

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/40638
IB/81497

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

L36



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

IVY FREITAS LAU

ANÁLISE MOLECULAR DE ALELOS MUTANTES
RAROS NO COMPLEXO GÊNICO DA ENZIMA 21-
HIDROXILASE

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a)	Ivy Freitas Lau
aprovada pela Comissão Julgadora.	07/01/2000

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

Orientadora: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Campinas, 1999



UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMADO DE	40638
PREÇO	278100
C	☐
D	☒
PREÇO	811,00
DATA	18/03/00
N.º CPD	

CM-00139017-1

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

Lau, Ivy Freitas

L36a Análise molecular de alelos mutantes raros no complexo gênico da enzima 21-hidroxilase/Ivy Freitas Lau.-- Campinas, SP: [s.n.], 2000. 135f: ilus.

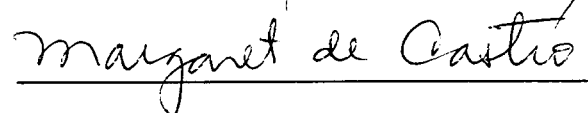
Orientadora: Maricilda Palandi de Mello
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

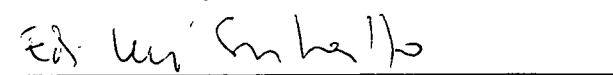
1. Hiperplasia congênita da adrenal. 2. Mutações. 3. Enzima 21-hidroxilase(CYP21). I. Mello, Maricilda Palandi de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 07 de janeiro de 2000

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. **MARICILDA PALANDI DE MELLO** (Orientadora) 

Profa. Dra. **MARGARETH DE CASTRO** 

Profa. Dra. **EDI LÚCIA SARTORATO** 

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	i
ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
1. Hiperplasia Congênita da Adrenal.....	3
2. Estrutura e função do córtex da Adrenal.....	3
3. Esteroidogênese.....	4
4. Deficiência da 21-hidroxilase.....	7
5. Características clínicas da deficiência da 21-hidroxilase.....	8
6. Herança e Incidência.....	10
7. Diagnóstico laboratorial.....	11
8. A enzima 21-hidroxilase.....	12
9. Mapeamento do gene CYP21.....	13
10. Formação de rearranjos gênicos e variabilidade do cluster.....	16
11. Mutações pontuais.....	19
12. Microconversão.....	20
13. Mutações ausentes em CYP21P.....	24
14. Polimorfismos neutros.....	27
15. Dificuldade na correlação entre genótipo e fenótipo.....	28
OBJETIVOS.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
1. Casuística.....	39
2. Obtenção das amostras.....	43
3. Extração de DNA genômico a partir de sangue total (Araujo <i>et al.</i> , 1996).....	43
4. Gel de eletroforese.....	44
5. Amplificação por reação de polimerização em cadeia-PCR (Polymerase Chain Reaction)....	45
6. PCR alelo-específico.....	49
7. Reação de sequenciamento.....	50
8. Gel de sequenciamento.....	51
9. Análise da Sequência.....	52
10. Reação de digestão com enzimas de restrição (Sambrook <i>et al.</i> , 1989).....	52
11. Precipitação ressuspensão do DNA.....	53

12. Recuperação e purificação dos fragmentos.....	53
13. Transferência do DNA para suporte sólido ('Southern blotting').....	54
14. Sondas utilizadas.....	55
15. Marcação das sondas.....	56
15.1 Random priming.....	56
16. Purificação da sonda.....	56
17. Pré-hibridização e Hibridização.....	57
17.1 Pré-hibridização.....	57
17.2 Hibridização.....	57
18. Lavagens.....	58
19. Auto-radiografia e estripagem das membranas.....	58
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
1ª Parte: IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES PONTUAIS.....	62
1. Identificação da mutação L107R.....	65
2. Identificação da mutação L142P.....	67
3. Identificação da mutação IVS2AS, A→G,-2.....	69
4. Identificação da mutação H38+C.....	73
5. Ausência da mutações demonstráveis.....	75
6. Identificação de Δ8.....	79
7. Variações encontradas no gene CYP21.....	81
2ª Parte: PADRÕES RAROS DE RFLP.....	85
8. RFLP de 3,9 kb em 'blot' de <i>Taq</i> I com sonda para C4.....	85
9. RFLP de 5,6 kb em 'blot' de <i>Taq</i> I com sonda para CYP21.....	90
CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
ANEXO I.....	117

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Pág
Figura 1: Controle do eixo hipotálamo-hipofisário-córtex da Adrenal.....	5
Figura 2: Esteroidogênese. Via metabólica dos hormônios esteróides.....	6
Figura 3: Mapa do complexo gênico da 21-hidroxilase.....	15
Figura 4: Mecanismos de conversão gênica.....	18
Figura 5: RFLP com a enzima <i>Taq</i> I da família 22.....	41
Figura 6: RFLP com a enzima <i>Taq</i> I da família 26.....	42
Figura 7: Esquema do gene CYP21 e posição de anelamento dos 'primers' utilizados.....	46
Figura 8: Seqüenciamento com Int3as e heredograma da Família 10. Mutação L107R.....	66
Figura 9: Seqüenciamento com Int3as e digestão com Pvu II do PCR Ex3ns-Ex6as da família 24. Mutação L142P.....	68
Figura 10: Seqüenciamento com Ex8na do indivíduo 24Xa1.....	70
Figura 11: Seqüenciamento com Int3as e digestão com Pst I do PCR Ex3ns-Ex6as da família 39. Mutação IVS2, A→G, -2.....	72
Figura 12: Seqüenciamento com Int1as e PCR alelo-específico para a mutação H38+C.....	74
Figura 13: Seqüenciamento com Int3as e PCR alelo-específico para a mutação Sp2 da família 27.....	76
Figura 14: Seqüenciamento com Int3as do indivíduo 26Xa1. Mutação Δ8+conversão.....	80
Figura 15: Seqüenciamento com Proex1s indicando o polimorfismo de leucinas.....	83
Figura 16: RFLP com 'blot' de <i>Taq</i> I e hibridização de sondas para C4 e CYP21 da família 26 e um indivíduo normal.....	88
Figura 17: Mapa esquemático do gene C4 indicando localização do sítio de <i>Taq</i> I.....	89
Figura 18: Digestão do fragmento de C4B1s-C4B1as com <i>Taq</i> I e seqüenciamento do fragmento, família 26.....	89
Figura 19: Digestão do fragmento 3'21Bs-3'21Bas com a enzima <i>Taq</i> I e seqüenciamento do fragmento, família 22.....	93
Tabela 1: Mutações 'missense' e 'nonsense' no gene CYP21.....	31
Tabela 2: Mutações em sítios de 'splicing' no gene CYP21.....	32
Tabela 3: Microdeleções e inserções no gene CYP21.....	32
Tabela 4: Famílias que apresentam polimorfismos de RFLP.....	39
Tabela 5: Famílias selecionadas para a análise de mutação pontual rara.....	40
Tabela 6: 'Primers' utilizados para a seleção do gene CYP21.....	45
Tabela 7: 'Primers' desenhados para amplificar e seqüenciar o gene CYP21.....	47

Tabela 8: 'Primers' desenhados para amplificar região 5' do gene C4B e 3' de CYP21.....	47
Tabela 9: 'Primers' desenhados para funcionarem em reação alelo-específica da mutação H38+C	49
Tabela 10: Resumo das mutações identificadas nas famílias estudadas.....	64
Tabela 11: Tabela de polimorfismos na região da junção íntron 2/éxon 3.....	77
Tabela 12: Polimorfismos encontrados em mais de um indivíduo.....	84
Tabela 13: Polimorfismos encontrados em um único indivíduo em estudo.....	86
Tabela 14: Mutações encontradas nas famílias portadoras de alelos raros de RFLP.....	92

ABREVIATURAS UTILIZADAS

17-OHP- 17-hidroxiprogesterona
Δ4-A - Δ4-androstenediona
ACTH - hormônio adrenocorticotrófico
BSA - soro albumina bovina
C4 - gene do quarto componente do sistema complemento
cAMP - adenina monofosfato cíclica
cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar
cpm - contagens por minuto
CRH - hormônio liberador de corticotropina
CYP21 - gene da enzima 21-hidroxilase
CYP21P- pseudogene da 21-hidroxilase
DNA - ácido desoxirribonucleico
DHEA - desidroepiandrosterona
DMSO - dimetilsulfóxido
dNTP - conjunto de quatro desoxirribonucleotídeos
DOC - desoxicorticosterona
EDTA – etilenediaminotetracetato dissódico.2H₂O
HCA - hiperplasia congênita da adrenal
HLA - antígenos leucocitários humanos
kb - quilobase
mRNA - ácido ribonucleico mensageiro
NADPH - nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato reduzida
nt- nucleotídeo
pb - pares de bases
PCR - reação em cadeia da polimerase
RNA - ácido ribonucleico
rpm - rotações por minuto
SDS - dodecil sulfato de sódio
TBE - tampão Tris/Borato/EDTA
TE - tampão Tris/EDTA

RESUMO

A Hiperplasia Congênita da Adrenal (HCA), uma doença autossômica recessiva que resulta na deficiência de produção de cortisol, é causada em >90% dos casos pela deficiência da enzima 21-hidroxilase (21OH). A doença é monogênica e o gene foi mapeado no braço curto do cromossomo 6, em íntima associação com Complexo Maior de Histocompatibilidade Humano. Existem duas cópias do gene da 21OH no genoma humano: CYP21 e CYP21P. Apesar da alta homologia existente entre as duas cópias (98% entre éxons), apenas CYP21 é um gene funcional, enquanto CYP21P é um pseudogene, devido a várias mutações deletérias adquiridas. Cada gene está associado a um dos genes que codificam para o quarto componente do Sistema Complemento, C4A e C4B, formando duas unidades duplicadas que se repetem em tandem. O alto grau de homologia entre as unidades C4A/CYP21P and C4B/CYP21 facilita a ocorrência de pareamento desigual nesta região. Alelos com deficiência da enzima 21OH surgem frequentemente através de dois mecanismos de recombinação entre os genes CYP21 e CYP21P: o 'crossing-over' desigual durante a meiose, originando alelos com deleções gênicas; e a conversão gênica, que resulta na transferência de mutações presentes no pseudogene para o gene CYP21. Os eventos de deleção e conversão gênica em larga escala têm sido estudados por 'Southern blot' e hibridização com sondas específicas para CYP21 e C4, enquanto que as microconversões são analisadas por ASOH e PCR alelo-específico. Estudos iniciais revelaram que aproximadamente 15% dos alelos não apresentavam nenhuma alteração detectável por estes métodos, indicando talvez que novas mutações poderiam ser responsáveis pela doença. Neste estudo, no intuito de pesquisar por possíveis novas mutações, sequenciamos por inteiro o gene CYP21 em 7 famílias onde nenhuma mutação foi encontrada em pelo menos um dos alelos. Quatro novas mutações foram descritas neste trabalho. As mutações L107R e L142P são mutações do tipo 'missense', que resultam na substituição de aminoácidos, levando à diminuição da eficiência da enzima. A mutação IVS2AS,A→G,-2 está posicionada no dinucleotídeo conservado do sítio de 'splice' do íntron 2, o que interfere na formação de um mRNA funcional a partir deste alelo. A mutação H38+C refere-se à inserção de um nucleotídeo no exon 1 do gene CYP21, levando à alteração do quadro de leitura e terminação prematura da tradução do mRNA, devido à criação de um 'stop' códon. Identificou-se a mutação Δ8 em um paciente, resultante de um evento mais extenso de microconversão em um dos pacientes, que não havia sido anteriormente detectado. Não foi possível identificar nenhuma mutação nova em dois pacientes da amostra. Entretanto, a perda de um alelo durante a realização de PCR poderia explicar a ausência de mutações. Em nossa amostra, a não amplificação alélica foi associada aos genótipos C/A ou C/G, na posição 656 do gene. Dois padrões raros de RFLP com a enzima *Taq I* para os genes C4 e CYP21 foram caracterizados. A banda de 3,9 kb para o gene C4 foi originada pela criação

de um sítio de restrição de *Taq* I, resultante da mutação G→A na posição 116 do gene C4. A banda de 5,6 kb para o gene CYP21 foi criada em consequência da perda de um sítio de restrição para *Taq* I na região 3' do gene, resultante da mutação C→T na posição 3653. Apesar de ambos os alelos não estarem relacionados diretamente na doença por deficiência da 21-hidroxilase, a sua presença interfere significativamente na interpretação de 'blots' com a enzima.

ABSTRACT

Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH), an autosomal recessive disorder resulting in cortisol deficiency, is caused by 21-hydroxylase (21-OH) deficiency in >90% of cases. This monogenic disorder is closely linked to the HLA major histocompatibility complex on the short arm of chromosome 6. There are two 21-OH genes in the human genome: CYP21 and CYP21P. Despite of the high homology shared by copies (98% identical in exons), only CYP21 is a functional gene whereas CYP21P is a pseudogene, due to various deleterious mutations. Each gene is associated with one of fourth component of Complement genes, C4A and C4B, producing tandemly duplicated units. The high degree of homology between the units C4A/CYP21P and C4B/CYP21 facilitates unequal crossover in this region. Deficiency alleles frequently arise from recombination mechanisms between CYP21 and CYP21P genes: unequal crossover during meiosis, originating gene deletions, and gene conversion, resulting in the transfer of mutations from CYP21P to CYP21. Gene deletion and conversion events in large scale have been studied by Southern blot hybridization with CYP21 and C4 specific cDNA probes. Microconversion events have been identified by ASOH and allele-specific PCR. Early studies have demonstrated that about 15% of the alleles have no alterations detectable by this methodology, which possibly indicates that new mutations may account for the disease. In this study, in order to search for putative new mutations, we have sequenced the entire CYP21 gene of 7 families where no alteration was identified at least in one of alleles. Four new mutations were here described. The L107R and L142P are missense mutations, which result in aminoacid substitutions and would account for enzymatic impairment. The IVS2AS,A→G,-2 mutation is located in the conserved dinucleotide splice site, which interferes with the formation of a functional mRNA from this allele. The H38+C is a nucleotide insertion in exon1 leading to frameshift and premature termination of translation, due to creation of a stop codon. A $\Delta 8$ mutation originated by a more extensive microconversion event was identified in one patient. Two patients failed to carry any demonstrable mutation, but allele dropout during PCR might account for the absence of new mutations. In our study, the allele dropout was associated to the genotypes C/G or C/A, at 656 position. We were also able to characterize two rare *Taq* I RFLP alleles. The C4 gene 3,9 kb *Taq* I fragment results from a new *Taq* I restriction site created by the G→A mutation, at nt 116. The CYP21 5,6 kb *Taq* I fragment was originated in consequence of the lost of *Taq* I restriction site in the 3' region of CYP21, due to C→T mutation, at nt 3653.

INTRODUÇÃO

1. Hiperplasia Congênita da Adrenal

Hiperplasia Congênita da Adrenal (HCA) é o termo aplicado para a família de patologias endócrinas inatas resultantes da deficiência de uma das cinco enzimas requeridas para a síntese do cortisol a partir do colesterol (Calliari, 1992; White *et al.*, 1987a, 1987b; Huma *et al.*, 1995; Migeon e Donohoue, 1991). O cortisol é sintetizado num processo denominado de esteroidogênese, localizado no córtex da adrenal (Higashi *et al.*, 1988a; Miller e Morel, 1989).

2. Estrutura e função do córtex da Adrenal

As glândulas adrenais, ou supra-renais, situam-se no pólo superior de cada um dos rins e são constituídas por duas camadas distintas: o córtex, mais periférico, e a medula, localizada ao centro. Por terem origem embrionária diversa (mesoderme e ectoderme, respectivamente) estas duas camadas podem ser consideradas dois órgãos distintos, unidos apenas topograficamente (Monte *et al.*, 1998; New *et al.*, 1989). O córtex é formado por três camadas concêntricas histologicamente distintas: a zona glomerulosa, sendo a mais externa e constituindo aproximadamente 15% do córtex; a zona fasciculada, intermediária, abrangendo 75% do córtex; e a zona reticular, a mais interna, com 10% (Junqueira e Carneiro, 1990). No córtex da adrenal são sintetizados 3 grupos de hormônios a partir do colesterol: os mineralocorticóides, os glicocorticóides e os esteróides sexuais, predominantemente esteróides androgênicos (Junqueira e Carneiro, 1990; Miller, 1991; New *et al.*, 1989). Além das diferenças histológicas entre as zonas do córtex, existe também variação na atividade de algumas enzimas esteroidogênicas, resultando na secreção diferenciada dos esteróides: a zona glomerulosa é responsável pela secreção do principal mineralocorticóide, a aldosterona; a zona fasciculada produz e secreta os glicocorticóides e, eventualmente, andrógenos; e a zona reticular é produtora de andrógenos (Monte *et al.*, 1998; New *et al.* 1989; White *et al.*, 1994; Junqueira e Carneiro, 1990).

O cortisol é o principal glicocorticóide produzido pelo córtex da adrenal e quantitativamente é seu principal produto de secreção (Calliari, 1992; New *et al.*, 1989; White *et al.*, 1994). Afeta principalmente o metabolismo proteico, lipídico e dos carboidratos. Promove catabolismo proteico, com conseqüente elevação da produção de

glicogênio (neoglicogênese) e a elevação da concentração da glicose no plasma sanguíneo (Junqueira e Carneiro, 1990). A aldosterona e outros esteróides com atividade de mineralocorticóides (corticosterona e desoxicorticosterona) atuam nos túbulos renais aumentando a reabsorção de íons de sódio pelos rins, da saliva e trato gástrico (Miller e Morel, 1989; White *et al.*, 1994). Os andrógenos da adrenal, principalmente a androstenediona e a testosterona, são responsáveis pelo desenvolvimento sexual normal e caracteres sexuais secundários no homem e pelos pêlos púbicos e axilares nas mulheres (New e Crawford, 1994; Calliari, 1992; Miller e Morel, 1989). As mesmas enzimas que produzem os hormônios esteróides na adrenal são necessárias para a produção de testosterona e estrógeno pelas gônadas (New, 1994; Speiser e New, 1989).

A síntese de cortisol na zona fasciculada está sob o controle do Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH) produzido pela adeno-hipófise. Sua secreção é controlada e induzida pelo sistema nervoso central, através da ação Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH) produzido pelo hipotálamo. Os níveis circulantes de cortisol plasmático, por sua vez, são responsáveis pelo controle do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, regulando a produção do ACTH e do CRH, num mecanismo denominado de retroalimentação ou 'feedback' negativo (figura 1A) (Strachan, 1990; White *et al.*, 1987a; New, 1995; Calliari *et al.*, 1992, Speiser e New, 1989). Altos níveis de cortisol no soro inibem a liberação de CRH e ACTH enquanto que baixos níveis têm atuação contrária. O hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), secretado pela hipófise, age diretamente nas células da zona fasciculada, mobilizando o colesterol de seus reservatórios para a esteroidogênese, aumentando a síntese de cortisol (Miller e Levine, 1987; Calliari, 1992; Monte *et al.*, 1998; New e Crawford, 1994; Miller e Morel, 1989; White *et al.*, 1994).

3. Esteroidogênese

Ao se ligar aos receptores de superfície das células do córtex da adrenal, o ACTH ativa a adenilato ciclase e aumenta os níveis intracelulares de 3'-5' monofosfato de adenosina cíclica (cAMP). Quinases dependentes de cAMP, ao seu turno, estimulam a fosforilação e ativação da colesterol éster hidrolase, enzima responsável pela mobilização do colesterol das reservas citoplasmáticas. O colesterol livre é transportado para a

mitocôndria onde é convertida para pregnenolona, pela enzima colesterol 20,22-desmolase (P450_{ssc}) (figura 2).

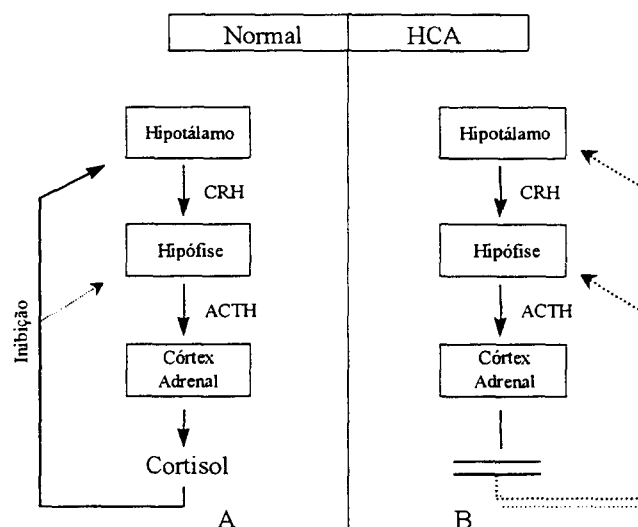


Figura 1: Regulação da produção de cortisol através do sistema de 'feedback' negativo sobre o eixo hipotálamo-hipofisário. **A.** Sob condições normais, o cortisol produzido no córtex da adrenal inibe a liberação dos hormônios CRH e ACTH. **B.** Em indivíduos afetados por HCA, não ocorre a inibição do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

(Migeon e Donohoue, 1991; Miller e Morel, 1989; Miller, 1991; White *et al.*, 1987a, b; New *et al.*, 1989). A enzima colesterol 20,22-desmolase é uma enzima específica mitocondrial da família do citocromo P450, ligada à membrana interna. A pregnenolona formada é precursora em comum dos esteróides produzidos na adrenal. O aumento da produção de pregnenolona é o efeito imediato do estímulo do ACTH no processo da esteroidogênese. O estímulo prolongado pelo ACTH resulta no aumento da síntese das quatro enzimas citocromo P450 requeridas para a síntese do cortisol e enzimas para armazenamento, síntese e transporte de colesterol, através do estímulo da transcrição dos genes correspondentes, por fatores ainda não elucidados (White *et al.*, 1987; New *et al.*, 1989; Miller e Morel, 1989; Miller, 1991).

Na via dos glicocorticóides, a pregnenolona formada deixa a mitocôndria e, no retículo endoplasmático, é desidrogenada na posição 3 β pela 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD), originando o composto progesterona. A quase totalidade da

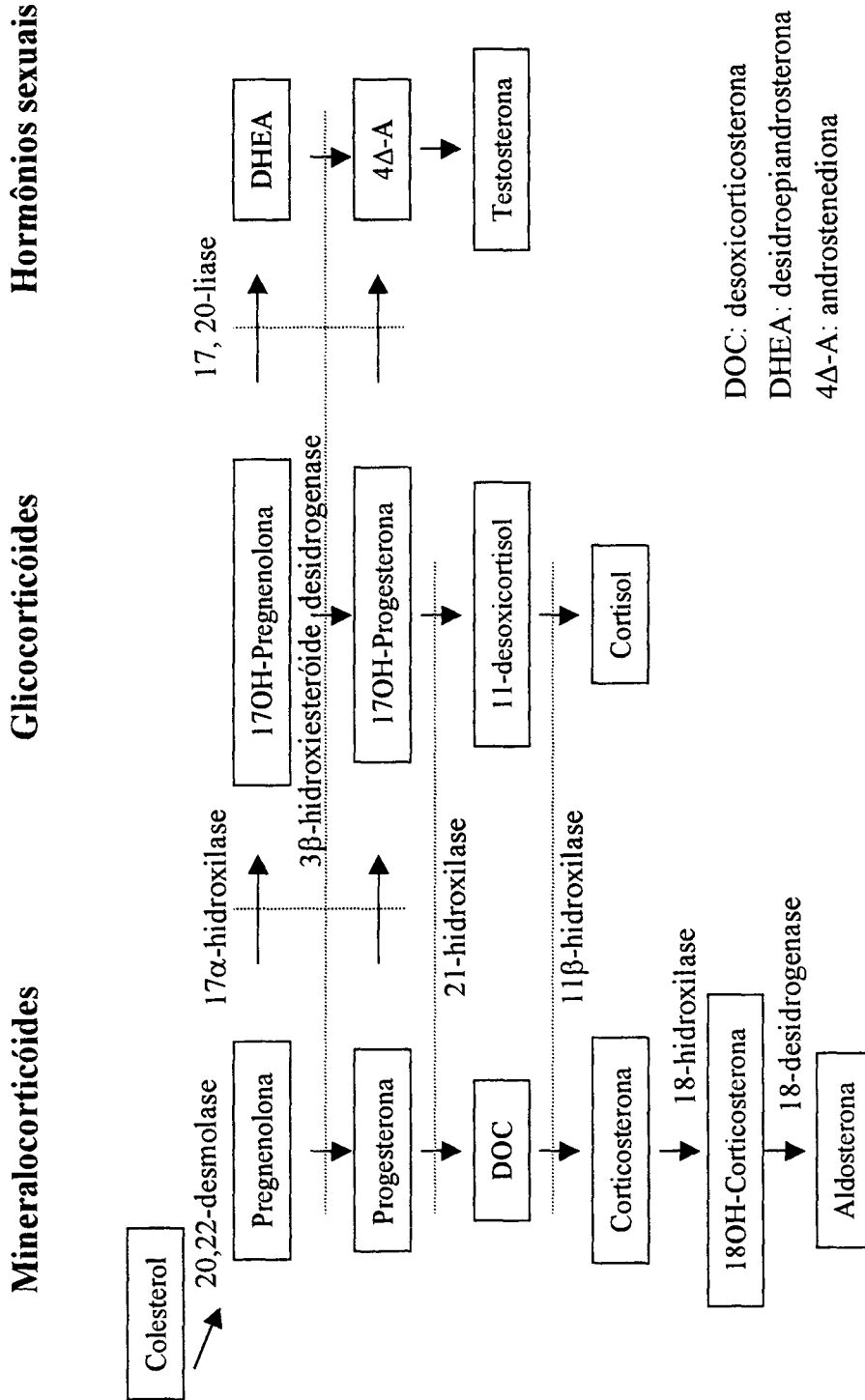


Figura 2: Vias metabólicas dos mineralocorticóides, glicocorticóides e hormônios sexuais produzidos no córtex da adrenal. Baseado em Calliari *et al.* (1992).

progesterona produzida na zona fasciculada é hidroxilada na posição C-17 α por uma enzima microsomal específica, a 17 α -hidroxilase (P450c17), formando 17-hidroxiprogesterona (17-OHP). No passo seguinte, a 17-OHP é hidroxilada na posição 21 por outra enzima microsomal da família do citocromo P450, a 21-hidroxilase (P450c21), produzindo o esteróide 11-desoxicortisol. O composto é transportado de volta para a membrana interna da mitocôndria, onde sofre hidroxilação por uma quarta enzima da família do citocromo P450, a 11 β -hidroxilase (P450c11), finalmente dando origem ao cortisol (figura 2) (New *et al.*, 1989; White *et al.*, 1987a, c; Migeon e Donohoue, 1991; Miller e Morel, 1989; Miller, 1991; Huma *et al.*, 1995).

A produção e secreção da aldosterona, o principal mineralocorticóide, está sob o controle do sistema renina-angiotensina, que é ativado pela queda nos níveis plasmáticos de sódio, da pressão arterial renal e perda aguda de volume e eletrólitos (White *et al.*, 1987a, b; New *et al.*, 1989). A angiotensina atua via receptores específicos que utilizam a proteína quinase C como segundo mensageiro. Na via sintética da aldosterona, não há a ação da 17 α -hidroxilase sobre a progesterona, pois esta enzima não é produzida na zona glomerulosa. A progesterona é sucessivamente hidroxilada nos carbonos 21, 11 β e 18, formando respectivamente desoxicorticosterona, corticosterona e 18-hidroxycorticosterona, utilizando as mesmas enzimas envolvidas na produção do cortisol (P450c21 e P450c11). Posterior oxidação da 18-hidroxycorticosterona pela enzima P450c11 origina a aldosterona (Miller e Morel, 1989; New *et al.*, 1989).

Na via dos andrógenos, a enzima P450c17 atua como 17,20-liase, convertendo a 17-hidroxipregnenolona e 17 α -hidroxiprogesterona nos andrógenos desidroepiandrosterona (DHEA) e Δ 4-androstenediona, respectivamente. O andrógeno DHEA dá origem à Δ 4-androstenediona, pela ação da 3 β -HSD, que é reduzida a testosterona pela enzima 17-cetoesteróide redutase (New *et al.*, 1989; Huma *et al.*, 1995).

4. Deficiência da 21-hidroxilase

A deficiência da enzima 21-hidroxilase é a forma mais comum de HCA, sendo responsável por aproximadamente 90% dos casos (White *et al.*, 1987a, b; Miller e Levine,

1987; New *et al.*, 1989; New *et al.*, 1983). A deficiência das enzimas 11 β -hidroxilase, 17 α -hidroxilase e 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase também são relatadas como causadoras de HCA.

Em portadores da deficiência da 21-hidroxilase o composto 17-OHP não é convertido a 11-desoxicortisol, tornando ineficiente a síntese de cortisol. Os baixos níveis de cortisol plasmático induzem o desbloqueio do 'feedback' negativo existente, determinando o aumento da secreção do hormônio ACTH no sangue por parte da adenohipófise (figura 1B) (Strachan, 1990; Huma *et al.*, 1995). Além de estimular a hiperplasia do córtex da adrenal, a atuação do ACTH sobre as células da zona fasciculada induz a transcrição das enzimas esteroideogênicas, principalmente P450ssc (Miller, 1991; New, 1989). O processo culmina na super produção e acúmulo dos compostos que antecedem o bloqueio: a progesterona, na via dos mineralocorticóides, e a 17-OHP, na via dos glicorticóides. Como consequência, ocorre um desvio da síntese no sentido da produção e secreção dos andrógenos desidroepiandrosterona (DHEA) e Δ 4-androstenediona (considerado um andrógeno de atividade moderada), sendo este último convertido a testosterona, em níveis muito acima do normal (Calliari *et al.*, 1992; White *et al.*, 1987; Miller e Morel, 1989; Migeon e Donohoue, 1991). As funções do córtex da adrenal estão totalmente ativas a partir do 3º mês de gestação, expondo o feto a níveis aumentados de andrógenos numa fase crítica para o desenvolvimento sexual, originando indivíduos femininos com ambigüidade genital ao nascimento.

5. Características clínicas da deficiência da 21-hidroxilase.

A HCA por deficiência da 21-hidroxilase ocorre num amplo espectro de variantes clínicas que podem ser agrupadas em duas categorias: **clássica**, apresentando duas divisões fenotípicas, perdedora de sal (PS) e virilizante simples (VS), e a **não-clássica** (NC). No geral, o quadro clínico da doença depende da intensidade e do nível do bloqueio enzimático (Calliari *et al.*, 1992; Miller e Morel, 1989; New, 1995; Helmberg, 1993; Miller, 1991).

A forma clássica da deficiência da 21-hidroxilase envolve bloqueio completo ou próximo do total da atividade enzimática da 21-hidroxilase e está clinicamente presente ao nascimento (Strachan, 1990; Helmberg, 1993; Miller, 1991). Assim, o neonato do sexo feminino apresenta ambigüidade genital em diversos graus, variando de uma leve

clitoromegalia até a completa fusão dos grandes lábios formando um escroto, sem que este no entanto apresente gônadas.

O sexo genético e a diferenciação gonadal são sempre normais em pacientes com HCA. A diferenciação dos órgãos internos masculinos estão sob o controle de mais dois hormônios produzidos em quantidades suficientes apenas pelos testículos: a testosterona, que direciona a formação das estruturas genitais masculinas a partir dos ductos de Wolff, e o Hormônio anti-mülleriano (AMH), que suprime o desenvolvimento dos ductos Müllerianos nas estruturas internas femininas. O AMH está sempre ausente no sexo feminino, mesmo nos casos de virilização externa severos, não havendo desenvolvimento de estruturas internas masculinas. Assim, a genitália interna feminina, a saber útero, ovários e terço superior da vagina, são sempre normais (Grumbach *et al.*, 1985; New *et al.*, 1989; Huma *et al.*, 1995).

Cerca de 25% dos casos clássicos de deficiência da 21-hidroxilase são capazes de sintetizar aldosterona em quantidade suficiente e são denominadas virilizantes simples (VS). São reconhecidos como portadoras da forma clássica VS de HCA os indivíduos do sexo feminino com genitália externa ambígua virilizada resultante do excesso de andrógenos e aumento na concentração de 17-OHP, mas sem deficiência de mineralocorticóides. Em indivíduos do sexo masculino portadores da forma VS de HCA, o principal sintoma capaz de identificar a HCA por deficiência da 21-hidroxilase são sinais de virilização precoce devido ao excesso de andrógenos, como aparecimento de pêlos púbicos, faciais e axilares e desenvolvimento precoce da genitália e a dosagem laboratorial de 17-OHP aumentada. Pacientes com esta forma de HCA podem apresentar um aumento da atividade da renina plasmática, que reflete a hiperestimulação da via dos mineralocorticóides (Miller e Morel, 1989; Huma *et al.*, 1995; New *et al.*, 1989).

Na forma clássica perdedora de sal (PS), os sinais de hiperandrogenismo não são distintos daqueles apresentados pelos portadores de HCA forma virilizante simples. A característica que os distingue é a capacidade de sintetizar ou não quantidade suficiente do mineralocorticóide aldosterona. É a forma mais grave da doença, induzida pela completa ausência da enzima 21-hidroxilase (Helmberg, 1993). A incapacidade de sintetizar aldosterona leva a crises de perda de sal, associadas com graves hiponatremia, hipercalemia e hipovolemia com acidose metabólica, perda do tônus vascular e choque hipovolêmico, que em muitos casos é fatal. Os sintomas de perda de sal podem ocorrer a qualquer instante

após os primeiros dias de vida, enquanto que a virilização pode se tornar evidente após 18 meses de idade. Casos clássicos VS ou PS de HCA por 21-hidroxilase não tratados originam crianças altas, com rápido desenvolvimento somático e avanço da idade óssea induzida pelos andrógenos, mas que se tornam adultos mais baixos do que o esperado, devido à calcificação prematura das epífises (diMartini-Nardi *et al.*, 1986; New, 1994; New, 1995; Migeon e Donohoue, 1991).

