

NATÁLIA TORRES

***ESTUDO MOLECULAR DA HIPERPLASIA ADRENAL
CONGÊNITA POR DEFICIÊNCIA DA ENZIMA
21-HIDROXILASE CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO***

CAMPINAS

2002

NATÁLIA TORRES

***ESTUDO MOLECULAR DA HIPERPLASIA ADRENAL
CONGÊNITA POR DEFICIÊNCIA DA ENZIMA
21-HIDROXILASE CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO.***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
de Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual Campinas para obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. MARGARET DE CASTRO

CO-ORIENTADORA: DR^a MARICILDA PALANDI MELLO

CAMPINAS

2002

UNIDADE	3E
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	T/636e
V	EX
TOMBO BC/	53413
PROC.	124103
C	D
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	23/04/03
Nº CPD	

BIBID. 290743

CM00182574-5

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

T636e Torres, Natália
Estudo molecular da hiperplasia adrenal congênita por deficiência da enzima 21-hidroxilase correlação genótipo-fenótipo / Natália Torres. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientadores : Margaret de Castro, Maricilda Palandi Mello
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hiperplasia. 2. Mutação (Biologia). I. Margaret de Castro.
II. Maricilda Palandi Mello. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Margaret de Castro

Membros:

1. Profa. Dra. Lucila Leico K. Elias

2. Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

3. Profa. Dra. Margaret de Castro

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 21.08.2002

0815213

DEDICATÓRIA

À minha avó com saudades

*Aos meus pais Dirceu e Cecília, pelo amor
incondicional,minha eterna gratidão*

*Aos meus irmãos Rafael e Carolina,
eternos companheiros,pelo carinho
e incentivo*

A conclusão deste trabalho significa muito mais que o término de minha dissertação de mestrado, é a realização de uma série de sonhos. Mas, é ainda o começo da formação do pesquisador, um processo de amadurecimento gradual, adquirido durante anos e também o marco inicial de perspectivas futuras no campo da pesquisa.

Aos pacientes e seus familiares, que mesmo não sabendo o significado de uma mutação, acreditaram no meu estudo e seus benefícios.

Agradeço, especialmente, a Prof^a Dr^a Margaret de Castro, a qual devo minha formação, que além de ter tido participação fundamental na orientação de meu trabalho, tornou-se um modelo não só de profissional, mas de pessoa. Ajudou-me em momentos difíceis e tornou-se uma grande amiga.

À Prof^a. Dr^a Lucila Leico Elias pela inestimável colaboração na execução desse estudo, pela capacidade de mostrar como superar os limites trabalhando em equipe e pela preciosa amizade.

Ao Dr. José Antunes-Rodrigues por ter cedido um espaço em seu laboratório, tornando-se pessoa por quem tenho um enorme carinho e um exemplo de pesquisador a ser seguido sempre.

Ao Dr. Ayrton C. Moreira por também ter aberto um espaço em seu laboratório, mostrando-se sempre a disposição.

À Dr^a. Maricilda pela co-orientação, disponibilidade e revisão criteriosa do meu mestrado.

À Dr^a. Carla Germano cuja participação foi fundamental para realização deste trabalho.

Em especial, ao colega de pós-graduação e amigo Sonir R. Antonini, por quem tenho grande admiração profissional e imenso carinho e que mesmo de longe continuou me ajudando muito.

À minha “prima-irmã” Cátia Sgavioli pelo convívio, carinho e incentivo durante esta jornada.

À grande amiga Cristina Helena F. Ferreira pela amizade sincera, difícil de se encontrar nos dias de hoje.

À colega de pós-graduação Flávia Vendramini Durlo e família, que foi a fiel companheira de minhas viagens à Campinas, tornando-se uma grande amiga.

Aos colegas de pós-graduação Dr^a Paula, Dr^a Patrícia, Dr. Ivan, Cristhianna, Theresa, Rosângela, Danielle, Renato, Dayane, Ana Paula e aos alunos de iniciação científica Livia, Alexandre, Heitor e Felipe pela amizade.

À Anita Salmazo por ter nos abrigado com alegria durante o tempo que passamos em Campinas.

Aos funcionários dos Laboratórios de Endocrinologia do HC Adriana, Mara, Zé Roberto e Sebastião, em especial à Nádia Bittar.e da Fisiologia Endócrina da FMRP-USP Valci e Marina, especialmente à Silvia Rossi.

A enfermeira “Cidinha” pela ajuda carinhosa na coleta de sangue de meus pacientes.

Ao colega e amigo Fernando Colbari do Amaral que me ajudou muito no final de minha dissertação não só na parte experimental, mas também ouvindo sempre meus desabafos.

Ao pessoal do CEBEMEG-Unicamp, em especial a Maria Madalena Vasconcelos, a “Madá”, Fernanda Coelo e Fernanda Soardi pela preciosa ajuda e disponibilidade na etapa conclusiva de meu mestrado.

À Marlucia, Carmen e Márcia da Faculdade de Ciências Médicas- Unicamp pela disponibilidade em nos atender sempre.

Ao Renato Santos, gerente da Bio-Import Ltda por ter me permitido aplicar na prática o que aprendi na teoria.

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando.

A certeza de que precisamos continuar.

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.

Portanto, devemos:

Fazer de interrupção um caminho novo.

Da queda um passo de dança.

Do medo, uma escada.

Do sonho, uma ponte.

Da procura um encontro.

(Fernando Pessoa)

	PÁG.
RESUMO	<i>xxix</i>
ABSTRACT	<i>xxxiii</i>
INTRODUÇÃO	37
1. Estrutura e função do Córtex da Adrenal.....	39
2. Hiperplasia congênita da adrenal e Deficiência da 21-hidroxilase.....	44
2.1 Forma Perdedora de Sal.....	45
2.2 Forma Viriliante Simples.....	46
2.3 Forma Não Clássica.....	47
3. Diagnóstico e Tratamento.....	47
4. Herança e Incidência.....	48
5. Mapeamento do gene <i>CYP21</i>	49
6. Rearranjo no ‘cluster’ do gene da enzima 21-hidroxilase.....	52
7. Mutações Pontuais e Microconversões.....	55
8. Correlação genótipo-fenótipo.....	57
OBJETIVOS	59
MATERIAL E MÉTODOS	63
1. Casuística.....	65
2. Coleta de Amostras.....	65
3. Extração DNA Genômico.....	65
4. Amplificação por Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) Alelo-Específico.....	66

5. Condições das PCRs alelo-específico.....	69
5.1. Mutação P30L.....	69
5.2. Mutação IVS2, A/C>G,-12.....	70
5.3. Mutação 706_713del8.....	71
5.4. Mutação I172N.....	72
5.5. Mutação V281L.....	73
5.6. Mutação Q318X.....	74
5.7. Mutação R356W.....	75
6. Southern Blotting.....	76
6.1 Sondas Utilizadas.....	76
7. Metodologia para correlação Genótipo-fenótipo.....	77
RESULTADOS.....	79
1. Hiperplasia adrenal congênita: análise das mutações.....	81
1.1 Hiperplasia adrenal congênita forma não clássica.....	81
2. Hiperplasia adrenal congênita forma clássica.....	88
2.1. Forma virilizante simples.....	88
2.2. Forma perdedora de sal.....	93
Correlação genótipo- fenótipo.....	101
DISCUSSÃO.....	103
Correlação entre Genótipos e Fenótipos.....	116
CONCLUSÕES.....	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA.....	123
ANEXOS.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS

17-OHP	17 hidroxiprogesterona
21-OH	enzima 21-hidroxilase
$\Delta 4- \Delta 4$	androstenediona
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
C4	gene do quarto componente do sistema complemento
CAMP	adenina monofosfato cíclica
CRH	hormônio liberador de corticotropina
<i>CYP21</i>	gene da enzima 21-hidroxilase
<i>CYP21P</i>	pseudogene da 21-hidroxilase
DNA	ácido desoxirribonucleotídeo
Dntp	desoxirribonucleotídeos
EDTA	etilenodiaminoteracetato dissódico
HCA	hiperplasia congênita da adrenal
HLA	Complexo Maior de Histocompatibilidade
Kb	kilobases
MRNA	ácido ribonucléico mensageiro
Nt	nucleotídeo
Pb	pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	ácido ribonucléico

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1: Mutações mais comuns no gene <i>CYP21</i>	56
Tabela 2: Primers utilizados nas PCRs Alelo-específicas para detecção das mutações do gene <i>CYP21</i>	68
Tabela 3: Pacientes com HCA por deficiência da 21-hidroxilase forma não clássica (NC), seus familiares e os respectivos alelos mutados.....	83
Tabela 4: Pacientes com HCA por deficiência da 21-hidroxilase forma clássica virilizante simples, seus familiares e os respectivos alelos mutados.....	90
Tabela 5: Pacientes com HCA por deficiência da 21-hidroxilase forma clássica, perdedora de sal, seus familiares e os respectivos alelos mutados.....	95
Tabela 6: Frequência (%) das mutações de ponto em pacientes com HCA por deficiência da enzima 21-hidroxilase no presente estudo.....	107
Tabela 7: Frequência (%) das microconversões em alelos nas diferentes populações com a forma clássica e não clássica da HCA por deficiência da 21-hidroxilase.....	109
Tabela 8: Frequência (%) das mutações de ponto em pacientes brasileiros com a forma clássica e não clássica da HCA por deficiência da 21-hidroxilase...	110
Tabela 9: Parâmetros clínicos e bioquímicos dos pacientes com a forma não clássica da HCA por deficiência da enzima 21-OH.....	145
Tabela 10: Parâmetros clínicos e bioquímicos dos pacientes com a forma clássica virilizante simples da HCA por deficiência da enzima 21-OH.....	146
Tabela 11: Parâmetros clínicos e bioquímicos dos pacientes com a forma clássica perdedora de sal da HCA por deficiência da enzima 21-OH.....	147

	PAG.
Figura 1: Controle do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.....	40
Figura 2: steroidogênese adrenal.....	43
Figura 3: Mapa do complexo gênico da 21-hidroxilase.....	51
Figura 4: Mecanismos de conversão gênica.....	54
Figura 5: Mutações e suas respectivas manifestações no fenótipo da HCA.....	58
Figura 6: Estratégia da PCR alelo-específico para identificação das mutações pontuais.....	67
Figura 7A: Representação esquemática do gene <i>CYP21</i> e da localização relativos “primers” utilizados para amplificação da PCR alelo-específico.....	82
Figura 7B: Representação esquemática dos sítios de restrição da enzima <i>Taq I</i> nos genes <i>C4</i> e <i>CYP21</i>	82
Figura 8: Gel de Agarose 1,0% demonstrando a amplificação por PCR alelo- específico do fragmento de 330 bp para a mutação V281L.....	85
Figura 9: Gel de Agarose 1,0% demonstrando a amplificação por PCR alelo- específico do fragmento de 330 bp para a mutação V281L (A) e 420bp para a mutação I172N (B).....	86
Figura 10: Gel de Agarose 1,0% demonstrando a amplificação por PCR alelo- específico do fragmento de 420bp para a mutação I172N.....	87
Figura 11: Gel de Agarose 1,0% demonstrando a amplificação por PCR alelo- específico do fragmento de 420bp para a mutação I172N (A), fragmento de 760bp para a mutação Sp2 e de 650pb para a mutação Q318X.....	87

Figura 12: Gel de Agarose 1,0% demonstrando a amplificação por PCR alelo- específico do fragmento de 760bp para a mutação Sp2 em homozigose.....	91
Figura 13: Gel de Agarose 1,0% demonstrando a amplificação por PCR alelo- específico do fragmento de 420bp para a mutação I172N (A), fragmento de 760bp para a mutação Sp2 e de 650pb para a mutação Q318X.....	92
Figura 14: Southern Blotting com a enzima <i>Taq I</i> e hibridação com sondas para o gene C4A, C4B e CYP21, da paciente 5VS. A paciente apresentou uma duplicação de (<i>CYP21P+C4B</i> [6,0]), seus pais não foram submetidos ao estudo.Os genes correspondentes estão descritos na figura, bem como o tamanho de cada banda.....	93
Figura 15: Gel de Agarose 1,0% demonstrando a amplificação por PCR alelo- específico do fragmento de 760bp da mutação Sp2 em homozigose na família 2. Os números 1, 2 e 3 referem-se ao paciente, mãe e pai respectivamente, M= marcador de peso molecular e C+ = controle positivo para estas mutações. N- primer com sequência normal e M- primer com sequência mutante.....	98
Figura 16: Gel de Agarose 1,0% demonstrando a amplificação por PCR alelo- específico do fragmento de fragmento de 760bp da mutação Sp2 (A), 720bp da mutação R356W, e de 650pb para a mutação Q318X da família 8. Os números 1, 2 e 3 referem-se ao paciente, mãe e pai respectivamente, M= marcador de peso molecular e C+ = controle positivo para estas mutações. N- primer com sequência normal e M- primer com sequência mutante.....	99

- Figura 17:** Southern Blotting com a enzima *Taq I* e hibridação com sondas para o gene *C4A*, *C4B* e *CYP21*, do paciente 5PS. O paciente apresentou uma duplicação de (*CYP21P*+*C4B* [6,0]), seus pais não foram submetidos ao estudo. Os genes correspondentes estão descritos na figura, bem como o tamanho de cada banda..... 100
- Figura 18:** Southern Blotting com a enzima *Taq I* e hibridação com sondas para o gene *C4A*, *C4B* e *CYP21*, do paciente 4PS. A paciente apresentou um alelo com deleção de (*C4B*+*CYP21*) herdado do pai e outro alelo com a mutação V281L herdado da mãe. Os genes correspondentes estão descritos na figura, bem como o tamanho de cada banda..... 100



RESUMO

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) constitui um grupo de doenças hereditárias decorrentes da deficiência de uma das enzimas necessárias para a esteroidogênese adrenal. A forma mais comum de HAC é decorrente da deficiência da 21-hidroxilase (21-OH), correspondendo a 90-95% de todos os casos, cuja herança é autossômica recessiva. Mutações no gene *CYP21* são responsáveis pelas diferentes formas da doença. O gene *CYP21* codifica a enzima 21-OH e se alternam em *tanden* com o pseudogene *CYP21P*, ambos apresentando 98% de homologia, favorecendo o emparelhamento desigual dos cromossomos durante a meiose, levando ao aparecimento de duplicações, deleções ou conversões destes genes. Estudos de mutagênes e *in vitro* permitiram quantificar a atividade enzimática de cada mutação e sua correlação com as diferentes formas clínicas da doença. O objetivo deste estudo foi delinear o perfil do complexo gênico 21-OH em famílias com pelo menos um membro portador de HAC por deficiência da 21-OH, determinar as frequências de haplótipos com mutações de ponto no gene *CYP21* e estabelecer uma correlação entre genótipo e fenótipo dos indivíduos afetados. Foram estudadas 50 famílias não correlacionadas, sendo 20 indivíduos portadores da forma clássica perdedora de sal (PS), 17 da forma clássica virilizante simples (VS) e 13 da forma não clássica (NC) de deficiência de 21-OH. Utilizamos DNA genômico para amplificação do gene *CYP21* por PCR alelo-específico. Mutações foram identificadas em 93 alelos, sendo mais frequentemente encontrada a mutação I172N (20,4%), seguida da V281L (18,2%), IVS2, A/C>G,-12 (Sp2) (14,0%) e R356W (6,5%), Q318X (1,1%), P30L (1,1%) e 706_713del8 (Δ 8) (1,1%). Os genótipos foram divididos em grupos A, B e C, em ordem crescente da atividade enzimática, e foram comparados com as formas clínicas de HAC: PS, VS e NC, respectivamente. Em nossa amostragem, houve, ainda, uma forte correlação do genótipo com o fenótipo (100% para o C grupo, 100% para o B e 88,8% para o A). A frequência de microconversões encontrada neste estudo foi semelhante à observada na população mundial e brasileira.



ABSTRACT

Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency (CAH-21OHD) is one of the most common inborn metabolism errors. It presents a wide spectrum of clinical manifestations, varying from a severe form with prenatal virilization and neonatal dehydration to a mild form in which the signs appear around puberty onset. It presents recessive autosomal inheritance and occurs due to mutations in the *CYP21* gene, which codifies the 21-hydroxylase enzyme. Mutations leading to less enzymatic activity are related to the classical form and those with more enzymatic activity with nonclassical form of the disease. We studied the frequency of the 7 most frequent point mutations reported in *CYP21* gene in 50 families with CAH-21OHD, 21 with classic salt wasting patients (SW), 17 with classic simple virilizing patients (SV) and 13 with nonclassic form (NC). In addition, we correlated the phenotype with the genotype observed in all patients studied. We used genomic DNA to amplify *CYP21* gene by allele-specific PCR. Mutations had been identified in 93 alleles. The more frequent mutation found was I172N (21.5%) followed by V281L (18.2%), IVS2, A/C>G,-12 (Sp2) (14.0%) and R356W (6.5%), Q318X (1.1%) and P30L (1.1%) and 706_713del8 (Δ 8) (1.1%). The genotype was divided in groups A, B and C, in an increasing order of enzymatic activity. These three groups were compared to the SW, SV and NC forms, respectively. There was a strong correlation of phenotype with the genotype (100% for C group, 100% for B group and 88.8% for A group). In conclusion, the frequency of microconversions found in this study was similar to those observed in the worldwide and in a Brazilian sub population.



INTRODUÇÃO

1. 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 órgãos distintos, unidos apenas topograficamente (Monte *et al.*, 1998a; 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 adrenal são sintetizados 3 grupos de hormônios a partir do colesterol: os mineralocorticóides, os glicocorticóides e os esteróides sexuais, predominantemente esteróides androgênicos. 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 a produtora de andrógenos (Monte *et al.*, 1998; New *et al.*, 1989; Miller, 1991; White *et al.*, 1994).

O cortisol, quantitativamente, é o principal glicocorticóide produzido pelo córtex adrenal e é o seu principal produto de secreção (Calliari, 1992; White *et al.*, 1987; White *et al.*, 1994). Afeta principalmente o metabolismo proteico, lipídico e dos carboidratos. Promove catabolismo proteico, com conseqüente elevação na produção de glicogênio (neoglicogênese) e a elevação da glicose no plasma sanguíneo (Junqueira e Carneiro, 1990). A aldosterona é o mineralocorticóide mais potente e tem como atividade principal a retenção de sal (Klouda *et al.*, 1978; New, 1998). Os andrógenos da adrenal, principalmente a androstenediona e a testosterona, são responsáveis pelo desenvolvimento sexual normal e caracteres sexuais secundários no homem e pêlos púbicos e axilares nas mulheres (New e Crawford, 1994; Calliari, 1992; Miller & Morel, 1989). As mesmas enzimas necessárias à produção dos esteróides adrenais são necessárias para a produção de testosterona e estrógeno pelas gônadas (New, 1994; Spiser e New, 1985).

A síntese do cortisol na zona fasciculada está sob controle do Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH) produzido pela adeno-hipófise. Sua secreção é controlada e induzida pelo sistema nervoso central, através do Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH), produzido pelo hipotálamo. Os níveis circulantes do cortisol plasmático, por sua vez, são responsáveis pelo controle do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, regulando a produção de ACTH e do CRH, num mecanismo denominado de “feedback” negativo ou retroalimentação (figura 1A) (Strachan, 1990; White *et al.*, 1987a; New, 1995; Calliari *et al.*, 1992; Speiser e New, 1989). Desta forma, altos níveis de cortisol plasmático inibem a liberação de CRH e ACTH, enquanto baixos níveis têm ação contrária. O 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 & Crawford, 1994; Miller e Morel, 1989; White *et al.*, 1994).

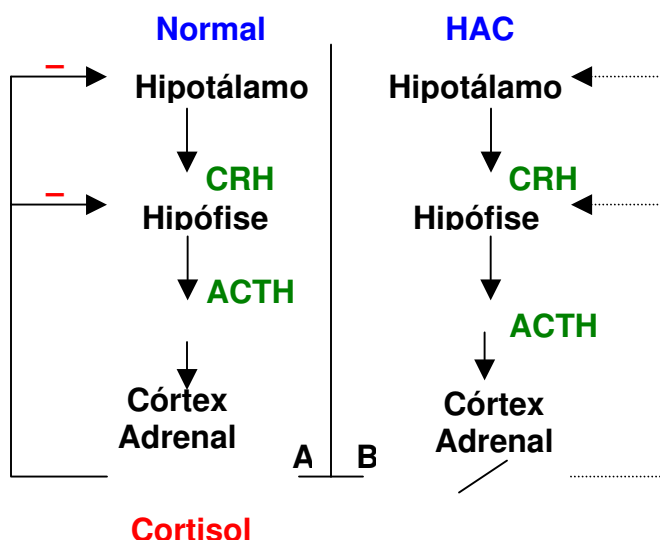


Figura 1: Regulação na produção do cortisol através do mecanismo de retroalimentação negativa sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. **A.** Sob condições normais, o cortisol produzido no córtex adrenal inibe a liberação dos hormônios CRH e ACTH. **B.** Em indivíduos afetados por HAC, não ocorre a inibição do eixo hipotalâmico-hipofisário, superestimulando o córtex adrenal (New *et al.*, 1989).

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

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 a ativação do colesterol éster hidrolase, enzima responsável pela mobilização do colesterol das reservas citoplasmáticas. O colesterol livre é transportado para a mitocôndria onde é convertido para pregnenolona, pela enzima 20,22 desmolase (P450_{ssc}) (figura 2). (Migeon e Donohoue, 1991; Miller e Norel, 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 a membrana interna. A pregnenolona formada é precursora comum dos esteróides produzidos pela adrenal. 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 e transporte de colesterol, através do estímulo da transcrição dos genes correspondentes, por fatores ainda não completamente elucidados.

Na via dos glicocorticóides, a pregnenolona formada é desidrogenada na posição 3 β pela 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD), no retículo endoplasmático, originando o composto progesterona. Tanto a pregnenolona quanto a progesterona são hidroxiladas na posição C-17 α por uma enzima microssomal específica, a 17 α -hidroxilase (CYP17), formando 17-hidroxiprenenolona e 17-hidroxprogesterona (17-OHP), respectivamente. A 17-hidroxiprenenolona, por ação da 3 β -HSD, é transformada em 17-OHP. No passo seguinte, a 17-OHP é hidroxilada na posição 21 por outra enzima microssomal da família do citocromo P450, a 21-hidroxilase (CYP21A2), produzindo 11-desoxicortisol. Este composto é transportado de volta para a membrana interna da

mitocôndria, onde sofre hidroxilação por uma quarta enzima da família citocromo P450, a 11 β -hidroxilase (CYP11B1), finalmente dando origem ao cortisol (New e Espeiser, 1989; Migeon e Donohoue, 1991; Huma *et al.*, 1995) (figura 2).

