eletroforese capilar onde os valores entre 0.8 - 1.2 indicam duas copias do fragmento, valores superiores indicam aumento no número de cópias e inferiores redução do número de cópias. As setas vermelhas indicam presença das mutações correspondentes às respectivas sondas em heterozigose composta com a deleção de 30 kb. A seta verde no paciente 70Ya1 indica a presença da seqüência, embora seja heterozigoto composto da mutação Q318X e deleção de 30 kb.

2.3 - Resultados de MLPA para o grupo 2.1

Este grupo é formado por pacientes homo ou heterozigotos compostos de alelos bi ou trimodulares que carregam genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2* com éxon 6 mutante. Na parte A da Figura 22 são observados os resultados de MLPA das pacientes Ubl6Xa1 e Ubl7Xa1 que são homozigotas de conversão, isto é, alelos bimodulares com genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2*, cujos resultados de *Southern blot* são ilustrados na Figura 14 A. O padrão de MLPA para estas pacientes indica que a região de recombinação deva ser entre os éxon 6 e 8. Outros 4 pacientes apresentaram heterozigose de genes híbridos com estas características (Figura 22 B). Devemos apenas ressaltar algumas diferenças entre eles. Por exemplo, as pacientes 28Xa1 e 108Xa1 mostram características de combinação de alelos bi e trimodulares, como também se observa no *Southern blot* (Figura 14 G, H, respectivamente). Este fato também pode ser verificado observando os aumentos das barras referentes ao gene *C4B* e ao pseudogene *CYP21A1P*. A diferença entre elas é que na primeira o híbrido está no alelo trimodular e na segunda, no bimodular, como demonstrado pelo estudo das famílias (Figura 14). O paciente 59Ya3, além da conversão, é também portador da mutação p.Q318X no gene *CYP21A2* não híbrido.



Figura 22: Dados normalizados obtidos por analise com MLPA dos genes: C4A e C4B (verde); CYP21A1P (laranja), CYP21A2 (azul), TNXB e CREBL1 (violeta). Os números 1-15 abaixo de cada gráfico representam as sondas de MLPA que correspondem: (1) C4A éxon 17; (2) C4B éxon 19; 5'UTR, íntron 2 e 3'UTR do pseudogene CYP21A1P (3-5, respectivamente); 5'UTR, éxon 3, éxon 4, éxon 6 e éxon 8 do gene CYP21A2 (6-10, respectivamente); 11-13 são sondas para os éxons 32, 15 e 1 do gene TNXB respectivamente e 14 é a sonda para o gene CREBL1 . A presença ou ausência do sinal da sonda 15 identifica pacientes 46,XY ou 46,XX, uma vez que esta sonda reconhece a região do cromossomo Y (UTY). As alturas das barras correspondem à normalização dos dados obtidos por eletroforese capilar onde os valores entre 0,8 – 1,2 indicam duas cópias do fragmento, valores superiores indicam aumento no número de cópias e inferiores redução do número de cópias. A seta vermelha indica presença da mutação correspondente à respectiva sonda em heterozigose composta com a deleção de 30 kb.

2.4 - Resultados de MLPA para o grupo 2.2

Este grupo é formado por pacientes homo ou heterozigotos compostos de alelos bi ou trimodulares que carregam genes híbridos CYP21A1P/CYP21A2 com éxon 6 normal. A Figura 23 Α mostra aqueles pacientes que são heterozigotos de alelos bimodulares/bimodulares com híbrido com padrão de Southern blot correspondente ao A e B da Figura 15. Observa-se que no ensaio de MLPA que os pacientes apresentaram um perfil semelhante com a região de recombinação para formação híbrida de CYP21 localizada entre os éxons 3 e 4. O paciente 180Ya1 é também portador da mutação p.1172N e, as outras duas são portadoras da mutação p.Q318X nos genes não-híbridos. Outros quatro pacientes apresentaram formações híbridas semelhantes, com a diferença que o paciente 86Ya1 apresenta um alelo trimodular sem gene híbrido e, os 91Xa1, 115Ya1 e 189Ya1 carregam a cópia híbrida CYP21A1P/CYP21A2 em um alelo trimodular (Figura 23 B). Distinção esta que pode ser feita com base na segregação familiar (Figura 16). Assim, nos 4 casos se observa um aumento significativo das barras correspondentes aos genes C4B e CYP21A1P.







A terceira formação híbrida observada neste grupo, e a que agregou um número maior de pacientes (n=9), foi aquela com ponto de recombinação entre a região 5' e o éxon 3 (Figura 24 A, B). Incluído aqui está uma paciente homozigota (20Xa1) deste alelo para o qual a consangüinidade dos pais é negada. Entre estes pacientes, dois apresentaram heterozigose composta com alelos trimodulares (Figura 16, pacientes 13Xa1 e 198Xa1), porém a cópia híbrida nos dois casos está associada a uma conformação bimodular.



^{Figura 24: Dados normalizados obtidos por analise com MLPA dos genes: C4A e C4B (verde); CYP21A1P (laranja), CYP21A2 (azul), TNXB e CREBL1 (violeta). Os números 1-15 abaixo de cada gráfico representam as sondas de MLPA que correspondem: (1) C4A éxon 17; (2) C4B éxon 19; 5'UTR, íntron 2 e 3'UTR do pseudogene CYP21A1P (3-5, respectivamente); 5'UTR, éxon 3, éxon 4, éxon 6 e éxon 8 do gene CYP21A2 (6-10, respectivamente); 11-13 são sondas para os éxon 32, 15 e 1 do gene TNXB respectivamente e 14 é a sonda para o gene CREBL1 . A presença ou ausência do sinal da sonda 15 identifica pacientes 46,XY ou 46,XX, uma vez que esta sonda reconhece a região do cromossomo Y (UTY). As alturas das barras correspondem à normalização dos dados obtidos por eletroforese capilar onde os valores entre 0.8 – 1.2 indicam duas copias do fragmento, valores superiores indicam aumento no número de cópias e inferiores redução do número de cópias. As setas vermelhas indicam presença das mutações correspondentes às respectivas sondas em heterozigose composta com a deleção de 30 kb.}

Finalmente há um grupo de três pacientes para os quais as evidências de genes híbridos não são muito diretas, como já foi citado no estudo de *Southern blot* (Figura 17). A paciente Ube7Xa1 tem um alelo trimodular, por isso apresenta nos resultados de MLPA proporções de 3 cópias para as barras correspondentes aos *C4B* e *CYP21A1P* (Figura 25). Por outro lado, as pacientes Ube3Xa1 e 168Xa1 apresentam as alturas das barras da sonda 5 equivalentes à uma cópia do terminal 3' de *CYP21A1P* o que indicaria a presença de um

único pseudogene nos seus genomas. Esta seria mais uma indicativa da conformação bimodular com um gene *CYP21A2* e um híbrido *CYP21A1P/CYP21A2* nestas pacientes, sem a presença do pseudogene.



Figura 25: Dados normalizados obtidos por analise com MLPA dos genes: C4A e C4B (verde); CYP21A1P (laranja), CYP21A2 (azul), TNXB e CREBL1 (violeta). Os números 1-15 abaixo de cada gráfico representam as sondas de MLPA que correspondem: (1) C4A éxon 17; (2) C4B éxon 19; 5'UTR, íntron 2 e 3'UTR do pseudogene CYP21A1P (3-5, respectivamente); 5'UTR, éxon 3, éxon 4, éxon 6 e éxon 8 do gene CYP21A2 (6-10, respectivamente); 11-13 são sondas para os éxons 32, 15 e 1 do gene TNXB respectivamente e 14 é a sonda para o gene CREBL1. A presença ou ausência do sinal da sonda 15 identifica pacientes 46,XY ou 46,XX, uma vez que esta sonda reconhece a região do cromossomo Y (UTY). As alturas das barras correspondem à normalização dos dados obtidos por eletroforese capilar onde os valores entre 0,8 – 1,2 indicam duas cópias do fragmento, valores superiores indicam aumento no número de cópias e inferiores redução do número de cópias.

3- Comparação dos resultados de Southern blot e MLPA

Para efeito de comparação dos métodos de *Southern blot* e MLPA, a tabela 11 apresenta as estimativas das intensidades relativas de bandas e picos que são proporcionais aos números de cópias dos respectivos genes. Observando-se o bloco dos homozigotos, a única divergência observada foi para os genes *C4A* e *B*, tanto no *Southern blot* quanto no MLPA. Para os heterozigotos de alelos monomodulares e bi ou trimodulares com híbridos *CYP21A1P/CYP21A2*, houve divergência também nos genes C4. Para o paciente 165Ya1, a

análise da mãe, doadora do alelo monomodular, sugere que a cópia C4 neste alelo seja inteira *C4A*. Por outro lado, a paciente 12Xa1 pode ser portadora de uma cópia híbrida *C4A/C4B* com seqüências de *C4A* até o éxon 17 no alelo monomodular herdado do pai, cujo perfil de MLPA confirma esta suposição, e outro híbrido onde o éxon 17 apresenta seqüências de *C4B*, provavelmente no alelo bimodular com *CYP21A1P/CYP21A2* herdado da mãe. A divergência observada para os genes C4 na paciente Ubl8Xa1 só poderá ser esclarecida pelo estudo de MLPA de seus pais.

	fragm	ento Taq I (kb)			MLPA			
Paciente	C4A / C4B ¹	CYP21A1P/CYP21A21	C4A/C4B ²	100000000000000000000000000000000000000	CYP21	A1P/CYP2	1A2 ²	
	7/6,4/6,0/5,4/3,9	3,2/3,7	Ex17/Ex19	5'Ex1/5'Ex1	Int2/Ex3	Int2/Ex4	Int2/Ex6	Ex10/Ex8
32Ya1	2:0:0:0:0	2:0	2:2	2:0	2:0	2:0	2:0	0:2
30Xa1	0:2:0:0:0	2:0	2:0	2:0	2:0	2:0	2:0	0:2
Rio6Xa1	2:0:0:0:0	2:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
165Ya1	2:0:1:0:0	3:0	2:2	2:0	3:0	3:1	3:1	2:1
12Xa1	2:0:1:0:0	3:0	1:2	2:0	3:0	3:1	3:1	2:1
Ubl8Xa1	2:0:0:2:0	4:0	3:1	3:0	3:1	3:1	3:1	2:2
Rio3Xa1	2:0:0:1:0	3:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
136Ya1	2:0:1:0:0	2:1	2:3	2:1	2:1	2:1	2:1	1:2
139Ya1	2:0:1:0:0	2:1	2:3	2:1	2:1	2:1	2:1	1:2
56Xa2	2:0:1:0:0	2:1	2:3	2:1	2:1	2:0	2:1	1:2
Nor2Ya1	2:0:1:0:0	2:1	1:1	2:1	2:1	2:1	2:1	2:1
Ube6Xa1	2:0:1:0:0	2:1	2:2	2:1	2:1	2:1	2:1	2:1
163Xa1	2:0:0:1:0	2:1	2:2	1:1	2:1	2:1	2:1	2:1
Ubl1Xa1	2:0:1:0:0	2:1	2:1	2:1	2:1	2:1	2:1	1:1
70Ya1	2:0:0:2:0	3:1	2:3	3:1	3:1	3:2	3:2	2:3
196Xa1	2:0:3:0:0	4:1	2:3	4:1	3:1	3:2	3:2	2:2
102Xa1	2:0:0:2:0	3:1	2:3	3:1	3:1	3:2	3:2	2:3
114Xa1	2:0:1:0:0	2:1	2:2	2:1	2:1	2:2	2:2	1:2
141Ya1	2:0:0:0:1	2:1	2:1	1:1	2:1	2:2	2:2	1:2
25Ya1	2:0:1:0:0	2:1	2:1	1:1	2:1	2:1	2:2	1:2
159Xa1	2:0:1:0:0	2:1	2:2	2:1	2:1	2:2	2:2	1:2
203Xa1	2:0:1:0:0	2:1	2:2	2:1	2:1	2:2	2:2	1:2
209Xa1	2:0:1:0:0	2:1	2:2	2:1	2:1	2:2	2:2	1:2
123Ya1	2:0:1:0:0	2:1	2:1	1:1	1:2	1:2	1:2	1:1
99Xa1	2:0:0:1:0	2:1	2:2	2:1	1:2	1:1	1:2	1:2
23Xa1	2:0:1:0:0	2:1	3:0	2:1	1:2	1:2	1:2	1:2

Tabela 11: Comparação dos resultados de Southern blot e MLPA dos alelos monomodulares.

¹Intensidades relativas das bandas no Southern blot; ²Razão entre os números de cópias C4A e C4B, e CYP21A1P e CYP21A2 baseados nas alturas de barras para cada sonda nos experimentos de MLPA.

A mesma observação de divergência nos dois métodos quanto aos genes C4 pode ser feita para o restante dos pacientes da Tabela 11. A presença ou ausência de gene C4 híbrido no alelo monomodular nestes casos só poderá ficar esclarecida com o estudo de MLPA dos pais. Por exemplo, para os pacientes 70Ya1, 196Xa1, 114Xa1, 159Xa1, 203Xa1 ficou claro que a cópia C4 do alelo monomodular é um *C4A* não híbrido pela análise de pelo menos um dos pais.

Quando se compara as estimativas de números de cópias gênicas com base nas intensidades relativas em cada experimento para os casos com conversão e genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2*, observa-se novamente alguma discrepância para os genes *C4* (Tabela 12). O grupo que apresenta alelos trimodulares (bloco ressaltado em cinza na Tabela 12) no genoma demonstrou uma variação grande das alturas das barras das sondas experimentais nos ensaios de MLPA, dificultando a interpretação do número de cópias, embora as sondas controles estivessem correspondendo sempre a duas cópias, dentro do intervalo 0,8 - 1,2. Provavelmente, nestes casos as análises deveriam ser refeitas estabelecendo uma nova faixa de valores para as alturas das barras correspondendo a números de cópias maiores que 3. No entanto, as composições híbridas *CYP21A1P/CYP21A2* ficam claras em todos os casos.

	fragm	ento Taq I (kb)			MLPA			
Paciente	C4A / C4B1	CYP21A1P/CYP21A21	C4A/C4B ²		CYP21	A1P/CYP2	1A2 ²	
	7/6.4/6.0/5.4/3.9	3.2/3.7	Ex17/Ex19	5'Ex1/5'Ex1	Int2/Ex3	Int2/Ex4	Int2/Ex6	Ex10/Ex8
Ubl6Xa1	2:0:0:2:0	4:0	3:3	4:0	4:0	4:0	4:0	2:4
Ubl7Xa1	2:0:0:2:0	4:0	4:2	?6:0	4:0	4:0	4:0	2:4
20Xa2	2:0:2:0:0	4:0	2:3	4:0	2:2	2:2	2:2	2:2
50Ya1	2:0:2:0:0	3:1	2:3	3:1	3:1	3:1	3:1	2:2
59Ya3	2:0:1:1:0	3:1	3:2	2:1	3:2	3:2	3:1	3:0
180Xa1	2:0:2:0:0	3:1	2:1	4:1	3:1	3:1	3:2	3:3
4Xa1	2:0:0:2:0	3:1	2:2	2:1	3:1	3:2	3:2	3:1
16Xa3	2:0:0:2:0	3:1	2:2	2:1	3:1	3:2	3:2	2:1
19Xa1	2:0:2:0:0	3:1	2:3	4:1	2:2	2:2	2:2	2:2
CI-13	2:0:1:1:0	3:1	2:3	4:1	2:2	2:2	2:2	3:1
61Xa2	2:0:2:0:0	3:1	2:3	5:1	2:3	2:1	2:3	1:2
60Ya1	2:0:2:0:0	3:1	2:3	3:1	2:2	2:1	2:2	2:2
36Xa1	2:0:1:1:0	3:1	2:3	3:1	2:2	2:2	2:2	2:1
122Xa2	2:0:2:2:0	4:2	1:3	3:1	3:2	3:1	3:2	2:3
13Xa1	2:0:1:2:0	4:1	1:4	4:1	3:2	3:1	3:2	3:3
198Xa1	2:0:1:2:0	4:1	2:4	4:1	4:2	4:2	4:2	3:3
86Ya1	2:0:0:3:0	4:1	2:5	3:1	3:1	3:2	3:2	5:3
91Xa1	2:0:1:2:0	4:1	2:4	3:1	4:1	4:2	4:2	3:3
115Ya1	2:0:1:2:0	4:1	2:4	4:1	4:1	4:2	4:2	3:3
189Ya1	2:0:1:2:0	4:1	2:4	4:1	4:1	4:2	4:2	3:3
28Xa1	2:0:1:2:0	4:1	2:4	4:1	4:1	4:1	4:1	2:4
108Xa1	2:0:0:3:0	4:1	2:4	4:1	4:1	4:1	4:1	4:4
Ube7Xa1	2:0:0:3:0	3:2	2:4	3:2	3:2	3:3	3:3	2:3
Ube3Xa1	2:0:1:1:0	2:2	2:3	3:2	2:2	2:3	2:3	1:2
168Xa1	2:0:0:2:0	2:2	2:2	3:2	2:2	2:3	2:3	1:2
117Xa1	2:0:1:1:0	3:1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Rio1Ya1	2:0:1:1:0	3:1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
HAT1Xa1	2:0:0:3:0	4:1	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tabela 12: Comparação dos resultados de Southern blot e MLPA dos alelos bimodulares e trimodulares.

¹Intensidades relativas das bandas no Southern blot; ²Razão entre os números de cópias C4A e C4B, e CYP21A1P e CYP21A2 baseados nas alturas de barras para cada sonda nos experimentos de MLPA.

Assim, os dados de MLPA acrescentados à Tabela 13, fazem uma nova divisão mostrada na Tabela 13 abaixo.

Haplótipo	Alelo Afetado		Fra	gmento	s Taq I (kb)	região de recombinação	Número de Alelos
		C4A	CYP21A1P	C4B	CYP21A1P/ CYP21A2	CYP21A1P/ CYP21A2	
A.I	Monomodular	7,0	-	-	3,2	3`UTR	5
A.II						ex 7 – ex 8	5
A.III						ex 3 - ex 4	10
A.IV						ex 1 - ex 3	3
						nd	2
В	Monomodular	6,4	-	-	3,2	ex 7 – ex 8	1
C.I	Bimodular	7,0	3,2	6,0	3,2	3`UTR	2
C.II						ex 7 – ex 8	1
C.III						ex 3 - ex 4	3
C.IV						ex 1 - ex 3	8
D.I	Bimodular	7,0	3,2	5,4	3,2	ex 7 – ex 8	3
D.II						ex 3 - ex 4	2
						nd	4
E	Bimodular	7,0	3,7	5,4	3,2	ex 3 – ex 4	3
F.I	Trimodular	7,0	2x3,2	2x5,4	3,2	ex 7 – ex 8	1
F.II						ex 3 – ex 4	3
F.III						ex 1 - ex 3	1
total							57

Tabela 13: Ha	plótipos	para o Loo	co C4/CYP21
			,

Letras maiúsculas de A-F= padrão correspondente aos dados obtidos por Southern blot, Algarismos romanos I- IV = padrão correspondente aos dados obtidos por MLPA.

4 - Polimorfismos e mutações nos genes CYP21A1P/CYP21A2

4.1 - Análise por ASO-PCR

O terceiro método utilizado para análise dos genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2* foi o de ASO-PCR. Foram investigadas a ausência ou a presença das oito mutações normalmente presentes no pesudogene e sete variações nucleotídicas consideradas polimorfismos (descritos em Casuística e Métodos).

Como *primers* fixos foram usados: o que se anela na seqüência do Cl6 normal para os híbridos com recombinação entre os éxons 1-3 e 3-4 e, o que se anela na seqüência do Cl6 mutante para os híbridos com recombinação entre os éxons 7-8 e 3[°]UTR.

Os pseudogenes dos alelos bi- e trimodulares também foram avaliados quanto à presença das mutações mais freqüentes e os polimorfismos. Para esta analise foi usado o *primer* fixo CL6 mutante (Tabela 3) *sense* ou *antisense*. As Figuras 26 e 27 abaixo mostram a análise da família 91. Nesta, o alelo estudado é trimodular+híbrido com

recombinação entre os éxons 3 e 4 de origem materna. Com a avaliação da segregação, foi possível estabelecer os polimorfismos pertencentes ao híbrido e aos pseudogenes presentes no alelo trimodular. Ao observarmos as imagens dos géis notamos a prevalência das variantes C nas posições g.115 e g.138 - a maior variabilidade foi para o polimorfismo g.395C>T. Por outro lado, observou-se a prevalência do alelo A na posição g.683 e dos alelos G nas posições g.1586 e g.1645. Para a variação IVS2-13A/C>G, em pseudogenes a variante G (que gera o sítio de *splicing* alternativo) foi encontrada em 100% dos alelos testados (Figura 27).



Figura 26:Polimorfismo 115 C/T (rs6468) no éxon 1, Polimorfismo 138 A/C (rs33947354) no éxon 1, Polimorfismo 395 C/T (rs6462) no íntron 2; Polimorfismos 683 A/G (rs6474) no éxon 3; Polimorfismo 1586 C/G (rs6477) no éxon 7; Polimorfismo 1645 C/G (rs rs6472). Os produtos das PCRs foram separados em gel de agarose 1%, o marcador de peso molecular *Ladder* 1 kb plus (Invitrogen Corporation, Estados Unidos). No canto superior esquerdo de cada polimorfismo, a letra corresponde à variação nucleotídica testada. O retângulo em preto ressalta os resultados da família 91.

As mutações foram triadas também utilizando o CL6 mutante como *primer* fixo. As alterações p.P30L (éxon 1), delta 8 (éxon 3) e p.I172N (éxon 4) apresentaram apenas a variante mutante tanto para a família 91 circulada em preto, quanto para as demais presentes nos géis (Figura 27). Em alguns casos a segregação não é informativa, como no caso da alteração p.V281L (éxon 7) onde o pai não amplificou e uma das filhas não apresentou a variante mutante. Para a confirmação da alteração no CL6, foi utilizado como *primer* fixo Ex3 mutante *sense* (Tabela 3). O pai apresentou apenas seqüência mutante para

Cl6, sugerindo a presença de dois pseudogenes, ou seja, um em cada alelo bimodular. A mãe apresentou seqüência normal e mutante para o CL6, pois seu gene híbrido apresenta a seqüência normal do Cl6 (Tabela 15) e, provavelmente seus pseudogenes, apresentaram a seqüência mutante. No éxon 8 a alteração p.R356W foi avaliada por ASO-PCR, apenas o irmão não afetado apresentou homozigose para a seqüência normal. O fragmento de PCR gerado para verificar a ausência ou a presença da alteração p.R356W foi digerido com a enzima de restrição PstI com a finalidade de detectar a presença da alteração p.Q318X. Quando a alteração p.Q318X está presente é suprimido um sítio de restrição PstI gerando um fragmento de de 750 pb (Figura 27). Na canaleta 1, temos o alelo paterno onde as seqüências para p.R356W e p.Q318X são normais. Na canaleta 2, temos o alelo paterno que apresentou a seqüência mutante para a p.R356W e p.Q318X. A canaleta 3, representa o alelo materno que apresentou a sequência normal para p.R356W e para a alteração p.Q318X apresentou heterozigose (normal/mutante). A canaleta 4, representa o alelo materno que apresentou as seqüências para p.R356W e p.Q318X mutantes. As filhas afetadas herdaram o alelo trimodular materno representado pela canaleta 3 e o bimodular paterno representado pela canaleta 2, já o menino normal apresentou o alelo paterno representado pela canaleta 1 e o trimodular materno (canaleta 3).



Figura 27: A)- Mutação p.P30L no éxons 1B, a mutação delta 8 no éxons 3, a mutação p.I172N no éxons 4, Mutação Cl6 (p. L236N, p.V237Q, p.M239K) no éxons 6, a mutação p.V281L no éxons 7 e a mutação p.R356W no éxons 8. Normal= primer ancora mutante combinado com a seqüência normal para a posição a ser verificada, Mutante= primer ancora mutante combinado com a sequência mutante para a posição a ser verificada. B)- a alteração ivs2-13 A/C>G no íntron 2. a mutação p.Q318X após a digestão do fragmento obtido pela combinação éxons 6 mutante com éxons 8,2 normal ou com éxons 8,2 mutante. Onde 1 = fragmento éxons 6 mutante +éxons 8,2 normal alelo paterno, 2= fragmento éxons 6 mutante +éxons 8,2 mutante alelo paterno, 3= fragmento éxons 6 mutante +éxons 8,2 normal alelo materno, 4= fragmento éxons 6 mutante +éxons 8,2 mutante alelo materno, 5= filho normal que herdou os alelos referente as canaletas 1 e 3, 6 e 7= filha afetada que herdou o alelo paterno referente a canaleta 2 e o alelo materno referente a canaleta 3 e 8 e 9 = filha afetada que herdou o alelo paterno referente a canaleta 2 e o alelo materno referente a canaleta 3.