A variante não-clássica (NC) da deficiência da 21-hidroxilase foi primeiro identificada em estudos genéticos de famílias em que a forma clássica da doença havia sido caracterizada (New, 1994). Esta forma não resulta em ambigüidade genital na menina recém-nascida e as características clínicas devido ao excesso de andrógenos são muito variáveis, podendo aparecer em qualquer idade, mais freqüentemente na puberdade e na vida adulta. Pode resultar em desenvolvimento prematuro de pêlos pubianos em criança, acne cística severa e numa baixa estatura na vida adulta. Aproximadamente 30% das mulheres com queixa de hirsutismo e com síndrome de ovário policístico são portadoras de deficiência não clássica da 21-hidroxilase. As mulheres na idade adulta podem ainda apresentar irregularidades menstruais, amenorréia (secundária), infertilidade e hirsutismo (New e Crawford, 1994; New *et al.*, 1989).

6. Herança e Incidência

Em 1956, foi demonstrado que a HCA por deficiência da 21-hidroxilase ocorria freqüentemente entre irmãos, independentemente do sexo, e que os pais não eram afetados. Concluiu-se assim que esta era uma doença genética transmitida de forma autossômica recessiva, com o risco de 25% de ocorrência na prole. Os pacientes são homozigotos para o gene mutante e os pais são heterozigotos obrigatórios (Migeon e Donohoue, 1991).

A incidência da deficiência da 21-hidroxilase varia consideravelmente dependendo do grupo populacional estudado (Miller e Morel, 1989). A análise de neonatos na população mundial demonstrou que a doença ocorre numa incidência ao redor de 1:14.000 nascimentos para a forma clássica da HCA. A freqüência calculada para o gene mutante, através da equação de Hardy-Weinberg, foi de 1 para 60 para portadores heterozigotos (Pang 1998, Miller e Morel, 1989). Entretanto, este cálculo exclui dois grupos populacionais que apresentam alta freqüência de HCA, provavelmente devido à endogamia:

o grupo esquimó Yupik do Alaska, com incidência de 1:280 e a população da ilha francesa Réunion do Oceano Índico, com incidência de 1:2.000 (Miller e Morel, 1989; Speiser *et al.*, 1992a). A forma não clássica da doença é muito mais comum, com incidência de 1:100 (Pang, 1988; New, 1998). Entretanto, os dados são muito variáveis e alguns grupos étnicos demonstraram possuir taxas muito maiores para a doença. Estudos indicam que a incidência da forma não clássica de HCA é de 1:27 entre Judeus Ashkenasi, 1:40 entre Hispânicos e de 1:50 entre Eslavos (Miller e Morel, 1989; New, 1998).

7. Diagnóstico laboratorial

A HCA por deficiência de 21-hidroxilase é diagnosticada inicialmente pelos sintomas clínicos de ambigüidade genital em meninas e quadros de perda de sal ao nascimento. Na forma PS pode-se detectar hiponatremia, hipercalemia e baixos níveis de aldosterona no plasma e urina, além de atividade elevada de renina plasmática (Calliari, 1992).

O diagnóstico laboratorial é feito principalmente através de dosagem hormonal. Os níveis dos precursores de cortisol e andrógenos adrenais são elevados em portadores não-tratados de deficiência clássica da 21-hidroxilase. Os níveis de cortisol aparecem na quantidade limite para identificação direta. Já o substrato da 21-hidroxilase, a 17-OHP, está freqüentemente centenas de vezes acima do valor normal, possibilitando diagnóstico laboratorial pela detecção por radioimunoensaio (Dupont *et al.*, 1980; White *et al.*, 1987b). A elevação basal na concentração sorológica de 17-OHP é diagnóstico para a forma clássica de HCA. A mensuração de outros esteróides como 17-hidroxipregnenolona, DHEA (desidroepiandrosterona) e androstenediona também auxiliam no diagnóstico, ao excluir a possibilidade de deficiência de outras enzimas esteroidogênicas (Miller, 1991). Em todos os casos de HCA a dosagem da 17-OHP, pregnenolona, 17-OH-pregnenolona, DHEA, testosterona, 11-desoxicortisol e cortisol pode ser feita após estímulo endovenoso da adrenal com ACTH sintético, para comparação com os níveis basais do hormônio. Os casos não-clássicos são corretamente identificados apenas após este procedimento. New *et al.* (1983) realizaram dosagens de 17-OHP basal e após estímulo por ACTH em indivíduos afetados pelas três formas de HCA, indivíduos heterozigotos e população em geral, após o qual foram capazes de estabelecer padrões característicos para cada grupo. Além dos exames

laboratoriais, é importante também a determinação do cariótipo do recém-nascido para confirmação do sexo e ultra-sonografia pélvica para visualização dos órgãos genitais internos (Miller, 1991; Migeon e Donohoue, 1991).

O tratamento do paciente é feito por substituição hormonal contínua a fim de suprir a falta de glicocorticóides e mineralocorticóides e impedir a produção excessiva de andrógenos. A forma PS requer também tratamento com mineralocorticóides, sendo utilizado normalmente 9 α - fluorohidroxycortisona (New *et al.*, 1989).

É possível realizar tratamento pré-natal através da administração de um análogo do cortisol, a dexametasona, o que aumenta a importância de diagnóstico pré-natal (Owerbach *et al.*, 1992; Speiser *et al.*, 1990; Rumsby & Honour, 1990). O objetivo principal é evitar a virilização da genitália externa feminina, a pseudopuberdade precoce nos meninos ou uma possível cirurgia corretiva (Migeon & Donohoue, 1991; White *et al.*, 1989). Os estudos genéticos, principalmente os de estrutura molecular, têm contribuído para o esclarecimento das formas alteradas que podem ocorrer no complexo gênico da 21-hidroxilase, possibilitando o desenvolvimento de técnicas mais precisas e eficientes de diagnóstico. A alta incidência na população em geral e risco de recorrência de 25 % na irmandade, aliados à gravidade dos sintomas e aos bons resultados obtidos quando o tratamento é precoce, tornam fundamental o estudo detalhado da deficiência da enzima 21-hidroxilase.

8. A enzima 21-hidroxilase

Das cinco enzimas participantes da síntese do cortisol, quatro são membros da família do citocromo P450: colesterol 20,22-desmolase (P450_{ssc}), a 17 α -hidroxilase (P450c17), a 21-hidroxilase (P450c21) e 11 β -hidroxilase (P450c11). Citocromos P450 fazem parte de uma superfamília de monoxigenases (oxidases e peroxidases), portadoras de um grupamento heme, que metabolizam uma ampla variedade de compostos lipofílicos. No fígado, estão envolvidas no metabolismo de drogas ou substâncias exógenas em geral, enquanto na adrenal apresentam função específica na esteroidogênese. As enzimas de P450 apresentam algumas características em comum, que incluem alto grau de conservação dos resíduos hidrofóbicos e um peptídeo de ligação do grupamento heme altamente conservado, um resíduo de cisteína, próximo ao terminal carboxílico. As enzimas P450 microsossomais apresentam cauda hidrofóbica amino-terminal que ancora a enzima à membrana e as

enzimas P450 mitocondriais apresentam uma sequência sinal amino-terminal que direciona o transporte da proteína até a membrana interna da mitocôndria, após o qual o sinal é clivado (New *et al.*, 1989; Huma *et al.*, 1995).

A enzima 21-hidroxilase (P450c21) é uma enzima microsomal que apresenta atividade de 21-hidroxilação dos substratos 17-OHP e progesterona, quando em presença de NADPH-P450 redutase. A enzima constitui de um polipeptídeo simples com peso molecular de aproximadamente 52.000 Da. É bastante conservada em mamíferos e pode conter 494 ou 495 aminoácidos, devido a um polimorfismo de repetições CTG (leucina) no éxon 1 do gene, a partir do códon 6. O gene pode conter 4 ou 5 repetições CTG, sem que haja prejuízo para a atividade enzimática (Higashi *et al.*, 1986; Rodrigues *et al.*, 1987). A sequência por nós utilizada neste trabalho possui o polimorfismo de 5 repetições de CTG.

9. Mapeamento do gene CYP21

O mapeamento do gene da 21-hidroxilase (CYP21) teve seu início com o isolamento do citocromo P450c21 bovino, por Kominami *et al.* (1980). A partir da proteína foi possível obter anticorpos contra 21-hidroxilase e utilizá-los para realizar varredura ('screening') de colônias bacterianas contendo mRNA extraído de adrenal bovina em vetores de expressão. Uma vez o mRNA isolado, foi possível realizar retrotranscrição dos mesmos e, após testes de confirmação, utilizar o cDNA de 21-hidroxilase bovino como sonda heteróloga para isolar o transcrito de P450 em biblioteca de cDNA humano (Migeon e Donohoue, 1991). O cDNA humano foi então utilizado para isolar e caracterizar a estrutura de DNA dos genes humanos e também para identificar a primeira deleção como causa de HCA (White *et al.*, 1984a).

Existem, no braço curto do cromossomo 6, ligados ao Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH), duas cópias do gene da enzima 21-hidroxilase, CYP21P e CYP21 (Levine *et al.*, 1978; Carrol *et al.*, 1984; Strachan e White, 1991). Estes por sua vez estão intercalados com genes que codificam para o quarto componente do Sistema Complemento (C4A e C4B), todos com a mesma orientação de transcrição. Estes genes estão localizados na região para HLA classe III, entre as regiões para HLA classe I e II,

como visto na figura 3 (White *et al.*, 1984b; White *et al.*, 1985; Carroll *et al.*, 1985a; Dupont *et al.*, 1977; Dupont *et al.*, 1980; Dunham *et al.*, 1989). O sequenciamento dos genes revelou que ambos apresentam aproximadamente 3,0 kb, sendo compostos por 10 éxons (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986). Embora os genes CYP21 e CYP21P possuam 98% de homologia em seus éxons e 96% entre seus íntrons, apenas CYP21 é um gene ativo. CYP21P é um pseudogene, isto é, não produz proteínas funcionais, como consequência de várias mutações deletérias adquiridas (White e Crawford, 1989; New, 1994; Strachan, 1989; Migeon e Donohoue, 1991; White *et al.*, 1984a; White *et al.*, 1985; White *et al.*, 1986; Rumsby *et al.*, 1988; Carrol *et al.*, 1985b; Werkmeister *et al.*, 1986). As primeiras mutações descritas para o pseudogene incluem uma deleção de 8 pb no éxon 3, inserção de uma base no éxon 7 (estas duas provocando mudança de quadro de leitura ou "frameshift") e uma substituição de uma base no éxon 8 (Higashi *et al.*, 1986). Cada um dos genes CYP21 está posicionado a 3 kb dos genes C4, altamente homólogos, formando duas unidades de 30 kb que se repetem em tandem, C4A/CYP21P e C4B/CYP21 (White *et al.*, 1985). Este arranjo sugere a ocorrência de uma duplicação ancestral da unidade de DNA de 30 kb (White *et al.*, 1985; Strachan, 1990; Helmberg, 1993). Embora ainda não seja claro em que ponto da evolução ocorreu esta duplicação, sabe-se que é anterior à separação dos primatas 5-7 milhões de anos atrás. Encontrou-se duplicação da unidade em ratos, camundongos, gado e ovelha (Higashi *et al.*, 1986). Existem porém mamíferos que aparentam possuir genes CYP21 e C4 únicos, como a baleia, o cavalo, o hamster, a cobaia (guinea pig) e o gato (Higashi *et al.*, 1986).

Recentemente foi demonstrada a existência de dois genes adicionais neste complexo, que se situam na fita oposta de DNA sobrepondo-se aos terminais 3' dos genes CYP21P e CYP21 e com orientação de transcrição contrária (figura 3). São denominados de XA e XB, sendo que XB é um gene de 65 kb que codifica para um membro de família de proteínas de matriz extracelular, a tenascina-X (TN-X) (Bristow *et al.*, 1993a; Tee *et al.*, 1995a, Gitelman *et al.*, 1992). O gene XA (4,5 kb) teria surgido quando da duplicação do *locus*, produzindo mRNA de mesmo quadro de leitura que o gene XB, mas de tamanho muito reduzido (Tee *et al.*, 1995b). Identificou-se ainda um terceiro par de genes duplicados que se sobrepõem neste *locus*, YA e YB, cuja orientação de transcrição é a mesma dos genes CYP21P e CYP21. Os transcritos de YA utilizam o promotor de CYP21P

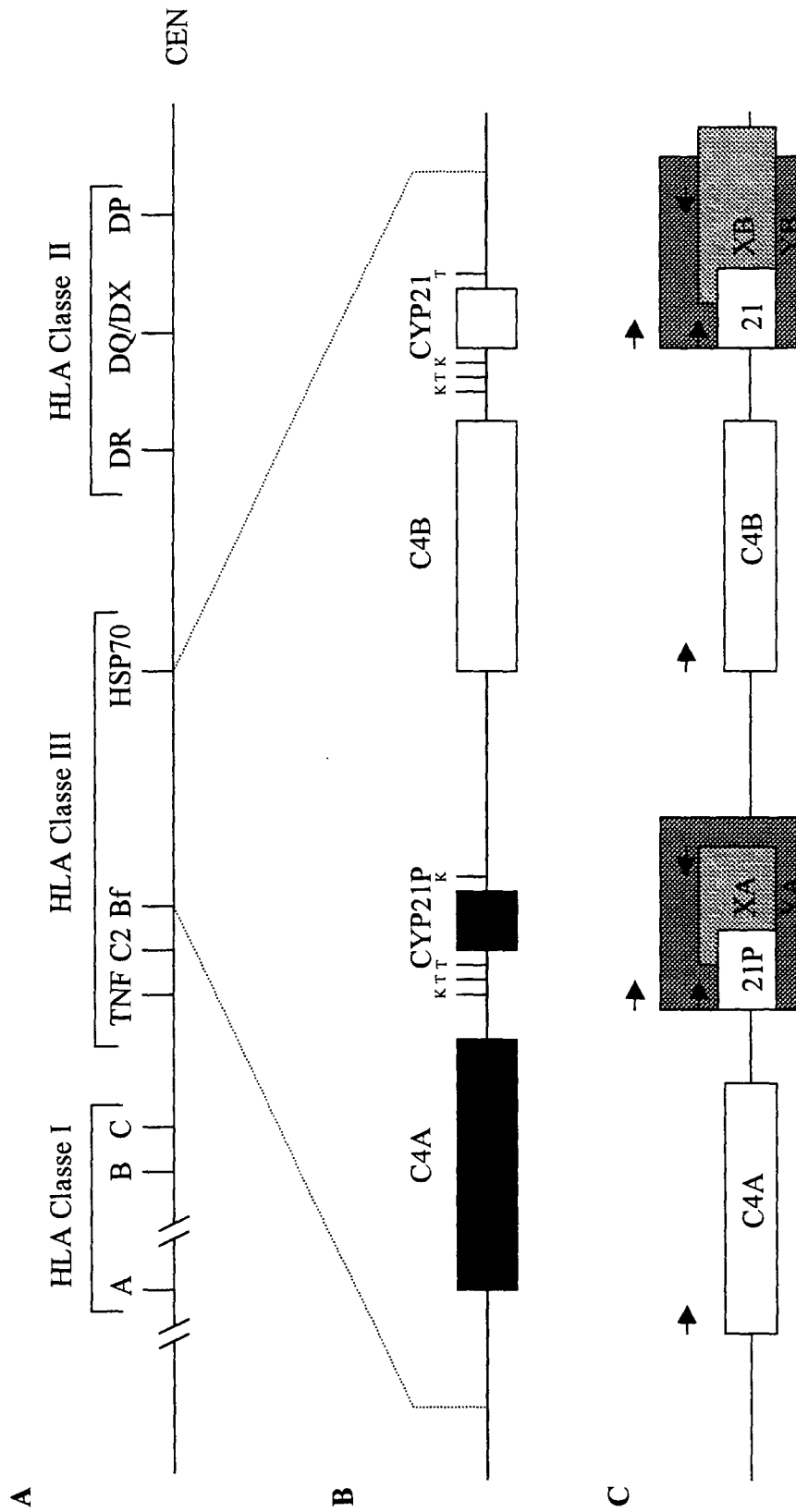


Figura 3: Mapa do braço curto do cromossomo 6, representando o sistema HLA e o complexo gênico da enzima 21-hidroxilase. A. Genes principais do sistema HLA classes I, II, III. CEN- centrômero. B. Organização dos genes C4 e CYP21. T-sítio de restrição *Taq* I, K- sítio de restrição *Kpn* I. Baseado em Araujo, 1996. C. Representação dos genes X, Y e Z, mapeados no complexo gênico da 21-hidroxilase. As setas indicam o sentido de transcrição dos genes. Baseado em Tee *et al.* (1995a).

e apresentam extremidade 5' similar aos de CYP21P mas possuem terminais 3' únicos. Embora a função da maioria destes genes ainda não seja clara, esta organização gênica envolvendo três genes que se sobrepõem (21/X/Y) aparenta ser única entre eucariotos superiores (Bristow *et al.*, 1993b; Tee *et al.*, 1995a, b).

10. Formação de rearranjos gênicos e variabilidade do 'cluster'

O alto grau de homologia entre as unidades C4B/CYP21 e C4A/CYP21P tem como consequência o favorecimento da ocorrência de pareamento desigual entre cromátides irmãs durante a metáfase meiótica. Subseqüentes recombinações por 'crossing-over' dentro dos genes CYP21P e CYP21 mal emparelhados são capazes de gerar gametas portadores de cromossomos com números desiguais de cópias de CYP21P ou CYP21 (deleções ou duplicações gênicas) ou genes híbridos não funcionais (White *et al.*, 1987; Rumsby *et al.*, 1986; Rumsby *et al.*, 1988; Sinnott *et al.*, 1990). A deleção total do gene CYP21 foi a primeira alteração descrita como causa da HCA em associação ao fenótipo PS (White *et al.*, 1984b). A alta proporção de recombinação vista entre os alelos responsáveis por deficiência da 21-hidroxilase sugere que estes genes contenham um ou mais pontos de alta frequência de recombinação ('hotspots') (Tusié-Luna *et al.*, 1995).

Entretanto, estudos populacionais demonstraram que a deleção do gene CYP21 estava presente em apenas 30% dos alelos de indivíduos afetados, entre europeus, norteamericanos e japoneses (Carroll *et al.*, 1985b; Harada *et al.*, 1987; Paulino *et al.*, 1999). No caso de mexicanos e sul-americanos essa porcentagem é ainda mais baixa (10%) (Tusié-Luna *et al.*, 1996; Dardis *et al.*, 1997; Araujo *et al.*, 1996; Bachega *et al.*, 1999). Outro mecanismo molecular está envolvido na produção de alelos afetados e é causa da maioria dos casos de 21-hidroxilase: a conversão gênica (de 70 a 90%) (Harada *et al.*, 1987). Esse processo ainda não está completamente esclarecido (Helmberg, 1993). O termo conversão gênica foi cunhado para um fenômeno observado em leveduras e, no tocante à 21-hidroxilase, refere-se ao surgimento de mutações ou polimorfismos típicos de CYP21P no gene CYP21 (Higashi *et al.*, 1986). Há duas hipóteses para explicar o mecanismo da conversão gênica entre o gene CYP21 e o pseudogene CYP21P. A primeira hipótese pressupõe a ocorrência de dois eventos de 'crossing-over' desiguais entre as fitas emparelhadas incorretamente (figura 4). Forma-se primeiramente um cromossomo com

duplicação de CYP21P e, posteriormente, o segundo 'crossing-over' eliminaria o CYP21, resultando num alelo com duplicação do pseudogene. Entretanto, o crossing-over pode ocorrer apenas uma vez em outros pontos da unidade de 30 kb, gerando duplicações e deleções de todos os quatro genes envolvidos (C4A/CYP21P e C4B/CYP21) assim como a formação de genes híbridos. Pela segunda hipótese, enzimas responsáveis pelo reparo pós-duplicação reconheceriam o pareamento errado e converteriam desde pequenas porções (microconversões) até a totalidade do gene CYP21 em pseudogene (conversão em larga escala) e vice-versa. No processo de conversão, uma das fitas serve de molde para o reparo da outra fita, sem sofrer no entanto nenhuma alteração (Werkmeister *et al.*, 1986; Higashi *et al.*, 1988a; Urabe *et al.*, 1990; Donohoue *et al.*, 1986a). Eventos de conversão podem ser facilitados pela presença de seqüências *chi*, usualmente GCTGGGG, normalmente envolvidas em recombinação em bacteriófagos λ . Seqüências similares foram observadas próximas a pontos de alta freqüência de recombinação em genes de imunoglobulina e genes de MCH classes I e II em humanos e ratos. Embora a probabilidade desta seqüência de 7 pb ocorrer no genoma humano seja 1 a cada 8.000 pb, a seqüência GCTGGGG ocorre pelo menos 6 vezes em CYP21 e 5 vezes no pseudogene CYP21P (Amor *et al.*, 1988). Estudos sobre a freqüência da ocorrência de deleções de CYP21 e de conversões *de novo* em células de origem espermática e leucocitária, em indivíduos normais, levaram à formulação da hipótese de que deleções ocorrem unicamente durante a meiose enquanto que conversões gênicas ocorrem em freqüências consideravelmente altas e principalmente durante a mitose (Tusié-Luna *et al.*, 1995).

O estudo dos diferentes casos de HCA pode geralmente ser feito através da análise de 'RFLP' ('Restriction Fragment Length Polymorphisms') do *locus* CYP21/C4 (Hagkud-Stengler *et al.*, 1991; Mornet *et al.*, 1986; Morel *et al.*, 1989; Palsdotir *et al.* 1987; Sinnott *et al.*, 1992; Donohoue *et al.*, 1986b). Algumas enzimas de restrição são capazes de distinguir os dois genes CYP21 (Miller e Morel, 1989). A digestão com enzimas de restrição apropriadas, como por exemplo *Taq* I, permite a distinção entre os genes CYP21P e CYP21 e entre os genes C4A e C4B pelos tamanhos dos fragmentos de restrição produzidos, seguidos da técnica de 'Southern blots' e hibridização com sondas dos genes CYP21 e C4, respectivamente (Rumsby *et al.*, 1988; Mornet *et al.*, 1986; Donohoue *et al.*, 1986b). Com essa enzima, CYP21P é caracterizado por fragmentos de restrição de 3,2 e 2,4 kb, enquanto

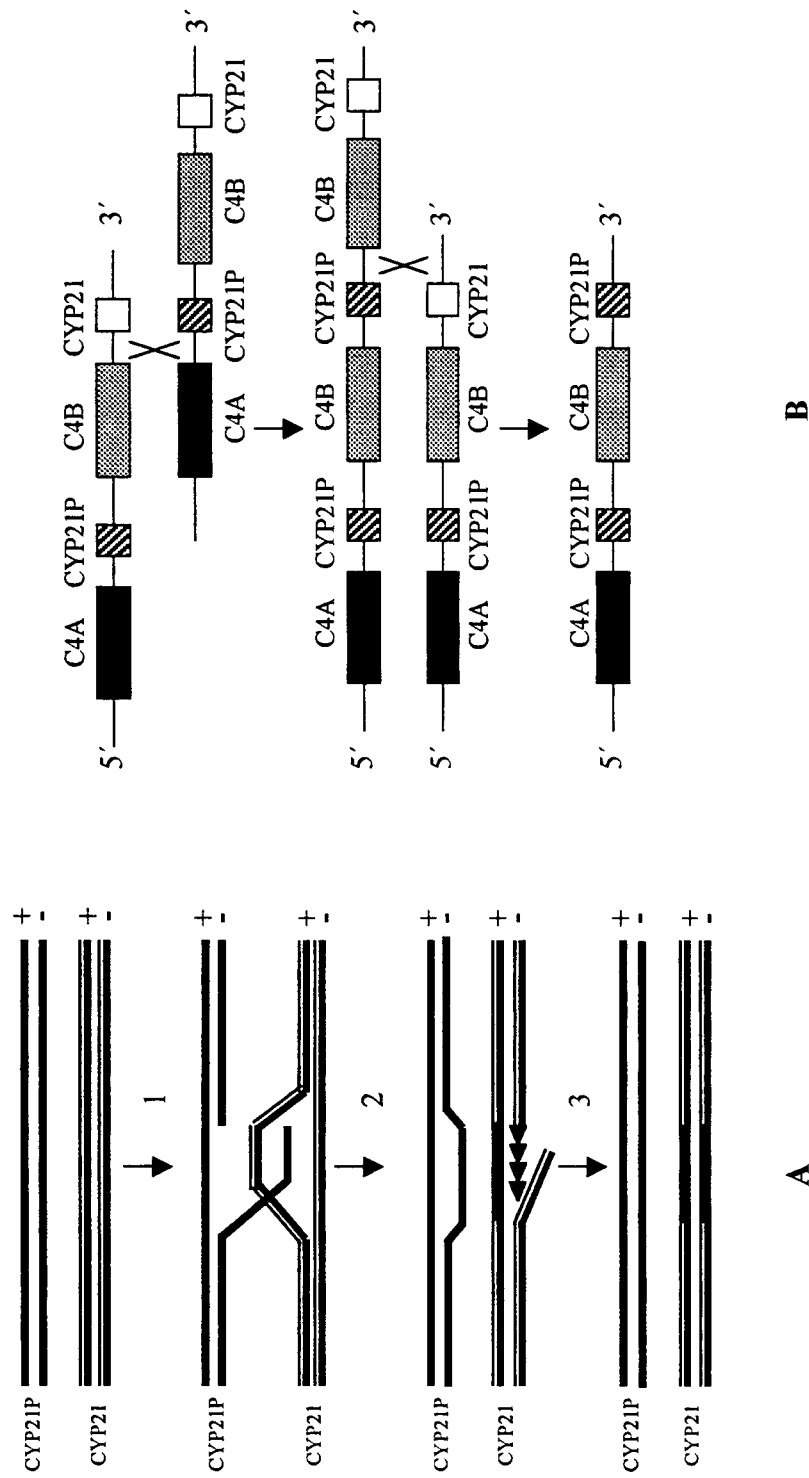


Figura 4: Dois possíveis mecanismos de conversão gênica. A. Mecanismo de conversão gênica por pareamento desigual, que ocorre durante a meiose, entre os genes CYP21 e CYP21P (1). Uma das fitas de CYP21P pareia com CYP21 formando um 'heteroduplex' (2). Enzimas envolvidas no sistema de reparo reconhecem o pareamento errado e efetuam a correção (3). Baseado em Strachan *et al.* (1994). B. Mecanismo de conversão gênica por duplo 'crossing-over'. Após o pareamento desigual na meiose, dois eventos de 'crossing-over' sucessivos ocorrem nas posições indicadas (X), gerando alelos com números desiguais de cópias de cada gene. Baseado em Strachan *et al.* (1990).

que o gene CYP21 é representado por fragmentos de 3,7 kb e 2,5 kb; o gene de C4A é reconhecido em um fragmento de 7,0 kb e o C4B por um fragmento de 6,0 ou 5,4 kb, devido à um polimorfismo em um íntron de C4B (Paldostir *et al.*, 1987). A análise de RFLP do complexo gênico envolve ainda as enzimas *Bgl* II, *Eco* RI e *Kpn* I.

11. Mutações pontuais

Estudos populacionais demonstraram que a maioria dos alelos não apresenta deleções ou conversões gênicas em larga escala, cuja soma das frequência fica em torno de 25 a 35% dos alelos (Ezquieta *et al.*, 1995; Ordoñez-Sanchez *et al.*, 1998; Araujo *et al.*, 1996). A HCA pode também ser causada por mutações pontuais no gene CYP21. A maioria das mutações verificadas em CYP21 são seqüências normais do pseudogene CYP21P, sugerindo que foram originadas por conversão gênica em pequena escala ou microconversões (Amor *et al.*, 1988; Globerman *et al.*, 1988; Mornet *et al.*, 1991; Higashi *et al.*, 1988b). As mutações pontuais pré-existentes no pseudogene são detectadas por diversos métodos, podendo-se citar a amplificação seletiva do gene CYP21 por PCR, seguida de hibridização com oligos alelo-específicos (ASOH) ou PCR alelo-específico como as mais comumente utilizadas (Collier *et al.*, 1989; Dunhan *et al.*, 1989; Partanen *et al.*, 1989; Strachan e White, 1991).

Com o estudo das deleções, conversões em larga escala e microconversões mais comuns de CYP21P para CYP21, nos pacientes atendidos pelo Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, conseguiu-se determinar cerca de 85% dos alelos afetados, ficando em média 15% atribuídos a mutações raras, devendo estas serem determinadas apenas por sequenciamento direto do gene CYP21 (Araujo *et al.*, 1996; Paulino *et al.*, 1999). Recentemente têm-se descrito várias mutações que aparentemente são encontradas unicamente no gene CYP21, sem que se tenha encontrado correspondente entre os pseudogenes estudados. Presume-se que estas mutações sejam espontâneas e não geradas pelo mecanismo de conversão gênica (Owerbach *et al.*, 1992; Wedellet *et al.*, 1994). As mutações 'missense'/'nonsense', intrônicas e de deleção/inserção identificadas até o momento estão relacionadas nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente, localizadas ao final da introdução.

Os diversos tipos de mutações encontrados em CYP21 aparentam estar associados a diferentes graus de comprometimento da atividade enzimática, determinados por estudos de expressão *in vitro*, e conseqüentemente à gravidade do fenótipo afetado (Higashi *et al.*, 1991, Speiser *et al.*, 1992). Deve-se, entretanto, levar em consideração nos indivíduos heterozigotos a expressão dos dois alelos, sendo que o fenótipo resultante em geral será determinado pelo alelo portador da mutação que causar menor dano à atividade enzimática. Em casos de indivíduos afetados cujos fenótipo e genótipo são discordantes, pode-se levantar a dúvida de que mutações espontâneas ainda não identificadas estejam ocorrendo nos mesmos alelos com mutações conhecidas já identificadas.

Numa tentativa de correlacionar o fenótipo diagnosticado clinicamente com o fenótipo predito a partir da identificação dos alelos mutantes CYP21 em indivíduos afetados, Speiser *et al.* (1992) reuniram as mutações em três grupos. Os grupos de mutações foram, na medida do possível, correlacionados tanto com os achados clínicos quanto com dados obtidos de estudos de expressão e atividade enzimática *in vitro* dos alelos portadores de mutações. O grupo A incluiria as mutações que resultariam em completa ausência de atividade enzimática, consistente principalmente com a forma grave PS. O grupo B relacionaria mutações capazes de diminuir a atividade enzimática em até 2% do normal, sendo associadas com a forma VS da doença. A forma não-clássica da doença estaria relacionada ao grupo C de mutações, em que 10-20% da atividade enzimática estaria comprometida. Entretanto, cada grupo apresentou pacientes com fenótipo mais ou menos grave do que o predito, com uma taxa de 80% de acerto entre o predito e observado, sugerindo que outros fatores além das mutações podem estar interferindo no processo.

12. Microconversão

A microconversão, ou conversão gênica em pequena escala, é responsável por 65 a 90% dos haplótipos afetados nos quais não se identificou nenhuma deleção em larga escala (Paulino *et al.*, 1997, Mornet *et al.*, 1991; Owerbach *et al.*, 1992a; Owerbach *et al.*, 1990; Kapelari *et al.*, 1999). No processo, mutações presentes no pseudogene são transferidas para o gene CYP21. Nove das mutações normalmente encontradas em CYP21P são comumente descritas em genes CYP21, provocando danos em diversos graus à função enzimática normal. Vários estudos tratam da mensuração da atividade das 21-hidroxilase

mutantes mais freqüentes, numa tentativa de correlacioná-las ao fenótipo, tornando o diagnóstico e evolução da doença previsíveis. Outras diferenças descritas entre CYP21P e CYP21 aparentam ser polimorfismos ou não são transferidas com tanta freqüência para o gene CYP21.

Dentre as alterações nucleotídicas capazes de provocar danos à atividade enzimática, as deleções, mutações do tipo 'frameshift' (inserções ou deleções de nucleotídeos capazes de alterar o quadro de leitura) e mutações 'nonsense' (substituições de nucleotídeos que criam códon e terminação-'stop códon') estão entre as mutações capazes de alterar drasticamente a estrutura e função da proteína e abolir completamente a atividade enzimática. Estão associadas com a forma mais grave da doença PS (Tusie-Luna *et al.*, 1990). Entre as microconversões descritas, pode-se citar as mutações $\Delta 8$, F306+ e Q318X, todas descritas em pacientes portadores da forma clássica grave PS.

$\Delta 8$ (Higashi, *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986): Esta deleção de 8 bases (TTGGgagactacTCCC) engloba os códons 110 ao 112 codificados no éxon 3, estando normalmente presente no pseudogene. A deleção provoca alteração do quadro de leitura e origina um códon de terminação de leitura na posição 130, dando origem a uma enzima truncada e inativa.

F306+ (Higashi, *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986): Ocorre a inserção de T, no códon 306 no éxon 7, numa região em que há seis nucleotídeos T em sequência, resultando na alteração do quadro de leitura da proteína.

Q318X (Globerman *et al.*, 1988): A alteração de CAG→TAG cria um códon de terminação ('stop códon') no éxon 8, originando uma enzima incompleta, devido à interrupção prematura da tradução, e sem a região do sítio de ligação do grupamento heme, que engloba o resíduo Cys 429. Além de produzir uma proteína inativa, estudos de clonagem e transfecção em células adrenais Y1 de camundongo revelaram que os níveis basais de mRNA transcritos a partir deste gene mutante são substancialmente inferiores aos obtidos a partir do gene normal (Globerman *et al.*, 1988).

Mutações do tipo 'missense' causam a substituição de um aminoácido por outro, em regiões mais ou menos importantes para a funcionalidade da enzima, dando origem à diversas formas fenotípicas da deficiência da 21-hidroxilase (Tusie-Luna *et al.*, 1990). As mutações CL6 e R356W estão entre as microconversões geralmente associadas também com a forma clássica grave PS.