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

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

Mineralocorticoide

Glicocorticoide

Hormônios Sexuais

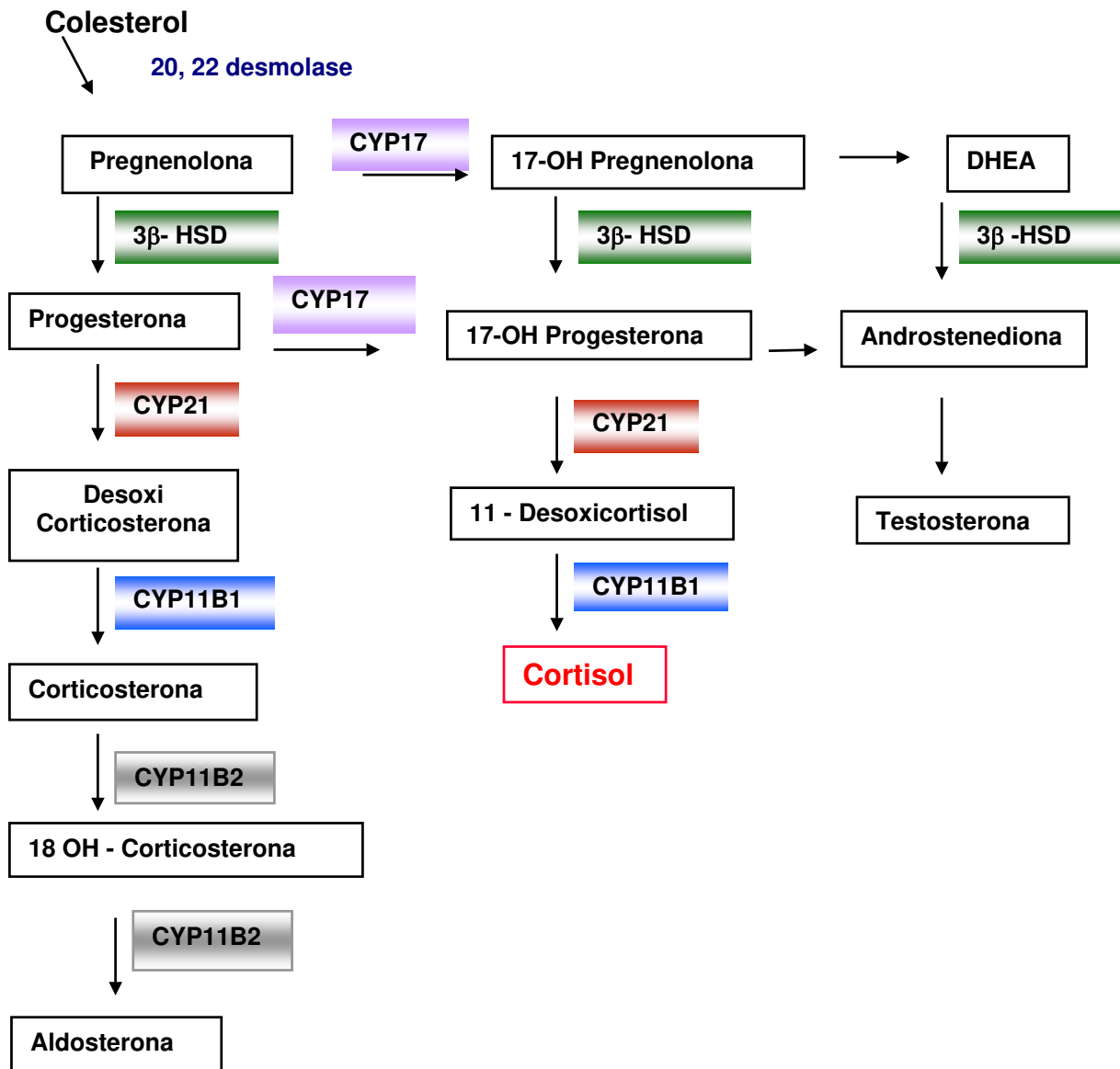


Figura 2: Vias metabólicas dos mineralocorticóides e hormônios sexuais produzidos no córtex da adrenal, baseado em Calliari (1992)

2. Hiperplasia Congênita da adrenal e deficiência da 21- hidroxilase

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 & Donhoue, 1991). O cortisol é sintetizado em um processo denominado de esteroidogênese, localizado no córtex da adrenal (Higashi *et al.*, 1988a; Miller e Morel, 1989).

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

Na deficiência da 21-hidroxilase, a 17-OHP não é convertida em 11-desoxicortisol, tornando ineficiente a síntese do cortisol. Como consequência, ocorre perda do “feedback “ negativo, resultando em elevados níveis de ACTH, levando a uma super produção e acúmulos dos precursores que antecedem o bloqueio: a progesterona na via dos mineralocorticóides e a 17-OH na via dos glicocorticóides. Como consequência, ocorre um desvio da síntese no sentido da produção e secreção dos andrógenos desidroepiandrosterona (DHEA) e Δ 4-androstenedina preferencialmente, sendo este último convertido em testosterona em níveis muito acima do normal (White *et al.*, 1987a; Miller & Morel, 1989, Migeon e Donohoue, 1991; Calliari, 1992). As funções do córtex adrenal estão totalmente ativas a partir do 3º mês de gestação, expondo o feto a níveis aumentados de andrógenos, em uma fase crítica para o desenvolvimento sexual; uma característica marcante de deficiência da enzima 21-hidroxilase é, portanto, a virilização. Entretanto, o sexo genético e a diferenciação gonadal são sempre normais em pacientes com HCA. A diferenciação dos órgãos internos está sob controle de mais dois hormônios produzidos em quantidades suficientes apenas pelos testículos: a testosterona, que direciona a formação das estruturas genitais masculinas a partir do Ducto de Wolff, e o Hormônio Anti-Mülleriano (AMH), que suprime o desenvolvimento dos ductos Müllerianos nas

estruturas internas femininas. 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).

A HCA por deficiência da enzima 21-hidroxilase ocorre em um amplo espectro de variantes clínicas que podem ser agrupadas em duas categorias: forma clássica, que apresenta duas divisões fenotípicas, perdedora de sal (PS) e virilizantes simples (VS) e não clássica (NC). Em geral, o quadro clínico da doença depende da intensidade e do nível do bloqueio enzimático (White *et al.*, 1987a; Miller e Morel, 1989, New, 1995; Helmberg, 1993; Calliari *et al.*, 1992). A forma clássica da deficiência da enzima 21-hidroxilase está envolvida com o bloqueio completo ou quase completo da atividade enzimática e está clinicamente presente ao nascimento (Strachan, 1990; Helmberg, 1993; Miller, 1991).

2.1. Forma Perdedora de Sal

A forma clássica da HCA por deficiência da enzima 21-hidroxilase com perda de sal ocorre em cerca de 3/4 dos casos, sendo esta a forma mais grave da doença. Na forma perdedora de sal (PS), os sinais de hiperandrogenismo são os mesmos apresentados pelos portadores de HAC forma virilizante simples. O que distingue nesse caso, é a capacidade de sintetizar ou não quantidade suficiente de mineralocorticoide aldosterona (Rappaport, 1983; New, 1995). A incapacidade de sintetizar aldosterona leva a crises de perda de sal, associadas com graves casos de hiponatremia, hipercalemia e hipovolemia com acidose metabólica, perda de 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. Os sinais de hiperandrogenismo geralmente não são detectáveis no neonato do sexo masculino, que em geral apresenta genitália externa normal com macrogenitossomia. O neonato do sexo feminino apresenta ambigüidade genital em diversos graus, variando de uma leve clitorimegalia até a completa fusão dos grandes lábios formando um escroto, sem que no entanto, apresente gônada (Richards *et al.*, 1978; Rumsby *et al.*, 1986; Miller, 1991a; Calliari, 1992), sendo que a virilização pode se tornar evidente com o passar do tempo. Indivíduos do sexo masculino e feminino quando não

tratados podem apresentar aparecimento prematuro de pêlos pubianos, acne, odor de adulto e um crescimento contínuo excessivo do pênis ou do clitóris. Pacientes quando não são tratados originam crianças altas, com rápido desenvolvimento somático e avanço da idade óssea induzida pelos andrógenos, mas se tornam adultos mais baixos que o esperado devido ao fechamento prematuro das epífises (diMartini-Nardi *et al.*, 1986; New, 1994; New, 1995; Migeon e Donohoue, 1991).

2.2. Forma Virilizante Simples

Cerca de 1/4 dos casos clássicos de deficiência da 21-hidroxilase são capazes de sintetizar aldosterona em quantidade suficiente e são denominados virilizantes simples (VS). São reconhecidos como portadoras da forma clássica VS de HAC os indivíduos do sexo feminino com genitália externa ambígua virilizada resultante do excesso de andrógenos e aumento na concentração de 17OH-P, mas sem deficiência de mineralocorticóides. Em indivíduos do sexo masculino portadores da forma VS de HAC, o principal sintoma capaz de identificar a HAC por deficiência de 21-hidroxilase são sinais de virilização precoce devido ao excesso de andrógenos, como o aparecimento de pêlos púbicos, faciais e axilares e desenvolvimento precoce da genitália e dosagem laboratorial de 17-OHP aumentada. Pacientes com esse fenótipo podem apresentar um aumento da atividade renina plasmática, que reflete a hiperestimulação da via dos mineralocorticóides (Miller e Morel, 1989; Huma *et al.*, 1995; New *et al.*, 1989). Pacientes do sexo feminino apresentam virilização progressiva com clitorimegalia e aparecimento precoce de pelos pubianos, com quadro bem estabelecido em torno dos 18 meses de vida. Na mulher adulta, pode-se observar também ovários policísticos, e devido aos altos índices de progesterona no sangue ocorre interferência com a capacidade do estradiol estimular os picos do hormônio luteinizante, em irregularidade menstrual ou amenorréia. A função do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal é afetada em ambos os sexos.

2.3. Forma Não clássica

Pacientes com a variante não clássica (NC) da deficiência da 21-hidroxilase não apresentam anormalidade ao nascimento. Como nesta forma o bloqueio enzimático é menos intenso, as características clínicas devido ao excesso de andrógeno são muito variáveis, podendo manifestar-se em qualquer idade, mais comumente na puberdade e vida adulta. Na infância ou puberdade, em ambos os sexos, o desenvolvimento prematuro de pêlos pubianos, acne cística severa e em uma baixa estatura na vida adulta. Na mulher ainda temos quadros de irregularidade menstrual e infertilidade (New e Crawford, 1994; Nwe *et al.*, 1989). Cerca de 30% das mulheres com queixa de hirsutismo e com síndrome de ovário policístico são portadoras de deficiência não clássica da 21-hidroxilase.

3. Diagnóstico e Tratamento

Além dos sinais e sintomas clínicos da deficiência da 21-hidroxilase nas suas diferentes apresentações fenotípicas, a consangüinidade e a presença de outros casos na família são dados que sugerem o diagnóstico (Calliari, 1992).

O diagnóstico laboratorial é fundamental para confirmação diagnóstica e é feito, principalmente, através da dosagem dos níveis dos precursores do cortisol, principalmente, os níveis de 17-OHP e andrógenos adrenais. Na forma PS pode-se detectar hiponatremia, hipercalemia e baixos níveis de aldosterona no plasma e urina, além de elevada atividade de renina plasmática. Os níveis de cortisol aparecem em quantidade limite para identificação direta; já o substrato da 21-hidroxilase, a 17-OHP, na forma clássica, está, freqüentemente, centenas de vezes acima do valor normal (Dupont *et al.*, 1980; White *et al.*, 1987b). A dosagem de outros esteróides androgênicos como a androstenediona também auxiliam no diagnóstico. Nas formas clássicas da HCA, a dosagem de 17-OHP basal é obrigatória; entretanto, na forma não clássica da HAC, o diagnóstico clínico é confirmado pelo teste de estímulo endovenoso da adrenal com ACTH sintético, para comparação com níveis basais da 17-OHP com os níveis observados após estímulo (New *et al.*, 1983).

Além dos exames laboratoriais, é importante a determinação do cariótipo do recém-nascido, para confirmação do sexo, e ultra-sonografia pélvica para visualização dos órgãos genitais internos, para possibilitar melhor tratamento corretivo da genitália (Migeon e Donohoue, 1991; Miller, 1991).

O tratamento é feito por substituição hormonal contínua a fim de suprir a falta de glicocorticóides e mineralocorticóides e impedir a produção excessiva de andrógenos. É possível realizar um tratamento pré-natal através da administração de um análogo do cortisol, a dexametasona. O objetivo principal do tratamento pré natal é evitar a virilização da genitália externa feminina, a pseudopuberdade precoce nos meninos ou uma possível cirurgia corretiva (Migeon e Donohoue, 1991; White *et al.*, 1989). A possibilidade de tratamento pré-natal aumenta a importância do diagnóstico pré natal (Owerbach *et al.*, 1992c; Speiser *et al.*, 1990; Rumsby e Honour, 1990).

Os estudos genéticos e moleculares têm contribuído muito para o diagnóstico pré-natal de alterações no complexo gênico da 21-hidroxilase.

4. Herança e Incidência

A HCA pela deficiência da enzima 21-hidroxilase é uma doença genética transmitida de forma autossômica recessiva (Migeon e Donohoue, 1991). Verificou-se que esta doença ocorria freqüentemente entre irmãos, independente do sexo, em que pais não eram afetados e apresentava-se com risco de recorrência de 25% na prole.

A incidência da deficiência da 21-hidroxilase varia consideravelmente dependendo do grupo populacional estudado (Miller & Morel, 1989). A análise dos neonatos na população mundial demonstrou que a doença ocorre ao redor de 1:14.000 nascimentos para a forma clássica da HCA, e a freqüência calculada para o gene mutante, através da equação de Hardy-Weinberg, foi de 1 para 60 para portadores heterozigotos (Miller e Morel, 1989). Entretanto, este cálculo exclui dois grupos, os Esquimós Yupik, com uma freqüência de 1:280 (Speiser *et al.*, 1992a) e uma população de Réunion, com incidência de 1:2000. Esses números são sugeridos, provavelmente, devido a maior ocorrência de casamentos consangüíneos nesses grupos étnicos (White *et al.*, 1987a; Pang *et al.*, 1988;

White *et al.*, 1989; New *et al.*, 1989a; Helmberg, 1993). A forma não clássica tem sido observada em alta frequência em populações brancas, 1:100 e é maior em etnias específicas como 1:27 em judeus Ashkenazi, 1:40 em hispânicos, 1:50 em iugoslavos e 1:333 em italianos (Sherman *et al.*, 1988; Dunic *et al.*, 1990).

5. Mapeamento do gene *CYP21*

Das cinco enzimas que participam da síntese do cortisol, quatro são membros da família do citocromo P450: colesterol 20, 22 desmolase ou CYP11A1 (P450_{ssc}), a CYP17 (P450c17), a CYP21A2 (450c21) e a CYP11B1 (P450c11) (Miller, 1991b). Os citocromos P-450 fazem parte de uma super família de mono oxigenases (oxidases e peroxidases) contendo um grupo heme e metabolizam uma ampla variedade de compostos lipofílicos. Na adrenal, apresentam função específica na esteroidogênese; estas enzimas apresentam algumas características em comum, que incluem o alto grau de conservação dos resíduos hidrofóbicos e um peptídeo de ligação do grupamento heme altamente conservado.

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

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

O gene da enzima 21- hidroxilase está localizado no braço curto do cromossomo 6, ligado ao Complexo Maior de Histocompatibilidade (HLA). Existem duas cópias deste gene, *CYP21P* e *CYP21* (Levine *et al.*, 1978; Carrol *et al.*, 1984; Strachan & White, 1991), que se apresentam intercaladas com genes que codificam o quarto

componente do Sistema Complemento (C4A e C4B), todos com a mesma orientação de transcrição (Figura 3). Estes genes estão localizados na região do Complexo HLA classe I e II, (White *et al.*, 1984b; White *et al.*, 1985; Carrol *et al.*, 1985a; Dupont *et al.*, 1977; Dupont *et al.*, 1980; Dunham *et al.*, 1989).

O seqüenciamento destes genes revelou que ambos possuem 3.0 kb, sendo compostos por 10 exons cada (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986) e, embora os genes *CYP21* e *CYP21P* possuam 98% de homologia em seus exons e 96% de homologia em seus íntrons, apenas o *CYP21* é um gene ativo. O gene *CYP21P* é um pseudogene, isto é, não produz proteínas funcionais, como consequência de várias mutações deletérias adquiridas (White & Cawford, 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).

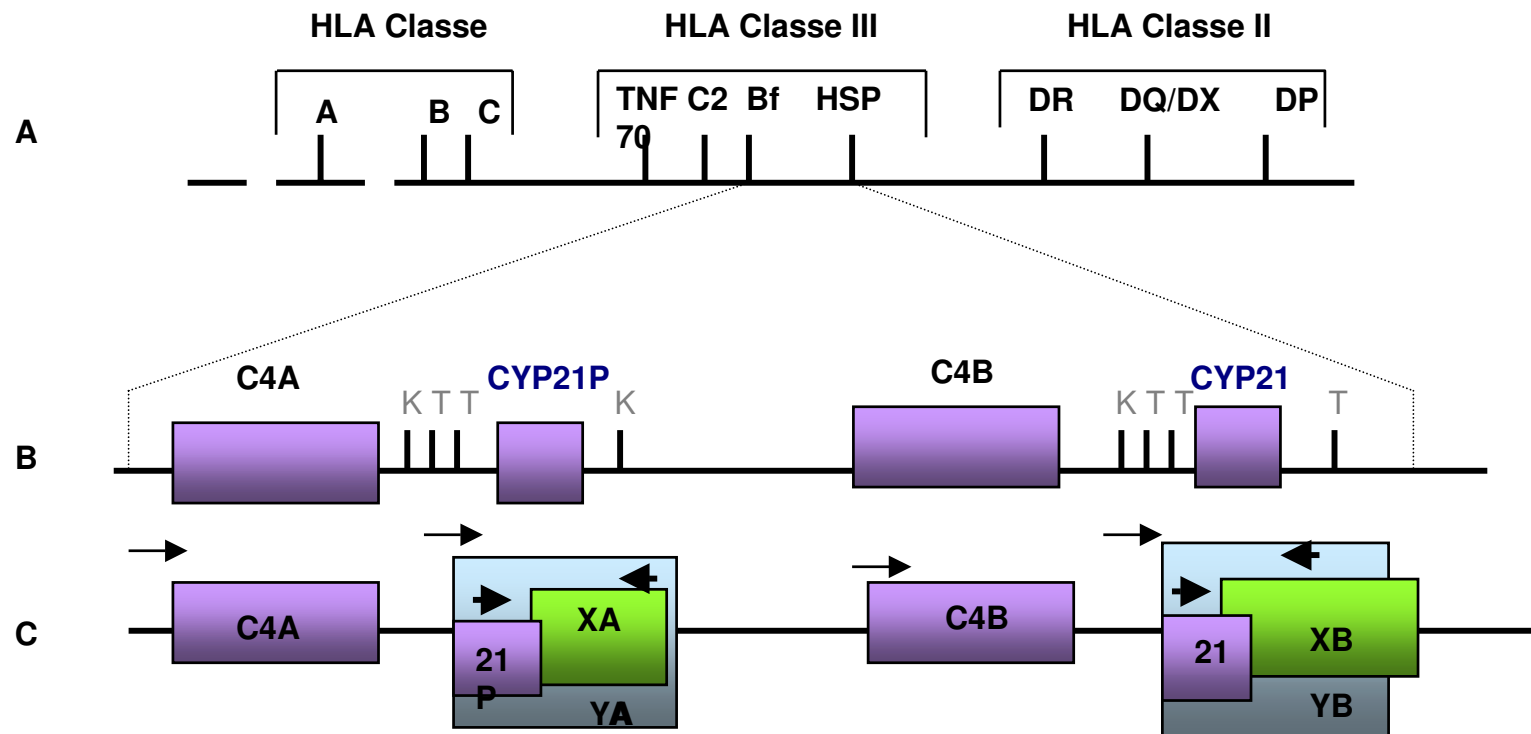


Figura 3: Mapa do braço curto do cromossomo 6, representativo do sistema HLA e do complexo gênico da enzima 21- hidroxilase. **A.** Genes principais do sistema HLA classes I, II, III. **B.** Organização dos genes C4 e CYP21. T-sítio de restrição Kpn I. Baseado em Araujo, 1996. **C.** Representação dos genes X,Y e Z, mapeados no complexo gênico da 21-hidroxilase.

As setas indicam o sentido de transcrição dos genes. Baseados em Tee *et al.*, 1995a.

As primeiras mutações descritas no pseudogene incluem uma deleção de oito pares de base no exon 3 e a inserção de uma base no exon 7, que causam um ‘frameshift’ (mudança no quadro de leitura) e ainda uma substituição de uma base no exon 8 (Higashi *et al.*, 1986). A organização dos genes *C4* e *CYP21* formam duas unidades de 30 kb, *C4A/CYP21P* e *C4B/CYP21*, sugerindo uma duplicação em tandem (White *et al.*, 1985), mas unidades individuais podem ter até 33 kb (unidades longas) ou 26,5 kb (unidades curtas), em consequência de um polimorfismo no gene *C4B* (Paldostir *et al.*, 1987). Além dos genes citados acima, foi demonstrada a existência de dois genes adicionais neste complexo, que estão situados na fita oposta do DNA, sobrepondo-se aos terminais 3’ dos genes *CYP21* e *CYP21P* ambos com orientação de transcrição contrária (figura 3C). Estes genes são denominados de *XB* e *XA*, sendo que *XB* é um gene de 65 kb que codifica um membro da família de proteínas de matriz, a tenascina-X (TN-X) (Gitelman *et al.*, 1992; Bristow *et al.*, 1993; Tee *et al.*, 1995b).