4.2 - Seqüenciamento

Para os grupos 1 e 2 os genes híbridos foram estudados mais detalhadamente. A confirmação da presença da região 5' UTR pertencente ao pseudogene *CYP21A1P* foi realizada por seqüenciamento.

Novamente, os fragmentos que foram seqüenciados foram amplificados inicialmente em duas partes selecionadas com base na presença ou ausência da mutação Cl6 no éxons 6, como explicado em Material e Métodos. Assim, dois grandes fragmentos foram gerados, os quais foram purificados antes do seqüenciamento com *primers* internos (Figura 28).



Figura 28: Amplificação do gene híbrido *CYP21A1P/CYP21A2*, visualização em gel de agarose 1% (Invitrogen Corporation, Estados Unidos); L = *Ladder* 1 kb plus (Invitrogen Corporation, Estados Unidos). A) fragmento de 2000 pb obtido após reação da PCR com os iniciadores 5' e éxons 6 normal (listados na Tabela 3); B) produto da amplificação da região éxons 6 normal íntron com o fragmento de 1500 pb.

Todos os híbridos demonstraram as seqüências da 5'UTR correspondente à do *CYP21A1P*. Um grupo de quatro pacientes com alelos monomodulares demonstrou duas mutações no éxon 1 que não são normalmente encontradas no pseudogene (Figura 29).



Figura 29: Alinhamento da seqüência do pseudogene *CYP21A1P*, gene *CYP21A2* com a seqüência referente ao éxon 1 do paciente 165ya1. Os círculos em vermelho evidenciam as alterações p.P34L e p.H62L. Abaixo o eletroferograma do éxon 1 do paciente 165Ya1. As setas em vermelho mostram as alterações p.P34L e p.H62L, a seta verde mostra a ausência da alteração p.P30L.

As alterações p.P34L, ainda não descrita, e a p.H62L, rara, foram encontradas em nossa casuística segregando juntas no alelo monomodular com gene híbrido como mostra a Figura 29. Este alelo não apresenta a mutação p.P30L que é a mutação do éxon 1 normalmente observada nesses casos. Já nos alelos bimodulares não foi observada a presença da alteração p.P34L em nenhum dos alelos, porém a alteração p.H62L foi detectada segregando juntamente com a alteração p.P30L (Figura 30).



Figura 30: Eletroferograma referente à seqüência do éxon 1 da paciente 16xa3, as setas vermelhas indicando a presença das alterações p.P30L e p.H62L.

Como não há relatos de ocorrência da mutação p.P34L e poucos relatos citando a mutação p.H62L e, ainda, como neste estudo esta mutação foi identificada em genes híbridos, levantou-se a hipótese de se tratarem de mutações derivadas do pseudogene. Assim, foram avaliados 80 pseudogenes de indivíduos não portadores de deficiência de 21 – hidroxilase. A alteração p.P34L não foi encontrada e, a p.H62L estava presente em 3,4% destes indivíduos.

Estas mutações, então, separam os alelos portadores em grupos de haplótipos únicos como mostram as tabelas 14 e 15 (haplótipos A.III.2 e D.II.1) detalhadas no próximo tópico.

5 - Combinação dos dados de ASO-PCR e seqüenciamento

Após a triagem por ASO-PCR e seqüenciamento os haplótipos da tabela 13 foram subdivididos levando em consideração as formações dos genes híbridos CYP21A1P/CYP21A2 (Tabelas 14 e 15). Foram identificados 10 haplótipos para os alelos monomodulares (tabela 14). O grupo A.I, formado pelos híbridos com Cl6 mutante, demonstrou sequências derivadas do pseudogene para toda a extensão, confirmando a classificação do MLPA, além disso, um alelo dentro deste grupo gerou um sub-grupo por divergir nas posições nucleotídicas g.395, g.1645 e R356W. No grupo A.II, também com Cl6 mutante, mas com região provável de recombinação entre éxon 6 e éxon 8, houve também uma sub-divisão com um alelo único por divergência nas seqüências p.V281L e

p.Q318X, além de apresentar a mutação nova p.H392Q no éxon 9 gerada pela trocag.2298C>G (Figura 31), confirmando a singularidade do haplótipo.



Figura 31: Alinhamento da seqüência do pseudogene *CYP21A1P*, gene *CYP21A2* com a seqüência referente ao éxon 9 da paciente Ubl8Xa1. O círculos em vermelho evidencia a alteração nova p.H392Q. Abaixo o eletroferograma mostrando a alteração g.2298C>G.

O grupo A.III formado pelos alelos com Cl6 normal e região de recombinação provável entre os éxons 3 e 4, dividiu-se em 3 sub-grupos. O sub-grupo A.III.1 divergiu do A.III apenas na posição g.395. Por outro lado, os alelos portadores das mutações p.P34L e p.H62L, que formaram outro subgrupo, foram únicos por apresentarem as mutações novas e, também divergiram na posição -4 onde todos os outros são T e estes são C (não ilustrado).

O grupo A.IV, que apresentou pontos de recombinação entre os éxons 1 e 3, também se subdividiu em dois sub-grupos uma vez que o seqüenciamento revelou pontos de recombinação diferentes. Nos pacientes 99Xa1 e 123Ya1 parte do íntron 2 corresponde a seqüências do *CYP21A1P* indicando que a recombinação deva ter acontecido nesta região. Por outro lado, a paciente 23Xa1 apresentou o íntron 2 inteiro com seqüências do gene *CYP21A2* sugerindo que neste caso a recombinação deva ter ocorrido entre o final do éxon 1 e o éxon 2, inclusive.

A paciente 30Xa1 para qual a cópia do gene C4 apresentou o fragmento *Taq* I de 6,4 kb, mais uma vez foi distinta de todos os demais, formando um haplótipo único. Além de não se alinhar com nenhum outro haplótipo considerando as mutações e SNPs conhecidos, o seqüenciamento do seu gene híbrido revelou uma nova variação na 5'UTR, posição -294T>C e, na posição g.1662T>C do éxon 7, apresentou a variação bastante rara aparentemente derivada do pseudogene, (rs11970671) cuja freqüência estimada para o alelo C é de 0,014 (Figura 32).



Figura 32: Alinhamento da seqüência do pseudogene CYP21A1P, gene CYP21A2 com a seqüência referente a região 5' da paciente 30Xa1. A) Mostrando a alteração na posição -294T>C e abaixo o eletroferograma. B) alinhamento referente à região do éxon 7, mostrando a variação g.1662T>C, evidenciada com circulo vermelho. Abaixo o eletroferograma mostrando a alteração g.1662T>C indicada pela seta.

Foram definidos 10 haplótipos diferentes para os genes híbridos presentes em alelos bi ou trimodulares.

O haplótipo C.I representa aqueles alelos que apresentam na região 3 `UTR da cópia híbrida seqüências de *CYP21A1P* indicado pelo MLPA, no entanto um dos pacientes (165Ya1) apresentou seqüências de *CYP21A2* nas posições p.V281L e p.R356W (Tabela 15) dividindo o haplótipo em C.I.1. Os haplótipos C.II e C.III confirmaram a divergência já verificada no MLPA.

O haplótipo C.IV representa o grupo com maior número de alelos para os bimodulares. Este grupo foi subdividido em três grupos devido às variações p.P30L no éxon 1, g.295C>T (rs6462) no íntron 2, g683G>A (rs6474) no éxon 3 e g. 1586C>G (rs6477) no éxon 7. A paciente CI-13 que compõe o haplótipo C.IV.3 apresentou também uma heterozigose da alteração p.A16T, porém neste caso não foram analisados os parentais o que dificultou a análise, isto explica a duplicidade dos resultados nas variações do éxon 7 (g.1586C/G, rs6477) e no éxon 8 p.Q318X e p.R356W. Portanto, não é possível concluir se a alteração p.A16T está presente no gene hibrido ou não, mas se forem observados os demais haplótipos este alelo não integraria nenhum outro com a ausência da alteração p.P30L.

O grupo D.I confirmou a formação decorrente do *Southern blot* e MLPA. Já o grupo D.II se subdividiu e outros dois grupos que se caracterizaram pela presença da mutação p.H62L e ausência da p.P30L nos grupos D.II.1 D.II.2, respectivamente.

O grupo E que demonstrou sua singularidade com as análises de *Southern blot* e MLPA, manteve sua formação e ainda foi acrescido de um componente cujos resultados da análise de MLPA foi prejudicada por degradação da amostra.

Os grupo F.I é representado também por um único alelo, bem como o F.III cuja caracterização ainda não está completa. O F.II foi subdivido em F.II.1 devido à ausência de p.P30L.

Assim, os genes híbridos aqui caracterizados geraram 10 haplótipos com Cl6 mutante distribuídos 5 em alelos monomodulares e 4 em alelos bi e 1 em trimodulares. O maior número de híbridos foi daqueles com Cl6 normal que geraram 17 haplótipos, 5 em alelos monomodulares e 10 em alelos bi e 2 em trimodulares com um total de 57 alelos em indivíduos não aparentados.

Os alelos bi e trimodulares, com exceção dos que fazem parte do haplótipo E, são portadores de uma ou duas cópias de *CYP21A1P*. Como os *CYP21A1Ps* podem também apresentar certa variabilidade, estes foram avaliados quanto à presença das oito mutações mais freqüentes e dos sete polimorfismos (Tabela 16). Cinco haplótipos foram reconhecidos com diferenças que se concentraram principalmente nas posições g.395, p.V281L, p.Q318X e p.R356W e, assim provocaram novas sub-divisões nos haplótipos estabelecidos anteriormente.

6 - Genótipos dos pacientes

Assim, de acordo com os haplótipos os genótipos dos pacientes ficaram esclarecidos (Tabela 17).

			Exol	11			Intre	7 UO	EX01	~	Exon 4	Exon 6		Exon		Ex	on 8	
ciente 5'UTR ¹	4 ou 5 CTGs	p.P30L C>T	p.P34L C>T	rs6468 g.115 C>T	rs6464 g.138 C>A	p.H62L A>T	rs6462 g.395 C>T	IVS2-13 A/C>G	rs6474 g.683 G>A	del8 ²	p.1172N T>A	CL6 ³	rs6477 g.1586 C>G L2481	rs6472 g.1645 G>C S268T	p.V281L G>T	p.Q318X C>T	p.R356W C>T	3'UTR ⁴
63Xal P	5	Г	C	J	C	A	F	9	Α	+	Α	+	IJ	IJ	Ŀ	Г	Т	Ч
o3Xa1 P	5	Г	C	c	c	А	T ou C	IJ	Α	pu	pu	+	IJ	IJ	Т	pu	pu	pu
IlYal P	pu	Г	С	С	c	Α	Г	pu	pu	pu	pu	+	ŋ	Ð	Г	Т	Г	Ρ
e6Xa1 P	5	pu	pu	pu	pu	pu	Г	pu	pu	pu	А	+	ŋ	Ð	Т	pu	pu	Ρ
r2Yal P	pu .	pu '	pu .	pu .	, pu	pu .	pu .	pu .	pu .	pu	pu '	+ -	pu '	pu	, Pu	pu .	pu '	Ч.
00Aal F	yd y	BI F				pu		pl c	Pu <	pu +	pu	+ -	B G		pu +	pa +		DI d
2 Val F	<i>. ч</i>	-				4	ی د		-	+ +	4	+ +			- 1	- (CN
51a1 F	n vo		50	טכ	50	4 4	ט נ	5 0	A A	+ +	A	+ +	טכ	ט ני ני		50	50	NB
6Yal P	ŝ	Ē	0	c c	0	V	υ Ο	0	A	+	A	+	0	0	Ē	0	0	BN
9Yal P	5	Г	C	C	C	A	C	ŋ	Α	+	А	+	IJ	C	Т	C	C	GN
i8Xa1 P	5	Ч	c	c	c	A	c	Ð	Α	+	A	+	U	9	9	н	c	GN
06Xa1 P	5	г	c	с	c	A	ပ	G	Α	+	Т		ပ	IJ	G	ပ	c	GN
12Xal P	5	Г	С	С	С	А	С	IJ	Α	+	Т	,	C	G	G	С	С	GN
59Xal P	5	Т	С	С	С	А	С	G	Α	+	Т		С	G	G	С	С	GN
5Yal P	5	Г	С	С	С	Α	Т	G	Α	+	Т		С	9	9	С	С	GN
)3Xal P	5	Ē	C	C	C	Α	Г	G	Α	+	Т		C	9	9	C	C	GN
9Xal P	5	Г	С	С	с	Α	Т	G	Α	+	Т		С	G	G	с	С	GN
5Yal P	5	c	Т	С	С	Т	С	G	A	+	Т		C	G	G	С	C	GN
0Ya1 P	5	J	н	c	J	H	C	IJ	A	+	Т		C	G	IJ	C	C	GN
4Xa1 P	5	J	F	c	J	F	c	IJ	A	+	Т		C	G	IJ	C	c	GN
11 Yal P	5	С	Т	С	c	Т	С	G	А	+	Т		С	G	G	С	С	GN
3Yal P	5	Г	С	С	С	Α	С	Α	G		Т		С	9	9	С	С	GN
9Xal P	5	Т	С	С	С	А	С	Α	G		Т		С	G	G	С	С	GN
3Xal P	5	Т	С	С	С	A	С	Α	G		Т		С	G	6	С	С	GN
0Xa1 P	5	Т	С	С	С	A	Τ	9	Α	+	Α	+	G	G	Τ	С	С	GN
P21A1P; ² presença (+ eterminado: rs=núm	+) ou ausên em de aces	icia (-) d so no <i>Hu</i>	la mutaçã <i>iman Gen</i> i	o 707_7. e Mtutati	14delGA ion Data	AGACTAC;	³ presenç FR e 3'UT	a (+) ou a R=resultae	usência (⁴ º dos ex	(-) das mi	utações L23 tos de MLPA	6N,V2370, 1	M239K,	conhecid	as como <i>cl</i> i	uster 6; ⁴ GN	= seqüênci	as do gene
	ciente S'UTR ¹ 63Xal P 63Xal P 63Xal P 63Xal P 65Xal P 933tal P 935tal P 935tal P 935tal P 935tal P 935tal P 955tal P 955tal P 95tal P	ciente S'UTR ¹ 4 on 5 63Xal P 5 63Xal P 5 63Xal P 5 66Xal P 6 65Xal P 6 65Xal P 6 65Xal P 6 65Xal P 6 62Xal P 6 62Xal P 5 63Yal P 5 63Yal P 5 63Yal P 5 63Yal P 5 93Yal P 5 93Yal P 5 93Xal	cienteS'UTR1 4 ou 5 P su 301.GXXalP5TGiXalP5TGiXalP5TbeiXalP66Di YalP67beiXalP66CTGaCT6CTAP5TbeiXalP66CiticalP5TSiyalP5TSixalP5T9XalP	cienteS'UTR14ou 5 $pP34L$ GiXalP5TCGiXalP5TCGiXalP5TCGiXalP5TCbeñalP6ndndor2ValP6ndndor2ValPndndndor2ValPndndndor2ValP5TCbeñalP5TCcostalP5TCstylalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5TCbittalP5T	cienteS'UTR14 ous p_{P30L} p_{P34L} r_{8468} 63XalP5TCC63XalP5TCC63XalP5TCC63XalP5TCC63XalP5TCC6453P6ndndnd63XalP5TCC65XalP6ndndnd67XalP5TCC65XalP5TCC65XalP5TCC65XalP5TCC65XalP5TCC65YalP5TCC95XalP5TCC65YalP5TCC95XalP5TCC95XalP5TCC95XalP5TCC95XalP5TCC95XalP5TCC95XalP5TCC95XalP5TCC95XalP5TCC95XalP5TCC95XalP5TCC95AaP </td <td>cienteS'UTR14 ous$p_{1301}$$p_{1301}$$p_{1301}$$p_{1301}$$p_{13111}$$p_{13111}$$p_{1311111111111111111111111111111111111$</td> <td>ciente5'UTR14015$pP30L$$pL34L$rs6466rs6466pH62L63XalP5TCTGsCTCTCA63XalP5TCCA63XalP5TCCA63XalP5TCCA63XalP5TCCA63XalP5TCCA63XalP5TCCA63XalP5TCCA73XalP5TCCA73XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCCA93XalP5TC<td>cienteS'UTR¹Fous$p_{F341}$$p_{F341}$$p_{F4648}$$p_{H621}$$p_{F342}$$p_{F341}$$p_{F6468}$$p_{H621}$$p_{F6458}$63XalPSTCCTCCAT63XalPSTCCCATT63XalPSTCCCATT63XalPSTCCCATT66XalPSTCCCATT66XalPSTCCCATT66XalPSTCCCAC66XalPSTCCCAC73XalPSTCCCAC73XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCCC</td><td>cienteS'UTR1Fousp_{P301}</td><td>cienteS'UTR1FUR1FOUR<</td><td>cienteS'UTR1risticspr341 curtosristic</td><td>ciente 5'UTR¹ metera restra metera restra metera restra pull'za 6(3Xal P 5 T CT C C C A T C C C A</td><td>ciente 5'UTR¹ Mais Prisur Releta NS3-13 Releta NS3-13 Releta Paira CL0³ 6Xal P 5 T C CT CAT CA T A T CL0³ CT C10³ C10³ P A H A H A H</td><td>ciente 5'UTR¹ restor resor resor resor<!--</td--><td></td><td>ciente S'UTR¹ rest res rest rest</td><td>centre STUTRI CTGa mean pan mean mean</td><td>dente 5'UTR¹ Testing Priori Prior</td></td></td>	cienteS'UTR14 ous p_{1301} p_{1301} p_{1301} p_{1301} p_{1311} p_{13111} p_{13111} $p_{1311111111111111111111111111111111111$	ciente5'UTR14015 $pP30L$ $pL34L$ rs6466rs6466pH62L63XalP5TCTGsCTCTCA63XalP5TCCA63XalP5TCCA63XalP5TCCA63XalP5TCCA63XalP5TCCA63XalP5TCCA63XalP5TCCA73XalP5TCCA73XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCA93XalP5TCCCA93XalP5TC <td>cienteS'UTR¹Fous$p_{F341}$$p_{F341}$$p_{F4648}$$p_{H621}$$p_{F342}$$p_{F341}$$p_{F6468}$$p_{H621}$$p_{F6458}$63XalPSTCCTCCAT63XalPSTCCCATT63XalPSTCCCATT63XalPSTCCCATT66XalPSTCCCATT66XalPSTCCCATT66XalPSTCCCAC66XalPSTCCCAC73XalPSTCCCAC73XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCCC</td> <td>cienteS'UTR1Fousp_{P301}</td> <td>cienteS'UTR1FUR1FOUR<</td> <td>cienteS'UTR1risticspr341 curtosristic</td> <td>ciente 5'UTR¹ metera restra metera restra metera restra pull'za 6(3Xal P 5 T CT C C C A T C C C A</td> <td>ciente 5'UTR¹ Mais Prisur Releta NS3-13 Releta NS3-13 Releta Paira CL0³ 6Xal P 5 T C CT CAT CA T A T CL0³ CT C10³ C10³ P A H A H A H</td> <td>ciente 5'UTR¹ restor resor resor resor<!--</td--><td></td><td>ciente S'UTR¹ rest res rest rest</td><td>centre STUTRI CTGa mean pan mean mean</td><td>dente 5'UTR¹ Testing Priori Prior</td></td>	cienteS'UTR¹Fous p_{F341} p_{F341} p_{F4648} p_{H621} p_{F342} p_{F341} p_{F6468} p_{H621} p_{F6458} 63XalPSTCCTCCAT63XalPSTCCCATT63XalPSTCCCATT63XalPSTCCCATT66XalPSTCCCATT66XalPSTCCCATT66XalPSTCCCAC66XalPSTCCCAC73XalPSTCCCAC73XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCAC75XalPSTCCCCC	cienteS'UTR1Fous p_{P301}	cienteS'UTR1FUR1FOUR<	cienteS'UTR1risticspr341 curtosristic	ciente 5'UTR ¹ metera restra metera restra metera restra pull'za 6(3Xal P 5 T CT C C C A T C C C A	ciente 5'UTR ¹ Mais Prisur Releta NS3-13 Releta NS3-13 Releta Paira CL0 ³ 6Xal P 5 T C CT CAT CA T A T CL0 ³ CT C10 ³ C10 ³ P A H A H A H	ciente 5'UTR ¹ restor resor resor resor </td <td></td> <td>ciente S'UTR¹ rest res rest rest</td> <td>centre STUTRI CTGa mean pan mean mean</td> <td>dente 5'UTR¹ Testing Priori Prior</td>		ciente S'UTR ¹ rest res rest rest	centre STUTRI CTGa mean pan mean	dente 5'UTR ¹ Testing Priori Prior

Tabela 14: Grupos de haplótipos definidos com base nas composições das composições de nucleotídeos dos genes híbridos dos alelos monomodulares.

