

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Fernanda Caroline Soardi

**“MUTAÇÕES NOVAS NOS GENES *CYP21A2* E *CYP11B1* E SUAS
ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
FERNANDA CAROLINE SOARDI
Maricilda Palandi de Mello
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Co-Orientadora: Profa. Dra. Anna Wedell

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

| | |
|--------------|--|
| So11m | <p>Soardi, Fernanda Caroline Mutações novas nos genes <i>CYP21A2</i> e <i>CYP11B1</i> e suas alterações na atividade enzimática / Fernanda Caroline Soardi. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientadora: Maricilda Palandi de Mello. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Hiperplasia supra-renal congênita. 2. Mutagênese sítio-dirigida. 3. <i>Splicing</i> alternativo. I. Mello, Maricilda Palandi de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p> |
|--------------|--|

Título em inglês: New mutations in *CYP21A2* and *CYP11B1* genes and their effects upon the enzymatic activities.

Palavras-chave em inglês: Congenital adrenal hyperplasia; Site-directed mutagenesis; Alternative splicing.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Maricilda Palandi de Mello, Margaret de Castro, Marly Aparecida Spadotto Balarin, Sofia Helena Valente Lemos-Marini, Ericka Barbosa Trarbach.

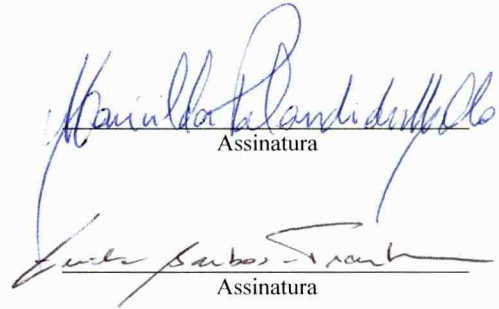
Data da defesa: 11/07/2008.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 11 de julho de 2008.

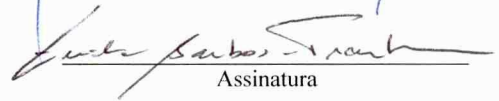
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello (Orientadora)
CBMEG-UNICAMP, Campinas-SP.



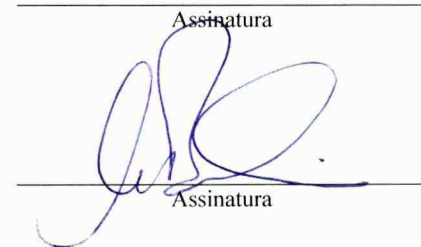
Assinatura

Dra. Ericka Barbosa Trarbach
Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento,
HC-FMUSP, São Paulo-SP.



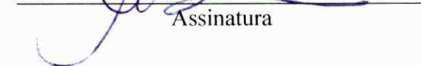
Assinatura

Profa. Dra. Margaret de Castro
Departamento de Clínica Médica, FMRP-USP,
Ribeirão Preto-SP.



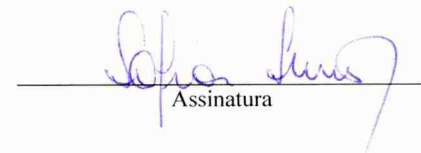
Assinatura

Profa. Dra. Marly Aparecida Spadotto Balarin
Departamento de Ciências Biológicas - UFTM,
Uberaba-MG.



Assinatura

Profa. Dra. Sofia Helena Valente Lemos-Marini
Departamento de Endocrinologia Pediátrica,
HC-UNICAMP, Campinas-SP.



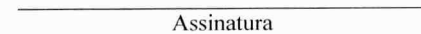
Assinatura

Profa. Dra. Angela Maria Spinola-Castro
Departamento de Pediatria - UNIFESP, São Paulo-SP.



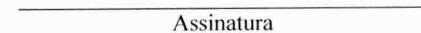
Assinatura

Profa. Dra. Camila Andréa de Oliveira
Núcleo de Pesquisas em Ciências da Saúde. Centro
Universitário Herminio Ometto, Araras-SP.



Assinatura

Dra. Marcela Araújo
Laboratório de Biologia Molecular, Centro Infantil de
Investigações Hematológicas "Dr. Domingos A. Boldrini",
Campinas-SP.



Assinatura

**Aos meus pais
Vera Beatriz e João Miguel**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à PROFESSORA Maricilda por ter acreditado em mim e no meu trabalho. Obrigada por todo apoio, confiança e amizade desenvolvida ao longo desses anos... Obrigada por tudo!

Jag skulle vilja tacka Anna Wedell som har tagit emot mig på sitt labb, samt litat på mig och mitt arbete.

Stort tack till Svetlana Lajic också, för att ha handledat mig, trott och stöttat mig på alla sätt. Tack så jättemycket för allting.

Ringrazio Michela per tutto l'aiuto e l'amicizia che mi ha dato.

Aos meus pais, João Miguel e Vera Beatriz, pelo amor incondicional, por todo o suporte, luta, orações, por nunca terem desistido e pelo exemplo de vida que vocês são!!! Aos meus irmãos: Rafaella “Fafa”, João Victor “Vitinho” e Egberto “Beto” por todo amor e confiança. Aos meus amados Bibia, Clarinha, Yasmin, Pri, Gui e Baby, por existirem! Amo vocês!

Ao My, meu amor, obrigada pelo companheirismo e apoio incondicional. À família que ganhei de brinde: “Cunhado” Myriano, “Sogra” Maria Helena, Mylena, Melyna e Rogério, muito obrigada pelo apoio e pelos bons momentos.

À minha avó Judite, *in memoriam*, pelo exemplo de vida e dignidade, por acreditar que tudo se constrói a partir da educação. Ao meu avô Honório, meus tios, primos, minha dinda amada Darça, obrigada por todo o apoio sempre!

Aos colegas e professores do CBMEG, muito obrigada pela amizade e “empréstimos”. Gostaria de agradecer em especial à Tânia, Sandra e Andreza pela amizade e auxílio na “logística”.

À profa. Gisele Zenker, à profa. Carmem Veríssima e ao pessoal do laboratório da profa. Carmem, por todo o auxílio e amizade.

Till mina vänner Virpi, Mike, Tiina och Anki: Tack för den tiden tillsammans, alla goda stunder och all hjälp.

People at KI, especially: Barbara, Britta, Louise, Bao Xia, Sun Bo, Tian Ling, Ana Beleza, Fabio, Gunther, Clara, Bying, Anna-Lena, Ângela, Arwa, Eniko, Natalija and Jessica. Thank you!!!

Meus queridos amigos “Sueco-Brasileiros” Solange e Daniel, por todo apoio, amizade, força, almoços, jantas... Muito obrigada por tudo!

Ao pessoal da “velha guarda” do laboratório: Marcela, Ivy, Juliana, Eliana, Lucy, Junia, Adelmo, Fer “1” Reis, Camila, Heloísa, Frau, Osmar, Hamilton, Diler, André, Marcelo, Dani, Bel, Lucio, Sandra, Alexandre, Ericka, Dud’s, profa.Christine ... Obrigada pela paciência e apoio!

Ao pessoal que está ou passou pelo laboratório nos últimos anos: Fer “3” Coeli, Mariana, Frau, Marinha “Mamys”, Ana “Cecília” Letícia, Zélo, Van-Van, Sueli, Renan, Creyto, Creuza, Cleidy, Victor, Milena, Flávia Flor, Flávia E., Paulo do Amor Divino, Carol Hortolândia, Carol PR, Carol Lincon, Rose, Bruna, Thalita, Reginaldo, RiCCardo, Sr. Rodrigo, Uiara, Márcinha, Martha, Raquel, Fran, Ju Gabriel, Denise, Carla, Jéssica, Paula, Érika “Su”, Dani Boy, Renata, Regiane, Luiz Eduardo, Tércio, Eduardo Porque, Jair, Karla, Bia, ... Provavelmente estou esquecendo alguns nomes, mas muito obrigada a todos pelos bons momentos e pela amizade!

À querida Madá, por toda paciência, amizade e bom humor sempre contagiante.

Ao Instituto de Biologia e ao Departamento de pós-graduação da Genética e Biologia Molecular. A profa. Anete Pereira, pela motivação e incentivo. Ao prof. Marcelo e ao prof. Wanderley pela agilidade em avaliar os pedidos e requerimentos. A Lourdes, por todo auxílio e disposição em ajudar, muito obrigada!!!

Aos meus amigos queridos, que vivenciaram a tensão “pré-tese” comigo: Juarez, Sandra, Júnia, Fer 3, Carol SP e Chiara. Obrigada pelo incentivo e pela amizade!

Às minhas amigas “Horrorosas”: Luli e Lene, obrigada pela amizade, apoio e orações.

Aos amigos: Kathe, Bru, René, Sônia, Sato, Willian, Ju e Lucy. Obrigada pela torcida e apoio.

À profa. Edi Lúcia e à Dra. Juliana por todas as sugestões e comentários na pré-banca.

À Fer 3, Mara, Rose e Len pela “segunda” leitura da tese, obrigada!!!

Às professoras que gentilmente aceitaram participar da banca de defesa, muito obrigada!

À equipe do “Buffetttt” da Tese, muito obrigada meninas!!!

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

Aos pacientes e seus familiares, muito obrigada por terem permitido a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta Tese:

OBRIGADA! THANKS! TACK!

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| ABREVIATURAS | xi |
| RESUMO | xiv |
| ABSTRACT | xvi |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| 1- As glândulas adrenais | 3 |
| 1.1- A esteroidogênese | 4 |
| 1.2- Hiperplasia congênita da adrenal | 6 |
| 1.2.1- Deficiência da CYP21A2 | 8 |
| 1.2.2- Deficiência da CYP11B1 | 14 |
| 1.2.3- Mutações pontuais: <i>missense</i> , <i>nonsense</i> e <i>frameshift</i> | 16 |
| 1.2.4- Mutações em sítio de processamento do pré-mRNA (<i>splicing</i> alternativo) | 18 |
| 1.2.5- Polimorfismos nos genes <i>CYP21A2</i> e <i>CYP11B1</i> | 21 |
| OBJETIVOS | 25 |
| Objetivos Gerais | 27 |
| CASUÍSTICA E MÉTODOS | 29 |
| 1- Casuística | 31 |
| 2- Obtenção das amostras de DNA | 35 |
| 2.1- Extração de DNA genômico a partir de sangue total periférico | 35 |
| 2.2- Quantificação do DNA genômico extraído | 36 |
| 2.3- Verificação da integridade do DNA genômico extraído | 37 |

| | |
|--|----|
| 2.4- Amplificação de fragmentos de DNA por reação de polimerização em cadeia - PCR | 37 |
| 2.5- Amplificação do gene <i>CYP21A2</i> | 38 |
| 2.6- Digestão com enzima de restrição | 39 |
| 2.7- Amplificação do gene <i>CYP11B1</i> | 40 |
| 2.8- Reação de seqüenciamento | 41 |
| 3- Investigação da atividade enzimática | 44 |
| 3.1- Manutenção e preparo das células COS-1 | 48 |
| 3.2- Preparação das células para transfecção | 48 |
| 3.3- Transfecção das células COS-1 com as construções plasmidiais | 49 |
| 3.4- Ensaio de 17-Hidroxiprogesterona (17-OHP)/ Progesterona (PROG) | 50 |
| 3.5- Ensaio de atividade enzimática | 51 |
| 3.6- Ensaio de concentração da proteína total | 52 |
| 3.7- Ensaio de β -galactosidase | 52 |
| 3.8- Análise dos resultados dos ensaios | 53 |
| 3.9- Cinética da proteína | 54 |
| 3.10- <i>Western blotting</i> | 55 |
| 3.11- Estudo <i>in silico</i> | 57 |
| 4- Construção dos mini-genes | 59 |
| 4.1- Amplificação dos fragmentos | 59 |
| 4.2- Preparação das células competentes para transformação por tampão químico | 61 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3- Clonagem em pGEM-T <i>easy</i> | 62 |
| 4.4- Extração de plasmídeo em pequena escala (mini-preparação) | 64 |
| 4.5- Clonagem em pSVL | 65 |
| 4.6- Identificação do inserto por PCR das colônias | 67 |
| 4.7- Descongelamento e cultura das células COS-7 | 68 |
| 4.8- Manutenção das células COS-7 | 68 |
| 4.9- Preparação das células para transfecção | 69 |
| 4.10- Transfecção com as construções dos mini-genes | 70 |
| 4.11- Extração do RNA total | 70 |
| 4.12- Síntese do cDNA | 71 |
| 4.13- Amplificação dos fragmentos de cDNA | 72 |
| RESULTADOS | 75 |
| 1- Triagem das mutações novas ou raras | 77 |
| 2- Investigação da atividade enzimática | 82 |
| 3- Estudo estrutural das proteínas mutantes | 86 |
| 4- Investigação de sítios de <i>splicing</i> | 89 |
| 4.1- Alteração IVS2+5G>A no gene <i>CYP21A2</i> | 90 |
| 4.2- Alteração IVS2-2A>G no gene <i>CYP21A2</i> | 92 |
| 4.3- Variações nucleotídicas g.1104A>C (IVS4-15A>C) + g.1111C>T (IVS48C>T) + g.1121C>G (p.D183E) no gene <i>CYP21A2</i> | 94 |
| 4.4- Mutação g.1753G>A (p.G267S), mini-gene do <i>CYP11B1</i> | 96 |

| | |
|--|------------|
| 5- Correlação genótipo-fenótipo | 100 |
| DISCUSSÃO | 103 |
| 1- Mutações presentes ou ausentes no pseudogene que dispensaram estudo funcional | 105 |
| 2- Mutações <i>missense</i> novas ou raras e estudo funcional | 107 |
| 2.1- Mutação p.G56R | 107 |
| 2.2- Mutação p.L107R | 109 |
| 2.3- Mutação p.L142P | 110 |
| 2.4- Mutação p.R408C | 111 |
| 2.5- Mutação p.H62L | 113 |
| 3- Mutações em sítios de <i>splicing</i> | 115 |
| 3.1- Alteração IVS2+5G>A no gene <i>CYP21A2</i> | 116 |
| 3.2- Alteração IVS2-2A>G no gene <i>CYP21A2</i> | 117 |
| 3.3- Variações nucleotídicas IVS4-Exon5 no gene <i>CYP21A2</i> | 119 |
| 3.4- Mutação g.1753G>A (p.G267S), mini-gene do <i>CYP11B1</i> | 120 |
| 5- Correlação genótipo-fenótipo | 121 |
| CONCLUSÕES | 127 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 131 |
| ANEXO 1- Declaração | 149 |
| ANEXO 2- Artigo Publicado | 153 |

ABREVIATURAS

β -gal - β -galactosidase

Δ 4-A - Δ 4-androstenediona

3'ss - sítio acceptor de *splice*

5'ss - sítio doador de *splice*

11-DOL - 11-desoxicortisol

17OHD - deficiência da 17α -hidroxilase

17OHP - 17-hidroxiprogesterona

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

AMH - hormônio anti-Mulleriano

BSA- albumina sérica bovina

C - forma clássica da deficiência de CYP21A2

c. - posição no cDNA

C4 - gene que codifica o quarto componente do complemento

cAMP - monofosfato de adenosina cíclica

CBMEG - Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética

COS-1 ou 7 - fibroblastos renais de macaco verde africano modificados com SV40

CRH - hormônio liberador de corticotrofina

CYP - família do citocromo P450

CYP11A1 - enzima colesterol 20,22-desmolase

CYP11B1 - enzima 11β -hidroxilase

CYP11B1 – gene que codifica a enzima 11β -hidroxilase

CYP11B2 - enzima aldosterona sintase

CYP11B2 - gene que codifica a enzima aldosterona sintase

CYP17 - enzima 17α -hidroxilase

CYP21A2 - enzima 21-hidroxilase

CYP21A2 – gene que codifica a enzima 21-hidroxilase

CYP21PA1 - pseudogene inativo do gene *CYP21A2*

DHEA - desidroepiandrosterona

DMEM - meio *Eagle* modificado por Dulbecco

DOC - desoxicorticosterona
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
g. - posição gênica
HCA - Hiperplasia congênita da adrenal
HLA - complexo principal de histocompatibilidade
HSD3B2 - enzima 3β-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2
IVS – do inglês *intervening sequence*
KH₂PO₄ - fosfato de potássio monobásico
K_m - constante de Michaelis-Menten
NADPH- nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato reduzida
NC - forma não-clássica da deficiência de CYP21A2
ONPG - 2-Nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
p. - Posição do aminoácido na proteína
PBS - solução tampão fosfato
PCR - reação de polimerização em cadeia (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)
PDB – banco de dados de proteínas (do inglês *protein data bank*)
PROG - progesterona
PS - forma clássica perdedora de sal da deficiência de CYP21A2
rpm - rotação por minuto
composto S - 11-desoxicortisol
SNP - polimorfismo de único nucleotídeo
snRNPs - pequenas ribonucleoproteínas nucleares
SR - proteínas ricas em serinas e argininas
SV40 – do inglês *Simian virus 40*
TBS-T - tampão salínico Tris com *tween20*
Tris - Tris(hidroximetil)aminometano
UTR - região não traduzida (do inglês *untranslated region*)
VS - forma clássica virilizante simples da deficiência de CYP21A2
Y - trato degenerado rico em bases pirimidinas
Wt - tipo selvagem ou normal (do inglês *wild type*)

RESUMO

A causa mais freqüente de hiperplasia congênita da adrenal (HCA) é a deficiência da enzima CYP21A2 responsável por cerca de 90% dos casos, seguida da deficiência de CYP11B1, a qual é responsável por 5-8%. A deficiência de CYP21A2 apresenta diferentes sintomas clínicos, que podem variar de uma forma leve não clássica (NC) a uma forma grave clássica, dividida em virilizante simples (VS) e perdedora de sal (PS). Enquanto a deficiência de CYP11B1 é classificada nas formas clássica e não-clássica, dependendo da gravidade do fenótipo. As diferentes formas destas deficiências estão associadas a mutações distintas ou a combinação de mutações nos genes, sendo estas mutações provenientes dos genes homólogos ou não. O primeiro objetivo desta tese foi identificar novas mutações em alelos de 31 pacientes. As variantes protéicas novas p.G56R, p.L107R e p.L142P e, as raras p.H62L, p.H62L+p.P453S e p.R408C do gene *CYP21A2* foram expressas para comparar as atividades da enzima CYP21A2 nas suas formas normal e mutantes. Foi objetivo, também, estudar através da técnica de mini-genes as possíveis alterações no processo de *splicing* para as variantes IVS2+5G>A, IVS2-2A>G, IVS4-15A>C+IVS4-8C>T+p.D183E do gene *CYP21A2* e para a variante g.1753G>A do gene *CYP11B1*. O estudo da atividade enzimática do gene *CYP21A2*, realizado pela técnica de mutagênese sítio-dirigida, demonstrou que as mutações p.L107R, p.L142P e p.R408C reduziram a atividade enzimática para valores praticamente nulos, classificando-as como responsáveis pela forma PS. A alteração p.G56R apresentou uma quantidade mínima de conversão de progesterona em desoxicorticosterona, quantidade suficiente para evitar a perda de sal, sendo considerada clássica associada à forma VS. A mutação p.H62L foi encontrada no mesmo alelo que a mutação p.P34L, em uma das pacientes da casuística desse trabalho, ambas inseridas num gene quimérico portador da deleção de 30 Kb. A mutação p.H62L também foi encontrada em associação com a mutação p.P453S, em dois pacientes de origem Escandinava. No estudo funcional a mutação p.H62L reduziu parcialmente a atividade enzimática. Os resultados cinéticos classificaram essa mutação como relacionada à forma NC da deficiência de CYP21A2. Em combinação com a mutação p.P453S, observou-se um sinergismo, uma vez que reduziu a atividade da enzima para a faixa limítrofe entre NC e VS. A investigação no processo de *splicing* utilizando a técnica de mini-genes para as alterações no gene *CYP21A2* indicou que a variação IVS2+5G>A causa a perda do exon 2 na formação do mRNA, sendo relacionada à forma PS. Da mesma forma, a variação IVS2-2A>G foi classificada como associada à forma PS, pois inseriu no mRNA 19 bases provenientes do intron 2 na junção exon2-exon3, o que modificou o *frame* de leitura do mRNA criando um códon de parada prematura. Por outro lado, ficou demonstrado que as variações IVS4-15A>C+IVS4-8C>T+p.D183E não interferem no processamento normal do mRNA do gene *CYP21A2*. No caso da alteração g.1753G>A no gene *CYP11B1*, que foi classificada como responsável pela forma clássica da deficiência de CYP11B1, o estudo de mini-gene indicou a perda dos últimos 45 nucleotídeos do exon 4, criando um códon de parada prematura. A elucidação do papel funcional e estrutural das mutações nos genes estudados permitiu o correto estabelecimento da correlação genótipo-fenótipo na maioria dos pacientes com HCA estudados.