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

A presença de cópias gênicas no gene da 21-hidroxilase, duplicadas e altamente homólogas entre si, aumenta a probabilidade de pareamento e “crossing-over” desigual durante a metáfase meiótica. Essas seqüentes recombinações por ‘crossing-over’ dentro dos genes *CYP21* e *CYP21P* mal emparelhados são capazes de gerar gametas portadores de cromossomos com números desiguais de cópias de *CYP21* ou *CYP21P* (deleções ou duplicações gênicas) ou genes híbridos não funcionais, cujas variações fenotípicas dependendo do ponto de rearranjo. (White *et al.*, 1987a; Rumbsy *et al.*, 1986; Rumbsy *et al.*, 1988; Sinnott *et al.*, 1990). A alta proporção de recombinações observada entre os alelos responsáveis pela deficiência da 21-hidroxilase sugere que estes genes contenham um ou mais pontos de alta frequência de recombinação (‘Hotspots’) (Tsié-Luna *et al.*, 1995).

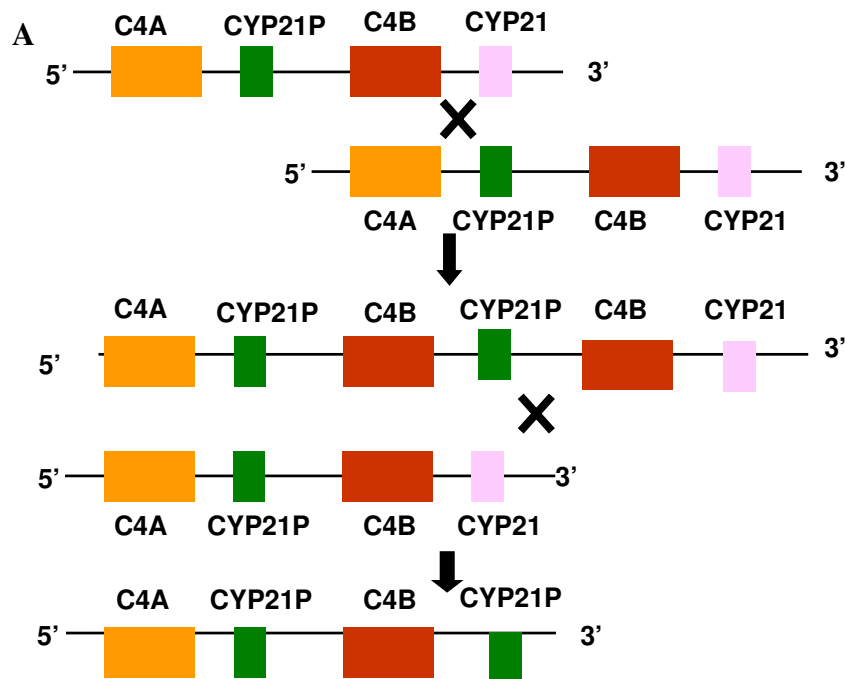
Estudos populacionais demonstraram que a deleção do gene *CYP21* estava presente em apenas 30% dos alelos de indivíduos afetados, entre europeus, norte americanos e japoneses (Carrol *et al.*, 1985b; Harada *et al.*, 1987). No caso de mexicanos e sul americanos, essa porcentagem é ainda mais baixa (10%) (Tusié-Luna *et al.*, 1996; Dardis *et al.*, 1997; Araujo *et al.*, 1996, Paulino *et al.*, 1999; Bachega *et al.*, 1998).

A deficiência da 21-hidroxilase também pode ser determinada por eventos de conversão gênica, definida como transferência de uma sequência de um gene para outro, sendo que o gene doador permanece inalterado e não há perda de material genético (Kourilsky, 1986). Os eventos de conversão gênica têm extensões variáveis, podendo abranger desde pequenas porções (microconversão) até a totalidade do gene (conversão gênica em larga escala) (Higashi *et al.*, 1988a). O termo conversão gênica foi cunhado para um fenômeno observado em leveduras e no tocante a 21-hidroxilase, refere-se ao surgimento de mutações ou polimorfismos típicos de *CYP21P* no gene *CYP21*.

Uma das hipóteses para explicar o mecanismo de conversão gênica entre esses genes é a ocorrência de dois eventos de “crossing-over” desigual entre as fitas emparelhadas incorretamente (figura 4A). Com isso, primeiramente, teríamos a formação de um cromossomo com duplicação do *CYP21P* e posteriormente, em um segundo “crossing-over”, ocorreria a eliminação do *CYP21*, resultando em um alelo com duplicação do pseudogene. Entretanto, o “crossing-over” pode ocorrer apenas uma vez em outro pontos da unidade 30 kb, gerando duplicações e deleções de todos os 4 genes envolvidos, *C4A/CYP21P* e *C4B/CYP21*, assim como a formação de genes híbridos.

Outra hipótese para explicar o mecanismo de conversão gênica aplicada ao caso da enzima 21-hidroxilase, envolveria a atuação de enzimas do sistema de reparo. Após o pareamento desigual entre as duas cópias gênicas durante a meiose, uma fita simples de um cromossomo invade o outro e enzimas envolvidas nos sistemas de reparo reconheceriam as bases erradas e efetuariam a correção, tomando como molde uma das fitas (“mismatch repair”) (figura 4B). (Werkmeister *et al.*, 1896; Higashi *et al.*, 1988a; Urabe *et al.*, 1990; Strachan, 1990; Strachan, 1994).

O mecanismo molecular mais freqüentemente envolvido na produção de alelos afetados, responsável pela causa da maioria dos casos de deficiência da 21-hidroxilase é a microconversão gênica, que ainda não está completamente esclarecido (Harada *et al.*, 1987; Helmberg, 1993) e refere-se ao surgimento de mutações ou polimorfismos típicos de *CYP21P* no gene *CYP21* (Higashi *et al.*, 1986).



B

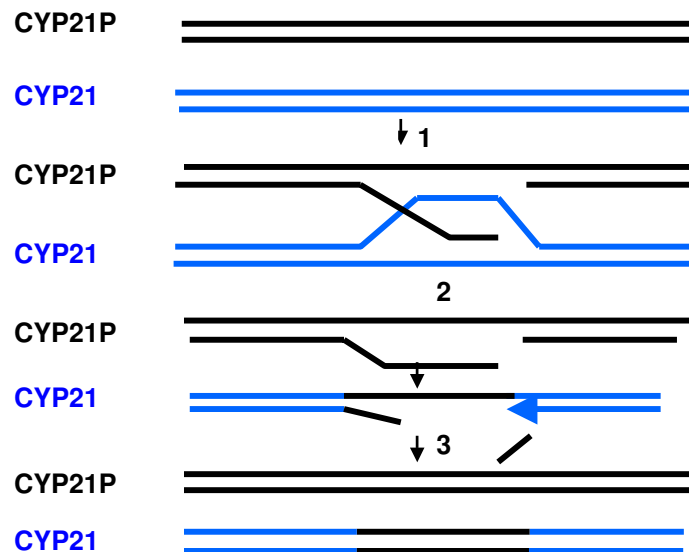


Figura 4: Mecanismos de conversão gênica. **A.** Duplo “crossing over” , após pareamento desigual na meiose, dois eventos de “crossing over” sucessivos ocorrem nas posições indicadas (X), gerando alelos com números desiguais de cópias de cada gene. **B.** Pareamento desigual que ocorre durante a meiose (1), enzimas envolvidas no sistema de reparo reconhecem o pareamento errado (2) e efetuam a correção (3).

7. Mutações Pontuais e Microconversões

As mutações de ponto no gene da enzima 21-hidroxilase são a causa mais freqüente de HAC nas formas clássicas e não clássicas (Higashi *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992a; Wilson *et al.*, 1995a; Ezquieta *et al.*, 1995) e incluem pequenas deleções, inserções e substituições pontuais de nucleotídeos presentes no pseudogene, sendo consideradas microconversões (Globerman *et al.*, 1988; Higashi *et al.*, 1988a; Mornet *et al.*, 1991). As mutações pontuais pré-existentes no pseudogene são detectadas por diversos métodos, como a amplificação seletiva do gene *CYP21* por PCR, seguida de hibridização com oligonucleotídeos alelo-específicos (ASOH) ou PCR alelo-específico (Collier *et al.*, 1989; Partanen *et al.*, 1989; Strachan e White, 1991).

A microconversão ou conversão gênica em pequena escala é responsável por 65 a 90% dos alelos afetados (Mornet *et al.*, 1991; Owerbach *et al.*, 1992; Paulino *et al.*, 1999, Kapelari *et al.*, 1999). Quando transferidas por conversão gênica para o *CYP21* nove das mutações encontradas no gene *CYP21P* causam danos em diversos graus à função enzimática normal e conseqüentemente à gravidade do fenótipo do afetado (Tabela 1).

Dentre as alterações nucleotídicas capazes de provocar danos à atividade enzimática, as deleções, mutações do tipo “frameshift” e mutações “nonsense” (substituição de nucleotídeos que criam códon de terminação- ‘stop codon’) estão entre as mutações capazes de alterar drasticamente a estrutura e função da proteína, chegando até a inativar a ação da enzima. Estas estão associadas à forma mais grave da doença, a forma perdedora de sal (Tusie-Luna *et al.*, 1990). (tabela 1).

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

Tipo	Mutação/nt ^b	E/I ^c	Efeito	Atividade 21-OH(%) ^d	Incidência Média ^e	Forma Clínica
P30L	89 C→T	E1	“missense”	30-60	2,2	NC
Sp2	656 A/C→G	I2	“splicing”	< 5	27,9	VS-PS
Δ8	Deleção 8pb	E3	“frameshift”	0	2	PS
I172N	1001 T→A	E4	“missense”	1	13	VS
CL6	L236N/V237Q/M 239K	E6	“missense”	0	—	PS
V281L	1685 G→T	E7	“missense”	20-50	8	NC
Q318X	1996 C→T	E8	“nonsense”	0	6	PS
R356W	2110 C→T	E8	“missense”	0	7	PS

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

Recentemente, têm-se descrito várias mutações em 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). Cabe ressaltar, que existem polimorfismos entre alelos de *CYP21P* não descritos e que algumas mutações no gene *CYP21* podem ter sido originadas por processos de microconversões 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 da enzima e com a forma clássica PS, enquanto que mutações ‘missenses’ resultam em variabilidade do fenótipo, dependendo da importância funcional do aminoácido alterado.

8. Correlação genótipo- fenótipo

As mutações podem ser relacionadas com as diferentes formas clínicas da deficiência da 21-hidroxilase, perdedora de sal, virilizante simples e não clássica (figura 5). Consideradas independentemente, diversas mutações associam-se a diferentes graus de atividade enzimática e, conseqüentemente, à severidade do fenótipo do indivíduo portador da deficiência. Levando-se em conta a heterozigose com duas mutações diferentes, o fenótipo dever ser deduzido por aquela que determinar menor dano à atividade enzimática. Desta maneira, a forma clínica PS seria determinada pela combinação de duas mutações graves, a forma VS por uma mutação grave e uma intermediária ou por duas intermediárias e a não clássica por duas mutações brandas ou uma branda combinada com uma grave ou intermediária (Miller, 1991b; Mornet *et al.*, 1991).

Esta correlação, entretanto, não é absoluta, sendo descritos vários casos de indivíduos que apresentam determinado fenótipo e são portadores de mutações normalmente não relacionadas a ele (Mornet *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992; Wedell *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1995). A mutação Sp2, para a forma clássica perdedora de sal, e a mutação V281L, estão entre as mutações que apresentam uma maior discrepância da correlação genótipo/fenótipo (Wilson *et al.*, 1995; Schulze *et al.*, 1995; Kohn *et al.*, 1995; Bormann *et al.*, 1992).

Casos de indivíduos afetados com fenótipos e genótipos discordantes podem ser devido à presença de mutações espontâneas ainda não identificadas que estejam ocorrendo no mesmo alelo em que haja mutações já identificadas.

A discrepância genotípica-fenotípica ocorre principalmente, devido a presença de heterozigose composta. Adicionalmente, 20% dos indivíduos heterozigotos apresentam uma terceira mutação em um dos alelos estudados. (Speiser *et al.*, 1992; Wedell e Luthman, 1993; Wilson *et al.*, 1995; Kohn *et al.*, 1995; Bornann *et al.*, 1992).

Em casos de discordância do fenótipo entre irmãos portadores do mesmo genótipo, como os descritos por Tajima *et al.* (1993) e Bornann *et al.* (1992), esta discrepância pode ser explicada 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.

Outro fator sugerido para explicar essa disparidade genótipo/fenótipo é a presença de possíveis anormalidades na sequência reguladora e promotora do gene, bem como as atividades de fatores de transcrição, transporte de proteínas entre outros, presentes somente nas condições *in vivo*. Porém, ainda pouco se sabe sobre a regulação do gene *CYP21* e nenhuma alteração na região promotora deste gene foi descrita (Wilson *et al.*, 1995).

Outro fator a se considerar é uma possível atividade da 21-hidroxilase extra-adrenal (Miller e Morel, 1989; Speiser *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1997), sugerindo que estas fontes de atividade da enzima extra-adrenal poderiam compensar a gravidade do fenótipo da HCA.

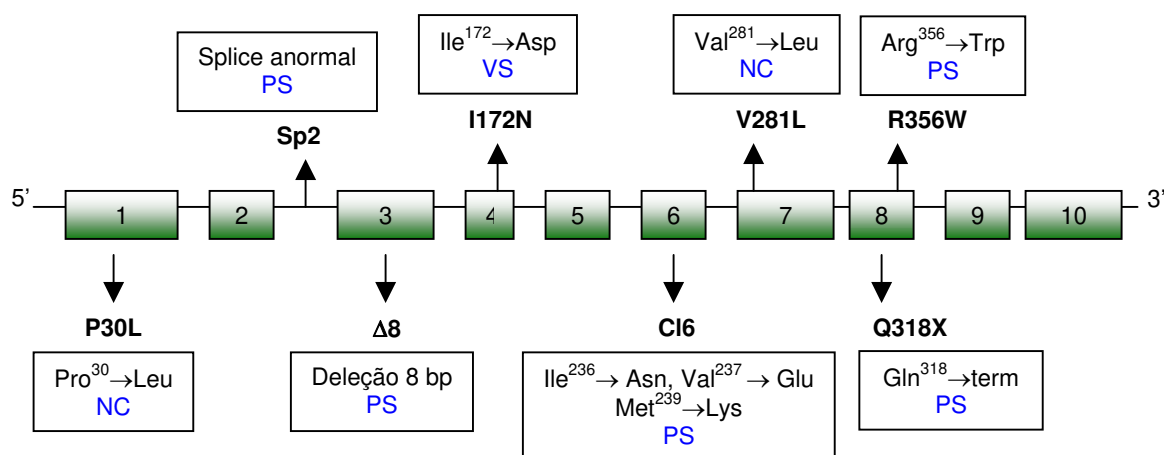


Figura 5: Mutações e suas respectivas manifestações no fenótipo. PS- perdedor de sal; VS- virilizante simples; NC-não clássica.



OBJETIVOS

- ❖ Delinear o perfil do complexo gênico da enzima 21-hidroxilase em famílias provenientes da região de Ribeirão Preto, com pelo menos um membro portador de HC por deficiência da enzima 21-hidroxilase.
- ❖ Determinar a frequência das mutações de ponto (microconversões) no gene *CYP21*.
- ❖ Estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo dos indivíduos afetados.



MATERIAIS E MÉTODOS

1. Casuística

Foram estudadas 45 famílias que possuem pelo menos um membro portador de Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da 21-hidroxilase, formas clássica e não clássica, e 5 pacientes isolados, acompanhados no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

O grupo de pacientes constituiu-se de 20 indivíduos portadores da forma clássica perdedora de sal, 17 da forma clássica virilizante simples e 13 da forma não clássica de deficiência de 21-OH. O diagnóstico laboratorial da deficiência de 21-OH foi realizado através da dosagem de 17-hidroxiprogesterona, androstenediona, testosterona e da realização de cariótipo em pacientes do sexo feminino com genitália ambígua. A forma não clássica foi diagnosticada através do teste de estímulo com ACTH 1-24 exógeno (Cortrosina 250ug EV), com valores de corte para 17-hidroxiprogesterona plasmática após estímulo acima de 2000 ng/dl.

2. Coleta das Amostras

A coleta de amostras de sangue dos pacientes, e de seus familiares foi realizada junto ao Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto-USP. Foram coletados 10 ml a 20 ml de sangue periférico, em tubos estéreis contendo EDTA (etilenediaminotetracetato dissódico.2H₂O) 10% como agente anti-coagulante.

3. Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico a partir de sangue total foi realizada de acordo com método padronizado, que tem por princípio a lise dos leucócitos com Proteinase K e extração do DNA com fenol- clorofórmio –álcool isoamílico (Araújo et al., 1996).

Em um tubo Falcon de 50 ml, foram adicionados 15 ml de sangue total e completado o volume, lentamente, com a solução A, responsável pela lise de hemácias. O tubo contendo a amostra ficou submerso em gelo por 30 minutos. A amostra foi

centrifugada por 15 min. a 2.000 rpm, 4°C. Desprezou-se cuidadosamente o sobrenadante e o precipitado

Tris-HCl pH 8,0	20 mM
-----------------	-------

Solução C (a ser preparada no momento do uso)

[] Final

Solução B	0,5X
-----------	------

SDS	5%
-----	----

Proteinase K	1 mg/ml
--------------	---------

4. Amplificação por Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) Alelo- Específico.

A PCR alelo- específico foi utilizada para estudar as 7 mutações mais frequentes associadas à Hiperplasia Adrenal Congênita por deficiência da enzima 21- hidroxilase (Tabela 2), sendo este método mais prático e de escolha para detecção dessas

Os primers para a seleção das mutações, utilizados neste trabalho, foram descritos por Wilson *et al* (1995) e estão representados na tabela 3. Para cada sítio de mutação em questão realizamos duas reações de PCR: Uma reação detecta o alelo normal e a outra detecta o alelo mutante. Cada reação continha um “primer” comum a ambas reações, específico para o gene *CYP21*. Os “primers” normal e mutante diferiam em seu nucleotídeo terminal 3’ que coincidia com o sítio da possível mutação.

Para identificação das mutações pontuais até o éxon 4 (figura 6A) utilizou-se o “primer” antissense Ex6na como âncora em conjunto com os pares de “primers” sense normais e mutantes referente a cada mutação (figura 6B). Para identificação das mutações até o exon 8 foi utilizado como âncora o “primer” Ex6ns, em conjunto com os pares de “primers” sense normais e mutantes referente a cada mutação (figura 6 B). Quando a amostra foi homozigota normal de para o sítio em análise, foi gerado um produto de PCR apenas na reação que continha o “primer” normal. Por outro lado, se a amostra foi

homozigota mutante, foi gerado um produto de PCR apenas na região que utilizou o “primer” mutante. Se, entretanto, a amostra foi heterozigota, houve amplificação do produto de PCR em ambas as reações. Utilizamos como controles positivos da reação o DNAs com as respectivas mutações, que foram gentilmente cedidos pela Dr^a. Maricilda Palandi Mello.

As condições específicas de cada reação de amplificação dos fragmentos de DNA do gene mais freqüentes estão apresentadas, em detalhe, a seguir.

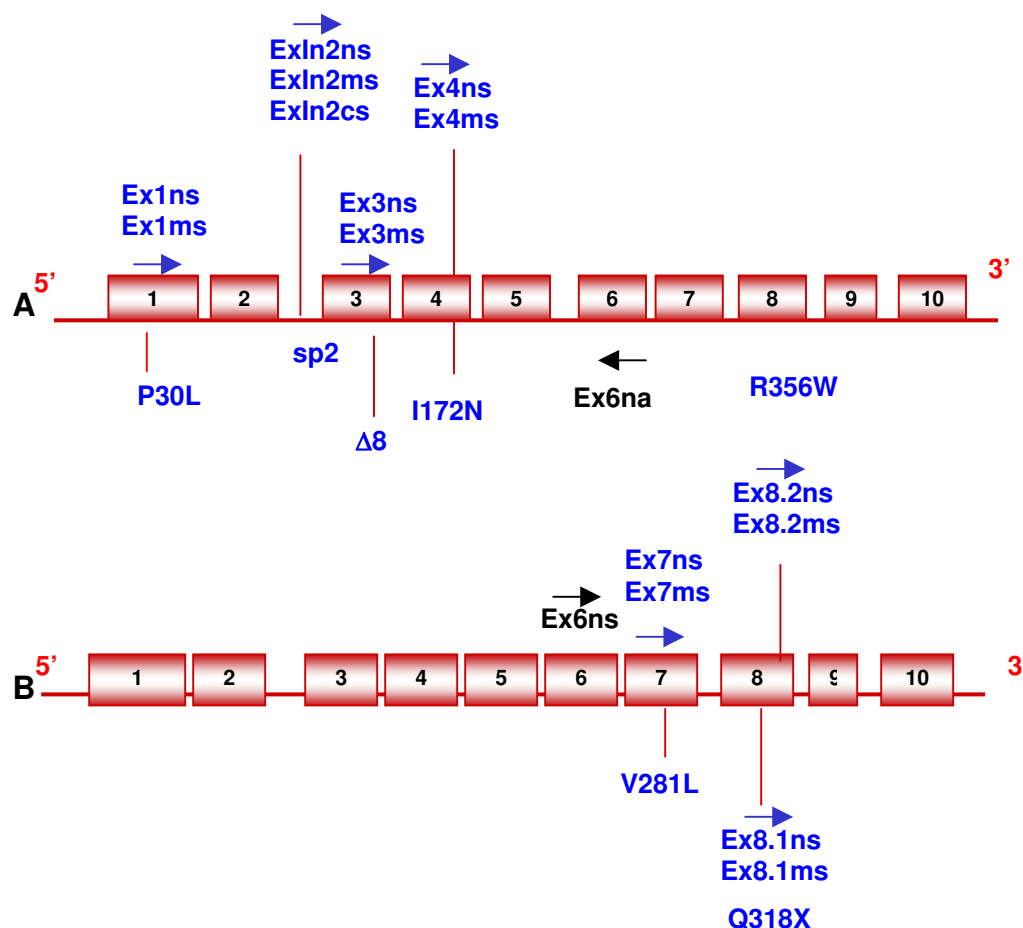


Figura 6: Estratégia da PCR alelo-específico para identificação das mutações pontuais.

A- Alelos com mutação até o éxon 4; **B-** alelos com mutações até o éxon 8. Os quadros representam os éxons e a linha os íntrons. As setas indicam o sentido dos “primers”. **a:** antissense e **s:** sense. Os primers estão demonstrados sobre as setas e as mutações abaixo de cada éxon.