					Exo	11			Intr	on 2	Exo	n 3	Exon 4	Exon 6		Exon	-	Ex	on 8	
Haplótipos	Paciente	5'UTR ¹	4 or 5 CTGs	p.P30L C>T	p.P34L C>T	rs6468 g.115 C>T	rs6464 g.138 C>A	p.H62L A>T	rs6462 g.395 C>T	IVS2-13 A/C>G	rs6474 g.683 G>A	del8 ²	N271Lq T>A	CL6 ³	rs6477 g.1586 C>G	rs6472 g.1645 G>C S268T	p.V28IL G>T	p.Q318X C>T	p.R356W C>T	3'UTR ⁴
CI	59Ya3	Р	5	Т	С	С	c	A	Т	9	Α	+	Υ	+	9	9	T	Т	T	Р
C.I.1	165Ya1	Р	5	Т	c	c	c	A	Т	9	A	+	A	+	9	9	9	Т	с	Ч
C.II	50Yal	Р	5	Т	с	С	С	A	Τ	9	A	+	Α	+	9	9	Т	T	с	GN
C.III	12Xa1	Р	5	Т	c	c	c	A	Т	9	A	+	Τ		c	9	9	c	c	B
	180Xa1	Ρ	5	Т	С	С	С	Α	pu	9	pu	+	Τ		С	pu	6	С	С	GN
C.IV	13Xa1	Р	5	Т	c	J	J	Α	Т	Α	Α		Т		ပ	9	9	ပ	С	GN
	19Xa1	Ь	5	Т	С	С	c	Α	Т	Α	Υ		Т		С	9	9	С	С	GN
	20Xa2	Ь	5	Т	С	С	c	Α	Т	Α	Υ		Т		C	9	9	C	С	GN
	36Xal	Ь	5	Т	С	С	С	Α	Т	Α	Α		Т		С	9	9	С	С	BN
	60Ya1	Ь	5	Т	С	С	c	Α	Τ	Α	Υ		Т		С	9	9	С	С	GN
	61Xa2	Ь	5	Т	С	С	С	Α	Т	Υ	Υ		Τ		С	9	9	С	С	BN
	198Xa1	Ь	5	Т	c	c	c	Α	Т	Α	pu		Т		pu	pu	9	С	с	GN
C.IV.1	Rio3Xa1	Р	5	Т	С	c	c	Α	C ou T	Α	Ð		Т		ပ	9	9	c	с	GN
C.IV.2	122Xa2	Ρ	5	Т	С	С	С	Α	Т	Α	A ou G		Т		6	9	6	С	С	GN
C.IV.3	CI-13	Ρ	5	C (A16T)	С	С	С	Α	С	Α	9		Т		C	9	9	C ou T	C ou T	GN
D.I	Ubl6Xa1	Р	5	T ou C	С	С	С	Υ	Τ	9	Υ	+	Α	+	9	9	Т	С	С	GN
	Ubl7Xa1	Ь	5	T ou C	c	C	c	Α	Т	9	Υ	+	V	+	pu	9	Г	pu	С	GN
	108Xa1	Ρ	5	Т	ပ	ပ	ပ	Α	C ou T	ŋ	A	+	Α	+	ŋ	9	T ou G	J	c	GN
D.II	RiolYal	Ч.	5 ou 4	T ou C	С	T ou C	A ou C	A	C ou T	Ð	pu	+	Г		c	Ð	9	c	c	GN
	86Yal	Р	5	Т	c	c	с	Α	Т	G	A	+	Т		ပ	9	9	C	с	GN
D.II.1	16Xa3	Ь	5	Т	С	c	С	Т	c	G	Α	+	Т		c	9	G	c	С	GN
	117Xa1	Ρ	5	Т	c	J	c	Т	J	9	A	+	Т		ပ	9	G	С	С	GN
D.II.2	4Xa1	Ρ	5	c	с	J	J	Α	ပ	ŋ	Α	+	Т		ပ	9	Ð	J	С	GN
н	HATIXa1	Ь	5	C	c	T ou C	A ou C	Α	Т	9	pu	+	Т		pu	pu	pu	pu	pu	GN
	168Xa1	Ь	5	С	С	T ou C	A ou C	Α	Τ	9	pu	+	Τ		G ou C	pu	9	C ou T	С	GN
	Ube3Xa1	Ь	5	C	С	T ou C	c	Α	pu	pu	pu	+	Т		pu	pu	9	C ou T	С	BN
	Ube7Xa1	Ρ	5	С	С	T ou C	С	Α	Т	9	pu	+	Τ		pu	pu	G	C ou T	С	GN
F.I	28Xa1	Р	5	Т	С	С	С	Α	С	9	Α		Α	+	9	9	T ou G	T ou C	С	GN
F.II	91Xa2	Ρ	5	Т	С	С	С	Α	С	Ð	Α	+	Т		9	9	Т	С	С	GN
F.II.1	115Xa1	Ь	5	С	С	С	С	Α	С	G	Α	+	Т		9	9	Г	c	С	GN
	189Yal	Р	5	c	ပ	ပ	J	A	ပ	9	pu	+	Т		9	5	Т	С	с	GN
F.III	Ubl8Xa1	Р	pu	Т	pu	pu	pu	pu	Г	9	pu	+	Т		pu	pu	9	С	С	GN

					Exo	n 1			Intro	on 2	Exo	n 3	Exon 4	Exon 6		Exon 7		Exc	on 8
Paciente	Haplótipos	Haplótipos <i>CYP21A1P</i>	4 or 5 CTGs	p.P30L C>T	p.P34L C>T	rs6468 g.115 C>T	rs6464 g.138 C>A	p.H62L A>T	rs6462 g.395 C>T	IVS2-13 A/C>G	rs6474 g.683 G>A	del8 ²	p.1172N T>A	CL6 ³	rs6477 g.1586 C>G L248L	rs6472 g.1645 G>C S268T	p.V281L G>T	p.Q318X C>T	p.R356W C>T
59Ya3	C.I		5	Т	PN	c	c	pu	Т	Ð	A	+	A	+	Ð	Ð	Т	Т	Т
13Xa1	C.IV	_	pu	Τ	pu	C	С	pu	Τ	Ð	Υ	+	А	+	G	ŋ	Т	Τ	Τ
19Xa1			pu	Т	pu	С	С	pu	Т	G	Α	+	А	+	Ð	ŋ	Τ	Т	Т
20Xa2			pu	Т	pu	C	С	pu	Τ	G	Α	+	А	+	G	ŋ	Т	Г	Т
36Xa1		a	pu	Т	pu	c	С	pu	Т	G	Α	+	А	+	G	ŋ	Т	Т	Т
60Ya1			pu	Τ	pu	c	c	pu	Т	G	A	+	А	+	G	ŋ	Т	Г	Т
61Xa2			pu	Τ	pu	C	C	pu	Т	Ū	V	+	А	+	Ð	ŋ	Т	Г	Г
12Xa1	C.III		5	Т	C	C	C	A	Т	Ð	A	+	A	+	ŋ	ŋ	Т	Т	Т
50Ya1	C.II		5	Τ	c	c	С	A	Т	G	A	+	A	+	G	G	Т	Г	C
86Ya1	D.II	q	pu	Т	pu	C	С	pu	Т	G	A	+	А	+	G	ŋ	Т	Т	C
165Ya1	C.I.1		pu	Τ	C	C	С	A	Т	Ð	A	+	A	+	Ð	ŋ	G ou T	Г	С
180Xa1	C.III		pu	Т	pu	С	С	nd	pu	G	Α	+	Α	+	G	nd	Т	Т	С
Rio3Xa1	C.IV.1		5	Т	С	С	С	Α	C ou T	G	Α	pu	pu	+	6	9	Т	pu	pu
122Xa2	C.IV.2	c	PN	Ч	pu	c	c	pu	C ou T	ŋ	A	+	A	+	G	G	г	c	c
Ubl6Xa1	D.I		5	T ou C	C	U	C	Α	Т	G	A	+	A	+	IJ	ŋ	Г	J	C
Ubl7Xa1			5	T ou C	c	c	c	А	Т	G	Α	+	Α	+	pu	G	Г	pu	c
108Xa1	D.I		5	Т	ပ	c	c	A	C ou T	G	A	+	A	+	Ð	Ð	T ou G	c	С
16Xa3	D.II.1		pu	Т	pu	С	С	pu	С	G	Α	+	Α	+	Ð	Ð	Т	Т	Т
117Xa1		p	pu	Г		C	C	pu	C	Ð	Α	+	A	+	G	G	Т	Т	Г
91Xa2	F.II		pu	Ч	pu	c	c	pu	С	IJ	A	+	A	+	IJ	G	Г	н	Ч
115Xa1	F.II.1		pu	Т	pu	С	С	nd	С	G	Α	+	А	+	G	Ð	Т	Т	Т
4Xa1	D.II.2		5	Т	С	С	С	pu	С	G	Α	+	Α	+	6	9	6	Т	С
28Xa1	F.I	e	pu	Т	pu	C	c	pu	С	G	A	+	А	+	Ð	ŋ	G ou T	C ou T	c
Ubl8Xa1	F.III		5	Т	pu	С	С	nd	С	G	Α	+	Α	+	G	Ð	G	Т	С
CI-13	C.IV.3		5	Т	С	С	С	Α	pu	pu	pu	pu	Υ	+	pu	pu	pu	pu	pu
189Ya1	F.II.1		pu	pu	pu	pu	pu	pu	pu	pu	pu	pu	pu	+	pu	pu	pu	pu	pu
198Xa1	C.IV		PN	pu	pu	pu	pu	pu	pu	pu	pu	pu	pu	+	pu	pu	pu	pu	pu
RiolYal	D.II		pu	pu	pu	pu	pu	nd	pu	nd	pu	nd	nd	+	pu	pu	pu	pu	pu
¹ P = seqüênc <i>CYP21A2</i> ; nd=	ias <i>CYP21A1P</i> ; ² -não determina	presença (+) o do; rs=número	u ausênc de acess	ia (-) da o no <i>Hum</i>	mutação 1an Gene 1	707_714 Mtutation	delGAGA 1 Databas	CTAC; ³ pr se: 5'UTR e	esença (+) 3'UTR=re	ou ausênci sultado dos	ia (-) das exnerim	mutaçõe: entos de l	L236N,V23	7Q, M239K, c	onhecidas	como <i>clu</i>	ster 6; ⁴ GN :	= seqüência	s do gene

Tabela 16: Grupos de haplótipos definidos com base nas composições de nucleotídeos dos pseudogenes dos alelos bi e trimodulares

Resultados

Paciente ¹	Alelo paterno	Alelo Materno	Genótipo ²	Fenótipo ²
4Xa1	D.II.2.e	c.920_921insT + p.Q318X+p.R356W	PS	PS
12Xa1	A.I	C.III.a	PS	PS
13Xa1	p.I172N+p.V281L	C.IV.a	NPS	NPS
16Xa3	c.920_921insT + p.Q318X+p.R356W	D.II.1.d	PS	PS
19Xa1	IVS2-13A/C>G	C.IV.a	NPS	NPS
20Xa2	C.IV.a	C.IV.a	NPS	NPS
20Ya3	C.IV.a	C.IV.a	NPS	NPS
23Xa1	A.IV.1	IVS2-13A/C>G	NPS	NPS
25Ya1	p.I172N	A.III.1	NPS	NPS
28Xa1	IVS2-13A/C>G	F.I.e	PS	PS
30Xa1	В	В	PS	PS
32Ya1	A.II	A.II	PS	PS
36Xa1	c.920_921insT + p.Q318X+p.R356W	C.IV.a	NPS	NPS
50Ya1	C.II.b	IVS2-13A/C>G	PS	PS
56Xa2	p.I172N	A.II	NPS	NPS
59Ya3	C.I.a	p.Q318X	PS	PS
60Ya1	C.IV.a	p.I172N	NPS	NPS
61Xa2	C.IV.a	p.I172N	NPS	NPS
70Ya1	p.Q318X	A.III.2	PS	PS
86Ya1	p.V281L	D.II.b	NC	NPS/NC
91Xa2	F.II.d	IVS2-13A/C>G	PS	PS
91Xa3	F.II.d	IVS2-13A/C>G	PS	PS
99Xa1	A.IV	p.I172N	NPS	NPS
102Xa1	A.III	p.V281L	NC	NC
108Xa1	p.V281L + p.R426C	D.I.c	PS	PS
114Xa1	c.920_921insT	A.III.2	PS	PS
115Ya1	F.II.1.d	IVS2-13A/C>G	PS	PS
117Xa1	IVS2-13A/C>G	D.II.1.d	PS	PS
122Xa2	p.I172N	C.IV.2.c	NPS	NPS
123Ya1	A.IV	p.Q318X	NPS	NPS

Tabela 17: Variabilidade Genotípica

Paciente ¹	Alelo paterno	Alelo Materno	Genótipo ²	Fenótipo ²
136Ya1	IVS2-2A>G	A.II	PS	PS
139Ya1	A.II	c.920_921insT	PS	PS
141Ya1	A.III.2	p.R356W	PS	PS
159Xa1	A.III	IVS2-13A/C>G	PS	PS
163Xa1	A.I	p.P30L?	PS	PS
165Ya1	C.I.1.b	A.III.2	PS	PS
168Xa1	IVS2-13A/C>G	Е	PS	PS
180Ya1	C.III.b	p.I172N	NPS	NPS
189Ya1	F.II.1	IVS2-2A>G	PS	PS
198Xa1	p.V281L	C.IV	NC	NC
196Xa1	p.	A.III	PS	PS
203Xa1	p.R356W	A.III.1	PS	PS
209Xa1	IVS2-13A/C>G	A.III.1	PS	PS
Nor2Ya1	A.I	IVS2-13A/C>G	PS	PS
Ube3Xa1	E	IVS2-2A>G	PS	PS
Ube6Xa1	A.I	p. L236N, p.V237Q, p.M239K (Cl6)	PS	PS
Ube7Xa1	Е	p.V281L	NC	NC
Ubl1Xa1	A.I	IVS-13A/C>G	PS	PS
Ubl6Xa1	D.I.c	D.I.c	PS	PS
Ubl7Xa1	D.I.c	D.I.c	PS	PS
Ubl8Xa1	A.II.1	F.III.e	PS	PS
Rio1Ya1	p.I172N	D.II	NPS	NPS
Rio3Xa1	A.I	C.IV.1.c	NPS	PS ou NPS??
Rio6Xa1	A.I	A.I	PS	PS
HAT-1Xa1	Е	p.V281L	NC	NC
CI-13 ³	C.IV.3 ou p.Q318X+p.R356W	p.Q318X+p.R356W ou C.IV.3	NC	NC

¹código padronizado no laboratório: 1º número = número da família; X = sexo genético feminino; Y = sexo genético masculino; a = afetado; 2º número = ordem na irmandade, CI = caso isolado, Ubl= Uberlândia, Ube= Uberlândia, Nor= Nordeste, Rio= Rio e Janeiro, HAT= Manifestação tardia da defiiencia de 21-hidroxilase . ²PS= perdedor de sal; NPS= não perdedor de sal; NC= Não clássica, ³genótipo mais provável.

DISCUSSÃO
1 - O Módulo RCCX

A grande homologia existente entre os genes que compõem o módulo RCCX favorece emparelhamento desigual entre os alelos, durante a meiose I, e conseqüentemente introduz variabilidade genética. Como conseqüência há a formação de alelos com alteração no número de módulos existentes, ou seja, redução ou aumento. Segundo Blanchong et al.(2000) a conformação alélica mais freqüente em humanos é a bimodular (RCCX+RCCX) com 69% de ocorrência. Também são encontrados nas freqüências de 14% e 17% alelos trimodulares (RCCX+RCCX+RCCX) e alelos monomodulares (RCCX), respectivamente (BLANCHONG, C.A., et al., 2000). Estes rearranjos no módulo RCCX, podem ser considerados macroconversões por serem responsáveis por deleções ou duplicações de cerca de 30 kb, que é o tamanho aproximado de cada módulo. Há duas possibilidades: ou estes eventos de recombinações ocorreram em uma determinada época evolutiva gerando as diferentes conformações alélicas ou, estes eventos estão ocorrendo continuamente ao longo do tempo, assim como em cada formação gamética, seja na espermatogênese ou na ovogênese, ocorre recombinação com a finalidade de introduzir variabilidade genética. Considerando que a homologia é alta entre os genes do módulo RCCX e que sua estrutura mais freqüente é a bimodular, o emparelhamento desigual pode ocorrer com freqüência relativamente alta gerando alelos com novas características (CARROLL, M.C., CAMPBELL, R.D. e PORTER, R.R., 1985, DONOHOUE, P.A. et al., 1986, RAUM, D. et al., 1984, RODRIGUES, N.R., et al., 1987, SINNOTT, P., et al., 1990). Além do aumento ou redução do número de módulos RCCX, dependendo da região onde o crossing over ocorra pode haver a formação de genes híbridos. Para pacientes com deficiência de 21-hidroxilase a recombinação de interesse imediata é a que ocorre envolvendo o pseudogene CYP21A1P e o gene CYP21A2 gerando um hibrido inativo com terminal 5' correspondente ao pseudogene e 3' correspondente ao gene.

Neste trabalho, para se avaliar a variabilidade dos genes *CYP21* e *C4* que integram o módulo RCCX nos pacientes com deficiência de 21-hidroxilase, foi utilizada primeiramente a técnica de *RFLP* produzido pela enzima de restrição *Taq* I. Dessa forma, foi possível a identificação de genótipos diferentes nos indivíduos portadores de deficiência de 21-hidroxilase (Figura 11). Dado que a intensidade dos fragmentos nos blots podem induzir a uma conclusão errônea, devido a heterozigoses compostas de alelos monomodulares e trimodulares, por exemplo causando um efeito do tipo de compensação de dose, com a análise dos familiares foi possível a identificação das composições alélicas presentes em cada genótipo. A Figura 12, que mostra a análise de segregação em quatro famílias no item de Resultados, ilustra claramente este caso. Além de identificar a origem dos alelos monomodulares portadores de genes híbridos, no caso das duas primeiras famílias; na terceira família (Ubl8) foi possível verificar que o indivíduo afetado não apresentava homozigose para alelo bimodular + híbrido CYP21A1P/CYP21A2, que sugeria seu perfil de hibridização e, sim um alelo trimodular + híbrido CYP21A1P/CYP21A2 de origem materna e um alelo monomodular + híbrido CYP21A1P/CYP21A2 de origem paterna. O mesmo ocorreu com a quinta família (196) na qual as intensidades dos fragmentos para o filho afetado sugeriria uma duplicação da unidade C4B + CYP21A1P, devido às maiores intensidades das bandas de 6,0 kb, referente ao gene C4B, e de 3,2 kb, referente ao pseudogene CYP21A1P e, também, à menor intensidade do fragmento de 3,7 kb referente ao gene ativo CYP21A2. Quando os pais foram avaliados foi possível concluir que a mãe apresentava um alelo monomodular+híbrido CYP21A1P/CYP21A2 e o pai um alelo pouco freqüente tetramodular.

2 - Alelos monomodulares com a presença de genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2*

Este estudo descreve novos alelos com deleção em pacientes brasileiros com deficiência de 21-hidroxilase e descreve também a variabilidade dos alelos monomodulares *C4/CYP21* avaliada por *Southern blot*, MLPA, ASO-PCR e seqüenciamento.

A freqüência de alelos com deleção que causam deficiência de 21-hidroxilase é cerca de 9% no Brasil (BACHEGA, T.A. *et al.*, 1999, CHU, X., *et al.*, 1992). Em geral, alelos monomodulares carregam genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2* com composições de seqüências diferentes e com manifestações clínicas diferentes (KILLEEN, A.A., SANE,

K.S. e ORR, H.T., 1991, KOPPENS, P.F., HOOGENBOEZEM, T. e DEGENHART, H.J., 2000, L'ALLEMAND, D., *et al.*, 2000, LEE, H.H., 2005).

Estes alelos são caracterizados pela presença de um único modulo RCCX associado ao gene híbrido *CYP21A1P/CYP21A2*. Foram encontrados 26 alelos que apresentaram esta conformação alélica na casuística deste trabalho.

Os genes C4A e C4B devido à homologia que guardam entre si também podem se recombinar dando origem a genes híbridos C4A/C4B, assim como o CYP21A1P e o *CYP21A2*. Um gene híbrido *C4A/C4B*, que se caracteriza pela banda *Taq* I de 6,4 kb, havia sido descrito tanto em conformação alélica monomodular, com deleção C4B + CYP21A1P como em trimodular (BLANCHONG, C.A., et al., 2000, KOPPENS, P.F., HOOGENBOEZEM, T. e DEGENHART, H.J., 2002). O mais comum para este híbrido é a associação à deleção de C4B + CYP21A1P que foi até proposta como uma configuração com associação negativa com deficiência de 21-hidroxilase e também como pré-mutação (SINOTT et al., 1990). No presente trabalho os dois híbridos C4A/C4B (6,4 kb) e CYP21A1P/CYP21A2 (3,2 kb) foram encontrados em um mesmo alelo monomodular na paciente 30Xa1 de deficiência de 21-hidroxilase. A paciente apresentou homozigose deste alelo devido à consangüinidade de seus pais (Figura 13). A segregação deste alelo raro foi verificada em três gerações da família indicando que surgiu há várias gerações, porém foi identificada pela primeira vez nesta paciente. Ao diagnóstico a paciente apresentava ambigüidade genital com grau III segundo a classificação de Prader, e seu fenótipo para deficiência de 21-hidroxilase é perdedor de sal (PS). Assim, o alelo raro está relacionado com a forma mais grave de HCA devido à deficiência de 21-hidroxilase.

A análise por MLPA dos pacientes com alelos monomodulares corroborou e complementou a análise de *RFLP* com *Taq* I. Como as sondas do kit P050B não se limitam apenas às regiões 5'UTR e 3'UTR, mas estão também localizadas em regiões exônicas e intrônicas dos genes, com esta técnica foi possível, além da verificação do número de módulos estimar a região de recombinação dos genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2* e *C4A/C4B*. Para os genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2* foram observadas 3 regiões principais de recombinação: entre os éxons 1 e 3 (n = 3), entre os éxons 3 e 4 (n = 10),

entre os éxons 6 e 8 (n = 6) e genes que apresentaram a seqüência do pseudogene até o éxon 8 (n = 5) e n = 2 não determinados.

Nos casos dos pacientes homozigotos de alelos monomodulares, a formação do gene híbrido CYP21A1P/CYP21A2 foi semelhante para os dois casos, porém estes alelos diferiram no que diz respeito aos genes C4. A paciente 30Xa1 apresentou o híbrido detectado por RFLP, que no MLPA se mostrou portador de seqüências C4A até o éxon 19, sendo que neste experimento não foram detectadas seqüências de C4B (Figura 19A). O paciente 32Ya1, também filho de casal consangüíneo, apresentou fragmento de 7,0 kb correspondente ao gene C4A no Southern blot, porém no MLPA apresentou barras correspondentes ao C4A e ao C4B, sugerindo também um gene híbrido C4A/C4B. Porém, este caso não envolvia o terminal 5'UTR e sim a região entre o éxon 17 do gene C4A e o éxon 19 do gene C4B. A Figura 19A referente a este paciente apresentou nas barras correspondentes aos genes C4A e C4B alturas correspondentes a duas cópias destes fragmentos no genoma. Como estamos avaliando conformações alélicas monomodulares, ou seja, conformações sem a presença da unidade C4B, não deveria aparecer a barra referente a este gene em indivíduos homozigotos, assim como no caso da paciente 30Xa1, ou esta altura deveria ser reduzida pela metade para os indivíduos heterozigotos (Figura 21C).

No entanto, estes resultados confirmaram os dados recentemente descritos onde as quantidades de proteínas C4A e C4B foram baixas, respectivamente, nos pacientes 23Ya1 e 30Xa1 (DODDS, A.W. *et al.*, 1996). Considerando que *C4A* e *C4B* guardem 99% de homologia, as proteínas por eles codificadas possuem diferenças quanto à atividade hemolítica, afinidade covalente frente aos antígenos e a imuno-complexos e reatividades sorológicas. C4B tende a formar ligações covalentes de éster com substratos contendo grupos hidroxilas, enquanto C4A forma efetivamente ligações covalentes do tipo amidas com antígenos contendo grupamento amina (BLANCHONG, C.A., *et al.*, 2000, DONOHOUE, P.A., *et al.*, 1995).

Cópias do gene *C4A* que produzem uma proteína que se comporta eletroforeticamente como C4A, mas antigenicamente reage como C4B, foram descritas em associação com o haplótipo HLA-A3 (22). As diferenças que conferem estas afinidades

específicas de ligação estão contidas no éxon 26 (SORENSEN, K.M. *et al.*, 2008), portanto o alelo monomodular do paciente 32Ya1 pode ter o terminal 5' do gene *C4A* indicado pelo fragmento de 7,0 kb e o terminal 3' do gene *C4B* indicado pela presença do éxon 19 detectado pelas técnicas de MLPA e ELISA. De forma similar, os pacientes 56Xa1, 136Ya1 e 139Ya1 (Figura 19C) e também as 159Xa1, 203Xa1 e 209Xa1 (Figura 21C) podem ser portadores do gene híbrido de *C4A/C4B* devido a divergência de resultados obtidos por *Southern blot* e MLPA (Tabela 11).

Efeito semelhante foi observado para a paciente 23Xa1 (Figura 21D) que não apresentou barras no MLPA para o gene *C4B*, em divergência ao resultado do *Southern blot* onde estava presente o fragmento de 6,0 kb. Provavelmente, esta paciente é portadora também de um híbrido que confere características de C4A à proteína já que Guerra-Júnior *et al.*(2008) descreveram a paciente como tendo baixa resposta imune ao anti-soro. Embora nesse trabalho tenha sido demonstrado que pacientes com alelos monomodulares tenham baixa quantidade de proteínas C4A ou C4B os resultados não indicam correlação com doenças do sistema imunológico.

Os genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2* foram estudados e mapeados quanto à presença ou ausência de seqüências do pseudogene, buscando delimitar a região onde a recombinação tivera ocorrido, através de ASO-PCR e seqüenciamento automático. As regiões pertencentes ao pseudogene *CYP21A1P* e ao gene *CYP21A2* foram analisadas baseando-se nas mutações mais freqüentes provenientes do pseudogene e dos polimorfismos intrônicos e exônicos.

Combinando os resultados obtidos pelas técnicas de *Southern blot*, ASO-PCR, seqüenciamento e MLPA foram identificados 10 haplótipos diferentes com gene híbrido em alelos monomodulares (Tabela 14) que divergiram de acordo com a região de recombinação. Um grupo com 6 genes híbridos apresentaram a região de recombinação entre o éxon 7 e 8. Os 5 alelos que pertencem aos grupos de haplótipos A.II e A.II.1 são similares àqueles descritos primeiros e foram encontrados em outras populações (18, 22, 37, 38). O gene híbrido da paciente 30xa1 diferiu dos grupos A.II e A.II.1 no SNPs rs6462 e 6472, e também em um SNP novo na região 5`UTR demonstrando mais uma vez a singularidade deste alelo (Figura 32). Seis pacientes apresentaram a seqüência integral do

pseudogene *CYP21A1P* no alelo monomodular, inclusive a paciente 12Xa1 que apresentava a mutação p.Q318X, mas divergiu dos outros do grupo no SNP rs 6472 e na p.R356W (haplótipos A.I e A.I.1).