CL6 (Higashi *et al.*, 1988b): Este conjunto de mutações é composta pelas substituições de três resíduos hidrofóbicos por resíduos polares (não-carregado, carga negativa e carga positiva, respectivamente), entre os códons 236-239 do éxon 6 (Ile-Val-Glu-Met²³⁶⁻²³⁹→Asn-Glu-Glu-Lys) I236N/V237E/M239K. A análise da expressão das proteínas mutantes em células COS confirmou perda completa da atividade enzimática, condizente com o fenótipo PS ao qual está associado (Tusie-Luna *et al.*, 1990; Higashi *et al.*, 1988b). Este grupo de mutações afetaria uma região provisoriamente identificada como a região de ligação do oxigênio, hipótese que permanece ainda sem comprovação experimental (New e Crawford, 1994).

R356W (Chiou *et al.*, 1990): Consiste em uma substituição de arginina por triptofano, resultante da alteração da trinca CGG→TGG no éxon 8. A região constituída pelos códons 342-358 é altamente conservada em várias proteínas com função de ligação a esteróides, inferindo-se disto que se trata de domínio de ligação ao substrato. Alterações em qualquer um destes códons, inclusive do códon conservado Arg356, afetaria a atividade enzimática. A comprovação em experimentos de expressão em sistema de células COS (Higashi *et al.*, 1991) ou mutagênese sítio-dirigida (Chiou *et al.*, 1990) de que a atividade enzimática da P450c21 fica completamente abolida por esta mutação é condizente com a descrição desta mutação em indivíduos com a forma PS. Foram ainda descritas as variantes R356P e R356G para este mesmo códon.

Em indivíduos diagnosticados com a forma PS, entretanto, a mutação que foi definida como a mais freqüente causadora de HCA é uma mutação no sítio de 'splicing' (Sp2), afetando a fita receptora do íntron 2. Cerca de 25-35% dos alelos analisados em todos estudos populacionais são portadores da mutação Sp2. Existe uma forte correlação entre a mutação Sp2 e a forma PS, porém esta não é absoluta. Aproximadamente 20% dos pacientes que exibem a mutação Sp2 estão associados com a forma VS da HCA (Schulze *et al.*, 1995; Helmberg, 1993).

Sp2 (Higashi *et al.*, 1988b): A posição -13 do íntron 2 é polimórfica, podendo ser tanto A quanto C no gene CYP21. A mutação consiste na substituição de A/C→G, uma alteração identificada normalmente em pseudogenes (Higashi *et al.*, 1988, 1991; Helmberg *et al.*, 1992). Esta mutação encontra-se a 11 pb do sítio consenso de 'splice' e leva à ativação de um sítio de 'splice' críptico (Lajic e Wedel, 1996). Como resultado ocorre processamento imperfeito do RNA ('splicing') em que 19 pb normalmente excisados

durante o processo são retidos, levando à alteração do quadro transcricional e à criação de um códon de terminação na posição 102, com conseqüente inativação da enzima (Lajic e Wedel, 1996, Higashi *et al.*, 1988; Owerbach *et al.*, 1992). Testes de transfecção de células COS-1 *in vitro* (Higashi *et al.*, 1988) revelaram que quase a totalidade do mRNA portador desta mutação é processado de forma aberrante, apesar de ser possível também a detecção de pequenas quantidades de mRNA normalmente processados (Helmberg, 1993; New *et al.* 1994a, Higashi *et al.*, 1991, White e New, 1992) Embora não seja determinada a proporção de mRNA corretamente processados *in vivo* nas glândulas adrenais, a confirmação do processo explicaria a variabilidade de fenótipo associada à mutação (Helmberg, 1993, Schulze *et al.*, 1995).

I172N (Amor *et al.*, 1988). Com relação ao fenótipo VS, a mutação I172N é descrita como a causa mais freqüente (Higashi *et al.*, 1991). Esta mutação ATC → AAC no éxon 4 promove a substituição não conservativa de um resíduo apolar hidrofóbico por um polar hidrofílico, o que interfere significativamente na interação hidrofóbica da enzima com a membrana do retículo endoplasmático, abolindo a atividade enzimática. Testes funcionais de enzimas portadoras desta substituição revelaram que a conversão do substrato 17-OHP ocorre numa taxa de apenas 2% da taxa de conversão normal (Tusie-Luna *et al.*, 1990). Mais recentemente mostrou-se que a alteração estrutural causada pela mutação I172N pode ser responsável também pela redução da eficiência da enzima em captar o grupamento heme, chegando a dar origem 1/10 dos níveis normais de hemoproteínas (Hsu *et al.*, 1996). Os estudos que definem atividade enzimática próxima a 2% sugerem que pacientes portadores da mutação I172N são capazes de sintetizar quantidades adequadas de aldosterona de forma a prevenir uma perda de íons de sais significativa, resultando no fenótipo de VS. Apesar de possuir forte correlação com a forma VS, foram descritos pacientes perdedores de sal entre os portadores desta mutação em associação com outras alterações. Estes dados sugerem que fatores adicionais epigenéticos podem influenciar no fenótipo perdedor de sal (Tusie-Luna *et al.*, 1990).

Algumas mutações determinam alterações menos drásticas à enzima 21-hidroxilase, permitindo atividade parcial da mesma e resultando no fenótipo não-clássico da doença. As mutações 'missense' V281L e P30L são as microconversões comumente associadas ao fenótipo.

V281L (Speiser *et al.*, 1988): Esta mutação GTG→CTG no éxon 7 originando substituição de valina por leucina, representa a causa mais comum da forma não clássica de HCA na população caucasiana. O resíduo de valina aparenta ter importância funcional para a enzima, pois é conservado em pelo menos quatro espécies de mamíferos (Speiser *et al.*, 1988). A análise de expressão de genes mutantes em células COS-1 revelou que a taxa de conversão com relação à enzima normal é de 50% quando o substrato é a 17-OHP e de 20% quando a progesterona (Tusie-Luna, 1990). Um indivíduo homozigoto para esta mutação apresenta a forma não clássica da HCA com significantes anormalidades bioquímicas e sintomas variáveis de excesso de andrógenos. Esta alteração é freqüentemente associada a alelos portadores de 3 unidades C4/CYP21 (Speiser *et al.*, 1988; Mornet *et al.*, 1991). Na população japonesa, contudo, esta mutação parece não ser a mais importante causadora de HCA não-clássica (Tajima *et al.*, 1998).

P30L (Tusie-Luna *et al.*, 1991): A proteína portadora da substituição CCG→CTG (Prolina→Leucina) apresenta uma queda de produtividade quando comparada com a enzima normal, convertendo aproximadamente 60% da 17-OHP e apenas 25% quando o substrato é a progesterona (Helmberg, 1993). A enzima 21-hidroxilase é ancorada na membrana do retículo endoplasmático pela sua porção amino-terminal e a substituição do aminoácido prolina deve de alguma forma alterar a ligação da mesma com a membrana (Helmberg, 1993). Esta mutação está associada com a forma não clássica da HCA, sendo encontrada em aproximadamente 10-20% dos alelos. Na população japonesa, entretanto, parece ser a principal causadora da forma não-clássica da doença, correspondendo a 85% dos casos analisados até então (Tajima *et al.*, 1998).

13. Mutações ausentes em CYP21P

Recentemente têm-se descrito várias mutações que aparentemente são encontradas unicamente no gene CYP21, sem que se tenha encontrado correspondente entre os pseudogenes estudados. Presume-se que estas mutações sejam esporádicas e não geradas pelos mecanismos de conversão gênica (Owerbach *et al.*, 1992a; Wedell *et al.*, 1994). Vale ressaltar que existem polimorfismos entre os alelos de CYP21P não descritos e que algumas mutações no gene CYP21 podem ter sido originadas por processos de microconversão a partir destes genes (Strachan, 1994). Algumas destas foram analisadas

quanto à atividade enzimática. Mutações do tipo deleção, 'frameshift', 'nonsense' e em sítios de 'splicing' estão, de forma geral, associadas a danos mais graves na atividade enzimática e com a forma clássica PS, enquanto que mutações 'missense' resultam em variabilidade no fenótipo, dependendo da importância funcional do aminoácido alterado.

A mutação P453S (Owerbach *et al.*, 1992b; Helmberg *et al.*, 1992) consiste da substituição CCC→TCC (Prolina→Serina) e foi encontrada em associação com a forma não clássica da HCA. Este aminoácido é conservado em pelo menos quatro espécies diferentes e que aparenta ser o responsável pelo quadro de HCA não-clássico do portador. Apresenta um decréscimo da atividade enzimática normal nos mesmos patamares descritos para as enzimas portadoras das mutações P30L e V281L (Owerbach *et al.*, 1992; Helmberg, 1993). Wedell *et al.* (1992) indentificaram também a mutação Pro453Ser, mas este alelo apresentou ainda as alterações C→T na posição -4 anterior ao ATG do início do éxon 1 e uma mutação Pro105Leu, que foi desconsiderada por não afetar um aminoácido conservado.

Wedell *et al.* (1992) identificaram a mutação 'missense' G291S, no éxon 7. O aminoácido glicina é conservado em proteínas da 21-hidroxilase de humanos, bovinos, roedores e suínos, o que dá indício da sua importância no funcionamento normal da enzima. Foi encontrado em associação com a alteração T→C na posição +9 do íntron 2. O grupo identificou ainda uma mutação GG→C no códon 483 (R483Δ), em heterozigose com a mutação R356W num indivíduo com sintomas da forma PS da HCA.

No códon 380 ocorre substituição de GAC→GAT levando à substituição conservativa de um ácido glutâmico por ácido aspártico (E380D). A mutação foi encontrada em homozigose levando à forma clássica PS, não sendo descrita para o pseudogene (Kirby-Keyser *et al.*, 1997).

Uma transição G→A no códon 424, alterando o aminoácido glicina por serina (G424S), está associada com as formas VS da HCA. Esta mutação foi identificada em 5 famílias de uma região do Brasil, sempre associada com deleção de C4A/CYP21P e com HLA-DR17, sugerindo a presença de um efeito fundador (Billerbeck *et al.*, 1999).

A conversão de G→C no sítio conservado doador de 'splicing' do íntron 7 e a mutação T406X, (éxon 9, TGG→TAG) foram encontradas em cromossomos diferentes de um mesmo paciente (Wedell *et al.*, 1992). Os dinucleotídeos GT e AG nas fitas doadoras e receptoras do íntron, respectivamente, são conhecidas como sendo bastante conservadas,

sendo virtualmente encontradas em todos os íntrons de mamíferos. A alteração neste dinucleotídeo interfere na maturação normal do mRNA. A mutação T406X provoca a terminação prematura da tradução da mRNA, originando uma proteína truncada em que estão ausentes os últimos 90 resíduos, inclusive o resíduo Cys 429 de ligação para o grupo heme (White *et al.*, 1986). O diagnóstico da forma PS confirma o genótipo encontrado.

A mutação W23X é causada por uma transição de TGG→TGA alterando o códon 23 para um códon de terminação, no início do éxon 1. A terminação prematura da tradução no códon início do gene origina uma enzima em que a quase totalidade dos 495 aminoácidos não estão presentes. O trabalho de Lajic *et al.* (1996) descreve também outra mutação intrônica no sítio acceptor de 'splice' do íntron 1, como uma transição A→G que altera o dinucleotídeo AG para GG. Ambos estão relacionados com o fenótipo PS da HCA.

Lee *et al.* (1998) identificaram 4 mutações novas na população chinesa, nenhuma presente no pseudogene. Uma alteração G→A no sítio doador de 'splice' do íntron 2 resultou no fenótipo PS (IVS2DS,G-A,+1). A mutação resulta na transcrição incorreta de parte do íntron 2 e na criação de um códon de terminação prematuro localizado no nucleotídeo 46-48 do íntron, levando à formação de uma proteína truncada. A mutação 'nonsense' R316X resulta da alteração de CGA→TGA, promovendo a substituição de arginina por um 'stop códon', com perda dos códons responsáveis pela ligação do grupo heme. Foi encontrada em associação com a forma PS. Uma deleção da sequência TCCAGCTCCC de 10 pares de bases no éxon 8, entre os códons 330-333, e uma duplicação de 16 pb no éxon 9 no códon 397 foram descritas em pacientes portadores da forma clássica PS. Tanto a deleção quanto a duplicação provocam alteração de quadro de leitura e terminação prematura da tradução da proteína. O domínio de ligação do grupamento heme também ficam prejudicados.

Uma deleção seguida de inserção de TC→A foi descrita por Witchel *et al.* (1998) no códon 169, presente no éxon 4. Gera alteração de quadro de leitura e códon de terminação de leitura prematuro, condizente com associação definida com a forma PS da HCA. Não foram encontrados correspondentes desta mutação no pseudogene (Witchel *et al.*, 1998).

A mutação 141delT foi associada com a forma PS e consiste na deleção de um nucleotídeo no éxon 1. Esta mutação leva à alteração do quadro de leitura, resultando na

terminação prematura de uma proteína truncada na posição 51, onde um 'stop códon' é formado (Krone *et al.*, 1999).

14. Polimorfismos

A presença de um códon CTG extra foi verificada na sequência gênica de CYP21 descrita por Rodrigues *et al.* (1987), codificando para leucina, numa região descrita previamente com 4 códons para Leu na posição 6 do éxon 1 (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986). Comparações entre espécies revelaram a presença de leucina nessa mesma posição, indicando possivelmente um polimorfismo de tamanho na enzima 21-hidroxilase, entre 494 e 495 aminoácidos (Rodrigues *et al.*, 1987). Posteriormente foi confirmado que a inserção de leucina não acarretava alteração da atividade enzimática e que pode ser normalmente encontrada em CYP21P (New e Crawford, 1994).

Outra variação na sequência descrita por Rodrigues *et al.* (1987) em relação a publicações anteriores (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986) está na posição 102 no éxon 3, onde verificou-se uma alteração de lisina para arginina (K102R), confirmado também por Ordoñez-Sanchez *et al.* (1998). Já na posição 426, foram identificados os aminoácidos arginina (White *et al.*, 1986; Rodrigues *et al.*, 1987) e prolina (Higashi *et al.*, 1986). Tais observações sugerem que tanto o gene CYP21 como a proteína codificada por ele podem ser polimórficos (Rodrigues *et al.*, 1987).

Rodrigues *et al.* (1987) descreveu uma substituição de serina por treonina, na posição 268 no éxon 7, que mais tarde mostrou-se ser uma mutação neutra (Donohoue *et al.*, 1992), ausente do pseudogene (Owerbach *et al.*, 1990; Mornet *et al.*, 1991). Segundo Higashi *et al.* (1991), a demonstração de que a substituição de Ser por Thr, Cys ou Met nesta posição não altera a atividade normal da enzima, associado ao fato de que este aminoácido não é conservado em outras espécies descritas, são indícios de que o resíduo Ser 268 não participa diretamente na catálise de P450c21.

A substituição de asparagina por serina na posição 493 no éxon 10 (N493S) foi descrita em pacientes de HCA (Harada *et al.*, 1987; Rodrigues *et al.*, 1987; Wedell e Luthman, 1993b). Entretanto, comparações com as sequências de aminoácidos de outras espécies de mamíferos demonstraram que a posição 493 não é conservada, assim como a

posição 268. Estas observações, aliadas à baixa frequência de N493S e a sua ocorrência em associação com mutações conhecidas e em homozigose são indícios de que se trata de um polimorfismo neutro (New e Crawford, 1994; Ordoñez-Sanchez *et al.*, 1998). Outra alteração que possivelmente trata-se de um polimorfismo neutro é a substituição K98R, descrita por Ordoñez-Sanchez *et al.* (1998) em apenas um indivíduo e em associação com a mutação Sp2.

15. Dificuldades na correlação entre genótipo e fenótipo

De uma forma geral, pode-se associar as diversas mutações descritas à forma da HCA apresentada pelo paciente. As mutações encontradas em CYP21 estão relacionadas a diferentes graus de comprometimento da atividade enzimática, determinados por estudos de expressão *in vitro*, e conseqüentemente à gravidade do fenótipo afetado (Higashi *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992). Deve-se, entretanto, levar em consideração a expressão dos dois alelos em indivíduos heterozigotos para análise. Presume-se que o fenótipo resultante será determinado pelo alelo portador da mutação que causar menor dano à atividade enzimática. Esta correlação entretanto não é absoluta, sendo descritos vários casos de indivíduos que não apresentaram o genótipo esperado (New *et al.*, 1989; Mornet *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992; Miller, 1994; Wedell *et al.*, 1994c; Wilson *et al.*, 1995). Em casos de indivíduos afetados com fenótipo e genótipos discordantes pode-se levantar a dúvida de que mutações espontâneas ainda não identificadas estejam ocorrendo nos mesmos alelos com mutações conhecidas já identificadas (Wilson *et al.*, 1995).

Várias são as mutações descritas para o gene CYP21 em pacientes com diferentes fenótipos, dentre os quais, até 45% são heterozigotos compostos e aproximadamente 20% dos mesmos apresentam alelos afetados com mais de uma mutação. Estes dados sugerem que o amplo espectro de expressão fenotípica encontrada na HCA seja devido à alta heterogeneidade dos alelos mutantes (Speiser *et al.*, 1992; Wedell e Luthman, 1993; Wilson *et al.*, 1995; Lajic e Wedell, 1997; Ordoñez-Sanchez *et al.*, 1998).

Há várias descrições de casos em que a análise do genótipo não foi capaz de prever o fenótipo. A mutação PS Sp2 e a mutação não-clássica V281L estão entre as que apresentam maior discrepância de correlação genótipo/fenótipo (Wilson *et al.*, 1995; Schulze *et al.*, 1995; Kohn *et al.*, 1995; Bormann *et al.*, 1992). Mesmo no estudo de

populações bem definidas e sem relatos de alta miscigenação foram descritas variações fenotípicas também associadas à mutação I172N (Jääkeläinen *et al.*, 1997).

Apesar de estar relacionada na maioria dos casos com a forma não-clássica da doença, a mutação V281L foi encontrada em associação com as formas clássicas virilizante simples e PS da doença (Wilson *et al.*, 1995). O mesmo genótipo P30L, Sp2, $\Delta 8$ em um alelo e V281L no outro alelo, deu origem a um indivíduo com a forma não-clássica e a um paciente com a forma PS e o genótipo Sp2/V281L foi descrito em pacientes dos três grupos de HCA, com maioria na forma não-clássica (Wilson *et al.*, 1995).

A mutação Sp2 está em forte associação com a forma PS da doença. Entretanto, são descritos casos em que indivíduos homozigotos para a mutação ou com o genótipo Sp2/del apresentam a forma VS da doença (Speiser *et al.*, 1992; Owerbach *et al.*, 1990; Schulze *et al.*, 1995). Variações fenotípicas da forma PS também foram descritas em indivíduos homozigotos para a mutação, que apresentaram atraso no surgimento dos sintomas característicos da HCA (Kohn *et al.*, 1995) e em indivíduos de uma mesma família portadores do genótipo Sp2/I172N e com as formas VS e não-clássica (Chin *et al.*, 1998). Nestes casos, a verificação da ocorrência de splicing normal nos alelos portadores da mutação, como descrito *in vitro*, poderia ser responsável pela diversidade fenotípica encontrada (Helmberg, 1993).

Em casos de discordância do fenótipo entre irmãos portadores do mesmo genótipo, como os descritos por Tajima *et al.* (1993) e Borman *et al.* (1992), podem ser explicados por diferenças nas seqüências gênicas herdadas pelos irmãos resultantes do surgimento de mutações *de novo* (Tajima *et al.*, 1993), ou alelos iguais mas com expressões alteradas por fatores externos ao *locus* da 21-hidroxilase (Sinnott *et al.*, 1989, 1990; Collier *et al.*, 1992; Tajima *et al.*, 1993).

Existe ainda a descrição de um caso de HCA em que a totalidade dos genes CYP21 e CYP11A1 foram seqüenciados sem que fosse possível determinar a causa da doença (Nimkarn *et al.*, 1999).

Entre os fatores sugeridos para explicar a disparidade genótipo/fenótipo está a presença de outras mutações raras no mesmo alelo com a mutação definida (Wilson *et al.*, 1995), o que poderia ser confirmado apenas por isolamento do alelo seguido de seqüenciamento direto. Outro fator sugerido seria anormalidades na seqüência reguladora e promotora do gene, bem como as atividades de fatores de transcrição, transporte de

proteínas entre outros, presentes somente nas condições *in vivo*. Apesar dos avanços obtidos na área, pouco ainda se sabe sobre a regulação da CYP21 e nenhuma alteração na região promotora do gene foi descrita ainda (Wilson *et al.* 1995). Speiser *et al.*, 1992 sugerem ainda a ocorrência de 'imprinting' genômico parental para explicar a variação na severidade do fenótipo.

Outro fator relevante para a correlação entre genótipo e fenótipo é uma possível atividade de 21-hidroxilase extra-adrenal (Mellon e Miller, 1989; Speiser *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1997). Identificou-se atividade de 21-hidroxilase em tecidos não-adrenais, como os rins (Lajic *et al.*, 1995), baço e gônadas (Zhou *et al.*, 1997). Também verificou-se a expressão de CYP21 em cultura de linfócitos B, que possuem uma outra fonte de atividade de 21-hidroxilase que não a do gene CYP21. Foi sugerido que estas fontes de atividade 21-hidroxilase extra-adrenal poderiam compensar a gravidade do fenótipo da HCA (Zhou *et al.*, 1997).

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

Tabela 1: Mutações 'missense' e sem sentido descritas para o gene CYP21

Mutação 'missense' e sem sentido	Códon	Alteração	Efeito	Nº de acesso HMGD	Referência
W22X	22	TGG-TGA	Trp-Term	CM960478	Lajic <i>et al.</i> (1996)
P30L	30	CCG-CTG	Pro-Leu	CM920227	Speiser <i>et al.</i> (1992)
G64E	64	GGG-GAG	Gly-Glu	CM990459	Ohlsson <i>et al.</i> (1999)
K74X	74	CAAG-TAG	Lys-Term	CM990460	Lobato <i>et al.</i> (1999)
G90V	90	GGC-GTC	Gly-Val	CM990461	Lobato <i>et al.</i> (1999)
Y97X	97	TAC-TAA	Tyr-Term	CM980506	Krone <i>et al.</i> (1998)
P105L	105	CCG-CTG	Pro-Leu	CM940328	White <i>et al.</i> (1994)
I172N	172	ATC-AAC	Ile-Asn	CM880020	Amor <i>et al.</i> (1988)
G178A	178	GGA-GCA	Gly-Ala	CM990462	Lobato <i>et al.</i> (1999)
V211L	211	CGTG-CTG	Val-Leu	CM880021	Speiser <i>et al.</i> (1988)
I236N	236	ATC-AAC	Ile-Asn	CM920228	Speiser <i>et al.</i> (1992)
V237E	237	GTG-GAG	Val-Glu	CM920229	Speiser <i>et al.</i> (1992)
M239K	239	ATG-AAG	Met-Lys	CM920230	Speiser <i>et al.</i> (1992)
Q262X	262	CAA-TAA	Gln-Term	CM990463	Ohlsson <i>et al.</i> (1999)
V281L	281	CGTG-CTG	Val-Leu	CM950333	Barbat <i>et al.</i> (1995)
V281L	281	GTG-TTG	Val-Leu	CM880022	Speiser <i>et al.</i> (1988)
G291S	291	GGT-AGT	Gly-Ser	CM920231	Wedell <i>et al.</i> (1992)
G291C	291	GGT-TGT	Gly-Cys	CM990464	Lobato <i>et al.</i> (1999)
W302X	302	TGG-TGA	Trp-Term	CM970411	Levo <i>et al.</i> (1997)
R316X	316	CGA-TGA	Arg-Term	CM980507	Lee <i>et al.</i> (1998)
Q318X	318	CAG-TAG	Gln-Term	CM880023	Globerman <i>et al.</i> (1988)
R339H	339	CGT-CAT	Arg-His	CM920232	Helmberg <i>et al.</i> (1992)
R339W	341	CGG-TGG	Arg-Trp	CM970412	Lajic <i>et al.</i> (1997)
R354H	354	CGC-CAC	Arg-His	CM990465	Lobato <i>et al.</i> (1999)
R356Q	356	CGG-CAG	Arg-Gln	CM970413	Levo <i>et al.</i> (1997)
R356P	356	CGG-CCG	Arg-Pro	CM970414	Lajic <i>et al.</i> (1997)
R356W	356	CGG-TGG	Arg-Trp	CM900080	Chiou <i>et al.</i> (1990)
A362V	362	GCC-GTC	Ala-Val	CM990466	Ohlsson <i>et al.</i> (1999)
E380N	380	GAG-GAC	Glu-Asp	CM970415	Kirby-Keys <i>et al.</i> (1997)
W405X	405	TGG-TAG	Trp-Term	CM930185	Wedell <i>et al.</i> (1993)
G424S	424	GGT-AGT	Gly-Ser	CM990467	Billerbeck <i>et al.</i> (1999)
P453S	453	CCC-TCC	Pro-Ser	CM920233	Owerbach <i>et al.</i> (1992)
R483P	483	CGG-CCG	Arg-Pro	CM930186	Wedell <i>et al.</i> (1993)

HMDB-Human Mutation Data Base.

Tabela 2: Mutações descritas em íntrons do gene CYP21

Mutação	Localização	Alteração	Efeito	Nº de acesso HMDB	Referência
IVS1AS,A-G,-2	Intron 1 as -2	A-G	'splice' anormal	CS961545	Lajic <i>et al.</i> (1996)
Sp2	Intron 2 as -12	A-G	'splice' anormal	CS971704	Tajima <i>et al.</i> (1997)
IVS2AS,C-G,-13	Intron 2 as -13	C-G	'splice' anormal	CS880069	Higashi <i>et al.</i> (1988)
IVS2DS,G-A,+1	Intron 2 ds +1	G-A	'splice' anormal	CS982154	Lee <i>et al.</i> (1998)
IVS7DS,G-C,+1	Intron 7 ds +1	G-C	'splice' anormal	CS930787	Wedell <i>et al.</i> (1993)

HMDB-Human Mutation Data Base.

Tabela 3: Deleções e inserções descritas para o gene CYP21

Mutação	Códon	Deleção	Inserção	Efeito	Nº acesso HMDB	Referência
ΔT46	46	ATCTA ICTGCTTGGCC	-	'frameshift'	CD991688	Krone <i>et al.</i> (1999)
Δ8pb	109	TTGGgagactacTCCCTGCTCT	-	'frameshift'	CD941657	White <i>et al.</i> (1994)
Δ3pb195	195	CAGGaggTGTTAAAAAC	-	'frameshift'	CD982584	Nikoshkov <i>et al.</i> (1998)
Δ8pb235	235	CACatcgtggaGATGCAGCTG	-	'frameshift'	CD951676	Barbat <i>et al.</i> (1995)
Δ10pb329	329	GCCtccagctcccGGGTCCCCTA	-	'frameshift'	CD982585	Lee <i>et al.</i> (1998)
ΔG482	482	CCCCgGGGGATGGGG	-	'frameshift'	CD941658	White <i>et al.</i> (1994)
F306+	06	-	T	'frameshift'	CI920933	Speiser <i>et al.</i> (1992)
dup16pb	397	-	CCTGGATG AGACGGTC	'frameshift'	CI983072	Lee <i>et al.</i> (1998)
Indel168	168	CCtgCAGCATCATC	a	'frameshift'	CX983271	Witchel <i>et al.</i> (1998)
Indel482	482	CCCCggGGGATGGGGG	c	'frameshift'	CX920958	Wedell <i>et al.</i> (1992)

HMDB-Human Mutation Data Base.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Determinar, através de seqüenciamento integral do gene CYP21, as mutações em 7 alelos afetados, nos quais não se pôde determinar nenhuma deleção ou mutação pelos métodos de análise usuais, tais como análise de RFLP e realização de PCR alelo-específico para as mutações mais freqüentes.
- Correlacionar possíveis mutações encontradas com o fenótipo observado.
- Caracterizar e esclarecer a formação dos alelos contendo fragmentos extras em RFLP com a enzima *Taq* I para os genes C4 e CYP21 observados em duas famílias que apresentam indivíduos portadores de deficiência de 21-hidroxilase.
- Esclarecer a possibilidade de envolvimento destes alelos contendo fragmentos extras de *Taq* I na etiologia da Hiperplasia Congênita da Adrenal nestas famílias.

MATERIAL E MÉTODOS

1. CASUÍSTICA

A análise do complexo gênico da 21-hidroxilase foi realizado em famílias de pacientes portadores de Hiperplasia Congênita da Adrenal em tratamento no ambulatório de Endocrinologia Pediátrica-HC-UNICAMP

Foram estudadas duas famílias com indivíduos afetados pela HCA por deficiência de 21-hidroxilase apresentando alelos raros dos genes CYP21 e C4, identificados por análise de RFLP com a enzima *Taq I* (Araujo, 1996). A descrição dos alelos em ambas as famílias esta na tabela 4. As figuras 5 e 6 apresentam a análise do gene CYP21 nas famílias 22 e 26, respectivamente, revelando os fragmentos raros de RFLP (Araujo, 1996).

Foram estudadas ainda 6 famílias onde somente 1 alelo responsável por HCA devido à deficiência da 21-hidroxilase está determinado e 1 família, apresentando consangüinidade, na qual nenhuma mutação foi determinada (tabela 5), totalizando 7 alelos afetados. Dentre estes alelos, um está associado com a forma clássica virilizante simples e seis com a forma severa perdedora de sal.

Tabela 4: Genótipo das famílias com alelos raros

Família	Indivíduo (código)	Mutação Paterna	Mutação Materna	HCA	Alelo raro associado
26	Pai (26P)	Mut	-	PS	Banda de 3,9 kb no blot de <i>Taq I</i> com sonda C4, associado ao alelo portador da mutação R356W em Mãe e filha afetada.
	Mãe (26M)	-	R356W		
	Filha afetada (26Xa1)	Mut	R356W		
22	Pai (22P)	Q318X(dupA)	-	PS	Banda de 5,6 kb no blot de <i>Taq I</i> com sonda para CYP21, associado ao alelo portador de mutação ainda não identificada, em Mãe e dois filhos.
	Mãe (22M)	-	Mut(dupB)		
	Filha afetada (22Xa1)	Q318X(dupA)	Mut(dupB)		
	Filho normal (22Yn2)	-	Mut(dupB)		

Mut: Alelo com mutação não determinada; dupA: Duplicação de CYP21P/C4B; dupB: Duplicação de CYP21/C4B

Tabela 5: Casos em que apenas uma mutação ou nenhuma mutação é conhecida.

Família	Indivíduo (código)	Mutação Paterna	Mutação Materna	Nº de alelos não determinados
10	Pai (10P)	I172N	-	1
	Mãe (10M)	-	?	
	Filho afetado (10Ya1)	I172N	?	
	Filha afetada (10Xa2)	I172N	?	
11	Pai (11P)	?	-	1
	Mãe (11M)	-	Sp2	
	Filha afetada1 (11Xa1)	?	Sp2	
	Filha afetada2 (11Xa2)	?	Sp2	
	Filho afetado (11Ya3)	?	Sp2	
24	Pai (24P)	I172N	-	1
	Mãe (24M)	-	?	
	Filha afetada (24Xa1)	I172N	?	
26	Pai (26P)	?	-	1
	Mãe (26M)	-	R356W	
	Filha afetada (26Xa1)	?	R356W	
27	Filha normal (26Xn2)	-	R356W	1
	Pai (27P)	Sp2	-	
	Mãe (27M)	-	?	
	Filha afetada (27Xa1)	Sp2	?	
39	Pai (39P)	?	-	1
	Mãe (39M)	-	I172N	
	Filha afetada (39Xa1)	?	I172N	
41	Pai* (41P)	?	-	1
	Mãe* (41M)	-	?	
	Filha afetada (41Xa1)	?	?	
	Filho normal (41Yn2)	-	-	

*- Consangüíneos

2. Obtenção das amostras:

Utilizou-se amostras de DNA genômico extraídas a partir de sangue total dos pacientes e de seus familiares, coletadas no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do HC UNICAMP. Foram colhidos de 10 a 20 ml de sangue periférico, em tubos cônicos, contendo 1,0 ml de EDTA (etilenediaminotetraacetato dissódico 2H₂O), 10 % pH 8,0 como um coagulante.