Tabela 2: Primers utilizados nas PCRs Alelo-específico para detecção das mutações acima citadas.

Mutação	Exon	Sequência	Referência
I 172 N	Ex 4ns	5'-TCCTCACCTgCAGCATCAT-3'	Amor et al. (1998)
	Ex 4ms	5'-CTCTCCTCACCTgCAGCATCAA-3'	
$\Delta 8$	Ex 3ns	5'-CggACCTgTCCTTgggAgACTAC-3'	White et al. (1994)
	Ex 3ms	5'-ACTACCCggACCTgTCCTTggTC-3'	
R356W	Ex 8.2na	5'-CTAAgggCACAACgggCCg-3'	Chiou et al. (1990)
	Ex 8.2ma	5'-CTAAgggCACAACgggCCA-3'	
Q318X	Ex 8.1na	5'-TTCgTggTCTAgCTCCTCCTg-3'	Globerman et al. (1998)
	Ex 8.1ma	5'-AgTTCgTggTCTAgCTCCTCCTA-3'	
P30L	Ex 1ns	5'-TCCggAgCCTCCACCTCCC-3'	Speiser et al. (1992)
	Ex 1ms	5'-TCCggAgCCTCCACCTCCT-3'	
IVS2, A/C>G,- 12	In2ns	5'-TTCCCACCCTCCAgCCCCAA-3'	Tajima et al. (1997)
	In2ms	5'-TTCCCACCCTCCAgCCCCAg-3'	
Sp 2	In2cs	5'-TTCCCACCCTCCAgCCCCAC-3'	
Cluster	Ex 6na	5'-AgCTgCATCTCCACgATgTgA-3'	
	Ex 6ns	5'-gAgggATCACATCgTggAgATG-3'	
V281L	Ex 7na	5'-TCCACTgCAGCCATgTgCAC-3'	Speiser et al. (1998)
	Ex 7ns	5'-TCCACTgCAGCCATgTgCAA-3'	

5. Condições das PCRs alelo-específico

5.1. Mutação P30L

O primer Ex6na foi utilizado como primer antisense e âncora para ambas as reações de amplificação, tanto do alelo normal (primer sense Ex1ns), quanto do alelo mutado (primer sense Ex1ms). As concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR, estão apresentadas abaixo.

DNA (1 µg)	1.0 µl
Tampão Gibco 10X	3.0 µl
MgCl ₂	0.8 µl
dNTP (2mM)	2.5 µl
Primer Ex 1ns / Ex 1ms (20 pmol/µl)	1.0 µl
Primer Ex 6na (20 pmol/µl)	1.0 µl
BSA 0,01%	0.3 µl
Taq	0.2 µl
Água	20.2 µl
Volume final das reações	30 µl

As condições da PCR foram 1 ciclo de 5 minutos a 94°C para desnaturação inicial; 5 ciclos iniciais de 94°C por 5 minutos, 72°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por 10 minutos. Mais 30 ciclos de 94°C por 5 minutos, 72°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por 4 minutos. E um ciclo final para extensão de 72°C durante 10 minutos.

O produto amplificado pela PCR foi verificado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e visualizado no transiluminador ultra-violeta (UV).

5.2. Mutação IVS2, A/C>G,-12 (Sp2)

O primer Ex6na foi utilizado como primer antisense e âncora para as reações de amplificação, tanto do alelo normal (primer sense Ex1n2ns), o alelo polimórfico (primer sense Ex1n2cs), quanto o alelo mutado (primer sense Ex1ms). As concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR estão apresentadas abaixo.

DNA (1 µg)	1.0 µl
Tampão Gibco 10X	3.0 µl
MgCl ₂	0.9 µl
dNTP (2mM)	2.5 µl
Primer Ex 1n2ns ou Ex 1n2cs ou Ex 1n2ms (20 pmol/µl)	1.0 µl
Primer Ex 6na (20 pmol/µl)	1.0 µl
BSA 0,01%	0.3 µl
Taq	0.2 µl
Água	20.1 µl
Volume final das reações	30 µl

As condições da PCR foram 1 ciclo de 5 minutos a 94°C para desnaturação inicial; 5 ciclos iniciais de 94°C por 5 minutos, 72°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por 10 minutos. Mais 30 ciclos de 94°C por 5 minutos, 72°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por 4 minutos. E um ciclo final para extensão de 72°C durante 10 minutos.

O produto amplificado pela PCR foi verificado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e visualizado no transiluminador ultra-violeta (UV).

5.3. Mutação 706_713del8 ($\Delta 8$)

O primer Ex6na foi utilizado como primer antisense e âncora para ambas as reações de amplificação, tanto do alelo normal (primer sense Ex3ns), quanto do alelo mutado (primer sense Ex3ms). As concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR estão apresentadas abaixo.

DNA (1 μ g)	1.0 μ l
Tampão Gibco 10X	3.0 μ l
MgCl ₂	0.9 μ l
dNTP (2mM)	2.5 μ l
Primer Ex 3ns ou Ex 3ms (20 pmol/ μ l)	1.0 μ l
Primer Ex 6na (20 pmol/ μ l)	1.0 μ l
BSA 0,01%	0.3 μ l
Taq	0.2 μ l
Água	20.1 μ l
Volume final das reações	30 μ l

As condições da PCR foram 1 ciclo de 5 minutos a 94°C para desnaturação inicial; 5 ciclos iniciais de 94°C por 5 minutos, 70°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por 10 minutos. Mais 30 ciclos de 94°C por 5 minutos, 70°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por 4 minutos. E um ciclo final de 72°C durante 10 minutos.

O produto amplificado pela PCR foi verificado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e visualizado no transiluminador ultra-violeta (UV).

5.4. Mutação I172N

O primer Ex6na foi utilizado como primer antisense e âncora para ambas as reações de amplificação, tanto do alelo normal (primer sense Ex4ns), quanto do alelo mutado (primer sense Ex4ms). As concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR estão apresentadas abaixo.

DNA (1 µg)	1.0 µl
Tampão Gibco 10X	3.0 µl
MgCl ₂	0.9 µl
dNTP (2mM)	2.5 µl
Primer Ex 4ns ou Ex 4ms (20 pmol/µl)	1.0 µl
Primer Ex 6na (20 pmol/µl)	1.0 µl
BSA 0,01%	0.3 µl
Taq	0.2 µl
Água	20.1 µl
Volume final das reações	30 µl

As condições da PCR foram 1 ciclo de 5 minutos a 94°C para desnaturação inicial; 5 ciclos iniciais de 94°C por 5 minutos, 68°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por 10 minutos. Mais 30 ciclos de 94°C por 5 minutos, 68°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por 4 minutos. E um ciclo final para extensão de 72°C durante 10 minutos.

O produto amplificado pela PCR foi verificado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e visualizado no transiluminador ultra-violeta (UV).

5.5. Mutação V281L

O primer Ex6ns foi utilizado como primer sense e âncora para ambas as reações de amplificação, tanto do alelo normal (primer antisense Ex7na), quanto do alelo mutado (primer sense Ex7ma). As concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR estão apresentadas abaixo.

DNA (1 µg)	1.0 µl
Tampão Gibco 10X	3.0 µl
MgCl ₂	0.9 µl
dNTP (2mM)	2.5 µl
Primer Ex 7na ou Ex 7ma (20 pmol/µl)	1.0 µl
Primer Ex 6ns (20 pmol/µl)	1.0 µl
BSA 0,01%	0.3 µl
Taq	0.2 µl
Água	20.1 µl
Volume final das reações	30 µl

As condições da PCR foram 1 ciclo de 5 minutos a 94°C para desnaturação inicial; 5 ciclos iniciais de 94°C por 5 minutos, 68°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por 10 minutos. Mais 30 ciclos de 94°C por 5 minutos, 68°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por 4 minutos. E um ciclo final para extensão de 72°C durante 10 minutos.

O produto amplificado pela PCR foi verificado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e visualizado no transiluminador ultra-violeta (UV).

5.6. Mutação Q318X

O primer Ex6ns foi utilizado como primer sense e âncora para ambas as reações de amplificação, tanto do alelo normal (primer antisense Ex8.1 na), quanto do alelo mutado (primer sense Ex8.1 ma). As concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR estão apresentadas abaixo.

DNA (1 µg)	1.0 µl
Tampão Gibco 10X	3.0 µl
MgCl ₂	0.9 µl
dNTP (2mM)	2.5 µl
Primer Ex 8.1na ou Ex 8.1ma (20 pmol/µl)	1.0 µl
Primer Ex 6ns (20 pmol/µl)	1.0 µl
BSA 0,01%	0.3 µl
Taq	0.2 µl
Água	20.1 µl
Volume final das reações	30 µl

As condições da PCR foram 1 ciclo de 5 minutos a 94°C para desnaturação inicial; 5 ciclos iniciais de 94°C por 5 minutos, 70°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por 10 minutos. Mais 30 ciclos de 94°C por 5 minutos, 70°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por 4 minutos. E um ciclo final para extensão de 72°C durante 10 minutos.

O produto amplificado pela PCR foi verificado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e visualizado no transiluminador ultra-violeta (UV).

5.7. Mutação R356W

O primer Ex6ns foi utilizado como primer sense e âncora para ambas as reações de amplificação, tanto do alelo normal (primer antisense Ex7na), quanto do alelo mutado (primer sense Ex7ma). As concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR estão apresentadas abaixo.

DNA (1 µg)	1.0 µl
Tampão Gibco 10X	3.0 µl
MgCl ₂	0.9 µl
dNTP (2mM)	2.5 µl
Primer Ex 8.2na ou Ex 8.2ma (20 pmol/µl)	1.0 µl
Primer Ex 6ns (20 pmol/µl)	1.0 µl
BSA 0,01%	0.3 µl
Taq	0.2 µl
Água	20.1 µl
Volume final das reações	30 µl

As condições da PCR foram 1 ciclo de 5 minutos a 94°C para desnaturação inicial; 5 ciclos iniciais de 94°C por 5 minutos, 70°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por 10 minutos. Mais 30 ciclos de 94°C por 5 minutos, 70°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por 4 minutos. E um ciclo final para extensão de 72°C durante 10 minutos.

O produto amplificado pela PCR foi verificado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e visualizado no transiluminador ultra-violeta (UV).

Para a realização das amplificações foi utilizado o termociclador GeneAmp PCR System 9600-Perkin Elmer. Todas as reações foram acompanhadas de um controle positivo para cada mutação estudada; o produto de PCR foi aplicado em gel, submetido à eletroforese, observado em transiluminador e fotografado com filme Polaroid®, conforme descrito.

6. “Southern Blotting”

A determinação dos rearranjos gênicos no “cluster” CYP21/C4, como deleções, conversões e duplicações gênicas, foi feita através de “Southern Blotting”. A análise da variação numérica dos genes *CYP21* e *C4* foi realizada pela comparação da intensidade das bandas obtidas pelo “Southern Blotting” com a enzima *Taq I* e hibridação com sondas de *CYP21* e *C4*.

O DNA genômico (10 µg) foi digerido com a enzima *Taq I* (10U) em 150 µl de tampão de reação 1X seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante da enzima. As reações foram incubadas em banho a 65°C “overnight”. Após a reação, o DNA foi precipitado com 0,1 volume de acetato de sódio 3M, pH 5.2 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado, por 18 horas a -20°C. Após esse período essa solução contendo o DNA foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos em microcentrifuga e o precipitado do DNA foi lavado com etanol 70%. Após nova centrifugação o DNA foi ressuspensão em 15 µl de TE, separa em gel de agarose e fotografado.

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

6.1. Sondas utilizadas

A sonda para detecção do gene *CYP21* e *C4* (pC21/3c) foram gentilmente cedida pela Dr^a. Maricilda Palandi Mello, a sonda para *CYP21*, corresponde ao cDNA de *Cyp21* (2kb), isolado das glândulas adrenais humanas e clonado em sítio *BamH I*, no vetor pcD. A sonda correspondente ao gene *C4* do Sistema Complemento é um fragmento de

cDNA (550pb) correspondente à região 5' do gene, clonado nos sítios *BamH* I e *Kpn* I no vetor pTZ18B.

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

Os filtros lavados foram expostos a filmes de raios-X (Hyperfilm MP-Amersham) em cassetes de exposição contendo intensificador de sinal (“Lightning Plus” da Dupont), a -70°C, por períodos variáveis. Após um período mínimo de 14 horas, os filmes foram revelados e lavados. A sonda foi removida dos filtros incubando os mesmos em solução Tris-HCl 5 mM, pH 8,0 0,004% de EDTA e 0,1% de SDS, a 100°C, até que a solução atingisse a temperatura ambiente. Os filtros lavados foram selados em saco plástico e armazenados a 4°C, sendo posteriormente re-hibridizados.

7. Metodologia para comparação do genótipo com o fenótipo.

A comparação do genótipo com o fenótipo foi realizada nos pacientes com mutações identificadas em ambos os alelos. O genótipo foi comparado com a forma de apresentação clínica da HCA por deficiência da enzima 21-hidroxilase, previamente estabelecida no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, onde ficou estabelecido o grau de virilização da genitália externa do paciente, segundo a classificação de Prader. A comparação foi baseada, também, no valor da 17-OHP basal na forma clássica e após estímulo com ACTH sintético, na forma

não clássica, além da comparação com valores basais de androstenediona e testosterona, no momento do diagnóstico e na ausência de medicação.

Os genótipos foram dividido em três grupos, de acordo com a atividade enzimática da mutação, como previamente já descrito (Speiser *et al.*, 1992).

Grupo A: compreendeu os genótipos com mutações que conferem atividade enzimática de 0 a 2% em ambos os alelos (Sp2, Δ 8, Q318X, R356W, além de deleção do *CYP21* e grande conversão gênica).

Grupo B: compreendeu os genótipos com a mutação I172N, que confere atividade enzimática ao redor de 3% em homozigose ou mutações em heterozigose composta com mutações do grupo A.

Grupo C: compreendeu os genótipos com mutações que conferem atividade enzimática maior que 18% (P30L e V281L), em homozigose ou em heterozigose composta. A presença de heterozigose composta com mutações dos grupos A ou B também pertenceu a este grupo.



RESULTADOS

1. Hiperplasia adrenal congênita: análise da frequência das mutações

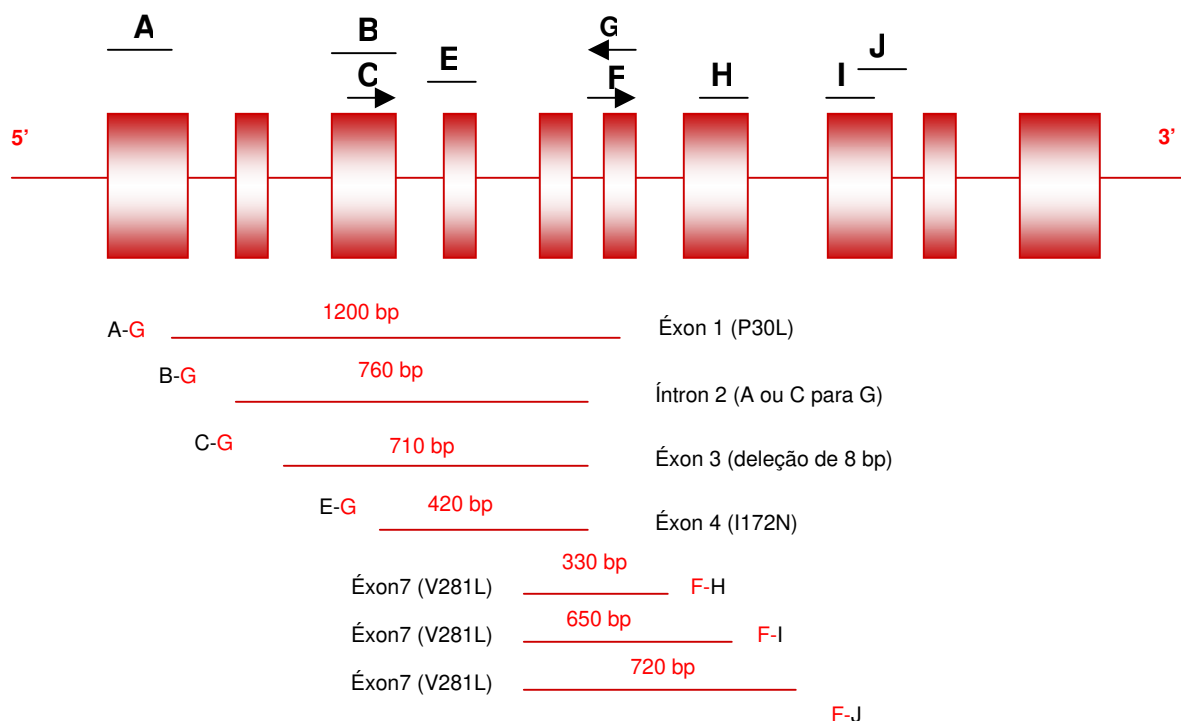
As mutações testadas, por PCR alelo-específico, correspondem a seqüências normalmente presentes no pseudogene que são transferidas para o gene ativo, provavelmente, devido a processos de microconversões entre as duas seqüências gênicas.

Para averiguar a presença das microconversões nos pacientes e em seus familiares, o gene *CYP21* foi amplificado por PCR através de primers seletivos de acordo com as mutações mais freqüentemente associadas a HCA por deficiência da enzima 21-hidroxilase. Estas mutações são as seguintes: P30L, IVS2,A/C>G,-12 (Sp2), 706_713del8 (Δ 8), I172N, V281L, Q318X, R356W (figura 7A). Já os casos onde ocorrem conversões, duplicações ou deleções gênicas devem ser estabelecidos pelo “Southern Blotting” através da hibridização com sondas *CYP21* e *C4* (figura 7B).

1.1. Hiperplasia adrenal congênita forma não clássica

Mutações originadas por processos de microconversões nos alelos provenientes dos dois progenitores foram identificadas nas 13 famílias com a forma não clássica da HCA estudadas. Foram analisados 26 alelos afetados, sendo que desses 26 alelos, 3 foram deduzidos pelo padrão de segregação familiar. A mutação V281L foi encontrada em 15 (57,7%) alelos, a mutação P30L foi encontrada em 1 (3,8%) alelo, a mutação R356W em 2 alelos (8,3%), a mutação I172N ocorreu juntamente com a mutação P30L e V281L, respectivamente em 2 alelos afetados, além da presença de 1 alelo com conversão também associado à V281L. A tabela 4 mostra os genótipos para essas famílias.

A.



B

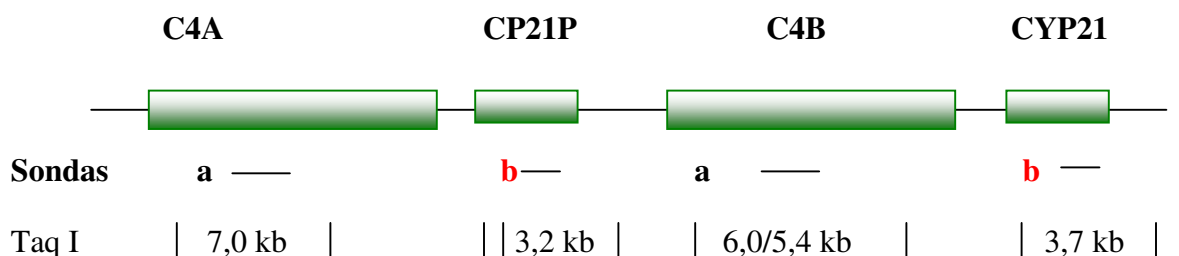


Figura 7: A. Representação esquemática do gene *CYP21* e da localização relativa dos “primers” utilizados para amplificação da PCR alelo-específico. Os retângulos representam os éxons de 1 a 10. A -J representam os “primers” utilizados para o PCR alelo específico do gene *CYP21* (tabela 3). C, D, F e G são “primers” específicos para o gene *CYP21*; a orientação dos “primers” é dada pelo sentido das setas. A, B, E, H, I, e J são pares de “primers” normal e mutante. Os tamanhos dos fragmentos originados pela PCR alelo-específico estão representados abaixo das linhas.

B. Representação esquemática dos sítios de restrição da enzima taq I nos genes *C4* e *CYP21*. Fragmentos de 3,7 kb e 3,2 kb correspondem a *CYP21* e *CYP21P*, respectivamente; o fragmento de 7,0 kb refere-se a *C4A*, enquanto os fragmentos de 6,0 kb e 5,4 kb a *C4B*. Barras simbolizam as sondas *C4B* 550, para os genes *C4* (a) e pC21/3c (b), para 21-hidroxilase.

Tabela 3: Pacientes com HCA por deficiência da 21-hidroxilase forma não clássica (NC), seus familiares e os respectivos alelos mutados.

Família	Paciente	Alelo Paterno^(a)	Alelo Materno^(a)	Tipos de mutação e Genótipo esperado
1	1NC*	V281L (por dedução)	V281L	C/C – NC
2	2NC	R356W	V281L	A/C - NC
3	3NC*	V281L+dupl (<i>CYP21P+C4B</i> [5,4])	V281L+dupl (<i>CYP21P+C4B</i> [5,4])	C/C - NC
4	4NC	V281L	V281L	C/C - NC
5	5NC	R356W (por dedução)	V281L	A/C - NC
6	6NC*	V281L (por dedução)	V281L+Dupl (<i>CYP21P+C4B</i> [5,4]) +conv <i>CYP21P/CYP21</i>	C/C - NC
7	7NC	?	V281L + I172N	?/C -
8	8NC*	V281L (por dedução)	V281L+Dupl (<i>CYP21P+C4B</i> [5,4])	C/C - NC
9	9NC	?	P30L + I172N	?/C -
10	10NC*	?	V281L+dupl (<i>CYP21P+C4B</i> [5,4])	?/C -
11	11NC	V281L	?	?/C -
12	12NC*	V281L+ dupl (<i>CYP21P+C4B</i> [5,4])	?	?/C -
13	13NC	P30L	?	C/?

(a) Resultados obtidos pela análise das 7 mutações mais frequentemente associadas a HAC.* Famílias submetidas ao estudo por “Southern Blotting”. NC: fenótipo não clássico. C: grupo de mutação que acarretam leve alteração enzimática. A: grupo de mutações que acarretam grave alteração enzimática. (b) alelo sem estudo de segregação familiar.