ABSTRACT

Deficiency of CYP21A2 enzyme is responsible for more than 90% of congenital adrenal hyperplasia (CAH) followed by the deficiency of CYP11B1, which is responsible for 5-8% of the cases. The deficiency of CYP21A2 is normally classified in clinical forms that vary from a mild non-classical (NC) to a severe classical form, which can manifest as salt wasting (SW) or as simple virilizing (SV). Depending on the severity of phenotype, deficiency of CYP11B1 can be classified in classical or non-classical forms. In both deficiencies the clinical forms are associated with different mutations or combination of mutations, which may or may not be originated from the homologous genes. The aim of this study was to identify novel or rare mutations in alleles of 31 patients with CYP21A2 deficiency. Using site-direct mutagenesis strategies, nucleotide variants were introduced into the cDNA and the novel p.G56R, p.L107R and p.L142P and rare p.H62L, p.H62L+p.P453S and p.R408C protein variants of CYP21A2 were expressed to compare the enzymatic activity between the wild-type and mutant proteins. Furthermore, splicing activities were investigated for IVS2+5G>A, IVS2-2A>G, IVS4-15A>C+IVS4-8C>T+p.D183E sequence CYP21A2 variations and for g.1753G>A on *CYP11B1* gene by minigene constructions. The analysis of enzymatic conversion of both CYP21A2 substrates, 17-hydroxyprogesterone and progesterone, into 11-desoxycortisol and corticosterone, respectively, showed low levels of residual activities for p.L107R, p.L142P and p.R408C, which were classified as SW mutations. Whereas, the result of enzyme activity for p.G56R indicated that it might be a SV-related mutation due a residual activity of 1.4% toward progesterone as substrate. The p.H62L was associated to p.P34L mutation in a chimeric gene present in a 30-kb deletion allele in Brazilian patients. In Scandinavian patients, the p.H62L mutation was found associated to the p.P453S which is known as a NC mutation. The p.H62L itself showed an activity within the range of NC mutations. The apparent kinetic constant confirmed this classification. A synergistic effect was observed for the allele bearing the p.H62L+p.P453S combination as it had caused a significant reduction in the enzymatic activity bringing it to the borderline level between SV and NC mutations. On the minigene analyses for *CYP21A2*, the IVS2+5G>A variation showed skipping of exon 2, therefore this alteration was classified as SW mutation. Likely, IVS2-2A>G was considered as a SW mutation due to the insertion of 19 nucleotides from intron 2 into the resulting mRNA, which changed the reading frame and created a premature stop codon. Conversely, the group of variations IVS4-15A>C+IVS4-8C>T+p.D183E did not affect the normal splicing of *CYP21A2* mRNA. In the *CYP11B1* minigene analysis, the g.1753G>A nucleotide variation was classified as responsible for the classical form of deficiency. An alternative splicing due to disruption of the normal donor site was used and the skipping of the last 45 nucleotides of exon 4 was observed. This alteration modified the mRNA reading frame and created a premature stop codon. The elucidation of functional and structural characters of the steroidogenic gene mutations led to the establishment of a correct genotype-phenotype in most patients studied.

INTRODUÇÃO

1- As glândulas adrenais

As glândulas adrenais, ou supra-renais, são estruturas bilaterais situadas nos pólos superiores de cada um dos rins, geralmente envoltas por tecido adiposo. Cada glândula adrenal é composta de medula ao centro e do córtex na região periférica. Apesar de unidas, estas duas camadas possuem origem embrionária distinta (mesoderme e ectoderme, respectivamente). A medula secreta catecolaminas, epinefrina e norepinefrina em resposta a estimulação simpática. O córtex adrenal secreta um grupo de hormônios chamados de corticosteróides (mineralocorticóides e glicocorticóides) e também hormônios sexuais (esteróides androgênicos), e pode ser dividido histologicamente em três zonas concêntricas histologicamente distintas: glomerulosa, fasciculada e reticular (New, 1994).

Cada zona do córtex é responsável pela produção de diferentes tipos de hormônios. A zona glomerulosa, mais externa, produz mineralocorticóides (aldosterona e desoxicorticosterona), responsáveis pelo equilíbrio do sal no organismo. As células da zona fasciculada, intermediária, secretam glicocorticóides (cortisol e corticosterona), os quais estão envolvidos no metabolismo dos carboidratos. A zona reticular produz hormônios androgênicos, e também, em menor escala, produz glicocorticóides e outros hormônios como progesterona e estrógeno (Miller, 1991; New, 1994).

Os principais hormônios secretados pelo córtex adrenal são o cortisol (glicocorticóide) e a aldosterona (mineralocorticóide). O efeito global dos glicocorticóides no metabolismo é o catabolismo protéico, fornecendo glicose ao organismo através da transformação de proteínas. Isto ocorre via indução das enzimas da gliconeogênese no fígado. A aldosterona é regulada pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona e pelos níveis de potássio sérico. Os mineralocorticóides agem nos túbulos renais aumentando a reabsorção de íons de sódio pelos rins, saliva e trato digestivo (White, 1994).

O hipotálamo libera o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), também chamado de fator regulador de corticotrofina, que controla a secreção pela hipófise anterior do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A síntese do cortisol na zona fasciculada é controlada pelo ACTH, que se liga a receptores específicos na membrana plasmática das células do córtex adrenal e exerce controle sobre a secreção do cortisol, estimulando a

conversão do colesterol em pregnenolona, a etapa limitante da esteroidogênese adrenal. O cortisol plasmático é responsável pelo controle do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, regulando a produção de ACTH e CRH quando a concentração deles aumenta no sangue, mecanismo denominado de retroalimentação ou *feedback* negativo (White e Speiser, 2000).

1.1- A esteroidogênese

A principal substância que inicia a esteroidogênese é o colesterol, derivado de alimentos e da síntese endógena via acetato. O hormônio ACTH ao se ligar aos receptores de superfície das células do córtex das adrenais ativa a adenilciclase na dependência de Ca^{2+} , aumentando os níveis de 3'-5' monofosfato de adenosina cíclica (cAMP), a qual ativa as quinases adrenocorticais. A maior parte do colesterol livre usado para a síntese dos esteróides no córtex é derivada dos ésteres de colesterol das lipoproteínas plasmáticas estimulados pelas quinases dependentes de cAMP. O resultado é a fosforilação de enzimas que aumentam a taxa de conversão de colesterol a pregnenolona. A ação do ACTH nas glândulas adrenais é rápida, dentro de minutos após sua liberação há um aumento da concentração de esteróides no sangue venoso das adrenais (New *et al.*, 1989; Miller, 1991).

A diferença na produção dos hormônios adrenocorticais nas zonas é devido a diferentes sistemas enzimáticos esteroidogênicos (White e Speiser, 2000). Na via dos glicocorticóides, a pregnelona formada vai da mitocôndria ao retículo endoplasmático, onde é desidrogenada na posição 3 β pela 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (HSD3B2), originando a progesterona. Nas zonas reticular e fasciculada a enzima CYP17 (17-hidroxilase), catalisa a 17 α -hidroxilação da progesterona e da pregnenolona, sendo a 17 α -hidroxiprogesterona (17-OHP) precursora do cortisol. A 17-OHP em seguida é hidroxilada na posição 21 por outra enzima da família do citocromo P450, a 21-hidroxilase (CYP21A2), produzindo o esteróide 11-desoxicortisol (S). Este composto é transportado para a membrana interna da mitocôndria, onde é hidroxilado por uma quarta enzima da família do citocromo P450, a 11 β -hidroxilase (CYP11B1), dando origem ao cortisol (Figura 1) (White e Speiser, 2000; Nimkarn e New, 2008).

A CYP11B2, que participa das três etapas de conversão da desoxicorticosterona em aldosterona (Figura 1), é encontrada apenas na zona glomerulosa. A zona glomerulosa é deficiente na atividade da 17 α -hidroxilase, tornando esta zona incapaz de sintetizar cortisol ou androgênios. A progesterona é hidroxilada no carbono 21 (pela enzima CYP21A2) formando 11-desoxicorticosterona (DOC), que é hidroxilada, pela ação de 11 β -hidroxilase da enzima CYP11B2, produzindo corticosterona. A corticosterona, por sua vez, dá origem à aldosterona através da atividade de aldosterona sintase também exercida pela enzima CYP11B2. A secreção de aldosterona é regulada primariamente pelas concentrações de renina, angiotensina e potássio sérico (Nimkarn e New, 2008).

Na via dos andrógenos, a enzima CYP17 atua como 17,20-liase, convertendo a 17-hidroxi-pregnenolona e a 17-hidroxi-progesterona nos andrógenos dehidroepiandrosterona (DHEA) e Δ 4-androstenediona, respectivamente (Figura 1). O DHEA pela ação da HSD3B2 dá origem à Δ 4-androstenediona que é reduzida à testosterona pela enzima 17-cetoesteróide redutase (New *et al.*, 1989; White e Speiser, 2000).

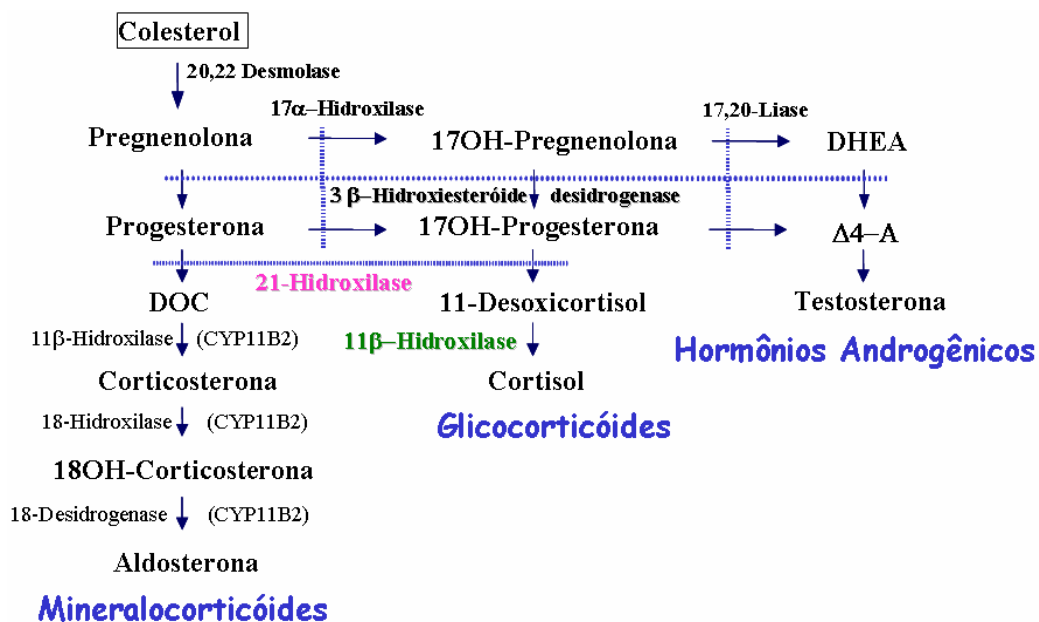


Figura 1. Esquema da esteroidogênese baseado em Calliari (1992). Onde: DOC – 11-desoxicorticosterona, DHEA- dehidroepiandrosterona, Δ 4-A- Δ 4-androstenediona.

1.2- Hiperplasia congênita da adrenal

Hiperplasia congênita da adrenal (HCA) é um erro inato do metabolismo da esteroidogênese do cortisol, com padrão de herança autossômica recessiva. A hiperplasia congênita da adrenal (HCA) é provocada por deficiência da atividade de qualquer uma das cinco enzimas necessárias para a síntese de cortisol a partir do colesterol, são elas: colesterol 20,22-desmolase (CYP11A1), 17 α -hidroxilase (CYP17), 21-hidroxilase (CYP21A2), 11 β -hidroxilase (CYP11B1) e 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (HSD3B2). Um dos resultados dessas deficiências enzimáticas é a diminuição da produção de cortisol com o aumento da secreção de ACTH e, conseqüentemente, o super-estímulo da glândula levando à hiperplasia (New, 2004).

Dentre as principais formas de HCA, se destaca a deficiência da CYP21A2 que ocorre em cerca de 90-95% dos casos. Em um estudo multicêntrico envolvendo 125 instituições da Sociedade Européia de Endocrinologia Pediátrica (ESPE), 6.500 pacientes com HCA foram analisados, sendo 95% dos casos devido à deficiência da CYP21A2 (Riepe *et al.*, 2002). A incidência da deficiência de CYP21A2 é de cerca de 1:14.000 nascimentos para a forma clássica de HCA (Miller e Morel, 1989). Enquanto que a incidência para a forma não-clássica é de 1:100 (New, 1998). A frequência de heterozigotos normais na população, obtidos pela equação de Hardy-Weinberg, é calculada em cerca de 1 para 60 portadores heterozigotos (Pang, 1998). Na maioria das populações, a deficiência da CYP11B1 compreende em torno de 5-8% dos casos de hiperplasia congênita da adrenal (Zachmann *et al.*, 1983), com uma incidência de 1:100.000 nascimentos. Esta deficiência é mais frequente em populações que apresentam grande número de casamentos consanguíneos (Al-Jurayyan, 1995), como é o caso de judeus Marroquinos onde a incidência estimada é de 1 para 5.000 nascimentos (Rösler *et al.*, 1992).

Outros casos de HCA estão associados às deficiências mais raras de CYP11A1, CYP17 e HSD3B2. A enzima CYP11A1 converte o colesterol em pregnenolona no primeiro passo da esteroidogênese. Deficiência da atividade enzimática de CYP11A1 causa a deficiência de todos os hormônios esteróides incluindo a progesterona, a qual é essencial para manter a gravidez até o término, e está associada à insuficiência adrenal e sexo reverso

em pacientes 46,XY (al Kandari *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008). A deficiência da 17 α -hidroxilase (17-OHD) (Biglieri *et al.*, 1966) é caracterizada por insuficiência adrenal, hipertensão, amenorréia primária e infantilismo sexual em pacientes do sexo feminino. Enquanto que os pacientes do sexo masculino podem apresentar pseudohermafroditismo masculino, um baixo grau de virilização acompanhado de ginecomastia (Yang *et al.*, 2006; Won *et al.*, 2007). A deficiência clássica de HSD3B2 (Bongiovanni *et al.* 1962) é uma forma grave de HCA, que afeta toda a esteroidogênese, tanto nas adrenais quanto nas gônadas (Simard *et al.*, 1993). Pacientes do sexo masculino apresentam pseudohermafroditismo e masculinização incompleta da genitália externa, enquanto que no sexo feminino pode ocorrer uma diferenciação normal ou genitália externa ambígua (Simard *et al.*, 2002).

Apesar da virilização dos fetos do sexo feminino, o sexo genético e a diferenciação gonadal são normais em pacientes com HCA. Dado que a diferenciação dos órgãos internos masculinos é determinada pela ação dos hormônios testosterona e anti-Mulleriano (AMH), produzidos em quantidades suficientes apenas nos testículos. A testosterona direciona a formação das estruturas genitais masculinas a partir dos ductos de Wolff, enquanto o AMH suprime o desenvolvimento dos ductos Mullerianos nas estruturas internas femininas (Huma *et al.*, 1995). Indivíduos do sexo masculino podem apresentar virilização precoce devido ao hiperandrogenismo, podendo ser acompanhado de surgimento de pelos púbicos, faciais e axilares (New *et al.*, 1989).

Tanto a deficiência da enzima CYP21A2 como a da CYP11B1 bloqueia a via dos glicocorticóides e causa um excesso da produção de andrógenos, levando à virilização de fetos do sexo feminino, devido a um desvio de síntese na esteroidogênese. No entanto, os efeitos dos diferentes bloqueios enzimáticos na síntese de mineralocorticóides resultam em sintomas distintos: na forma grave da deficiência da CYP21A2, a não produção de aldosterona leva à perda de sal, à desidratação e à hipotensão arterial, enquanto na deficiência da CYP11B1, o acúmulo do metabólito, 11-desoxicortisol na zona fasciculada causa um desvio de síntese em sentido aos hormônios androgênicos e aos mineralocorticóides. Devido a este desvio em sentido aos mineralocorticóides ocorre um aumento de 11-desoxicorticosterona na zona glomerulosa, o que em alguns indivíduos com

deficiência de CYP11B1 pode causar retenção de sódio e hipertensão (Zachmann *et al.*, 1983; Rösler *et al.*, 1982).

Desta forma, as enzimas CYP21A2 e CYP11B1 são produzidas no córtex da adrenal e participam da via metabólica de síntese de cortisol, sendo que a CYP21A2 participa também da síntese de aldosterona (White *et al.*, 1989). A CYP21A2 cataliza a hidroxilação da 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) para formação do 11-desoxicortisol (S) na via dos glicocorticóides e converte progesterona em 11-desoxicorticosterona (DOC) na via dos mineralocorticóides. Enquanto a CYP11B1 atua somente na via dos glicocorticóides onde converte o 11-desoxicortisol (S) em cortisol.