3. Extração de DNA

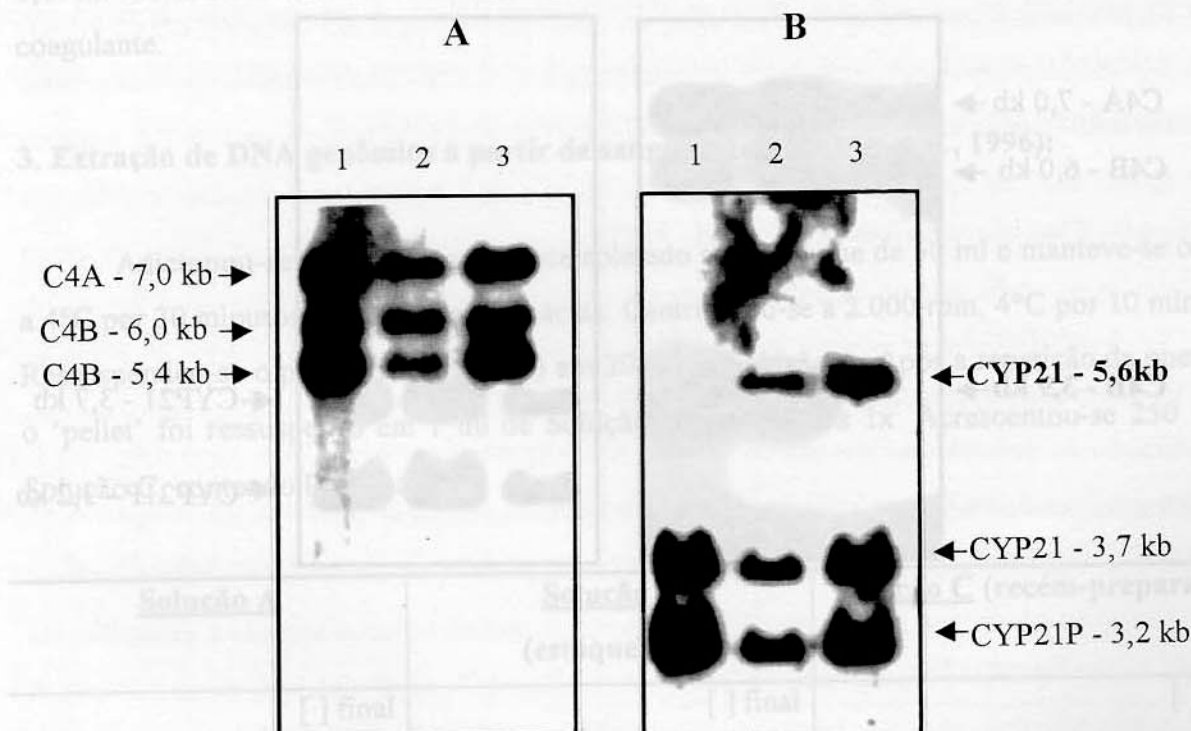
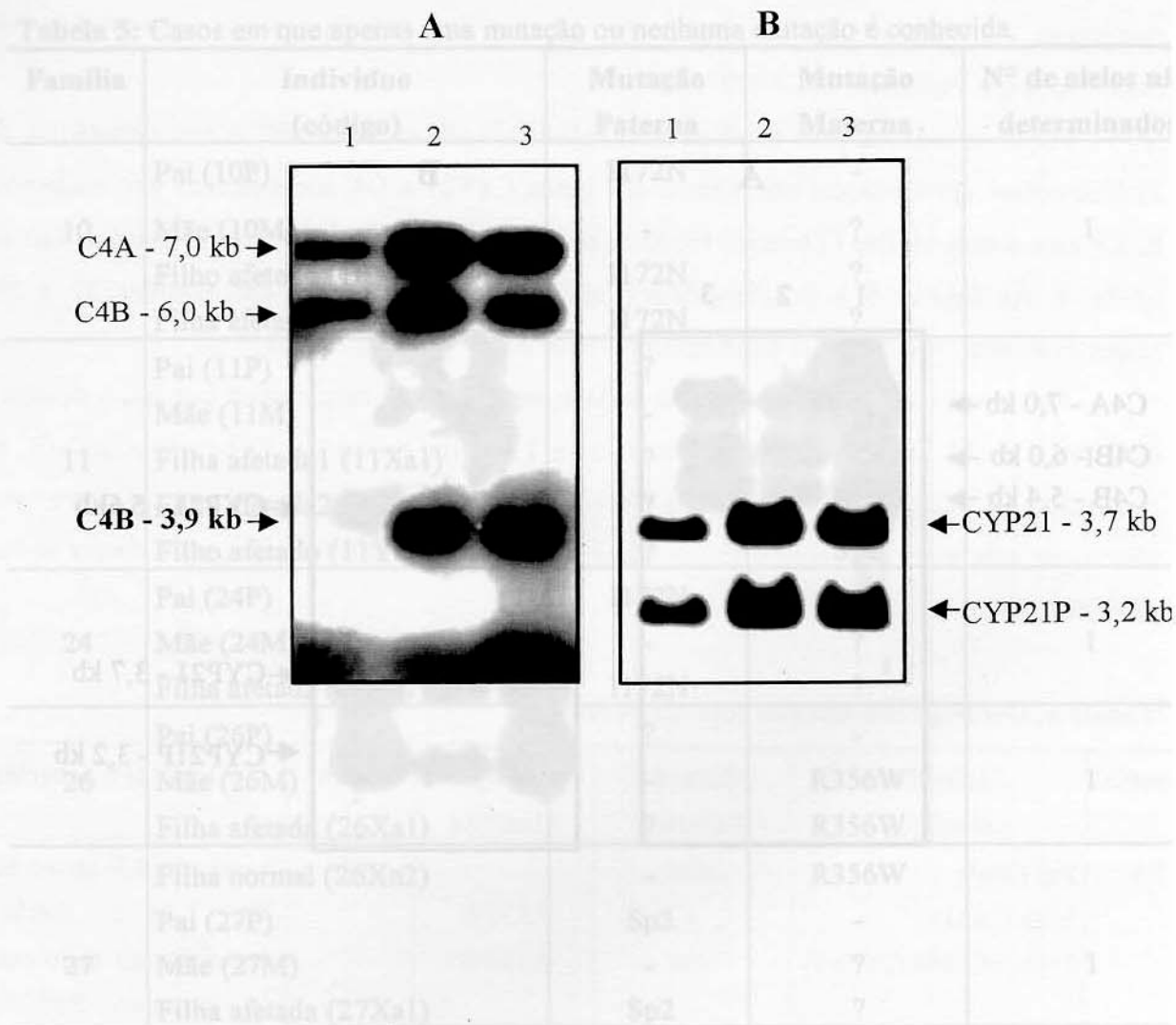


Figura 5: 'Blots' de RFLP com a enzima *Taq* I e hibridização com sondas para o gene C4 (A) e CYP21 (B), da família 22. Os genes correspondentes estão indicados na figura, bem como o tamanho de cada banda. O fragmento raro de 5,6 kb está presente em mãe e filha afetada. 1- Pai; 2- Mãe; 3- Filha afetada. (Araujo, M. 1996).



2. Obtenção das amostras:

Utilizou-se amostras de DNA genômico extraídas a partir de sangue total dos pacientes e de seus familiares, coletadas no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do HC-UNICAMP. Foram colhidos de 10 a 20 ml de sangue periférico em tubos cônicos, contendo 1,0 ml de EDTA (etilenediaminotetracetato dissódico.2H₂O) 10 % pH 8,0 como anti-coagulante.

3. Extração de DNA genômico a partir de sangue total (Araujo *et al.*, 1996):

Adicionou-se Solução A ao sangue coletado até o volume de 50 ml e manteve-se o tubo a 4°C por 30 minutos, para lise das hemácias. Centrifugou-se a 2.000 rpm, 4°C por 10 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado ('pellet') em 20 ml de Solução A. Após a repetição da operação o 'pellet' foi ressuspensão em 1 ml de Solução B diluída para 1x. Acrescentou-se 250 µl de Solução C, contendo Proteinase K.

<u>Solução A</u>	<u>Solução B</u> (estoque 2x):	<u>Solução C (recém-preparada):</u>
[] final	[] final	[] final
MgCl ₂5 mM	Na ₂ EDTA.....20 mM	Solução B0,5x
Sacarose.....0,32 M	NaCl.....20 mM	SDS.....5 %
Tris-HCl pH 8,0.....10 mM	Tris-HCl, pH 8,0.....20 mM	Proteinase K.....1 mg/ml
Triton-X 100.....1 %		

Incubou-se a mistura sob leve agitação a 37°C, durante um período de aproximadamente 18 horas, ou a 65°C, por 2 horas. Para a extração do DNA, adicionou-se 1,25 ml de TE 1x (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 (Applied Biosystems). Homogeneizou-se a mistura por inversão cuidadosa do tubo durante 5 minutos, após o qual centrifugou-se a 2.500 rpm por 15 minutos, à temperatura ambiente, para separação e recuperação da fase aquosa (superior). À fase aquosa, acrescentou-se novamente igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 seguido de centrifugação, repetindo-se o procedimento duas vezes com solução

fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1; v:v:v) e por último com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v:v). Para a precipitação do DNA, acrescentou-se 1/10 do volume obtido de acetato de sódio 3 M e 2,5x o volume de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado foi recuperado com o auxílio de uma haste plástica esterilizada e lavado com etanol 70% antes de ser ressuspenso em volume que variou de 200-500 µl de TE 1x. A concentração de DNA obtida foi calculada através de leitura de absorbância a 260 nm em espectrofotômetro, sendo a integridade do DNA testada em de gel de eletroforese (ver item 4).

4. Gel de Eletroforese (Sambrook *et al.*, 1989):

A verificação da qualidade do DNA genômico extraído, amplificação de produto de PCR e separação dos fragmentos originados por digestão enzimática foi feita a partir da realização de eletroforese em gel de agarose 0,8% (para digestão e DNA genômico) ou 1,5% (para produto de PCR) em TBE 1x, preparado segundo protocolo descrito em Sambrook *et al.* (1989). Solução estoque de tampão utilizado na corrida eletroforética e preparação do gel:

TBE (Tris-Borato) 10x

ácido bórico	55,0 g
trizma-base	108 g
EDTA 0,2 M, pH 8,0	100 ml
H ₂ O	q.s.p. 1.000 ml

Aplicou-se a amostra no gel juntamente com 1/10 do volume de tampão de corrida (0,25% de Azul de Bromofenol; 50% glicose). As condições de corrida variaram de 60 a 100 V. Os marcadores de peso molecular utilizados foram DNA 'ladder' de 1 kb ou de 100 pb (Gibco BRL), utilizando-se 5 µl de solução estoque de 40 ng/µl. Corou-se o gel em solução diluída de Brometo de Etídeo (0,5 µg/ml) durante 10 minutos, sendo visualizado em transluminador de luz ultra-violeta e fotografado com câmera Polaroid.

5. Amplificação por Reação de Polimerização em Cadeia - PCR (Polymerase Chain Reaction)

O gene CYP21 e o pseudogene CYP21P têm aproximadamente 3,0 kb em tamanho e apresentam cerca de 96 % de homologia entre si (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986). Este fato dificulta o estudo de mutações pontuais no gene CYP21, pois estas podem muitas vezes estar presentes também em CYP21P. O seqüenciamento e identificação de mutações exclusivas do gene CYP21 envolve a distinção entre gene e pseudogene. Esta distinção é feita com base em método descrito por Owerbach *et al.* (1990), que se vale da presença de uma deleção de 8 pares de base no éxon 3, sempre presente no pseudogene. 'Primers' desenhados para se anelarem nesta região, porém sem a deleção de 8 pb, são capazes de amplificar seletivamente o gene CYP21. Utilizou-se a mesma estratégia para o uso de 'primers' específicos de CYP21 que se anelassem em uma região do éxon 6, onde se identifica uma diferença em três pares de bases entre gene e pseudogene (mutação CL6).

Os 'primers' para seleção de CYP21 utilizados neste trabalho foram descritos por Wilson *et al.* (1995a) (tabela 6). Os 'primers' não seletivos para o gene CYP21 utilizados na amplificação e seqüenciamento do mesmo foram desenhados com o auxílio do programa 'Gene Runner', versão 3.0 (tabela 7). Uma primeira reação de amplificação com os pares 5'21B1-Ex6na (ou 5'21B1s-Ex3na), Pro1-Ex6na e Ex3ns-Int10ants foi utilizada para selecionar o gene CYP21. Estes fragmentos foram posteriormente utilizados como molde para a realização de 'nested' PCR, em casos específicos, ou na realização de seqüenciamento direto. A figura 7 mostra uma representação esquemática da posição dos 'primers' e tamanho dos fragmentos obtidos.

Tabela 6: Seqüências dos 'Primers' utilizados para seleção do gene CYP21.

'Primer'	Seqüência (5'-3')	T _m (°C)	Localização
Ex3ns*	CGG ACC TGT CCT TGG GAG ACT AC	66,0	Exon 3
Ex3na*	TCC AGA GCA GGG AGT AGT CTC	66,0	Exon 3
Ex6na*	AGC TGC ATC TCC TCG ATG TGA	64,0	Exon 6
Ex6ns*	GAG GGA TCA CAT CGT CGT TGG AGA TG	72,0	Exon 6

* 'primers' descritos por Wilson et al 1995^a; s: sense; as: antissense

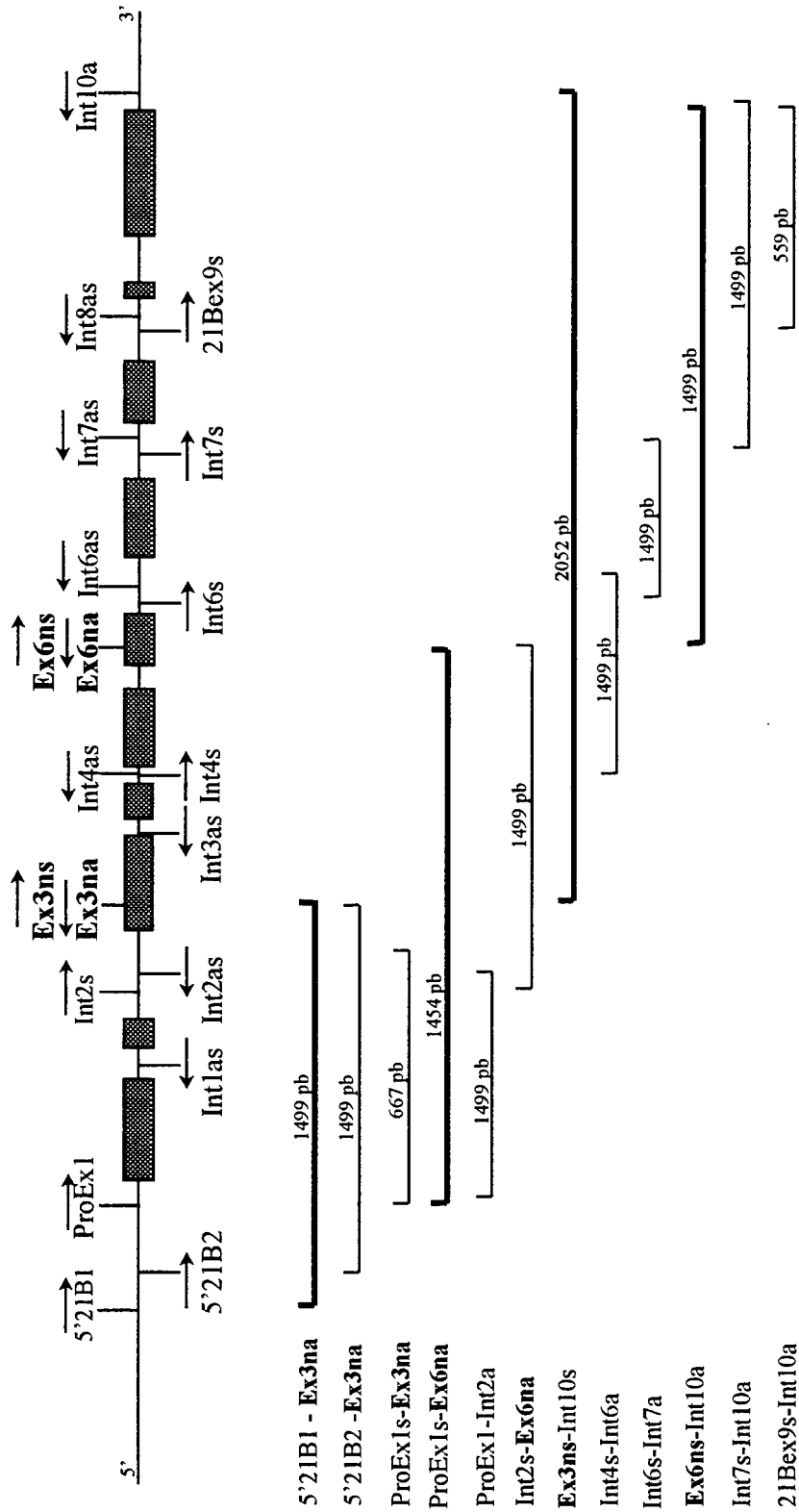


Figura 7: Representação esquemática do gene CYP21 e da localização relativa dos 'primers' utilizados para amplificação gênica. Os retângulos escuros representam os éxons de 1 a 10. A orientação dos 'primers' é dada pelo sentido das setas acima deles. Os 'primers' em negrito foram utilizados para selecionar o gene CYP21 em detrimento do pseudogene CYP21P. Os outros 'primers' foram utilizados para reamplificação e sequenciamento do gene. Abaixo estão relacionados o tamanho dos fragmentos originados.

Tabela 7: Sequências dos 'Primers' utilizados para amplificação e sequenciamento do gene CYP21.

'primer'	Seqüência (5'-3')	T _m (°C)	Obs.
5'21B1s	GAG TGA GTG CCC ACA AAG C	60,0	5'21B1-Ex6na: 1381 pb
5'21B2	AGT AAA CTG GCC CAC GGT G	60,0	5'21B2-Ex6na: 1079 pb
ProEx1s	GGA TGG CTG GGG CTC TTG AG	66,0	ProEx1s-Int2as: 576 pb
Int1as	CAG CCA AAG CAG CGT CAG CG	66,0	-
Int2as	CAC ACT TGA GGC TGA GGT GG	64,0	-
Int2s	GAG ATG GGT TCT TGC TAT GCT G	60,0	Int2s-Ex6na: 964 pb
Int2s2	CCT TCA TCA GTT CCC ACC CTC	60,0	Int2s2-Ex6na: 771 pb
Int3as	CTG TGA GAG GCG AGG CTG AC	60,0	-
Int4as	CAG TTC AGG ACA AGG AGA GGC	62,0	-
Int4s	GTG CCT CAC AGC CCC TCA G	64,0	Int4sens-Int6ants: 539 pb
Int6as	GGT GAA AGG AGC GGG CTG AG	66,0	-
Int6s	CAG TGA TGC TAC CGG CCT C	62,0	Int6sens-Int7ants: 405 pb
Int7as	CAG AGC TGA GTG AGG GTG	60,0	-
Int7s	CCG GCA CTC AGG CTC ACT	60,0	Int7s-Int8a: 347 pb
Int8a	GGG CTG GAG TTA GAG GCT GG	62,0	-
Ex81na*	TTC GTG GTC TAG CTC CTC CTG	67,0	-
21Bex9s	TTG GGG ATG AGT GAG GAA AG	60,0	21Bex9A-Int10ants: 573 pb
Int10as	GAA ACT GAG GTA CCC GGC	58,0	-

* 'primer' descritos por Wilson et al 1995a; s: sens; as: antissense

Na caracterização dos fragmentos raros de RFLP observados nas famílias 22 e 26, foram desenhados 'primers' para a região 3' do gene CYP21 e para a região 5' do gene C4B, respectivamente (tabela 8).

Tabela 8: Sequências dos 'Primers' utilizados na amplificação da região 3' do gene CYP21 e CYP21P e do gene C4B.

'Primer'	Seqüência (5'-3')	T _m (°C)	Obs.
3'21Bs	GAT CGC TGG CAG AGA AGG C	62,0	CYP21Int10s-Cyp21Int10a: 318 pb
3'21Bas	GAG GTT GGT TGA GTG CTG GG	62,0	
C4B1s	GGT GCT CAG GCA CTG GAA TG	64,0	C4B1A-C4B1B: 915 pb
C4B1as	AGG CCA CAG CTC TTC GCA TC	64,0	

s: sens; as: antissense

Segue-se a reação geral de amplificação por PCR utilizada para a caracterização tanto de mutações novas quanto dos polimorfismos de RFLP.

Reação	[] final	Ciclo geral
DNA genômico	0,5 - 1 µg	1 ciclo de: 94°C, 5 min
Tampão Gibco BRL (10x)	1 x	
MgCl ₂	1,5 mM	30 ciclos de: 94°C, 45 seg
dNTP (Pharmacia)	0,1 mM	T _m do 'primer', 1 min
'primer' sense	20 pmoles	72°C, 1m 15 seg
'primer' antissense	20 pmoles	
Enzima Taq DNA polimerase	2,0 U	1 ciclo de: 72°C. 5 min
Gibco BRL (5 U/µl)		
Volume Final	50 µl	

Tampão Gibco BRL 10 x Concentrado	[] estoque
Tris-Hcl pH 8,4	200 mM
KCl	500 mM

No caso do produto de PCR gerado pelos pares 5'21Bs-Ex3na (1.381 pb) e ProEx1s-Ex6na (1.457 pb), foi delineado um ciclo que se beneficia da estratégia de amplificação por PCR 'Touchdown' (Don *et al.*, 1991). Por este método, os primeiros ciclos da PCR são realizados a uma temperatura muito superior ao da T_m do par de 'primers', que é gradativamente reduzida nos ciclos seguintes até alcançar a temperatura ótima de anelamento, quando começa o ciclo normal de amplificação. Este procedimento tem por finalidade dar uma vantagem numérica inicial aos fragmentos gerados apenas pelo anelamento específico dos 'primers', evitando que produtos formados por um pareamento incorreto sejam amplificados em quantidades suficientemente altas para interferir no seqüenciamento. O ciclo abaixo refere-se ao do par 5'21Bs-Ex3na, mas foi utilizado como base também para o par ProEx1s-Ex6na, variando-se apenas a T_m. Ciclo de PCR 'Touchdown':

1 ciclo de :	94°C, 5 min
12 ciclos de:	94°C, 1 min 72°C-65°C, 1 min (-0,5°C por ciclo) 72°C, 3 min
30 ciclos de:	94°C, 1 min 65°C, 1 min 72°C, 1 min
1 ciclo de	72°C, 5 min

A amplificação dos fragmentos foi testada em gel de agarose 1,5%, conforme descrito no item 4.

6. PCR alelo-específico:

Para a confirmação da mutação H38+C encontrada na família 41, que se refere à inserção de um nucleotídeo C, foram desenhados dois 'primers', um com a sequência normal e outro com a sequência mutante (tabela 9), para serem utilizados em PCR de amplificação específica destes alelos. O 'primer' ancorador escolhido para selecionar o gene CYP21 foi o Ex3na.

Tabela 9: Sequências dos 'Primers' utilizados em PCR-Alelo específico da mutação H38+C

'Primer'	Sequência (5'-3')	T _m (°C)	Observação
41Norsense	GAA GCT CCG GAG CCT CCA CC	68,0	41N/M-Ex6na: 1.335 pb
41Mutsense	GAA GCT CCG GAG CCT CCC AC	68,0	-

Segue-se a descrição dos reagentes e do ciclo utilizado para a amplificação seletiva dos alelos.

Reação	[] final	PCR alelo-específico, Família 41	
DNA genômico	1 µg	1 ciclo de :	94°C, 5 min
Tampão Gibco BRL (10x)	1x	12 ciclos de:	94°C, 1 min
MgCl ₂	1,5 mM		72°C-65°C, 1 min (-0,5°C por ciclo)
dNTP (Pharmacia)	0,2 mM		72°C, 3 min
BSA 1%	0,1%	30 ciclos de:	94°C, 1 min
'primer' 41Muts ou 41Norms	20 pmoles		65°C, 1 min
'primer' Antisense	20 pmoles		72°C, 1 min
enzima Taq DNA polimerase	2,0 U	1 ciclo de	72°C, 5 min
Gibco BRL (5 U/µl)			
Volume Final	30 µl		

7 - Reação de seqüenciamento:

Para o seqüenciamento direto do produto de PCR procedeu-se com um pré-tratamento do mesmo com as enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP – 'Shrimp Alkaline Phosphatase') no intuito de remover o DNA fita simples residual e os dNTPs remanescentes (PCR product pre-sequencing kit – Amersham/Pharmacia).

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

Tempo de reação: 37°C..... 15 minutos
 85°C..... 15 minutos

O método selecionado para o seqüenciamento tem como princípio a utilização dos quatro terminadores didesoxinucleotídeos (ddNTPs) marcados com o isótopo α -³³P. Desta feita ao final da reação apenas estarão marcados o DNA fita simples que resultarem de polimerização e terminação da cadeia por um ddNTP, evitando a marcação de fitas simples

resultantes de terminação prematura. Fez-se uso do 'Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit' da Amersham/Pharmacia.

Reação	Volume	[] final
Tampão de reação 10x	2 µl	1 x
PCR Pré-tratado	7 µl	50-500 ng
'primer' sense/antisense (20 pmoles/µl)	1 µl	2 pmoles
Thermo Sequenase polimerase (4 U/µl)	2 µl	8 unidades
H ₂ O	qsp 20 µl	

Transferiu-se 4,5 µl da reação para quatro tubos, cada um contendo 0,06 µM de um dos ddNTP (α -³³P) e 6 µM de mistura de dNTPs, num volume final de 7 µl. Submeteu-se a reação à seguinte ciclagem:

40 ciclos: 95°C , 30 segundos
 T_m do 'primer', 30 segundos
 72°C, 1 minuto

Ao final da reação acrescentou-se 4 µl de Solução de Terminação contendo 95% de formamida, 0,05% de Azul de bromofenol e 20 mM de EDTA.

8- Gel de Seqüenciamento

Separou-se a reação de seqüenciamento em Gel Desnaturante de Poliacrilamida 7% contendo Uréia 7 M, com variação de espessura de 0,1- 0,4 mm.

	Volume	[] final
Acrilamida.Bisacrilamida (19:1) 40%	17,5 ml	7%
TBE 10x	10 ml	1x
Uréia	106 g	7 M
Água	q.s.p. 100 ml	

Os parâmetros de corrida foram 2.000 V, 50 mA a 50 W, por tempos que variaram de 2 a 4 horas. Após a corrida o gel foi fixado em solução contendo metanol (10%): ácido acético (10%) por 20 minutos e seco em forno a 37°C por 16 horas. Posteriormente foi exposto a filme de raio-X sensíveis à emissão de radiação do nucleotídeo marcado (por exemplo, Kodak X-Omat AR), por tempo variável. A revelação do filme foi feita de acordo com as indicações do fabricante.

9. Análise da Sequência

Existem duas seqüências completas do gene CYP21 depositadas no GeneBank (NCBI-NIH). Essas duas seqüências apresentam algumas variações entre si, dado que foram obtidas de populações diferentes. Higashi *et al* (1986) fizeram o seqüenciamento a partir de indivíduos de origem étnica japonesa, enquanto Rowen *et al* (1997) o fizeram a partir de caucasóides. Optamos por utilizar como base de leitura a descrita por Rowen *et al.* (1997), fazendo uma redução de tamanho, focalizando na região do CYP21. A análise da seqüência foi, então realizada por comparação com a original descrita no banco 'GeneBank DNA sequence' da 'National Center for BioTechnology Information' (NCBI) sob o número de acesso AF019143, da qual foi selecionada a parte correspondente ao gene CYP21 incluindo aproximadamente 600 pb da região 5' ao início da transcrição. Para melhor compreensão dos resultados descritos a seqüência com respectiva numeração nucleotídica utilizada como base para a análise encontra-se no Anexo 1. Vale observar que essa seqüência corresponde à variante com 5 códons de Leucina nas posições de aminoácidos 6, 7, 8, 9 e 10.

A comparação entre gene e pseudogene foi feita com base na seqüência do gene CYP21 descrita acima e a seqüência do pseudogene CYP21P descrita por Higashi *et al.* (1986).

10. Reação de digestão com enzimas de restrição (Sambrook *et al.*, 1989):

A digestão com enzimas restrição foi utilizada para estudar padrão de restrição em DNA genômico e para avaliação de variabilidade de sítio em produto de PCR. Realizou-se a digestão total de DNA genômico e produto de PCR com a enzima *TaqI* (Pharmacia), no caso das famílias portadoras de polimorfismos raros de RFLP. O produto de PCR de indivíduos afetados e familiares das famílias 39 (Int2s-Ex6na) e 24 (Ex3ns-Ex6na) foram digeridos com as enzimas

Pst I e *Pvu* II (Gibco BRL), respectivamente, de acordo com procedimento descrito em Sambrook *et al.* (1989). A reação ocorreu à temperatura ótima de cada enzima, descrita pelo fabricante, num volume de 150 µl contendo:

	[] final
DNA genômico / PCR	10 µg / 1 µg
enzima	1 U para cada µg de DNA
Tampão 10 x	1x
Água	q.s.p 150 µl

11. Precipitação e ressuspensão do DNA:

No caso da digestão de DNA genômico para realização de 'Southern blot' e avaliação de polimorfismos de RFLP, após a certificação da qualidade da digestão do DNA em eletroforese em gel de eletroforese (item 4), as amostras foram precipitadas com acetato de sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$), pH 5,5, na concentração final de 0,3 M e 2,5 Volumes de etanol absoluto gelado, sendo deixadas a -20°C por um período de tempo mínimo de 18 horas. Para ressuspensão do DNA digerido, centrifugou-se a amostra a 12.000 rpm em microcentrífuga por 20 min. O 'pellet' resultante foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 12.000 rpm por 5 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e, após a evaporação do álcool, ressuspendeu-se em volume apropriado de TE 1x (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM), para uma concentração final de 1 µg DNA/µl.

12. Recuperação e purificação dos fragmentos:

Foi realizada purificação de fragmentos para uso como sonda por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (item 4). O fragmento foi recuperado em papel DEAE (DE-81), por método descrito em Sambrook *et al.* (1989), modificado. O gel de agarose foi preparado com tampão TAE 1x (Tris-Acetato), utilizado também como tampão de corrida:

TAE 50x

Trizma Base	242 g
Ácido Acético Glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	100 ml
H ₂ O	q.s.p. 1.000 ml

Com um bisturi estéril fez-se uma incisão no gel à frente da região contendo o fragmento de interesse e nela inseriu-se um pedaço de papel DEAE (DE-81). Restabeleceu-se a eletroforese até que todo o fragmento tivesse migrado para o papel, o que foi monitorado por luz U.V. Em seguida o papel DEAE foi transferido para um tubo de microcentrifuga contendo 400 µl de tampão de Eluição e incubado a 65°C por 30 minutos, solução microfiltrada em filtro de 0,45 µm. Centrifugou-se o tubo por 15 minutos a 12.000 rpm e retirou-se o sobrenadante, deixando o papel ao fundo. Repetiu-se o processo por duas vezes. O DNA foi então precipitado com 2,5 Volumes de Etanol absoluto a -20°C, por um período de aproximadamente 18 horas. A recuperação do fragmento se deu conforme descrito no item 1.1.

Tampão de Eluição	[] final
Tris-HCl 1 M, pH 7,9	10 mM
EDTA 0,5 M pH 8,0	1 mM
NaCl 5 M	625 mM

13. Transferência do DNA para suporte sólido ('Southern Blot')

Foi realizada eletroforese visando a transferência de DNA para um suporte sólido pelo método 'Southern blot', descrito por Southern, 1975, modificado (Sambrook *et al*, 1989). Após ser fotografado, o gel sofreu tratamento através de imersão em duas soluções:

- a.) Solução ácida (depurinação), por 15 min.: HCl 0,25 N
- b.) Solução alcalina (desnaturação), por 30 min ou mais: NaOH 0,4 N; NaCl 1 N

Montou-se então o sistema de transferência, constituído pelas seguintes camadas:

- 1.) duas folhas de papel Whatman 3MM para compor a ponte, que permite a subida do tampão por capilaridade;
- 2.) gel;
- 3.) membrana de nylon Hybond N⁺(Amersham), cortada do tamanho do gel;
- 4.) duas folhas de papel Whatman 3MM (tamanho do gel);
- 5.) quatro folhas de papel 'blotting paper' (Sigma) (tamanho do gel);
- 6.) papel absorvente;
- 7.) peso.

As extremidades da ponte entram em contato direto com a solução de transferência, que foi a mesma utilizada para a desnaturação. O tempo da transferência foi de aproximadamente 18 h. Após a transferência realizou-se a neutralização da membrana, por imersão da mesma em solução de neutralização durante 30 min.

c) Solução de neutralização: Tampão Fosfato de sódio 0,1 M

A membrana foi seca em papel de filtro e colocada em um forno a 80°C por 2 h.

14. Sondas utilizadas

A sonda para o gene da 21-hidroxilase foi gentilmente cedida pelo Dr. Perin White, Cornell University Medical College, New York, EUA. A sonda pC21/3c é um cDNA completo obtido do mRNA da enzima 21-hidroxilase de adrenais humanas, sendo o vetor o pcD (3.0 kb). A sonda tem 2.1kb e está inserida no sítio de *Bam* HI do vetor. Quando este inserto é digerido com *Eco* RI origina dois fragmentos, um de 0,6 kb e um de 1,5 kb, correspondentes aos terminais 5' e 3' do gene, respectivamente.

A outra sonda utilizada é correspondente ao gene da proteína do Sistema Complemento, C4, que foi gentilmente cedida pelo Dr. Tom Strachan, Dpt of Medical Genetics, St Mary's Hospital, Manchester, Inglaterra. É um clone de cDNA da região 5' do gene, possuindo 550 pb e sendo obtida através de digestão com *Bam* HI e *Kpn* I.

Os plasmídios contendo as sondas de interesse foram inseridos em bactérias por transformação para manutenção e posterior amplificação, segundo protocolos descritos em Sambrook *et al.* (1989).

15. Marcação das sondas:

As sondas foram marcadas radioativamente com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham) basicamente pelo método de 'Random Priming', seguindo o protocolo do fabricante do kit de marcação (Stratagene). Todas as reações foram monitoradas com contador Geiger.

15.1. Random priming

Desnaturou-se 25-50 ng do DNA por aquecimento a 95-100°C, durante 10 min e em seguida colocou-se o tubo em gelo por 5 min. Centrifugou-se rapidamente e acrescentou-se:

[] final

tampão (0,67 M de HEPES, 0,17mM Tris-HCl, 17 mM	
de MgCl_2 , 33 mM 2-mercaptoetanol, 1,33 mg/ml de	
BSA, 'primers' aleatórios (hexâmeros); pH 6.8	 1 x
Cada dNTP	 0,01 mM
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mmol)	 (Volume) 5 μl
Fragmento Klenow DNA Polimerase	 3 unidades
H_2O q.s.p	 50 μl

Incubou-se a 37°C por 2h. A reação foi interrompida com 5 μl de 'stop buffer' e 45 μl de TE 1x.

16. Purificação da sonda:

A sonda foi purificada através da passagem por uma coluna de Sephadex G-50 (Pharmacia), feita pelo empacotamento de solução estoque saturada com Tris-HCl, 1 M, pH 8,0, em uma seringa de 1 ml adaptada a um suporte, através de sucessivas centrifugações de 4

min a 3.000xg. Antes de purificar a sonda, equilibrou-se a coluna com 100 µl de TE, por centrifugação. Retirou-se 1 µl da sonda purificada para a contagem do nível de incorporação radioativa em contador de cintilação líquida.

17. Pré-hibridização e Hibridização:

Após a transferência pelo método de 'Southern blot', a membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham) contendo o DNA imobilizado foi hibridizada com sondas para CYP21 e C4 protocolo descrito por Mornet *et al.* (1986), modificado.