Os pacientes das famílias 3 e 4 apresentaram a mutação V281L em homozigose, sendo que os pais foram estudados e foram heterozigotos da mesma mutação

Os pacientes das famílias 1 (Figura 8), 6 e 8 herdaram o alelo com a mutação V281L da mãe. Não foi possível estudar os alelos paternos desses pacientes. Entretanto, uma vez que os pacientes são homozigotos, por dedução, os pais devem apresentar pelo menos um alelo com a mutação V281L.

Os pacientes das famílias 2 e 5 apresentaram o alelo com a mutação R356W herdado do pai e o alelo com a mutação V281L herdado da mãe.

Nas famílias 7 (figuras 9 A e B) e 9 verificaram-se alelos com mais de uma mutação. A confirmação de que duas mutações identificadas provêm de um mesmo alelo foi possível pelo estudo das famílias completas, onde se observa a segregação dessas mutações. Na família 9, por exemplo, o indivíduo afetado possui alelos com as mutações P30L e I172N, situadas nos exons 1 e 4, respectivamente, herdados da mãe. O pai desse indivíduo foi estudado para a presença de microconversões e nenhuma das 8 mutações mais comuns foi identificada. O outro alelo deverá ter sua determinação por “Southern Blotting” ou sequenciamento.

Os pacientes das famílias 10, 11 e 12 apresentam um alelo com a mutação V281L. O paciente da família 10 herdou este alelo mutado da mãe, enquanto os pacientes das famílias 11 e 12 herdaram do pai. Nestas famílias buscamos detectar as mutações mais frequentes do *CYP21* no outro alelo. Entretanto, nenhuma destas mutações foi encontrada. Esse alelo indeterminado deverá ter, portanto, sua identificação realizada por “Southern Blotting” ou sequenciamento.

Na família 13, apenas o alelo paterno com a mutação P30L foi determinado por PCR alelo-específico. A caracterização genética das mães deste não foi possível pela técnica da PCR alelo-específico. Portanto, os alelos deverão ser determinados por “Southern Blotting”, devido à possibilidade de deleções do gene *CYP21*, ou por sequenciamento direto do gene.

Foi realizado “Southern Blotting” para 6 famílias (1, 3, 6, 8, 10 e 12) com a forma não clássica da HCA por deficiência da 21-hidroxilase. Na família 1 (figura 10), apenas o indivíduo afetado foi analisado por esta técnica e apresentou intensidade de fragmentos inalterados, tanto para *C4* quanto para *CYP21*.

Na família 3 (figura 11), a paciente apresentou duplicação de (*CYP21P+C4B* [5,4]), proveniente tanto do alelo materno quanto do alelo paterno.

Na família 6, a mutação V281L foi encontrada, no alelo materno, em associação com uma duplicação (*CYP21P+C4B* [5,4]) e com uma conversão de *CYP21P/CYP21*, uma vez que a intensidade deste fragmento apresentava uma proporção de 4:1.

Nas famílias 8 e 10 os pacientes apresentavam duplicação (*CYP21P+C4B* [5,4]), proveniente dos alelos maternos.

Na família 12 o paciente apresentou uma duplicação (*CYP21P+C4B* [5,4]), proveniente do alelo paterno.

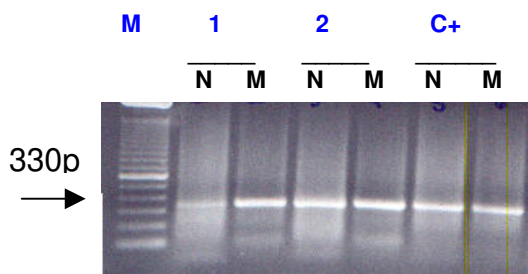
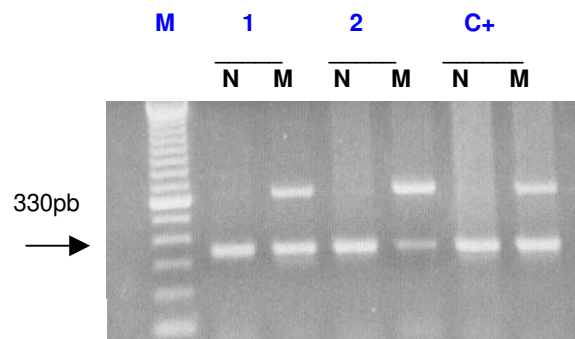


Figura 8: Gel de Agarose 1,0% demonstrando a amplificação por PCR alelo- específico do fragmento de 330 bp da mutação V281L na família 1.

Os números 1 e 2 referem-se ao paciente e sua mãe, respectivamente, M= marcador de peso molecular e C+ = controle positivo para estas mutações. N= primer com sequência normal e M= primer com sequência mutante.

A



B

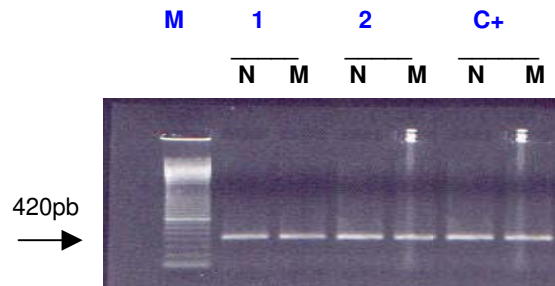


Figura 9: Gel de Agarose 1,0% demonstrando a amplificação por PCR alelo- específico do fragmento de 330 bp da mutação V281L (A) e 420bp da mutação I172N (B) na família 7.

Os números 1 e 2 referem-se ao paciente e sua mãe, respectivamente, M= marcador de peso molecular e C+ = controle positivo para estas mutações. N- primer com sequência normal e M- primer com sequência mutante.

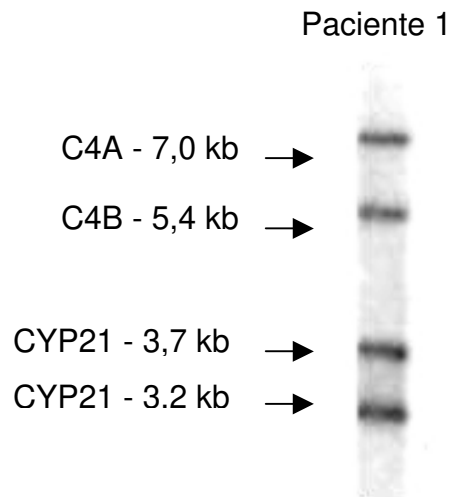


Figura 10: Southern Blotting com a enzima *Taq I* e hibridação com sondas para o gene C4A, C4B e CYP21, da paciente 1NC que apresentou intensidade de fragmentos inalterados tanto para *C4*, quanto para *CYP21*. Os genes correspondentes estão descritos na figura, bem como o tamanho de cada banda.

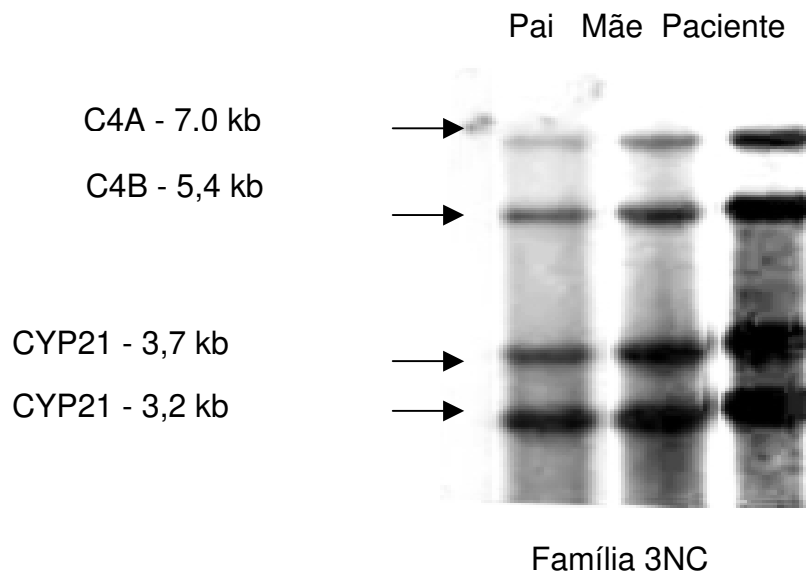


Figura 11: Southern Blotting com a enzima *Taq I* e hibridação com sondas para o gene C4A, C4B e CYP21, da família 3NC. A paciente apresentou uma duplicação de (*CYP21P*+*C4B* [5,4]) proveniente do alelo materno e do alelo paterno. Os genes correspondentes estão descritos na figura, bem como o tamanho de cada banda.

2. Hiperplasia adrenal congênita forma clássica

2.1. Forma virilizante simples

A mesma abordagem metodológica, PCR alelo-específico, foi utilizada para a caracterização genotípica dos pacientes com a forma clássica da HCA por deficiência da enzima 21-hidroxilase. Estudamos 17 famílias (28 alelos afetados) com pelo menos um indivíduo portador da forma clássica virilizante simples. Neste estudo a mutação I172N, a mais freqüentemente associada a esse fenótipo, foi encontrada em 18 alelos (64,2%), a mutação R356W foi encontrada em 2 alelos (7,1%). As mutações R356W e Q318X foram encontradas em 1 mesmo alelo (3,6%) em uma das famílias e a mutação Sp2 e Q318X foram encontradas em um mesmo alelo em 2 famílias (7,1%) com fenótipo virilizante simples. A associação das mutações I172N e Q318X foi encontrada em 1 alelo (3,6%). A tabela 5 mostra os genótipos para essas famílias.

Os pacientes das famílias 2, 6, 10, 12 (Figura 12) e 16 apresentaram a mutação I172N em homozigose, sendo os pais confirmados como heterozigotos para a mesma mutação. A família 8/9 também apresentou a mutação I172N em homozigose, porém o alelo paterno foi considerado afetado para esta mutação por dedução pela segregação da família.

Os pacientes das famílias 4 e 5 apresentaram o alelo com a mutação I172N herdado do pai e o alelo com a mutação R356W herdado da mãe.

Nas famílias 1, 11, 13 e 14/15 verificaram-se alelos afetados com mais de uma mutação. Nas famílias 1 (figura 13 A, B, C) e 14/15, os indivíduos afetados possuem alelos com as mutações Sp2/Q318X herdadas das mães e alelos com a mutação I172N herdados dos pais. O indivíduo com HCA da família 11, apresenta o alelo com a mutação I172N/Q318X que provém do pai, enquanto, o alelo com a mutação I172N da mãe.

O paciente da família 13 apresenta o alelo com as mutações R356W/Q318X herdado do pai e o alelo com a mutação I172N herdado da mãe.

No pacientes da família 7 não foi possível a determinação, por PCR alelo-específico, da presença de microconversões decorrentes das 8 mutações mais comumente associadas a HCA por deficiência de 21 hidroxilase em um dos alelos. Nestes

casos, este alelo deverá ser determinado por “Southern Blotting” ou por seqüenciamento direto. O paciente da família 7 é heterozigoto para a mutação I172N. Não foi encontrada, por PCR alelo-específico, em sua mãe, nenhuma das 7 mutações mais freqüentemente associada a HCA, incluindo o estudo da I172N. Adicionalmente, não foi possível o estudo genético de seu pai. Entretanto, desde que sua mãe não apresenta a mutação I172N, deduz-se que esta mutação tenha sido herdada de seu pai. A caracterização genética da mãe deste paciente não foi possível pela técnica da PCR alelo-específico. Portanto, os alelos deverão ser determinados por “Southern Blotting”, devido à possibilidade de deleções do gene *CYP21*, ou por seqüenciamento direto do gene.

O paciente 17VS é outro dos casos isolados de HCA forma perdedora de sal da HCA que foram estudados. Esta criança é criada por parentes. Utilizando a técnica de “screening” por PCR alelo-específico, apenas foi possível a caracterização de um alelo, onde foi encontrada a mutação Sp2 em heterozigose. Desde que seus pais não foram submetidos ao estudo genético não foi possível determinar de quem foi herdado este alelo mutado. Cabe salientar que o outro alelo deste paciente deverá ser determinado por outras técnicas como “Southern Blotting” ou por seqüenciamento direto.

O “Southern Blotting” foi realizado apenas no paciente 5VS, o qual apresentou uma duplicação (*CYP21P+C4B* [6,0]), porém, seus pais não foram submetidos ao estudo (figura 14).

Na família 6VS, a mãe do indivíduo afetado apresentou uma deleção de *CYP21P+C4B* em um dos alelos.

Tabela 4: Pacientes com HCA por deficiência da 21-hidroxilase forma clássica virilizante simples, seus familiares e os respectivos alelos mutados.

Família	Paciente	Alelo Paterno ^(a)	Alelo Materno ^(a)	Tipos de mutação e Genótipo esperado
1	1VS	I172N	Sp2 + Q318X	B/A - VS
2	2VS/3VS	I172N	I172N	B/B - VS
4	4VS	I172N	R356W	B/A - VS
5^(b)	5VS*	I172N + (<i>CYP21P+C4B</i> [6,0])	R356W (por ded.)	B/A - VS
6	6VS*	I172N	I172N + del <i>C4B</i> + <i>CYP21P</i>	B/B - VS
7	7VS*	I172N(por dedução)	?	B/?
8/9	8VS/9VS	I172N(por dedução)	I172N	B/B - VS
10	10VS	I172N	I172N	B/B - VS
11	11VS	I172N+Q318X	I172N	B/A - VS
12	12VS	I172N	I172N	B/B - VS
13	13VS	Q318X + R356W	I172N	A/B - VS
14/15^(b)	14VS/15VS	I172N	Sp2+Q318X	B/A - VS
4				
16	17VS	I172N	I172N	B/B - VS
17^(b)	18VS	?	Sp2	?/A

(a) Resultados obtidos pela análise das 7 mutações mais frequentemente associadas a HAC.* Famílias submetidas ao estudo por “Southern Blotting”. NC: fenótipo não clássico. B: grupo de mutação que acarretam moderada alteração enzimática. A: grupo de mutações que acarretam grave alteração enzimática. (b) alelo sem estudo de segregação familiar.

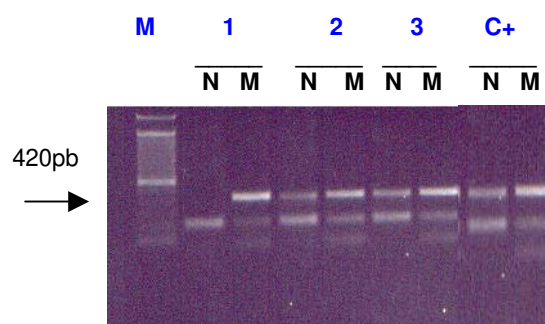
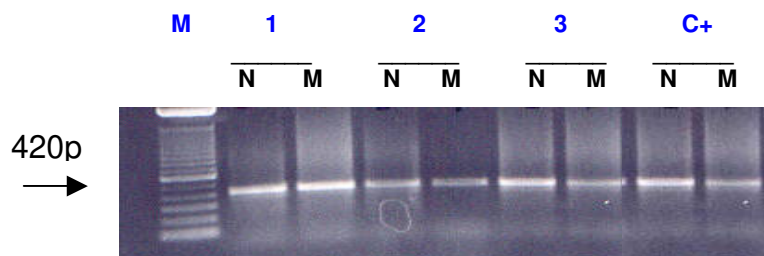


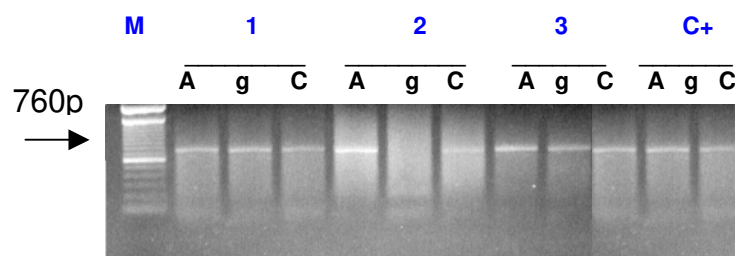
Figura 12: Gel de Agarose 1,0% demonstrando a amplificação por PCR alelo- específico do fragmento de 420bp da mutação I172N na família 12

Os números 1, 2 e 3 referem-se ao paciente, pai e mãe, respectivamente, M= marcador de peso molecular e C+ = controle positivo para esta mutação. N= primer com sequência normal e M- primer com sequência mutante.

A



B



C

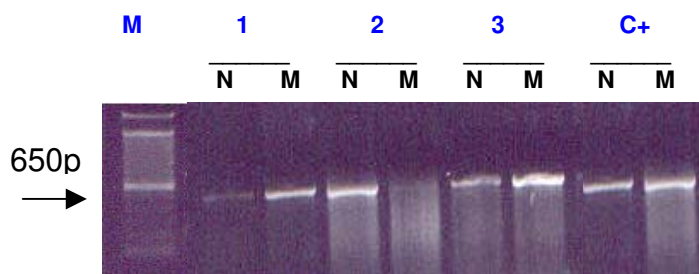


Figura 13: Gel de Agarose 1,0% demonstrando a amplificação por PCR alelo- específico do fragmento de 420bp da mutação I172N (A), fragmento de 760bp da mutação Sp2 e de 650pb da mutação Q318X da família 1.

Os números 1, 2 e 3 referem-se ao paciente, mãe e pai respectivamente, M= marcador de peso molecular e C+ = controle positivo para estas mutações. N- primer com sequência normal e M- primer com sequência mutante.

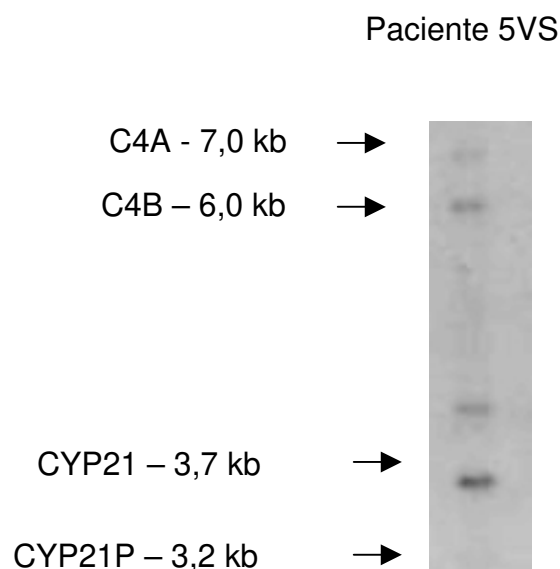


Figura 14: Southern Blotting com a enzima *Taq I* e hibridação com sondas para o gene C4A, C4B e CYP21, da paciente 5VS. A paciente apresentou uma duplicação de (*CYP21P*+*C4B* [6,0]), seus pais não foram submetidos ao estudo. Os genes correspondentes estão descritos na figura, bem como o tamanho de cada banda.

2.2. Forma perdedora de sal

Os indivíduos com a forma clássica perdedora de sal estão representados neste estudo por 20 famílias (37 alelos afetados). com pelo menos um indivíduo afetado, sendo que 2 dessas famílias podem ser consideradas como caso isolado, já que seus pais não foram estudados. A mutação Sp2, presente no íntron 2 do gene da enzima 21-hidroxilase, foi mais freqüentemente observada neste estudo. 12 dos 37 (32,4%) alelos estudados apresentaram pelo menos um alelo com esta mutação. A mutação R356W e a mutação V281L ocorreram em freqüências iguais, em 2 (5,4%) alelos estudados. A mutação $\Delta 8$ e a I172N foram encontradas em 1 alelo (2,7%), respectivamente. As mutações Sp2 e R356W foram encontradas em 1 mesmo alelo (2,7%) em uma das famílias. As mutações Sp2 e V281L também foram encontradas em 1 mesmo alelo (2,7%) em uma das famílias. Nessa

mesma frequência (2,7%) de alelos mutados, foram encontradas em associação em um mesmo alelo, as mutações Sp2 e $\Delta 8$ e também V281L em associação com Q318X.

As mutações Q318X e R356W foram encontradas em associação em 2 (5,4%) alelos dessas famílias. Ocorreu ainda, nos pacientes em que foi possível o estudo com Southern Blotting, com a forma perdedora de sal, a presença de 2 alelos com deleção de *C4B* + *CYP21P* e 1 alelo com conversão de *CYP21P/CYP21*. A tabela 6 mostra os genótipos para essas famílias.

Tabela 5: Pacientes com HCA por deficiência da 21-hidroxilase forma clássica, perdedora de sal, seus familiares e os respectivos alelos mutados.

Família	Paciente	Alelo Paterno ^(a)	Alelo Materno ^(a)	Tipos de mutação e Genótipo esperado
1	1PS*	Del. <i>C4B</i> + <i>CYP21P</i>	$\Delta 8$ (por dedução)	A/A - PS
2	2PS	Sp2	Sp2	A/A - PS
3	3PS	Sp2	Sp2	A/A - PS
4	4PS*	Del <i>C4B</i> + <i>CYP21P</i>	V281L	A/C NC
5 ^(b)	5PS	Sp2(por dedução) + dupl (<i>CYP21P</i> + <i>C4B</i> [6,0])	Sp2(por dedução)	A/A - PS
6	6PS*	Conversão <i>CY21P/ CYP21</i>	Sp2	conv/A - PS
7	7PS	?	Sp2+R356W	?/A
8	8PS	Q318X +R356W	Sp2	A/A - PS
9	10PS	?	Sp2	?/A
10/11	11PS/12PS	Sp2	Sp2	A/A - PS
12	12PS	Q318X+R356W	Sp2	A/A - PS
13	13PS	Sp2+V281L	R356W	A/A - PS
14	14PS	Sp2+ $\Delta 8$ (por dedução)	?	A/?
15	15PS	?	?	?/?
16	16PS	Sp2	Q318X	?/A
17	17PS	R356W (por dedução)	V281L	A/C-NC
18	18PS	Sp2 (por dedução)	?	A/?
19 ^(b)	19PS	?	I172N	A/B - VS
20	20PS	?	?	?/?

(a) Resultados obtidos pela análise das 8 mutações mais frequentemente associadas a HAC.* Famílias submetidas ao estudo por “Southern Blotting”. NC: fenótipo não clássico.C: grupo de mutação que acarretam leve alteração enzimática B: grupo de mutação que acarretam moderada alteração enzimática. A: grupo de mutações que acarretam grave alteração enzimática. (b) alelo sem estudo de segregação familiar.