1.2.1- Deficiência da CYP21A2

A deficiência da CYP21A2 é clinicamente classificada em duas formas: a forma clássica (C), presente ao nascimento, se caracteriza pelo o bloqueio total ou quase total da atividade enzimática e, a forma não clássica (NC), que envolve somente bloqueio parcial tardio da atividade enzimática, sendo geralmente menos grave que a forma clássica, podendo se manifestar na fase peri-puberal (Speiser *et al.*, 1985; Lajic e Wedell, 1996).

A forma clássica, por sua vez, pode ser subdividida em duas variantes, a forma perdedora de sal (PS), na qual os indivíduos afetados, além da virilização, apresentam perda de sal devido à deficiência da síntese de aldosterona; e a forma virilizante simples (VS) na qual apenas a síntese do cortisol é alterada (New e Levine, 1984; New, 1994).

Assim, pacientes portadores da deficiência de CYP21A2 não convertem 17-OHP e progesterona nos produtos esperados, o que além de estimular o aumento da glândula devido ao desbloqueio do *feedback* negativo gera um desvio de síntese no sentido da produção e secreção dos andrógenos DHEA e Δ 4-androstenediona (andrógeno de atividade moderada) e conseqüentemente, um aumento na quantidade de testosterona (Miller e Morel, 1989). A partir do terceiro mês de gestação o córtex da adrenal está em plena atividade, expondo o feto a elevados níveis de andrógenos em um período crítico para o desenvolvimento sexual intra-útero, originando indivíduos femininos com ambigüidade genital. Desta maneira, no sexo feminino a forma clássica da deficiência de CYP21A2 está

cl clinicamente presente ao nascimento, podendo manifestar-se em diferentes graus, variando de uma clitoromegalia até a fusão completa dos grandes lábios formando um escroto (sem gônadas), conforme classificação de Prader (Figura 2).

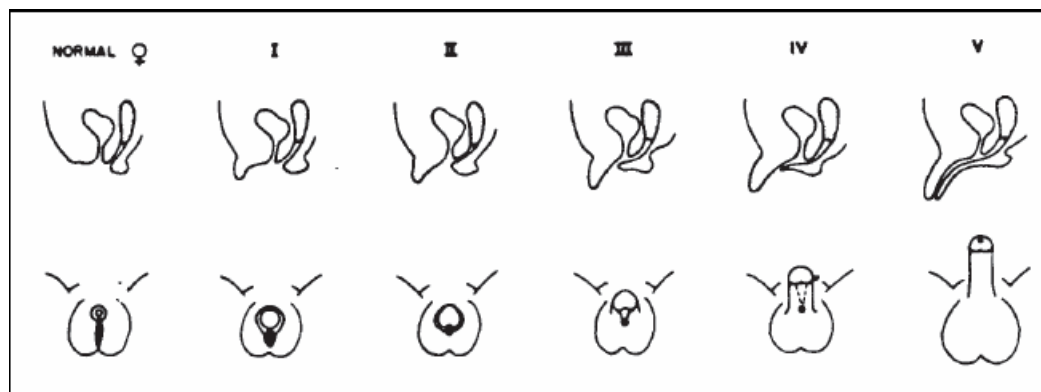


Figura 2. Virilização da genitália externa segundo Prader (extraído de Miller, 1991). Na parte superior, corte sagital do espectro contínuo desde uma genitália feminina normal até uma masculina normal (V). Na parte inferior, visão perineal dos vários graus de virilização da genitália externa.

O mapeamento genético indicou que o gene da *CYP21A2* (*CYP21A2*) se localiza no braço curto do cromossomo 6, na região do complexo principal de histocompatibilidade (HLA), adjacente aos loci *C4A* e *C4B*, os quais codificam para o quarto componente do complemento (Dupont *et al.*, 1977; Dupont *et al.*, 1980). Verificou-se que existem duas cópias do gene, *CYP21A2* (forma ativa) e *CYP21PA1*, um pseudogene não funcional (White *et al.*, 1985). Os genes *CYP21A2* e *C4* são alternados entre si e são transcritos na mesma direção. O gene *CYP21A2* contém 10 exons, cobrindo uma região cromossômica de 2,7 kb. Embora *CYP21A2* e *CYP21PA1* tenham aproximadamente 98% de similaridade nos exons, *CYP21PA1* é um pseudogene por apresentar mutações deletérias (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986; Hughes, 2003).

Uma consequência da organização em tandem dos genes *CYP21* e *C4* é que esta favorece eventos de *crossing-over* desigual nessa região (White *et al.*, 1985; Strachan e White, 1991). Portanto, a recombinação das unidades mal pareadas durante a meiose I pode

levar à formação de gametas com um número variável de unidades completas (Werkmeister *et al.*, 1986).

Assim, o primeiro defeito molecular observado no gene *CYP21A2* e relacionado com HCA foi uma deleção (Carrol *et al.*, 1985; Rumsby *et al.*, 1986). Em seguida foram descritos eventos de conversão (Harada *et al.*, 1987; Urabe *et al.*, 1990). Nos dois casos há a formação de genes híbridos (Figura 3), formados por *CYP21A1P/CYP21A2* (White e New, 1992; L'Allemand *et al.*, 2000).

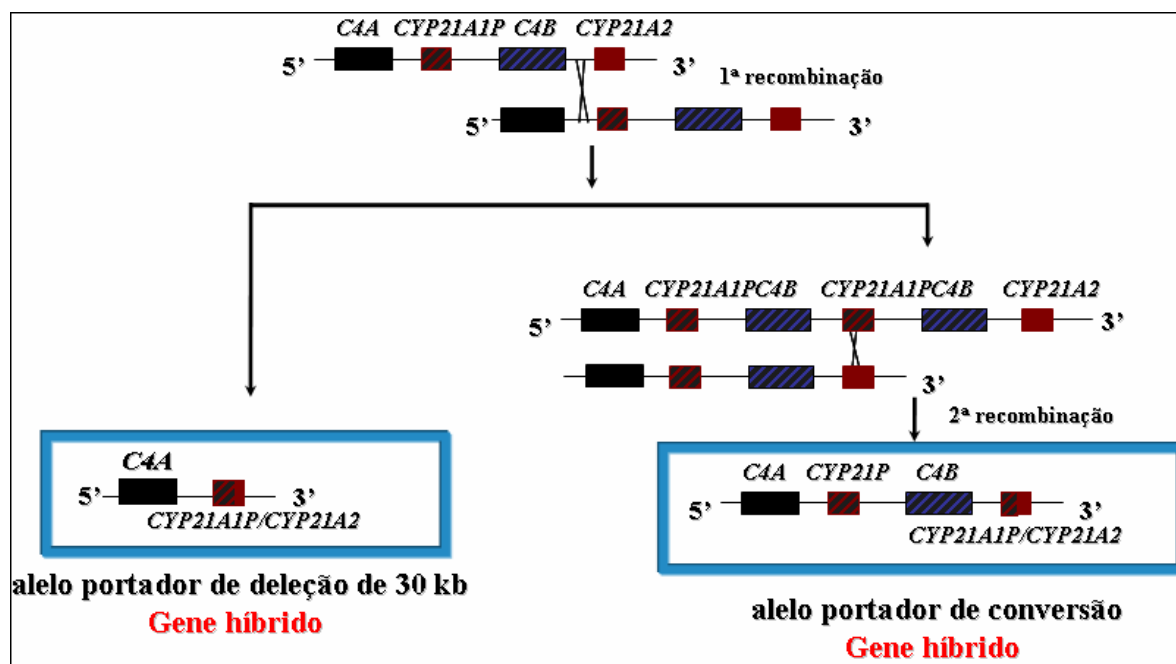


Figura 3. Formação dos alelos com número alterado de cópias gênicas no locus *C4/CYP21*. Os vários pontos de recombinação estão indicados por letras minúsculas e os genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2* formados através de eventos de deleção e conversão gênica em larga escala estão em destaque nos quadros.

Estes dois tipos de mutação explicam 20-30% dos casos de deficiência da *CYP21A2* em Norte-Americanos, Japoneses e na maioria dos países europeus (Carrol *et al.*, 1985; Harada *et al.*, 1987), enquanto em Eslovenos chegam a explicar 36,4% dos casos (Dolzan *et al.*, 2003). No caso de Mexicanos e Sul-Americanos, incluindo brasileiros, essa

porcentagem é menor, cerca de 10% (Araújo *et al.*, 1996; Tusié-Luna *et al.*, 1996; Dardis *et al.*, 1997; Bachega *et al.*, 1999; Paulino *et al.*, 1999). Sendo que, nestas populações, pequenas deleções, inserções e trocas pontuais de nucleotídeos são mais freqüentes e estão normalmente presentes no pseudogene sendo consideradas microconversões (Globerman *et al.*, 1988; Mornet *et al.*, 1991; Higashi *et al.*, 1988) (Figura 4).

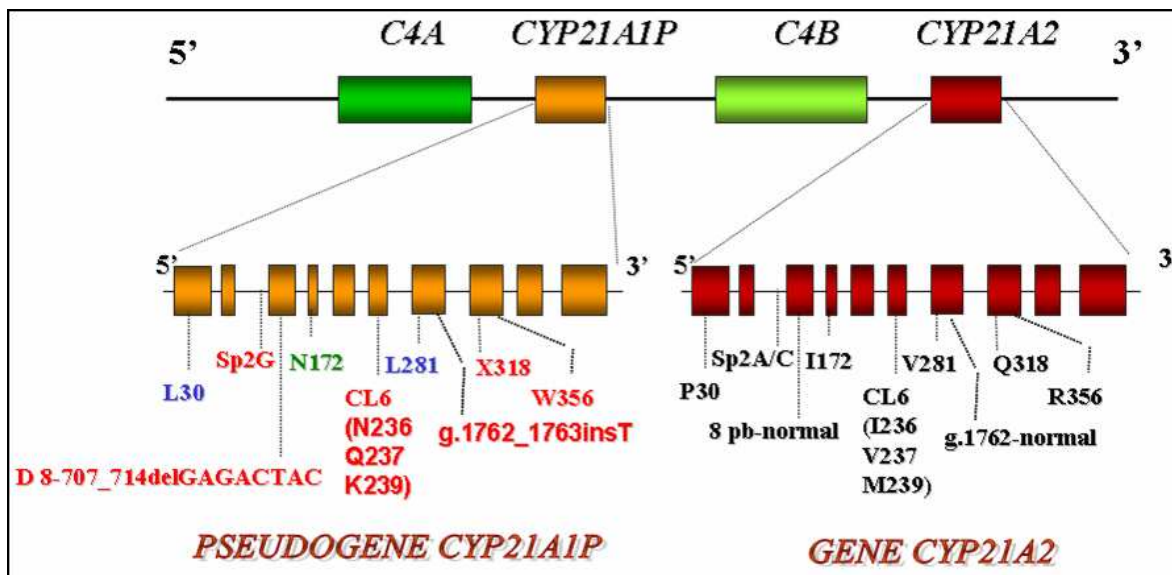


Figura 4. Alterações presentes no pseudogene que são frequentemente transferidas para o gene ativo *CYP21A2*. Em azul as mutações causadoras da forma NC, em verde a causadora da forma VS e em vermelho as mutações causadoras da forma PS da deficiência de *CYP21A2*.

Em geral, estudando-se deleções, conversões e microconversões consegue-se determinar cerca de 85% dos alelos afetados, ficando em média 15% atribuídos a mutações raras que são identificadas somente por seqüenciamento direto do gene *CYP21A2* (Lajic e Wedell, 1996). O estudo de famílias realizado em nosso laboratório não fugiu à regra, numa porcentagem de 13% de alelos não foi encontrada nenhuma das alterações mais comuns no gene *CYP21A2* (Araújo *et al.*, 1996; Paulino *et al.*, 1999).

Por outro lado, há algumas mutações que, embora não tenham sua origem no pseudogene, têm sido descritas em baixas freqüências (Wedell *et al.*, 1992; Owerbach *et*

al., 1992; Helmberg *et al.*, 1992a). Assim, podem representar um efeito fundador, como exemplificado pela mutação p.G424S descrita na população Brasileira (Billerbeck *et al.*, 1999). A mutação p.G424S foi encontrada em sete pacientes de cinco famílias não relacionadas, três das quais de origem não-branca, onde todos os alelos portadores desta mutação apresentavam também deleção de *CYP21A1P* e *C4A*. Esses dados levam à suposição de que os alelos que carregam essa mutação são freqüentes na população Brasileira, indicando um efeito do fundador para esta mutação.

Quando transferidas para o *CYP21A2*, cada uma das mutações encontradas no *CYP21PA1* provoca danos com diferentes graus de efeito na função enzimática (Figura 4). As mutações do tipo *frameshift*, *nonsense* e que causam *splicing* alternativo alteram drasticamente a estrutura e a função da proteína geralmente abolindo a atividade enzimática. Frequentemente estão associadas com a forma clínica mais grave da doença, perdedora de sal. Enquanto mutações do tipo *missense* podem dar origem a diversas formas fenotípicas da deficiência da *CYP21A2*.

Levando-se em conta a heterozigose com duas mutações diferentes no gene *CYP21A2*, o fenótipo deve ser deduzido por aquela que determinar menor dano à atividade enzimática. Assim, a forma clínica PS seria apenas determinada pela combinação de duas mutações graves, a forma VS por uma grave e uma intermediária ou por duas intermediárias e a não clássica por duas mutações menos graves ou uma menos grave combinada com uma grave ou com uma intermediária. Há, entretanto, vários portadores da deficiência que não se enquadram neste padrão (Miller, 1991; Mornet *et al.*, 1991, Krone *et al.*, 2000).

O fenótipo VS é resultado de uma mutação da enzima *CYP21A2* que afeta a atividade frente ao substrato 17-OHP na via dos glicocorticóides e mantém a produção da aldosterona relativamente intacta na via dos mineralocorticóides. Assim, a causa mais provável da diferença fenotípica entre as formas VS e PS, é a diferença da atividade de *CYP21A2* frente aos substratos progesterona e 17-OHP. Como a aldosterona é normalmente secretada numa razão de 100-1000 vezes menor do que o cortisol torna-se evidente que a atividade da *CYP21A2* terá que diminuir a níveis extremamente baixos para que a falta de aldosterona se manifeste (Strachan, 1990; Helmberg, 1993). Assim, a síntese de aldosterona ocorre com uma quantidade mínima de atividade normal da *CYP21A2* ($\geq 1\%$), evitando a perda de sal

e resultando num fenótipo VS (White e New, 1992). A microconversão comumente associada a esse fenótipo é a mutação proveniente do pseudogene p.I172N, que mantém cerca de 2% de atividade da enzima CYP21A2 (Amor *et al.*, 1988; Chiou *et al.*, 1990).

A forma não-clássica da deficiência de CYP21A2 não resulta em ambigüidade genital ao nascimento, e as características clínicas variáveis devido ao excesso de andrógenos aparecem mais frequentemente na fase peri-puberal e na vida adulta (New, 1994). Dentre as microconversões associadas ao fenótipo não-clássico destacam-se as mutações p.V281L e p.P30L. A mutação p.V281L confere uma atividade residual $\geq 20\%$ à enzima CYP21A2 (Tusie-Luna *et al.*, 1990). Essa alteração é a mais freqüente causadora da forma NC em diferentes populações (Dolzan, *et al.*, 2005; Pasqualini *et al.*, 2007), está frequentemente presente em alelos com 3 unidades de *C4/CYP21* (Mornet *et al.*, 1991) e pode se apresentar combinada com outras mutações no mesmo alelo (Concolino *et al.*, 2007). A mutação p.P30L é uma das mais freqüentes causadoras da forma NC (Kotaska *et al.*, 2003; Grigorescu *et al.*, 2005), a qual é frequentemente encontrada em alelos contendo genes híbridos (Tajima *et al.*, 1997; Menassa *et al.*, 2008). Entretanto esta mutação confere uma atividade residual $\geq 10\%$ à enzima CYP21A2 (Hu *et al.*, 1996), valor limítrofe entre VS/NC, o que acarreta em alguns casos à associação como causadora da forma VS (Janjanin *et al.*, 2007). Além destas microconversões, uma mutação não proveniente do pseudogene, a p.P453S, é descrita em alta freqüência como causadora da forma NC em diferentes populações (Stikkelbroeck *et al.*, 2003; Balsamo *et al.*, 2003), conferindo uma atividade enzimática $\geq 60\%$ à CYP21A2 (Lajic *et al.*, 2002).

A associação entre a forma clínica e a classe da mutação patológica discutida na literatura é geralmente concordante, porém a distinção entre as formas VS, PS e NC não é absoluta (Sinnott *et al.*, 1992; Speiser *et al.*, 1992; Wedell *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1995a; Koppens *et al.*, 1998; Krone *et al.*, 2000; Balsamo *et al.*, 2003).

1.2.2- Deficiência da CYP11B1

A deficiência da CYP11B1 foi primeiramente relatada por Bongiovanni e Eberlein em 1955. Glenthoj *et al.* em 1980 descreveram a deficiência da CYP11B1 em três pacientes adultos que tinham sido inicialmente diagnosticados como deficiência de CYP21A2. Desde então, relativamente poucos casos têm sido relatados, sendo a maioria em filhos de casais consanguíneos (Kuribayashi *et al.*, 2003; Cingoz *et al.*, 2007; Nimkarn e New, 2008).

Na HCA devido à deficiência da CYP11B1 ocorre diminuição da produção de cortisol com superprodução de andrógenos e mineralocorticóides. A secreção intra-útero excessiva dos andrógenos adrenais produz virilização de fetos femininos (Nakagawa *et al.*, 1995; Geley *et al.*, 1996; White e Speiser, 2000). Em caso de tratamento inadequado, a manutenção da secreção aumentada de andrógenos durante a vida pós-natal, causa agravamento da virilização, além de outros sinais de hiperandrogenismo como pubarca precoce, crescimento excessivo com avanço da idade óssea, aumento da massa muscular, acne, hiperpigmentação de mamilos e genitais (Hochberg *et al.*, 1985).

A HCA devido à deficiência de CYP11B1 é resultado de mutações no gene *CYP11B1* que codifica a enzima (Mornet *et al.*, 1989). Além deste, existe um segundo gene, o *CYP11B2* em 8q21 extremamente similar (Mornet *et al.*, 1989; Kawamoto *et al.*, 1990; Curnow *et al.*, 1991). No entanto, ao contrário de *CYP11B1*, *CYP11B2* não foi detectado em tecidos da zona fasciculada por técnica de *Northern Blotting*. A análise do padrão de restrição de ambos os genes demonstrou que não se tratava de variação alélica, mas sim de dois genes íntegros (Mornet *et al.*, 1989).