Um grupo de 12 alelos apresentaram região de recombinação entre o éxon 3 e 4, entretanto este grupo se subdividiu em 3 outros grupos. Haplótipo A.III difere do A.III.1 apenas no SNP rs6462 onde a variante C e T são mais freqüente no pseudogene e no gene, respectivamente. Entretanto o haplótipo A.III.2 diverge dos outros dois grupos por ser portador de duas mutações raras, p.P34L e p.H62L. Uma peculiaridade é que este gene híbrido foi observado somente na conformação alélica monomodular e em 4 pacientes não relacionados. A recombinação envolvendo CYP21A1P e CYP21A2 deu origem a um gene híbrido com seqüências do pseudogene até a região do éxon 3 e a partir do éxon 4, seqüências do gene ativo. No entanto, no éxon 1, supostamente com seqüências referentes ao pseudogene, a mutação p.P30L estava ausente, mas as mutações raras p.P34L e p.H62L foram identificadas. Como a alteração p.P30L pode estar ausente nos pseudogenes, inferese que o pseudogene que gerou este híbrido teria a seqüência normal para p.P30L. Uma vez que as seqüências que margeiam estas duas mutações nos alelos aqui descritos são derivadas do pseudogene, foi levantada a hipótese destas serem provenientes do pseudogene. Ficou demonstrado que a alteração p.H62L pode ser oriunda de CYP21A1P uma vez que sua presença foi identificada em 3,4% dos pseudogenes estudados. Entretanto a alteração p.P34L não foi observada em nenhum pseudogene, assim sua origem ainda não foi esclarecida. Pode-se sugerir que o pseudogene ancestral poderia conter a p.H62L e que, após a formação hibrida a alteração p.P34L tenha surgido. A p.P34L ainda não foi descrita e, a p.H62L foi recentemente descrita em associação com a p.P453S em pacientes com a forma não clássica da deficiência de 21- hidroxilase (BRAUN, L. et al., 1990, MENASSA, R. et al., 2008, PINTO, G. et al., 2003). A presença destas duas mutações caracteriza um novo alelo que pode ser freqüente em pacientes brasileiros que apresentem em seu genótipo alelos monomodulares, neste trabalho representaram 15% dos alelos monomodulares.

Finalmente, um grupo composto por três alelos, mostrou que além de ter 600 pb da região promotora 5' correspondendo ao *CYP21A1P*, incluiu a alteração p.P30L no éxon 1 e, também, seqüências até a metade do íntron 2, sendo que a partir do grupo de

6Gs no pseudogene e 7Gs no gene apresentou seqüências do *CYP21A2* (tabela 14, A.IV e A.IV.1). A subdivisão nestes casos ocorreu devido a divergências no íntron 2, sendo que a paciente 23Xa1 apresenta o íntron 2 inteiro com seqüências do *CYP21A2*, ressaltando a singularidade deste alelo. Estes alelos são considerados do tipo virilizante simples e não são muito freqüentes em outras populações (LEE, H.H., 2005, SOARDI, F.C. *et al.*, 2008).

Como houve uma ampla distribuição alélica nos haplótipos com configuração monomodular, não há evidências para um efeito fundador destes alelos em casos de deficiência de 21-hidroxilase.

3 - Alelos bimodulares e trimodulares com híbridos CYP21A1P/CYP21A2

Os alelos bimodulares, quando analisados por RFLP com a enzima Taq I, se caracterizam por apresentarem um gene C4A de 7,0 kb, um pseudogene CYP21A1P de 3,2 kb, um gene C4B de 5,4 ou 6,0 kb e um gene hibrido CYP21A1P/CYP21A2 de 3,2 kb. Estes alelos são conhecidos como portadores de conversão gênica em larga escala. Foram avaliados 26 alelos bimodulares. A triagem com a enzima de restrição Taq I dividiu em dois grupos: os alelos com o gene C4B de 5,4 kb (n= 9 alelos) e os alelos com o gene C4B de 6,0 kb (n= 14 alelos) que foram representados pelos haplótipos C e D respectivamente (Tabela 10). O haplótipo E também apresentou o gene C4B de 5,4 kb, mas o pseudogene estava ausente. Este haplótipo foi identificado em três indivíduos não relacionados (Tabela 10).

Na Tabela 12 onde são comparados os resultados obtidos por *Southern blot* e MLPA, observa-se certa discrepância no gene *C4A* assim como foi notada nos alelos monomodulares. Os indivíduos Ubl7Xa1 e 59Ya3 assim como os indivíduos que integram o bloco ressaltado em cinza apresentaram esta divergência. Estes genes C4 podem ser híbridos (*C4A/C4B* ou *C4B/C4A*) com região de recombinação envolvendo apenas os éxons 19 e ou 17 não envolvendo o terminal 5'; desta forma apenas as sondas de MLPA detectariam estes híbridos justificando a divergência de resultados.

As regiões de recombinação dos genes híbridos contidos em alelos bimodulares foram: entre os éxons 1 e 3 (n = 8), entre os éxons 3 e 4 (n = 8), entre os éxons 6 e 8 (n = 4)

e genes que apresentaram a seqüência do pseudogene até o éxons 8 (n = 2) e não determinados (n = 4). Para alelos trimodulares foram: entre os éxons 1 e 3 (n = 1), entre os éxons 3 e 4 (n = 3), entre os éxons 6 e 8 (n = 1).

Nos três indivíduos não relacionados que integram o haplótipo E não foi observada a presença de pseudogene em seu alelo bimodular ($C4A^{[7,0 \text{ kb}]} + CYP21A2^{[3,7 \text{ kb}]}$ + $C4B^{[5,4 \text{ kb}]} + CYP21A1P/CYP21A2^{[3,2 \text{ kb}]}$). Ezquieta *et al.* (2006) descreveram um alelo bimodular semelhante, sem pseudogene e com uma cópia do *CYP21A2* portador da mutação p.Q318X. Assim como Ezquieta *et al.* (2006), também observamos a mutação p.Q318X neste gene alelo. A diferença entre o alelo descrito e o aqui identificado é a cópia híbrida com ponto de recombinação entre os éxons 3 e 4, fazendo com que este haplótipo se separasse dos demais com ponto de recombinação na mesma região. Outra caractrística peculiar deste haplótipo é que os *CYP21A1P/CYP21A2* não apresentam a p.P30L no éxon 1, nem as outras mutações raras, como nos casos dos monomodulares negativos para p.P30L.

O haplótipo D.II.1 da Tabela 15 do item resultado apresentou 2 alelos. Neste haplótipo a região de recombinação também se localiza entre o éxon 3 e éxon 4, mas neste híbrido há a presença da alteração p.P30L, ausência p.P34L, a presença da alteração rara p.H62L e a variante g.395T (rs6462) no íntron 2. Diferente então dos híbridos em alelos monomodulares que apresentam as mutações p.P34L e p.H62L sem a p.P30L e que na posição g.395 (rs6462) apresentam a variante C; estes genes híbridos, identificados nos bimodulares, apresentam a p.P30L, a p.H62L e a variante g.395T (rs6462). Sendo assim, estes híbridos podem ter se derivado de dois pseudogenes ancestrais diferentes, ambos apresentando a alteração rara p.H62L, mas em eventos de recombinação diferentes: o primeiro envolvendo perda de material genético e, o segundo não apresentando ganho e nem perda. O haplótipo D.II.1 de genes híbridos foi observado apenas nos alelos bimodulares.

Os demais haplótipos apresentaram divergência no polimorfismo no íntron 2 g.395T>C (rs6462), que é considerado *hot spot* para alterações polimórficas, nos polimorfismos g.683G>A (rs6474) presente no éxon 3, g.1586C>G (rs6477) e na mutação p.V281L ambos no éxon 7.

Para estabelecer os haplótipos dos alelos bi- e trimodulares foram avaliados os pseudogenes (Tabela 16) quanto à presença das mutações e polimorfismos. Quando comparamos os diversos *CYP21A1P*, as regiões que mais divergiram foram: o polimorfismo g.395T>C (rs 6462) e, no éxon 7, o polimorfismo g.1645G>C (rs 6472). Estes pontos de divergência também foram observados nos genes híbridos que apresentaram o CL6 mutante. Como nos alelos trimodulares há presença de dois pseudogenes é mais difícil estabelecer exatamente as variações, mesmo com analise de segregação.

4 - Comparação dos genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2* dos alelos mono, bi e trimodulares

O número de alelos com uma cópia de pseudogene completa no lugar do gene foi significativamente maior nos alelos monomodulares (n = 7) que nos bimodulares (n = 2). Por outro lado, com exceção dos dois háplótipos de alelos únicos (Tabelas 14, 15, haplótipos A.I.1 e C.I.1.b), as composições nucleotídicas nos dois casos parecem similares, embora muitos alelos não tenham sido caracterizados completamente.

No grupo de genes com éxon 6 mutante e recombinação entre 6-8, os híbridos dos alelos mono (n = 5), bi (n = 3) e trimodulares (n = 1) não se igualam e divergem principalmente nos polimorfismos g.395 no íntron 2 e g.1645 no éxon 7 (Tabelas 14, 15, haplótipos A.II e D.I.c). Mais uma vez, dois haplótipos isolados, um de cada grupo, não se alinham com os demais (Tabelas 14, 15, haplótipos A.II.1 e F.I.e).

No grupo de genes com éxon 6 normal, considerando o ponto de recombinação entre os éxons 3 e 4, há duas vezes mais haplótipos no grupo dos bi e trimodulares (n = 22) do que nos monomodulares (n = 10), no entanto há apenas dois haplótipos que compartilham híbridos *CYP21A1P/CYP21A2* com estruturas nucleotídicas semelhantes, o monomodular A.III.1 (Tabela 14) e o bimodular D.II (Tabela 15). Todas as outras formações foram características ou de monomodular ou de bimodular. Novamente, o ponto de divergência foi principalmente o g.395 onde nos alelos monomodulares predominou a variante C e nos bi a variante T. Os únicos que apresentaram a variante C nos bimodulares

foram os que portavam também a mutação rara p.H62L no haplótipo D.II.1 (Tabela 15). Outro ponto de divergência foi a p.P30L. O haplótipo monomodular AIII.2 não apresenta esta mutação, mas sim as p.P34L e p.H62L (Tabela 14), por outro lado o haplótipo bimodular que é negativo para pP30L não apresenta nenhuma das outras duas mutações (Tabela 15, haplótipo E). Esse haplótipo é característico do alelo que não possui pseudogene na sua composição, mas sim uma cópia do *CYP21A2*, inativa por carregar a mutação p.Q318X, e o gene híbrido. Da mesma forma os alelos trimodulares (Tabela 15, F.II.1) não apresentam a p.P30L, mas diferem dos demais por apresentarem a p.V281L.

Finalmente, no grupo com ponto de recombinação entre os éxons 1 e 3, novamente o SNP g.395 determinou a separação entre mono (n = 3) e bimodular (n = 6) (Tabelas 14 e 15, A.IV e C.IV).

Desta forma podemos sugerir que cada conformação alélica originou-se de eventos de recombinação diferentes aumentando a variabilidade destes alelos. Além disso, o grande número de haplótipos diferentes não indica a possibilidade de efeito fundador, nem para deleções, nem para conversões em larga escala, na propagação dos alelos afetados causadores de deficiência de 21-hidroxilase.

Na Tabela 17 a relação fenótipo com genótipo não foi discordante na maioria dos casos, apenas o indivíduo Rio3Xa1 apresentou divergência em seu fenótipo que foi informado como PS enquanto seu genótipo indica NPS. Deve-se ressaltar aqui o fato de identificarmos alelos apenas com a região 5'UTR correspondendo ao pseudogene que devem estar ligados à forma NC (ARAUJO, R.S. et al., 2007), como no caso CI-13 (Tabela 15, haplótipo C.IV.3), pois esta paciente com a forma clínica não clássica deve apresentar heterozigose composta com p.Q318X+p.R356W que são mutações reconhecidamente provocadoras da forma PS de deficiência de 21-hidroxilase. Já o haplótipo C.IV.a que apresenta também a p.P30L além de toda a região 5'UTR do pseudogene seria responsável pela forma NPS, como se observa nos pacientes homozigotos deste alelo (Tabela 17). O efeito virilizante simples deste haplótipo deve ser resultado do sinergismo das alterações na região promotora com o efeito na atividade enzimática provocado pela mutação p.P30L que é da ordem de não-clássica (ARAUJO, R.S. et al., 2005, BOBBA, A. et al., 2000, KYLLO, J.H., COLLINS. M.M. DONOHOUE, 1995). e P.A.,

CONCLUSÕES

- Em relação ao número de unidades RCCX, foram identificados 26 alelos mono, 26 alelos bi e 5 trimodulares portadores de genes híbridos responsáveis pela deficiência de 21-hidroxilase em 56 pacientes.
- Verificou-se um alto grau de variabilidade tanto nos alelos mono- como nos bi- e trimodulares dado pela recombinação em pontos diferentes dentro dos genes C4A e C4B e de CYP21A1P e CYP21A2;
- Foram identificados 10 haplótipos mono, 15 haplótipos bi e 5 haplótipos trimodulares;
- A avaliação molecular quanto às mutações e SNPs dos híbridos *CYP21A1P/CYP21A2* e dos *CYP21A1P* identificou estruturas nucleotídicas características para cada configuração mono, bi ou trimodular formando haplótipos específicos;
- Foi identificado um alelo monomodular novo portador da variante *C4A*^[6,4 kb] que se mostrou único inclusive quanto à formação híbrida *CYP21A21P/CYP21A2*.
- Um haplótipo se distinguiu em 15% dos monomodulares por apresentar as mutações p.P34L e p.H62L no exon 1 ao invés da esperada p.P30L; por outro lado, a p.H62L foi identificada também em dois alelos bimodulares com configuração *CYP21A1P/CYP21A2* diferente onde há a presença da p.P30L e divergência no SNP g.395;
- a p.P34L é uma mutação nova não derivada do pseudogene e a p.H62L pode ser derivada do pseudogene uma vez que foi identificada em cerca de 3,4% de *CYP21A1P*s analisados;

- SNPs no terminal 5'UTR, no íntron 2 e no éxon 7 responderam pela diferenciação principal entre os híbridos tanto nos haplótipos de mesmo grupo como na comparação entre os de grupos diferentes;
- Não se observou um haplótipo com freqüência expressiva;
- Em conseqüência da variabilidade encontrada não foi possível estimar efeito fundador para nenhum dos haplótipos;
- O uso de diferentes métodos de análise identificou haplótipos novos indicando que a combinação de técnicas de biologia molecular é bastante indicada para a genotipagem em casos com deficiência de 21- hidroxilase.
- Os genes híbridos podem estar relacionados às formas clínicas perdedora de sal, não perdedora de sal e não clássica dependendo da região onde ocorreu a recombinação para sua formação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOR, M., *et al.* Mutation in the CYP21B gene (Ile-172----Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.85, n.5, p.1600-1604, Mar 1988.

ARAUJO, R. S., *et al.* Substitutions in the CYP21A2 promoter explain the simple-virilizing form of 21-hydroxylase deficiency in patients harbouring a P30L mutation. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v.62, n.2, p.132-136, Feb 2005.

ARAUJO, R. S., *et al.* Microconversion between CYP21A2 and CYP21A1P promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, v.92, n.10, p.4028-4034, Oct 2007.

BACHEGA, T. A., *et al.* Low frequency of CYP2B deletions in Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylas deficiency. **Hum Hered**, v.49, n.1, p.9-14, Jan 1999.

BACHEGA, T. A., *et al.* Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab, v.83, n.12, p.4416-4419, Dec 1998.

BARBARO, M., Mechanisms in disorders of sex development. [tese de doutorado] Estocolmo: Centro de Medicina Molecular, Instituto Hospital Karolinska, 2008.

BEALE, D. e LEHMANN, H. Abnormal haemoglobins and the genetic code. Nature, v.207, n.994, p.259-261, Jul 17 1965.

BLANCHONG, C. A., *et al.* Deficiencies of human complement component C4A and C4B and heterozygosity in length variants of RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules in caucasians. The load of RCCX genetic diversity on major histocompatibility complex-associated disease. **J Exp Med**, v.191, n.12, p.2183-2196, Jun 19 2000.

BOBBA, A., *et al.* Characterization of the CYP21 gene 5' flanking region in patients affected by 21-OH deficiency. **Hum Mutat**, v.15, n.5, p.481, May 2000.

BONTROP, R. E., *et al.* Polymorphism of C4 and CYP21 genes in various primate species. **Tissue Antigens**, v.37, n.4, p.145-151, Apr 1991.

BORMANN, M., *et al.* Clinical heterogeneity of 21-hydroxylase deficiency of sibs with identical 21-hydroxylase genes. Acta Endocrinol (Copenh), v.126, n.1, p.7-9, Jan 1992.

BRAUN, L., *et al.* Null alleles of human complement C4. Evidence for pseudogenes at the C4A locus and for gene conversion at the C4B locus. **J Exp Med**, v.171, n.1, p.129-140, Jan 1 1990.

BRISTOW, J., *et al.* Abundant adrenal-specific transcription of the human P450c21A "pseudogene". **J Biol Chem,** v.268, n.17, p.12919-12924, Jun 15 1993a. BRISTOW, J., *et al.* Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. **J Cell Biol**, v.122, n.1, p.265-278, Jul 1993b.

BURCH, G. H., *et al.* Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome. **Nat Genet,** v.17, n.1, p.104-108, Sep 1997.

CARROLL, M. C., *et al.* A molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B. **Nature**, v.307, n.5948, p.237-241, Jan 19-25 1984.

CARROLL, M. C., CAMPBELL, R. D. e PORTER, R. R. Mapping of steroid 21hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.82, n.2, p.521-525, Jan 1985.

CHU, X., *et al.* Identification of the recombination site within the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) of the HLA-B47,DR7 haplotype. **Exp Clin Immunogenet,** v.9, n.2, p.80-85, 1992.

COFFALYSER MLPA DAT. Disponível em: http://www.mrc-holland.com.

COLLIER, S., *et al.* Pulsed field gel electrophoresis identifies a high degree of variability in the number of tandem 21-hydroxylase and complement C4 gene repeats in 21-hydroxylase deficiency haplotypes. **Embo J**, v.8, n.5, p.1393-1402, May 1989.

COLLIER, S., *et al.* A de novo pathological point mutation at the 21-hydroxylase locus: implications for gene conversion in the human genome. **Nat Genet**, v.3, n.3, p.260-265, Mar 1993.

DARDIS, A., *et al.* Mutations of the steroid 21-hydroxylase gene in an Argentinian population of 36 patients with classical congenital adrenal hyperplasia. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v.10, n.1, p.55-61, Jan-Feb 1997.

DE-ARAUJO, M., *et al.* Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. **Braz J Med Biol Res**, v.29, n.1, p.1-13, Jan 1996.

DODDS, A. W., *et al.* The reaction mechanism of the internal thioester in the human complement component C4. **Nature**, v.379, n.6561, p.177-179, Jan 11 1996.

DONDI, E., *et al.* Molecular analysis of CYP21 gene mutations carried on HLA-B14 positive haplotypes. **Eur J Immunogenet,** v.21, n.5, p.341-350, Oct 1994.

DONOHOUE, P. A., *et al.* The HLA-A3, Cw6,B47,DR7 extended haplotypes in salt losing 21-hydroxylase deficiency and in the Old Order Amish: identical class I antigens and class II alleles with at least two crossover sites in the class III region. **Tissue Antigens**, v.46, n.3 (Pt 1), p.163-172, Sep 1995.

DONOHOUE, P. A., *et al.* Congenital adrenal hyperplasia: molecular mechanisms resulting in 21-hydroxylase deficiency. Acta Endocrinol Suppl (Copenh), v.279, p.315-320, 1986.

DUNHAM, I., *et al.* Direct observation of the gene organization of the complement C4 and 21-hydroxylase loci by pulsed field gel electrophoresis. **J Exp Med**, v.169, n.5, p.1803-1818, May 1 1989.

DUPONT, B., *et al.* Close genetic linkage between HLA and congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). Lancet, v.2, n.8052-8053, p.1309-1312, Dec 24-31 1977.

EZQUIETA, B., *et al.* Gene conversion (655G splicing mutation) and the founder effect (Gln318Stop) contribute to the most frequent severe point mutations in congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in the Spanish population. **Clin Genet,** v.62, n.2, p.181-188, Aug 2002.

FARDELLA, C. E., *et al.* Salt-wasting congenital adrenal hyperplasia: detection of mutations in CYP21B gene in a Chilean population. J Clin Endocrinol Metab, v.83, n.9, p.3357-3360, Sep 1998.

FIFE, D. e RAPPAPORT, E. B. Prevalence of salt-losing among congenital adrenal hyperplasia patients. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v.19, n.2, p.259-264, Aug 1983.

FLEISCHNICK, E., *et al.* Extended MHC haplotypes in 21-hydroxylase-deficiency congenital adrenal hyperplasia: shared genotypes in unrelated patients. **Lancet**, v.1, n.8317, p.152-156, Jan 22 1983.

FRIAES, A., *et al.* CYP21A2 mutations in Portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia: identification of two novel mutations and characterization of four different partial gene conversions. **Mol Genet Metab**, v.88, n.1, p.58-65, May 2006.

GITELMAN, S. E., BRISTOW, J. e MILLER, W. L. Mechanism and consequences of the duplication of the human C4/P450c21/gene X locus. **Mol Cell Biol**, v.12, n.7, p.3313-3314, Jul 1992.

GOJOBORI, T., LI, W. H. e GRAUR, D. Patterns of nucleotide substitution in pseudogenes and functional genes. **J Mol Evol**, v.18, n.5, p.360-369, 1982.

GUERRA-JUNIOR, G., *et al.* Complement 4 phenotypes and genotypes in Brazilian patients with classical 21-hydroxylase deficiency. **Clin Exp Immunol**, Nov 27 2008.

HAGLUND-STENGLER, B., *et al.* Haplotypes of the steroid 21-hydroxylase gene region encoding mild steroid 21-hydroxylase deficiency. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.88, n.19, p.8352-8356, Oct 1 1991.

HEGELE, R. A., HUFF, M. W. e YOUNG, T. K. Common genomic variation in LMNA modulates indexes of obesity in Inuit. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n.6, p.2747-2751, Jun 2001.

HELMBERG, A. Twin genes and endocrine disease: CYP21 and CYP11B genes. Acta Endocrinol (Copenh), v.129, n.2, p.97-108, Aug 1993.

HELMBERG, A., *et al.* 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**, v.11, n.5, p.359-368, Jun 1992.

HIGASHI, Y., *et al.* Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21hydroxylase [P-450(C21)] deficiency in humans: possible gene conversion products. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.85, n.20, p.7486-7490, Oct 1988.

HIGASHI, Y., *et al.* Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. **Proc Natl** Acad Sci U S A, v.83, n.9, p.2841-2845, May 1986.

HOMMA, K., *et al*.Elevated urine pregnanetriolone definitively establishes the diagnosis of classical 21-hydroxylase deficiency in term and preterm neonates. **J. Clin. Endocr. Metab**. v.89, p.6087-6091, 2004.

HUGHES, A. L. Concerted evolution of éxons and introns in the MHC-linked tenascin-X gene of mammals. **Mol Biol Evol,** v.16, n.11, p.1558-1567, Nov 1999.

JAATINEN, T., *et al.* An unequal crossover event in RCCX modules of the human MHC resulting in the formation of a TNXB/TNXA hybrid and deletion of the CYP21A. **Hum Immunol**, v.63, n.8, p.683-689, Aug 2002.

JIDDOU, R. R., *et al.* Single-nucleotide polymorphisms in intron 2 of CYP21P: evidence for a higher rate of mutation at CpG dinucleotides in the functional steroid 21-hydroxylase gene and application to segregation analysis in congenital adrenal hyperplasia. **Clin Chem**, v.45, n.5, p.625-629, May 1999.

KAWAGUCHI, H., *et al.* Organization of the chimpanzee C4-CYP21 region: implications for the evolution of human genes. **Eur J Immunol**, v.20, n.4, p.739-745, Apr 1990.

KAWAGUCHI, H., O'HUIGIN, C. e KLEIN, J. Evolutionary origin of mutations in the primate cytochrome P450c21 gene. **Am J Hum Genet**, v.50, n.4, p.766-780, Apr 1992.

KEEGAN, C. E. e KILLEEN, A. A. An overview of molecular diagnosis of steroid 21hydroxylase deficiency. **J Mol Diagn**, v.3, n.2, p.49-54, May 2001.

KILLEEN, A. A., JIDDOU, R. R. e SANE, K. S. Characterization of frequent polymorphisms in intron 2 of CYP21: application to analysis of segregation of CYP21 alleles. **Clin Chem**, v.44, n.12, p.2410-2415, Dec 1998.

KILLEEN, A. A., SANE, K. S. e ORR, H. T. Molecular and endocrine characterization of a mutation involving a recombination between the steroid 21-hydroxylase functional gene and pseudogene. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.38, n.6, p.677-686, Jun 1991.

KLOUDA, P. T., HARRIS, R. e PRICE, D. A. Linkage and association between HLA and 21-hydroxylase deficiency. **J Med Genet**, v.17, n.5, p.337-341, Oct 1980.

KOPPENS, P. F., HOOGENBOEZEM, T. e DEGENHART, H. J. CYP21 and CYP21P variability in steroid 21-hydroxylase deficiency patients and in the general population in the Netherlands. **Eur J Hum Genet**, v.8, n.11, p.827-836, Nov 2000.