Os pacientes das famílias 2 (Figura 15), 3 e 5 apresentaram a mutação Sp2 em homozigose, sendo a heterozigose confirmada nos pais dos pacientes das famílias 2 e 3, a homozigose na família 2 já era esperada, pois seus pais são consangüíneos. Adicionalmente, a paciente 3PS também apresenta a mutação $\Delta 8$. Não foi possível o estudo molecular dos pais do paciente 5PS, entretanto, por apresentar apenas a mutação Sp2, os pais podem ser heterozigotos da mesma mutação. O paciente também foi estudado por “Southern Blotting” apresentou uma duplicação (*CYP21P+C4B* [6,0]), sendo afastadas as possibilidades de deleção ou conversão (figura 17)

O paciente da família 4 foi estudado também por “Southern Blotting” e apresenta um alelo com deleção de (*C4B+CYP21*) herdado do pai e outro alelo com a mutação V281L herdado da mãe (figura 18).

O paciente da família 17, também, apresenta heterozigose, tendo herdado o alelo com a mutação R356W do pai e o alelo com a mutação V281L da mãe.

O paciente 19 é um dos casos isolados e sua caracterização genotípica demonstra a presença da mutação I172N em heterozigose, a presença de uma mutação no outro alelo não pode ser determinada por PCR alelo-específico devendo ser determinada por “Southern Blotting” ou sequenciamento direto.

A paciente 1PS foi uma das pacientes que também tiveram sua caracterização genotípica determinada por “Southern Blotting”, apresentando um dos alelos com deleção de *C4B + CYP21P* e o outro alelo com a mutação $\Delta 8$. Seu pai apresentava alelos com deleção de *C4B + CYP21P* e V281L em heterozigose, sugerindo ser portador assintomático de HCA forma não clássica. Entretanto, não foi possível o estudo bioquímico dos níveis de 17-OHP após teste de estímulo com ACTH, para confirmar esta possibilidade. O estudo genético da mãe não foi realizado; entretanto, por dedução a paciente deve ter herdado o alelo com a deleção do pai e a mutação $\Delta 8$ do alelo materno.

Nas famílias 8 (figura 16), 12 e 13 verificaram-se alelos com mais de uma mutação. Os pacientes 8PS e 12PS herdaram o alelo com as mutações Q318X/R356W, presentes no mesmo exon, dos seus respectivos pais e a mutação Sp2 foi herdada do alelo materno. A paciente 13PS herdou o alelo com a mutação Sp2/V281L do pai e o alelo com a mutação R356W da mãe.

A paciente família 6 herdou um alelo com conversão *CYP21P/CYP21*, determinada por “Southern Blotting”, do pai e um alelo com a mutação Sp2 da mãe.

Nas famílias 9 e 18, utilizando a técnica de screening por PCR alelo-específico, apenas foi possível somente a caracterização de um dos alelos. No paciente 9PS foi identificada a mutação Sp2, herdada do alelo materno, enquanto que o paciente 18PS herdou o alelo com a mutação Sp2 do pai. Nenhuma das 8 mutações, mais frequentemente associadas a HCA por deficiência da enzima 21-OH, foi encontrada no outro alelo desses pacientes. Esse alelo deverá ter seu estudo determinado por “Southern Blotting” ou por seqüenciamento direto.

A paciente 7PS herdou as mutações Sp2/R356W do alelo materno e seu pai não foi submetido ao estudo genético, portanto, não foi possível a caracterização do alelo paterno dessa paciente.

A família contendo os pacientes 10PS/11PS apresenta dois irmãos afetados com um alelo com a mutação Sp2, em heterozigose. Os pais também apresentam esta mutação em heterozigose. Por PCR alelo específico não foi possível determinar uma segunda mutação nos pacientes que justificasse seu fenótipo. Estes alelos deverão ser determinados por outras técnicas como “Southern Blotting” ou por seqüenciamento direto, para a definição do genótipo desta família. Essa família apresentou um padrão incomum para a mutação Sp2. Como citado anteriormente, nessa posição nucleotídica pode ser encontrado os nucleotídeos A ou C, que representam um polimorfismo. Os pais destes pacientes foram positivos para os três alelos (A, C, G), ao passo que os filhos afetados foram positivos apenas para A/G. Uma possível explicação para esse padrão de segregação é a ocorrência de uma duplicação *C4B+ CYP21* em um dos alelos dos pais.

O paciente 14PS herdou, por dedução, as mutações Sp2/ Δ 8 do alelo paterno, pois o pai não foi submetido ao estudo genético. Como nenhuma das mutações citadas foram encontradas na mãe, deduz-se então, que tenham sido herdadas do pai e devem estar presentes no mesmo alelo, tendo em vista que o pai não é afetado. O alelo materno deverá ser determinado por outras técnicas como “Southern Blotting” ou por seqüenciamento direto, pois o mais provável é que a mãe possa apresentar uma mutação nova ou uma deleção/conversão onde o exon 6 também foi convertido e conseqüentemente não amplificado.

O paciente 16PS apresenta a mutação Q318X em heterozigose. Sua mãe apresenta as mutações V281L e Q318X, portanto, o alelo Q318X pode ter sido herdado de sua mãe, e visto que a criança afetada, não possui o alelo com a mutação V281L presente na mãe, conclui-se que a mãe possa ter HCA e ser assintomática, . Utilizando a técnica de screening por PCR alelo-específico não foi encontrada nenhuma das 7 mutações, mais freqüentemente associadas a HCA, no alelo paterno, sugerindo deleção ou uma nova mutação, sendo que estas possibilidades deverão ser estudadas por “Southern Blotting” ou seqüenciamento direto. A mesma abordagem de estudo deverá ser utilizada na família 15, pois nenhuma das 7 mutações mais freqüentemente associadas a HCA foi encontrada na paciente e em seus familiares.

No paciente 20 nenhuma das 7 mutações mais freqüentemente associadas a HCA foi encontrada por PCR alelo-específico. O mesmo foi observado em relação a sua mãe, enquanto seu pai não foi submetido ao estudo genético. Neste caso, os alelos deverão ser determinados por “Southern Blotting”, devido à possibilidade de deleções do gene CYP21, ou por seqüenciamento direto do gene.

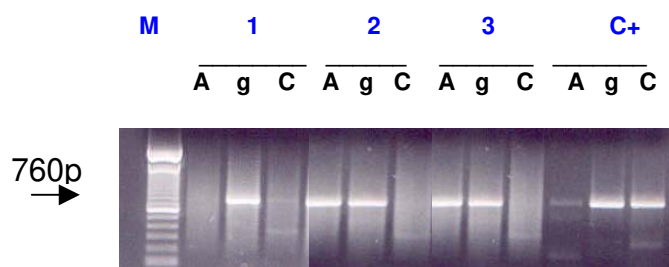


Figura 15: Gel de Agarose 1,0% demonstrando a amplificação por PCR alelo- específico do fragmento de 760bp da mutação Sp2 em homozigose na família 2.

Os números 1, 2 e 3 referem-se ao paciente, mãe e pai respectivamente, M= marcador de peso molecular e C+ = controle positivo para estas mutações. N- primer com seqüência normal e M- primer com seqüência mutante.

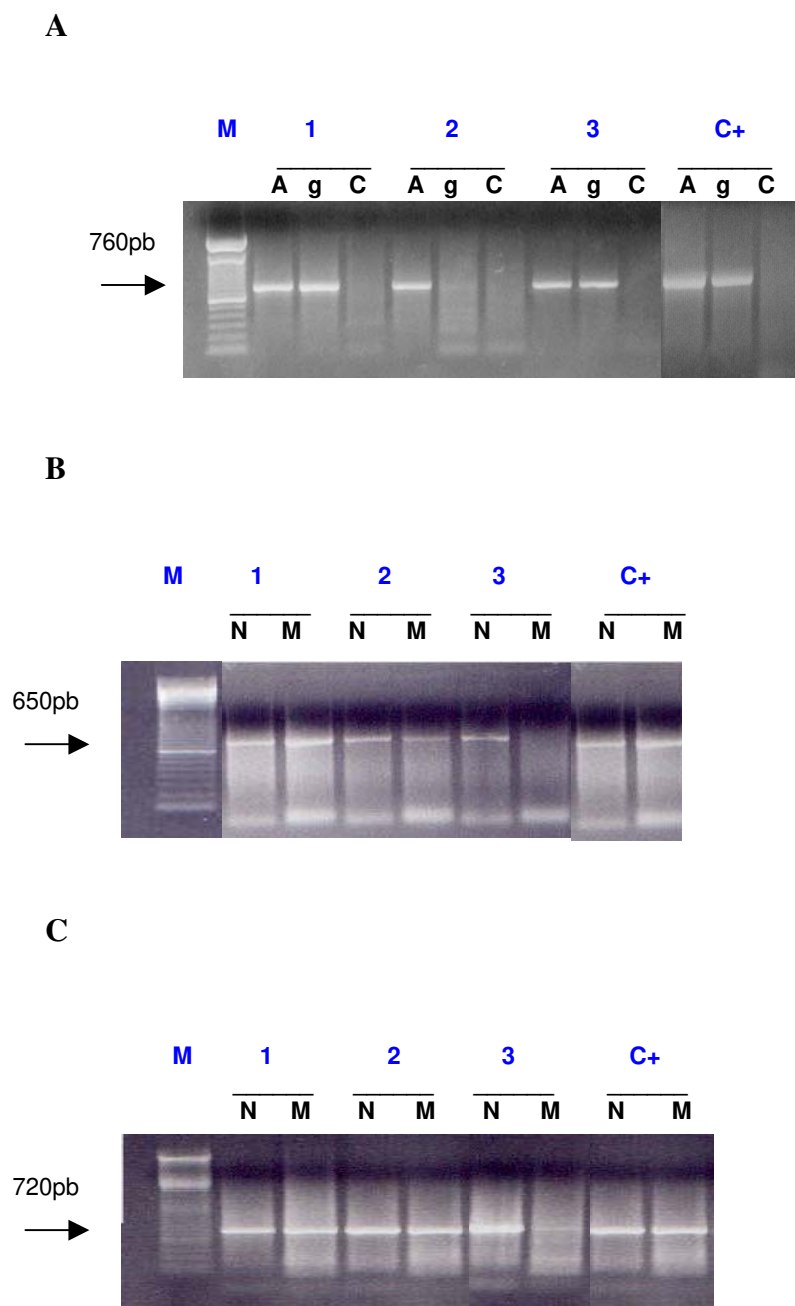


Figura 16: Gel de Agarose 1,0% demonstrando a amplificação por PCR alelo- específico do fragmento de fragmento de 760bp da mutação Sp2 (A), 720bp da mutação R356W, e de 650pb para a mutação Q318X da família 8.

Os números 1, 2 e 3 referem-se ao paciente, mãe e pai respectivamente, M= marcador de peso molecular e C+ = controle positivo para estas mutações. N- primer com seqüência normal e M- primer com seqüência mutante.

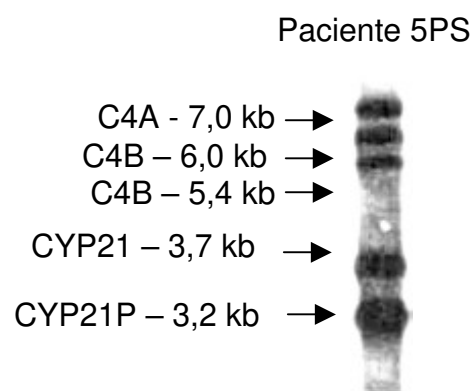


Figura 17: Southern Blotting com a enzima *Taq I* e hibridação com sondas para o gene *C4A*, *C4B* e *CYP21*, do paciente 5PS. O paciente apresentou uma duplicação de (*CYP21P*+*C4B* [6,0]), seus pais não foram submetidos ao estudo. Os genes correspondentes estão descritos na figura, bem como o tamanho de cada banda.

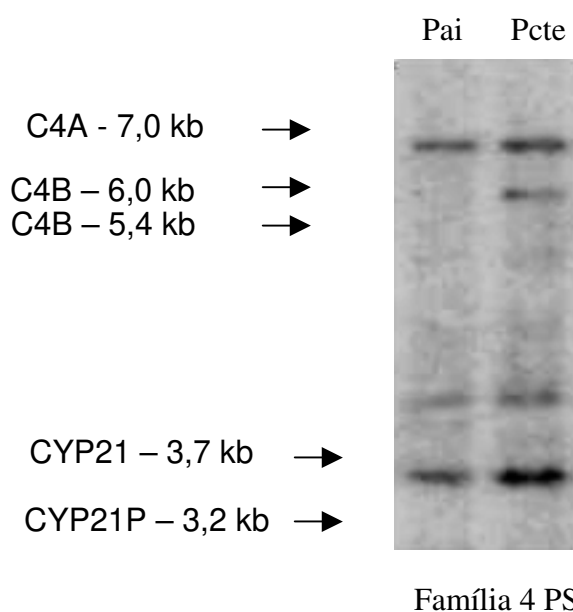


Figura 18: Southern Blotting com a enzima *Taq I* e hibridação com sondas para o gene *C4A*, *C4B* e *CYP21*, do paciente 4PS. A paciente apresentou um alelo com deleção de (*C4B*+*CYP21*) herdado do pai e outro alelo com a mutação V281L herdado da mãe. Os genes correspondentes estão descritos na figura, bem como o tamanho de cada banda.

Correlação entre o genótipo e o fenótipo

Baseando-se na classificação de Speiser et al., (1992) os pacientes com HCA por deficiência da enzima 21-hidroxilase foram reunidos em 3 grupos (A, B e C), de acordo com a atividade enzimática conferida por seu genótipo. As 7 microconversões, mais freqüentemente associadas a HCA, foram encontradas em ambos os alelos em 70 (75,2%) dos 93 alelos afetados estudados. O grupo A apresentou 8 pacientes, todos com o fenótipo perdedor de sal e com genótipo A/A (tabela 5); o grupo B (tabela 4) apresentou 11 pacientes com a forma virilizante simples e os seguintes genótipos: B/B (n=6) e B/A (n=5); o grupo C (tabela 3) apresentou 8 pacientes, sendo 7 com a forma não clássica da doença e 1 com a forma clássica perdedora de sal. Os pacientes do grupo C apresentaram os seguintes genótipos: C/C (n=5) e A/C (n= 3).

A correlação do genótipo A com a forma perdedora de sal foi de 88%, do genótipo B com a forma virilizante simples foi de 100% e do genótipo C com a forma não clássica foi de 100%. Um único paciente do estudo não apresentou correlação genótipo-fenótipo (3,7%).

Pacientes do sexo feminino com genótipo do grupo A apresentaram virilização da genitália externa variando de Prader II a Prader IV. As pacientes do grupo B tiveram variação de Prader I a IV, já as pacientes pertencentes ao grupo C variaram de Prader I a II (tabelas 9, 10 e 11, apresentadas no anexo).

A mediana da concentração plasmática da 17-OHP basal no grupo A foi de 32.620 ng/ml e as concentrações plasmáticas variaram de um mínimo de 18.300 a um máximo de 37.780 ng/ml. No grupo B a mediana da concentração da 17-OHP foi de 14.440 ng/ml, variando de 1888 a 36.250 ng/ml, já o grupo C apresentou a mediana da concentração da 17-OHP de 1.224 ng/ml, variando de 308 a 8.500 ng/ml. A mediana do pico da 17-OHP após estímulo com ACTH no grupo C foi de 5125 ng/ml e variaram de 1224 a 7986 ng/ml. Houve diferença significativa dos valores de 17OHP entre os grupos A e B ($p=0,05$), A e C ($p=0,002$) e B e C ($p= 0,001$), demonstrando uma significativa variação nas concentrações de 17-OHP nos diferentes grupos Cabe salientar que a paciente que apresentou 17OHP de 8.500 ng/ml é a mesma paciente que apresentou discordância

genótipo. Os alelos eram afetados com as mutações R356W/ V281L, porém apresentava a forma clínica perdedora de sal (tabelas 9, 10 e 11, apresentadas no anexo).

As concentrações plasmáticas de androstenediona no grupo A variaram de um mínimo de 144 ng/dl a um máximo de 7.225, apresentando mediana de 989,0 ng/dl. No grupo B as concentrações plasmáticas androstenediona variaram de 58 a 3.102 ng/dl, apresentando mediana de 408 ng/dl. O grupo C as concentrações plasmáticas de androstenediona variaram de 24 a 351 ng/dl, com mediana de 118 ng/dl. (tabelas 9, 10 e 11, apresentadas no anexo).

As concentrações plasmáticas de testosterona variaram de um valor mínimo de 32 a um valor máximo de 648 ng/dl, com uma mediana de 263 ng/dl no grupo A. No grupo B variaram de 59 a 466 ng/dl, com mediana de 98 ng/dl e no grupo C variaram de 12 a 121 ng/dl, com mediana de 32 ng/dl. As concentrações plasmáticas de androstenediona e testosterona foram similares (NS) nos grupos A e B (tabelas 9, 10 e 11, apresentadas no anexo). Entretanto, houve diferença significativa dos valores de androstenediona e testosterona entre os grupos A e C ($p=0,002$ e $p=0,005$, respectivamente), e entre os grupos B e C ($p=0,002$ e $p=0,003$, respectivamente).



DISCUSSÃO

O gene *CYP21* e pseudogene *CYP21P* têm aproximadamente 3,0 kb em tamanho e apresentam cerca de 96% e 98% de homologia entre si nas seqüências exônicas e intrônicas, respectivamente (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986). Este fato dificulta o estudo de mutações pontuais no gene, pois mutações presentes no gene *CYP21P* podem estar presentes no gene ativo. A identificação de mutações exclusivas do gene *CYP21* envolve a distinção entre gene e pseudogene. Esta distinção é feita com base em método descrito por Owebach *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 pares de base, são capazes de amplificar seletivamente o gene *CYP21*. Esta mesma estratégia pode ser utilizada com o uso de ‘primers’ específicos de *CYP21* que se anelem em uma região do éxon 6, onde também se identifica uma diferença em três pares de bases entre o gene e pseudogene (mutações L236N, V237Q, M239K chamadas de CL6). No presente trabalho utilizamos a segunda abordagem, isto é, estudamos o gene *CYP21* ativo por amplificação da seqüência que não contém o cluster de mutações presentes no éxon 6 do *CYP21P*.

A formação de um gene híbrido por conversão gênica em larga escala (Strachan, 1989; Strachan, 1990; Strachan, 1991; Speiser *et al.*, 1992b) pode surgir pela ocorrência de dois eventos de *crossing-over* desigual entre cromossomos emparelhados incorretamente. No entanto, uma segunda hipótese para explicar tais conversões seria que enzimas responsáveis pelo reparo pós-duplicação reconheceriam o pareamento errado e converteriam *CYP21* em pseudogene desde pequenas porções (microconversões) até a totalidade do gene (conversão em larga escala) e vice-versa. Estudos populacionais demonstram que o evento de deleção formando o gene híbrido *CYP21P/CYP21* está presente em cerca de 30% dos alelos de indivíduos afetados, entre europeus, norte americanos e japoneses (Carrol *et al.*, 1985b; Harada *et al.*, 1987). No caso de mexicanos e sul-americanos, incluindo brasileiros, essa porcentagem é mais baixa, perfazendo cerca de 10% (Tusié-Luna *et al.*, 1996; Araujo *et al.*, 1996; Dardis *et al.*, 1997; Paulino *et al.*, 1999; Bachega *et al.*, 1999). Microconversões são responsáveis por 65 a 90% dos alelos afetados (Mornet *et al.*, 1991; Owerbach *et al.*, 1992; Paulino *et al.*, 1999, Kapelari *et al.*, 1999, Bachega *et al.*, 1998). A tabela 1 reúne as microconversões mais freqüentes, as atividades enzimáticas e as formas clínicas mais freqüentemente associadas a cada mutação.

A presença de microconversões foi investigada, por PCR alelo-específico, em 93 alelos afetados em 45 famílias afetadas por HCA e 5 casos isolados em suas diferentes apresentações fenotípicas. Deste total de alelos, 26 referem-se a 13 famílias que apresentam a forma não clássica de deficiência de 21-hidroxilase. Sessenta e cinco alelos referem-se a 37 famílias afetadas pela forma clássica da deficiência de 21-hidroxilase, sendo que 28 desses alelos provêm de 16 famílias que apresentam a forma clínica virilizante simples e 37 alelos de 20 famílias apresentam a forma perdedora de sal. A tabela 6 resume as frequências de cada uma das microconversões observadas no presente estudo nos diferentes fenótipos da HCA. Cabe salientar que as frequências apresentadas na tabela 6 levou em consideração a presença de alelos com apenas uma mutação e alelos com mutação em heterozigose composta, isto é, mais de uma mutação no mesmo alelo. Este fato é importante para explicar a diferença na frequência destas mutações quando as mesmas são analisadas apenas pela presença nos alelos (tabela 8), como tem sido previamente descrito nas populações brasileiras e mundiais estudadas (White PC e Speiser , 2000; Paulino *et al.*, 1999, Bachega *et al.*, 1998).

Tabela 6: Frequência (%) das mutações em ponto em pacientes com HCA por deficiência da enzima 21-hidroxilase no presente estudo.

Forma Clínica	Alel os (n)	P30L	Sp2	Δ8	I172N	V218L	Q318X	R356 W	P30L +	I172N +	I172N +	Q318X +	Sp2 +	Sp2 +	Sp2 +	Sp2 +	Conv.	Del.
									I172N	Q318X	V281L	R356X	Q318X	R356W	V281L	Δ8		
PS	37	–	12	1	1	2	1	2	–	–	–	2	–	1	1	1	1	1
			32%	2,7%	2,7%	5,4%	2,7%	5,4%				5,4%		2,7%	2,7%	2,7%	2,7%	2,7%
VS	28	–	2	–	18	–	–	2	–	1	–	1	2	–	–	–	–	–
			7,1%		64,2%			7,1%		3,6%		3,3%	7,1%					
NC	26	1	–	–	–	15	–	2	1	–	1	–	–	–	–	–	–	–
		3,8%				57,7%		7,7%	3,8%		3,8%							
Total	93	1	13	1	19	17	1	6	1	1	1	3	2	1	1	1	1	1
		1,1%	14 %	1,1%	20,4%	18,2%	1,1%	6,5%	1,1%	1,1%	1,1%	3,7 %	2,2%	1,1%	1,1%	1,1%	1,1%	1,1%

Dentre as principais microconversões presentes no gene *CYP21* está a mutação P30L, presente no exon 1 do gene *CYP21* (Tusie-Luna *et al.*, 1991). Nesta mutação ocorre a substituição CCG→CTg, substituindo na proteína uma Prolina por Leucina, levando a uma diminuição na atividade enzimática (60% da atividade quando o substrato 17-OHP e 30% quando progesterona) da proteína mutada quando comparada a enzima normal. Esta é uma mutação associada à forma não clássica da HCA, sendo encontrada em até 10-20% dos alelos. Entretanto, na população japonesa parece ser a principal causadora da forma não clássica da doença (Tajima *et al.*, 1998).