17.1. Pré-hibridização:

As membranas obtidas por 'Southern blot' foram incubadas a 42°C em 10 ml de solução de pré-hibridização, sob agitação, por aproximadamente 18 h.

Solução de Pré-Hibridização	volume	[] final
Formamida deionizada.....	50 ml	50 %
100x Denhart's.....	10 ml	10x
20x SSC.....	25 ml	5x
SDS 20%.....	5 ml	1%
Tris-HCl 2M pH 7.0.....	1 ml	0,2 M
água estéril.....	9 ml	

Acrescentou-se na hora do uso 100 µg/ml de DNA de Esperma de Salmão (ssDNA) desnaturado por aquecimento.

17.2. Hibridização:

A Solução de pré-hibridização foi substituída pela de Hibridização, que é idêntica à primeira, com exceção da utilização de apenas 2 ml de reagente Denhardt's 100x. Na hora do uso, acrescentou-se Sulfato de Dextran na concentração de 100 µl/ml e 100 µg/ml de DNA de Esperma de Salmão, desnaturado por aquecimento. Antes de ser adicionada à solução, a sonda

marcada foi desnaturada com o acréscimo de 1/33 Volume de NaOH 10 N. Incubou-se os filtros sob agitação a 42 °C, por no mínimo 16 horas ('overnight').

18. Lavagens:

Após hibridização, os filtros foram lavados em solução de estringência média (2x SSC; 0,1% SDS) à temperatura ambiente, por 10 min, como descrito em Sambrook *et al.* (1989). Em seguida lavou-se os filtros duas vezes em solução de alta estringência (0,1x SSC; 0,1% SDS) a 65°C durante 15 min. Este processo retira as sondas hibridizadas com seqüências de baixa homologia, deixando somente as hibridizadas com seqüências de alta homologia.

19. Auto-radiografia e remoção da sonda das membranas :

Os filtros lavados foram expostos a filmes de raio-X sensíveis à emissão de radiação do nucleotídeo marcado (por exemplo, Kodak X-Omat AR) em cassetes de exposição com intensificador de sinal ('Lightning Plus' da Dupont), a -70°C por períodos variáveis. Após este período os filmes foram revelados e lavados. Os filmes foram analisados quanto ao tamanho e presença dos fragmentos. A sonda foi removida dos filtros por um processo que consistiu da incubação dos mesmos em solução contendo 5 mM de Tris-HCl pH 8,0, 0,04% de EDTA e 0,1% de SDS, a 95-100°C, até que a solução atingisse a temperatura ambiente. Os filtros tratados foram selados em saco plástico e armazenados a 4°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira triagem para delinear o perfil do complexo gênico da enzima 21-hidroxilase em famílias apresentando portadores de deficiência da 21-hidroxilase, constituiu-se da identificação do padrão de hibridização com sondas CYP21 e C4 em 'Southern blots' produzidos por digestão com enzimas de restrição. Essa triagem nos indicou uma variabilidade bastante acentuada quanto ao arranjo do *locus* gênico nas famílias recrutadas (Araujo, 1996; Araujo *et al.*, 1996). Paulino *et al.* (1999) estimaram as frequências de microconversões no gene CYP21, que são mutações originárias do pseudogene CYP21P, responsáveis pela deficiência da 21-hidroxilase. A proposta do presente trabalho foi a caracterização de alelos raros identificados durante a análise do 'cluster' gênico da 21-hidroxilase e de alelos pertencentes a indivíduos afetados pela HCA mas nos quais não foram identificados deleção, conversão ou uma das nove mutações triadas que pudessem explicar o fenótipo observado de doença.

Aproximadamente 15% dos alelos estudados por 'Southern Blot' e análise de mutações previamente conhecidas por ASOH permaneceram não elucidadas quanto à causa da HCA. Esta porcentagem está de acordo com dados de literatura, como descrito previamente na introdução. Pode-se inferir que estes alelos sem identificação das mutações mais frequentes resultantes de microconversões devem ser portadores de alguma mutação rara, determinadas apenas por seqüenciamento direto do gene afetado. Foram estudadas 6 famílias onde somente 1 alelo responsável por HCA devido à deficiência da 21-hidroxilase está determinado e 1 família, apresentando consangüinidade, na qual nenhuma mutação foi determinada, totalizando 7 alelos afetados. Dentre estes pacientes, um está associado com a forma clássica virilizante simples e seis com a forma grave perdedora de sal.

Dois alelos, em duas famílias diferentes, se destacaram dentre as estudadas através de análise de RFLP, por apresentarem padrão gênico diverso do normalmente encontrado, quando se efetuou digestão com a enzima *Taq* I e hibridização com sonda para os genes da 21-hidroxilase e de C4. Na família 22, o padrão de RFLP com a enzima *Taq* I e hibridização com sonda específica para CYP21 apontou a presença de um fragmento extra que, por coincidência, apresenta o mesmo tamanho de 5,4 kb característico do fragmento originado por digestão com *Taq* I e hibridizado com sonda de C4. O alelo é de origem materna e está presente na filha afetada e no filho não afetado. Na família 26, o padrão de hibridização diferiu do normal para o gene C4B. A análise de RFLP com a enzima *Taq* I e hibridização com sonda para o gene de C4 da mãe, filha normal e filha afetada revelou,

além dos fragmentos normais de 7,0 e 6,0 kb (C4A e C4B), um fragmento de 3,9 kb, inicialmente identificado como sendo de 3,7 kb devido a uma falta de resolução da técnica de 'Southern blot' (Araujo, 1996).

1ª Parte: Identificação de mutações pontuais

Inicialmente havia sido planejado, como estratégia de estudo, executar uma triagem prévia de possíveis alterações no gene CYP21, utilizando-se da técnica de SSCP ('Single Strand Conformation Polymorfism'). Esta técnica baseia-se na variação da conformação secundária de DNA fita simples entre seqüências normal e com alguma mutação pontual, separados em gel não desnaturante. Posteriormente seria realizado o seqüenciamento dos fragmentos que originassem alteração do padrão normal. Várias tentativas foram feitas no sentido de padronizar este protocolo para o estudo do gene CYP21, porém essa estratégia não se mostrou adequada pelo fato de não se poder amplificar éxons isoladamente sem que ocorresse a co-amplificação do pseudogene CYP21P. A seleção do gene CYP21 com 'primers' específicos daria origem a fragmentos amplificados com tamanho superior à capacidade de resolução da técnica de SSCP. Seria necessário a redução do tamanho dos fragmentos por digestão com enzimas de restrição. Nesse caso, o número de fragmentos obtidos dificultou a padronização do SSCP, devido à complexidade do padrão de bandas formados. A presença de muitos polimorfismos no gene CYP21 também contribuiu para a complexidade da análise. Assim, realizou-se o seqüenciamento direto de toda seqüência gênica em todos os indivíduos.

Para o seqüenciamento da totalidade do gene CYP21, englobando os 10 éxons, 9 íntrons e 655 pb anteriores ao códon ATG de iniciação, 16 'primers' foram desenhados, com o auxílio do programa 'Gene Runner', versão 3.0 (tabela 7, em material e métodos). Os 'primers' necessários à seleção do gene CYP21 em detrimento do pseudogene CYP21P foram retirados da literatura (tabela 6, em material e métodos) (Wilson *et al.*, 1995). Efetuou-se a padronização da reação de PCR dos vários pares de 'primers', sendo os padrões obtidos descritos na metodologia (item 6).

Convém, entretanto, fazer algumas considerações quanto à amplificação de um dos fragmentos a ser seqüenciado. A reação de amplificação por PCR com o par Int2sens-

Ex6na mostrou-se inesperadamente problemática. Não foi capaz de gerar o fragmento esperado do gene CYP21 em alguns indivíduos, apesar de ter dado origem a bandas específicas e bem definidas em outros indivíduos. Após o seqüenciamento da região de anelamento do 'primer' Int2sens, efetuado partir do fragmento gerado pelos 'primers' ProEx1-Ex6na (tabela 7), verificou-se que a posição 20 do 'primer' Int2sens é polimórfica, podendo ser C ou T no nucleotídeo 456 do gene CYP21. Como o 'primer' foi desenhado com o nucleotídeo C nesta posição, os indivíduos homozigotos para T não seriam amplificados. Nos indivíduos heterozigotos para este polimorfismo, poderíamos explicar a aparente presença de mutações e polimorfismos raros em hemizigose, pois apenas um alelo seria selecionado. Entretanto, verificou-se que a amplificação de um único alelo, comprovada pela presença de mutação Sp2 em hemizigose em indivíduos sabidamente heterozigotos, ocorria independentemente da presença de polimorfismo C ou T no nucleotídeo 456. Para evitar os problemas gerados pelo polimorfismo, outro 'primer' foi desenhado para se anelar ao íntron 2, numa posição a 150 pb na direção 3' (Int2s2). Vale ressaltar que a alta variabilidade nucleotídica do íntron 2 dificultou a escolha de uma seqüência invariável e apropriada para o desenho do 'primer'. Ainda assim, na maioria dos casos a aparente hemizigose permaneceu. Com certeza, um dos alelos de CYP21 não foi amplificado. Devem pois existir outros fatores que devem influenciar na amplificação dos fragmentos, o que será discutido mais adiante.

O seqüenciamento do gene CYP21 nos indivíduos estudados revelou diversas variações nucleotídicas quando em comparação com a sequência de CYP21 tomada por base, obtida de um banco de dados e que apresenta o polimorfismo de repetição de 5 leucinas no éxon 1. (Genebank [NCBI-NIH], número de acesso AF019143; Anexo 1). Algumas dessas variações foram encontradas em mais de um indivíduo e em geral em heterozigose. A maioria das alterações podem ser provenientes do pseudogene CYP21P, desde que foram encontradas na sua seqüência registrada no GeneBank (NCBI-NIH, número de acesso M12793).

A tabela 10 identifica as mutações encontradas neste trabalho, bem como as famílias em que não foi possível encontrar nenhuma mutação que pudesse ser associada com o fenótipo doente.

Tabela 10: Resumo das mutações identificadas nas famílias estudadas.

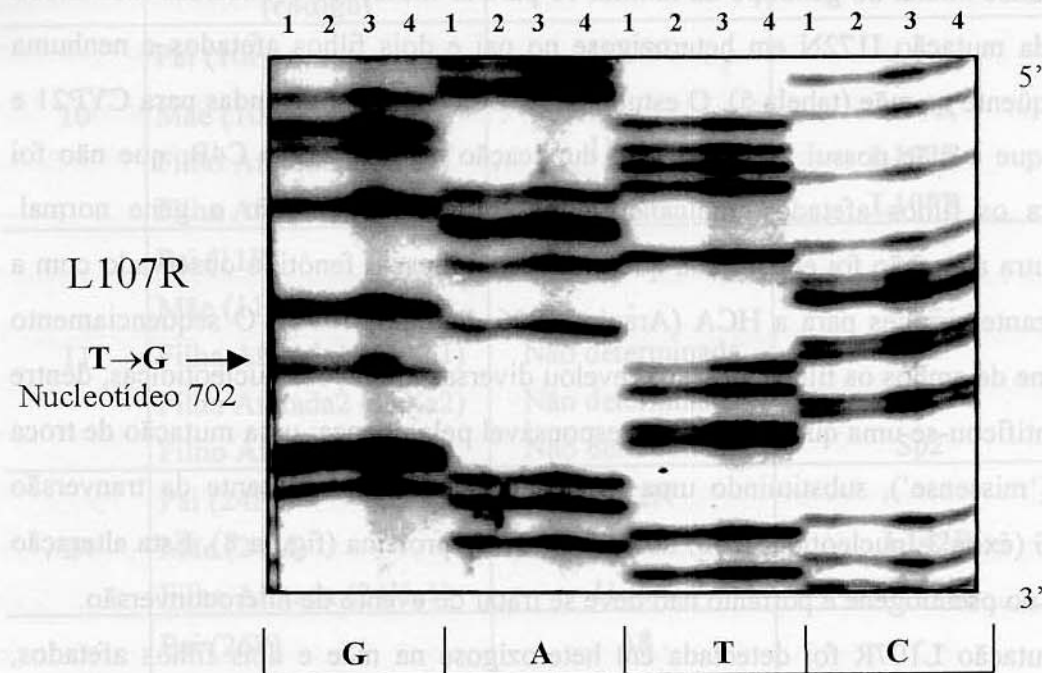
Família	Indivíduo (código)	Mutação Paterna	Mutação Materna	HCA
10	Pai (10P)	I172N	-	VS VS
	Mãe (10M)	-	L107R	
	Filho Afetado (10Ya1)	I172N	L107R	
	Filha Afetada (10Xa2)	I172N	L107R	
11	Pai (11P)	Não determinada	-	PS PS PS
	Mãe (11M)	-	Sp2	
	Filha Afetada1 (11Xa1)	Não determinada	Sp2	
	Filha Afetada2 (11Xa2)	Não determinada	Sp2	
	Filho Afetado (11Ya3)	Não determinada	Sp2	
24	Pai (24P)	I172N	-	PS
	Mãe (24M)	-	L142P	
	Filha Afetada (24Xa1)	I172N	L142P	
26	Pai (26P)	$\Delta 8$	-	PS
	Mãe (26M)	-	R356W	
	Filha Afetada (26Xa1)	$\Delta 8$	R356W	
	Filha normal (26Xn2)	-	R356W	
27	Pai (27P)	Sp2	-	PS
	Mãe (27M)	-	Não determinada	
	Filha Afetada (27Xa1)	Sp2	Não determinada	
39	Pai (39P)	IVS2AS, A→G, -2	-	PS
	Mãe (39M)	-	I172N	
	Filha Afetada (39Xa1)	IVS2AS, A→G, -2	I172N	
41	Pai* (41P)	H38+C	-	PS
	Mãe* (41M)	-	H38+C.	
	Filha Afetada (41Xa1)	H38+C.	H38+C.	
	Filho normal (41Yn2)	-	-	

*casal consanguíneo

1. Identificação da mutação L107R

A análise inicial do genótipo da família 10 para as mutações conhecidas identificou a presença da mutação I172N em heterozigose no pai e dois filhos afetados e nenhuma mutação freqüente na mãe (tabela 5). O estudo de RFLP com *Taq* I e sondas para CYP21 e C4 revelou que a mãe possui um alelo com duplicação de CYP21P e C4B, que não foi passado para os filhos afetados, indicando estar em associação com o gene normal. Nenhuma outra alteração foi encontrada que pudesse explicar o fenótipo observado com a forma virilizante simples para a HCA (Araujo, 1996; Paulino, 1997). O seqüenciamento direto do gene de ambos os filhos afetados revelou diversas alterações nucleotídicas, dentre as quais identificou-se uma que poderia ser responsável pela doença: uma mutação de troca de sentido ('missense'), substituindo uma leucina por arginina, resultante da tranversão CTG→CGG (éxon 3; nucleotídeo 702) no códon 107 da proteína (figura 8). Esta alteração está ausente no pseudogene e portanto não deve se tratar de evento de microconversão.

A mutação L107R foi detectada em heterozigose na mãe e dois filhos afetados, reforçando a hipótese do seu envolvimento na etiologia da doença (figura 8). Esta mutação, não descrita anteriormente, foi identificada numa região próxima a outras duas mutações previamente descritas na literatura: uma neutra, K102R (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986) e a mutação P105L (Wedell *et al.*, 1992) que foi descrita em conjunto com duas outras alterações (Introdução, item 13). Diferentemente destas duas mutações, que promovem a substituição de um aminoácido por outro de mesma polaridade, a mutação L107R resulta na substituição de um aminoácido não-polar (Leucina) por um aminoácido básico (Arginina). As chances desta modificação provocar alguma alteração na estrutura secundária e terciária da proteína são maiores, podendo influenciar na sua atividade frente ao substrato. A comparação das seqüências de aminoácidos de humanos com as de bovinos, roedores e suínos indicou que o códon 107 é polimórfico para os resíduos não-polares de leucina e iso-leucina (Lewis *et al.* 1998; Kawaguchi *et al.*, 1992). Apesar de considerarmos a mutação L107R como causa da HCA nesta família, apenas a realização de análise da expressão da proteína mutante *in vitro* seria capaz de confirmar o seu papel na doença.



5'- AGGAACTACCCGGACC(T/G)GTCCTTGGGAGAC -3'

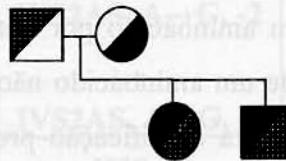


Figura 8: Análise por sequenciamento direto do gene CYP21 da família 10, com o 'primer' Int3as, abrangendo a região do exon 3. A mutação T→G, no nucleotídeo 702, está presente em heterozigose nos indivíduos 1, 2 e 3. Abaixo estão indicados a seqüência do gene CYP21 analisada e o heredograma correspondente à família. 1-Filha afetada; 2-Filho afetado; 3-Mãe; 4-Pai.

2. Identificação da mutação L142P

Outra mutação 'missense' não descrita foi identificada na família 24, onde se tinha determinado que o pai e a filha, afetada com a forma PS, eram portadores da mutação I172N em heterozigose. Pai e mãe apresentavam ainda duplicação de CYP21P e C4B em associação com os alelos não afetados, que não foram passados para a filha afetada. A única alteração identificada em éxon capaz de explicar o fenótipo de HCA foi a transição de CTG→CCG observada no nucleotídeo 807 no códon 142 (éxon 3), que deu origem à substituição do resíduo não-polar leucina por outro não-polar prolina (L142P) (figura 9A). O aminoácido alterado é o segundo de uma sequência de 10 aminoácidos conservados em pelo menos quatro espécies de mamíferos (Lewis *et al.* 1998). Esta transição de nucleotídeo está ausente no pseudogene, indicando não tratar-se de caso de microconversão. A filha teria o genótipo I172N/L142P e um fenótipo predito de VS. Entretanto, a forma PS foi diagnosticada. A relação da mutação com a atividade normal da enzima dependerá da importância do aminoácido alterado para o funcionamento normal da enzima.

O sequenciamento revelou que a filha doente é portadora em heterozigose desta mutação, enquanto que a mãe, portadora obrigatória, não apresentou a mutação, mesmo após a repetição do PCR e do sequenciamento. Ocorreu então a suspeita de que o alelo portador da mutação não estaria sendo amplificado durante a reação de PCR, já que havia precedentes na literatura para tal (Day *et al.* 1996). A confirmação de que a mãe era de fato portadora veio através da análise de digestão de produto de PCR com enzima de restrição. A mutação L142P está posicionada dentro um sítio de restrição para a enzima *PvuII* e a presença da mutação abole o sítio e impede a digestão do DNA (figura 9B). O fragmento Ex3ns-Ex6na foi digerido com *PvuII* revelando que mãe e filha afetada são portadoras de L142P. Presume-se destes dados que a não- amplificação do alelo afetado ocorreu durante a reação de sequenciamento e não no PCR inicial realizado para selecionar o gene CYP21.

Nesta família a mãe apresentou a mutação V281L no alelo que não foi transmitido à filha. Assim ela seria heterozigota composta para a mutação L142P e V281L e deveria apresentar um quadro clínico de hiperplasia não clássica. Aparentemente essa mãe é assintomática e somente a dosagem de 17-OHP, após estímulo com o ACTH, irá indicar se

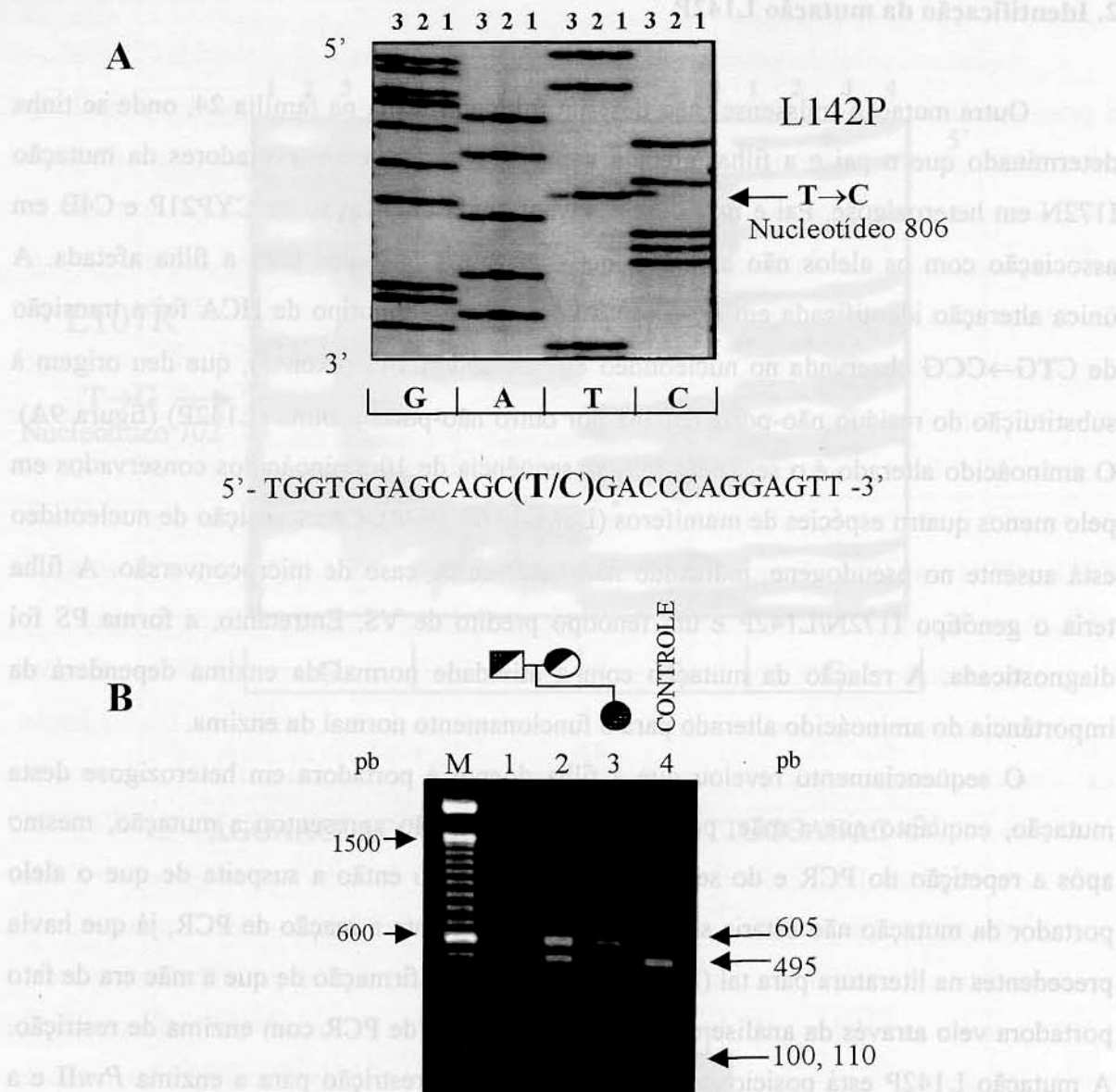


Figura 9: A- Análise por seqüenciamento direto gene CYP21 da família 24, com o 'primer' Int3as, abrangendo a região do exon 3. A mutação T→C, no nucleotídeo 806, está presente em heterozigose no indivíduo 3. Abaixo está indicada a seqüência analisada. B- Heredograma e digestão do produto de PCR In2s-Ex6nas com *Pvu* II. A mutação suprime sítio de restrição de *Pvu* II. Indivíduos 2 e 3 são heterozigotos para a mutação. M- Marcador de Peso molecular; 1- Pai; 2- Mãe; 3- Filha afetada; 4- controle.

existe algum bloqueio da síntese de cortisol, o que já foi solicitado. Como dito anteriormente para a mutação L107R, a análise de expressão e atividade da enzima mutante seria útil e muito mais importante para definir o papel de L142P na doença. Um outro experimento de igual importância é a triagem de uma população normal para a mutação L142P o que afastaria a hipótese de ser um polimorfismo entre genes CYP21.

Dentre os vários polimorfismos identificados no estudo do indivíduo afetado 24Xa1 (tabelas 12 e 13), um se destaca, pela semelhança com um sítio de 'splicing' normal que é criada. Esta alteração de base G→A foi encontrada na posição 1.874, no íntron 7 do indivíduo 24xa1, a +90 pb do sítio normal doador de 'splicing' (figura 10; tabela 13). Existe já uma mutação identificada para o dinucleotídeo GA da fita doadora de 'splice' neste íntron, como descrito na introdução. A presença de mutação criando sítios de 'splicing' alternativo não é uma ocorrência incomum no gene da CYP21, visto que a mutação mais frequentemente encontrada é justamente a Sp2. A alteração por nós identificada possivelmente estaria gerando um sítio alternativo de 'splicing' dentro do íntron 7, o que resultaria na formação de mRNA de tamanho alterado, originando uma proteína truncada. Entretanto, não nos foi possível afirmar a ocorrência deste evento a menos que experimentos de transcrição *in vitro* ou em cultura de células, tendo o produto de PCR como molde, sejam levados a termo. Além do mais, não se determinou se este polimorfismo estaria em associação com a mutação descrita para o éxon 3 e proveniente da mãe ou em associação com a mutação I172N proveniente do pai. A confirmação da associação com o alelo paterno e a realização de experimentos de expressão poderiam de alguma forma explicar o fato de ser observada uma divergência entre o fenótipo predito (VS) e o observado na paciente (PS).

3. Identificação da mutação IVS2AS, A→G, -2

A análise prévia da família 39 quanto às 10 mutações mais frequentes havia definido que a mãe e filha afetada eram portadoras da mutação I172N, enquanto que nenhuma mutação proveniente do pai foi encontrada. Com o seqüenciamento integral de CYP21 do indivíduo afetado, foi possível a identificação em heterozigose de uma mutação nova. Esta mutação consiste em uma transição de AG→GG no sítio consenso de splice, no

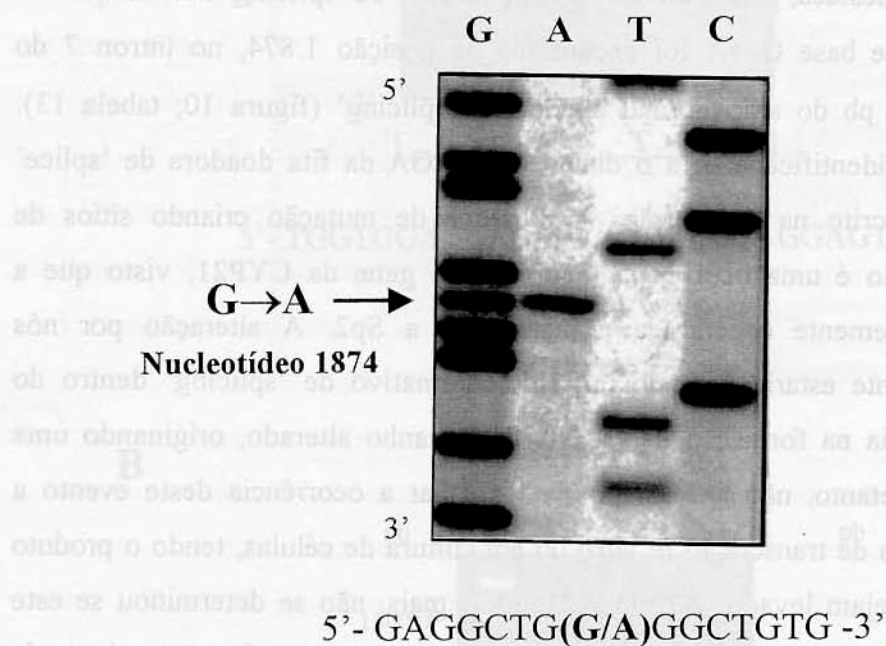


Figura 10: Sequenciamento do gene CYP21 do indivíduo 24Xa1, com o “primer” Ex8na, indicando a presença da alteração G→A em heterozigose no íntron 7, na posição -75 (nucleotídeo 1874 da sequência). O fragmento de sequência do gene CYP21 analisado está indicada logo abaixo.

nucleotídeo 670, localizado na fita aceptora do íntron 2 (figura 11A). Não foi encontrada a variação no pseudogene (Higashi *et al.*, 1986; GenBank, accession #M12793).

O par de dinucleotídios 5'-GT...AG-3' nas extremidades dos íntrons foi identificado em virtualmente todos os mamíferos estudados até o momento (Lajic *et al.*, 1996), sendo que a sua presença é considerada crucial para que ocorra o processamento normal do mRNA. Alterações nestes consensos resultariam na completa incapacidade de realizar a excisão normal do íntron, que seria mantido e traduzido, originando uma proteína maior do que o normal e possivelmente com o quadro de leitura alterado, podendo até gerar códons de terminação precoces. A proteína resultante seria completamente inativa. Como já citado anteriormente, a mutação mais freqüente na deficiência da 21-hidroxilase é a mutação Sp2. A alteração A/C por G na posição -12 do íntron 2 leva à ativação de um sítio de splice críptico, que resulta no processamento imperfeito do mRNA (splicing) com retenção de 19 pb normalmente excisados, levando à alteração do quadro transcricional à criação de um códon de terminação. Foi associada à forma PS, com uma certa variação fenotípica para a forma VS, devido talvez ao fato de que uma pequena porcentagem dos mRNA portadores da mutação serem corretamente processados pela célula. O mesmo não acontece com a mutação descrita para o paciente da família 39. É inferido que todo o mRNA resultante da transcrição do alelo mutante não terá o íntron 2 corretamente excisado. Como resultado haverá um prolongamento da proteína, alteração do quadro de leitura e surgimento de um códon de terminação, como visto abaixo.

93

E	P	L	T	Y	K	L				L	S	L	G	D	Y	
GAG	CCA	CTT	ACC	TAC	AAG	CTG		CTG	TCC	TTG	GGA	GAC	TAC			
																Seqüência normal
E	P	L	T	C	K	G				K	K	I	F	F	stop	
GAG	CCA	CTT	ACC	TGT	AAG	GGC		AAA	AAA	ATT	TTT	TTT	TAA			Seqüência Mutante

Outra mutação foi descrita para a seqüência consenso GA da fita doadora no íntron 2, por Lajic *et al.* 1996, cujas conseqüências da mutação seriam as mesmas da mutação aqui descrita.

Inesperadamente, enquanto o paciente da família 39 revelou possuir a mutação no íntron 2 em heterozigose, o pai portador obrigatório apresentou hemizigose para a mutação

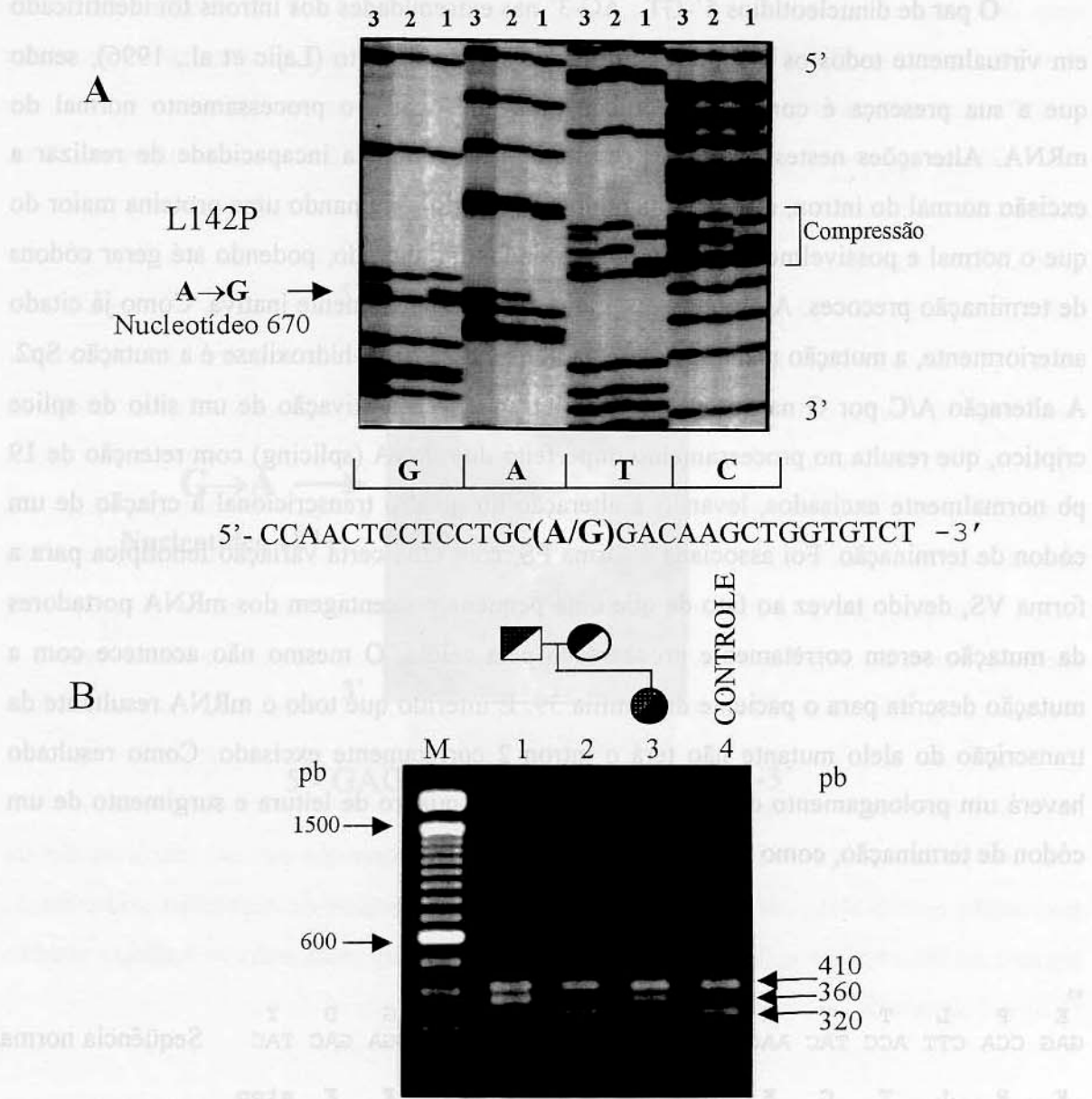


Figura 11: A- Análise por seqüenciamento direto do gene CYP21 da família 39, com o 'primer' Int3as, abrangendo a região do exon 3. A mutação A→G, no nucleotídeo 670, está presente em heterozigose no indivíduo 3. Abaixo está indicada a seqüência do gene CYP21 analisada. A compressão observada no gel é resultante da presença da mutação. B- Heredograma e digestão do produto de PCR In2s-Ex6nas com *Pst* I. A mutação suprime sítio de restrição de *Pst* I. Indivíduos 1 e 3 são heterozigotos para a mutação. Apenas 1 alelo do indivíduo 1 está presente na digestão. 1-Pai; 2-Mãe; 3-Filha afetada; 4- Controle.

no seqüenciamento (figura 11A). Então, foi necessário recorrer a outros métodos de análise para determinar que o pai na verdade possui um alelo normal e um mutante, sendo que o primeiro não foi amplificado em reações de PCR. Na análise por PCR alelo-específico da mutação Sp2 nesta família, que avalia inclusive o polimorfismo A/C nesta posição, observou-se que pai e mãe apresentam o genótipo A e C nesta posição, enquanto a filha é homozigota para A (dados não mostrados). Uma vez sabido que o pai possui dois alelos diferentes e sendo a mutação identificada rara, procurou-se confirmar a heterozigose através da digestão com a enzima *Pst* I, cujo sítio é suprimido pela mutação (figura 11B). Porém a condição de hemizigose permaneceu, indicando que o alelo portador de C no sítio de Sp2 deve ter sido perdido durante a reação de PCR para seleção do gene CYP21. Uma discussão sobre as prováveis causas da seleção de alelos nesta região do gene CYP21 será apresentada mais adiante.