KOPPENS, P. F., HOOGENBOEZEM, T. e DEGENHART, H. J. Duplication of the CYP21A2 gene complicates mutation analysis of steroid 21-hydroxylase deficiency: characteristics of three unusual haplotypes. **Hum Genet,** v.111, n.4-5, p.405-410, Oct 2002.

KOPPENS, P. F., *et al.* Family studies of the steroid 21-hydroxylase and complement C4 genes define 11 haplotypes in classical congenital adrenal hyperplasia in The Netherlands. **Eur J Pediatr**, v.151, n.12, p.885-892, Dec 1992.

KOPPENS, P. F., *et al.* Mapping of a de novo unequal crossover causing a deletion of the steroid 21-hydroxylase (CYP21A2) gene and a non-functional hybrid tenascin-X (TNXB) gene. **J Med Genet**, v.40, n.5, p.e53, May 2003.

KYLLO, J. H., COLLINS, M. M. e DONOHOUE, P. A. Constitutive human steroid 21hydroxylase promoter gene and pseudogene activity in steroidogenic and nonsteroidogenic cells with the luciferase gene as a reporter. **Endocr Res**, v.21, n.4, p.777-791, Nov 1995.

L'ALLEMAND, D., *et al.* How a patient homozygous for a 30-kb deletion of the C4-CYP 21 genomic region can have a nonclassic form of 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, v.85, n.12, p.4562-4567, Dec 2000.

LEE, H. H. Chimeric CYP21P/CYP21 and TNXA/TNXB genes in the RCCX module. **Mol Genet Metab**, v.84, n.1, p.4-8, Jan 2005.

LEE, H. H. The chimeric CYP21P/CYP21 gene and 21-hydroxylase deficiency. J Hum Genet, v.49, n.2, p.65-72, 2004.

LEE, H. H., *et al.* Deletion of the C4-CYP21 repeat module leading to the formation of a chimeric CYP21P/CYP21 gene in a 9.3-kb fragment as a cause of steroid 21-hydroxylase deficiency. **Clin Chem,** v.49, n.2, p.319-322, Feb 2003.

LEE, H. H., *et al.* Structural analysis of the chimeric CYP21P/CYP21 gene in steroid 21hydroxylase deficiency. **J Hum Genet**, v.47, n.10, p.517-522, 2002.

LEVINE, L. S., *et al.* Genetic mapping of the 21-hydroxylase-deficiency gene within the HLA linkage group. **N Engl J Med**, v.299, n.17, p.911-915, Oct 26 1978.

LEVO, A. e PARTANEN, J. Mutation-haplotype analysis of steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency in Finland. Implications for the population history of defective alleles. **Hum Genet**, v.99, n.4, p.488-497, Apr 1997.

LI, W. H., WU, C. I. e LUO, C. C. Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. J Mol Evol, v.21, n.1, p.58-71, 1984.

LOBATO, M. N., ALEDO, R. e MESEGUER, A. High variability of CYP21 gene rearrangements in Spanish patients with classic form of congenital adrenal hyperplasia. **Hum Hered**, v.48, n.4, p.216-225, Jul-Aug 1998.

MENASSA, R., *et al.* p.H62L, a rare mutation of the CYP21 gene identified in two forms of 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, v.93, n.5, p.1901-1908, May 2008.

MIGEON, C. J. e DONOHOUE, P. A. Congenital adrenal hyperplasia caused by 21hydroxylase deficiency. Its molecular basis and its remaining therapeutic problems. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v.20, n.2, p.277-296, Jun 1991.

MILLER, W. L. Androgen synthesis in adrenarche. **Rev Endocr Metab Disord**, Sep 27 2008.

MILLER, W. L. Congenital adrenal hyperplasias. Endocrinol Metab Clin North Am, v.20, n.4, p.721-749, Dec 1991.

MLPA - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, protocolos e kits. Disponível em: http://www.mrc-holland.com.

MOREL, Y., *et al.* Transcript encoded on the opposite strand of the human steroid 21hydroxylase/complement component C4 gene locus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.86, n.17, p.6582-6586, Sep 1989. MORNET, E., *et al.* 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**, v.74, n.4, p.402-408, Dec 1986.

NEW, M. I. Inborn errors of adrenal steroidogenesis. **Mol Cell Endocrinol,** v.211, n.1-2, p.75-83, Dec 15 2003.

NEW, M. I. Steroid 21-hydroxylase deficiency (congenital adrenal hyperplasia). Am J Med, v.98, n.1A, p.2S-8S, Jan 16 1995.

NEW, M. I. e LEVINE, L. S. Congenital adrenal hyperplasia. **Monogr Endocrinol,** v.26, p.1-88, 1984.

O'NEILL, G. J., *et al.* Complement C4 allotypes in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: further evidence for different allelic variants at the 21-hydroxylase locus. **Clin Immunol Immunopathol**, v.23, n.2, p.312-322, May 1982.

PALSDOTTIR, A., *et al.* Heterogeneity of human C4 gene size. A large intron (6.5 kb) is present in all C4A genes and some C4B genes. **Immunogenetics**, v.25, n.5, p.299-304, 1987.

POLLACK, M. S.; *et al.* HLA linkage and B14,DR1,BfS haplotype association with the genes for late onset and cryptic 21-hydroxylase deficiency. Am. J. Hum. Genet. v.33, p.540-550, 1981.

PARTANEN, J., *et al.* Major-histocompatibility-complex gene markers and restriction-fragment analysis of steroid 21-hydroxylase (CYP21) and complement C4 genes in classical congenital adrenal hyperplasia patients in a single population. **Am J Hum Genet**, v.44, n.5, p.660-670, May 1989.

PAULINO, L. C., *et al.* Mutation distribution and CYP21/C4 locus variability in Brazilian families with the classical form of the 21-hydroxylase deficiency. Acta Paediatr, v.88, n.3, p.275-283, Mar 1999.

PINTO, G., *et al.* Follow-up of 68 children with congenital adrenal hyperplasia due to 21hydroxylase deficiency: relevance of genotype for management. **J Clin Endocrinol Metab**, v.88, n.6, p.2624-2633, Jun 2003.

POLLACK, M. S., *et al.* Possible genetic linkage disequilibrium between HLA and the 21hydroxylase deficiency gene (congenital adrenal hyperplasia). **Transplant Proc,** v.11, n.2, p.1315-1316, Jun 1979.

RAMAZANI, A., *et al.* The frequency of eight common point mutations in CYP21 gene in Iranian patients with congenital adrenal hyperplasia. **Iran Biomed J,** v.12, n.1, p.49-53, Jan 2008.

RAUM, D., *et al.* Human C4 haplotypes with duplicated C4A or C4B. **Am J Hum Genet**, v.36, n.1, p.72-79, Jan 1984.

RODRIGUES, N. R., *et al.* Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. **EMBO J**, v.6, n.6, p.1653-1661, Jun 1987.

RUMSBY, G., *et al.* Heterogeneity in the gene locus for steroid 21-hydroxylase deficiency. **J Med Genet**, v.25, n.9, p.596-599, Sep 1988.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual In: Cold Spring Harbor Laboratory Press, ed. Cold Spring Harbor, NY, 1989, 2nd edition.

SHEN, L., *et al.* Structure and genetics of the partially duplicated gene RP located immediately upstream of the complement C4A and the C4B genes in the HLA class III region. Molecular cloning, éxon-intron structure, composite retroposon, and breakpoint of gene duplication. **J Biol Chem**, v.269, n.11, p.8466-8476, Mar 18 1994.

SINNOTT, P., *et al.* Genesis by meiotic unequal crossover of a de novo deletion that contributes to steroid 21-hydroxylase deficiency. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87, n.6, p.2107-2111, Mar 1990.

SOARDI, F. C., *et al.* Inhibition of CYP21A2 enzyme activity caused by novel missense mutations identified in Brazilian and Scandinavian patients. J Clin Endocrinol Metab, v.93, n.6, p.2416-2420, Jun 2008.

SORENSEN, K. M., *et al.* Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Technique for Copy Number Analysis on Small Amounts of DNA Material. **Anal Chem,** Nov 8 2008. SPEISER, P. W., *et al.* High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. **Am J Hum Genet,** v.37, n.4, p.650-667, Jul 1985.

SPEISER, P. W., *et al.* Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **J Clin Invest**, v.90, n.2, p.584-595, Aug 1992.

SPEISER, P. W., NEW, M. I. e WHITE, P. C. Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14,DR1. **N Engl J Med**, v.319, n.1, p.19-23, Jul 7 1988.

STRACHAN, T. Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia. **Trends Endocrinol Metab**, v.1, n.2, p.68-72, Nov-Dec 1989.

STRACHAN, T. Molecular pathology of congenital adrenal hyperplasia. **Clin Endocrinol** (**Oxf**), v.32, n.3, p.373-393, Mar 1990.

STRACHAN, T. e WHITE, P. C. Molecular pathology of steroid 21-hydroxylase deficiency. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.40, n.4-6, p.537-543, 1991.

SZILAGYI, A., *et al.* Rapid quantification of human complement component C4A and C4B genes by capillary gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v.27, n.8, p.1437-1443, Apr 2006.

TAJIMA, T., FUJIEDA, K. e FUJII-KURIYAMA, Y. de novo mutation causes steroid 21hydroxylase deficiency in one family of HLA-identical affected and unaffected siblings. **J Clin Endocrinol Metab**, v.77, n.1, p.86-89, Jul 1993.

TAYEBI, N., *et al.* Reciprocal and nonreciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: implications for complexity in Gaucher disease. **Am J Hum Genet,** v.72, n.3, p.519-534, Mar 2003.

TEE, M. K., *et al.* Sequences promoting the transcription of the human XA gene overlapping P450c21A correctly predict the presence of a novel, adrenal-specific, truncated form of tenascin-X. **Genomics,** v.28, n.2, p.171-178, Jul 20 1995.

TORRES, N., *et al.* Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the CYP21A1P to the CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. **Braz J Med Biol Res,** v.36, n.10, p.1311-1318, Oct 2003.

WHITE, P. C., DUPONT, B. e NEW, M. I. Molecular cloning of steroid 21-hydroxylase. **Endocr Res**, v.10, n.3-4, p.335-345, 1984.

WHITE, P. C., *et al.* Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.82, n.4, p.1089-1093, Feb 1985.

WHITE, P. C., NEW, M. I. e DUPONT, B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.83, n.14, p.5111-5115, Jul 1986.

WHITE, P. C. e SPEISER, P. W. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **Endocr Rev**, v.21, n.3, p.245-291, Jun 2000.

WHITE, P. C., *et al.* Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.85, n.12, p.4436-4440, Jun 1988.

WIJESURIYA, S. D., *et al.* Transcriptional regulatory elements of the human gene for cytochrome P450c21 (steroid 21-hydroxylase) lie within intron 35 of the linked C4B gene. **J Biol Chem,** v.274, n.53, p.38097-38106, Dec 31 1999.

YANG, Y., *et al.* Diversity in intrinsic strengths of the human complement system: serum C4 protein concentrations correlate with C4 gene size and polygenic variations, hemolytic activities, and body mass index. **J Immunol**, v.171, n.5, p.2734-2745, Sep 1 2003.

YANG, Z., *et al.* Modular variations of the human major histocompatibility complex class III genes for serine/threonine kinase RP, complement component C4, steroid 21-hydroxylase CYP21, and tenascin TNX (the RCCX module). A mechanism for gene deletions and disease associations. **J Biol Chem**, v.274, n.17, p.12147-12156, Apr 23 1999.

YOSHINO, M., *et al.* Recombination in the class III region of the mouse major histocompatibility complex. **Immunogenetics**, v.40, n.4, p.280-286, 1994.

YU, C. Y. The complete éxon-intron structure of a human complement component C4A gene. DNA sequences, polymorphism, and linkage to the 21-hydroxylase gene. **J Immunol**, v.146, n.3, p.1057-1066, Feb 1 1991.

ZUCKERKANDL, E., DERANCOURT, J. e VOGEL, H. Mutational trends and random processes in the evolution of informational macromolecules. **J Mol Biol**, v.59, n.3, p.473-490, Aug 14 1971.

ANEXO 1



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 13/10/08. (Grupo III) 2ª VIA

PARECER CEP: N° 870/2007 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto) **CAAE:** 0626.0.146.000-07

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: **"ANÁLISE MOLECULAR DO LOCO C4/CYP21: IMPACTO DA** VARIABILIDADE ALÉLICA PROVOCADA POR RECOMBINAÇÕES, NOS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES". PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fernanda Borchers Coeli INSTITUIÇÃO: Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética/IB/Unicamp APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/11/2007 APRESENTAR RELATÓRIO EM: 27/11/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Estudar a variabilidade genética dos haplótipos portadores de unidades monomodulares, bimodulares com conversão e trimodulares quanto aos pares de genes C4A e B e, CYP21A1P e CYP21A2; estudar os mecanismos de rearranjos no módulo RCCX investigando a variabilidade genética dos CYP21A1P e dos híbridos CYP21A1P/CYP21A2 através da determinação do ponto de recombinação e de SNPs intra-gênicos.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um projeto de doutorado. Os alelos portadores de genes híbridos serão o foco do trabalho, uma vez identificados, serão feitas PCR para o rastreamento dos sete polimorfismos e das oito mutações mais frequentes provenientes de CYP21A1P. Pretende-se a estruturação de haplótipos para alelos portadores de gene hibrido em pacientes com HCA, caracterizando ou não um efeito fundador.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto encontra-se adequado à Resolução CNS/MS 196/96 e complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada. O conteúdo e as

FONE (019) 3521-8936 FAX (019) 3521-7187 cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

S www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de novembro de 2007.

Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 Caixa Postal 6111 13084-971 Campinas – SP

ANEXO 2

SPECIAL FEATURE

Clinical Case Seminar

XX Maleness and XX True Hermaphroditism in SRY-Negative Monozygotic Twins: Additional Evidence for a Common Origin

Andréa Trevas Maciel-Guerra, Mariolda Palandi de Mello, Fernanda Boechers Coeli, Marcelo Lima Ribeiro, Márcio Lopes Miranda, Antonia Paula Marques-de-Faria, Maria Tereza Matias Baptista, Suzana Guimarães Moraes, and Gil Guerra-Júnior

Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo, Faculdade de Cláncias Medicas, UNICAMP, 13083-970 Carroinas, Sao Paulo, Brasil

Context: Differentiation of testicular tissue in 46,XX individuals is seen either in XX males, the majority of them with SRY gene, or in individuals, usually SRY(-), with ovotesticular disorder of sex development (OT-DSD). Although they are sporadic cases, there are some reports on familial recurrence, including coexistence of XX maleness and OT-DSD in the same family.

Objective: We report on a case of SRY(-) 46,XX monozygotic twins with genital ambiguity.

Methods: Hormonal evaluation included testosterone, FSH, and LH measurements. SRY gene was investigated by PCR and two-step PCR in peripheral leukocytes and gonadal tissues, respectively. Direct DNA sequencing of the DAX-1 coding sequence was performed. Real-time PCR for SOX9 region on chromosome 17 was obtained.

Results: Both twins had a 46,XX karyotype. Twin A had a 1-cm phallus with chordee, penoscrotal hypospadias, and palpable gonads. Serum levels of FSH (2.34 mIU/mI), LH (8.8 mIU/mI), and testosterone (1.6 ng/ml) were normal, and biopsies revealed bilateral testes. Twin B had a 0.5-cm phallus, perineal hypospadias, no palpable gonad on the right, and a left inguinal hernia. Hormonal evaluation revealed high FSH (8.2 mIU/ml) and LH (15 mIU/ml) and low testosterone (0.12 ng/m[). Upon herniotomy, a right testis (crossed ectopia) and a small left ovotestis were found. SRY genewas absent in both peripheral leukocytes and gonadal tissue samples. Neither DAX-1 mutations nor SOX9 duplication was identified.

Conclusions: This case provides evidence that both XX maleness and XX OT-DSD are different manifestations of the same disorder of gonadal development. (J Clin Endocrinol Metab 93: 339-343, 2008)

n 46,XY normal males, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) is the key gene, which triggers the expression of a complex gene cascade leading to testicular differentiation (1, 2). However, testicular tissue differentiation can be observed in 46,XX individuals, those with XX maleness or true hermaphroditism, now called ovotesticular disorder of sex development (OT-DSD) (3).

XX males usually have normal male genitalia, small azoospermic testes, and hypergonadotropic hypogonadism (4),

have genital ambiguity combined with both ovarian and testicular tissues in various arrangements (ovary plus testis or either gonad plus an ovotestis or two ovotestes): most 46,XX OT-DSD subjects are SRY(-) (7). Abbreviations: OT-DSD, Ovotexticular disorder of sex development: SNP, single nucleotide

and most of them carry the SRY gene due to unequal crossing

over between X and Y chromosomes during paternal meiosis (5),

whereas those who are SRY(-) usually exhibit genital ambigu-

ity, but complete masculinization in an infertile individual has

also been described (6). Generally, individuals with OT-DSD

polymorphism.

0021-0723/08/\$15.00/0 Printed in U.S.A. Copyright @ 2008 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2007-1115 Received May 21, 2007. Accepted November 27, 2007. Rist Published Online December 4, 2007

J Clin Endocrinol Metab, February 2008, 99(2):339-343 (cem.endojournals.org 339

340 Maciel-Guerra et al. XX Maleness and XX Hermaphroditism in Twins

There are some reports on familial recurrence of XX males or OT-DSD and on the coexistence of both conditions in the same family as well (S = 10). We report on a rare case of 46, XX SRY(-) monozygotic twins with genital ambiguity, one of them an XX male and the other an XX OT-DSD.

Subjects and Methods

Laboratory assays

LH, FSH, testosterone, and estradiolwere measured by electrochemiluminescence (BM/Hitachi Elecsys 2010; Roche Diagnostics, Boehringer, Mannheim, Germany).

Amplification of SRY gene

Peripheral blood samples were collected from patients and parents. An informed consent was obtained according to our institutional guidelines. Genomic DNA was isolated from whole-blood leukocytes using a proteinase K and phenol/chloroform extraction (11). Primers used to amplify SRYHMG box and SRY whole-coding sequence were described elsewhere (12, 13). A CYP2IA2 (21-hydroxylase gene) primer pair, which amplify a fragment expanding from exon 3 to exon 6 (forward, 5'-GGACCTGTCCITGGGAGAC TAC-3'; reverse, 5'-CCTCAGCT-GCATCITC CACGA-3'), was used as internal amplification control. Par-affin-embedded gonadal tissue DNA was obtained by treating 25 mg of each sample with 1200 µl of xylene (Synth Chemical Co., São Paulo, Brazil). Samples were vigorously vortexed and centrifuged for 5 min at 3000 rpm at room temperature. To remove residual xylene, sam ples were treated twice with 1200 µl 100% ethanol (Merck Chemical, Darmstadt, Germany). Room temperature centrifugation at 3000 rpm for 5 min was used to remove supernatant after each treatment. Samples were incubated 10 min at 37 C to eliminate residual ethanol. To extract DNA from gonadal tissue, the DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany) was used, according to the manufacturer's instructions. A two-step PCR was performed for SRY HMG box and for an exon 3 to intron 4 CYP21A2 401-bp amplifying fragment (intron 4 reverse primer, s'-CAGTTCAGGACA AGGAGAGGC-3'). For the first step, a 25-µl final volume PCR was carried out with PCR Master Mix Kit (Promega, Madison, WI) following the provider's protocol. A second step PCR with the same primer pairs was performed as in the first step, except using 4 μl of the first PCR product as template.

Genotyping

Genotyping was performed by testing three different single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in CYP21A2 gene and Taq 1 restriction fragment length polymorphisms in both C4B and class II HLA genes.

DAX-1 and SOX9 gene analyses

Primers used to amplify the two exons and exon-intron boundaries of the DAX-1 gene were published elsewhere (14). Direct sequencing was performed using the A BI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a 3700 automated sequencer (Applied Biosystems). Quantizative PCR for SOX9 gene was performed using primers de-

Quantitative PCR for SOX^{59} gene was performed using primers described by Rajender et al. (15). Reactions were carried out in a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), and threshold cycle numbers were determined using RQ Study Software (Applied Biosystems). Reactions were performed in triplicate, and threshold cycle numbers were averaged. The 30-µl reaction mixture was prepared as follows: 25 µl Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA), 10 µM of each primer, and different DNA amounts. Normal fertile 46,XY male DNA was used as a standard for real-time PCR assay. Three reactions were set up independently for each concentration of genomic DNA (1.25, 2.5, 5.0, and 10 ng) for drawing the standard plot. Similarly, three independent reactions were set up for J Clin Endocrinol Metab, February 2008, 93(2):339-343

each of the two concentrations of the test samples (2.5 and 5.0 ng). The reaction was cycled with preliminary UDG treatment for 2 min at 50 C and a denaturation step for 2 min at 95 C, followed by 45 cycles of denaturation at 95 C for 15 sec, annealing for 15 sec, and primer extension at 72 C for 15 sec. This was followed by melting-point analysis of the double-stranded amplicons consisting of 40 cycles of 1 C decrement (15 sec each) beginning at 95 C. The first derivative of this plot, dF/dT, is the rate of change of fluorescence in the reaction, and a significant change in fluorescence accompanies the melting curve of the double-stranded PCR products. A plot of -dF/dT is temperature displays these changes as distinct peaks.

Results

Case reports

The twins were born by cesarean section in the 35th week of gestation due to fetal distress. Pregnancy was complicated by diabetes, depression, and polytrauma in the first month; the mother took metformin, amitriptilin, clonazepam, and fluoxetin and had many radiographs in the first trimester. She had two previous gestations: a 13-yr-old boy from her first marriage and a 9-yr-old boy. Family history was unremarkable except for a maternal aunt with primary amenorthea.

Twin A had a birth weight of 1530 g, length 40 cm, head circumference 30 cm; 1-min and 5-min Apgar scores were 7 and 8. The child had a 1-cm phallus with chordee and penoscrotal hypospadias, and gonads were palpable bilaterally in the scrotal folds (Fig. 1, A and B). Hormonal evaluation at the age of 23 d revealed normal FSH (2.34 mIU/ml), LH (8.8 mIU/ml), and testosterone (1.6 ng/ml) levels, and biopsies carried out at the age of 1 month revealed bilateral testes (Fig. 2, A and B).

Twin B had a birth weight of 1210 g, length 37 cm, head circumference 29.5 cm; 1-min and 5-min Apgar scores were 6 and 8. The child had a 0.5-cm phallus, perineal bypospadias, no palpable gonad on the right, and a left inguinal hernia (Fig. 1, C and D). Hormonal evaluation at the age of 23 d revealed high FSH (8.2 mIU/ml) and LH (15 mIU/ml) and low testosterone (0.12 ng/ml). At the age of 1 month, hernictomy revealed the presence of two gonads: the right testis (crossed ectopia) and a



FIG. 1. External genitalia of twin A (A and B) and twin B (C and D).

jcem.endojournals.org 341



FIG. 2. Histology of the genads of twin A (A and B) and twin B (C and D). The sections were stahed with hematoxylin and exit. B is a higher magnification of the boxed area in A and shows immature solid tubules of the prepuberal testis (arrows). D is a higher magnification of the left gonad boxed area in C and shows a primordial folicie (arrow) in ovarian stroma. Note in C the primordial epiddymis (asterisk). Magnification, x50 (A and (2) and x750 (B and D).

small left gonad, which was removed together with an epididymis and Müllerian remnants. This gonad was found to be an ovotestis, with ovarian follicles interspersed among seminiferous tubules (Fig. 2, C and D). The right testis was translocated from the left to the right side and orchidopexy was carried out.

Both twins had a 46,XX karyotype (Fig. 3, A and B).

Molecular studies

SRY gene was negative in peripheral blood leukocytes as verified by PCR using two different primer pairs, one for SRY HMG box (Fig. 4a) and the other for the whole coding sequence (data not shown). The CYP21A2 internal amplification control producing a 707-bp fragment was positive in all samples (Fig. 4A). To test the presence or absence of SRY in gonadal tissues, a two-step PCR was performed. Negative results were obtained in both steps for twin A and twin B (Fig. 4B). To avoid misinterpretation of negative results due to nonamplifying samples, a separated PCR producing an SRY size-equivalent fragment was carried out using a CYP21A2 primer pair and gonadal DNA as template (Fig. 4C). Positive results for the 401-kb CYP21A2 fragment led us to conclude that both twins are SRY negative in gonadal tissues as well. Homozygosity between twins was verified after testing three different SNPs in CYP 21A2 gene and Taq I restriction fragment length polymorphisms in both C4B and class II HLA genes (data not shown).