À semelhança dos genes para CYP21A2, a presença de dois genes para CYP11B1 parece ser o resultado da duplicação do gene original (*CYP11B*) (Strachan, 1989). Porém, ao contrário de *CYP21PA1* e *CYP21A2*, os dois genes em 8q21 são ativos, e produzem duas isoenzimas e citocromos diferenciais na membrana interna mitocondrial (Mitani *et al.*, 1995). Os genes *CYP11B1* e *CYP11B2* apresentam 9 exons e 8 introns, dispostos em 7 Kb de extensão e separados entre si por 40 Kb. São 95% similares na seqüência nucleotídica dos exons, 97% nos introns e 93% na seqüência de aminoácidos das isoenzimas. As seqüências de menor homologia concentram-se nas regiões terminais 5' (*upstream* ao

códon de iniciação ATG). A posição dos introns, incluindo as seqüências sinalizadoras de *splicing*, são homólogas, correspondentes entre si (White *et al.*, 1991). Ambos os genes transcrevem mRNAs para enzimas com 503 aminoácidos, apresentando 24 resíduos excisáveis no momento da internalização na membrana mitocondrial (peptídio sinal).

Aparentemente, a duplicação de *CYP11B* iniciou um processo de especialização das funções metabólicas das enzimas que culminou na separação espacial de sua expressão na glândula (White *et al.*, 1994). O transcrito de *CYP11B1* codifica para uma enzima com atividade pura de 11 β -hidroxilase, na zona fasciculada, comprometida com a síntese de cortisol (Erdmann *et al.*, 1995). O *CYP11B2*, por sua vez codifica uma segunda enzima intrinsecamente capaz de agir como 11 β -hidroxilase, 18-hidroxilase e 18-oxidase, na zona glomerulosa (Curnow *et al.*, 1991; White *et al.*, 1994). Como os genes *CYP11B1* e *CYP11B2* são ativos e expressam mRNAs distintos, a probabilidade de perpetuação de mutações deletérias, devido à recombinação em emparelhamento desigual com o gene homólogo, é pouco significativa (White e Slutsker, 1995). Assim, genes híbridos *CYP11B1/CYP11B2* resultantes de processos de duplicações por recombinação intergênica, justapondo o promotor do *CYP11B1* com seqüências codificadoras do *CYP11B2*, acontecem e estão associados aos casos de hiperaldosteronismo controlável por glicocorticóides (Helmberg, 1993; MacConnachie *et al.*, 1998). Neste processo o gameta gerado apresenta o gene híbrido intercalado aos genes *CYP11B2* e *CYP11B1*. Enquanto o gene quimérico recíproco (*CYP11B2/CYP11B1*), resultante de um evento de deleção, está associado à deficiência de 11 β -OH (Hampf *et al.*, 2001; Portrat *et al.*, 2001).

Mutações deletérias no gene *CYP11B1* estão presentes nas análises de DNA de pacientes com deficiência de *CYP11B1* e são correlacionadas com alterações em sítios importantes da enzima (mutações *missense*) ou com interrupções da transcrição normal do gene gerando mRNA alterados (mutações *nonsense* ou *frameshift*) (White *et al.*, 1991; Helmberg *et al.*, 1992b; Naiki *et al.*, 1993; Curnow *et al.*, 1993; Skinner e Rumsby, 1994; Nakagawa *et al.*, 1995; Geley *et al.*, 1996). Alterações em sítios de *splicing* também estão presentes no gene (Hampf *et al.*, 2001; Nicod *et al.*, 2004), podendo ou não ser deletérias.

A maioria das mutações deletérias para a hidroxilação em c11 de *CYP11B1* estão situadas no exon 2 e entre os exons 6-8 (Curnow *et al.*, 1993), formando um *cluster* de

mutações. Duas hipóteses básicas têm sido levantadas para explicar essa concentração: mutações nessas regiões aconteceriam com a mesma frequência que no resto dos exons, porém teriam maior probabilidade de serem deletérias na atividade enzimática ou a região do *cluster* representaria uma área *hot-spot* no gene de CYP11B1, estando por alguma razão mais susceptível a mutações (Cooper e Youssoufian, 1988).

Hipertensão arterial com alcalose hipercalêmica devido ao excesso de produção de DOC é uma das características que distingue a deficiência de CYP11B1 da deficiência de CYP21A2. Entretanto a hipertensão arterial pode ou não estar presente (Zachmann *et al.*, 1983; Rösler *et al.*, 1982), sendo observada em 30-60% dos casos (Al-Jurayyan, 1995; Huma *et al.*, 1995; Rösler, 1992). A hipertensão, muitas vezes, só se manifesta nas fases mais tardias da infância ou adolescência (Mimouni *et al.*, 1985) e é atribuída ao excesso de DOC.

1.2.3- Mutações pontuais: *missense*, *nonsense* e *frameshift*

Diversas mutações relacionadas ao fenótipo de HCA têm sido descritas tanto no gene *CYP21A2* quanto no gene *CYP11B1*. Segundo o *The Human Gene Mutation Database* (HGMD, www.hgmd.cf.ac.uk), foram descritas 106 mutações no gene *CYP21A2*, destas 55 são mutações *missense*, 12 *nonsense*, 7 de *splicing*, 11 de pequenas deleções e 8 pequenas inserções. Enquanto para o gene *CYP11B1* foram descritas 56 mutações, destas 30 são mutações *missense*, 7 *nonsense*, 5 de *splicing*, 4 de pequenas deleções e 3 pequenas inserções.

Substituições nucleotídicas podem apresentar variados graus de expressão na atividade da proteína, quando a troca nucleotídica modifica o aminoácido para um códon de parada (*nonsense*), gera um mRNA alterado, que se for traduzido produzirá uma proteína truncada com a atividade prejudicada. Por outro lado, a troca de aminoácidos (*missense*), pode causar diferentes graus de influência na atividade da enzima. Devido a esta grande heterogeneidade, mutações *missense* são frequentemente estudadas em relação à alteração na atividade enzimática e, também em relação à interferência na estrutura tridimensional da proteína e, conseqüentemente em suas interações com outras proteínas (Krone *et al.*, 2006;

Robins *et al.*, 2006; Dhir *et al.*, 2007; Riepe *et al.*, 2008). Já as deleções e inserções são alterações responsáveis por mudanças no quadro (*frame*) de leitura do mRNA, gerando proteínas gravemente alteradas, normalmente produzindo um códon de parada distinto do esperado para a proteína normal.

Para estudar a atividade enzimática das proteínas mutantes diferentes estratégias são adotadas, como observado no estudo de mutações no gene *CYP21A2*. Para as mutações provenientes do pseudogene e mais freqüentes no gene, o efeito funcional de cada microconversão foi investigado *in vitro* introduzindo-as por mutagênese sítio dirigida no cDNA do gene *CYP21A2* clonado num vetor apropriado e avaliando sua expressão. Vários sistemas de expressão foram usados tais como, transfecção com plasmídios em células de mamíferos, infecção de células de mamíferos com vírus da vaccinia ou mesmo expressão em bactérias ou leveduras (Higashi *et al.*, 1988; Chiou *et al.*, 1990; Hu e Chung, 1990; Tusie-Luna *et al.*, 1990; Higashi e Fujii-Kuriyama, 1991; Tusie-Luna *et al.*, 1991; Wu e Chung, 1991; Wu *et al.*, 1991; Helmberg *et al.*, 1992a; Kohn *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1996; Lajic *et al.*, 1997; Nikoshkov *et al.*, 1997; Nikoshkov *et al.*, 1998; Barbaro *et al.*, 2004). Da mesma forma, mutações *missense* no gene *CYP11B1* são estudadas por mutagênese sítio-dirigida. Entretanto, quando transfectadas em células onde não são expressas naturalmente precisam ser co-transfectadas com vetores portadores dos genes de adrenodoxina e adrenodoxina redutase (Krone *et al.*, 2005), proteínas acessórias que são utilizadas sequencialmente, como transportadoras de elétrons, uma vez que *CYP11B1* não recebe elétrons diretamente do NADPH (Lambeth *et al.*, 1979). Em geral, os resultados relativos aos efeitos de uma mutação particular sobre a atividade enzimática não dependem do método usado para a expressão.

Constantemente mutações novas ou raras não derivadas do *CYP21A1P* são identificadas em pacientes brasileiros (Bachega *et al.*, 1999; Lau *et al.*, 2001; Billerbeck *et al.*, 2002). Apesar de considerarmos tais alterações como as causas de HCA nessas famílias, para as mutações *missense*, é necessário saber se as proteínas mutantes têm atividade de 21-hidroxilase frente aos substratos *in vitro*, e como essa atividade se compara a da proteína normal.

1.2.4- Mutações em sítio de processamento do pré-mRNA (*splicing* alternativo)

Mutações associadas a sítios de *splicing* são descritas em ambos os genes, *CYP21A2* e *CYP11B1*, porém nem sempre são estudadas *in vitro* quanto a seus efeitos no processamento do mRNA. Dentre as 7 mutações de sítio de *splice* descritas no HGMD para o gene *CYP21A2*, apenas 3 foram avaliadas quanto aos efeitos no processamento do mRNA, dentre as mutações estudadas encontra-se a mutação PS proveniente do pseudogene IVS2-13A/C>G (Higashi *et al.*, 1988). Da mesma forma, 3 das 5 alterações descritas como de *splicing* alternativos no gene *CYP11B1* foram estudadas *in vitro*.

A transcrição da maioria dos genes eucariotos resulta em pré-mRNAs constituídos da região codificante do gene, os exons. Durante o processamento do pré-mRNA, os introns, região não codificante do gene, são removidos enquanto os exons são unidos para produzir um mRNA maduro (Nicholls *et al.*, 2004). Frequentemente inúmeros mRNAs são formados a partir de um mesmo pré-mRNA, o que ocorre devido ao processo de *splicing* alternativo (Cartegni *et al.*, 2002; Buratti *et al.*, 2007).

Durante muito tempo o *splicing* alternativo foi descrito como evento raro, entretanto com o recente advento da genômica e da proteômica, uma grande variedade de transcriptomas foi observada em diferentes organismos (Johnson *et al.*, 2003). Segundo a revisão de Lee e Wang (2005), cerca de 80% dos genes humanos apresentam *splicings* alternativos. Essa alta prevalência parece ser similar a outros mamíferos, sendo utilizada para justificar a complexidade dos mamíferos quando comparados a moscas e vermes (Brett *et al.*, 2002). Entretanto, a alta frequência de *splicings* alternativos observada não significa que todos sejam funcionais.

O processamento normal para produção do mRNA maduro envolve o reconhecimento de regiões de junção exon-intron; em mamíferos, introns que passam por *splicing* nuclear são quase que em sua totalidade flanqueados por 5'-GT...AG-3' (Sheth *et al.*, 2006). Além disso, a região 3' do intron geralmente apresenta um trato degenerado rico em pirimidinas (Y) que se estende por até 20 nucleotídeos em direção a região 5'. O sítio de ponto de ramificação, ou seja, a adenina responsável pelo ataque nucleofílico à borda intron 5' -exon 3', apesar de bastante degenerado e com disposição variável em relação aos sítios

de *splice* 5' e 3' em mamíferos, também é reconhecido pela maquinaria responsável pelo *splicing*. Na maioria dos eucariotos a seqüência consenso do sítio de *splice* 5' (5'ss) envolve nove nucleotídeos parcialmente conservados, presentes na junção exon-intron, (C/A)AGGT(G/A)AGT os quais são reconhecidos por pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs), envolvidas no processo de *splicing*.

Após o reconhecimento da região a ser excisada do pré-mRNA, o *spliceossomo* é montado em seqüência sobre o fragmento do pré-mRNA a ser processado. O *spliceossomo* é complexamente constituído de 5 snRNPs (U1, U2, U4, U5 e U6) em seu centro, as quais são constituídas de snRNAs e proteínas associadas (Zhou *et al.*, 2002). As snRNPs se ligam a fatores auxiliares importantes (não-snRNPs), como por exemplo proteínas ricas em serinas e argininas (SR), para assim formarem o *spliceossomo* completo (Zhou *et al.*, 2002). Além disso, todos os genes humanos contém elementos de ação cis e fatores trans dentro dos introns e dos exons que são requeridos para um correto e eficiente *splicing* do precursor do mRNA, o pré-mRNA (Singh e Cooper, 2006).

Diferentes tipos alternativos de processamento de um pré-mRNA transcrito podem ser observados, indo desde pequenas variações ao utilizar sítios de *splice* alternativos localizados a alguns nucleotídeos de distância do sítio original até a exclusão de vários exons (Xing e Lee, 2005). Não existe uma nomenclatura oficial utilizada para definir os tipos de *splicing* existentes, mas a maioria dos autores (Modrek e Lee, 2003; Matlin *et al.*, 2005; Xing e Lee, 2005) considera basicamente três tipos de *splicing* (Figura 5). O sítio de *splice* alternativo (doador ou acceptor), onde a junção exon-exon é diferente da junção esperada, resulta em um encurtamento ou alongamento de um dos exons, ou seja, um dos exons pode perder alguns nucleotídeos ou receber algumas bases nucleotídicas provenientes do intron durante o processamento do pré-mRNA transcrito (Figura 5a). A perda de um ou mais exons (*exon skipping*) juntamente com os introns flanqueadores, resulta na formação de transcritos mais curtos com inclusão alternativa de exons (Figura 5b). A retenção de intron define casos onde o intron é mantido no transcrito final, podendo permanecer no mRNA maduro flanqueado por exons ou podendo ser excisado nesta etapa, mantendo desta forma a junção exon-exon no momento da tradução em proteína (Figura 5c).

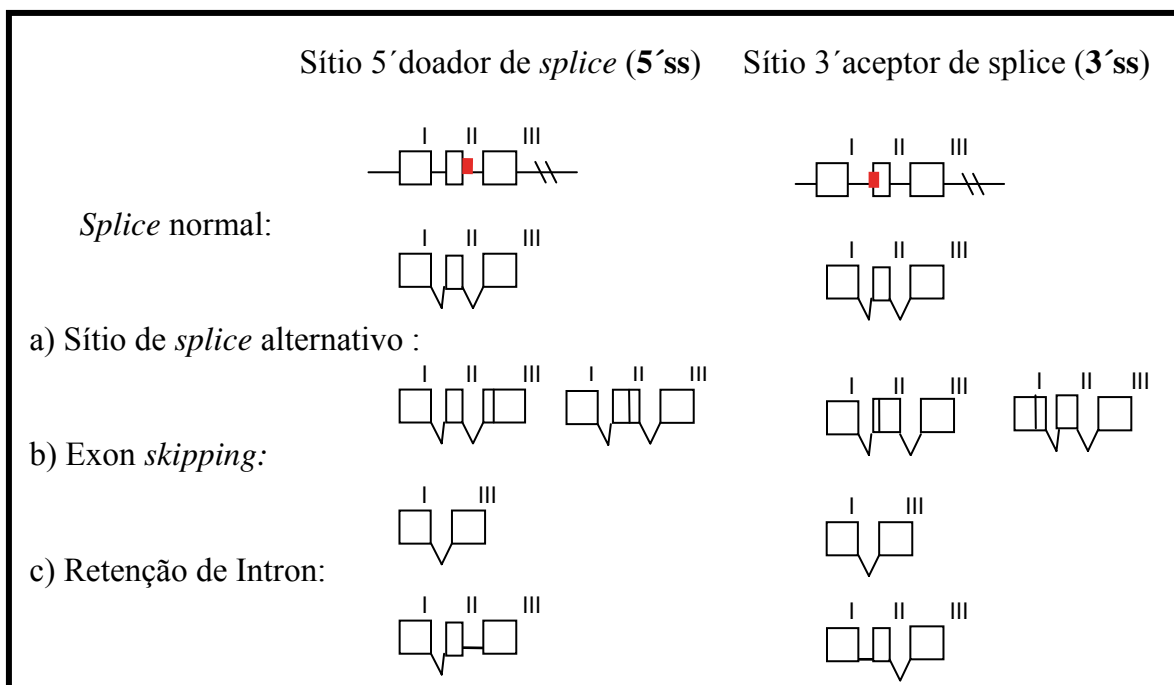


Figura 5. Esquema dos tipos de *splicing* descritos, tanto associados ao sítio doador (5') quanto ao sítio receptor (3'). Onde, a) sítio de *splice* alternativo doador ou receptor onde nucleotídeos provenientes do intron podem ser inseridos ou nucleotídeos do exon podem ser excluídos; b) inclusão alternativa de exon ou *exon skipping*; c) retenção de intron ou uso alternativo de intron.

Devido as diferentes alterações possíveis no mRNA e conseqüentemente, na proteína, mutações em sítio de *splicing* ou na região envolvendo o sítio são frequentemente estudadas. Análise direta do mRNA de interesse é realizada sempre que possível por meio de biópsia ou extração do órgão onde a proteína é expressa (Michael *et al.*, 2005). Quando o mRNA de interesse não pode ser coletado, pode ser produzido, ou seja, mini-genes são construídos contendo a região a ser estudada, são ligados a um vetor de expressão e em seqüência, expresso em cultura de células. O estudo por construção de mini-genes provem uma forma direta de determinar se uma mutação causadora de doença ou um polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) afetam a eficiência do processo de *splicing* (Singh e Cooper, 2006). Análise de mini-genes em *CYP21A2* para a alteração IVS2+1G>A, demonstrou a formação de dois diferentes transcritos; um com a perda do exon 2 e o outro, menos

freqüente, com a utilização de um sítio de *splicing* alternativo na posição -19 do intron 2 (Lee e Chang, 2001).

Alterações em sítio de *splicing* são frequentemente observados em pacientes com HCA, principalmente em pacientes com deficiência de CYP21A2 onde a mutação de *splicing* alternativo IVS2-13A/C>G é uma das mais freqüentes associada à forma PS em diferentes populações (Wilson *et al.*, 2007; Ramazani *et al.*, 2008). Chabre *et al.* (2000) descreveu a mutação silenciosa p.T318T no gene *CYP11B1*, onde a troca de um G>C no último nucleotídeo do exon 5 criou alteração no sítio doador de *splicing* e consequentemente, alterou a proteína formada. No mesmo estudo a variação intrônica IVS8+4G>A foi identificada como responsável pela perda do exon 8 (*exon skipping*).

Apesar das suposições envolvendo as alterações encontradas em regiões de *splicing* como responsáveis por HCA, o papel destas alterações no quadro clínico dos pacientes somente será compreendido com o estudo por mini-genes do tipo de processamento realizado.

1.2.5- Polimorfismos nos genes *CYP21A2* e *CYP11B1*

Além de mutações, a presença de polimorfismos nos genes *CYP21A2* e *CYP11B1* vem sendo descrita por vários autores (Higashi *et al.*, 1986, White *et al.*, 1986, Rodrigues *et al.*, 1987, De Carvalho *et al.*, 1999), bem como a relação entre alguns polimorfismos com mutações específicas de cada gene (Koppens *et al.*, 1992; Skinner *et al.*, 1996, Skinner *et al.*, 1998; De Carvalho *et al.*, 1999; Levo *et al.*, 1999; Paulino *et al.*, 1999).

Entende-se por polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) alterações no DNA que não apresentam efeito fenotípico, seja porque a alteração não modifica a seqüência primária de aminoácidos de um polipeptídeo ou porque a alteração resultante da seqüência de aminoácidos codificada ocorre em uma região não crítica da proteína. Apesar disso, em conjunto com mutações a presença de polimorfismos pode agravar o fenótipo, interferindo na atividade enzimática (Asanuma *et al.*, 1999). Por outro lado, pode não interferir na atividade, mas auxiliar na definição de haplótipos relacionados a cada mutação (Ordonez-Sanches *et al.*, 1998).