Nesta família houve discordância entre o fenótipo predito e o observado. Como portador em heterozigose da mutação I172N, o fenótipo esperado para este genótipo seria a forma virilizante simples. Entretanto encontra-se respaldo à esta aparente discordância no trabalho de Speiser *et al.* (1992) onde são caracterizados genótipos do tipo I172N/Del, I172N/R356W e I172N/I172N, todos associados com a forma PS.

4. Identificação da mutação H38+C

A paciente da família 41, afetada com a forma PS, é filha de casamento consanguíneo, que indica ser portadora de um mesmo alelo afetado provenientes de pai e mãe. A análise anterior não havia indicado a presença de nenhuma das mutações mais freqüentes. O seqüenciamento do éxon 1 revelou a inserção de um único nucleotídeo C entre os nucleotídeos 85 e 86, na segunda posição do códon 38 que codifica para o aminoácido histidina (5'-CTC C↓CAC CTC-3') (figura 12A). A inserção deste aminoácido deve ser responsável por alterações drásticas na estrutura da proteína, pois origina alteração do quadro de leitura logo no início do gene com posterior formação de um stop códon na posição 79. A proteína formada fica truncada e incompleta, como mostra a seqüência a seguir:

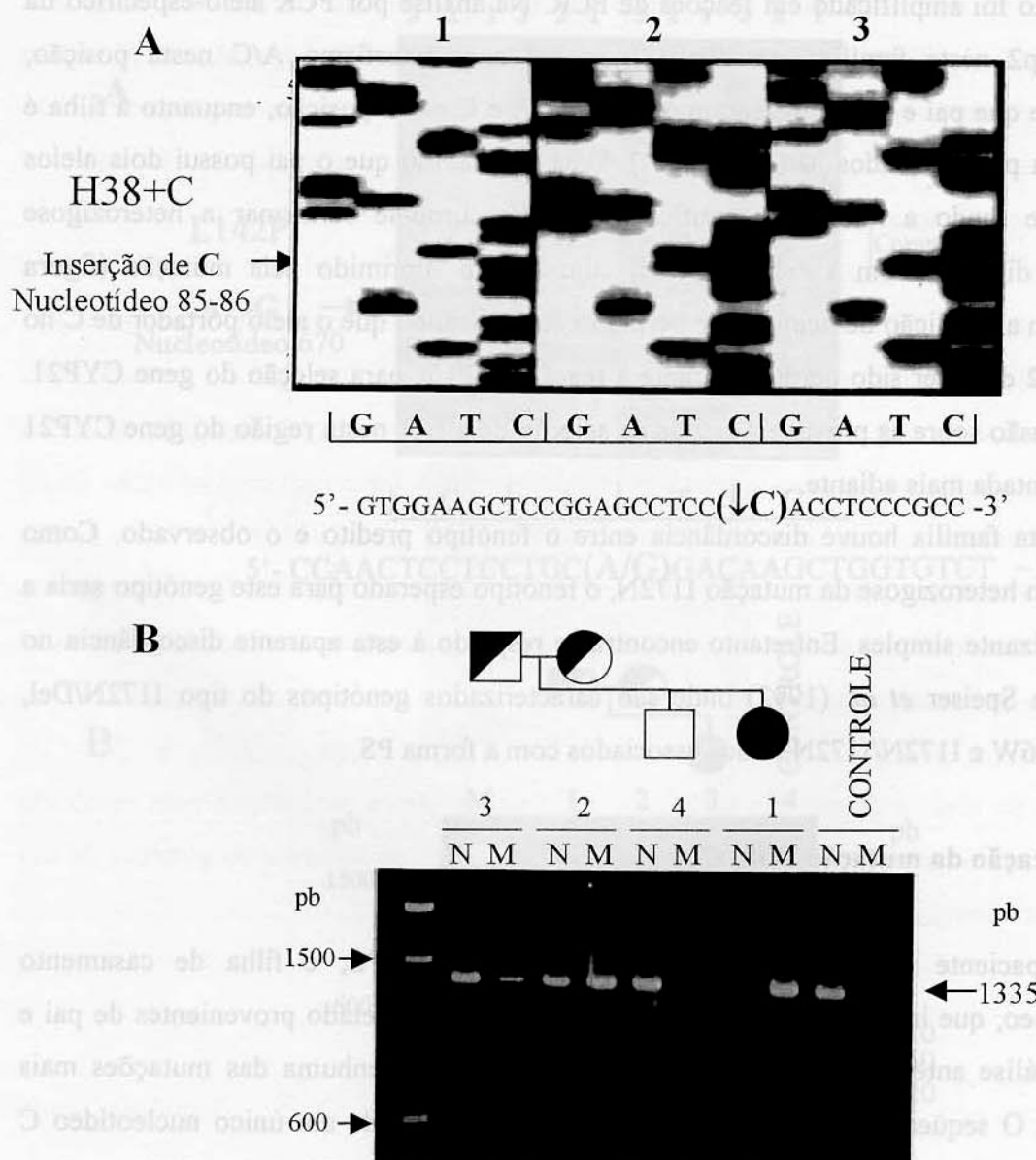


Figura 12: A- Análise por seqüenciamento direto gene CYP21 da família 41, com o 'primer' Intlas, abrangendo a região do exon1. A inserção de C entre os nucleotídeos 85-86 está presente em homozigose no indivíduo 1 e em heterozigose nos indivíduos 2 e 3. Abaixo está indicada a seqüência do gene CYP21 analisada. B- Heredograma e PCR alelo-específico para seqüência normal e portadora da mutação H38+C. 1- Filha afetada; 2- Mãe; 3- Pai; 4- filho normal; N- normal; M- mutante.

36	S	L	H	L	P	P	L		K	R	T	I	E	79	
	AGC	CTC	CAC	CTC	CCG	CCT	CTT		AAG	AGG	ACC	ATT	GAG	...	Sequência normal
	S	L	P	P	P	A	S		Q	E	D	H	Stop		
	AGC	CTC	CCA	CCT	CCC	GCC	TCT		CAA	GAG	GAC	CAT	TGA		Sequência Mutante

A mutação foi encontrada em homozigose na paciente, o que condiz com o fenótipo PS. Por seqüenciamento direto dos alelos dos pais, a mutação foi inicialmente encontrada em heterozigose na mãe e ausente no pai. Para verificar-se a heterozigose em pai e mãe, foram desenhados 'primers' para realização de PCR alelo-específico para a mutação (material e métodos, tabela 9). Confirmou-se assim a condição de portadores obrigatórios em ambos os pais, excluindo-se inclusive a possibilidade do filho normal ser portador (figura 12B).

5. Ausência de mutações demonstráveis

Não foi possível a identificação de nenhuma mutação em duas das famílias com apenas um alelo determinado. A família 11 compõe-se de mãe e três filhos afetados identificados por PCR alelo-específico como heterozigotos para a mutação Sp2 (íntron 2, -12, G). Os três filhos compartilham dos mesmos alelos paternos e maternos e apresentam o polimorfismo C na posição da mutação Sp2, provenientes do pai (íntron 2, -12, C). Não havia sido encontrada nenhuma alteração ou mutação no alelo paterno que justificasse o fenótipo doente. De maneira semelhante, a família 27 apresenta pai e filha afetada portadores heterozigotos da mutação Sp2 enquanto que nenhuma mutação conhecida foi determinada no alelo materno herdado pela filha afetada. O gene CYP21 de ambos os indivíduos afetados foi inteiramente seqüenciado, da posição -655 até o final do éxon 10. Várias alterações de nucleotídeos foram observadas, muitas provenientes do pseudogene, sem que no entanto nenhuma pudesse ser relacionada com alteração da função normal da proteína. Como citado acima, ambos os indivíduos afetados são portadores da mutação Sp2 em heterozigose e no entanto o seqüenciamento da região do íntron 2/éxon 3 inesperadamente revelou a mutação em hemizigose. O resultado de alelo-específico para a mutação Sp2 e seqüenciamento da junção íntron 2/éxon 3 exemplificam a questão (figura 13A e B).

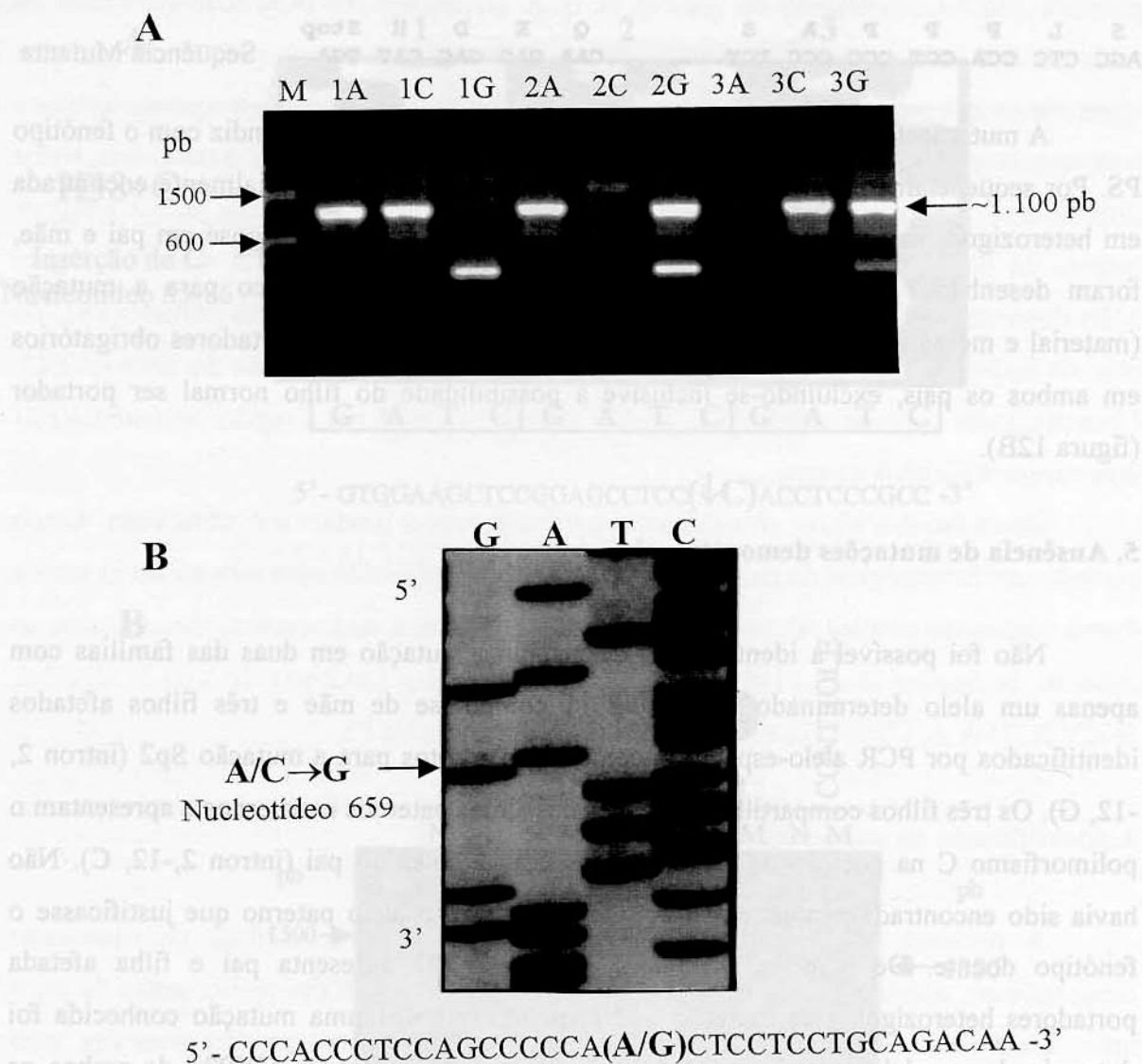


Figura 13: A- PCR alelo-específico para a mutação Sp2 (cortesia de Araujo, M.). O número refere-se ao indivíduo estudado e a letra à variação na posição 656 do 'primer' alelo-específico utilizado (A, C, ou G). B- Sequenciamento do gene CYP21 do indivíduo 27Xa1, com o "primer" Int3as, para a região do éxon 3. A seta indicam a posição 656 da sequência, local da mutação Sp2. Apesar de diagnosticado como heterozigoto C/G nesta posição, o sequenciamento retrata apenas o alelo portador da variante G, em hemizigose. A sequência do gene CYP21 analisada encontra-se descrita logo abaixo. 1-Pai; 2-Mãe; 3-filha afetada.

Tabela 11: Haplótipos para os polimorfismos encontrados na região entre os nucleotídeos 606-630.

Indivíduo	Mutação nova**	Sítio de Sp2 (nt 656)		Polimorfismos				
		Genótipo	Sequenciamento	ASO-PCR	nt 605 (C/A)	K102R	nt 633-634 (CA/GG)	nt 628 (G/T)
10P	-	A/C	A/X***	-	A/X	-	-	-
10M	L107R (Het)	C/C	C/C	-	C/C	-	-	-
10Ya1	L107R (Het)	C/C	C/C	-	C/C	-	-	-
10Xa2	L107R (Het)	C/C	C/C	-	C/C	-	-	-
11P	nd	A/C	-	A/C	-	-	-	-
11M	-	A/G	-	A/G	-	-	-	-
11Ya3	nd	C/G	G/X	C/G	-	-	-	-
24P	-	A/C	A/X	-	-	K/X	-	-
24M	-	A/C	A/X	-	-	R/X	-	-
24Xa1	L142P (Het)	C/C	C/C	-	-	K/R	-	-
26P	Δ8	A/A	-	A/A	C/C	R/R	-	-
26M	-	A/C	-	A/C	-	-	-	-
26Xa1	Δ8	A/C	A/X	A/C	C/X	R/X	-	-
27P	-	A/G	-	A/G	-	-	-	-
27M	nd	A/C	-	A/C	-	-	-	-
27Xa1	nd	G/C	G/X	G/C	C/X	K/X	-	-
39P	IVS2AS, -2 (hom)	A/C	A/X	A/C	-	-	-	-
39M	-	A/C	A/X	A/C	-	-	-	-
39Xa1	IVS2AS, -2 (Het)	A/A	A/A	A/A	-	-	-	-
41P	-	A/C	A/X	-	A/X	-	CA/X	G/X
41M	H38+C (Het)	C/C	C/C	-	-	-	CA/GG	G/T
41Xa1*	H38+C(homo)	C/C	C/C	-	-	-	GG/GG	T/T

*-consanguíneo

**-dados obtidos do sequenciamento; Het-heterozigose; hom-homozigose

***- X: alelo não identificado

A ocorrência de hemizigose para o fragmento amplificado com os pares ProEx1s-Ex6na, Int2s-Ex6na, Int2s2-Ex6na e 5'21Bs-En3na foi observada em vários indivíduos de todas as famílias estudadas (tabela 11). Estes 'primers' amplificam a região que engloba o sítio da mutação Sp2, que nos casos de alelos normais pode apresentar os nucleotídeos A ou C. Ao observarmos os dados da tabela 11, podemos afirmar que em todas as famílias os indivíduos que não tiveram ambos os alelos amplificados apresentam o genótipo A/C ou G/C para posição Sp2, sendo sempre o alelo portador da variante C a ser perdido durante a reação de amplificação.

Todos estes dados são concordantes com a hipótese de que alguns alelos não amplificam os fragmentos que contêm a região 3' do intron 2. Day *et al.* (1996) também relatou a ocorrência do fenômeno, em associação com a mutação Sp2. Sua análise da mutação por método baseado em PCR genotipou indivíduos normais como portadores homozigotos para Sp2 (Sp2G/G) e indivíduos portadores obrigatórios de Sp2 como homozigotos normais (Sp2C/C), numa frequência alélica muito superior à calculada para a mutação Sp2. A paternidade foi confirmada através da análise de microssatélites, que serviu também para demonstrar o compartilhamento de um mesmo alelo entre pais e filhos, mesmos que estes apresentassem discrepância na tipagem da mutação, como na família com o seguinte genótipo: Pai Sp2C/C, Mãe Sp2A/G e filho Sp2G/G. Para tentar explicar o fenômeno, o autor lançou mão de outros protocolos, bem como a utilização de 'primers' diferentes para a seleção e amplificação do gene CYP21. Na seleção do gene CYP21 foram utilizados 'primers' normais para as regiões das mutações $\Delta 8$ (éxon 3), CL6 (éxon 6) e P30L (éxon 1), e mesmo a amplificação de fragmento delimitado por 'primers' específicos para as mutações Sp2 e $\Delta 8$ foi tentada. Todos os métodos utilizados corroboraram os genótipos identificados anteriormente. Apesar de ser possível sugerir que a variabilidade da expressão da mutação seja responsável pelos homozigotos Sp2/Sp2 normais, esta hipótese não explica todos os casos observados. A observação da tipagem diversa de um mesmo alelo entre mãe e filho afetado (Mãe: Sp2G/V281L/TNF102; filha afetada: Sp2A/V281L/TNF102) associada aos outros genótipos encontrados sugeriram a ocorrência da perda de um alelo durante a amplificação ('dropout'). O fenômeno, no entanto, parece ocorrer apenas quando a região de aproximadamente 90 pb entre a mutação Sp2 e $\Delta 8$ está presente no produto de amplificação de PCR específico para CYP21. Esta hipótese foi

levada em consideração para explicar as particularidades observadas nas famílias em estudo.

Dados de literatura em que se observou tanto indivíduos normais homozigotos para a mutação Sp2 quanto homozigotos normais em portadores obrigatórios (Schulze *et al.*, 1995; Chin *et al.* 1998) ajudam a sustentar esta hipótese. Baseados em nossos dados (tabela 11) podemos sugerir que a não amplificação de um dos alelos estaria conjugada ao genótipo A/C ou G/C no sítio da mutação Sp2. Apesar de 100% dos alelos não identificados por seqüenciamento serem A/C, esta relação não é absoluta, pois fomos capazes de identificar, por exemplo, os dois alelos de 24M (A/C) por digestão de produto de PCR. Por outro lado, não foi possível a comprovação da heterozigose para a mutação nova no heterozigoto obrigatório 39P, utilizando a mesma abordagem. Talvez a tranversão A→C (purina→pirimidina) altere de alguma forma a estrutura secundária da fita simples molde dificultando amplificação do alelo C quando na presença de A ou G, ambas purinas. Não observamos no estudo realizado problemas de amplificação de indivíduos com o genótipo A/G.

Nas famílias 11 e 27, onde nenhuma mutação foi identificada, acreditamos que só um alelo foi seqüenciado, pelos motivos acima discutidos. Considerando-se que 3 das 4 mutações novas descritas neste trabalho se encontram na região do éxon 3, existe uma grande possibilidade de que o alelo não amplificado nestas famílias exiba alguma mutação rara na região.

6. Identificação de $\Delta 8$

Na família 26, a mutação R356W foi transmitida pela mãe, sendo que no pai não havia sido encontrada nenhuma das mutações testadas. Porém a filha afetada mostrou ser hemizigota para a mutação detectada por ASOH (Paulino, 1997). Já que os experimentos de "Southern blot" e hibridização de sondas de CYP21 e C4 não revelaram deleções ou conversões gênicas que pudessem justificar a doença, pensou-se imediatamente na possibilidade de se tratar da mutação $\Delta 8$. Os alelos afetados por esta mutação não são amplificados pela estratégia de PCR que se utiliza da mutação $\Delta 8$ para seleção do gene CYP21, o que explicaria os resultados obtidos. Tal hipótese, entretanto, não se confirmou

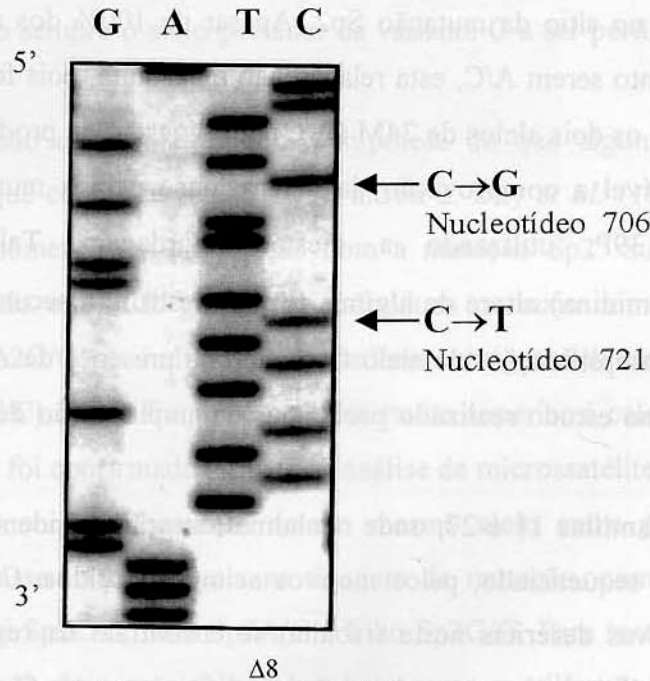
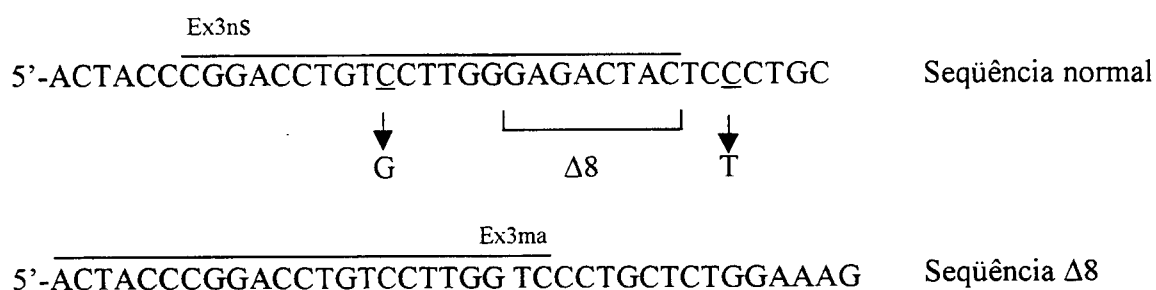


Figura 14: Sequenciamento do gene CYP21 do indivíduo 26Xa1, com o 'primer' Int3as, para a região do éxon 3. As setas indicam a presença de alteração C→G e C→T, ambos em hemizigose, no éxon 3, nas posições 706 e 721, respectivamente. Estas variações levam à mutação silenciosa Ser→Ser no gene CYP21. A sequência do gene analisada encontra-se descrita logo abaixo.

após experimentos de PCR alelo-específico (Paulino, 1997). A realização de seqüenciamento identificou a mutação $\Delta 8$, porém originária de um evento de conversão que abrangeu pelo menos uma região de 16 pb incluindo a já descrita deleção de 8 pb. Assim, dois nucleotídeos normalmente encontrados no pseudogene e posicionados a 5 pb (T→G) acima e 3 pb (C→T) abaixo da deleção $\Delta 8$ estão presentes também neste alelo (posições nucleotídicas 707 e 722, respectivamente) (figura 14). Ambos consistem de uma mutação silenciosa Ser→Ser no gene CYP21. Destes, apenas a variação do nucleotídeo 1357 está presente na região do 'primer' utilizado para a detecção da mutação por PCR alelo-específico, que foi desenhado com o nucleotídeo C ao invés de G, o que talvez explique que o método não tenha detectado a mutação $\Delta 8$ (Paulino, 1997). Após o resultado do seqüenciamento, realizou-se novo PCR alelo-específico que desta vez confirmou a presença da mutação.



7. Variações encontradas no gene CYP21

Várias alterações foram identificadas ao longo de todo o gene CYP21 em todos os indivíduos estudados (tabelas 12 e 13). A troca nucleotídica $A^{138} \rightarrow C$ é uma mutação silenciosa, uma vez que não há troca de aminoácido na proteína variante. Essa variação foi encontrada em dois alelos não relacionados, porém é descrita por Higashi *et al.* (1986) como sendo a seqüência normal. O mesmo acontece com a variação $AA^{422} \rightarrow AC$, que foi encontrada em 5 dos 7 alelos estudados; com $C^{1591} \rightarrow G$, encontrada em dois alelos não relacionados; e, com $C^{2252} \rightarrow T$, também encontrada em dois alelos não relacionados. Já as variações $GC^{456} \rightarrow GT$ e $AC^{1426} \rightarrow AT$ estão presentes no pseudogene CYP21P mas nunca

foram relatadas antes como variação em CYP21 e, foram encontradas no presente estudo em dois e três alelos não relacionados, respectivamente.

Outra variante protéica observada foi a presença de uma Leucina a mais no éxon 1 no codon 6 (figura 15). A figura mostra o padrão de bandas no seqüenciamento do éxon 1 com o 'primer' ProEx1 no ponto de inserção do codon da Leucina extra para indivíduos heterozigotos para o polimorfismo nas linhas 1 (10Ya1), 2 (10Xa2), 3 (24Xa1), 4 (39Xa1), homozigotos para 4 Leucinas nas linhas 5 (26P) e 6 (41Xa1) e, homozigotos para 5 Leucinas nas linhas 7 (27Xa1) e 8 (57Xa1, que não está integrada neste estudo). A presença de uma leucina extra (códon CTG) nessa posição foi descrita originalmente por Rodrigues *et al.* (1987), e não estava presente nas primeiras seqüências descritas (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986). Essa variação foi verificada no CYP21 de outras espécies, indicando um polimorfismo de tamanho na enzima 21-hidroxilase, entre 494 e 495 aminoácidos (Rodrigues *et al.*, 1987). De fato, posteriormente foi confirmado que esse polimorfismo pode ter sua origem no pseudogene e não tem efeito sobre a atividade enzimática (New & Crawford, 1994).

Doze diferenças de seqüência foram encontradas sem recorrência em alelos não relacionados, sendo que a maioria delas não foram encontradas na seqüência do pseudogene CYP21P consultada.

Os indivíduos das famílias 10 e 11 apresentaram diferenças na região 5' do gene. Diferenças nessa região tem sido encontradas em indivíduos afetados. Por exemplo, Wedell *et al.* (1992) descreveram uma alteração C→T na posição -4 ao sítio de início da transcrição, região importante para promover a transcrição, porém esse mesmo paciente, com a forma não clássica da doença, apresentou duas outras variações: uma Pro106Leu e uma Pro454Ser. Essa última é uma posição bastante conservada e provavelmente é importante para a função normal da enzima. Assim, não ficou comprovado o envolvimento da posição -4 na expressão do fenótipo. Uma das diferenças encontradas na família 10 é uma inserção de um T a -3 do início de transcrição. Uma vez que foi encontrada em heterozigose, deve-se verificar agora se é proveniente do alelo materno em associação com a mutação L107R determinada neste estudo.

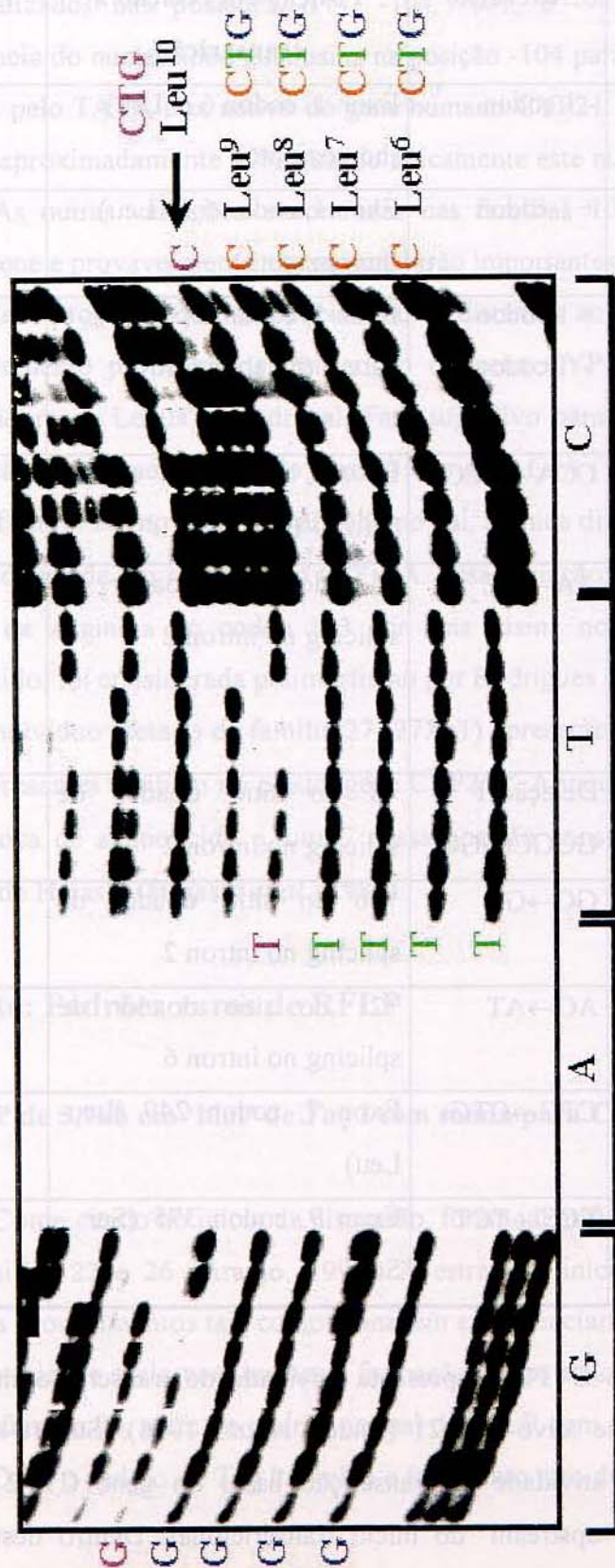


Figura 15: A figura mostra o padrão de bandas no sequenciamento do exon 1 com o primer ProEx1 no ponto de inserção do códon da Leucina extra para indivíduos com 4 e 5 códon para Leucina (CTG) nas linhas 1 (10Yal), 2 (10Xa2), (24Xa1), 4 (39Xa1), homozigotos para 4 Leucinas nas linhas 5 (26P) e 6 (41Xa1) e, homozigotos para 5 Leucinas nas linhas 7 (27Xa1) e 8 (57Xa1, que não está integrada neste trabalho.)

Tabela 12: Variações que aparecem em mais de um indivíduo:

Posição Nucleotídica	Indivíduos	Alteração	Posição em relação à transcrição	Presença no CYP21P
16	27Xa1	- 1 codon	Éxon 1, codon 6 (- Leu) (homozigoto)	-
16	26P, 41Xa2	+ 1 codon	Éxon 1, codon 6 (+ Leu) (homozigoto)	-
16	10Ya1 e 10Xa2, 24Xa1, 39Xa1	+ 1 codon - 1 codon	Éxon 1, codon 6 (+ Leu) (-Leu) (heterozigoto)	-
138	10Ya1 e 10Xa2 27Xa1	CCA→CCC	Éxon 1, codon 46 (Pro → Pro)	Sim
422	10Ya1 e 10Xa2, 24Xa1, 27Xa1, 39Xa1g, 41xa2	AA→AC	+33 do sítio doador de splicing no íntron 2	Sim
398	27Xa1, 39xa1	Deleção T GGGcTGGG	+8 do sítio doador de splicing no íntron 2	Não
456	10Ya1 e 10Xa2, 39xa1	GC→GT	+66 do sítio doador de splicing no íntron 2	Sim
1426	24Xa1, 26P, 27Xa1	AC→AT	+21 do sítio doador de splicing no íntron 6	Sim
1591	24Xa1, 27Xa1	CTC→CTG	Éxon 7, codon 249 (Leu- Leu)	Sim
2252	26P, 39xa1	TCC→TCT	Éxon 9, codon 375 (Ser – Ser)	Não

Sabe-se que o pseudogene CYP21P apresenta atividade de transcrição mais baixa quando comparada com o gene ativo CYP21 (Endoh *et al.*, 1998). Sugere-se que as seqüências que determinam a atividade de transcrição basal do gene CYP21 estejam localizadas dentro de 166 pb 'upstream' do início transcricional. Dentro desta região,

apenas 4 nucleotídeos são diferentes entre o gene ativo CYP21 e o pseudogene CYP21P; são localizados nas posições -117, -104, -101, e -94. Recentemente, foi descrita a importância do nucleotídeo guanosina na posição -104 para a atividade de transcrição basal regulada pelo TATA box nativo do gene humano CYP21. A atividade de transcrição basal diminui aproximadamente 80% quando unicamente este nucleotídeo é mudado (Chin *et al.*, 1998). As outras variações encontradas nas famílias 10 e 11 não são encontradas no pseudogene e provavelmente não se mostrarão importantes ao fenótipo, porém vale lembrar que se tem proposto que seqüências muito distantes ao início de transcrição funcionem como elemento promotor de transcrição do gene CYP21, tendo um papel de "Região Controladora de Locus" na adrenal. Fato sugestivo para essa suposição é o elemento de transcrição encontrado dentro do íntron 35 do gene C4A (Tee *et al.*, 1995).