No mutations were identified in DAX1 coding sequence. The analysis revealed only heterozygosity for two SNPs (SNP ID rs6150C \rightarrow T and SNP ID rs2269345G \rightarrow A) in both children.

The copy number of SOX9 gene in the patients was investigated by real-time PCR assay. There was no evidence for a SOX9 dosage effect because both twins presented an amplification pattern similar to the normal male control (Fig. 5).

After discussions with the parents, twin A, an XX male, was



FIG. 3. Karyotype of twin A (A) and B (B): arrows indicate the X chromosomes.

assigned a male gender, and twin B, with OT-DSD, a female gender. When the twins were 5 months old, the boy underwent chordee correction and urethroplasty, whereas his sister underwent clitoroplasty, introitoplasty, and right gonadectomy.

When the children were 17 months old, a human menopausal



FIG. 4. Gel electrophoresis of the PCR amplicons of the SRY and CYP2/A.2 genes. A, Laukovyte DNA. The SRY HMG region produces a 360-bp fragment, and the CYP2/A.2 gene, used as internal control, produces a 707-bp fragment expanding from exon 3 to exon 6. L, 1-kb ladder plus (invitrogen); tane 1, twin A, XX male; tane 2, twin B, XX OT-OSD; tane 3, 46,XX normal female; tane 4, 46,XY normal male; tane 5, blank control (without DNA). B and C, Paraffin-embedded gonadal tissue DNA used as template for the first-step PCR (upper panels) in the two-step PCR procedure; *lower* panels are the results of the second-step PCR for SRY HMS box (B) and exon 3 Minton A CY27/14.2 fragment (C); tane 1, XX male, right gonad; tane 2, XX OT-DSD, right gonad; tane 3, XX OT-DSD, left gonad; tane 4, 46,XX normal female; tane 7, 46,XY normal male; tane 8, blank control (without DNA).

342 Maciel-Guerra et al. XX Maleness and XX Hermaphroditism in Twins



FIG. 5. Standard curve plot for real-time PCR assay to estimate SOX9 gene copy number. Ct represents the number of the PCR cycle to achieve the threshold fluorescence in the real-time PCR. Reactions were performed in triplicate, and threshold cycle numbers were averaged. Genomic DNA amounts for drawing the standard plot were 1.25, 2.5, 5.0, and 10 ng. Standard plot was constructed with a normal male DNA sample. The test DNA samples were set up with 2.5 and 5.0 ng each for twin A (XX male) and twin B (XX OTSD).

gonadotropin stimulation test was performed (three im injections of Pergonal, 150 IU of FSH and LH on successive days). Testosterone levels increased in twin A (from 0.54 to 1.14 ng/ml) but not in twin B (<0.02 ng/ml both before and after the injections), and there was no response of estradiol in both children (from 13.1 to 12.65 pg/ml in twin A and from 12.53 to 11.76 pg/ml in twin B), indicating absence of gonadal remnants in twin B and reinforcing the diagnosis of XX maleness in twin A.

Discussion

In this study, we report a case of 46,XX monozygotic twins with genital ambiguity. One is XX male and the other XX OT-DSD. *SRY* gene is absent in both peripheral leukocytes and gonadal tissues. The possibility of inhibition in the PCR using blood DNA samples was excluded because positive amplification was observed with an internal PCR control gene and for *DAX1* and *SOX9* genes as well. Similarly, an *SRY* gene mosaicism in the gonadal tissue was also discarded, because positive amplification was observed for the control gene in the second-step PCR (Fig. 4C), whereas *SRY*-negative results were obtained after both PCR steps for twin A and B (Fig. 4B). Hidden *SRY* mosaicism in gonads is rare and has been described in only two cases of XX OT-DSD (16, 17) and one case of XX maleness (18).

DAX1 and SOX9 have been proposed to function downstream to the SRY gene in the male sex-determination pathway (19, 20).

Originally, DAX1 duplication, an X-linked gene within the DSS locus (dosage-sensitive sex reversal) at Xp21, was considered to cause male-to-female sex reversal in SRY(+) 46,XY individuals (21), whereas mutations in DAX1 coding sequence were associated with hypogonadotropic hypogonadism and congenital adrenal hypoplasia in 46,XY individuals (22). Lately, a function as an early mediator of testes development downstream to SRY has been proposed (19). Sequence analysis of the coding regions of DAX1 in the present cases did not show any mutation.

The human 3O X9 gene belongs to the SRY-related HMG box (SOX) gene family and maps to chromosome 17q24. In general, J Clin Endocrinol Metab, February 2008, 93(2):339-343

mutations in the SOX9 gene are responsible for Campomelic dysplasia in which skeletal malformations are associated with XY male-to-female sex reversal (23).

Because increased expression of SOX9 has been considered to cause female-to-male sex reversal in 46,XX SRY(-) individuals (24-26), we investigated SOX9 gene duplications in both children. The results showed normal gene dosage, excluding the involvement of SOX9 in the phenotypes described here.

Either XX male or OT-DSD condition is sporadic in the majority of cases. However, both may coexist within a same family (8–10). Although SRY(+) sibs with either XX maleness or 46,XX OT-DSD have been described (9), most familial cases are SRY(-), and sibs with SRY(-) XX maleness have been reported (8). Some pedigrees indicate an autosomal recessive inheritance, whereas others suggest an autosomal dominant pattern with incomplete penetrance or even an X-linked mutation transmitted through a carrier 46,XY male (10).

The case presented here is, to the best of our knowledge, the first report on the coexistence of XX maleness and OT-DSD in identical twins, and this finding brings additional evidence that they are different manifestations of the same gonadal development disorder. More reports on twins will be necessary to evaluate the extent to which this trait is inherited, that is, to estimate the heritability of this disorder.

In addition, the many gestational problems referred in the present case suggest that adverse environmental conditions may play a role in testicular differentiation in susceptible SRY(-)46,XX subjects.

In fact, as pointed out by Mittwoch (27), the idea of a single Y-chromosomal gene responsible for initiating testis differentiation is giving way to the recognition that this gene, in collaboration with non-Y-chromosomal genes, increases proliferation in the cells in which it is active, thus suggesting that the genes required for male sex differentiation act as promoters of growth (28). Hence, these genes must be assumed to interact to some extent with environmental factors (27).

Adknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Andréa Trevas Maciel Guerra, M.D., Ph.D., Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brasil. E-mail: atmg@fcm.unicamp.br.

Disclosure Statement: All authors have nothing to disclose.

References

- Sinchir AH, Borta P, Palmer MS, Hawkina JR, Griffin BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovel-Badge R, Goodfolow PN 1990 A gene from the human sex-determining region encoder a provin with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature 346:140–244
- Parker KL, Scholl Å, Schimmer BP 1999 Gene interactions in gonadul developmere. Annu Rev Physicl 61:417–433
- Houk CP, Hughes IA, Ahmed SF, Lee PA, Writing Committee For The International Internet Conserves Conference Participants 2006 Summary of conservers statement on internex disorders and their management. International Internet Conference, Pediatrics 118:753-757

J Clin Endocrinol Metab, February 2008, 93(2):339-343

- 4. De La Chapollo A 1981 Etiology of malentas in XX men. Hum Genet 58:105-116
- Fochaer PV, Marcantonio SM, Jarwaney V, Stetten G, Goodfellow PN, Mi-geon CJ, Smith KD, BerkowitzGD 1993 Therese of the rex-determining region Y gene in the etiology of 46,XX malenear. J Clin Endocrinol Metab 76:690– 695
- 6. Forgueson-Smith MA, Cooke A, Affara NA, Boyd E, Toknie JL 1990 Genotype-phenotype coerclations in XX males and their bearing on current theories of sex determination. Hum Genet 84:198–202
- 7. Krob G, Braan A, Kuhnle U 1994 True hermaphroditism: geographical distribution, clinical findings, chromosomes and gonadal histology. Eur J Pediatr 1532-10
- Zentono JC, López M, Vera C, Mónder JP, Kofman-Alfaro S 1997 Two SRY-acgarive XX malt beothers without genical ambiguity. Hum Genet 100:606– 610
- Abbas N, McElroavey K, Leconiat M, Vilaia E, Jaubert F, Borger R, Nihoul-Feloue C, Rappaport R, Felous M 1993 Familial care of 46 XX raile and 46 XX true hermapheodite associated with a paternal-derived SRY-bearing X chromosome. CR Acad Sci III 316:375–383 XX true here
- Sarafoglos K, Ostrer H 2000 Familial etx revenul: a review. J Can Endocrinol Menab 85:483–493
- 11. Sambrook J, Fristech EF, Maniatia TE 1989 Molecular cloning: a laboratory
- manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press Schmin-Ney M, Thiole H, Kalwaber P, Bardoni B, Gistemino M, Scherer G 12. Schu 1995 Two novel SR Y missense matations reducing DNA binding identified in XY females and their moraic fathers, Am I Hum Genet 56:862-869
- 13. Hawkim JR, Taylor A, Borta P, Levilliers J, Van der Auwera B, Goodfollo PN 1992 Mutational analysis of SRY, nonsense and missense mutations in XY ex revenual. Hum Genet 88:471-474
- Yamaso T, Takayanagi R, Oba K, Nishi Y, Oho K, Nawata H 1996 New mutations of DAX-1 genes in two Japanese patients with X-Inked congenital adrenal hypoplasis and hypogenadoteopic hypogenadism. J Clin Endocrinol Metab 81:530-535
- Rajeader S, Rajani V, Gapta NJ, Chakravarty B, Singh L, Thangaraj K 2006 SRY-arganize 46,XX male with normal genicals, complete masculinization and infertility. Mol Flum Reprod 12:341–346
- Inoue H, Nomura M, Yanase T, khino I, Goto K, Ikuyama S, Takayanagi R, Nawata H 1998 A rare case of 46,XX true hermaphroditism with hidden

jcem.endojournals.org 343

monikism with sex-determining region Y chromosome-bearing cells in the gausda. Intern Med 37:467-471

- Jimenez AL, Kofmas-Affero S, Borumen J, Hornandez E, Canto P, Mondez JP, Zontono JC 2000 Partially deleted SRY grae confined to testicular tistar in a 46,XX true hermaphendite without SRY in leukocytic DNA. Am J Med Genet 17. Jir 93:417-420
- 18. Dardis A, Saraco N, Mondilaharru H, Rivarola M, Bolgorosky A 1997 Report of an XX male with hyporpadias and pubereal gyaccomastia, SRY gene neg-ative in blood leakscopes but SRY gene positive in resticular cells. Hoem Res 47:85-87
- 19. Mooles JJ, Weise J, Jam toon JL 2003 Dax1 is required for testis determination. Nar Genet 34:32–33
- Broanan J, Capel B 2004 One timor, two fatter molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. Nat Rev Genet 5:509–521
 Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley KC, Toniai G, Forrante E,
- Chiumello G, McCabe ERB, Fraccaro M, Zuffardi O, Camerino G 1994 A dosage senitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female rez revereal. Nat Genet 7:497-501
- 22. Zanaria E, Muecatelli F, Bardoui B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ER, Meitinger T, Monaco AP, Samone-Comi P, Camorino G 1994 Au unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked advenal hypoplasia congenita. Nature 372-635-641
- Wagner T, Winh J, Meyer J, Zabol B, Hold M, Zinmer J, Pacastos J, Dagna Bricardli F, Kousel J, Harstert E, Wolf U, Tommorup N, Schonpp W, Schorer G 1994 Autournal sex reversal and componentic dyaplanic are caured by mu-tations in and around the SRY-related gene SOX9, Cel 79:1111-1120 24. Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J 1999 Autonomal XX rex reversal caured by duplication of SOX9, Am J Med Genet 87:349-353
- Vidal VP, Chaboinior MC, de Rosij DG, Schedl A 2001 Sox9 induces textis development in XX transgenic mice. Nat Genet 28:216–217
 Qin Y, Bishop CE 2005 Sox9 is sufficient for functional testis development
- producing firtule male mice in the absence of Sey. Hum Mol Gener 14:1221-1229
- 27. Mittwoch U 2004 The choive action of rex-determining genes: mitochondria to the researd J Theor Biol 228:359-365
- Erickson RP 1997 Does sex determination begin at conception? BioEstays 19:1027-1032

ANEXO 3

Apparent Mineralocorticoid Excess Syndrome in a Brazilian Boy Caused by the Homozygous Missense Mutation p.R186C in the *HSD11B2* Gene

ABSTRACT

The apparent mineralocorticoid excess syndrome (AME) is a rare autosomal recessive disorder due to the deficiency of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme (11beta-HSD2). The 11beta-HSD2 enzyme, encoded by *HSD1182* gene, metabolizes active cortisol in cortisone. Mutations on *HSD1182* gene affect the enzyme activity by leading to an excess of cortisol, which causes its inappropriate access to mineralocorticoid receptor. Therefore, cortisol will blind mineralocorticoid receptor. The human *HSD1182* gene maps to chromosome 16q22 and consists of five exons encoding a protein of 405 amino acids. We present here clinical and molecular studies on a Brazilian boy who was born pre-term after an oligodramnious pregnancy. He was diagnosed as having AME at the age of 26 months. His parents are second cousins. Molecular characterization of the *HSD1182* gene revealed the homozygous mutation p.R188C. The patient described here is the second case of *HDS1182* gene mutation reported in Brazilian patients with AME. (Arq Bras Endocrinol Metab 2008; 52/8:1277-1281)

Keywords: Apparent mineralocorticoid excess; HSD11B2 gene; Hypertension; Deficiency of 118-hydroxysteroid dehydrogenase type 2; Mutations

RESUMO

Sindrome de Excesso Aparente de Mineralocorticólde em um Menino Brasileiro Causada pela Mutação p.R196C em Homozigose no Gene HSD11B2.

A síndrome de excesso aparente de mineralocorticólde (AME) é uma doença autossómica recessiva rara devido à deficiência da enzima 118-hidroxidesterólde desidrogenase tipo 2 (11beta-HSD2). A enzima 11beta-HSD2 metaboliza o cortisol ativo a cortisona. As mutações no gene *HSD1182*, que codifica a enzima, afetam sua atividade levando a um excesso de cortisol, que terá acesso inapropriado ao receptor de mineralocorticólde, competindo com a ligação da aldosterona. O gene *HDS1182* humano está localizado no cromossomo 16q22 e é formado por 5 éxons que codificam uma proteína de 405 aminoácidos. Este relato apresenta os estudos clínicos e moleculares de um paciente brasileiro do sexo masculino que nasceu prematuro depois de uma gestação sob oligodrámnio. Recebeu o diagnóstico de AME com 26 meses de idade. Seus país são primos em segundo grau. A caracterização molecular do gene *HSD1182* revelou a mutação p.R186C em homozigose. O paciente descrito é o segundo caso relatado de brasileiro com mutação no gene *HSD1182*. (Arq Bras Endocrinol Metab 2008; 52/8:1277-1281)

Descritores: Excesso aparente de mineralocorticólde; Gene HDS11B2; Hipertensão; Deficiência da118-hidroxiesterólde desidrogenase tipo 2; Mutações

INTRODUCTION

** Share first authorship

A pparent mineralocorticoid excess (AME; OMIM # 207765) is a rare autosomal recessive disorder, which consists in an inherited form of hyperten-

Arg Bras Endocrinol Metab 2008;52/8

clinical case report

* "Fernanda Borchers Coeli " "Lucio Fábio Caldas Ferraz Sofia H. V. de Lemos-Marini Sumara Zuanazi Pinto Rigatto Vera Maria Santoro Belangero Maricilda Palandi de-Mello

Laboratório de Genética Molecular Humana, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas (FBC, LFCF, MPM); Centro de Investigação em Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Pediatria, Universidade Estadual de Campinas (SHVIM, SZPR, VMSB), Campinas, SP, Brasil.

and a mandanto and

Received in 25/8/2008 Accepted in 14/10/2008

1277

copyty/*AEEM to doc as drattassevadas

p.R186C Mutation in HSD11B2 Gene Coeli, Ferrazet d.

sion caused by the deficiency of 113-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11beta-HSD2) (1-3). This enzyme is highly expressed in mineralocorticoid target tissues and functions unidirectionally to convert cortisol to cortisone, an inactive form (4). Although cortisol is a less potent mineralocorticoid than aldosterone, the main mineralocorticoid produced in the adrenal gland, both aldosterone and cortisol bind to the mineralocorticoid receptor (MR) with equal affinity (5), whereas cortisone does not. Therefore, 11beta-HSD2 enzyme protects normal subjects from cortisol intoxication by converting it into cortisone and providing a mechanism that ensures the proper occupation of MR by aldoste-rone (6). As cortisol is secreted in concentrations much higher than aldosterone, the deficiency of 11beta-HSD2 leads to an inappropriate inactivation of cortisol, which in excess, acts as a mineralocorticoid. This cortisol excess stimulates the MR causing intense sodium retention, hypokalemia and hypertension (1-3).

Two isoforms of 11beta-HSD have been identified and characterized (7). The type 1 isoform, which is expressed in several human tissues, is a NADP-dependent enzyme with reductase activity (8, 9). The type 2 isoform, which is only 20-26% identical to type 1, is NADdependent and presents dehydrogenase activity (10). The human *HSD11B2* gene, encoding the 11beta-HSD2 enzyme, is located on chromesome 16q22, consists of 5 exons spanning about 6.2 Kb, and encodes a protein of 405 amino acids (11).

AME is a result of mutations in HSD11B2 gene (12-15). In general, the disease is present in early childhood, with a severe phenotype including low birth weight, failure to thrive, hypokalemic metabolic alkalosis, and high mortality rate in untreated patients (2, 16). However, milder phenotypes have been described in adults with clinical features such as hypertension without electrolyte abnormalities (17-20). Milder phenotypes are associated with mutations causing only partial inactivation of HSD11B2 (21).

In this study, we report a boy with typical clinical features of AME with p.R186C homozygous mutation in the *HSD11B2* gene.

SUBJECTS AND METHODS

Blood specimens and clinical data of the patient and relatives were collected with approval by the appropriate institutional review board; signed informed consent

Clinical data

A Brazilian male, son of a consanguineous marriage, was born pre-term (weight = 1,700 g; length = 40 cm), Apgar score 8-9, after an oligodramnious pregnancy. He had normal male genitalia with palpable testes. His development was normal up to the age of 5 months when he had bronchiolitis. Thereafter he presented failure to thrive. When he was 17 months old he was admitted in a hospital for pneumonia when he presented polyuria, polydipsia, hypokalemia (serum potassium, 1.9 mmol/L) and hypertension. He was first examined by us at the age of 26 months when he was referred to our hospital for evaluation because prednisone and chlorthalidone failed to control his labile hypertension. At this time his weigh (8,580 g) and height (76.8 cm) were both below the third percentile (zW = - 3.32 and zH = - 2.53). He also presented hypertension (130/90 mmHg). Laboratorial findings indicated hypokalemia (serum potassium, 2.5 mmol/L), alkalosis (pH = 7.51) and normal sodium (141 mmol/L), plasma renin activity (0.48 ng/ml/h, normal 0.15 to 2.33), aldosterone (26 pg/ ml, normal 10 to 160 pg/mL), 11-deoxycortisol (2.0 ng/mL, normal < 8.0 ng/mL) and serum cortisol (9.9 µg/dL, normal 7.58 to 27 µg/dL,). On 24-hour urine he presented normal cortisol (31.9 μ g/24hs, normal 20 to 90 μ g/24hs) and hypercalciuria (18 mg/kg/day, normal < 4 mg/kg/day). Unfortunately, neither cortisol nor cortisone urinary metabolites could be evaluated.

Renal ultrasounds revealed the presence of bilateral nephrocalcinosis (not progressive) whereas cardiac echocardiography showed mild left ventricular hypertrophy when he was 5 years old.

He has been treated with diuretics, antihypertensive drugs, salt restriction and potassium supplementation and he responded well to the treatment. On follow-up, biochemical results indicated normal serum levels of both sodium and potassium, and blood pressure in the upper limit of normality. He also had an improvement of growth parameters. At the age of 11.1 years his weight was 32,300 g (Z = -0.61), height 140.4 cm (Z = -0.48), pubertal stage G2P3, his blood pressure was normal (110/60 mm Hg). In the last consultation, his clinical features were stable upon treatment with KCI (3.30 g/day), Amiloride (12.5 mg/ day), Captopril (100 mg/day), Hydrochlorothiazide (25 mg/day), Atenolol (18 mg/day) and Losartam Potassium (25 mg/day).

Arg Bras Endocrinol Metab 2008;52/8
p.R186C Mutation in HSD11B2 Gene Coei, Ferraz et al.

Molecular analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by standard phenol/chloroform method (22). HSD11B2 gene was amplified by PCR amplification of the entire coding region including exon-intron junctions and both 5'UTR and 3'UTR regions using synthetic oligonucleotides (Invitrogen, CA, USA) as primers (table 1), which were designed using Primer 3 open access software (http://primer3.sourceforge. net). The amplified fragments were directly sequenced using Big Dye TM Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1 Ready Reaction (ABI PRISM / PE Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequences obtained in an ABI377 Semi-Automated Sequencer (ABI PRISM / PE Biosystems) were compared to the normal sequence of the gene (NCBI # U27317).

Table 1. Primers used for PCR HSD1182 gene amplification.

RESULT

HSD11B2 sequence analysis on patient's DNA revealed a c.556Co-T homozygous transition in codon 186 located in exon 3. This nucleotide substitution leads to the p.R186C missense mutation (Figure 1A). Further sequence analysis on parent's DNA samples showed heterozygosis for the mutation in both father and mother (Figure 1B).

DISCUSSION

In the present study we describe a boy diagnosed as having AME disease. Clinical and hormonal data supported the presence of a deficiency in the 11beta-HSD2 enzyme activity. Facing clinical and laboratorial featu-

	Primors	Sequences (5'3')	Tm (°C)	Size (pb)
5'-UTR	HSD1182-51-F	GGGGCTCTTCATAAGCTCG	60	255
	HSD1182-51-R	CCAGACGCAGGTCTGAGC		
Exon 1	HSD11B2-1F	TAGAAGCTCTCTCCCCGC	61	308
	HSD11B2-1R	CCTGTTGAGTGTCCAGTCCC		
Exon 2	HSD1182-2F	IGGIGAITCIGGGGIIGICI		304
	HSD11B2-2R	CACAGAGCAGAGGAGGGAAG	00	
Exon 3	HSD11B2-3F	GACACGGGGACTGGAAGTT	10	288
	HSD11B2-3R	GGCTCCTTTTGCTCCAGT	00	
Exon 4	HSD11B2-4F	ACTEGAGCAAAAAGGAGOC	40	296
	HSD11B2-4R	CTGCCCCCATAAGACCATT		
Exon SI	HSD11B2-5IF	CGCGGGTTAAACAGTCCTAA		300
	HSD1182-5IR	CCCTGGCCGGGGTAATAG	- 61	
Exon 51	HSD1182-51F	ATGCCATCACAGATGCGCT	62	292
	HSD1182-5IR	GOCTOCTGTGCTGCAGTG		
3'-UTR - I	HSD1182-3'-IF	AGGACCCAAACCTGAGCC		310
	HSD11B2-3"-IR	GTTCTCCAAGCTGCAGGGTA	50	
3'-UTR - II	HSD1182-3"-IF	CACTGTTTCATGAGCCCAAA	10	406
	HSD1182-31-IR	CACACTGTGTCACTCAGCCA	60	

Arg Bras Endocrinol Metalb 2008;52/8

p.R186C Mutation in HSD1 1B2 Gene Coeli, Ferraz et dl.



Figure 1. HSD1182 gene sequencing electropherograms showing part of exon 3. The QGT > IGT nucleotide change is denoted. This change causes the missence mutation R186C observed in homozygosis for patient's DNA (A) in the sequencing with both forward and reverse primers. The heterozygous status was verified for his parents (B).

res, the etiologies raised were: AME and Liddle Syndrome. Several clinical characteristics, such as low birth weight, failure to thrive, hypercalciuria and also parent's consanguinity favored AME diagnosis and led us to search for *HSD11B2* gene mutations.

Molecular investigation identified the p.R186C homozygous mutation in the HSD11B2 gene. This mutation was previously described by Wilson and cols. (23). The aminoacid residue R186 is conserved across several species. In addition, computer analysis of the predicted protein structure revealed that p.R186C substitution yields a protein with a new P-sheet from residues 189 to 195 and an increased hydrophobicity from residues 180 to 191 (24). In pitro enzymatic activity assays showed complete inactivation of 11beta-HSD2 enzyme due to p.R186C mutation (24).