Os SNPs têm sido relatados tanto no gene ativo como no pseudogene da enzima CYP21A2, bem como nas cópias gênicas *C4* (Chung *et al.*, 1986; Higashi *et al.*, 1986; Rodrigues *et al.*, 1987). Como os genes *CYP21A2* e *CYP21PA1* encontram-se intercalados com genes que codificam para o quarto componente do sistema Complemento (*C4A* e *C4B*), o alto grau de homologia entre as unidades *C4B/CYP21A2* e *C4A/CYP21A1P* tem como consequência o favorecimento de pareamento desigual entre cromátides irmãs durante a metáfase meiótica, sendo importante sua determinação para definição de haplótipos. Analisando o *locus C4/CYP21* por digestão seguida por *Southern blot* é possível detectar duplicações, deleções e conversões gênicas observando o tamanho dos fragmentos hibridizados e suas intensidades. Por exemplo, a digestão com a enzima *Taq I* gera fragmentos de 3,2 e 2,4 Kb no *CYP21A1P* enquanto que no gene *CYP21A2* os fragmentos são de 3,7 e 2,5 Kb; o gene *C4A* é reconhecido em um fragmento de 7,0 kb enquanto o *C4B* por um fragmento de 6,0 ou 5,4 Kb, devido a um polimorfismo em um intron de *C4B* (Paldostir *et al.*, 1987).

A presença dos SNPs no gene *CYP21A2* é de grande interesse e podem ser utilizados para análise da segregação dos alelos em estudos genéticos das famílias com HCA, permitem também a identificação de deleções gênicas em famílias informativas e, podem oferecer novos *insights* nas taxas relativas de mutações nesses genes (Jiddou *et al.*, 1999).

Para a deficiência de CYP21A2, de uma forma geral, existe uma boa correlação genótipo-fenótipo quanto às formas perdedoras de sal, virilizantes simples e tardia, porém dentro de uma mesma forma clínica, indivíduos afetados podem apresentar diferentes graus de gravidade (Koyama *et al.*, 2002), inclusive indivíduos com genótipo idêntico, isto é, mesmas mutações. O estudo de SNPs para composição de haplótipos pode colaborar para o entendimento dessa variação fenotípica (Koppens *et al.*, 2002), uma vez que para certas doenças algumas seqüências intragênicas variantes que constituem variações comuns podem se relacionar com manifestações clínicas mais ou menos graves (Hegele *et al.*, 2001).

A presença de um códon CTG (leucina) extra, foi verificada em *CYP21A2* (Rodrigues *et al.*, 1987), numa região descrita previamente com 4 códons para leucina nas

posições p.L6-p.L10 do exon 1 (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986). Comparações entre espécies revelaram a presença de leucinas nessas mesmas posições, indicando possivelmente um polimorfismo de tamanho na enzima 21-hidroxilase, variando entre 494 e 495 aminoácidos (Rodrigues *et al.*, 1987). Posteriormente foi confirmado que a inserção de leucina não acarretava alteração da atividade enzimática e que pode ser normalmente encontrada no *CYP21PA1* (New, 1994). Entretanto, sabe-se que em procariotos a eficiência da tradução é determinada pelo estágio de iniciação (Gualerzi e Pon, 1990). Um dos fatores principais que regem a eficiência do início da tradução é a estrutura secundária do terminal 5' do mRNA (Dreyfus, 1988; de Smit e van Duin, 1990; Chen e Inouye, 1990; Stenström *et al.*, 2001), assim a presença de polimorfismos que alterem a estrutura secundária do mRNA, como por exemplo o polimorfismo das leucinas e o g.115T>C no exon 1 do gene *CYP21A2* podem provocar um baixo nível de produção da proteína. Outros polimorfismos na seqüência codificante podem ser encontrados como as trocas p.K102R e p.S268T (Rodrigues *et al.*, 1987). Além das variações em exons, pode-se encontrar SNPs em introns, especialmente dentro do intron 2. Este intron contém um grande número de seqüências polimórficas, entre elas, as encontradas nas posições nucleotídicas g.395 e g.453 (T>C) e g.601 (A>C) (Higashi *et al.*, 1986; Rodrigues *et al.*, 1987; Wedell *et al.*, 1992; Bobba *et al.*, 1997).

A análise de polimorfismos nos loci *CYP11B1* e *CYP11B2* é importante não somente para os diagnósticos, mas também para estudos de ligação ou estudos de associação para determinar se o gene desempenha um papel importante, por exemplo, na hipertensão (Skinner *et al.*, 1998). Análise do loci *CYP11B1* e *CYP11B2* em pacientes com diminuição na produção de 18-hidrocortisol apresentou três variantes em *CYP11B1* e nove no *CYP11B2* (Nicod *et al.*, 2004).

Vários polimorfismos são encontrados no gene *CYP11B1*, alguns provenientes do gene homólogo *CYP11B2*, como a troca nucleotídica CGG>CAG na posição genômica g.128 responsável pela substituição de um aminoácido arginina para glutamina no exon 1 (p.R43Q), e a transição GAT>GAC no exon 2, qual não altera o aminoácido p.D82. Outros não tiveram a sua origem no *CYP11B2*, como: p.L75L no exon 1 e p.A291A no exon 5. Skinner *et al.* (1996) descreveram o polimorfismo p.L75L, no exon 1 em associação com

uma mudança na seqüência do intron 3 (IVS3+12A/G). A freqüência destes polimorfismos os faz úteis como marcadores intragênicos para o diagnóstico pré-natal ou estudo de famílias.

Portanto, utilizando informações dos polimorfismos associados às mutações encontradas nos alelos torna-se possível definir os haplótipos associados ao fenótipo de HCA. Entretanto, para uma correta definição do efeito da mutação no fenótipo do paciente faz-se necessário descobrir se tal mutação afeta de fato a atividade da enzima ou a sua formação a partir do mRNA, o que poderá explicar o fenótipo característico das deficiências de 21-hidroxilase e de 11 β -hidroxilase desses indivíduos.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

- Identificar, por seqüenciamento do gene *CYP21A2*, mutações novas ou raras.
- Investigar a atividade enzimática - determinar a atividade das enzimas alteradas com mutações *missenses* novas ou raras no gene *CYP21A2*.
- Investigar alterações em sítios de *splicing*:
 - no gene *CYP21A2*: avaliar as alterações intrônicas ou de região de *splice*.
 - no gene *CYP11B1*: avaliar possíveis alterações do sítio de *splicing* causadas pela mutação g.1753G>A (p.G267S).
- Verificar a correlação genótipo-fenótipo: relacionar a atividade encontrada para cada mutação com o fenótipo característico de deficiência da *CYP21A2* e *CYP11B1* dos indivíduos.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1- Casuística

Foram incluídos na casuística desta tese 28 indivíduos (Tabela 1) com deficiência de CYP21A2: 4 pacientes com mutações novas encontradas previamente por seqüenciamento (Tabela 2), 22 pacientes (dois primos) com fenótipo de deficiência de CYP21A2 e genótipo não definido (Tabela 3), 2 pacientes com a correlação genótipo-fenótipo não esclarecida (Tabela 4). Os quais foram encaminhados pelo Serviço de Endocrinologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP.

Estes pacientes foram incluídos na casuística desta tese após a triagem de deleções e conversões em larga escala (por *Southern Blot*), e da triagem por PCR alelo-específica das mutações provenientes do pseudogene mais freqüentes no gene *CYP21A2*: p.P30L, IVS2-13A/C>G, $\Delta 8$ (g.707_714delGAGACTAC), p.I172N, p.I236N+p.V237E+p.M239K (*Cluster 6*), p.V281L, p.Q318X e p.R356W.

Dois pacientes (Tabela 1), de origem Escandinava (Tabela 5), com deficiência da CYP21A2 e de famílias não relacionadas foram também inseridos nesta casuística.

Fechando a casuística, uma paciente com deficiência da CYP11B1 (Tabela 1 e Tabela 2), encaminhada pela Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento Hospital das Clínicas - FMUSP.

Este trabalho foi conduzido sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP (CAAE: 1618.0.146.000-05).

Tabela 1. Descrição clínica dos pacientes incluídos na casuística desta tese (n=31).

| <i>Pacientes¹</i> | <i>Idade do diagnóstico²</i> | <i>Dados Clínicos</i> | <i>17OHP basal (nmol/Litro)</i> | <i>Na⁺/K⁺ (nmol/Litro)</i> |
|------------------------------|---|---|---------------------------------|--|
| 8Ya ₁ / | 3m/ | Desnutrição e desidratação/ choque séptico, pois a genitália era normal (havia feito tratamento pré-natal). | na ³ / | na / |
| 8Xa ₂ | 3d | | > 20 | 113/7,3 |
| 10Ya ₁ / | 3a1m/ | Puberdade Precoce/ Genitália ambígua ao nascimento (Prader III). | > 6mnd ⁴ / | na/ |
| 10Xa ₂ | 3m | | > 6mnd | 136/5,5 |
| 11Xa ₁ / | 9d/ | Genitália ambígua ao nascimento (Prader III)/ | 49/ | 135/7.2/ |

| <i>Pacientes¹</i> | <i>Idade do diagnóstico²</i> | <i>Dados Clínicos</i> | <i>17OHP basal (nmol/Litro)</i> | <i>Na⁺/K⁺ (nmol/Litro)</i> |
|---|---|--|--------------------------------------|--|
| 11Xa ₂ / 11Ya ₃ | 1m/ 5d | Genitália ambígua ao nascimento (Prader IV)/ Baixo ganho de peso. | > 6mnd/ > 6mnd | 127/7.1/ 130/6.6 |
| 24Xa ₁ | 8d | Baixo ganho de peso, clitoromegalia ao nascimento (Prader I-II). | > 6mnd | 126/5.5 |
| 27Xa ₁ | 1a5m | Clitoromegalia e fusão lábio-escrotal parcial ao nascimento (Prader II). | > 6mnd | 143/4.7 |
| 31Xa ₁ | 1m | Genitália ambígua ao nascimento (Prader III), desnutrição. | > 20 | 113/7,4 |
| 31primoYa ₁ 39Xa ₆ | 5 a 3m 23d | Antecedente familiar Genitália ambígua ao nascimento (Prader III/IV), desnutrição. | 15,5 na | na na |
| 44Xa ₂ | 25d | Genitália ambígua ao nascimento (Prader II), desnutrição e desidratação. | na | na |
| 53Xa ₂ | 50d | Genitália ambígua ao nascimento (Prader III-IV), desnutrição. | > 25 | 134/8,5 |
| 79Ya ₃ | 7 a 2m | Pubarca, aumento de pênis desde 6 a 8m; alta estatura. | na | na |
| 95Ya ₁ | 14 a | Puberdade adiantada, acne, baixa estatura, 17OHP levemente aumentados, sem confirmação de diagnóstico clínico. | 17 sendo > 25 após estímulo com ACTH | na |
| 101Xa ₁ | 1m25d | Genitália ambígua ao nascimento (Prader III), desnutrição. | > 25 | 121/6 |
| 104Xa ₁ | 2m | Níveis de 17OHP elevados na triagem neonatal, genitália ambígua ao nascimento (Prader V). | 50 | na |
| 114Xa ₁ | 5d | Genitália ambígua ao nascimento (Prader IV). | > 6mnd | 119/5.3 |
| 129Ya ₁ | 5 a 7m | Pubarca e aumento de pênis desde 5 a ; ata estatura. | 15,5 | na |
| 131Xa ₁ | 7d | Genitália ambígua ao nascimento (Prader III/IV). | > 20 | 136/6,4 |
| 136Ya ₁ | 44d | Desnutrição e desidratação. | > 20 | 120/5,5 |
| 139Ya ₁ | 2m7d | Desnutrição e desidratação. | > 200 | 121/6,8 |
| 164Ya ₁ | na | Desnutrição e desidratação. | na | na |

| <i>Pacientes¹</i> | <i>Idade do diagnóstico²</i> | <i>Dados Clínicos</i> | <i>17OHP basal (nmol/Litro)</i> | <i>Na⁺/K⁺ (nmol/Litro)</i> |
|-------------------------------------|---|---|---------------------------------|--|
| 175Ya ₁ | 5d | Dosagem de 17OHP levemente elevada, detectada na triagem neonatal. | 30,1 | 127/4,5 |
| 179Ya ₁ | 1m | Desnutrição e desidratação. | 14,4 | 127/7 |
| 181Ya ₁ | 29d | Desidratação e desnutrição; genitália ambígua ao nascimento (Prader II). | na | na |
| 182Xa ₁ | 27d | Diagnóstico pré-natal de genitália ambígua por ultrassom de rotina (na 16 ^a semana) (Prader IV). | 35 | 127/7.1 |
| 11XaE | 6a | Puberdade pseudo-precoce com avançada idade óssea. | na | na |
| 12YaE | 11a | Puberdade precoce aos 4 anos de idade, com acentuado desenvolvimento puberal até os 10 anos de idade resultando em baixa estatura (1,60m). | 151 | na |
| 3Xa ₁ (<i>CYP11B1</i>) | 5a6m | Micropênis e criptorquidia bilateral ao nascimento. Pubarca precoce aos 12 meses e incontinência urinária primária. Pressão arterial 100/60 mmHg. | na | 137/4.6 |

¹Os pacientes foram identificados com códigos, onde: N^o= número de registro da família, X= paciente do sexo feminino, Y= paciente do sexo masculino, a= afetado, n^o subscrito= identificação dentro de uma irmandade, E= origem Escandinava. ²Idade do diagnóstico, onde: d=dias, m=meses, a=anos. ³ na=não avaliado ou iniciou o acompanhamento clínico após início do tratamento. ⁴mnd=medida não diluída.

Tabela 2. Descrição dos genótipos dos pacientes (n=5) com mutações novas ou raras encontradas previamente nos genes *CYP21A2* e *CYP11B1*.

| <i>Pacientes¹</i> | <i>Gene</i> | <i>Mutação Paterna</i> | <i>Mutação Materna</i> | <i>Fenótipo</i> | <i>Referência</i> |
|--------------------------------------|----------------|---------------------------------|------------------------|-----------------|--------------------------|
| 10Xa ₁ /10Xa ₂ | <i>CYP21A2</i> | p.I172N ² | p.L107R | VS | Lau, 2000. |
| 24Xa ₁ | <i>CYP21A2</i> | p.I172N | p.L142P | PS | Lau, 2000. |
| 39Xa ₆ | <i>CYP21A2</i> | IVS2-2A>G | p.I172N | PS | Lau, 2000. |
| 3Xa ₁ | <i>CYP11B1</i> | g.1753G>A³ | g.1753G>A | VS | Penachioni, 2001. |

¹Os pacientes foram identificados com códigos, onde: N^o= número de registro da família, X= paciente do sexo feminino, Y= paciente do sexo masculino, a= afetado, n^o subscrito= identificação dentro de uma irmandade. ²p.= posição do aminoácido na proteína; ³g.= posição gênica do nucleotídeo.

Tabela 3. Descrição dos pacientes com fenótipo de deficiência de CYP21A2 (n=22), e genótipo indefinido.

| <i>Pacientes</i> | <i>Mutação Paterna¹</i> | <i>Mutação Materna¹</i> | <i>Fenótipo</i> |
|---|------------------------------------|------------------------------------|-----------------|
| 8Ya ₁ /8Xa ₂ | ? | p.R356W | PS |
| 11Xa ₁ /11Xa ₂ /11Ya ₃ | ? | IVS2-13A/C>G | PS |
| 27Xa ₁ | ? | IVS2-13A/C>G | VS |
| 31Xa ₁ | ? | ? | PS |
| 31primoYa ₁ | ? | p.V281L | NC |
| 44Xa ₂ | ? | ? | PS |
| 79Ya ₃ | p.I172N | ? | VS |
| 95Ya ₁ ² | ? | ? | ? |
| 101Xa ₁ | ? | ? | PS |
| 104Xa ₁ | ? | p.I172N | VS |
| 114Xa ₁ | g.1762_1763insT | ? | PS |
| 129Ya ₁ | p.V281L | ? | NC |
| 131Xa ₁ | p.R356W | ? | PS |
| 136Ya ₁ | ? | Deleção de 30 Kb | PS |
| 139Ya ₁ | Deleção de 30 Kb | ? | PS |
| 164Ya ₁ | IVS2-13A/C>G | ? | PS |
| 175Ya ₁ ³ | p.V281L | ? | ? |
| 179Ya ₁ | ? | IVS2-13A/C>G | PS |
| 182Xa ₁ | ? | p.R356W | PS |

¹p.= posição do aminoácido na proteína; g.= posição gênica do nucleotídeo. ²Paciente encaminhado por aumento moderado de 17-OHP sem confirmação de diagnóstico clínico, o DNA dos pais não estava disponível para análise. ³Paciente encaminhado por dosagem de 17-OHP levemente elevada, detectada na triagem neo-natal.

Tabela 4. Pacientes com deficiência de CYP21A2 e correlação genótipo-fenótipo discordante (n=2).

| <i>Pacientes</i> | <i>Mutação Paterna¹</i> | <i>Mutação Materna¹</i> | <i>Fenótipo predito pelo genótipo/ Fenótipo clínico</i> |
|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|
| 53Xa ₂ | p.I172N+? | p.V281L+? | NC / PS |
| 181Ya ₁ | p.V281L+? | p.R356W+? | NC / PS |

¹p.= posição do aminoácido na proteína; g.= posição gênica do nucleotídeo.

Tabela 5. Genótipo dos pacientes de origem Escandinava.

| <i>Paciente</i> | <i>Alelo 1¹</i> | <i>Alelo 2¹</i> | <i>Fenótipo</i> | <i>Nacionalidade</i> |
|-----------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|----------------------|
| 11Xa | p.H62L+p.P453S | IVS2-13A/C>G | VS | Norueguesa |
| 12Ya | p.H62L+p.P453S | c.920_921insT+p.Q318X | VS | Sueca |

¹DNA parental não foi obtido para análise de segregação, mas as mutações encontradas em heterozigose composta estão aqui descritas.

2- Obtenção das amostras de DNA

Foram utilizadas amostras de DNA genômico extraídas a partir de sangue total periférico dos pacientes e de seus familiares, coletadas no Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do HC - UNICAMP. Foram colhidos de 10 a 20 mL de sangue periférico em tubos cônicos, contendo 10% do anti-coagulante etilenediaminotetracetato dissódico.2H₂O (EDTA) 0,5M pH 8,0.