Na família 26, no alelo não afetado no pai, a única diferença não recorrente encontrada foi a mudança de um nucleotídeo $G^{687} \rightarrow A$. Essa variação, que existe no pseudogene, causa a troca da Arginina do codon 103 por uma Lisina no éxon 3. Embora haja troca de aminoácido, foi considerada polimorfismo por Rodrigues *et al.* (1987).

O indivíduo afetado da família 27 (27Xa1) apresentou duas variações não recorrentes, ambas presentes também no pseudogene CYP21P. A mudança de nucleotídeo $T^{118} \rightarrow C$ não causa troca de aminoácido e, um C nessa posição consta como normal na seqüência de CYP21 de Higashi (Higashi *et al.*, 1986).

2ª Parte: Padrões raros de RFLP

8. RFLP de 3,9kb em 'blot' de *Taq* I com sonda para C4

Como citado no início da discussão, foram identificados dois padrões raros de RFLP nas famílias 22 e 26 (Araujo, 1996). A estratégia inicial de análise destes fragmentos envolvia procedimentos tais como clonagem e seqüenciamento dos fragmentos na tentativa de caracterizar e esclarecer melhor a formação destes alelos afetados.

Na família 26, além do padrão normal de RFLP com diferentes enzimas para o gene de C4A e C4B, o padrão de *Taq* I revelou o fragmento raro de 3,9 kb (figura 16). Encontrou-se

Tabela 13: Variações no CYP21 em um único indivíduo:

Indivíduos	Posição Nucleotídica	Alteração	Posição em relação à transcrição	Presença no CYP21P
10Xa2	-553	TG→TT	-553 nt. do início da Transcrição	Não
10Xa2	-473	TT→TC	-473 nt. do início da Transcrição	Não
10Ya1 e 10Xa2	-3, -2	Inserção de T CTC^GCC	-3 do início da Transcrição	Não
11Ya1	-551	AG→AA	-551 do início de transcrição	Não
11Ya1	-536	AC→AT	-536 do início da transcrição	Não
41Xa2	85-86	Inserção de C GGAG^CCT C	Inserção de um C, causando um "frameshift", que produz um codon de stop no aminoácido 79 da proteína	Não
27Xa1	118	T→C	Éxon 1, codon 40 (Leu – Leu)	Sim
24Xa1	1874	GGG→GAG	-75 do sítio acceptor de splicing no íntron 7	Não
27Xa1	2375	CG→CA	+26 do sítio doador de splicing no íntron 9	Sim
24Xa1	2425	CC→CT	-21 do sítio acceptor de splicing no íntron 9	Não
39xa1	670	AG→GG (Sp)	-2 do sítio acceptor de splicing no íntron 2	Não
26P	687	G→A	Éxon 3, codon 103 (Arg – Lys)	Sim
24xa1	1794	GG→GC	+11 do sítio doador de splicing no íntron 7	Sim

citações na literatura quanto à existência de dois polimorfismos raros no padrão de C4, um gerando um fragmento *Taq* I de 3,5 kb e em associação com Lúpus Sistêmico Eritromatoso (Goldstein *et al.*, 1991) e outro apresentando um fragmento *Taq* I de 3,9 kb, devido à presença de um sítio extra de restrição no primeiro íntron do gene (Koppens *et al.*, 1992), sendo que nenhum desses polimorfismos foi relacionado com deficiência da 21-hidroxilase. Apenas o trabalho de Koppens *et al.* sugeria uma alternativa para o fragmento extra de C4 por ele observado. Através de estudos de digestão com várias enzimas, Koppens *et al.* puderam determinar que apenas a enzima *Taq* I originava alteração de RFLP, sem que se produzisse o mesmo resultado com qualquer outra enzima, indicando que talvez a modificação no padrão de RFLP se devesse não a uma conversão ou deleção em larga escala mas sim devido ao surgimento de um sítio extra de *Taq* I. Para testar sua hipótese realizaram diversas digestões duplas com *Taq* I/*Kpn* I, *Pst* I/*Kpn* I e *Bam*HI/*Kpn* I. Somente a digestão com *Taq* I/*Kpn* I revelou alteração, dando origem a um fragmento extra de 0,9 kb, o que poderia ser apenas explicado por um sítio *Taq* I adicional no primeiro íntron do gene C4B, a aproximadamente 70 pb abaixo do sítio para *Pst* I.

A realização de digestão dupla com *Taq* I/*Pst* I na família 26 e hibridização com sonda de C4, apresentou resultados não conclusivos (dados não mostrados). Com o auxílio do programa "Gene Runner" versão 3.0, desenhou-se então 'primers' que amplificassem parte da região compreendida entre os sítios *Taq* I previamente conhecidos e que abrangessem o íntron 1 de C4, a localidade do provável novo sítio de *Taq* I. A simples digestão do fragmento amplificado com a enzima forneceu a informação precisa sobre a existência ou não de um sítio de restrição.

A digestão do produto de PCR obtido com a enzima *Taq* I deu origem a dois fragmentos além do originalmente amplificado, como demonstrado na figura 18, um de ~400 pb e outro de ~600 pb. Tais fragmentos originaram-se apenas do produto amplificado de Mãe, filha afetada e filha normal, todas portadoras do alelo com fragmento anômalo de 3,9 kb, sendo que o pai não apresentou o polimorfismo. Na região em questão existem duas bases que se alteradas poderiam originar um sítio novo para a enzima *Taq* I, cujo sítio é 5' - TCGA - 3':

5' - GGGCTGGCATTCGGGACCCGATTTCAGGAGTG - 3'

A T

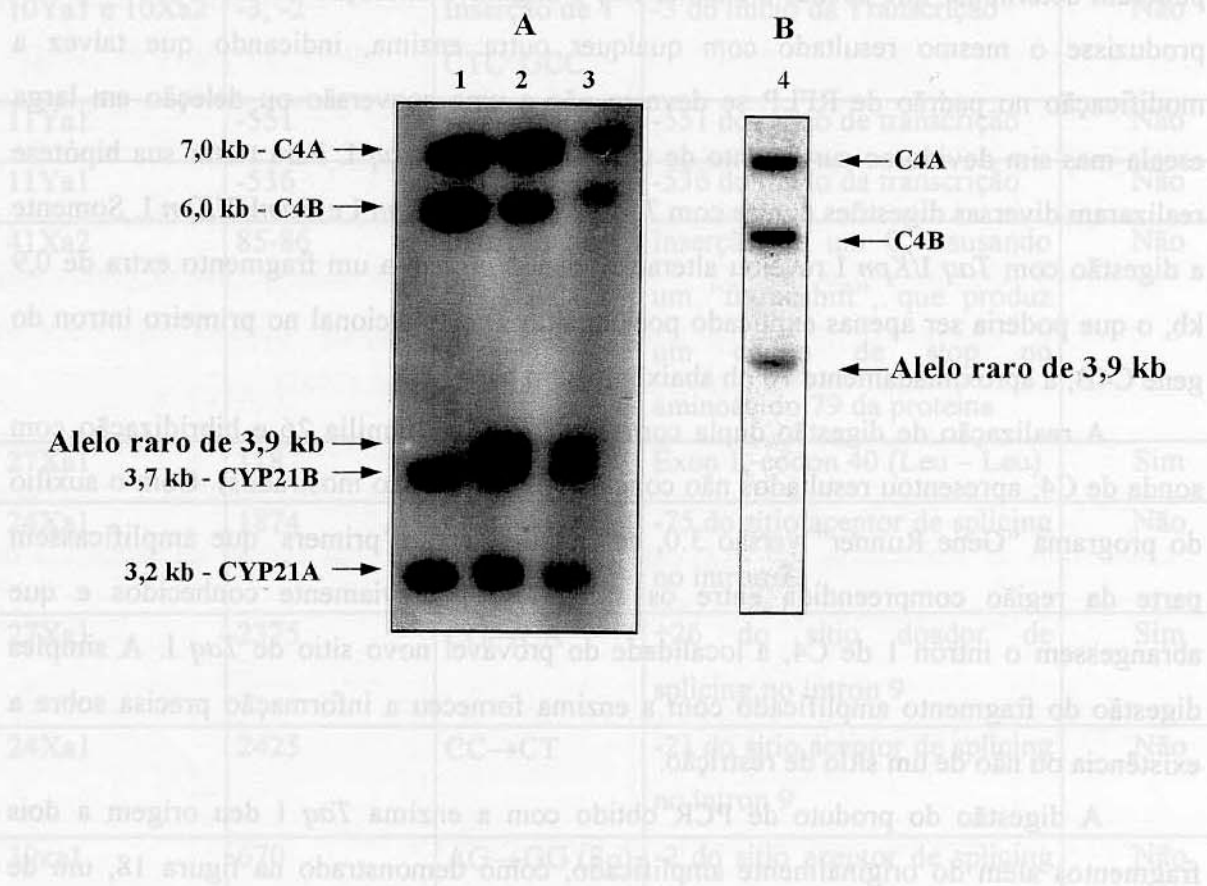


Figura 16: 'Blots' de RFLP com a enzima *Taq* I e hibridização com sondas para os genes CYP21 (A) e C4 (A e B). Os genes e o tamanho correspondente a cada banda estão indicados. O fragmento raro de 3,9 kb está indicado. Os indivíduos 2, 3 e 4 são portadores em heterozigose do alelo. 1-3: família 26. 1- Pai; 2-Mãe; 3-filha afetada. 4-Indivíduo normal portador do alelo raro de C4.

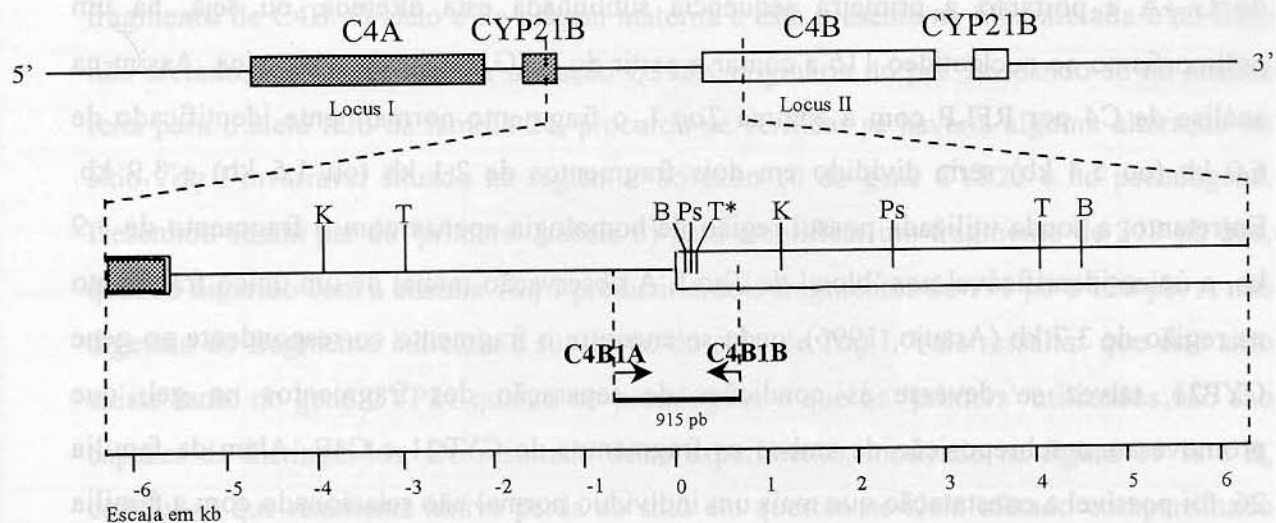


Figura 17: Representação esquemática do locus CYP21/C4, evidenciando a posição relativa dos "primers" C4B1A e C4B1B. Um mapa de restrição parcial do local está representado pelas enzimas *Kpn* I (K), *Taq* I (T), *Bam* HI (B) e *Pst* I (P). O posicionamento de um sítio *Taq* I extra está representado por T*.

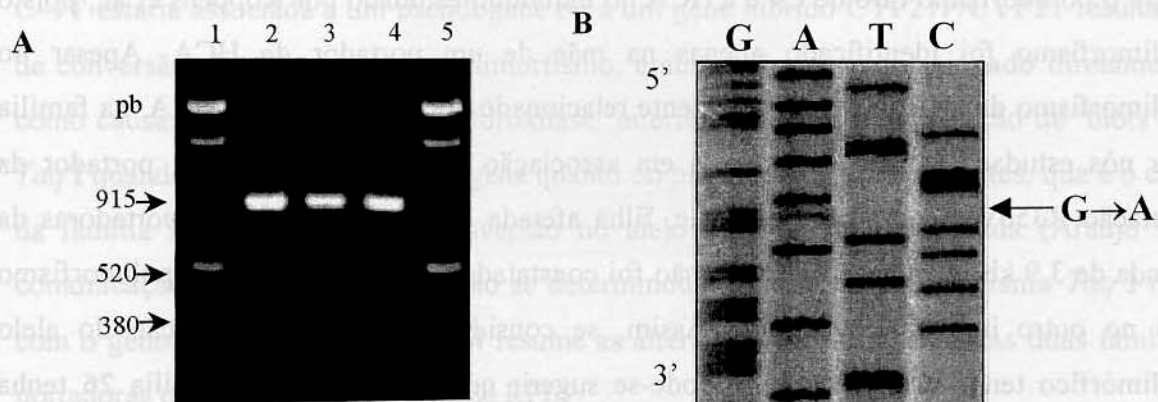


Figura 18: A- Digestão com a enzima *Taq* I de produto de PCR obtido com o par de primers C4B1 de três indivíduos da família 26: Pai (2), Mãe (3) e filha afetada (4). Em 1 e 5, ladder 100 pb. As setas indicam o tamanho do PCR e dos fragmentos originados por digestão, em pb. B- Sequenciamento de região do íntron 1 do gene C4B, indicando a mutação G→A no nucleotídeo 116.

Para a determinação exata da localização do sítio extra de *Taq* I realizou-se o seqüenciamento do fragmento (figura 18 A e B). O seqüenciamento demonstrou a alteração de G→A e portanto a primeira seqüência sublinhada está alterada, ou seja, há um polimorfismo no nucleotídeo 116 a contar a partir do ATG que inicia a proteína. Assim na análise de C4 por RFLP com a enzima *Taq* I, o fragmento normalmente identificado de 6,0 kb (ou 5,4 kb) seria dividido em dois fragmentos de 2,1 kb (ou 1,5 kb) e 3,9 kb. Entretanto, a sonda utilizada possui região de homologia apenas com o fragmento de 3,9 kb, o único identificável nos 'blots' de *Taq* I. A observação inicial de um único fragmento na região de 3,7 kb (Araujo, 1996), onde se encontra o fragmento correspondente ao gene CYP21, talvez se devesse às condições de separação dos fragmentos no gel, que promoveram a sobreposição de ambos os fragmentos de CYP21 e C4B. Além da família 26, foi possível a constatação que mais um indivíduo normal não relacionado com a família é portador do alelo raro (figura 16).

Este polimorfismo raro do gene de C4 (2 alelos em 444 estudados) aparenta ser o mesmo descrito por Koppens *et al.* (1992), embora não se saiba se existe alguma correlação, como efeito fundador, entre o alelo por ele identificado em estudo populacional da Holanda e o por nós observado. Fato importante a ser considerado é a falta de relação entre o polimorfismo raro de C4 e a HCA no indivíduo estudado por Koppens *et al.*, pois o polimorfismo foi identificado apenas na mãe de um portador de HCA. Apesar do polimorfismo de C4 não estar diretamente relacionado com a etiologia da HCA, na família por nós estudada o alelo de C4 está em associação com um gene CYP21 portador da mutação R356W, identificada em mãe, filha afetada e filha normal, todas portadoras da banda de 3,9 kb. A mutação R356W não foi constatada no alelo portador do polimorfismo C4 no outro indivíduo analisado. Assim, se considerarmos que a formação do alelo polimórfico tenha origem comum, pode-se sugerir que o haplótipo da família 26 tenha adquirido a mutação em eventos posteriores ao do surgimento do polimorfismo de C4, dado de interesse para o estudo evolutivo do complexo gênico CYP21/C4.

9. RFLP de 5,6 kb em 'blot' de *Taq* I e sonda para CYP21

Na família 22, o padrão de RFLP com a enzima *Taq* I e hibridização com sonda específica para CYP21 apontou a presença de um fragmento extra de 5,6 kb (figura 6). De

maneira semelhante ao da família 26, este fragmento foi primeiramente classificado como tendo 5,4 kb, pelo fato do gel original não ter tido resolução suficiente para separá-lo do fragmento de C4B. O alelo é de origem materna e está presente na filha afetada e no filho não afetado. Foi determinada a mutação Q318X originária do pai. Baseando-se na análise feita para o alelo raro da família 26, procurou-se verificar se haveria alguma alteração no sítio *Taq* I invariável situado na região 3' ao éxon 10 do gene CYP21 e no pseudogene. Desenhou-se um par de 'primers' (tabela 8) para amplificar um fragmento de 319 pb que, quando digerido com a enzima *Taq* I produziria dois fragmentos de 191 pb e 128 pb. A não digestão do fragmento indicaria a supressão do sítio de *Taq* I. Vale ressaltar que este sítio existe tanto no gene CYP21 quanto no pseudogene e que os 'primers' utilizados não são capazes de distingui-los. Do resultado deste experimento, mostrado na figura 19 A e B, conclui-se que realmente houve perda do sítio em questão no alelo afetado compartilhado por mãe e filhos normal e afetado. O seqüenciamento do fragmento revelou a existência de uma transição C→T, no nucleotídeo 3653, na segunda posição do sítio de reconhecimento da enzima (5'-T↓CGA-3'). No gene normal, a supressão deste sítio resultaria na formação de um fragmento de 6,2 kb que seria normalmente reconhecido pela sonda utilizada. Entretanto, o fragmento observado foi de 5,6 kb, levando à conclusão de que a mutação C→T estaria associada a um pseudogene ou a um gene híbrido CYP21P/CYP21 resultante de conversão. A presença deste polimorfismo, embora não esteja relacionado diretamente como causa de deficiência da 21-hidroxilase, interfere na exata interpretação de 'blots' de *Taq* I quando duplicações tanto do gene quanto do pseudogene estão presentes, que é o caso da família 22. A hipótese de conversão no alelo materno foi confirmada (Araujo M., comunicação pessoal) mas ainda não se determinou a ligação do polimorfismo *Taq* I raro com o gene convertido. A tabela 14 resume as alterações encontradas nestas duas famílias portadoras de polimorfismos raros de RFLP.

Tabela 14: Mutações encontradas nas famílias portadoras de fragmentos raros de RFLP com a enzima *Taq* I.

Família	Indivíduo (código)	Fragmento de RFLP	Mutação Identificada	HCA
26	Pai (26P)	-	-	PS
	Mãe (26M)	3,9 kb	G→A, nt 116, gene C4	
	Filha afetada (26Xa1)	3,9 kb	G→A, nt 116, gene C4	
22	Pai (22P)	-	-	PS
	Mãe (22M)	5,6 kb	C→T, nt 2998, CYP21	
	Filha Afetada (22Xa1)	5,6 kb	C→T, nt 2998, CYP21	
	Filho normal (22Yn2)	-	C→T, nt 2998, CYP21	

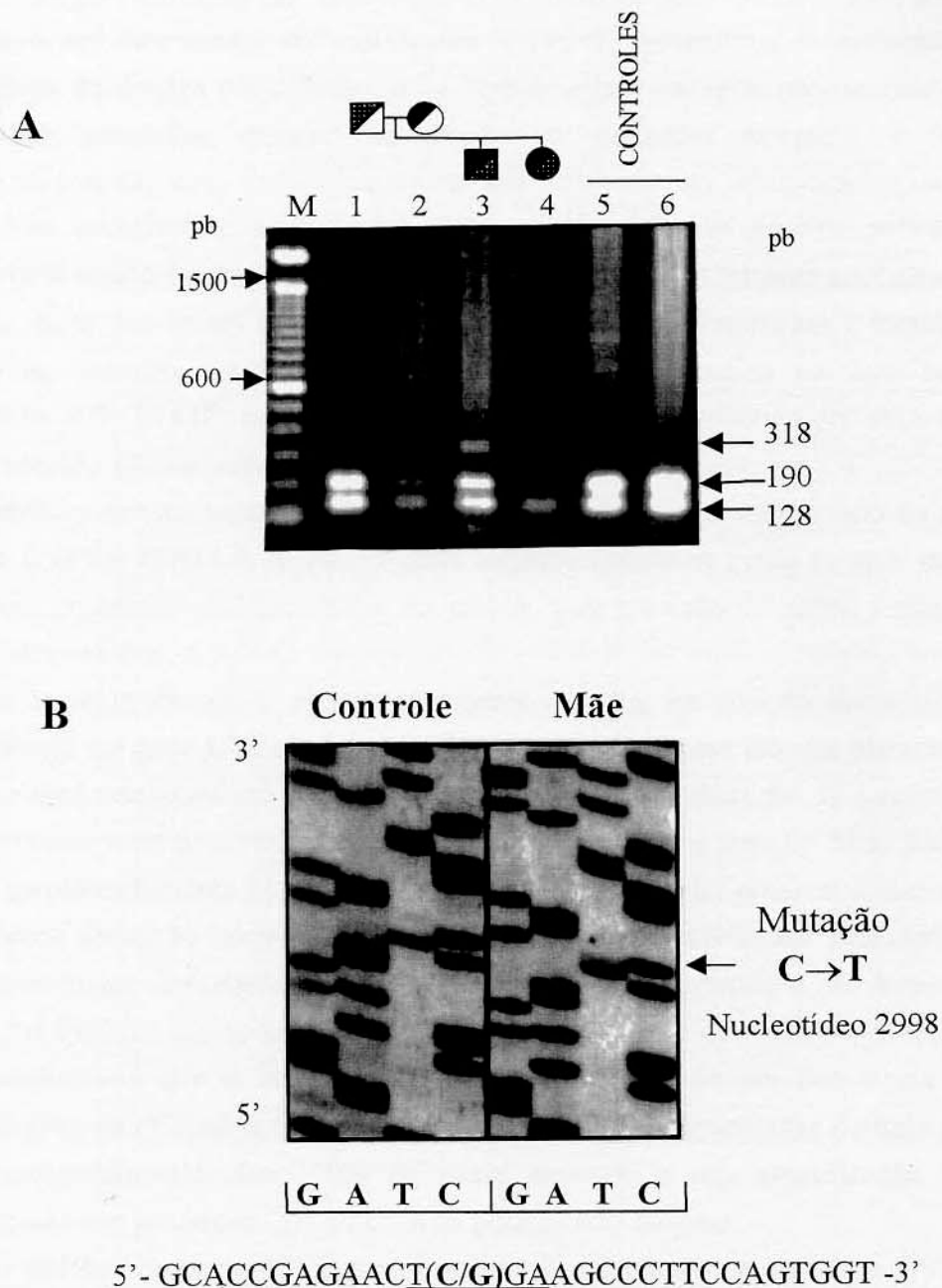


Figura 19: A- Heredograma e digestão do fragmento 3'B21s-3'B21as com a enzima *Taq* I. Os indivíduos 2, 3 e 4 apresentam heterozigose para a supressão do sítio de restrição de *Taq* I. B- Análise por seqüenciamento do gene CYP21 da família 22, com o 'primer' 3'21Bs, abrangendo a região após o éxon 10. A mutação C→T está presente em heterozigose no indivíduo 2, 3 e 4. Abaixo está indicada a seqüência analisada. M-Marcador de Peso Molecular; 1-Pai; 2-Mãe; 3-Filho afetado; 4-filha afetada; 5 e 6-controles.

CONCLUSÕES

- A estratégia de análise por sequenciamento direto do gene CYP21, após a seleção do mesmo em detrimento do pseudogene CYP21P, possibilitou o esclarecimento da etiologia da doença por deficiência da 21-hidroxilase em aproximadamente 71,5% das famílias estudadas. Foram identificadas 4 mutações novas e 1 evento de microconversão com limites superiores aos anteriormente identificados, em 5 das 7 famílias inicialmente selecionadas. Vários polimorfismos neutros provenientes de microconversão e outros não descritos anteriormente foram também encontrados.
- Duas mutações novas originando troca de aminoácido ('missense') foram descritas: **L107R**, mutação que resulta na substituição de uma leucina por uma arginina, na posição 107; **L142P**, mutação na qual uma leucina é substituída por uma prolina, no aminoácido 142 da proteína.
- Identificou-se uma mutação nova no sítio acceptor de 'splice' conservado do íntron 2 do gene CYP21: **IVS2AS, A→G, -2**. Esta mutação resulta na perda do sítio de 'splice' e em um processamento imperfeito do mRNA, com retenção do íntron e surgimento de um 'stop' códon.
- Uma inserção de um C não anteriormente descrita, na posição nucleotídica 85 da sequência do gene CYP21, foi identificada em homozigose em um paciente, filho de casamento consanguíneo: **H38+C**. Esta mutação leva à alteração do quadro de leitura da proteína, com posterior formação de um 'stop' códon na posição 79 do gene.
- Em aproximadamente 28,5% das famílias estudadas, não foi possível a identificação de nenhuma alteração nucleotídica que pudesse ser responsabilizada pela deficiência da 21-hidroxilase. Entretanto, comprovou-se que estaria ocorrendo a não amplificação de um dos alelos, o que pode estar impedindo a identificação de possíveis mutações novas.
- Determinou-se que o fenômeno de não amplificação de um dos alelos durante a realização de PCR seria responsável pelas hemizigoses observadas durante o processo de sequenciamento. Em 100% de nossa amostra, a não amplificação alélica foi associada aos genótipos C/A ou C/G, na posição 656 do gene.
- Dois padrões raros de RFLP com a enzima *Taq I* para os genes C4 e CYP21 foram caracterizados. A banda de 3,9 kb para o gene C4 foi originada pela criação de um sítio de restrição de *Taq I*, resultante da mutação G→A na posição 116 do gene C4. A banda de 5,6 kb para o gene CYP21 foi criada em consequência da perda de um sítio de restrição para *Taq I* na região 3' do gene, resultante da mutação C→T na posição 3653. Apesar de ambos os alelos não estarem relacionados diretamente na doença por deficiência da 21-hidroxilase, a sua presença interfere significativamente na interpretação de 'blots' com a enzima *Taq I*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMOR, M.; PARKER, K.L.; GLOBERMAN, H.; NEW, M.I.; WHITE, P.C., Mutation in the CYP21 Gene (Ile172-Asn) Causes Steroid 21-Hydroxylase Deficiency, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1600-1604, (1988).
- ARAUJO, M. Estudo da organização molecular do "cluster" gênico CYP21 e C4 em famílias com a forma clássica da deficiência da 21- hidroxilase no Brasil. Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, (1996).
- ARAUJO, M.; SANCHES, M.R.; SUZUKI, L.A.; GUERRA JR., G; FARAH, S.B.; DE MELLO M.P., Molecular Analysis of CYP21 and C4 Genes in Brazilian Families the Classical Congenital Adrenal Hyperplasia, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29:1-13, (1996).
- BARBAT, B.; BOGYO, A.; RAUX-DEMAY, M.C.; KUTTEN, F.; BOUE, J.; SIMON-BOUY, B.; SERRE, J.L.; MORNET, E. Screening of CYP21 gene mutations in 129 French patients affected by steroid 21-hydroxylase deficiency, *Hum. Mut.*, 5:126-130, (1992).
- BILLERBECK, A.E.C.; BACHEGA, T.A.S.S.; FRAZZATTO, E.T.; NISHI, M.Y.; GOLDBERG, A.C.; MARIN, M.L.C.; MADUREIRA, G.; MONTE, O.; ARNHOLD I.J.; MENDONÇA, B.B., A novel missense mutation, GLY424SER, in brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency., *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 84:2870-2872, (1999).
- BORNANN, M.; KOCHHAN, L.; KNORR, D.; BIDLINGMAIER, F.; OLEK, K., Clinical heterogeneity of 21-hydroxylase deficiency of sibs with identical 21-hydroxylase genes, *Acta Endocrinol.*, 126:7-9, (1992).
- BRISTOW, J.; GITELMAN, S. E.; TEE, M. K.; STAELS, B.; MILLER, W. L. Abundant Adrenal-Specific Transcription of the Human P450c21A, *J. Biol. Chem.*, 268:12919-12924, (1993).
- CARRERA, P.; FERRARI, M.; BECCARO, F.; SPIGA, I.; ZANUSSI, M.; RIGON, F.; BRAGGION, F.; ZACCHELLO, F.; GREGGIO, N., Molecular Characterization of 21-Hydroxylase Deficiency in 70 Italian Families, *Hum. Hered.*, 43:190-196, (1993).

- CARROLL, M.C.; CAMPBELL, R.D.; BENTLEY, D.R.; PORTER, R.R., A Molecular Map of the Human Major Histocompatibility Complex Class III Region Linking Complement Genes C4, C2 and Factor B, *Nature*, 307:237-241, (1984).
- CARROLL, M.C.; CAMPBELL, R.D.; PORTER, R.R., Mapping the Steroid 21-Hydroxylase Adjacent Complement Component C4 Genes in HLA Major Histocompatibility Complex in Man, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:521-525, (1985a).
- CARROL, M. C.; PALDOSTTIR, A.; BELT, K. T.; PORTER, P. R., Deletion of complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes in the HLA class III region., *EMBO J.*, 4:2547-2552, (1985b).
- COOPER, D.N.; BALL, E.V.; KRAWCZAK, M. The human gene mutation database. *Nucleic Acids Res.*, 26:285-287, (1998).
- CHIOU, S.H.; HU, M.C.; CHUNG, B.-C., A missense mutation at Ile¹⁷²-Asn or Arg³⁵⁶-Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency, *J. Biol. Chem.* 265:3549-3552, (1990).
- CHIN, D.; SPEISER, P. W.; IMPERATO-MCGINLEY, J.; DIXIT, N.; ULI, N.; DAVID, R.; OBERFIELD, S. E., Study of a kindred with classic congenital adrenal hyperplasia: diagnostic challenge due to phenotypic variance. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 83:1940-1945, (1998a).
- CHIN, K.K.; CHANG S.F., The -104G nucleotide of the human CYP21 gene is important for CYP21 transcription activity and protein interaction. *Nucl. Ac. Res.*, 26:1959-1964, (1998b).
- COLLIER, S.; SINNOT, P.J.; DYER, P.A.; PRICE, D.A.; HARRIS, R. STRACHAN, T., Pulsed Field Electrophoresis Identifies a High Degree of Variability in the Number of Tandem 21-Hydroxylase and Complement C4 Gene Repeats in 21-Hydroxylase Deficiency Haplotypes, *EMBO J.* 8:1393-1402, (1989).
- COLLIER, S.; TASSABEHJI, M.; STRACHAN, T., A Method for specific amplification and PCR sequencing of individual members of multigene families: application to the study of steroid 21-hydroxylase deficiency., *PCR Methods and Applications*, 1:181-186, (1992).

- CRAWFORD, P. A.; SADOVSKY, Y.; WOODSON, K.; LEE, S. L.; MILBRANDT, J. Adrenocortical Function and Regulation of the Steroid 21-Hydroxylase Gene in NGFI-B-Deficient Mice., *Mol Cell. Biol.*, 15:4332-4336, (1995).
- DiMARTINO-NARDI, J.; STONER, E.; O'CONNELL, A.; NEW, M.I., The effect of treatment on final height in classical congenital adrenal hyperplasia (CAH), *Acta Endocrinol.* 113:305-314, (1986).
- DAY, J.D.; SPEISER, P.W.; SCHLZE, E.; BETTENDORF, M.; FITNESS, H.; BARANY, F.; WHITE, P.C., Identification of non-amplifying CYP21 genes when using PCR-bases diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia (CAH) affected pedigrees., *Hum. Mol. Gene.*, 5:2039-2048, (1996).
- DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S., 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification., *Nuc. Ac. Res.*, 19: 4008, (1991).
- DONOHOU, P.A.; VAN DOP, C.; McLEAN, R.H.; WHITE, P.C.; JOSPE, N.; MIGEON, C.J., Gene Conversion in Salt-Losing Congenital Adrenal Hyperplasia with absent Complement C4 Protein, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 62:995-1002, (1986a).
- DONOHOU, P.A.; JOSPE, N.; MIGEON, C.J.; McLEAN, R.H.; BIAS, W.B.; WHITE, P.C.; VAN DOP, C., Restriction Maps and Restriction Fragment Length Polymorphisms of the Human 21-Hydroxylase Genes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 136 : 722-729, (1986b).
- DUNHAM, I.; SARGENT, C.A.; TROWSDALE, J.; CAMPBELL, R.D., Molecular map of the human major histocompatibility complex in man, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7237-7241, (1989).
- DUPONT, B.; OBERFIELD, S.E.; SMITHWICK, E.M.; LEE, T.D.; LEVINE, L.S., Close Genetic Linkage Between HLA and Congenital Adrenal Hyperplasia (21-Hydroxylase Deficiency), *The Lancet*, 24-31, 1309-1312, (1977).