Nosso estudo demonstrou uma frequência geral de alelos mutados para a P30L, entre todas as formas de HCA, de 1,1%. Este resultado é semelhante ao encontrado na literatura geral, em média de 2%, podendo estar presente em maior frequência (9%) na população Mexicana (Tabela 7). Em estudos brasileiros prévios, Bachega *et al.* (1998) encontraram esta mutação em 2,2% dos alelos de pacientes portadores da HCA. Esta mutação está associada, principalmente, à forma não clássica da doença, em nosso estudo, neste fenótipo encontramos uma frequência de 3,8% de alelos com esta mutação. A tabela 8 resume as frequências de cada uma das microconversões observadas nos principais estudos realizados em população brasileira.

Tabela 7: Frequência (%) das microconversões em alelos das diferentes populações com a forma clássica e não clássica da HCA por deficiência da enzima 21-hidroxilase.

Países	Alelos (n)	P30L (%)	Sp2 (%)	Δ8 (%)	I172N (%)	V281L (%)	Q318X (%)	R356W (%)
Suécia	186	1,6	30,5	1,2	20,8	7	3,2	4,3
França	182	NT	20,0	7,0	4,0	15,0	4,0	NT
Estados Unidos	158	2,5	26,0	10,0	15,8	8,9	5,7	7,6
Espanha	76	2,6	25,0	4,0	1,3	18,4	4,0	4,0
Argentina	72	NT	18	2,7	15,3	NT	13,8	5,5
Itália	146	8,2	29,4	1,4	9,6	15,8	10,3	0,7
México	94	8,5	47,0	2,1	11,7	8,5	4,3	7,4
Inglaterra	220	2,0		NT	14,0	7,0	NT	NT
Japão	102	0	NT	0	13,0	1,0	0	13,0
Presente estudo	93	1,1	14,0	1,1	20,4	18,2	1,1	6,5

NT: mutação não testada

Tabela 8: Frequência (%) das mutações de ponto em pacientes brasileiros com a forma clássica e não clássica da HCA por deficiência da enzima 21-hidroxilase.

Forma Clínica	Alelos (n)	P30L	Sp2	Δ8	I172N	V281L	Q318X	R356W
Bachega et al., 1998	228	5 (2,2%)	47(20,6%)	3 (1,3%)	32 (14%)	41 (18%)	5 (5,7%)	16 (7%)
Paulino et al., 1999	68	NT	26,5%	1,4%	20,5%	4,5%	12%	9%
Presente estudo	93	2 (2,2%)	21 (22,8%)	2 (2,2%)	23 (25%)	21 (22,8%)	7 (7,6%)	10 (10,8%)

PS: perdedor de sal, VS: virilizante simples, NC: não clássica, NT: mutação não testada.

A mutação IVS2, A/C>G, -12 (Sp2) intrônica, está localizada na posição- 12 do íntron 2 (nt 656) e é polimórfica, podendo ser tanto A (adenina) quanto C (citosina) no gene CYP21 (Higashi *et al.*, 1988b). Esta mutação consiste na troca de A/C→G, uma alteração normalmente identificada no pseudogene (Higashi *et al.*, 1988, 1991; Helmberg *et al.*, 1992). Essa alteração das bases encontra-se a 11bp do sítio consenso de “splice” e leva a ativação de um sítio de “splice” críptico (Lajic e Wedel, 1996), resultando em um processamento imperfeito do RNA (‘splicing’) em que 19 bp, normalmente excisados durante o processo, ficam retidos levando a formação 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). Esta mutação está associada às formas graves da HCA por deficiência da enzima 21-OH. Embora, não seja determinada a proporção correta de mRNA corretamente processados *in vivo* nas glândulas adrenais, a presença de quantidade de mRNA correta explicaria a variabilidade de fenótipo associada a esta mutação (Helmberg, 1993; Schulze *et al.*, 1995).

Nosso estudo demonstrou a freqüência de 13 (14,0%) de alelos mutados para a Sp2. Este resultado é semelhante ao encontrado na literatura geral, cujos trabalhos variam de 18 a 29%, podendo estar presente em maior freqüência (47%) na população Mexicana (Tabela 7). Em estudos brasileiros prévios, Bachega *et al.* (1998) e Paulino *et al.* (1999) encontraram esta mutação em 20,6% e 26,5%, respectivamente, dos alelos de pacientes portadores de HCA. Esta freqüência está associada, principalmente, a forma clássica da doença. Em nosso estudo 39,1% dos alelos das formas clássicas, sendo 7,1% na forma virilizante simples e 32,0% na forma perdedora de sal. Estas freqüências observadas nas formas clássicas da doença foram semelhantes às observadas em estudos brasileiros. Esta mutação parece não estar associada a forma não clássica da doença e não esteve presente em nenhum dos alelos de nosso estudo. Entretanto, Bachega *et al.* (1998) encontraram em 5,7% dos pacientes com a forma não clássica.

A mutação Δ8 (706-713Del8nt) engloba os códons 110 ao 112 no éxon 3, representa a deleção de 8 bases (TTgggAgACTACTTCC) normalmente presente no pseudogene (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986). Esta mutação provoca alteração no

quadro de leitura e origina um codon de terminação prematuro, na posição 130, dando origem a uma enzima truncada e inativa.

Nosso estudo demonstra uma frequência de 1 (1,1%) de alelo mutado para a $\Delta 8$. Similarmente à literatura, esta frequência está associada, principalmente, a forma clássica da doença, principalmente na forma perdedora de sal. Este resultado é semelhante ao encontrado na literatura geral, cujos trabalhos variam de 1 a 3%, podendo estar presente em maior frequência (7 e 10%) em população da França e dos Estados Unidos (Tabela 7). Em estudos brasileiros prévios, Bachega *et al.* (1998) e Paulino *et al.* (1999) encontraram esta mutação em 1,3% e 1,4%, respectivamente, dos alelos de pacientes portadores de HCA. Este alelo, em nosso estudo, foi encontrado apenas na forma perdedora de sal (5%).

A mutação I172N descrita como a mais freqüente associada ao fenótipo VS (Amor *et al.*, 1986, Higashi *et al.*, 1991) está presente no éxon 4 (ATC→AAC) e resulta em uma proteína com apenas 1% da atividade enzimática da 21-hidroxilase. Esta mutação 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 assim a atividade enzimática. Pode haver, também uma alteração estrutural da proteína contribuindo para a redução da eficiência em captar grupamento heme. Estudos sugerem que portadores desta mutação são capazes de sintetizar quantidades adequadas de aldosterona, resultando no fenótipo VS. Entretanto, foram descritos pacientes perdedores de sal entre os portadores dessa mutação em associação com outras alterações, sugerindo fatores epigenéticos influenciando o fenótipo perdedor de sal (Tusie-Luna *et al.*, 1990).

Nosso estudo demonstrou uma frequência de 20,4% de alelos mutados (20 alelos) para a I172N. Este resultado é semelhante ao encontrado na literatura geral, cujos trabalhos variam de 6 a 29%, podendo estar presente em menor frequência (1,3%) na população espanhola (Tabela 7). Em estudos brasileiros prévios, Bachega *et al.* (1998) e Paulino *et al.* (1999) encontraram esta mutação em 14% e 20,5%, respectivamente, dos alelos de pacientes portadores de HCA. Este alelo foi encontrado em 59,3% dos pacientes com a forma virilizante simples e 2,7% dos perdedores de sal. Na forma não clássica da

HCA, encontramos a mutação I172N somente em associação com a mutação V281L em 1 alelo (4,2%).

A mutação CL6 é um conjunto de mutações, localizado no éxon entre os codons 236-239, (Ile-Val-Glu-Met²³⁶⁻²³⁹ → Asn-Glu-Glu-Lys) 236N/V237E/M239K. A análise da expressão das proteínas mutantes em células COS confirmou a perda total da atividade enzimática, portanto esta é uma mutação associada à forma PS (Tusie-Luna *et al.*, 1990; Higashi *et al.*, 1988b). Não realizamos em nosso estudo a análise desta mutação.

A mutação V281L está presente no éxon 7 (gTg→CTg), originando a substituição de uma valina por uma leucina, e representa a mutação mais comum associada a 70% dos casos da forma não clássica de HAC na população caucasiana (Speiser *et al.*, 1988). Entretanto, na população japonesa esta mutação parece não ser a mais importante relacionada a esse fenótipo. Estudos em células COS-1 revelaram que a taxa de conversão em relação à enzima normal foi de 50% quando o substrato era a 17-OHP e de 20% quando a progesterona (Tusie-Luna, 1990).

Nosso estudo demonstrou uma frequência de 18,2% (17 alelos mutados) para a V281L. Este resultado é semelhante ao encontrado na literatura geral, cuja frequência nos diferentes trabalhos variam de 6 a 17%, podendo estar presente em menor frequência (1 a 4%) na população japonesa e inglesa (Tabela 7). Cabe salientar que, estudos que apresentam uma frequência muito baixa de V281L, geralmente não incluem pacientes com a forma não clássica da doença. Este comentário não inclui a população japonesa, pois sua frequência, realmente, é inferior nesta etnia. Similarmente a literatura esta frequência esteve associada, principalmente, à forma não clássica da doença (62,5%). Em estudos brasileiros prévios, no Brasil, Bachega *et al.* (1998) encontraram esta mutação em 18% dos alelos de pacientes com HCA, sendo que 40,2% apresentavam esta mutação associada à forma não clássica. Paulino *et al.* (1999) obtiveram uma frequência menor (4,5%), no entanto, estudaram apenas pacientes com as formas clássicas da doença. Nosso estudo apresentou a mutação V281L em associação com outras mutações presentes em um mesmo alelo, sendo elas; V218L/Sp2, V281L/I172N, respectivamente, que apareceram em uma frequência de 1 (1,1%) nos casos de HCA.

A mutação Q318X corresponde a troca de CAg→TAg e cria um códon de terminação prematuro (stop codon) no éxon 8, dando origem a uma proteína incompleta. Portanto, essa mutação está associada ao fenótipo PS da HAC. Esta não apresenta a região do sítio de ligação do grupamento heme que engloba o resíduo Cys 429. Estudos com transfecção em células adrenais Y1 de camundongos demonstram que, além de produzir uma enzima inativa, os transcritos de mRNA a partir do gene mutante são substancialmente inferiores aos obtidos a partir do gene normal (Globerman *et al.*, 1988).

Nosso estudo demonstrou uma frequência de 1,1% (1 alelo mutado) para a Q318X. Este resultado é semelhante ao encontrado na literatura geral, cuja frequência nos diferentes trabalhos variam de 3,2 a 14%, podendo estar presente em menor frequência na população japonesa e inglesa (Tabela 7). Em estudos brasileiros prévios, Bachega *et al.* (1998) e Paulino *et al.* (1999) encontraram esta mutação em 5,7% e 12%, respectivamente, dos alelos de pacientes portadores de HCA. Cabe salientar, que a mutação Q318X apareceu em nosso estudo em associação com outras mutações presentes em um mesmo alelo, tais como: Q318X/ I172N, Q318X/R356W e Q318X/Sp2 e similarmente à literatura esta frequência está associada, principalmente, à forma clássica da doença. Não encontramos nenhum paciente com a forma não clássica da doença apresentando alelos com esta mutação.

A mutação R356W está presente no éxon 8 e consiste na alteração do códon Cgg→Tgg e na substituição da arginina pelo triptofano. A região composta pelos códons 342-358 é altamente conservada em várias proteínas com função de ligação aos esteróides, portanto, infere-se que se trata de domínio de ligação ao substrato. Esta mutação está associada às formas clássicas da doença (Chiou *et al.*, 1990).

Nosso estudo demonstrou uma frequência de 6,5% de alelos mutados para a R356W, comparável à frequência encontrada na literatura (3 a 13%). Em estudos brasileiros prévios, Bachega *et al.* (1998) e Paulino *et al.* (1999) encontraram esta mutação em 7% e 9%, respectivamente, dos alelos de pacientes portadores de HCA. Encontramos 6,2% dos alelos com a mutação R356W associada a forma VS e 5,4% a forma PS. Encontramos 8,3% de alelos mutados em pacientes com a forma não clássica da doença.

A mutação I172N foi a mais freqüente em nossa amostragem, correspondendo a aproximadamente 20,4% do total de 93 alelos (incluindo os alelos com deleções e conversões gênicas envolvendo os sítios *Taq I*). Foi identificada, principalmente, em alelos de pacientes afetados pela forma clínica virilizante simples. A segunda mutação mais frequente foi a mutação V281L e ocorreu em uma freqüência de 18,2%. A mutação Sp2 foi identificada em 14,0% dos pacientes com HCA formas clássicas e não clássica. A maioria dos alelos com a mutação Sp2 foi proveniente de indivíduos afetados pela forma perdedora de sal, enquanto os alelos com a mutação V281L estavam associados com a forma não clássica da doença. Estes resultados diferem discretamente dos dados obtidos em outros estudos, levando-se em consideração a população mundial e a brasileira, onde a mutação mais freqüente é a Sp2, seguida da I172N. Esta inversão na ordem de freqüência deve-se, provavelmente, a grande porcentagem de pacientes homozigotos para esta mutação observada em nosso estudo. Esta alta incidência de homozigose pode ser devida a presença de consangüinidade, embora os pacientes tenham negado, provavelmente por desconhecimento. As freqüências das mutações R356W, e $\Delta 8$ parecem não diferir significativamente em comparação com outros estudos. As mutações Q318X e $\Delta 8$ foram identificadas, cada uma isoladamente, em 1 alelo dentre 93 estudados (1,1%). Entretanto, Mornet *et al.* (1991) e Wilson *et al.* (1995b) encontraram freqüências de 9% e 10%, respectivamente, da mutação $\Delta 8$, sendo esta freqüência obtida por estudos de alelos da forma clássica. Tais valores não chegam a ser tão elevados quanto os citados por Higashi *et al.* (1991), embora este autor considere apenas pacientes perdedores de sal, fato que por si só deve superestimar a freqüência observada. A mutação P30L, normalmente associada à forma não clássica da doença, também apareceu e 1/93 (1,1%) dos alelos estudados, valor bastante semelhante aos levando-se em consideração a população mundial e brasileira.

Não foi possível a realização do estudo por “Southern Blotting” de todas as famílias com HCA por deficiência da enzima 21-hidroxilase. Foram estudadas 7 famílias com a forma não clássica, num total de 14 alelos estudados. Todos estes pacientes estudados apresentaram uma duplicação de *CYP21+ C4B* [5,4] em associação com a mutação V281L, achado este, freqüentemente observado e já previamente descrito na literatura (White, P.C.e Speiser, P.W, 200). É importante salientar que quando a mutação V281L ocorre em associação com duplicação do gene *CYP21P*, os alelos que carregam

esta duplicação parecem estar em desequilíbrio de ligação com a forma não clássica da doença. Foram, ainda, analisados por “Southern Blotting”, 2 pacientes com a forma virilizante simples (5VS e 6VS). O paciente 5VS, apresentou uma duplicação (*CYP21P+C4B* [6,0]), porém, como seus pais não foram submetidos ao estudo ficou impossibilitada a determinação de qual alelo foi herdado essa duplicação. Na família 6VS, a mãe do indivíduo afetado apresentou uma deleção de *CYP21P+C4B* em um dos alelos.

Correlações entre genótipos e fenótipos

Os diversos tipos de mutações geralmente estão associados a diferentes graus de prejuízo da atividade da proteína e, conseqüentemente, à gravidade do fenótipo e com as diversas formas clínicas de HCA. (Chiou *et al.*, 1990; Tusie-Luma *et al.*, 1990; Wu e Chung, 1991; Higashi *et al.*, 1991).

Em nossa casuística observamos forte correlação genótipo-fenótipo. A correlação do genótipo A com a forma perdedora de sal foi de 88%, do genótipo B com a forma virilizante simples foi de 100% e do genótipo C com a forma não clássica foi de 100%. Um único paciente do estudo não apresentou correlação genótipo-fenótipo (3,7%). Cabe salientar que neste estudo não foi realizado “Southern Blotting” para determinação de grandes deleções e conversões gênicas. Este indivíduo pode, portanto, apresentar, no mesmo alelo onde detectamos a presença da mutação V281L, uma macroconversão ou deleção, o que justificaria o fenótipo perdedor de sal. Por outro lado outras mutações que reduzem gravemente a atividade enzimática ou também a anormalidades na região promotora ou dos fatores reguladores da transcrição podem, também, estar presentes. Não encontramos, em nosso estudo, fenótipo mais leve que o predito. Este achado tem sido descrito na literatura e os autores sugerem a existência de variações individuais no metabolismo dos hormônios, ou na sensibilidade dos tecidos aos andrógenos, ou ainda uma 21-hidroxilação extra- adrenal (Wilson *et al.*, 1995).

Das famílias estudadas com a forma virilizante simples, 2 indivíduos eram irmãos e 2 eram primos e apresentavam a mesma forma clínica da doença e os mesmos genótipos foram observados. O mesmo ocorreu em uma família que apresentava 2 irmãos com a forma perdedora de sal, evidenciando a relação do genótipo com o fenótipo nos

casos familiares. Entretanto, diferentes formas clínicas na mesma irmandade têm sido descritas e podem representar o envolvimento de três genes, quando um dos pais é afetado.

Casos de fenótipos e genótipos discordantes têm sido descritos na literatura (New *et al.*, 1989; Mornet *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992; Miller, 1994. Wilson *et al.*, 1995b). Uma das possibilidades para explicar estes achados seria a ocorrência de mutações raras ainda não identificadas nos mesmos alelos. Esta hipótese já foi anteriormente sugerida (Strachan, 1994; Wilson *et al.*, 1995b). O seqüenciamento completo dos alelos, provavelmente, permitirá a confirmação ou exclusão dessa hipótese. Ainda para explicar as discrepâncias entre genótipos e fenótipos, alguns autores propõem o envolvimento de outros genes que atuam na via metabólica do cortisol (Bornann *et al.*, 1992), inclusive enzimas com função de 21-hidroxilase, produzidas em outros tecidos que não a adrenal (Melo e Miller, 1989; Speiser *et al.*, 1991; Kronbach *et al.*, 1991. Endoh *et al.*, 1995). Observamos que os níveis basais de 17OHP, androstenediona e testosterona também se correlacionaram com a severidade do genótipo. A intensidade do hiperandrogenismo traduziu-se na gravidade da virilização da genitália externa, e observamos que a genitália PIV ocorreu com maior frequência no grupo A que no grupo B.

Em conclusão, em um total de 93 alelos estudados encontramos a mutação I172N em 20,4%, seguida pela V281L (18,2%) e IVS2, A/C>G, -12 (15%). A causa da deficiência da 21-hidroxilase foi determinada, por PCR alelo-específico, em 75,2% dos pacientes. A identificação dos genótipos não caracterizados necessitará de futuros estudos com técnicas de “Southern Blotting” e seqüenciamento direto do gene. Portanto, as mutações IVS2, A/C>G, -12 (Sp2), I172N e V281L apresentaram associação com a forma perdedora de sal, virilizante simples e a forma não clássica, respectivamente, demonstrando correlação genótipo-fenótipo.

O estabelecimento do genótipo nas famílias, com pelo menos um indivíduo afetado com HCA por deficiência de 21-hidroxilase, é útil para aconselhamento genético, diagnóstico pré-natal e possível tratamento pré-natal, com intuito de evitar ou minimizar a virilização da genitália externa de fetos femininos afetados. Adicionalmente, como a população brasileira apresenta alto grau de miscigenação, é necessário o estudo destas

doenças genéticas, de alta prevalência, no maior número de pacientes brasileiros, para que mutações já encontradas em outras populações sejam identificadas, e que novas mutações específicas da nossa população sejam, também, determinadas e, desta forma, seja possível o estudo de gene fundador.



CONCLUSÕES

- Em um total de 93 alelos estudados encontramos a mutação I172N em 20,4%, seguida pela V281L (18,2%) e IVS2, A/C>G,-12 (15%). As mutações IVS2, A/C>G, -12 (Sp2), I172N e V281L, apresentaram associação com a forma perdedora de sal, virilizante simples e a forma não clássica, respectivamente. A frequência das mutações foi semelhante a outros estudos populacionais mundiais e brasileiros.

- Observamos correlação do genótipo e fenótipo em relação à forma clínica. Os fenótipos que conferem total, grave e moderado comprometimento da atividade enzimática correlacionaram-se com as formas clínicas perdedora de sal, virilizante simples e não clássica, respectivamente.

- Finalmente, observamos que os níveis basais de 17OHP, androstenediona e testosterona também se correlacionaram com a gravidade do genótipo. A intensidade do hiperandrogenismo traduziu-se na gravidade da virilização da genitália externa.

- A abordagem metodológica utilizada neste estudo permitiu identificar a causa da deficiência da 21-hidroxilase em 75.2% dos pacientes

- O estabelecimento do genótipo nas famílias, com pelo menos um indivíduo afetado com HCA por deficiência de 21-hidroxilase, é útil para aconselhamento genético, diagnóstico pré- natal e possível tratamento pré-natal, com intuito de evitar ou minimizar a virilização da genitália externa de fetos femininos afetados.



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.*, 84: 1600-1604, (1998).

ARAÚJO, 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).

ARAÚJO, M. Estudo da organização molecular “cluser” gênico CYP21 e C4 em famílias com a forma clássica de deficiência da 21 – hidroxilase no Brasil. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, (1996).

BACHEGA, T.A.S.S., BILLERBECK, A.E.C.; 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, (1990).

BACHEGA, T.A.S.S.; BILLERBECK, A.E.C.; MADUREIRA, M; MARCONDES, J.A.M; LONGUI, C.A; LEITE, M. V.; ARNHOLD, I.J.; MENDONÇA, B.B. Molecular genotyping in Brazilian patients with classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 84:2870-2872, (1998).