2.1- Extração de DNA genômico a partir de sangue total periférico

Para a extração de DNA foi empregada metodologia de lise com Proteinase K (Boehringer Mannheim, Germany) padronizada no laboratório de Genética Molecular Humana - CBMEG (Araújo *et al.*,1996):

- Para lise das hemácias foi adicionada solução A ao sangue coletado até completar o volume de 50 mL (adiciona-se de 30 a 40 mL da solução A), permanecendo o homogeneizado em gelo por 30 minutos;
- Centrifugou-se a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C;
- O sobrenadante foi descartado e o precipitado (*pellet*) ressuspensionado em 20 mL de solução A. Esta operação foi repetida até o *pellet* ficar livre de hemácias lisadas;
- O *pellet* então foi ressuspensionado em solução B diluída para 1x;
- Acrescentou-se 250 µL de solução C recém-preparada, contendo proteinase K;
- O *pellet* com as soluções permaneceu em incubação a 37°C por aproximadamente 18 horas;

- Para extração de DNA dos leucócitos foram adicionados 1,25 mL de TE 1x (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) e igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM pH 8,0;
- Homogeneizou-se a mistura por inversão lenta do tubo durante 5 minutos;
- Para separação e recuperação da fase aquosa (superior) o tubo foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente;
- Acrescentou-se à fase aquosa igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM pH 8,0, após leve agitação por 5 minutos foi novamente centrifugado;
- O procedimento foi repetido com solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v:v:v) e por último com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v:v).
- Para precipitação do DNA, acrescentou-se 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,5 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado.
- O DNA precipitado foi então recuperado com auxílio de uma haste plástica esterilizada e lavado com etanol 70%, para retirada do excesso de sal, antes de ser ressuspensionado em TE 1x (200 a 500 µL).

A concentração de DNA foi obtida através de leitura de absorvância óptica a 260 nm em espectrofotômetro e a integridade do DNA foi verificada em gel de agarose.

| Solução A | Solução B (estoque 2x) | Solução C |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------------|
| [] final | [] final | [] final |
| MgCl ₂5 mM | Na ₂ EDTA.....20mM | Solução B.....0,5x |
| Sacarose.....0,32 M | NaCl.....20mM | SDS.....5% |
| Tris-HCl pH 8,0...10mM | Tris-HCl pH 8,0.....20mM | Proteinase K....1mg/mL |
| TritonX100.....1% | | |

2.2- Quantificação do DNA genômico extraído

A quantificação do DNA extraído foi obtida por leitura de absorvância óptica a 260 nm em espectrofotômetro *DU-65 Spectrophotometer* (Beckman, Estados Unidos). Água

destilada foi utilizada como amostra referência (branco) para calibrar o aparelho, 10 µL da amostra de DNA foi diluída 490 µL de água destilada (fator de diluição = 50), para análise. A concentração das amostras foi obtida por:

$$[\text{DNA } (\mu\text{g/ mL})] = 50 \times \text{Absorbância } 260 \times \text{fator de diluição}$$

2.3- Verificação da integridade do DNA genômico extraído

A verificação da integridade do DNA genômico extraído foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 1x, preparado segundo protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989).

A amostra foi aplicada no gel juntamente com tampão de corrida (0,25% de azul de bromofenol; 50% glicose) na razão de 6:1. As condições de eletroforese variaram entre 90 a 110 V. Os marcadores de peso molecular utilizados foram DNA *ladder* de 1 Kb, 1 Kb plus ou 100 pb (Invitrogen Corporation, Estados Unidos), em concentração de 0,15 µg/µL. O gel foi imerso em solução diluída de brometo de etídio (0,5µL/mL de água destilada) durante 15 minutos, sendo visualizado em transluminador de luz ultravioleta e fotografado utilizando uma câmera digital acoplada a um computador (*Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System-EDAS*, Kodak Digital Science, Estados Unidos).

2.4 Amplificação de fragmentos de DNA por reação de polimerase em cadeia - PCR

A reação de polimerização em cadeia (PCR) foi utilizada para amplificação de todos os fragmentos moldes tanto para o seqüenciamento como para as clonagens e está exemplificada na Tabela 6.

Tabela 6. Reagentes utilizados para reação geral de PCR com enzima *Taq DNA polymerase recombinant* (Invitrogen Corporation, Estados Unidos), e ciclo utilizado para amplificação.

| <i>Reagentes</i> | <i>[] final</i> | <i>Ciclo Geral</i> |
|---|------------------|--|
| DNA genômico | 1,0 – 2,0 µg | |
| Tampão Invitrogen (10x) | 1x | |
| MgCL ₂ 50 mM (Invitrogen) | 1,5 mM | 94°C - 5 minutos |
| dNTP 2 mM (Invitrogen) | 0,1 mM | 30 ciclos de: |
| <i>Primer</i> direto 20 pmoles | 20 pmoles | 94 °C - 1 minuto |
| <i>Primer</i> reverso 20 pmoles | 20 pmoles | T _{média} do par de <i>primers</i> – 1 minuto |
| Enzima <i>Taq DNA polymerase recombinant</i> (5 U/µl, Invitrogen) | 2,0 U | 72°C - 2 minutos |
| H ₂ O deionizada q.s.p. | 50 µl | |

2.5 Amplificação do gene *CYP21A2*

O gene *CYP21A2* e o pseudogene *CYP21A1P* têm aproximadamente 3,0 Kb e apresentam cerca de 98% de homologia entre si (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986). Tal homologia faz com que o seqüenciamento para identificação de mutações exclusivas do gene *CYP21A2* seja precedido de um procedimento de distinção entre o gene e o pseudogene. Este procedimento pode se basear tanto no método descrito por Owerbach *et al.* (1990), que se vale da presença de uma deleção de 8 pares de bases no exon 3 (mutação g.707_714delGAGACTAC), como no método de Wilson *et al.* (1995b), que usa a troca de 3 nucleotídeos no exon 6 entre gene e pseudogene (mutações p.I236N+p.V237E+p.M239K), geralmente presentes apenas no pseudogene. Assim, *primers* específicos, desenhados para estas regiões, são capazes de amplificar seletivamente o gene *CYP21A2*, sendo tais *primers* designados como “âncoras”.

Neste trabalho foram utilizados tanto os *primers* descritos por Owerbach *et al.* (1990) como os de Wilson *et al.* (1995b) para seleção específica de *CYP21A2* (Tabela 7).

Inicialmente o gene foi amplificado em duas partes, ora eram amplificados os fragmentos ProEx1s-Ex3Nas e Ex3Ns-Intron10as, ora eram amplificados os fragmentos ProEx1s-Ex6Ns e Ex6Ns-Intron10as mostrados na Tabela 7. Nos casos de exclusão alélica da variante C656, que ocorre comprovadamente nos casos de heterozigose A/C ou G/C na posição 656 nas amplificações ProEx1s-Ex3Nas e ProEx1s-Ex6Nas, o *primer* utilizado para seleção específica do alelo foi o Int2Cas. Os ciclos dependeram do fragmento a ser amplificado e dos pares de *primers* utilizados (tempo de extensão e a ligação dos *primers* ao fragmento variaram segundo a temperatura média de *melting* cada par de *primers*).

Tabela 7. Seqüência e localização dos *primers* utilizados para seleção do gene *CYP21A2*.

| <i>Primer</i> ¹ | <i>Seqüência do primer (5'→3')</i> | <i>T_m</i> ⁴ (°C) | <i>Localização</i> |
|----------------------------|------------------------------------|--|--------------------|
| ProEx1s | GGA TGG CTG GGG CTC TTG AG | 66,0 | 5' do exon 1 |
| Ex3Ns ² | CGG ACC TGT CCT TGG GAG ACT AC | 66,0 | exon 3 |
| Ex3Nas ² | TCC AGA GCA GGG AGT AGT CTC | 66,0 | exon 3 |
| Ex6Ns ³ | AG GGA TCA CAT CGT GGA GAT G | 64,0 | exon 6 |
| Ex6Nas ³ | GC TGC ATC TCC ACG ATG TGA | 62,0 | exon 6 |
| Int2Cas | AGC TTG TCT GCA GGA GGA GG | 63,0 | intron 2 |
| Int10as | GAA ACT GAG GTA CCC GGC | 58,0 | 3' do exon 10 |

¹s = *sense* ou direto; as = *antisense* ou reverso. ²Primers descritos por Owerbach *et al.* (1990). ³Primers descritos por Wilson *et al.* (1995b). ⁴T_m = temperatura de *melting* do *primer*.

2.6 Digestão com enzima de restrição

Digestões com enzimas de restrição foram realizadas para triagem das mutações em indivíduos com deficiência de *CYP21A2*. Após a amplificação do gene *CYP21A2* (descrita no item 3.2.5), os fragmentos foram digeridos com as enzimas apropriadas para cada alteração. A reação ocorreu à temperatura ótima de cada enzima, em um volume final de 30 µL:

Tampão da enzima 10X (fornecido pelo fabricante).....1X
 Enzima de restrição (10 U/µL)..... 5U

Produto de PCR9 µL
 H₂O ultra-pura q.s.p. 30 µL
 Incubada a 37°C por 2 horas.

2.7 Amplificação do gene *CYP11B1*

Semelhante ao o gene *CYP21A2* o gene *CYP11B1* apresenta um gene homólogo o *CYP11B2*, porém neste caso a homologia é de 93% na seqüência de aminoácidos e, o gene *CYP11B2* é funcional e expresso em região diferente da glândula supra-renal. Tal homologia dificulta o estudo de mutações no gene *CYP11B1* pela simples amplificação dos exons, assim, da mesma forma que para o gene *CYP21A2* é necessária à distinção entre o gene *CYP11B1* e *CYP11B2*. Três fragmentos do gene *CYP11B1* (A, B e C) foram amplificados por PCR usando *primers* específicos para englobar os seus 9 exons (Tabela 8) (White *et al.*, 1991). Tais *primers* se ligam complementarmente às regiões intrônicas específicas para o gene *CYP11B1* prevenindo assim a amplificação do gene *CYP11B2*.

As condições da PCR e os ciclos utilizados variaram de acordo com o fragmento a ser amplificado e o par de *primers* utilizado para a reação.

Tabela 8. Seqüência dos pares de *primers* utilizados para amplificar o gene *CYP11B1*.

| Fragmento | Seqüência do primer¹ (5'→3') | T_m²(°C) | Fragmento(pb) |
|------------------|--|--------------------------------------|----------------------|
| A ³ | 11B1.2s- TCGAAGGCAAGGCACCAG | 61,1 | 968 |
| | 11B1.2as- CCTGCTCCCAGCTCTCAG | 56,8 | |
| B ⁴ | 11B3.5s- AGAAAATCCCTCCCCCCT | 58,7 | 1406 |
| | 11B3.5as- GGCATGGGACACGTGGGC | 65,7 | |
| C ⁵ | 11B6.9s- TGACCCTGCAGCTGTGTCT | 57,4 | 1542 |
| | 11B6.9as- GAGACGTGATTAGTTGATG | 56,2 | |

¹s = *sense* ou direto; as = *antisense* ou reverso. ²T_m = temperatura de *melting* do *primer*.
³exons 1 e 2; ⁴exons 3, 4 e 5; ⁵exons 6,7,8 e 9.

2.8 Reação de seqüenciamento

Os produtos das PCRs alelo-específicas, tanto do gene *CYP21A2* e *CYP11B1*, foram purificados utilizando o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega Corporation, Estados Unidos). Após a purificação as amostras foram quantificadas usando o marcador de peso molecular *Low mass DNA ladder* (Gibco®Invitrogen Corporation, Estados Unidos) para, então, serem seqüenciadas.

Os fragmentos, que para o gene *CYP21A2*, incluem a seqüência completa do gene da região 5'UTR ao exon 6 e do exon 6 à 3'UTR, foram em seguida utilizados como molde para a realização do seqüenciamento direto utilizando *primers* não específicos para o gene em relação ao pseudogene. A Tabela 9, abaixo, demonstra as seqüências dos *primers* utilizados para o seqüenciamento.

Tabela 9. Seqüências dos *primers* utilizados para amplificação e seqüenciamento do gene *CYP21A2*.

| <i>Fragmento molde</i> | <i>Primer¹</i> | <i>Seqüência do primer (5'→3')</i> | <i>T_m² (°C)</i> |
|------------------------|---------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| | ProEx1s | GGA TGG CTG GGG CTC TTG AG | 66,0 |
| | Int1as | CAG CCA AAG CAG CGT CAG CG | 66,0 |
| | Int1s | TAG GAG GGG GCG GAG GTGA | 62,0 |
| ProEx1s – Ex6nas | Int2as | CAC ACT TGA GGC TGA GGT GG | 64,0 |
| | Int2s | CCT TCA TCA GTT CCC ACC CTC | 60,0 |
| | Int2alt | TTC CCA CCC TCC AGC CCC CAC | 62,0 |
| | Ex3Ns | CGG ACC TGT CCT TGG GAG ACT AC | 66,0 |
| | Int4as | CAG TTC AGG ACA AGG AGA GGG | 62,0 |
| | Int4s | GTG CCT CAC AGC CCC TCA G | 64,0 |
| | Ex6Nas | AGC TGC ATC TCC ACG ATG TGA | 64,0 |
| | Ex6Ns | AGA GGG ATC ACA TCG TGG AGA | 72,0 |
| | Int7as | CAG AGC TGA GTG AGG GTG | 60,0 |
| Ex6ns – 3'UTR | Ex8.1as | TTC GTG GTC TAG CTC CTC CTG | 67,0 |
| | Ex9s | TTG GGG ATG AGT GAG GAA AG | 60,0 |
| | Ex9as | GGC GGG TGG ACA GGT GGG T | 60,0 |
| | Int10as | GAA ACT GAG GTA CCC GGC | 58,0 |

¹s = *sense* ou direto; as = *antisense* ou reverso. ²T_m = temperatura de *melting* do *primer*.

Os fragmentos A, B e C do gene *CYP11B1*, serviram como molde para a realização do seqüenciamento direto. O seqüenciamento foi realizado com os próprios *primers* empregados para seleção do gene e, para os fragmentos B e C, *primers* internos foram também utilizados, devido ao tamanho dos fragmentos gerados na amplificação. Na Tabela 10, encontram-se demonstradas as seqüências dos *primers* utilizados para o seqüenciamento.

Tabela 10. Seqüência dos *primers* internos utilizados para seqüenciamento do gene *CYP11B1*.

| <i>Fragmento molde</i> | <i>Primer</i> ¹ | <i>Seqüência do primer (5'→3')</i> |
|------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| B ² | Int2s | ACA AGG AGG ATG GGA TA |
| | Int3s | GGA CTG AAG GGA GTG TG |
| | Int4s | GGA TGA GAG CAG GGA GAC |
| | Int4as | AGCCTCACACCAATCTCCCC |
| C ³ | Int6s | GGT GCA GAG AGC ACA GG |
| | Int7s | TCG AGC TGA GAA CCT CC |

¹s = *sense* ou direto; as = *antisense* ou reverso.²exons 3, 4 e 5; ³exons 6,7,8 e 9.

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando o *kit ABI PRISM Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem- Applied Corporation, Estados Unidos), conforme descrito a seguir:

| | |
|---|--------------|
| DNA (produto de PCR purificado)..... | 40 - 80 ng |
| Tampão <i>Big Dye</i> 5x (fornecido pelo fabricante)..... | 2 µl |
| <i>Big Dye</i> (fornecido pelo fabricante)..... | 2 µl |
| <i>Primer</i> direto ou reverso (5 mM/µl)..... | 1 µl |
| H ₂ O ultra-pura..... | q.s.p. 10 µl |

Ciclo geral da reação de seqüenciamento:

| | |
|---------------------|-------------|
| 96 °C – 1 minuto | } 30 ciclos |
| 96 °C – 10 segundos | |
| 57 °C – 5 segundos | |
| 60°C – 4 minutos | |

Após a reação de seqüenciamento as amostras foram precipitadas com 80 µl de etanol gelado a 80% e incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Foi realizada, então, uma centrifugação de 45 minutos a 3700 rpm, após a qual o sobrenadante foi descartado, sendo adicionado 150 µl de etanol gelado à 70%. Uma nova centrifugação foi realizada com as amostras, desta vez por 10 minutos a 3700 rpm. Para finalizar, o sobrenadante foi descartado e as amostras armazenadas a -20°C. O produto da reação de seqüenciamento purificado foi ressuspendido em 10 µl de *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Estados Unidos), sendo em seguida vigorosamente agitado e posteriormente desnaturado a 94 °C por 5 minutos. As seqüências em bases nitrogenadas dos fragmentos foram obtidas em um seqüenciador automático *ABI PRISM 3700 DNA Analyzer* ou *ABI PRISM 310 DNA Analyzer* (Applied Biosystem-Applera Corporation, Estados Unidos).

As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com as seqüências normais dos genes com o auxílio dos programas *Chromas Lite*® (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html, versão reduzida de livre acesso) para visualização do eletroferograma e *Gene Runner*® v3.01 (<http://www.generunner.net/>, *software* livre) para comparação das seqüências obtidas com a seqüência padrão de cada gene *CYP21A2* (*National Center for Biotechnology Information*, no. M12792) e de *CYP11B1* (*National Center for Biotechnology Information*, no. M32863, M32878 e M32879). As numerações de nucleotídeos e de aminoácidos seguiram a seqüência publicada por Higashi *et al.*, (1986). Enquanto a nomenclatura utilizada para os genes e mutações seguiriam as nomenclaturas estabelecidas para o Citocromo P450 humano (<http://www.cypalleles.ki.se/>).

3- Investigação da atividade enzimática

O primeiro passo para este estudo foi a inserção das mutações p.G56R, p.H62L, p.L107R, p.L142P e p.R408C no cDNA do gene *CYP21A2* pela técnica de mutagênese sítio-dirigida.

O experimento foi realizado utilizando o vetor pALTER (Promega Corporation, Estados Unidos) com o inserto alvo, cDNA completo do gene *CYP21A2*, e dois oligonucleotídeos sintéticos complementares, contendo a mutação desejada (Tabela 11), através da amplificação de cópias mutantes. Esta amplificação foi realizada por PCR com o kit *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene, Agilent Technologies Company, Estados Unidos), o qual permite a inserção de mutação sítio-específica em plasmídios dupla fita, conforme a reação descrita a seguir:

Tabela 11. *Primers para mutagênese sítio-dirigida.*

| <i>Primer</i> | <i>Seqüência do primer (5'→3')</i> | <i>Sentido</i> |
|---------------|------------------------------------|------------------|
| mG56R_F | CCTGACTCAGAAATTCAGGCCCATCTACAGGC | <i>sense</i> |
| mG56R_R | GCCTGTAGATGGGCCTGAATTTCTGAGTCAGG | <i>antisense</i> |
| mH62L_F | CCATCTACAGGCTCCTCCTTGGGCTGCAAG | <i>sense</i> |
| mH62L_R | CTTGCAGCCCAAGGAGGAGCCTGTAGATGG | <i>antisense</i> |
| mL107R_F | GGAACTACCGGACCGGTCCTTGGGAGACTAC | <i>sense</i> |
| mL107R_R | GTAGTCTCCCAAGGACCGGTCCGGGTAGTTCC | <i>antisense</i> |
| mL142P_F | CAGTGGTGGAGCAGCCGACCCAGGAGTTCTG | <i>sense</i> |
| mL142P_R | CAGAACTCCTGGGTCGGCTGCTCCACCACTG | <i>antisense</i> |
| mR408C_F | GAGTTCTGGCCTGATTGCTTCCTGGAGCCAG | <i>sense</i> |
| mR408C_R | CTGGCTCCAGGAAGCAATCAGGCCAGAACTC | <i>antisense</i> |
| mP453S_F | CCTTCACGCTGCTGTCTCCGGGGACGC | <i>sense</i> |
| mP453S_R | GCGTCCCCGGAGGACAGCAGCGTGAAGG | <i>antisense</i> |

-Reação:

| | |
|--|-------------|
| Tampão de reação 10X (kit)..... | 1X |
| Primer <i>sense</i> | 125ng |
| Primer <i>antisense</i> | 125ng |
| pALTER- <i>CYP21A2</i> | 20ng |
| dNTP mix (kit)..... | 1µg |
| <i>Pfu Turbo</i> DNA polimerase (kit)..... | 2U |
| H ₂ O ultra-pura | q.s.p. 50µl |

Para estender e amplificar todo o vetor e o inserto por técnicas convencionais de PCR foi utilizada a enzima com atividade exonucleásica *Pfu Turbo* DNA polimerase (fornecida no kit). Após o término dos ciclos de amplificação, foi acrescentada à reação 1 U da enzima *Dpn* I (fornecida no *kit* acima), a qual reconhece o DNA parental proveniente da bactéria, vetor selvagem, pelo fato deste se encontrar metilado. Esta digestão foi realizada a 37°C por 1 hora, sendo em seguida estocada a temperatura de -20°C.