To date, over 30 different mutations on HSD11B2 gene have been reported worldwide and in many ethnic groups, including Caucasians, Africans, Asians, and American Indians (25-28). Consanguinity, endogamy or a founder effect for AME have been considered in several families, especially those from ethnics in whom recurrence of certain HSD11B2 mutations is observed (25). The Brazilian family described here is formed by a consanguineous marriage and both father and mother are p.R186C carriers. Since this mutation was previously described segregating in an African-American family (20), a founder effect should be considered. However, in the present case it is difficult to explain the mutation recurrence by considering a founder effect of an African-derived disease-causing allele without analyzing molecular markers, which could give an estimative of African ancestry index for this family as defined by Parra and cols. (29). Therefore, we cannot discard the possibility of this mutated allele being an Africanoriginated allele.

Conversely, the C>T transition at codon 186 (\underline{C} GT> \underline{T} GT) is a typical CpG-consequence mutation. This dinucleotide is considered to be prompt to undergo mutations through spontaneous deamination of cytidine to uracil (30, 31). Therefore, the occurrence of the p.R186C mutation in two unrelated families could suggest that the codon R186 is a hot spot for mutations in *HSD11B2* gene, like other mutations located in exons 3 to 5 (21, 32). However, the number of patients bearing the mutation is low, therefore there are no significant evidences for this possibility unless more patients are studied.

In general there are few cases of AME reported worldwide, since this is a very rare autosomal recessive disorder (25, 27). The boy described in the present paper was clinically diagnosed with AME and molecular findings confirmed the phenotype. This is the second case of AME with a deleterious *HDS11B2* gene mutation reported in Brazilian patients (33).

Acknowledgements: We thank Maria M. Vasconcelos Rosa for assistance and technical support. We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CA-PES) for financial support. The authors would also like to thank the family studied for agreeing to participate in this research.

REFERENCES

- White PC, Mune T, Agarwai AK. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticold excess. Endoor Rev. 1997;18(1):135-56.
- New MI, Wilson RC. Steroid disorders in children: congenital adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96(22): 12790-7.
- Luft FC. Mendellan forms of human hypertension and mechanisms of disease. Clin Med Res. 2003;1(4):291-300.
- Krozowski Z. The 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: functions and physiological effects. Mol Cell Endocrinol 1999; 151(1-2): 121-7.

Arg Bras Endocrinol Metab 2008;52/8

1280

p.R186C Mutation in HSD11B2 Gene Coel, Ferraz et al.

- Krozowski ZS, Punder JW. Renal mineralocorticoid receptors and hippocampel corticosterone-binding species have identical intrinsic staroid specificity. Proc Natl Acad Sci USA, 1983;80(19): 6056-60.
- Edwards C, Stewart P, Burt D, Brett L, McIntyre M, Sutanto W, et al. Localisation of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase: tissue specific protector of the mineraloconticoid receptor. Lanoct. 1988;2(8):19:96-9.
- Krozowski ZS, Provencher PH, Smith RE, Obeyesekere VR, Mercer WR, Albiston AL, Isozymes of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenasa: which enzyme endows mineralocorticoid specificity? Steroids. 1994;59(2):116-20.
- Moore CC, Mellon SH, Mural J, Silteri PK, Miller WL. Structure and function of the hepatic form of 11b-hydroxystaroid dehydrogenase in the squirrel monkey, an animal model of glucoconticoid resistance. Endocrinology. 1953; 139(1): 368-75.
- Stewart PM, Murry BA, Mason JI. Human kidney 118-hydroxysteroid dehydrogenase is a high affinity nicothamide adenine dinucleotide-dependent enzyme and differs from the cloned type I isoform. J Clin Endocrinol Metab. 1994;79(2):480-4.
- Rusval E, Naray-Fejes-Toth A. A new isoform of 11b-hydroxysteroid dehydrogensse in aldosterone target cells. J Biol Chem. 1993;268(15):107 17-20.
- Agarwal AK, Rogerson FM, Mune T, White PC. Gene structure and chromosomal localization of the human HBO11K gene encoding the kidney (type 2) isozyme of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Genomics. 1995;29(1):195-9.
- Mune T, Rogerson FM, Nikkliä H, Agarwal AK, White PC. Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Nat Genet. 1985;10(4):394-9.
- Li A, Tedde R, Krozowski ZS, Pala A, Li KX, Shackleton CH, et al. Molecular basis for hypertension in the "type il variant" of apparent mineralocorticoid excess. Am J Hum Genet. 1998;58(2):370-9.
- New MI, Geller DS, Fallo F, Wilson RC. Monogenic low renin hypertension. Trends Endocrinol Metab. 2005;16(3):92-7.
- Stewart PM, Krozowski ZS, Gupta A, Milford DV, Howie AJ, Shappard MC, Whorwood CB. Hypertansion in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess due to mutation of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene. Lancet. 1996;347(8994):88-91.
- Dave-Sharma S, Wilson RC, Harbison MD, Newfield R, Azar MR, Krozowski ZS, et al. Examination of genotype and phenotype relationships in 14 patients with apparent mineralcoorticold exases. J Clin Endocrin Metab. 1998;5317;2244–54.
- Ugrasbul F, Wiens T, Rubinstein P, New MI, Wilson RC. Prevalence of mild apparent mineralocorticoid excess in Mennonites. J Clin Endocrinol Metab. 1999;84(12):4735-8.
- Wilson RC, Dave-Sharma S, Wei JQ, Obeyesekere VR, Li K, Ferrari P, et al. A genetic defect resulting in mild low-renin hypertension. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95(17): 10200-5.
- Lavery GG, Ronconi V, Draper N, Rabbitt EH, Lyons V, Chapman KE, et al. Late-onset apparent mineralocorticoid excess caused by novel compound heterozygous mutations in the HSD1182 gene. Hyperiension. 2003;42(2):123-9.
- Inada M, Iwaseki K, Imai C, Hashimoto S. Two elderly patients with mineraleconticoid excess due to 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 beta-HSD2) impairment. Intern Med. 2008;47(7):631-6.

Arg Bras Endocrinol Metalb 2008;52/8

- Nunez BS, Rogerson FM, Mune T, Igarashi Y, Nakagawa Y, Philipov G, et al. Mutants of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11-HSD2) with partial activity: improved correlations between genotype and biochemical phenotype in apparent mineralocorticoid excess. Hyperiansion. 1999;34(4 Pt 1):638-42.
- Sambrook J, Fristsch EF, Manlatis TE. In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1989.
- Wilson RC, Harbison MD, Krozowski ZS, Funder JW, Shackleton CH, Hanauske-Abei HM, et al. Several homozygous mutations in the gene for 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in patients with apparent mineralocorticoid excess. J Clin Endocrinol Metab. 1995;80(11):3145-50.
- Ferrari P, Obeyesekere VR, LI K, Wilson RC, New MI, Funder JW, Krozowski ZS. Point mutations abolish 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II activity in three families with the congenital syndrome of apparent mineralocorticoid excess. Mol Cell Endocrinol. 1996;119(1):21-4.
- Wilson RC, Nimkam S, New MI. Apparent mineralocorticold excess. Trends Endocrinol Metab. 2001 12(3):104-11.
- Culnikler M, Bappel B, Draper N, Atterbury AJ, Lavery GG, Walker EA, et al. Molecular basis for the apparent mineralocorticoid excess syndrome in the Oman population. Mol Cell Endocrinol. 2004;217(1-2):143-9.
- Kamide K, Kokubo Y, Hanada H, Nagura J, Yang J, Takkuchi S, et al. Genetic variations of HSD1182 in hypertensive patients and in the general population, six rare missense/trameshift mutations. Hypertens Res. 2006;29(4):243-52.
- Morineau G, Sulmont V, Salomon R, Rquet-Kempf B, Jeunamaître X, Nicod J, Ferrari P. Apparent mineralocorticoid excess: report of six new cases and extensive personal experience. J Am Soc Nephrol. 2006;17(11):3176-84.
- Parra FC, Amado RC, Lamberlucci JR, Rocha J, Ankunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(1):177-82.
- Olilis J, Lappalainen I, Whinen M. Sequence specificity in CpG mutation hotspots. FEBS Lett. 1996;396(2-3):119-22.
- el Antri S, Mauffret O, Monnot M, Lescot E, Convert O, Fermandjian S. Structural deviations at CpG provide a plausible explanation for the high frequency of mutation at this site. Phosphorus nuclear magnetic resonance and circular dichroism studies. J Mol Biol. 1993;230(2):373-8.
- Rogoff D, Smolenicka Z, Bergadá I, Vallejo G, Barontini M, Helnrich JJ, Ferrari P. The codon 213 of the 1 lbeta-hydroxysteroid dehydrogenese type 2 gane is a hot spot for mutations in apparent mineralocorticoid excess. J Clin Endocrinol Metab. 1996;83(12):4391-3.
- Li A, U KX, Marul S, Krozowski ZS, Batista MC, Whorwood CB, et al. Apparent mineralocorticoid excess in a Brazilian kindred: hypertensioninthe heterozygote state. J Hypertens. 1997; 15(12) Pt 19:1397-402.

Correspondence to:

Mariaida Palandi de Mello CBMEG-Unicamp Caixa Postal 6010 13083-875 Campinas, SP Brasil E-mail: mmello@unicamp.br

1281

AEBM lodge os dhollor

oopyright*

ANEXO 4

Heterozygosis for CYP21A2 Mutation Considered as 21-Hydroxylase Deficiency in Neonatal Screening

perspectives

Fernanda Caroline Soardi Soria Helena V. Lemos-Marini Fernanda Borchers Coeu Victor Gonçalves Maturana Márcia Duarte Barbosa da Silva Renan Darin Bernardi Giselle Zenker Justo Mariciida Palandi de-Melo

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) (FCS, FBC, VGM, MDBS, RDB, MPM); Departamento de Pediatria e Centro de Investigação em Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) (SHVLM), Campinas, SPBrasit; Disciplina de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) (GZJ), São Paulo, SP, Brasit.

> Received in 25/8/2008 Accepted in 14/10/2008

ABSTRACT

Steroid 21-hydroxylase deficiency (21-OHD) accounts for more than 90% of congenital adrenal hyperplasia. CAH newborn screening, in general, is based on 17-hydroxyprogesterone dosage (17-OHP), however It is complicated by the fact that healthy preterm infants have high levels of 17-OHP resulting in faise positive cases. We report on molecular features of a boy born pre-term (GA = 30 weeks; weight = 1,390 g) with elevated levels of 17-OHP (91.2 nmol/L, normal < 40) upon neonatal screening who was treated as having CAH up to the age of 8 months. He was brought to us for molecular diagnosis. Medication was gradually suspended and serum 17-OHP dosages mantalned normail. The p.V281L mutation was found in compound heterozygous status with a group of nucleotide alterations located at the 3' end intron 4 and 5' end exon 5 corresponding to the splice site acceptor region. Molecular studies continued in order to exclude the possibility of a nonclassical 21-OHD form. The group of three nucleotide changes was demonstrated to be a normal variant since they failed to interfere with the normal splicing process upon minigene studies. (Arg Bras Endocrinol Metab 2008; 52/8;1388-1392)

Keywords: Neonatal screening: CYP21A2 mutations; Minigenes; 21-hydroxylase deficiency

RESUMO

Heterozigose para Mutação no Gene CYP21A2 Considerada como Deficiência de 21-Hidroxilase na Triagem Neonatal.

A deficiência de 21-hidroxilase (21-OHD) é uma doença autossômica recessiva que contribui com mais de 90% dos casos de hiperplasia congénita da adrenal. O teste de dosagem de 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) por radioimunoensalo em amostras de sangue colhidas em papel de filtro tem sido o método mais usado nos programas de triagem neonatal. No entanto, essa triagem pode apresentar alto número de faiso-positivos pelo fato de os recém-nascidos prematuros apresentarem dosagens mais elevadas deste esterólde. Apresentamos aquí os estudos moleculares de uma criança, sexo masculino, nascida pré-termo (IG = 30 sem; peso = 1.390 g) que apresentava valores elevados de 17-OHP sérica (91,2 nmol/L, normal < 40) na triagem neonatal e que foi tratada como portadora da forma clássica da 21-OHD até a idade de 8 meses quando nos foi encaminhada para diagnóstico molecular. A terapia foi, então, gradativamente descontinuada, sendo que as concentrações séricas de 17-OHP se mantiveram normais. A mutação p.V281L foi encontrada em heterozigose composta com um grupo de alterações no terminal 3' do intron 4 e no terminal 5' do exon 5 correspondendo à região do sítio aceptor de splicing. A análise do gene CYP21A2 prosseguiu para se excluir a possibilidade de a criança ser afetada com a forma não-clássica de 21-OHD. Pela análise de minigene ficou demonstrado que o grupo de três trocas nucleotídicas não afeta o processo normal de transcrição. Concluindo, a criança é apenas heterozigota da mutação p.V281L sem necessidade de tratamento. (Arg Bras Endocrinol Metab 2008; 52/8:1388-1392)

Descritores: Triagem neonatal: Mutações CYP21A2: Minigenes: Deficiência de 21-hidroxilase

Arg Bras Endocrinol Metab 2008;52/8

copyrith® A REB M to dor on dia flos instantador

INTRODUCTION

teroid 21-hydroxylase deficiency (21-OHD; OMIM +201910) is an autossomal disorder that accounts for more than 90% of congenital adrenal hyperplasia (CAH) (1,2). Impaired 21-hydroxylase activity results in decreased cortisol and aldosterone levels. Frequently, the dassical 21-OHD causes ambiguous external genitalia at birth in females, precocious puberty in males, and acceleration of somatic growth in both sexes (1,2). If the level of the enzyme impairment is higher than 99%, mineralocorticoid synthesis is severely affected leading to salt-wasting crisis. Therefore, clinical symptoms may indude failure to thrive, vomiting, hyperkalemia, hyponatremia, dehydration, metabolic acidosis (1,2). The nondassical form (NC) is characterized by late-onset manifestation and results from a mild deficiency of the enzyme. The excess of androgens presents different effects in nonclassical patients at any phase of postnatal development as pseudoprecocious puberty, hirsutism, acne, short stature, and decreased fertility (2).

21-OHD is caused by mutations on CYP21A2 gene that in general are derived from its adjacent pseudogene on chromosome 6p21. Either carriers for CYP21A2 mutations or NC patients with homozygous CYP21A2 mutations present an overlapping range for responses of 17-OHP levels upon ACTH test that varies, from values of 13 nmol/L up to 30 nmol/L (3). The higher value is generally considered as the lower limit for the diagnosis of the NC form (4, 5). However, this value is normally established before the identification of mutations in the CYP21A2 gene.

There is a high number of different techniques for diagnosing 21-OHD, but most CAH newborn screening is based on 17-hydroxyprogesterone radioimmunoassay on dried blood on filter paper (6-8). Nationwide and regional CAH screening programs have been introduced in several countries (7, 9, 10) including in a few regions in Brazil (11, 12).

In the present study, we report the molecular features of a child that presented elevated level of 17-OHP in the neonatal screening, which was normalized within few months of age. The search for *CYP21A2* mutations indicated compound heterozygosis for p.V281L mutation and a group of three nucleotide alterations located at the 3'-end intron 4 and 5'-end exon 5 corresponding to the splice site acceptor region. Molecular studies continued to exclude the possibility of this boy to develop a NC form of 21-OHD later. This group of

Arg Bras Endocrinol Metab 2008;52/8

alteration was demonstrated to be a normal variant since it failed to interfere with the normal splicing process upon minigene studies.

SUBJECTS AND METHODS

Clinical report

A Brazilian Caucasian male from non-consanguineous parents was born pre-term (GA = 30 weeks; weight = 1,390 g; height = 40 cm), after an in pitro fertilization triplet pregnancy. Upon 21-hydroxylase deficiency neonatal screening he presented high levels of 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) (91.2 nmol/L, normal « 40). At the age of 27 days confirmatory test was performed and 17-OHP serum value was 73 nmol/L (normal 3,5 to 122). The child has never had dehydration or vomiting episodes. Also, failure to thrive was never observed. He was treated with hydrocortisone and was referred to our outpatient clinics when he was 8 monthe old for molecular studies because the parents were interested in pre-natal diagnosis in future pregnancies. The treatment was gradually suspended during four months in order to confirm the diagnosis. At the age of 22 months he was asymptomatic and his 17-OHP serum level was 2.2 nmol/L(normal 0.2 to 4.6). Normal growing and normal 17-OHP levels did not indicate the classical form of 21-hydroxylase.

DNA extraction and analysis of the CYP21A2 gene

This study was reviewed and approved by the appropriate Ethics Committee from Faculdade de Ciências Médicas at Universidade Estadual de Campinas (Unicamp, Campinas-SP, Brasil) and informed consent was obtained from the parents.

Genomic DNA samples from the child and his parents were obtained from peripheral blood by Proteinase K digestion and phenol/chloroform extraction following standard techniques (13). CY21A2 large gene conversions and 30-kb deletions were screened by Southem-blot (14). The eight most frequent pseudogene-derived mutations were investigated by ASO-PCR (15). For sequencing experiments, CYP21A2 gene was amplified in two fragments, 5'UTR-exon 6 and exon 6-3'UTR, using specific CYP21A2 primers (15). The amplified fragments were purified with Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) and directly sequenced with Big Dye Terminator Cycle Amissdiagnosis of 210HD un Neonatai Screening Soardi et al.

Sequencing Kit V3.1 Ready Reaction (ABI PRISM/PE Biosystems, Foster City, CA, USA) using the internal primers as previously described (16). Purified PCR products were sequenced in both sense and antisense orientations using ABI PRISM 3700 Automated DNA Sequencer according to the manufacturer's recommendations (ABI PRISM/PE Biosystems, Foster City, CA, USA). Nucleotide and amino acid numbering followed the published sequence by Higashi et al. (17) (NCBI #M12792).

Minigene construction, transfection and cDNA analysis

A minigene with a fragment spanning from exon 2 to exon 6 was constructed. After the first amplification to select CYP21A2 gene, a nested-PCR was performed to construct the minigene with the following primers: Exon 2 sense-Xba I 5'- CCA GAT GTC TAG ATG ATG AAC TCC AAG -3' and Exon 6 antisense-Bass HI 5'- GTG GAT CCG AGG GGA GGC CGT -3'. The minigene amplification product was purified with Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega, Madison, WI, USA) and digested with Xba I and BamHI restriction enzymes. The digested fragment was ligated into a BamHI/Xba I opened pSVL vector (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA). These constructions were transformed into E. coli DH5a competent cells. Clones with the correct insert size (1,110 bp) were sequenced to verify their identity. Recombinant plasmids were transfected in COS-7 cells. Approximately 1 x 10⁴ cells were plated in each 10 cm diameter tissue culture dish containing 8 mLDMEM medium (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics. After 24 hours, COS-7 cell cultures were transfected with 10 µg of the construction using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Transfected cells were collected 24 hours after transfection and total RNA was isolated by use of RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), followed by DNase I (Invitrogen) digestion. First-strand synthesis was performed using 1 µL of Improm II reverse transcriptase (Promega) according to the manufacturer's recommendations. The cDNA was amplified by PCR using the internal primers Ex3Ns -Ex6Na (15). PCR products were fractioned and isolated on a 1.5% agarose gel and the products were directly sequenced as described above with appropriate primers.

RESULTS

A child with high 17-OHP serum levels in the neonatal screening was referred to molecular investigation on CYP21A2 gene. Southern blot analysis from family members revealed neither 30-kb deletions nor gene conversions (data not shown). However, upon screening for eight pseudogene-derived mutations by ASO-PCR the heterozygosis for p.V281L mutation was observed. Segregation analysis performed by screening parents' DNA showed that the father was a carrier for p.V281L (Figure 1A). The mother's inherited allele, however, did not show any pseudogene-derived mutation. In order to characterize this allele, CYP21A2 direct sequencing analysis of the entire gene was performed. The group of alterations g.1104A>C + g.1111C>T + g.1121C>G, the first two located at IV\$4-15A>C and IV\$4-8C>T, respectively, and the third in the first codon of exon 5 leading to the putative missense p.D183E was identified (Figure 1B).

As those nucleotide changes, now named IVS4-Ex5, were located within intron 4/exon 5 junction sequence and could interfere with the normal acceptor splice site, they were investigated on their influence upon the formation of the correct CYP21A2 transcript using mini-



Figure 1. (A) ASO-PCR results for p.V281L. Amplified fragments were separated on a 1% agarose gel. Left - the V281 normal primer; right – L281 mutant primer. F - father; M - mother; S - child; NC - normal control; MC - mutant control; HC- heterozygous control. The 1-kb Plus DNA ladder (Invitragen) was used as marker. (B) DNA sequencing data of the male child showing part of intron 4- exon 5 boundary region. The arrows indicate the nucleotide changes

Ara Bras Endocrinol Metab 2008:52/8

Amissaliagnosis of 210HD un Neonatal Screening Scardi et al.

gene constructions. The cDNAs resulted from the transcription of minigene containing CYP21A2 exons 3 to 6 did not show any sequence difference between the normal control and the variant constructs (Figure 2).

DISCUSSION

A male child presenting high levels of 17-OHP in the neonatal screening was conducted to molecular investigation for CYP21A2 mutations.

CYP21A2 gene was screened for 30-kb deletion, large gene conversion and pseudogene-derived mutations. The paternal inherited allele showed p.V281L. This mutation is pseudogene-derived and it is known to present a residual enzymatic activity of 20-50% (18, 19). It is considered the most common Caucasian mutation among cases of NC form of 21-OHD (20). The maternal allele presented three nucleotide changes, named IVS4-Ex5. These changes are also pseudogenederived but had never been described in the active *CYP21A2* gene, except one report on the D183E mutation in exon 5 (21). As no other sequence variations were observed in the maternal allele the IVS4-Ex5 nucleotide change was considered as a result of a rare microconversion mutational event.

The exon 5 g.1121C>G causing the mutation p. D183E had been studied before and did not affect the normal enzymatic activity, therefore was considered a polymorphism in CYP2IA2(19). However, the IVS4Ex5 nucleotide changes together were not investigated. Due to their location in the acceptor splice site region, they could interfere with the normal splicing process. Minigene *in pitro* experiments demonstrated that the recognition of the intron 4 acceptor splice site by the spliceosome occurred in both wild-type and mutant sequences. Therefore, neither p.D183E reduces enzymatic activity nor IVs4-Ex5 nucleotide changes alter normal transcription indicating a normal variant for the allele.

Elevated 17-OHP blood level is normally used as an indicator of CAH. In general, the technique of analyzing 17-OHP in neonatal screenings is radioimmunoassay in filter-paper blood samples (6, 7). It has been discussed by several authors that this procedure generate a high rate of positive results attributable to physiological reasons and to cross-reactions with steroids other than 17-OHP, especially in preterm neonates (9,10). In addition, Bachega et al. (5) studied obligate heterozygote parents of patients with 21-OHD and they observed that 11 of 19 p.V281L carriers presented elevated ACTH-stimulated 17-OHP levels. Therefore we consider that this study illustrate such technical artifact where a p.V281L carrier newborn was considered as having 21-hydroxylase deficiency and treated. Concluding, the child described here cannot be considered affected with 21-OHD, although a rare allelic variant had been identified in compound heterozygosis with p.V281L.



Figura 2. Betropherogram showing part of the cDNA sequence formed by exon 2 to exon 6. (A) wild-type minigene sequence; (B) sequence of minigene containing the NS4-Ex5 nucleotide changes. The grey bax denote the GAC> GAG transversion in codon 183 (p.D183E). Arrows indicate the exon 4 - exon 5 junction.

Arg Bras Endocrinol Metab 2008;52/8

Amissali agnosis of 210HD un Neonatal Screening Soardi et al.

In summary, the molecular study presented here contributed to define the normal phenotype of a boy considered as 21-OHD in neonatal screening. Therefore, this case illustrates the importance of molecular biology as feasible tools to confirm presumed altered neonatal screening results. Furthermore, this report provided new insights concerning the function of pseudogene-derived alterations in intron 4 / exon 5 acceptor splice site region. Knowledge about the functional effects of alterations improves a correct genotype-phenotype correlation. The molecular investigation pointed out this case as a heterozygous carrier directing clinical management.