BACHEGA, T.A.S.S.; BILLERBECK, A.E.C.; MADUREIRA, G.; ARNHOLD, I.J.; MEDEIROS, M; MARCONDES, J.A.M; LONGUI, C.A; NICOLAU, W.; BLOISE, W.; MENDONÇA, B.B. Low frequency of CYP21B deletions in Brasilia patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Human Heredity*, 49:9-14 (1998).

BARBAT, B.; BOGYO, A.; RAUX-DEMARY, M.C.; KUTTEN, F.; BOUE, J.; SIMON-BOUY, B.; SERRE, J.L.; MORNET, E. Screening of CYP21 gene mutation in 129 French patients affected by steroid 21-hydroxylase deficiency. *Hum. Mut.*, 5: 126-130, (1992).

BORNANN, M.; KOCHHAN, L.; KNOOR, 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.; MULLER, W.L. Abundant Adrenal-Specific Transcription of the Human P450c21^a. *J. Biol. Chem.*, 268:12919-12924, (1993).

CALLIARI, L.E.P. Hiperplasia adrenal congênita, em Endocrinologia para a pediatria, editado por Monte, & Carlos, A. Ed. Rio de Janeiro 115-124 (1992).

CARRERA, P.; FERRARI, M.; BECCARO, F.; SPIGA, I.; ZANUSSI, M.; RIGON F.; BRAGGION, F.; ZACCHELLO, F.; GREGGIO, N. Molecular Characterization of 21-Hydroxylase Deficiency in 70 Italian Families. *Hum. Hered.*, 43:190-196, (1993).

CARROLL, M.C.; CAMPBELL, R.D.; 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 Gene in HLA Major Histocompatibility Complex in Man. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 82:521-525, (1985a).

CARROLL, 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 Ile 172-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.; 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 specify amplification and PCR sequencing of individual members of multigene families: application to the study of steroid 21-hydroxylase deficiency. *PCR Methods and Application*, 1:181-186 (1992).

CRAWFOD, P.A.; SADOVSKY, Y.; WOODSON, K.; LEE, S.L.; HELMBERG, A.; TUSIE-LUSIE-LUNA, M.T; TABARELLI M.; KOFLER, R.; WHITE, P.C. R339H and P453: CYP21 mutations associate whit nonclassic steroid 21- hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversion. *Mol. Endocrinol.*, 6:1318-1322, (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 Cel Biol.*, 15:4332-4336, (1995).

DARDIS, A. BERGADA C.; RIVAROLA, M.; BELGOROSKY, A. Mutations of steroid 21-hydroxylase gene in a Argentinean population of 36 patients with classical congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Metab* 10(1):55-61 (1997).

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).

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).

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, (1996a).

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).

DUMIC, M.; BRKLJACIC L.; SPEISER, P.W.; WOOD, E.; CRAWFORD C. PLAVSIC, M.; RADMANOVIC. S.; RADIC, A.; KAYELAN A.; NEW, MI. An update on the frequency of nonclassic deficiency of adrenal 21-hydroxylase in the Yugoslav population. *Acta Endocrinol* 122: 703-710 (1990).

DUNHAM, I.; SARGENT, 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 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, 693-706, (1980).

ENDO, A.; NATSUME, H.; IGARASHI, Y. Dual regulation of 21-hydroxylase activity by Sex steroid rat hepatocytes. *J. Steroid Mol. Biol* 54:163-165 (1995).

EZQUIETA, B.; OLIVER, A.; GRACIA, R.; GANCEDO, P.G. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Hum. Genet.*, 96:198-204, (1985).

GILTEMAN, S.E.; BRISTOW, J. MILLER, W.L.; Mechanism and consequences of the duplication of the human C4/P450c21/gene X locus. *Mol. Cell Biol* 12(5):2124-2134 (1992).

GOBERMAN, 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).

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).

GRUMBACH, M.M.; CONTE, F.A., Disorders of sexual differentiation. In Wilson, J.D. Doarwe, D.W. (eds), 1985, Williams text book 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, (1997).

HELMBERG, A.; TISIE-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 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 Tenderly Arranged In Human Chromosome: A Pseudogene And Genuine Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83: 2841-2845, (1986).

HIGASHI, Y; TANAE, A; INOUE, H.; FUJI-KURIYAMA, Y. Conversion in the Steroid 21-Hydroxylase P-450 (C21) Gene: Implications for Steroid 21-Hydroxylase Deficiency. *Am. J. Hum. Gent.*, 42:17-25 (1988a).

HIGASHI, Y; TANAE, A; INOUE, H.; HIROSAMA, T.; FUJI-KURIYAMA, Y. Aberrant Splicing and Missense Mutations Cause Steroid 21-Hydroxylase [P450(C21)] Deficiency in Humans: Possible Gene Conversion Products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85:7486-7490, (1988).

HIGASHI, Y; HIROSAMA, 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 Pediatric 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).

JÄSKELÄINEN, J.; LEVO, A.; VOUTILAINEN, R.; PATENEN, 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).

JUNQUIERA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*, Sétima Edição, Editora Guanabara Koogan, Capítulo 20 (1990).

KAPELARI, K.; GHANAAT, 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.; DONOHOUE, 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).

KLOUDA, P.T.; HARRYIS, R.; PRICE, D.A. HLA and congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* II:1046 (1978).

KOHN, B.; DAY, D.; ALEMZDEH, R.; ENERIO, D.; PATEI, S.V.; PELCZAR, J.V.; SPEISER, P.W. Splicing mutation in CYP21 associated with delayed presentation of salt-wasting congenital adrenal hyperplasia. *Am J. Med. Genet.* 57:450-454 (1995).

KOPPENS, P.F.J.; HOGENBOENZEM, 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).

KRONBACH, T.; KEMPER, B.; JOHNSON, E.F. A hypervariable region of P450IIC5 confers progesterone 21-hydroxylase activity to P450IIC1. *Biochemistry* 30:6097-6102 (1991)

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.; EDSMO, L.; HOLST, M. Steroid 21-hydroxylase in the kidney: demonstration of levels of messenger RNA with the level of activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 52:181-186, (1995).

LAJIC, S.; WEDELL, A. An intron I 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 modeling of steroidogenic cytochromes P450 from families CYP11, CYP19 and CYP2 based on the CYP102 crystal structure. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 66:217-233, (1998).

LOBATO, M.N.; ORDONEX-SANCHEZ, M.L.; TISIE-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.; DONOHOU, P.A. Congenital Adrenal Hyperplasia Caused by 21-hydroxylase Deficiency. *Endocrinol. Metabol. Clin. North Am.*, 20:277-296, (1991).

MIGEON, C.J., DONOHOU, 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).

WHITE, P.C.; NEW, M.I.; DUPONT, B. Structure of human steroid 21-Hydroxylase genes. *Proc. Natl. Acad Sci, USA.*, 83:5111-5115, (1986).

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. *Anm. 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, (1988).

MOREL, Y.; ANDRÉ, J.; URING-LAMBERT, B.; HAUPTAMANN, G.; BÉTUEL, H.; TOSSI, M.; FOREST, M.G.; DAVID, M.; BERTRAND, J.; MILLER, W.L. Rearrangements and point mutations of P450c21 genes are distinguished by five restriction endonuclease haplotypes identified by a new probing strategy in 57 families with congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Invest.*, 83:527-536, (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-DEMARY, 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.; LORENZEN, 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., SPEISER, P.W. Congenital Adrenal Hyperplasia, *Pediatric Endocrinology*, Charles Book, ed., 441-462, (1989).

NEW, M.I.; WHITE, P.C.; PANG, S.; DUPONT, B.; SPEISER, P.W. The Adrenal hyperplasia, 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).

NEW, M.I. 21-Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 48:15-22, (1994).

NEW, M.I.; CRAWFORD, C. Molecular Genetics of Steroid 21-Hydroxylase Deficiency, *Molecular Genetics of Sex Determination*, p. 399-438, (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).

NIMLARN, S.; CERAME, B.I.; WEI, J.Q.; DUMIC, M.; ZUNEC, R.; BRKLJACIC, L.; CKRABIC, V.; NEW, M.I., WILSON, R. Congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) without demonstrable genetic mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 84:378-381, (1999).

OHLSSON, G.; SCHWARTZ, M. Mutations in gene encoding 21-hydroxylase detected by solid-phase mini sequencing. *Hum. Gent.*, 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-SANCHES, 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-hydroxylases deficiency in the Mexican population: identification of possible new mutation and high prevalence of apparent germ-line mutations. *Hum. Genet.*, 102:170-177, (1998).

OWERBACH, D.; CRAWFORD, Y.M.; DRAZNIN, M.B. Direct analysis of CYP21B genes in 21-hydroxylase deficiency using polymerase chain reaction amplification. *Mol. Endocrinol.* 4:125-131 (1990).

OWERBACH, D.; BALLARD, A.L.; DRAZNIN, M.B. Salt-wasting congenital Adrenal hyperplasia: detection and characterization of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene, CYP21, using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 74:553-558, (1992a).

OWERBACH, D.; SHERMAN, L.; BALLARD, A.L.; AZZOZ, R. pro 453-to-Ser mutation in CYP21 is associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency. *Molec. Endocr.*, 6:1211-1215, (1992b).

OWEBACH, D.; DRAZNIN, M.B.; CARPENTER, R.J.; GREENBERG, F. Prenatal Diagnostisis of 21-Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal hyperplasia Using The Polymerease Chain Reaction. *Hum. Gent.*, 89:109-110, (1992c).

PALDOSTTIR, A.; FOSSDAL, R.; ARNASOM, 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. *Immunogenectics.*, 25:299-304, (1987).

PANG, S.Y.; WALLACE, M.A.; HOFMAN, L.; THULINE, H.C.; DORCHE, C.; LYON, I.C.; DOBBINS, R.H.; KLING, S.; FUJIEDA, K.; SUWA, S. Wordtype experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 81:866-874 (1988).

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, Univesidade 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 Pediatr.*, 88:275-283, (1999).

PARTENEN J.; KOSHIMEIS, S.; SPILIÄ, I.; LIPSANEN, V. Major-histocompatibility-complex gene markers and restriction-fragment analysis of steroid 21-hydroxylase (CYP21) and complement C4 genes classical congenital adrenal hyperplasia patients in a single population. *Am J Hum genet* 44:660-670.

RICHARDS, G.E.; GRUMBACH, M.M.; KAPLAN, S.L.; CONTE, F.A. The effect of long acting glucocorticoids on menstrual abnormalities in patients with virilizing congenital adrenal hyperplasia. *J clin. Endocrinol. Metab* 47 (6):1208-1215 (1978).

RODRIGUES, N.R.; DUNHANM 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.; GRAT, D.B.; HJELM, M. Deletion of the steroid 21-hydroxylase and complement C4 genes in congenital adrenal hyperplasia. *J. Med. Genet.*, 23:204-209, (1986).

RUMSBY, G.; FIELDER, A.H.L.; HAGUE, W.M.; HONOUR, J.W. Heterogeneity in the Gene Locus for Steroid 21-hydroxylase Deficiency. *J. Med. Genet.*, 25:596-599, (1988).

RUMSBY, G.; HONOUR, J.W. *In vitro* gene amplification for prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *J. Med. Geneti.* 27:676-678 (1990).

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed., (1989).

SCHULZE, E.; SCHARER, G.; ROGATTZKI, A.; PRIEBE, L.; LEWICKA, S.; BETTENDORF, M.; HOEPFFNER, W.; HEINRICH, U.E.; SCHWABE, U. Divergence between genotype and phenotype in relative of patients with the intron 2 mutations of steroid 21-hydroxylase. *Endocr. Res.* 21:359-364 (1995).

SINNOTT, P.; COLLIER, S.; COSTIGAN, C.; DYER, P.A.; HARRIS, R.; STRANCHAN, 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.; MÁRCONI, M.; HARRIS, R.; SEVERI, F.; STRACHAN, T. CYP21/C4 Gene Organization In Italian 21-hydroxylase Deficiency Families. *Hum. Genet.*, 88:545-551, (1992).

SPEISER, P.W.; 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, DRI. *N. Engl. J. Med.*, 319:19-23, (1988).

SPEISER, P.W.; LAFORIDA, 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).

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.; TISIÉ-LUNA, M.; LESSER, M.; NEW, M. Disease Expression and Molecular Genotype in Congenital Adrenal Hyperplasia due 21-hydroxylase Deficiency. *J. Clin. Invest.* 90:584-595, (1992b).

SPEISER, P.W.; DUPONT, J.; ZHU, D.; SERRAT, J.; BUEGELEISEN, M.; TUSIÉ-LUNA, M.T.; LESSER, M.; NEW, M.I.; WHITE, P.C. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Invest.* 90:584-595, (1992).

STRACHAN, T. Molecular Genetics of Congenital Adrenal Hyperplasia. *Trends Endocr.*, 32:68-72, (1989).

STRACHAN, T. Molecular Pathology 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. Biol.* 40:537-543, (1991).

STRACHAN, T., WHITE, P.C. Molecular pathology of 21-hydroxylase deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.*, 17:430-441, (1994).

TAJIMA, T.; FIJIEDA, K.; FUJII-KURIYAMA, Y. *De novo* mutation causes steroid 21-hydroxylase deficiency in one family of HLA-identical affected and unaffected siblings. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* v77, 86-89, (1993).

TAJIMA, T.; FIJIEDA, K.; NAKAE, J.; TOYOURA, T.; SHIMOZAWA, K.; KUSUDA, S.; GOJI, K.; NAGASHIMA, T.; CUTLER JUNIOR, G. Molecular basis of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency detected by neonatal screening in Japan. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 2350-2356, (1997).

TAJIMA, T.; FIJIEDA, 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.; TRANKTMAN, P.; WHITE, P.C. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccine virus. *J. Biol. Chem.*, 265:20916-20922, (1990).

TUSIE-LUNA, M.T.; SPEISER P.W.; DUMIC, M.; WHITE, P.C. A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol Endocrinol* 5:685-692 (1991).

TUSIE-LUNA, M.T.; WHITE, P.C. Gene Conversion 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.; 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).

WEDEL, 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).

WEDEL, 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).

WEDEL, A.; LUTHMAN, H. Steroid 21-hydroxylase (P450c21): a new allele and spread of mutations through the pseudogene. *Hum. Genet.*, 91:236-240, (1993b).

WEDEL, A.; THEILÉN, A.; RITZÉN, E.M.; STENGLER, B.; LUTHMAN, 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 fo 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-Linkage Congenital Adrenal Hyperplasia results from a Defective Gene Encoding a Cytochrome P-450 Specific for Steroid 21-Hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81:7505-7509, (1984a).

WHITE, P.C.; NEW, M.I.; DUPONT, B. Cloning and expression of cDNA encoding a bovine adrenal cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.*, 81:1986, (1984b).

WHITE, P.C.; GROSSBERGER, D.; ONUFER, B.J.; CHAPLIN, D.D.; NEW, M.I.; DUPONT, B.; 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 Engl. 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.; TUSIE-LUNA, M.T.; NEW, M.I.; SPEISER, P.W. Mutations un steroid 21-hydroxylase (CYP21). *Hum. Mut.* 3:373-378, (1994).
- WHITE, P.C.AND SPEISER, P.W. Steroid 21-hydroxylase deficiency. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endo Rev. Journal. Clinical. Endocrinology. Metabolism.*, Jun;21(3):245-91. Review. (2000).
- 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 mutation in the 21- hydroxylase gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80:1635-1640, (1995a).
- WILSON, R.C.; MERCADO, A.B.; CHENG, K.C.; NEW, M.I. Steroid 21-hydroxylase Deficiency: Genotype May Not Predict Phenotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:2322-2329, (1995b).
- WU, Z.; CHUNG, B.C. Mutations of P450c21 (steroid 21-hydroxylase) at Cys428, Val281 and Ser 268 result in complete, partial, or no loss of enzymatic activity, respectively. *J. Clin. Invest.*, 88:519-823, (1991).
- ZHOUAGARWAL, 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).
- ZUBER, M.X.; JOHN, M.E.; OKAMURA, T.; SIMPSON, E.R.; WATERMAN, M.R. Bovine a adrenocortical cytochrome P-4517: regulation of gene expressionby ACTH and elucidation of primary. *J Biol Chem* 261: 1475 (1986).



ANEXOS

Tabela 9: Parâmetros clínicos e bioquímicos dos pacientes com a forma não clássica da HCA por deficiência da enzima 21-OH.

Paciente	Grau de virilização da genitália externa	Valor basal de 17-OHP (ng/ml)	Pico de 17-OHP Após ACTH	$\Delta 4$ /testosterona (ng/ml)	Idade ao diagnóstico ¹
1NC	P1	2.717	5.989	139,5/ < 12	Ao nascimento
2NC	P2	2.164	7.986	351/ --	5 anos
3NC	Pubarca Precoce P1	459,2	6.493	36,7/ 31,2	6 anos
4NC	Pubarca Precoce P1	2.200	6.400	24/ 84	4anos 9meses
5NC	Pubarca Precoce P1	1048	1.577,4	158,7/ 27,5	6 anos
6NC	Pubarca Precoce P1	1.400	5.539,8	118,7/ 27,5	6 anos
7NC	*	740	4.985	114/ 32	9 anos
8NC	*	1.781	2.348	327,4/ --	
9NC	Pubarca Precoce P1	558,8	1224,2	50/ 121,2	7 anos
10NC	—	—	—	—	—
11NC	Pubarca Precoce P1	308	5125	170,5/ 57,2	5 anos
12NC	*	350	2340	76,2/ 45,7	9anos 8meses
13NC	Pubarca Precoce P1	775,0	1.236,0	136/4,2	2anos 4meses

* sexo masculino, P: Prader, NC: Não clássica, 17-OHP: 17-hidroxiprogesterona, $\Delta 4$: androstenediona. Não foi possível analisar consangüinidade em todas famílias pelos dados obtidos dos prontuários.

Tabela 10: Parâmetros clínicos e bioquímicos dos pacientes com a forma virilizante simplesclássica da HCA por deficiência da enzima 21-OH.

Paciente	Grau de virilização genitália externa	Valor basa de 17-OHP (ng/ml)	Pico de 17-OHP Após ACTH	$\Delta 4$ / testosterona (ng/ml)	Sódio /Potássio	Idade ao diagnóstico
1VS	Pubarca Precoce -P1	11.000	–	280,0/ 97,5	–	9 anos
2VS	Pubarca Precoce	36.250	–	486,9 / 70,0	139,0/ 39,0	8 anos
3VS	Normal	11.000	–	368,4/ 60,0	136,0 / 4,9	6 meses
4VS	–	–	–	–	–	–
5VS	Genitália ambígua –P2	–	–	532,0	–	–
6VS	P3	–	–	58,0 / 84,4	137,0 / 6,9	Ao nascimento
7VS	P3	4.066	22.645	159,0 / 59,0	132,0 / 5,4	Ao nascimento
8VS	Macrogenitossomia	31.875	39.705	–	–	–
9VS	Macrogenitossomia	13.470	–	325,5 / 105,5	–	Ao nascimento
10VS	Macrogenitossomia	29.750	–	779,0 / 132,8	140,0 / 4,3	Ao nascimento
11VS	Macrogenitossomia	1.888	13.586	226,7 / 88,1	–	2 anos 7 meses
12VS	Macrogenitossomia	23.390	–	448,7 / 98,9	–	4 anos
13VS	P3	15.411	25.412	3.102 / 286	134,0 / 5,5	Ao nascimento
14VS	P1	–	–	160,0	139,0 / 4,9	1ano 1mes
15VS	P2-P3	673,0 ^(a)	–	–	–	–
16VS	Puberdade Precoce	6.125	–	578,0 / 105,3	137,6 / 4,2	5 anos 7 meses
17VS	Puberdade Precoce-P4	18.541	–	474,7/	–	2 anos 4meses

VS: virilizante simples, (a) sob uso de medicação, 17-OHP: 17-hidroxiprogesterona, $\Delta 4$: androstenediona. Não foi possível analisar consangüinidade em todas famílias pelos dados obtidos dos prontuários.

Tabela 11: Parâmetros clínicos e bioquímicos dos pacientes com a forma clássica perdedora de sal da HCA por deficiência da enzima 21-OH.

Paciente	Grau de virilização genitália externa	Valor basa de 17-OHP (ng/ml)	Pico de 17-OHP Após ACTH	$\Delta 4$ / testosterona (ng/ml)	Sódio /Potássio	Idade ao diagnóstico
1PS	Genitália ambígua- P3	37.784	—	7.225 / 648,0	122,0 / 6,0	26 dias
2PS	*	2.932 ^{(a)**}		3.814 / 262,5	112,0 / 7,3	13
3PS	Genitália ambígua- P3	—	—	-	116,0 / 10,0	Ao nascimento
4PS	P3	925,0 ^(a)	750,0	183,0 / 52,5	116,0 / 8,6	20 dias
5PS	*	583,0 ^(a)		95,4	94,5 / 7,9	25 dias
6PS	*	—	—	—	—	1 ano 4 meses
7PS	P2	530,0 ^(a)	—	176,0	127,0 / 8,0	Ao nascimento
8PS	*	1.417 ^(a)	1.341	18,0 / 38,7	113,0 / 6,0	1 mês
9PS	*	—	—	—	—	—
10PS	P 3	18.303	—	> 1.400 / 624	126,0 / 8,9	12 dias
11PS	P 3	32.620	—	1.775,0/ 609,0	106,0/ 8,1	23dias
12PS	P 3	7.560	—	100,0	130,0 / 5,2	20 dias
13PS	P 3	787,5 ^{(a)**}	—	349,0/ 90,0	93,0/ 6,4	34 dias
14PS	*	—	—	--/ 100,0	130,0/ 5.2	20 dias
15PS						
16PS	*	5.131,0	—	88,0 / 114,4	128,0 / 6,7	14 dias
17PS	P1	8.500	—	144,0/ 103,0	—	7 mês
18PS	P4	35.294	49.731	578,0	120,0 / 7,6	29 dias
19PS	P2	—	—	—	—	4 a
20PS	*	18.750	—	—	131,0/ 8,9	Ao nascimento

PS: perdedor de sal, (a) sob uso de medicação, 17-OHP: 17-hidroxiprogesterona, $\Delta 4$: androstenediona. Não foi possível analisar consangüinidade em todas famílias pelos dados obtidos dos prontuários.