Assim, os vetores resultantes contendo as alterações correspondentes a cada mutação, foram utilizados na transformação das células supercompetentes *E.coli XLI-Blue MRF*® (Stratagene, Agilent Technologies Company, Estados Unidos), no intuito de se aumentar o número de cópias do plasmídeo e, assim, termos disponível quantidade suficiente para se realizar o seqüenciamento e, confirmar a introdução correta da alteração no cDNA.

A transformação foi realizada conforme o protocolo sugerido pelo fornecedor das células supercompetentes. Após a transformação todo o volume foi colocado em placas de *Petri* de 100 mm contendo meio LB agar com tetraciclina para seleção das colônias recombinantes, pois o vetor pALTER confere resistência a tal antibiótico. As placas foram incubadas a 37°C durante 16 horas. Para cada mutação e para o controle, foram selecionadas aleatoriamente seis colônias recombinantes, ou seja, quarenta e duas colônias no total. Estas foram colocadas isoladamente em 40 mL de meio LB líquido com tetraciclina e incubadas a 37°C durante 16 horas. Em seguida, foram coletados: 2 mL para estoque por congelamento em glicerol 10% e manutenção de cultura permanente de cada construção; 2 mL para a mini-

preparação e isolamento do plasmídio e, assim confirmar as seqüências por seqüenciamento; os outros 36 mL foram centrifugados e o precipitado formado (*pellet*) foi estocado a -20°C até obter os resultados dos seqüenciamentos que foram realizados com *primers* específicos para o cDNA do gene *CYP21A2* (Tabela 12).

Tabela 12. *Primers* específicos para o cDNA do gene *CYP21A2*.

| <i>Primers</i> | <i>Seqüência do primer (5' → 3')</i> | <i>Localização</i> | <i>Sentido</i> |
|----------------|--------------------------------------|--------------------|------------------|
| CYP21cDNA100 | TTGCTGCAGCCCGACCTCCCA | Exon 1 | <i>sense</i> |
| CYP21cDNA101 | GACGTGATTCCCTTTCTCAGG | Exon 7 | <i>sense</i> |
| CYP21cDNA102 | ATCGCCGAGGTGCTGCGCCTG | Exon 10 | <i>sense</i> |
| CYP21cDNA13 | AAGTGGCTCAGGTCTGCCAGC | Exon 2 | <i>antisense</i> |

Confirmadas as seqüências corretas para cada construção, os plasmídios de cada *pellet* estocado (uma colônia por mutação) foram purificados com o kit *Qiagen plasmid purification*® (Qiagen, Alemanha) e, posteriormente quantificados utilizando o aparelho de quantificação *Genequant II*® (Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Reino Unido).

Cada plasmídio isolado foi digerido com as enzimas de restrição *Bgl II* e *Kpn I*, para liberar o inserto do vetor pALTER e permitir seu encaixe correto no vetor pCMV4, vetor de expressão em células de mamíferos que possui um promotor forte de citomegalovírus e que tem origem de replicação normal do vírus SV40, o qual também foi previamente digerido com as mesmas enzimas. Seguiu-se o seguinte protocolo:

pALTER-*CYP21A2* mutado..... 1 µg
Bgl II (10 U/ µL)..... 5 U
Kpn I (10 U/ µL)..... 5 U
Tampão *One Phor All* 10X (Amersham)..... 1 X
BSA 10X (Promega)..... 1 X
H₂O ultra-puraq.s.p. 40 µL
Incubada a 37°C por 2 horas.

Tanto o inserto quanto o vetor de expressão pCMV4 foram purificados com o kit *Qiaquick*® (Qiagen, Alemanha) de extração em gel e, em seguida quantificados.

A ligação cDNA mutado ao vetor de expressão teve êxito com o kit de ligação *DNA insert ligation into vector DNA*® (Fermentas, Canadá), seguindo as instruções do fabricante:

| | |
|---------------------------------------|-------------|
| pCMV4 digerido e purificado..... | 40 ng |
| Inserto digerido e purificado..... | 80 ng |
| Tampão de ligação 10X..... | 1X |
| Enzima T ₄ DNA ligase..... | 2U |
| H ₂ O ultra-pura | q.s.p. 20µL |

Incubada a 22°C por 1 hora.

Após o período de incubação, a ligação foi purificada utilizando o kit *Qiagen PCR purification*®, sendo ressuspensa em 30 µL de H₂O ultra-pura (Sigma-Aldrich Company, Estados Unidos). Deste total, 5 µL foram utilizados para realizar a transformação por eletroporação das células competentes *E. coli Electro Ten-Blue*® (Stratagene, Agilent Technologies Company, Estados Unidos).

Para cada construção, a transformação foi realizada conforme o protocolo recomendado. Todo o volume foi inoculado em 2 placas de *Petri* 100 mm contendo LBagar e ampicilina como antibiótico. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite. No dia seguinte foram selecionadas seis colônias por construção. Estas foram inoculadas isoladamente em 40 mL de meio LB líquido com ampicilina durante 16 horas. Da mesma forma que para as construções de pALTER, foram coletados: 2 mL para cultura permanente da construção que foram congelados em glicerol 10%; 2 mL para a mini-preparação dos plasmídios para seqüenciar; os outros 36 mL foram centrifugados e o *pellet* formado foi estocado a -20°C até o resultado do seqüenciamento.

Confirmada a inserção correta dos cDNAs contendo as mutações, a partir do *pellet* estocado de cada construção, foi selecionada uma colônia para a extração do plasmídio através da purificação com o kit *Qiagen plasmid purification*® (Qiagen, Alemanha). Estes plasmídios foram posteriormente quantificado utilizando o *Genequant II*® (Amersham Pharmacia, GE Healthcare, Reino Unido) e estocados a -20°C até o início das transfecções.

3.1- Manutenção e preparo das células COS-1

A linhagem de células utilizadas para transfecção foi a COS-1, que como a variante COS-7 expressa o antígeno T constitutivamente e, quando transfectada com um vetor contendo uma origem de replicação normal para SV40, têm todos os outros genes virais necessários para gerar múltiplas cópias do vetor, proporcionando altos níveis de expressão (Gluzman *et al.*, 1981).

Foi descongelada uma alíquota de 1 mL de células em 10 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino estéril e gentamicina (DMEM+/+) em frasco de cultura T25 (Corning Incorporating, Estados Unidos). A primeira passagem foi realizada 72 horas após o descongelamento: o meio foi descartado e as células aderidas foram lavadas gentilmente com 2 mL de PBS (Invitrogen Corporation, Estados Unidos), que foi descartado e, em seguida, 1 mL de tripsina foi adicionado. Após desprenderem-se do frasco, as células foram colhidas e homogeneizadas com 1 mL de meio em seguida repassadas para um frasco T50 (Corning Incorporating, Estados Unidos), onde 10 mL de DMEM+/+ foram adicionados. Seguiu-se uma incubação de 48 horas até o primeiro repique, onde metade das células foi eliminada e a outra metade foi plaqueada novamente com 10 mL de meio. Após dois repiques no frasco T50 as células foram tripsinizadas e todo o volume foi passado para um frasco T75 (Corning Incorporating, Estados Unidos) com 15 mL de DMEM+/+. As células foram mantidas em frasco T75 até o momento da preparação para transfecção. Foi considerado o período viável para realizar a transfecção entre a 15^a e 30^a passagem das células, antes e depois deste período a linhagem demonstrou-se muito instável. Quando o repique atingia a 25^a passagem outra alíquota de COS-1 era descongelada, para que desta forma, a instabilidade celular não interferisse na realização dos experimentos.

3.2- Preparação das células para transfecção

Após descartar o meio do frasco de cultura T75, às células foram gentilmente adicionados 4 mL de PBS, a fim de eliminar qualquer traço de meio com soro fetal bovino, esse PBS foi descartado e, em seguida, foram adicionados 5 mL de tripsina, seguiu-se uma

incubação de cerca de 10 minutos a 37°C. Durante o período de incubação, placas de cultura de 12 poços foram preparadas adicionando-se a cada poço 1 mL de meio DMEM suplementado com soro fetal bovino e antibiótico gentamicina. As células então foram retiradas do frasco de cultura e colocada em tubo *Falcon*® de 50 mL; foram adicionados ao frasco de cultura 10 mL de PBS para retirar as células ainda aderidas, esse volume foi repassado também para o tubo de 50 mL. Em seguida, o tubo foi submetido à centrifugação por 7 minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi lentamente descartado e, ao precipitado foram adicionados 20 mL de PBS. O *pellet* foi ressuspendido após uma leve agitação manual, sendo em seguida centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado novamente e o *pellet* foi ressuspendido em 4 mL de meio com o auxílio de uma pipeta, desses, 25 µL foram colocados em cada poço da placa preparada anteriormente e homogeneizados manualmente. Após 24 horas, a confluência celular observada era em torno de 50% a 70%, ideal para a realização do processo de transfecção.

3.3- Transfecção das células COS-1 com as construções plasmidiais

Cerca de 30 minutos antes de realizar a transfecção, o meio sobre as células foi descartado e adicionado o mesmo volume de meio DMEM+/+ (temperatura ambiente). A transfecção foi realizada utilizando o reagente *FuGene 6*® (Roche, Suíça), que é um combinado de lipossomos que forma um complexo com o DNA, transportando-o para o interior de células. A transfecção foi realizada em conjunto (co-transfecção) para os plasmídios (pCMV4) contendo os cDNAs *CYP21A2* normal e mutantes e para o plasmídio (pH110) com o gene repórter *LacZ* (Pharmacia, GE Healthcare, Reino Unido). Foram colocados no mesmo tubo de 1,5 mL: 0,5 µg de pCMV4-*CYP21A2* e 0,1 µg de pH110-βgalactosidase. Em um segundo tubo de 1,5 mL foram colocados 650 µL de meio DMEM sem soro fetal bovino e sem gentamicina (DMEM-/-) e, a este, foram adicionados lentamente 20 µL do reagente *FuGene 6*®. Esta mistura foi incubada durante 5 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação, 56 µL foram adicionados em cada tubo contendo os vetores. Os tubos permaneceram em incubação por 15 minutos, e foram em

seguida distribuídos nos poços de forma a abranger todo o espaço. A placa foi incubada a 37°C por 24 horas.

3.4- Ensaio de 17-Hidroxiprogesterona (17-OHP)/ Progesterona (PROG)

A atividade enzimática de cada construção de CYP21A2 frente aos seus dois substratos, a 17-OHP na via dos glicocorticóides produzindo 11-desoxicortisol e, a PROG na via dos mineralocorticóides produzindo 11-desoxicorticosterona, foi verificada através de ensaio realizado após 24 horas de co-transfecção das células COS-1 com o vetores contendo o cDNAs mutados e normal e o gene repórter.

O meio DMEM+/+ foi totalmente removido, em seguida foi colocada a mistura com os respectivos substratos. Foram utilizadas as seguintes concentrações e volumes de reagentes por poço (placa de 12 poços):

| | |
|---|--|
| 17-OHP/PROG 50 µM em KH ₂ PO ₄ 200 mM pH7,2 (gelado)..... | 10 µl |
| 4 mM NADPH | 21 µl |
| *17-OHP*/*PROG*radioativo (³ H)..... | 0,5 µl (ressuspendido em 100 µl de KH ₂ PO ₄) |
| Meio DMEM suplementado..... | q.s.p 250 µl |

Incubado a 37°C (estufa) por 20 minutos.

Após o período de incubação o meio foi retirado e colocado em tubos de 1,5 mL, 2 tubos por poço (125 µL por tubo). Os tubos foram mantidos a -20°C até o momento do ensaio de atividade enzimática.

Às células aderidas foram adicionados 250 µL de tripsina após lavagem com PBS gelado. Quando descoladas, as células foram coletadas em tubos de 1,5 mL. Após centrifugação a 1.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com 250 µL de PBS e centrifugado novamente nas mesmas condições. Ao término da centrifugação, após descartar o sobrenadante, foram adicionados 100 µL de PBS. Os tubos foram mantidos a -20°C até o momento da sonicação.

As células foram sonicadas por 7 segundos, em seguida centrifugadas por 10 minutos, 14.000 rpm a 4°C. Os sobrenadantes foram retirados com cuidado e colocados em

tubos de 1,5 mL novos, estes foram mantidos a -20°C até o momento dos ensaios de concentração de proteína e de atividade de β-galactosidase.

3.5- Ensaio de atividade enzimática

Aos meios retirados em duplicata (125 µL/tubo), foram adicionados 250 µL de cloreto de metanol por tubo, permanecendo sob agitação por 15 minutos em temperatura ambiente seguindo-se uma centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm, onde os esteróides em metanol (fase incolor) foram separados do meio DMEM (fase rosa). A fase contendo os esteróides foi colocada em um novo tubo de 1,5 mL. Todos os tubos foram centrifugados a vácuo, com a tampa aberta até completa evaporação do solvente e somente o *pellet* concentrado permanecer no tubo. O precipitado foi ressuspendido em 15 µL da mistura de marcadores dissolvidos em etanol (tanto marcador para o substrato quanto para o produto), na concentração de 0,5 µg/µL (para 17-OHP: 17-hidroxiprogesterona e 11-DOL, para PROG: Progesterona e 11-DOC), permanecendo em agitação por 15 minutos. Todos os 15 µL foram aplicados em placas de cromatografia de camada delgada de gel de sílica sobre alumínio com distância de 1,5 cm de uma amostra para a outra, e a cromatografia foi realizada em Clorofórmio-Acetato de Etila (80:20, v/v) por 45 minutos em uma cuba de cromatografia. Em seguida o gel foi secado em temperatura ambiente. As manchas correspondentes aos substratos e aos produtos foram visualizadas sob luz ultra-violeta (UV) e delimitadas individualmente. Após recortadas, foram colocadas em frascos individuais de 4 mL, aos quais foram adicionados 3,5 mL de solução Ultima Gold (Kodak Digital Science, Estados Unidos) para a análise em contador de cintilação líquida. Após a leitura, a porcentagem de conversão foi calculada pela fórmula:

$$\frac{\text{Produto}}{\text{(Produto + Substrato)}} \times 100$$

Foram considerados como valores de conversão para cada mutação os correspondentes à média de cada duplicata. Os ensaios foram realizados sempre em paralelo

com um controle para a proteína normal (pCMV4-*CYP21A2 wild type*) e um controle negativo, que consistia de um plasmídeo vazio, portanto não formava a proteína CYP21A2 (pCMV4-*CYP21A2 mock*). Os ensaios incluídos na média geral foram os que apresentaram valor de conversão para o controle normal (*wt*) de no mínimo 45% frente aos dois substratos.

3.6- Ensaio de concentração da proteína total

Para quantificar o extrato protéico de alto peso molecular obtido das células COS-1 foi utilizado o método de Bradford (1976). A proteína solúvel contida no sobrenadante, obtido da sonicação das células desprendidas com tripsina, foi quantificada com o reagente Bradford (Bio-Rad, Estados Unidos) usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Os padrões de BSA foram preparados nas concentrações de: 0,2 µg/µL; 0,4 µg/µL; 0,6 µg/µL; 0,8 µg/µL; 1,0 µg/µL. De cada padrão, 20 µL (10 µL do padrão +10 µL de tampão de Fosfato de Sódio concentração 1 M) foram colocados em 980 µL do tampão de ensaio de proteína (*Bio-Rad® Protein assay buffer*) diretamente na cubeta de leitura de 1 mL. Da mesma forma, para a proteína (20 µL da proteína foram adicionados em 980 µL do tampão de ensaio de proteína).

As soluções foram homogeneizadas e mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente protegida de luz. Em seguida foram lidas em 590 nm em um espectrofotômetro.

Os ensaios de concentração de proteína somente foram considerados quando o fator de correlação (R^2) obtido era maior ou igual 0,95. Considerando que R^2 indica quão bom é o ajuste da curva em relação aos pontos experimentais. Este fator varia de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo da unidade melhor é o ajuste.

3.7- Ensaio de β -galactosidase

Para referência interna nos estudos de transfecção foi utilizado o ensaio de β -galactosidase com ONPG (2-Nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo). A β -galactosidase (β -gal) além de agir na clivagem de lactose, pode agir em simples galactosídeos como o ONPG. A

hidrólise de ONPG pela β -gal resulta na liberação de galactose e do o-nitrofenol, um componente cromogênico amarelo cujo máximo de absorção de luz é em 420 nm. O gene LacZ, que codifica a β -galactosidase, quando ligado a certos promotores é utilizado como repórter quando a intenção é observar a interação proteína-proteína ou a ativação da transcrição em condições experimentais, uma vez que a maioria dos tipos celulares de cultura de mamíferos contém baixos níveis de atividade de β -gal endógena. Assim, o ensaio de β -gal foi utilizado como controle de transfecção. O ensaio seguiu o protocolo abaixo detalhado:

Proteína..... 30 μ l
100x Tampão de Magnésio (100 mM MgCl₂ e 2-Mercaptoetanol 5M)..... 3 μ l
ONPG em tampão NaH₂PO₄ 0,2M 66 μ l
Tampão de Fosfato de Sódio 0,1 M, pH 7,3..... q.s.p 300 μ l

Incubado a 37°C por 30 minutos, ou até a solução ficar amarelada. Acrescentando em seguida 0,5 ml de Na₂CO₃ 1M para inativar a β -galactosidase e maximizar a absorbância do ONPG em 420 nm.

Para verificar a quantidade de proteína todas as amostras foram medidas em espectrofotômetro a 420 nm, utilizando como branco a solução com PBS.