Adenowledgments: The authors would like to thank Profi. Dra. Carmen Veríssima Ferreira and Rodrigo Augusto da Silva for their assistance. This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sio Paalo-FAPESP (proc. nº 2005/00981-5) and personal grant to FCS (proc. nº 2003/01785-0). The authors thank the family studied for agreeing to participate in this research. No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Endocr Rev. 2000;21:245-91.
- Riepe FG, Sippell WG. Recent advances in diagnosis, treatment, and outcome of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Rev Endocr Metab Disord. 2007;8(4) :349-63.
- New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS, et al. Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. J Clin Endocrinol Metab. 1983;57:320-6.
- Azziz R, Hincapie LA, Knochenhauer ES, Dewality D, Fox L, Boots LR. Screening for 21-hydroxylase-daficient nonclassic adrenal hyperplasia among hyperandrogenic women. Fertil Staril. 1999;72:915-25.
- Bachega TA, Braniha EM, Billerbeck AE, Marcondes JA, Madureira G, Arnhold IJ, Mendonos BB. Variable ACTH-stimulated 17-hydroxyprogesterone values in 21-hydroxylase deficiency carriers are not related to the different CYP21 gane mutations. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87(2):785-50.
- Pang S, Hotchkiss J, Drash AL, Levine LS, New MI. Microfilter paper method for 17-hydroxyprogesterone radiommunoassay: its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasis. J Clin Endocrinol Metab. 1977;45:1003-8.
 Valentino R, Tommaselli AP, Rossi R, Lombardi G, Varrone S. A.
- Valentino R, Tommaselli AP, Rossi R, Lombardi G, Varrone S. A. pilot study for neonatal screening of congenital adrenal hyperpiasia due to 21-hydroxylase and 11-hydroxylase deficiency in Campania region. J Endocrinol Invest. 1990;13: 221–5.
- Campania region. J Endocrinol Invest. 1990;13: 221-5.
 Janzen N, Peter M, Sander S, Steuerwald U, Terhardt M, Holtkamp U, Sander J. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: additional steroid profile using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92(7): 2581-89.

- Pang S, Murphey W, Levine LS, Lorenzen F, Levy D, Lerner AJ, Rondanini GF, Dupont B, New MI. A pilot newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Alaska. J Clin Endocrinol Metab 1982; 55: 413–20.
- Nordenström A, Wedell A, Hagenfeldt L, Marcus C, Larsson A. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia: 17-hydroxyprogesterone levels and CYP21 genotypes in preterm infants. Pediatrics 2001;106(4): E68.
- Cardoso CB, Fonseca AA, Oliveira Mde F, Pereira BB, Guimarises MM. Congenital adrenal hyperplasta newborn screening: Rio de Janeiro experience. Arg Bras Endocrinol Metabol 2006; 49(1): 112-19.
- Silveira EL, dos SE, Bachega TA, van der Linden Nader I, Gross JL, Einecave RH. The actual incidence of congenital adrenal hyperpisala in Brazil may not be as high as inferred-an estimate based on a public neonatal screening program in the state of Golas. J Pediatr Endocrinol Metab 2008; 21(5): 465-60.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TE. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor. 1989.
- Araujo M, Sanches MR, Suzuki LA, Guerra-Jr G, Farah SB, De Melio MR Molecular analysis of CVP21 and C4 genes in Brazilian families with the dessical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. Braz J Med Biol Res. 1995;29:1-13.
- Wilson RC, Wei JQ, Cheng KC, Mercado AB, New MI. Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80(5): 1635-40.
- Lau IF, Soardi FC, Lemos-Marini SH, Guerra-Jr G, Baptista MT, De Mello MR H28+C Insertion in the CYP21 gene: a novel frameshift mutation in Brazilian patient with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 2001;88: 5877-80.
- Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Pujil-Kuriyama Y. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxytase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. Proc Natl Acad Sci USA, 1996;83:2841-5.
- Wilson RC, Nimkarn S, Dumic M, Obeid J, Atar MR, Najmabadi H, et al. Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. Mol Genet Metab. 2007;90(4):414-21.
- Tusie-Luna MT, Treitman P, White PC. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. J Biol Chem. 1990;265(34):20916-22.
- Higashi Y, Hiromasa T, Tanae A, Miki T, Nakura J, Kondo T, et al. 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. 1991;109(4):638-44.
- Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, et al. Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab. 1995;83(12):4416-9.

Correspondence to:

Maricilda Palandi de Melo C8MEG-Unicamp Caixa Postal 6010 13083-875 Campinas, SP E-mail: mmello@unicamp.br

Arg Bras Endocrinol Metab 2008;52/8

ANEXO 5

Hypertension Research (2009) 0, 1–4 to 2009 The Japanese Society of Hypertension. All rights reserved 0.916-963-6609 \$32:00 www.colume.com.hr.

ORIGINAL ARTICLE

T allele of -344C/T polymorphism in aldosterone synthase gene is not associated with resistant hypertension

Riccardo Lacchini¹, Maricene Sabha¹, Fernanda B Coeli², Fabricio F Favero¹, Juan Yugar-Toledo¹, Tatiane C Izidoro-Toledo³, Valéria C Sandrim³, José E Tanus-Santos³, Maricilda P de Mello² and Heitor Moreno Jr¹

Resistant hypertension (RH) is the maintenance of elevated blood pressure concurrent with the use of three different antihypertensive drugs, one of which is a diuretic. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System plays a major role in volumedependent hypertension. Therefore, its components are interesting targets for genetic association studies. This work focused on the -344 C/T polymorphism in the CYP11b2 gene, which encodes aldosterone synthase. This work evaluates the association between T allele and resistance to anti-hypertensive treatment. Genotyping analysis included 88 subjects with RH, 142 who were responsive to anti-hypertensive treatment and 110 subjects as a control group. Plasmatic concentrations of aldosterone, renin and cortisol, carotid intima-media thickness and carotid-femoral pulse wave velocity were assessed in a smaller subset of hypertensive patients. An association was found between T allele and hypertension (P < 0.005), but there was no difference in allele frequencies between both hypertensive groups. There was no difference in plasmatic parameters either, in remodeling indicatos between the genotypic groups.

Hypertens Res (2009) 0, 000-000. doi:10.1038/tr.2008.36

Keywords: aldosterone; CTP11b2; pharmacogenetics; refractory hypertension; resistant hypertension

INTRODUCTION

Hypertension is one of the most important issues in public health care, and is associated with increased morbidity and mortality, mainly through its secondary consequences.

Resistant (or refractory) hypertension (RH) is defined as the maintenance of high blood pressure (140/80 mm Hg for systolicdiastolic arterial pressure, respectively; 130/80 in diabetics), concurrent with the use of three different anti-hypertensive drugs (one of which is a diaretic) in optimized doses, with a high compliance of the patient to treatment.1 One of the probable causes of resistance to antihypertensive treatment is the maintenance of an increased intravascular volume, even using dimetics, and, therefore, the Renin-Angiotensin-Aldostesone System may have a pisotal role to play in this phenomenon.² Among the genes that participate in this system, the gene that encodes aldostesone synthase (CYP11h2) is an interesting target for genetic association studies, as this enzyme is responsible for the final step of aldosterone synthesis in justaglomerular cells.³ Several studies focused on the -344C/T polymorphism, which is located in the promoter of this gene, in a region where the transcription factor, steroidogenic factor-1, binds to the promoter.4 This polymorphism could affect *CYP11b2* expression, and indirectly aldosterone release. Although there are some discordant reports, most of the studies link the T allele to detrimental effects in hypertensive subjects.³⁵⁻⁷ Moreover, there is an association between the T allele and higher plasma aldosterone levels in subjects with a high salt load.⁹

Higher levels of aldostexone are correlated to hazardous effects on the cardiovascular system higher arterial stiffness, assessed through carotid-femoral pulse wave velocity (PWV),⁹ and higher carotid intima-media thickness (IMT),¹⁰ both parameters considered as predictive factors for cardiovascular outcomes^{11,12}. Parthermore, two recent studies evaluating mineralocorticoid antagonists showed benefits that cannot be explained merely by the reduction in plasma wolume through aldosterone blockade^{10,14}. It has been shown that aldosterone has a synergic effect with angiotensin II on vascular smooth muscle cells growth; therefore, it can act directly on cardiovascular remodeling in noncontrolled hypertensive patients.¹⁵

This study aims to assess the relationship between T allele and the pharmacological resistance to anti-hypertensive treatment. In addition, this study also investigates the possible physiological alterations associated with genotypic influence on aldosterone release, such as

¹Cardiovascular Pharmacology Laboratory Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campines (UNICAMP), Campines, São Paulo, Brazil, ²Human Genetics Laboratory, Melecular Biology and Genetics Centre (CBMEQ), State University of Campines (UNICAMP), Campines, São Paulo, Brazil and ³Cardiovascular Pharmacology Laboratory, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirio Preto, State University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil Camepondence: RL acotini, Tessilia Vieira Camargo 126, Departmento de Farmacologia, Laboratinio de Farmacologia Cardiovascular, Campines, São Paulo, 13084-971, Brazil Camepondence: RL acotini, Tessilia Vieira Camargo 126, Departmento de Farmacologia, Laboratinio de Farmacologia Cardiovascular, Campines, São Paulo, 13084-971, Brazil E-amil: Leothi 400er acom br

Received 13 November 2008; accepted 11 December 2008;



plasmatic aldostesone, renin and cortisol; carotid IMT and carotidfemoral PWV.

METHODS

In this study, we included 340 subjects, 88 of whom had RH, 140 were responsive to anti-hypertensive treatment (RT) and 110 were healthy controls, using the JNC 7 criteria.¹ To investigate the genetic influence on physiological sten, we studied a smaller subset of patients, 36 of whom were RT and 42 RH, who were divided according to genotypes. Briefly, the inclusion criterion for the RH group was uncontrolled hypertension (systolic, SBP, and diastolic, DBP, blood pressures higher than 140mmHg and 80mmHg, respectively) concurrent with the use of three different anti-hypertensive drugs (among them is a diuretic) in optimal doars, with a high patient compliance to the treatment. The inclusion criterian for the RT group was controlled hypertension with up to three different anti-hypertensive drugs. The control group was defined as subjects with SEP and DBP below 140mm Hg and 80 mm Hg, respectively, with no familial history of cardiovacular diasases. All patients had, at least 6 months of follow-up, were compliant to treatment, and had signed the informed convent form. The exclusion criteria were concurrent cardiovascular, hepatic or renal diseases, drug abuse and noncompliance of the patient to acological treatment. This work was approved by the Haman Research Ethics Committee at the State University of Campinas

Blood pressure was assessed by a cabbrated aphygmomanometer with a meetury oduma, in a calm and quiet room, after 15min of resting time in sitting position. Batients were instructed to abtain from nicotine and calleine for at least 60 min before blood pressure measurements and at least 12h before 1MT and PWV exams. All subjects with high blood pressure had the diagnosis confirmed by 24h ambidatory blood pressure monitoring. Blood samples were collected after a 12h fasting period between 0800 and 0900h for laboratory examinations and for DNA extraction. Patient compliance was assessed by counting the tables.¹⁶ and 0.3 was the minimum value accepted for the administered/prescription tables net. DMT was assessed by a high-resolution ultra-sound using the Powervision 6000 (Toshiba, Japan) equipment, and PWV was determined using the Complior SP (Artech Medical, Fance) equipment, both following the manufacturer's protocols. DNA was extracted using the salting out method.

Genotyping of CYP11k2 =344GT polymorphism was carried out using the restriction fragment length polymorphism method. Polymersse chain maction (PCR) was carried out with primers forward (5°- AGG CGT GGG GTC TGG ACT = 3°), using the following steps: initial denaturation of 3 min at 94 °C, 30 cycles of denaturation (1 min at 93 °C), annealing (1 min at 68 °C) and extension (1 min at 72 °C) and a final extension step of 7 min at 72 °C. The amplified PCR product (223 ph) was then digested with an Harell endonuclease (New England Biobbs, USA) for 2 h at 37°C. The digestion product was separated finally by electrophoresis using a 3% METAPHOR agroups gd (Lonza, USA). The C allele of -344C/T polymorphism creates a new restriction site, hence CChoromygous individuals will generate two fragments (105, $\theta\theta$ and 53 pb), Tf homorygous individuals will generate two fragments (125, 106, θ and 53 pb). Figure 1 shows a digestion example.

Statistical analysis was performed as follows: Allelic and genotypic distributions were expressed as frequencies, and were compared using the chi-squared method. Numerical parameters were expressed as mean 1 s.d.; when comparing three groups, the text used was one-way ANOVA with Takey's post text, when comparing two groups, the Student's s-text was used. $P\!<\!0.005$ was considered as statistically significant.

RESULTS

The characteristics of the groups are shown in Table 1.

Genotypic and allelic frequencies are presented in Figures 2 and 3, respectively. All genotypic distributions were in the Hardy–Weinberg equilibrium (P=1 for the control group; P=0.7370 for RT group and P=0.7919 for RH group).



Figure 1 Restriction fragment length polymorphism of the *CYP11b2* gene. High-resolution agarose gel (3% wV) stained with ethicium bromide. Column A: ladter (50pb). Column B: polymeanse chain reaction (PCR) product not digested. Columns D and G: digested product; TT homozygous. Columns C, E, F and H: digested product; CT hetrozygous. The sizes of the fragments are indicated on both sides of the gel.

A smaller subset of the hypertensive patients (36 RT and 42 RH) was divided as CC, CT and TT genotype carriers to assess the genetic influence on plasmatic aldosterone, renin, cortisol and in remodeling indicators PWV and IMT (Table 2).

DISCUSSION

Two important findings reported here are the following: T allele of -344C/T polymorphism in the CYP11b2 gene is more frequent in both hypertensive groups when compared with control groups thus suggesting that this allele is associated with hypertension. The second important result is that there is no difference in T allele frequency when hypertensives that respond to treatment and those that are resistant are compared, thus suggesting that this allele is not linked to resistance to anti-hypertensive treatment.

Besides the association with hypertension phenotype, we found no alteration in plasmatic aldostesone in T allele carriers (CT and TT genotypes) compared with that in noncarriers. Low salt load in alimentation was used as one of the nonpharmacological approaches to the treatment of all hypertensive subjects. As the maintenance of high salt load stimulates aldostesone release, this may obscure the genetic influence of the Tallele on plasmatic aldosterone in the studied subjects. Iwai and colleagues⁶ found increased plasmatic aldosterone in T carriers with a high salt intake, which strengthens this hypothesis. Once the aldosterone concentration was not augmented in T allele

carriers, no subsequent alteration was expected to appear in PWV and IMT in CT and TT genotypic groups, as it indeed happened. It is QI interesting to observe that these is a clear association between RH and increases in IMT, as our group has earlier reported.¹⁷ However, the T CVP1162 and resistance to hypotension treatment

R Lacchini et al

Table 1 Important characteristics of control, RT and RH groups

8	Control	Responsive to treatment (RT)	Resistant hyperbrasiws (RH)	P	P"
	110	140	88		
Gender (MVF)	42%58%	32%,68%	32%/68%	CT×HT=0.1215	
				CT×HAR=0.1347	
				HT×HAR=0.9922	
Race (WB)	53%47%	71%/29%	55%/45%	CT×HT=0.0093*	
				CT×HAR=0.7554	
				HT×HAR =0.0231*	
Age (years)	453±7.7	50.6±14.1	50.6±9.9	0.0008*	CT xHT < 0.001*
					CT×HAR<0.01*
					HT×HAR >0.05
SBP (mm Hg)	116 ± 12	133±23	159±21	<0.0001*	CT xHT < 0.001*
					CT×HAR<0.001*
					HT×HAR <0.001*
DBP (mmHg)	80±8	83±13	97±14	<0.0001*	CT xHT> 0.05
					CT×HAR<0.001*
					HT×HAR <0.001*
Choiesteral (mg per 100 ml)	-	198.6±34.4	193.2±47.7	0.3765	
Triglycerides (mg per 100 ml)		147.8±74.5	158.2±113.1	0.458	
HDL (mg per 100 ml)		46.7±11.8	44.4±11.7	0.208	
LDL (mg per 100 ml)	-	122.3± 30.4	122.6±40.1	0.9517	
Blood glucose (mg per 100 ml)		99.6± 30.6	99.7±15.9	0.987	
BMI (kgm ⁻²)	-	28.8±48	31.4±6.3	0.0004*	
Number of anti-hypertensives (units)	_	2±076	3.6±1.1	<0.0001*	

Althrewistians, BM, kedy mensioning, DBP, diability blood premare, HDL, high-dentity ipoprolein, HMT, intro-media thickness, LDL, low-dentity ipoprolein, MMT, manufacture result, software velocity, SDP, systelity blood premare, WDL, when blacks.

Values presented as percentiles or means to d. "Statistical difference considered significant, P. Plakes of the delegared test or one-way ANGVA test. P. Plakes of Tubey's partiest when one-way ANGVA was significant.



Figure 2 Genotypic frequencies of -34407 polymorphism on the CYP11b2 gene in control, responsive to anti-hypertensive treatment (RT) and resistant hypertension (RH) groups. There is statistical of filerence between control and RT (P=0.021) and between control and RT (P=0.0448) groups. There is no difference between RT and RH groups (P=0.3079).

allele of aldosterone synthase did not affect this parameter, as we have reported here. Probably this allele influences acute aldosterone release; thus not reflecting the maintenance of high plasmatic aldosterone levels in the absence of a high salt load.

This study did not reproduce the results reported by Freel and colleagues.³ They hypothesized that the Tallele of the *CYP11b2* gene would be in linkage disequilibrium with another unknown genetic factor in *CYP11b1*, which controls cortisol production. In that study, the T allele in *CYP11b2* was linked to higher plasmatic cortisol concentrations, thus leading to a higher ACTH drive, and indirectly



Figure 3 Aliclic frequencies of -3440/T polymorphism on the *CP11b2* gene in control, responsive to anti-hypertensive treatment (RT) and resistant hypertension (RH) groups. There is statistical difference between control and RT (*P*=0.0094) and between control and RH (*P*=0.0174) groups. There is no difference between RT and RH groups (*P*=0.9272).

to augmented aldosterone plasmatic concentrations. In this study, **Q2** however, neither aldosterone nor cortisol was augmented in CT and TT groups. The biochemical mechanism behind the influence of T allele of the studied polymorphism on hypertension has yet to be elucidated, especially in individuals with controlled alt load.

An important feature of this study is that resistant hypertensive subjects have been extensively well characterized. All confounding factors such as heavy smoking, alcohol abuse, noncompliance to the pharmacological treatment and secondary causes of hypertension have been thoroughly investigated. The three genotyped groups had similar

Hypertension Research

œ

CVP1152 and resistance to hypertension treatment R Larchini et al

•

Table 2 Differences in physiological parameters between CC, CT and TT genotypic groups

Parameter	cc	ст	π	P
	6	43	29	-
Frequencies (%)	7.7	551	37.2	
SBP (mm Hg)	139±18	150±19	148±19	0.4305
DBP (mmHg)	88±7	95±10	94±9	0.2267
Aldesterone (gg ml ⁻¹)	24.0±20.3	17.2±9.0	14.9±5.2	0.0918
Renin (pgml ⁻¹)	1.8±1.7	3.7±6.1	5.2±8.6	0.5086
Cartisal (ug per 100 mi)	14.0±3.1	14.0±6.9	12.0±4.6	0.4129
IMT (mm)	0.63±0.11	0.64±0.20	Q65±0.16	0.9565
PWV (ms ⁻¹)	8.9±1.2	9.3±1.6	8.9±1.5	0.5265
Number of anti-hypertensives (units)	2.5±0.5	3.2±1.1	3.1±1.2	0.3551

Abbreviations, CDP, distolic blood genoues, INT, intro-media thickness, PWJ, pulse wave wights, SDP, restdic blood greenare.

Values paramind as Meanst s.d. Three gauge compared by one-way ANOVA followed by Takejn portient. There were no statistical differences between groups.

characteristics, and although there were some differences in black and white frequencies in the RT group, our control group matched the RH group adequately. In addition, the subset of patients who were used to assess the genetic influence on physiological parameters showed, between groups, differences only in those parameters that were really expected to show differences, such as blood pressure, IMT and the number of anti-hypertensive drugs used (not shown).

As a limitation of this study, we should mention the small number of subjects in the RH group, both for genotyping, and for physiological assessment. The difficulty in achieving a larger group of RH subjects is the long duration of follow-up that is required for a reliable diagnosis. Moreover, we had some differences in the body mass index (BMI) on RT and RH groups. However, these differences have been neutralized in the smaller subset of patients used for physiological study.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to sincerely thank Leoni Adriana de Soura and Samira Ubaid Girioli for their instimulie contribution to the studied patient's health care. Financial Support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conzelho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Peacoal de Nivel Superior (CAPES)

CONFLICT OF INTEREST None.

- 1. Chobanian AV, Babris GL, Black HR, Curhman WC, Green LA, Iazo Jr JL, Jones DW,
- Createrian AV, Bahrs GL, Black HY, Coshman WC, Green LA, Leo Jr JL, Jones DW, Malence BJ, Oparl S, Wyley Li J J, Roccial E J. The Seventh Report of the Joint National Committee on Persentian, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure the JNC 7 report. JAMA 2023; 2839: 5560–2572. Galdam KK, Nohi ada MK, Path-Rasman MN, Pimenta E, Atan L, Oparl S, Calhoum DA, Ghanchen and previous technical association between restatet hyperies-sion, altitotheme, and previous technical evaluate expansion. Arch Interv Med 2008; 168: 1159–1164.

- 3 Frei EM, Ingram M, Friel EC, Fraser R, Bown M, Samani NJ, Gaulfield M, Munroe P, Famili M, Websler J, Gayton D, Dominicosk AF, Davies E, Connel JM. Phenotypic consequences of variation across the aldosterone synthese and 11-beta hydroxylase tocus in a hypothesis ecotoric data from the MRC BRGHT Study. *Chr. Esdostical* (Cel locus in a hypetensis 2007; 67: 832-838
- White PC, Slutsker L. Hiptotype analysis of CVP1182. Enderr Ret 1995: 21. 4 437-442
- 5 Freitas SR, Cabello PH, Moura-Neto RS, Colimby LC, Lima AB, Barros M, Bittencourt I, Control II., Analysis of renon-angetermin-al-desterone system gene polymorphisms in existent hyperkension. Bits: J Med Biol Res 2007, 40, 309-316.
- Higen KF, Schnidt SM, Gene variants of aldosterone synthuse and hypertension. *J hypertens* 2005; 23: 1957–1959.
 Daviss E, Hollowy CD, Ingan MC, Inglis GC, Friel EC, Morrison C, Anderson NH, Fraser R, Carnell JM. Aldosterone scientism ate and blood pressure in essential
- genfernon as related to polymorphic differences in the advolveme synthese gene VP1182, Hypertension 1999, 33: 703-707, ed. N. Kajimoto K, Tomoke H, Takashima N, Polymorphism of CVP1182 delemines 8
- Berry, Kapitolov, K. Mitolski, K. Lakashnar, 2007, 49 (2004)
 Park S, Nim JB, Shim CY, Ko VG, Choi D, Jang Y, Grang N. The influence of seram aldrahemes and the aldolerone-renin ratio on pulse wave velocity in hypothemistry patients. J Hypothemiol 207, 25: 1279–1283.
 Holuy R, Selinka T, Wichterle D, Petrak Q, Strauch B, Widlimsky Jr J. Increased informa-
- media bitchness of the common candid arbery in primary al determinin in comparison with essential hyperbonics. J Nigordens 2007; 25: 1451–1457. 11 Boutnuyrie I? Topeano Al, Aumir R, Gautier I, Bentos A, Lacotley R, Laurent S. Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hyperbonice.
- patients: a longitudinal study. Hyperterator 2002; 39: 10–15. 12 Laurent S, Cockordt J, Vin Bortel L, Boutouyre P, Giannattario
- nio C, Hayoz D, Pannier B, Vachopoulos C, Wilkinson I, Straijker-Boudier H. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. Ex Next J 2006; 27. 2588-2605
- 2.1 2000-2000 PHI B, Zumad F, Remme WJ, Goly R, Gastaigne A, Pene A, Palemky J, Wittes J The effect of spronolactone on modality and mortality in patients with severe heart 13 failure. Randomiaed Aldectone Evaluation Study Investigators. N Engl J Med 1999; 341:709-717
- Sell FORMER, W. Zamad F, Neaton J, Mirtinez F, Ronker B, Biltman R, Hurky S, Kleiman J, Gatin M. Epierenne, a selective addeterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003; 348: 1990-1991. 1309-1321
- 15 Schillrin EL. Effects of addressments the vacuature. Agr-elession 2006; 47: 312-318 16 Taylor DW Sackett DL, Haynes RB, Johnson AL, Gibson ES, Roberts RS, Compliance
- eth antihypertensive drug theory. Ann NY Acad. Sci. 1978; 304: 390-403. 17 Cittadino M, Goncalves de Souse M, Uga-Toledo JC, Rocha JC, Tanus Santos JE,
- Moreno Jr H. Biochemical endothelial markets and cardiovascular remodeling in refractory aterial hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2003, 25: 25–33.

Hypertension Research