- DUPONT, B.; POLLACK, M. S.; LEVINE, L. S.; O'NEILL, G. J.; HAWKINS, B. R.; NEW, M. I. (1980). In: TERASAKI, P. I. (Editor), *Histocompatibility testing*, Univ. of California at Los Angeles, Los Angeles, 693-706, (1980).
- EZQUIETA, B.; OLIVER, A.; GRACIA, R.; GANCEDO, P. G., Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Hum. Genet.*, 96:198-204, (1995).
- GLOBERMAN, H.; AMOR, M.; PARKER, K.L.; NEW, M.I.; WHITE, P.C., Nonsense Mutation Causing Steroid 21-Hydroxylase Deficiency, *J. Clin. Invest.* 82:139-144, (1988).
- GOLDSTEIN, R.; MOULDS, J. M.; SENGAR, D. P. S. A rare Complement Component C4 Restriction Fragment Length Polymorphism in Two Families with Systemic Lupus Eritromatosus., *J. Rheumatol.*, 18:345-348, (1991).
- GRUMBACH, M.M., CONTE, F.A., Disorders of sexual differentiation. In Wilson, J.D.; Foster, D.W. (eds.), 1985, Williams textbook of endocrinology, 7^a. ed., Philadelphia, 312-401.
- HAGLUND-STENGLER, B.; RITZÉN, E. M.; LUTHMAN, H., 21-hydroxylase deficiency: Disease-causing mutations categorized by densitometry of 21-hydroxylase specific deoxyribonucleic acid fragments., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 70:43-48, (1991).
- HARADA, F.; KIMURA, A.; IWANAGA, T.; SHIMOZAWA, K.; YATA, J.; SASAZUKI, T., Gene conversion-like events cause steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8091-8094, (1987).
- HELMBERG, A.; TUSIE-LUNA, M.T.; TABARELLI M.; KOFLER, R.; WHITE, P.C, R339H and P453: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions, *Mol. Endocrinol.*, 6:1318-1322, (1992).
- HELMBERG, A., Twin Genes and Endocrine Disease: CYP21 and CYP21 Genes, *Acta Endocrinol.*, 129:97-108, (1993).

- HIGASHI, Y; YOSHIOKA, H.; YAMANE, M.; GOTOH, O.; FUJI-KURIYAMA, Y., Complete Nucleotide Sequence of 2 Steroid 21-Hydroxylase Genes Tandemly Arranged in Human Chromosome: A Pseudogene and a Genuine Gene, *Poc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:2841-2845, (1986).
- HIGASHI, Y; TANAE, A.; INOUE, H.; FUJI-KURIYAMA, Y., Evidence for Frequent Conversion in the Steroid 21-Hydroxylase P-450 (C21) Gene: Implications for Steroid 21-Hydroxylase Deficiency, *Am. J. Hum. Genet.*, 42:17-25 (1988a).
- HIGASHI, Y; TANAE, A.; INOUE, H.; HIROSAMA, T.; FUJI-KURIYAMA, Y., Aberrant Splicing and Missense Mutations Cause Steroid 21-Hydroxylase [P450(C21)] Deficiency in Humans: Possible Gene Conversion Products, *Poc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:7486-7490, (1988b).
- HIGASHI, Y.; HIROMASA, T.; TANAE, A.; MIKI, T.; NAKURA, J.; KONDO, T.; OHURA, T.; OGAWA, E.; NAKAYAMA, K.; FUJII-KURIYAMA, Y., Effects of individual mutations in the P-450 (C21) pseudogene the P-450 (C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *J. Biochem.*, 109:638-644, (1991).
- HUMA, Z.; CRAWFORD, C.; NEW, M.I. Congenital Adrenal Hyperplasia. Clinical Paediatric Endocrinology, Cap 30, p.536, 3rd Edition, Blackwell Science, (1995).
- INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J., PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications. Academy Press, Inc., (1990).
- JÄÄSKELÄINEN, J.; LEVO, A.; VOUTILAINEN, R.; PARTANEN, J., Population-wide evaluation of disease manifestation in relation to molecular genotype in steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency: good correlation in a well defined population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82:3293-3297, (1997).
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., Histologia Básica, Sétima Edição, Editora Guanabara Koogan, Capítulo 20 (1990).

- KAPELARI, K.; GHANAATI, Z.; WOLLMANN, H.; VENTZ, M.; RANKE, M.B.; KOFLER, R.; PETERS, H., A rapid screening for steroid 21-hydroxylase mutations in patients with congenital adrenal hyperplasia. Mutations in brief no. 247. Online. *Hum. Mutat.*, 13:505, (1999).
- KILLEEN, A.A.; JIDDOU, R.R.; SANE, K.S., Characterization of frequent polymorphisms in intron 2 of CYP21: application to analysis of segregation of CYP21 alleles., *Clin. Chem.*, 44:2410-2415, (1998).
- KIRBY-KEYSER L.; PORTER C.C.; DONOHUE P.A., E380D: a novel point mutation of CYP21 in an HLA-homozygous patient with salt-losing congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency, *Hum. Mutat.* 9:181-182, (1997).
- KOPPENS, P. F. J.; HOOGENBOEZEM, T.; DEGENHART, H. J., A Rare *Taq* I Polymorphism in a Human Complement C4 Gene is Caused by an Additional Restriction Site in the First Intron., *Immunology Letters*, 34: 93-98, (1992).
- KRONE, N.; BRAUN, A.; ROSCHER, A.A.; SCHWARZ, H.P., A novel frameshift mutation (141delT) in exon 1 of the 21-hydroxylase gene (CYP21) in a patient with the salt wasting form of congenital adrenal hyperplasia., *Hum. Mut.*, Mutation in Brief #255, (1999).
- LAJIC, S.; EIDSMO, L.; HOLST, M., Steroid 21-hydroxylase in the kidney: demonstration of levels of messenger RNA which correlate with the level of activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 52:181-186, (1995).
- LAJIC, S.; WEDELL, A., An intron 1 splice mutation and a nonsense mutation (W23X) in CYP21 causing severe congenital adrenal hyperplasia., *Hum. Genet.*, 98:182-184, (1996).
- LAJIC, S.; LEVO, A.; MIKOSHKOV, A.; LUNDBERG, Y.; PARTANEN, J.; WEDELL, A. A cluster of missense mutations at arg 356 of human steroid 21-hydroxylase may impair redox partner interaction, *Hum Genet.*, 99:704-709 (1997).

- LEE H.H.; CHAO H.T.; LEE Y.J.; SHU S.G.; CHAO M.C.; KUO J.M.; CHUNG B.C., Identification of four novel mutations in the CYP21 gene in congenital adrenal hyperplasia in the Chinese, *Hum. Genet.* 103:304-310, (1998).
- LEVINE, L.S.; ZACHMANN, M.; NEW, M.I.; PRADER, A.; POLLACK, M.S.; O'NEIL, G.J.; YANG, S.Y.; OBERFIELD, S.E.; DUPONT, B., Genetic Mapping of the 21-Hydroxylase Deficiency Gene within the HLA Linkage Group, *New Engl. J. Med.* 299:911-915, (1978).
- LEVO A.; PARTANEN J., Novel nonsense mutation (W302X) in the steroid 21-hydroxylase gene of a Finnish patient with the salt-wasting form of congenital adrenal hyperplasia., *Hum. Mutat.*, 9:363-365, (1997).
- LEWIS, D. F.; LEE-ROBICHAUD, P., Molecular modelling of steroidogenic cytochromes P450 from families CYP11, CYP17, CYP19 and CYP21 based on the CYP102 crystal structure., *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 66:217-233, (1998).
- LOBATO, M.N.; ORDONEZ-SANCHEZ, M.L.; TUSIE-LUNA, M.T.; MESENGER, A. Mutation analysis in patients with congenital adrenal hyperplasia in the Spanish population: identification of putative novel steroid 21-hydroxylase deficiency alleles associated with the classic form of the disease, *Hum. Hered.*, 49:169-175 (1999).
- MIGEON, C.J.; DONOHUE, P.A., Congenital Adrenal Hyperplasia Caused by 21-Hydroxylase Deficiency, *Endocrinol. Metabol. Clin. North Am.*, 20:277-296, (1991).
- MILLER, W.L., Genetics, diagnosis and management of 21-hydroxylase deficiency, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 78:241-246, (1991a).
- MILLER, W.L. Congenital Adrenal Hyperplasias. *Endocrinol. Metabol. Clin. North Am.*, 20:721-749, (1991b).
- MILLER, W.L.; LEVINE, L.S., Molecular and Clinical Advances in Congenital Adrenal Hyperplasia, *J. Pediat.*, 111:1-17, (1987).
- MILLER, W.L.; MOREL, Y., The Molecular Genetics of 21-Hydroxylase Deficiency, *Annu. Rev. Genet.*, 23:371-393, (1989).

- MONTE, O.; LONGUI, C.A.; CALLIARI, L.E.P., Endocrinologia para o pediatra. Cap. 16. 2ª Ed. Editora Atheneu, São Paulo, (1998).
- MOREL, Y.; ANDRÉ, J.; URING-LAMBERT, B.; HAUPTAMANN, G.; BÉTUEL, H.; TOSSI, M.; FOREST, M. G.; DAVID, M.; BERTRAND, J.; MILLER, W. L., Rearrangements and point mutations of P450c21 genes are distinguished by five restriction endonucleasehaplotypes identified by a new probing strategy in 57 famailies with congenital adrenal hyperplasia., *J. Clin. Invest.*, 83:527-536, (1989).
- MORNET, E.; COUILLIN, P.; KUTTEN, F.; RAUX, M. C.; WHITE, P. C.; COHEN, D.; BOUÉ, A.; DAUSSET, J., Associations between restriction fragment length polymorphisms detected with a probe for human 21-hydroxylase (21-OH) and two clinical forms of 21-hydroxylase deficiency. *Hum. Genet.*, 74: 402-408, (1986).
- MORNET, E.; CRÉTÉ, P.; KUTTENN, F.; RAUX-DEMAY, M.-C.; BOUÉ, J.; WHITE, P.C.; BOUÉ, A., Distribution of Deletions and Seven Point Mutations on CYP21 Genes in Three Clinical Forms of Steroid 21-Hydroxylase Deficiency, *J. Hum. Genet.*, 48:79-88, (1991).
- NEW, M.I.; SPEISER, P.W., Congenital Adrenal Hyperplasia, *Paediatric Endocrinology*, Charles Book, ed., 441-462 , (1989).
- NEW, M.I., 21-Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 48:15-22, (1994).
- NEW, M.I., Steroid 21-hydroxylase deficiency (congenital adrenal hyperplasia). *Am. J. Med.*, 98:2S-8S, (1995).
- NEW, M.I. Diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia, *Annu. Ver. Med.*, 49:311-28, (1998).
- NEW, M.I.; CRAWFORD, C., Molecular Genetics of Steroid 21-Hydroxylase Deficiency, *Molecular Genetics of Sex Determination*, p. 399-438, (1994).

- NEW, M.I.; LORENZEN, F.; LERNER, A.J.; KOHN, B.; OBERFIELD, S.E.; POLLACK, M.S.; DUPONT, B.; STONER, E.; LEVY, D.J.; PANG, S.; LEVINE, L.S., Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data., *J. Clin. Endocr. Metab.*, 57:320-326, (1983).
- NEW, M.I.; WHITE, P.C.; PANG, S.; DUPONT, B.; SPEISER, P.W., The Adrenal hyperplasias, in *The metabolic basis of inherited diseases*, 6th ed.. Edited by Scriver, C.R.; Beaudet, A.C.; Sly, W.S.; Valle, D., p. 1881-1917, McGraw-Hill, New York (1989).
- NIMLARN, S.; CERAME, B.I.; WEI, J.Q.; DUMIC, M.; ZUNEC, R.; BRKLJACIC, L.; CKRABIC, V.; NEW, M.I.; WILSON, R.C. Congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) without demonstrable genetic mutations., *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 84:378-381, (1999).
- OHLSSON, G.; SCHWARTZ, M., Mutations in the gene encoding 21-hydroxylase detected by solid-phase minisequencing., *Hum. Genet.*, 99:98-102, (1997).
- OHLSSON, G.; MULLER, J.; SKAKKEBAEK, N.E.; SCHWARTZ, M. Steroid 21-hydroxylase deficiency: mutational spectrum in Denmark, three novel mutations, and *In vitro* expression analysis, *Hum. Mut.*, 13:482-486 (1999).
- ORDONEZ-SANCHEZ, M. L.; RAMIREZ-JIMENEZ, S.; LOPEZ-GUTIERREZ, A. U.; RIBA, L.; GAMBOA-CARDIEL, S.; CERRILLO-HINOJOSA, M.; ALTAMIRANO USTAMANTE, N.; CALZADA-LEON, R.; ROBLES-VALDES, C.; MENDOZA-ORFIN, F.; TUSIE-LUNA, M. T., Molecular genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population: identification of possible new mutations and high prevalence of apparent germ-line mutations. *Hum. Genet.*, 102:170-177, (1998).
- OWERBACH, D.; BALLARD, A. L.; DRAZNIN, M. B., Salt-wasting congenital Adrenal hyperplasia: detection and characterization of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene, CYP21, using the polymerase chain reaction., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 74: 553-558, (1992a).

- OWERBACH, D.; SHERMAN, L.; BALLARD, A.-L.; AZZIZ, R., Pro 453-to-Ser mutation in CYP21 is associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency, *Molec. Endocr.*, 6:1211-1215, (1992b).
- OWERBACH, D.; DRAZNIN, M.B.; Carpenter, R.J.; Greenberg, F., Prenatal Diagnosis of 21-Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia Using The Polymerase Chain Reaction, *Hum. Genet.*, 89:109-110, (1992c).
- PALDOSTTIR, A.; FOSSDAL, R.; ARNASON, A.; EDWARDS, J.H.; JENNSON, O., Heterogeneity of Human C4 Gene Size. A Large intron (6.6 Kb) Is Present in all C4A Genes and Some C4B Genes, *Immunogenetics*, 25:299-304, (1987).
- PAULINO, L. Análise de microconversões no complexo gênico da enzima 21-hidroxilase em famílias afetadas por Hiperplasia Congênita da Adrenal. Tese de mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, (1997).
- PAULINO, L.C., DE ARAUJO, M., GUERRA JR., G; MARINI S.H.L.V., DE MELLO M.P., Mutation distribution and CYP21/C4 locus variability in Brazilian families with the classical form of the 21-hydroxylase deficiency. *Acta Paediatr.*, 88:275-283, (1999).
- RODRIGUES, N. R.; DUNHAN, I.; YUNG, Y. C.; CARROL, M. C.; PORTER, R.R.; CAMPBELL, R. D., Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia., *EMBO J.*, 6:1653-1661, (1987).
- ROWEN, L., DANKERS, C., BASKIN, D., FAUST, J., LORETZ, C., AHEARN, M.E., BANTA, A., SWARTZELL, S., SMITH, T.M., SPIES, T.; HOOD, L., Sequence Determination Of 300 Kilobases Of The Human Class III MHC Locus, (GeneBank (NCBI-NIH), nº. acesso AF019413, (1997).
- RUMSBY, G.; CARROLL, M.C.; PORTER, R.R.; GRANT, D.B.; HJELM, M., Deletion of the steroid 21-hydroxylase and complement C4 genes in congenital adrenal hyperplasia, *J. Med. Genet.*, 23:204-209, (1986).

- RUMSBY, G.; FIELDER, A.H.L.; HAGUE, W.M.; HONOUR, J.W., Heterogeneity in the Gene Locus for Steroid 21-Hydroxylase Deficiency, *J. Med. Genet.*, 25:596-599, (1988).
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2° ed., (1989).
- SINNOTT, P.; COLLIER, S.; COSTIGAN, C.; DYER, P. A.; HARRIS, R.; STRACHAN, T., Genes by meiotic unequal crossover of a de novo deletion that contributes to steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2107-2111, (1990).
- SINNOTT, P.J.; LIVIERI, C.; SAMPIETRO, M.; MARCONI, M.; HARRIS, R.; SEVERI, F.; STRACHAN, T., CYP21/C4 Gene Organisation In Italian 21-Hydroxylase Deficiency Families., *Hum. Genet.*, 88:545-551, (1992).
- SPEISER, P.W.; NEW, M.I.; TANNIN, G.M.; PICKERING, D.; YANG, S.Y.; WHITE, P.C., Genotype of Yupik Eskimos with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency, *Hum. Genet.*, 88:647-648, (1992a).
- SPEISER, P.; DUPONT, J.; ZHU, D.; SERRAT, J.; BUEGELEISEN, M.; TUSIÉ-LUNA, M.; LESSER, M.; NEW, M., Disease Expression and Molecular Genotype in Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *J. Clin. Invest.* 90:584-595, (1992b).
- SPEISER, P.W.; NEW, M.I., Genetics of steroid 21-hydroxylase deficiency., *Trends Genet.*, 1: 275-278, (1985).
- SPEISER, P. W.; NEW, M. I.; WHITE, P. C., Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14, DR1., *N. Engl. J. Med.*, 319:19-23, (1988).
- SPEISER, P.W.; LAFORDIA, N.; KATO, K.; PAREIRA, J.; KHAN, R.; YANG, S.Y.; WHORWOOD, C.; WHITE, P.C.; ELIAS, S.; SCHRIOCK, E.; SCHRIOCK, E.; SIMPSON, J.L.; TASLINI, M.; NAJJAR, J.; MAY, S.; MILLS, G.; CRAWFORD, C.; NEW, M.I., First Trimester Prenatal Treatment and Molecular Genetic Diagnosis

- of Congenital Adrenal Hyperplasia (21-Hydroxylase Deficiency), *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 70:838-848, (1990).
- STRACHAN, T., Molecular Genetics of Congenital Adrenal Hyperplasia, *Trends Endocr.* 32:68-72, (1989).
- STRACHAN, T., Molecular Pathology of Congenital Adrenal Hyperplasia, *Clin. Endocrinol.*, 32:373-393, (1990).
- STRACHAN, T.; WHITE, P.C., Molecular Pathology of Steroid 21-Hydroxylase Deficiency, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 40:537-543, (1991).
- STRACHAN, T., Molecular pathology of 21-hydroxylase deficiency, *J. Inher. Metab. Dis.* 17:430-441, (1994).
- TAJIMA, T.; FUJIEDA, K.; MIKAMI, A.; IGARASHI, Y.; NAKAE, J.; CUTLER, G. B. JR., Prenatal diagnosis of steroid 21-hydroxylase deficiency by the modified polymerase chain reaction to detect splice site mutation in the CYP21 gene. *Endocr. J.*, 45:291-295, (1998a).
- TAJIMA, T.; FUJIEDA, K.; NAKAE, J.; MIKAMI, A.; CUTLER, G. B. JR., Mutations of the CYP21 gene in nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency in Japan., *Endocr. J.*, 45:493-497, (1998b).
- TEE, M.K.; BABALOLA, G.O.; AZA-BLANC, P.; SPEEK, M.; GITELMAN, S.E.; MILLER, W.L., A promoter within intron 35 of the human C4A gene initiates abundant adrenal-specific transcription of a 1 kb RNA: location of a cryptic CYP2 promoter element?, *Hum. Mol. Genet.*, 4:2109-2116, (1995a).
- TEE, M.; THOMSON, A.; BRISTOW, J.; MILLER, W., Sequences Promoting the Transcription of the Human XA Gene Overlapping P450c21A Correctly Predict the Presence of a novel, Adrenal-Specific, Truncated Form of Tenascin-X. *Genomics*, 28:171-178, (1995b).

- TUSIE-LUNA, M.T.; TRAKTMAN, P.; WHITE, P.C., Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus., *J. Biol. Chem.*, 265:20916-20922, (1990).
- TUSIE-LUNA, M.T.; WHITE, P., Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:10796-10800, (1995).
- TUSIE-LUNA, M.T.; RAMIREZ-JIMENEZ, S.; ORDONEZ-SANCHEZ, M.L.; CABELLO-VILLEGAS, J.; ALTAMIRANO-BUSTAMANTE, N.; CALZADA-LEON, R.; ROBLES-VALDES, C.; MENDOZA-MORFIN, F.; MENDEZ, J.P.; TERAN-GARCIA, M., Low frequency of deletion alleles in patients with steroid 21-hydroxylase deficiency in a Mexican population., *Hum. Genet.*, 98:376-379, (1996).
- URABE, K.; KIMURA, A.; HARADA, F.; IWANAGA, T.; SASAZUKI, T., Gene Conversion in Steroid 21-hydroxylase Genes, *Am. J. Hum. Genet.*, 46:1178-1186, (1990).
- WEDELL, A.; RITZEN, E. M.; HAGLUND-STENGLER, B.; LUTHMAN, H., Steroid 21-hydroxylase deficiency: three additional mutated allele and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:7232-7236, (1992).
- WEDELL, A.; LUTHMAN, H., Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations, *Hum. Molec. Genet.*, 2:499-504, (1993a).
- WEDELL, A.; LUTHMAN, H., Steroid 21-hydroxylase (P450c21): a new allele and spread of mutations through the pseudogene, *Hum. Genet.*, 91:236-240, (1993b).
- WEDELL, A.; THEILÉN, A.; RITZÉN, E. M.; STENGLER, B.; LUTHAMAN, H., Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 78:1145-1152, (1994).

- WERKMEISTER, J.W.; NEW, M.I.; DUPONT, B.; WHITE, P.C., Frequent Deletion and Duplication of the Steroid 21-Hydroxylase Genes, *Am. J. Hum. Genet.*, 39:461-469, (1986).
- WITCHEL, S.F.; LEE, P.A., Identification of heterozygotic carriers of 21-hydroxylase deficiency: sensitivity of ACTH stimulation tests., *Am. J. Med. Genet.*, 76:337-342, (1998).
- WHITE, P.C.; NEW, M.I.; DUPONT, B., HLA-Likeage Congenital Adrenal Hyperplasia results from a Defective Gene Encoding a Cytochrome P-450 Specific for Steroid 21-Hydroxylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7505-7509, (1984a).
- WHITE, P.C.; NEW, M.I.; DUPONT, B., Cloning and expression of cDNA encoding a bovine adrenal cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1986, (1984b).
- WHITE, P.C.; GROSSBERGER, D.; ONUFER, B.J.; CHAPLIN, D.D.; NEW, M.I.; DUPONT, B.; STROMINGER, J.L., Two Genes Encoding Steroid 21-Hydroxylase Are Located Near the Genes Encoding the Fourth Component of Complement in Man, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1089-1093, (1985).
- WHITE, P.C.; NEW, M.I.; DUPONT, B., Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:5111-5115, (1986).
- WHITE, P.C.; NEW, M.I.; DUPONT, B., Congenital adrenal hyperplasia. Part I, *N. Engl. J. Med.*, 316:1519-1524, (1987a).
- WHITE, P.C.; NEW, M.I.; DUPONT, B., Congenital adrenal hyperplasia. Part II, *N. Engl. J. Med.*, 316:1580-1586, (1987b).
- WHITE, P.C.; NEW, M.I.; DUPONT, B., Medical progress: congenital adrenal hyperplasia, *New Eng. J. Med.*, 316:1519-1524, (1987c).
- WHITE, P.C.; VITEK, A.; DUPONT, B.; NEW, M.I. . Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:4436-4440, (1988).

- WHITE, P.C.; CRAWFORD, C.; NEW, M.I., Steroid 21-hydroxylase deficiency., *Curr. Opinion Pediat.*, 1:436-440, (1989).
- WHITE, P.C.; VILEK, A.; DUPONT, B.; NEW, M.I., Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:4436-4440, (1988).
- WHITE, P.C.; TUSIE-LUNA, M.T.; NEW, M.I.; SPEISER, P.W. Mutations un steroid 21-hydroxylase (CYP21). *Hum. Mut.*, 3:373-378 (1994).
- WILSON, R.C.; WEI, J.Q.; CHENG, K.C.; MERCADO, A.B.; NEW, M.I., Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the 21-hydroxylase gene, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80:1635-1640, (1995a).
- WILSON, R.; MERCADO, A.; CHENG, K.; NEW, M., Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: Genotype May Not Predict Phenotype., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:2322-2329, (1995b).
- WU, D.A.; CHUNG, B.C.; Mutations of P450c21 (steroid 21-hydroxylase) at Cys428, Val281, and Ser268 result in complete, partial, or no loss of enzymatic activity, respectively., *J. Clin. Invest.*, 88:519-523, (1991).
- ZHOU, Z.; AGARWAL, V. R.; DIXIT, N.; WHITE, P.; SPEISER, P. W., Steroid 21-hydroxylase expression and activity in human lymphocytes., *Mol. Cel. Endocrinol.*, 127:11-18, (1997).

Legenda:

-Região flanqueadora 5' e 3'

-Exon

-Intron

-Alterações nucleotídicas

-Mutações identificadas

```
-655 GAGTGAGTGC CCACAAAGCA CTTAGAGCAG TGTCTGGTAC ATGCTATTAC TCCGCAGCGG
-595 GAAACCACTT CCTCCTTTGT CTTCTGGGCA CTTTGTGTGAG TGAAGGGAGG CACTAATAAC
-535 AATCACACTG GGATACCTGT ATATACTGGA ATGCCCCAGG CAAACCAGGC TTAAACTGTA
-475 TTACTCTATC TGTAGCTTAA ACTAACAAC AACCCACACA AATCACATTT TGTTCTTCAG
-415 GCGATTCAGG AAGGCCTATT AGGCAGGGAC TGCCATTTTC TCTCTGAGAC AAACATCATG
-355 CCAGTAAACT GGCCACGGT GGGGTGGCAG AGGGAGAGGG CCCAGGTGGG GGCGGACACT
-295 ATTGCCTGCA CAGTTGATGT GGAACCAGAA AGCTGACTCT GGATGCAGGA AAAAGGTCAG
-235 GGTTCATTT CCCTTCCTTG CTTCTTGATG GGTGATCAAT TTTTTTGAAA TACGGACGTC
-175 CCAAGGCCAA TGAGACTGGT GTCATTCCAG AAAAGGGCCA CTCTGTGGGC GGGTCGGTGG
-115 GAGGGTACCT GAAGGTGGGG TCAAGGGAGG CCCCAAACA GTCTACACAG CAGGAGGGAT
-55 GGCTGGGGCT CTTGAGCTAT AAGTGGCACC TCAGGGCCCT GACGGGCGTC TGCCATGCT
6 GCTCCTGGGC CTGCTGCTGC TGCTGCCCCT GCTGGCTGGC GCCCGCCTGC TGTGGAAGTG
66 GTGGAAGCTC CGGAGCCTC ACCTCCCGCC TCTTGCCCCG GGCTTCTTGC ACTTGCTGCA
126 GCCCGACCTC CCAATCTATC TGCTTGGCCT GACTCAGAAA TTCGGGCCCA TCTACAGGCT
186 CCACCTTGGG CTGCAAGGTG AGAGGCTGAT CTCGCTCTGG CCCTCACCAT AGGAGGGGGC
```

Exon 2

246 GGAGGTGACG GAGAGGGTCC TCTCTCCGCT GACGCTGCTT TGGCTGTCTC CCAGATGTGG
 306 TGGTGCTGAA CTCCAAGAGG ACCATTGAGG AAGCCATGGT CAAAAAGTGG GCAGACTTTG
 366 CTGGCAGACC TGAGCCACTT ACCTGTAAGG GCTGGGGGCA TTTTTCCTTT CTAAAAAAA
 426 TTTTTTTTTTA AGAGATGGGT TCTTGCTATG CTGCCCAGGC TGGTCTTAA TTCCTAGTCT
 486 CAAATGATCC TCCCACCTCA GCCTCAAGTG TGAGCCACCT TTGGGGCATC CCAATCCAG
 546 GTCCCTGGAA GCTCTTGGGG GGGCATATCT GGTGGGGAGA AAGCAGGGGT TGGGGAGGCC
 606 GAAGAAGGTC AGGCCCTCAG CTGCCTTCAT CAGTTCCCAC CCTCCAGCCC CCAACTCCTC
 666 CTGCAGACAA GCTGGTGTCT AGGAACTACC CGGACCTGTC CTTGGGAGAC TACTCCCTGC

-2, G Exon 3

726 TCTGGAAAGC CCACAAGAAG CTCACCCGCT CAGCCCTGCT GCTGGGCATC CGTGA CTCCA
 786 TGGAGCCAGT GGTGGAGCAG CTGACCCAGG AGTTCTGTGA GGTAAGGCTG GGCTCCTGAG
 846 GCCACCTCGG GTCAGCCTCG CCTCTCACAG TAGCCCCCGC CCTGCCCGCT GCACAGCGGC

Exon 4

906 CTGCTGAACT CAACTGTTT CTCCACAGCG CATGAGAGCC CAGCCCGGCA CCCCTGTGGC
 966 CATTGAGGAG GAATTCTCTC TCCTCACCTG CAGCATCATC TGTTACCTCA CCTTCGGAGA
 1026 CAAGATCAAG GTGCCTCACA GCCCCTCAGG CCCACCCCCA GCCCCTCCCT GAGCCTCTCC

Exon 5

1086 TTGTCCTGAA CTGAAAGTAC TCCCTCCTTT TCTGGCAGGA CGACAACTTA ATGCCTGCCT
 1146 ATTACAAATG TATCCAGGAG GTGTTAAAAA CCTGGAGCCA CTGGTCCATC CAAATTGTGG
 1206 ACGTGATTCC CTTTCTCAGG GTGAGGACCT GGAGCCTAGA CACCCTGGG TTGTAGGGGA
 1266 GAGGCTGGGG TGGAGGGAGA GGCTCCTTCC CACAGCTGCA TTCTCATGCT TCCTGCCGCA

Exon 6

1326 GTTCTTCCCC AATCCAGGTC TCCGGAGGCT GAAGCAGGCC ATAGAGAAGA GGGATCACAT

1386 CGTGGAGATG CAGCTGAGGC AGCACAAAGGT GGGGACTGTA^G CGTGGACGGC CTCCCCCTCGG
 1446 CCCACAGCCA GTGATGCTAC CGGCCTCAGC ATTGCTATGA GGCGGGTTCT TTTGCATACC
 1506 CCAGTTATGG GCCTGTTGCC ACTCTGTACT CCTCTCCCCA GGCD^{Ci}AGCCGC TCAGCCCGCT^T
 Exon 7
 1566 CCTTTCACCC TCTGCAGGAG AGCCTCGTGG^G CAGGCCAGTG GAGGGACATG ATGGACTACA
 1626 TGCTCCAAGG GGTGGCGCAG CCGAGCATGG AAGAGGGCTC TGGACAGCTC CTGGAAGGGC
 1686 ACGTGCACAT GGCTGCAGTG GACCTCCTGA TCGGTGGCAC TGAGACCACA GCAAACACCC
 1746 TCTCCTGGGC CGTGGTTTTT TTGCTTCACC ACCCTGAGGT GCGTCCTGGG GACAAGCAAA
 1806 AGGCTCCTTC CCAGCAACCT GGCCAGGGCG GTGGGCACCC^C TCACTCAGCT CTGAGCACTG
 1866 TGCGGCTGGG^A GCTGTGCTTG CCTCACCGGC ACTCAGGCTC ACTGGGTTGC TGAGGGAGCG
 Exon 8
 1926 GCTGGAGGCT GGGCAGCTGT GGGCTGCTGG GGCAGGACTC CACCCGATCA TTCCCCAGAT
 1986 TCAGCAGCGA CTGCAGGAGG AGCTAGACCA CGAACTGGGC CCTGGTGCCT CCAGCTCCCG
 2046 GGTCCCCTAC AAGGACCGTG CACGGCTGCC CTTGCTCAAT GCCACCATCG CCGAGGTGCT
 2106^T GCGCCTGCGG^T CCCGTTGTGC CCTTAGCCTT GCCCCACCGC ACCACACGGC CCAGCAGGTG
 2166 ACTCCCGAGG GTTGGGGATG AGTGAGGAAA GCCCGAGCCC AGGGAGGTCC TGGCCAGCCT
 Exon 9
 2226 CTA^TACTCCAG CCCCTTCAG CATCTCCGGC^T TACGACATCC CTGAGGGCAC AGTCATCATT
 2286 CCGAACCTCC AAGGCGCCCA CCTGGATGAG ACGGTCTGGG AGAGGCCACA TGAGTTCTGG
 2346 CCTGGTATGT GGGGGGCCGG GGGCCTGCCG^A TGAAAATGTG GTGGAGGCTG GTCCCCGCTG
 Exon 10
 2406 CCGCTGAACG CCTCCCCACC^T CACCTGTCCA CCCGCCGCA GATCGCTTCC TGGAGCCAGG
 2466 CAAGAACTCC AGAGCTCTGG CCTTCGGCTG CGGTGCCCGC GTGTGCCTGG GCGAGCCGCT

2526 GGCGCGCCTG GAGCTCTTCG TGGTGCTGAC CCGACTGCTG CAGGCCTTCA CGCTGCTGCC
2586 CTCCGGGGAC GCCCTGCCCT CCCTGCAGCC CCTGCCCCAC TGCAGTGTCA TCCTCAAGAT
2646 GCAGCCTTTC CAAGTGCGGC TGCAGCCCCG GGGGATGGGG GCCCACAGCC CGGGCCAGAG
2706 CCAGTGATGG GGCAGGACCG ATGCCAGCCG GGTACCTCAG TTTCTCCTTT ATTGCTCCTG
2766 TACGAACCCC TCCCCTCCCC CCTGTAAACA CAGTGCTGCG AGATCGCTGG CAGAGAAGGC
2826 TTCCTCCAGC GGCTGGGTGG TGAAGGACCC TGGCTCTTCT CTCGGGGCGA CCCCTCAGTG
2886 CTCGGCAGTC ATACTGGGGT GCGAGAGAGG TGGGCAGCAG CTCAGCCTCC CCCCCTGGG
2946 GAGCGAAAGT TTCTTGGTCT CAGCTTCATT TCCGTGAAGG GCACCGAGAA CTCGAAGCCC
3006 TTCCAGTGGT ACCAGCTCAC TCCCTGGGAA AGGGGTTGTC AAGAGAGAGT CAAAGCCGGA
3066 TGTCCTATCT GCTCCTCCCA TTCCCCTTAA GGAGGTAGCT CCCAGCACTC AACCAACCTC
3126 CCCGCAGAGC TCCCTTCCTG ACCCTCCGCT GCAGAGGATT GAGGCTTAAT TCTGAGCTGG

T FAM 22

T