3.8- Análise dos resultados dos ensaios

As análises dos dados obtidos foram realizadas em planilhas do programa Microsoft Excel®, onde a atividade específica da proteína normal (*wt*), das variantes e do controle negativo (*mock*) foi encontrada considerando:

$$\frac{([\text{pCMV4-CYP21A2 inicial}] \times \text{Valor de Conversão encontrado}/100)/\text{Total de proteína em mg}}{\text{Tempo de incubação com o substrato marcado radioativamente em minutos}}$$

Onde total de proteína em mg é dado por: Concentração de proteína em $\mu\text{g}/\mu\text{L} \times 0,1$.

Como a atividade específica do controle negativo esperada era nula ($V_{\text{mock}} = 0$), para normalização dos resultados a atividade basal encontrada foi retirada por subtração da

atividade das variantes e da proteína normal ($V_{\text{proteína}} - V_{\text{mock}}$). Para o cálculo da atividade relativa, o valor da atividade específica da proteína normal menos a atividade específica encontrada no controle negativo foi arbitrariamente considerada 100%, assim a atividade relativa em porcentagem para as variantes foi dada por:

$$\frac{(V_{\text{proteína mutada}} - V_{\text{mock}})}{(V_{\text{proteína normal}} - V_{\text{mock}})} \times 100$$

Foram realizados 12 experimentos independentes para cada substrato (17-OHP e PROG), desses, os que apresentaram valores de concentração de proteína semelhantes e bons resultados de conversão (conversão da proteína normal acima de 45%), foram considerados. Os cinco melhores experimentos foram utilizados para calcular a média tanto para as atividades específicas quanto relativas de cada variante da proteína e controles.

3.9- Cinética da proteína

O estudo cinético da atividade protéica foi empregado para os casos onde a conversão observada não sugeria valores nulos, ou muito baixos. A análise foi baseada na equação de Michaelis-Menten, a qual é definida com a equação da velocidade para reações catalisadas por enzimas que têm apenas um substrato:

$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + [S]}$$

Esta equação relaciona a velocidade inicial (v_0), a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) e a concentração inicial do substrato ($[S]$), por intermédio da constante de Michaelis-Menten (K_m). Sendo K_m igual a $[S]$ na qual v_0 é a metade da $V_{\text{máx}}$. A constante de Michaelis de uma proteína é característica importante não somente para a descrição matemática da cinética enzimática, mas também para o ensaio quantitativo da atividade enzimática.

O valor de K_m para uma determinada proteína pode ser obtido pela aproximação de uma série de experimentos únicos em que a v_0 da reação é medida em diferentes concentrações iniciais do substrato, em uma concentração fixa da proteína. Para CYP21A2 foram utilizadas as seguintes concentrações iniciais de substrato: 0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM ; 3 μM ; 4 μM e 7 μM .

Para obtenção de gráficos dos dados experimentais a equação de Michaelis-Menten foi transformada algebricamente na equação de Lineweaver-Burk, através da substituição dos valores inversos em ambos os lados da equação:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{\text{máx}} [S]}$$

Quando $1/v_0$ é colocado em um gráfico contra $1/[S]$ obtém-se uma linha reta, com inclinação de $K_m/V_{\text{máx}}$ e intercepção no eixo $1/v_0$ (Y) de $1/V_{\text{máx}}$ e no eixo $1/[S]$ (X) de $-1/K_m$. Esse gráfico duplo-recíproco permite uma determinação mais exata de $V_{\text{máx}}$ e fornece valores importantes com relação à inibição enzimática.

A análise dos gráficos foi realizada considerando os coeficientes angular (a) e linear (b). Foram aceitos os experimentos que apresentavam todos os gráficos (proteína normal e proteína mutante) com fator de correlação (R^2) maior ou igual a 0,95.

3.10- Western blotting

A técnica de *Western blotting* foi utilizada para verificar se a proteína CYP21A2 foi ou não expressa nas células transfectadas através da observação do tamanho correto revelado pelo anticorpo específico e estimar sua concentração. A análise por *Western blotting* foi realizada de duas formas, para as proteínas extraídas das células coletadas por desprendimento com tripsina e para proteínas de células coletadas diretamente do poço com tampão de lise.

Para as proteínas de células coletadas por tripsina:

Em 30 µg da proteína foram colocados 20 µL do mix para corrida previamente preparado (11 µL de H₂O miliQ; 5 µL de tampão de amostra *NUPAGE® LDS 4X* (Invitrogen Corporation, Estados Unidos); 4 µL de β-mercaptoetanol). Em seguida desnaturado a 80°C por 4 minutos. Todo o volume foi aplicado no gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE (Nupage Novex® Invitrogen Corporation, Estados Unidos), 12 poços juntamente com um padrão (*rainbow ladder*), na cuba previamente preparada com o tampão de corrida *NUPAGE®*. O gel correu por 1 hora a 200 V. Durante este período o material para a transferência foi preparado, a membrana foi recortada do tamanho do gel bem como 2 papéis filtros, as esponjas ficaram embebidas no tampão de transferência *NUPAGE®* com 10% de metanol. Após a corrida o gel foi retirado da placa aderindo diretamente na membrana de nitrocelulose (Hybond™-C, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Reino Unido), um papel filtro foi posto de cada lado do gel na membrana, foram postas duas esponjas na cuba de transferência, o gel aderido à membrana entre os papéis filtros e mais duas esponjas, fechando o aparato logo em seguida. A transferência ocorreu durante 1 hora a 30 V. Após a transferência a membrana foi lavada rapidamente com tampão TBS-T (8 g de NaCl, 20 mL de Tris-HCl 1M pH 7,6 em 1 litro de H₂O destilada com 1% de Tween 20). Para verificar a eficiência da transferência a membrana foi corada com *Ponceau* por 5 minutos sob leve agitação e, fotografada. A membrana em seguida ficou sob agitação durante 2 horas em TBS-T com 5% de leite desnatado, em temperatura ambiente. Descartado o tampão, foi adicionado anticorpo primário policlonal contra CYP21A2 humana produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos) na proporção de 1:2.000 em TBS-T 5% leite, permanecendo em leve agitação *overnight* em baixa temperatura (Lajic *et al.*, 2002). No dia seguinte o tampão com o anticorpo primário foi retirado e estocado a -20° em tubo *Falcon®* de 50 mL. A membrana foi novamente lavada com TBS-T e em seguida permaneceu sob agitação por 2 horas em TBS-T 5% leite, boqueando a primeira reação. A membrana foi exposta ao anticorpo secundário *anti-rabbit IgG* (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos) em TBS-T 5% leite na proporção de 1:1.500. Após incubação a membrana foi novamente lavada com TBS-T, em seguida foram adicionados os reagentes *ECL® 1 e 2* (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Reino Unido), reagentes de imunodeteção quimiluminescente. A quimiluminescência foi detectada por um analisador de imagens

(Image Reader LAS-1000, Fujifilm Corporation, Japão) e avaliada pelo programa *Image Gauge*® (Fujifilm Corporation, Japão).

Para as proteínas das células coletadas diretamente da placa com tampão de lise:

As proteínas foram coletadas diretamente das células plaqueadas 48 horas após a transfecção com tampão de lise. Após retirar o meio DMEM+/+ da placa, cada poço foi lavado com PBS, o qual foi em seguida descartado. Adicionou-se ao poço 200 µL de tampão de lise, composto por:

- 4 mL de tampão para ressuspender células (NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH 7.6, EDTA 1 mM);

- 5 mL SDS 2X (100 mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 50 mM DTT e azul de bromofenol suficiente para dar coloração azul escuro);

- 1 mL DTT 1M.

Todo o volume do poço (+/-300µL) foi repassado para um novo tubo de 1,5 mL e desnaturado a 80°C por 5 minutos. Em seguida 10 µL desse lisado foram aplicados no gel 10% SDS-PAGE (NUPAGE®, Invitrogen Corporation, Estados Unidos), juntamente com um padrão (*rainbow ladder*). A partir desta etapa procedeu-se seguindo o protocolo descrito acima para as proteínas extraídas das células coletadas por tripsina.

3.11- Estudo *in silico*

Para verificar quão conservada a posição protéica onde houve a troca de aminoácido é na proteína, as seqüências da CYP21A2 humana normal e mutantes foram comparadas às seqüências correspondentes de várias espécies de mamíferos (Bairoch *et al.*, 2005), tais como: camundongo, rato, cachorro, boi, ovelha e porco, utilizando o programa de múltiplo alinhamento de seqüências *ClustalW* (<http://align.genome.jp/>, acesso livre) (Thompson *et al.*, 1994).

Para a avaliação estrutural de cada alteração, o modelo hipotético PDB-ID 2GEG previamente descrito, e validado da proteína CYP21A2 humana (Figura 6), obtido com base na estrutura cristalizada da proteína CYP2C5 de coelho foi utilizado. O modelamento molecular foi realizado através do *software MODELLER 8v2*® (<http://salilab.org/modeller/>,

acesso livre) (Sali e Blundell, 1993). Foram construídos 20 modelos para cada mutação, os quais foram avaliados pelos métodos computacionais *Procheck*® (Laskowski *et al.*, 1993) e gráfico *Ramachandran*® (Branden e Tooze, 1999), onde cada modelo foi comparado com a estrutura padrão e o melhor modelo para cada mutação foi selecionado para a análise. A visualização e a manipulação das estruturas foram realizadas através da interface gráfica gerada pelo programa de acesso livre *STING Millennium* (suíte *BlueStar STING*, www.cnptia.embrapa.br) (Neshich *et al.*, 2003).

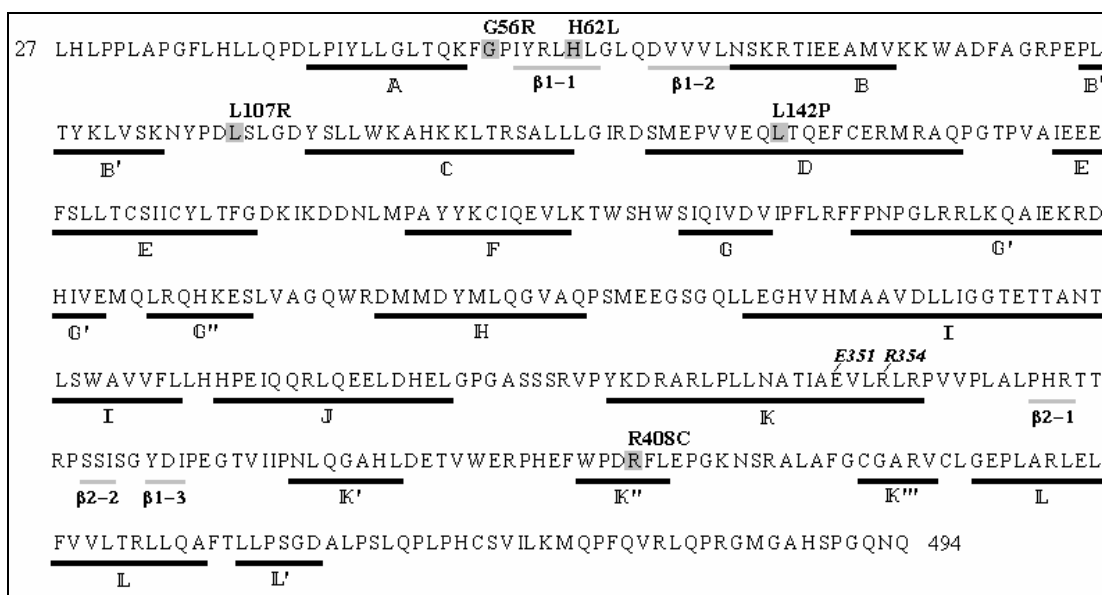


Figura 6. Seqüência da proteína modelo PDB-ID 2GEG, iniciando no aminoácido 27 (os 26 primeiros aminoácidos foram retirados devido sua hidrofobicidade, para facilitar o modelamento) e terminando no aminoácido 494. Sublinhado em preto as alfa-hélices, sublinhado em cinza as folhas β , em destaque as mutações alvo deste estudo e os aminoácidos p.E351 e p.R354, importantes estabilizadores da estrutura da proteína.

4- Construção dos mini-genes

4.1- Amplificação dos fragmentos

A partir do DNA genômico dos pacientes portadores das variantes IVS2 +5G>A, IVS2-2A>G, IVS4-Exon5 (g.1104A>C (IVS4-15C>A)+g.1111C>T (IVS4-8T>C) +g.1121C>G (p.D183E)) no gene *CYP21A2* e da alteração g.1753G>A no gene *CYP11B1*, foi realizada a amplificação da seqüência exon-intron-exon pela técnica de PCR utilizando-se os *primers* descritos na Tabela 13. Esses *primers* foram desenhados com base nas seqüências originais dos genes, porém foram introduzidas algumas alterações nucleotídicas para a criação de sítios de restrição para as enzimas *Xba* I (*primers sense*) e *Bam*H I (*primers antisense*) flanqueando os fragmentos amplificados, de forma a se garantir a ligação direcionada ao vetor pSVL (Pharmacia, GE Healthcare, Reino Unido). Assim, a estratégia de estudo das alterações envolveu a construção de mini-genes com exons flanqueadores ao intron que apresentava a alteração (Figura 7).

Tabela 13. Seqüências dos *primers* usados para os genes *CYP21A2* e *CYP11B1*, para a construção de mini-genes.

| <i>Gene</i> | <i>Exon-intron-exon</i> ¹ | <i>Seqüência do primer</i> ² (5'→3') | <i>Fragmento</i> |
|----------------|---|--|------------------|
| <i>CYP21A2</i> | Ex 1- IVS1- ex 2- IVS2- ex 3 | EX1s- <i>Xba</i> I- ATG CTG CTC TAG AGC CTG CTG C EX3as- <i>Bam</i> H I- CTC ACA GAT CCC CTG GGT CAG CTG C | 822 pb |
| <i>CYP21A2</i> | Ex 2- IVS2- ex 3- IVS3- ex 4- IVS4- ex 5- IVS5- ex 6 | EX2s- <i>Xba</i> I- CCA GAT GTC TAG ATG ATG AAC TCC AAG EX6as- <i>Bam</i> H I - GTG GAT CCG AGG GGA GGC CGT | 1110 pb |
| <i>CYP11B1</i> | Ex 3- IVS3- ex 4- IVS4- ex 5 | EX3s- <i>Xba</i> I- TGG CCT CTC TAG AAA TGG G EX5as- <i>Bam</i> H I - ATA GCC TGG GAT CCG GAC A | 1095 pb |

¹ex = exon e IVS= intron. ²As bases em negrito foram alteradas para a criação do sítio da enzima de restrição *Xba* I (TCTAGA) ou *Bam*H I (GGATCC). s= *sense* ou direto e as= *antisense* ou reverso.

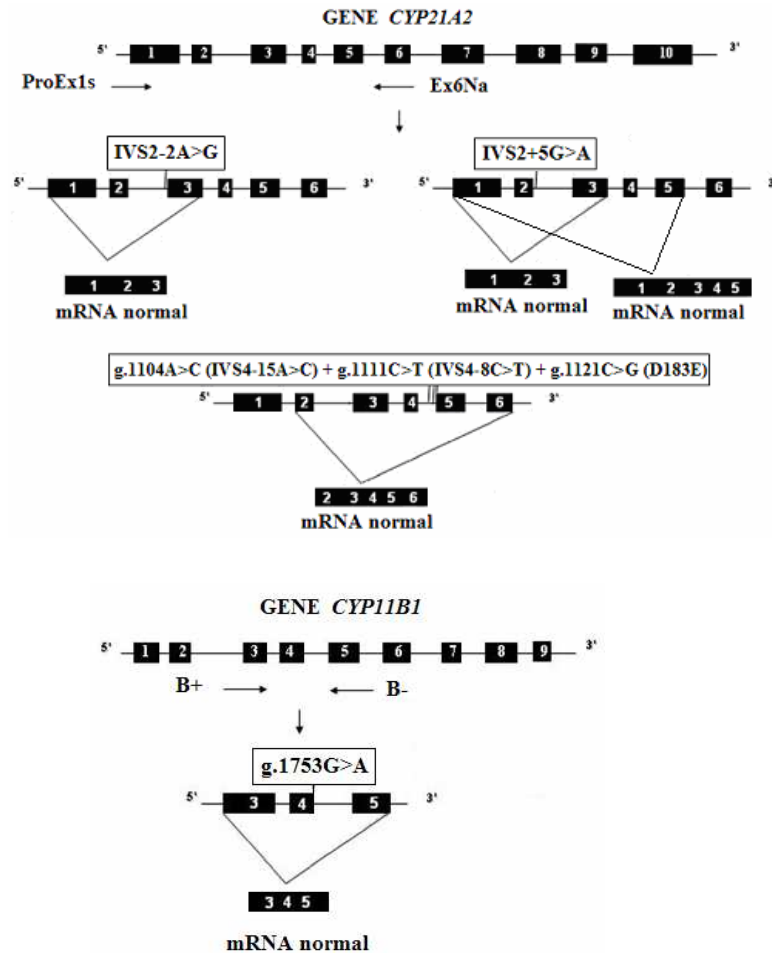


Figura 7. Seqüências dos genes *CYP21A2* e *CYP11B1*, destacando os fragmentos utilizados para construção dos mini-genes.

Para a reação de PCR foi utilizada a enzima *Platinum Pfx Taq DNA polymerase* (Invitrogen Corporation, Estados Unidos) por possuir maior processividade e fidelidade, além de apresentar atividade exonucleásica 3'→5', evitando desta forma a inserção de falsas variações nucleotídicas.

Todos os *primers* utilizados para a amplificação dos genes *CYP21A2* e *CYP11B1* foram desenhados com base nas seqüências dos genes (item 3.2.8), com o auxílio do programa *Gene Runner versão 3.01*.

4.2- Preparação das células competentes para transformação por tampão químico

Optamos pelo protocolo para preparação de células competentes *E. coli* DH5 α conforme Nishimura *et al.* (1990):

- Uma única colônia de *E.coli* DH5 α foi inoculada em 5 mL de meio TYM durante toda a noite a 37°C e sob agitação de 250 rpm;
- 100 μ L da cultura foram adicionados a 10 mL de meio TYM (1:100) ;
- 10 mL de cultura foram incubados a 37°C e sob agitação de 250 rpm até atingir OD₆₀₀ entre 0,2 – 0,6;
- Os 10 mL foram transferidos para um Erlenmeyer contendo 40 mL de meio TYM;
- 50 mL de cultura foram incubados novamente a 37°C e sob agitação de 250 rpm até atingir OD₆₀₀ entre 0,2 – 0,9;
- Os 50 mL de cultura foram adicionados a um Erlenmeyer contendo 200 mL de meio TYM;
- Os 250 mL de cultura foram incubados a 37°C e sob agitação de 250 rpm até atingirem OD₆₀₀ = 0,6;
- Atingindo a densidade óptica desejada a cultura foi mantida em gelo por 5 minutos;
- O volume total da cultura foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C;
- O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de bactérias foi ressuscitado em 100 mL de TBF1 gelado;
- As células foram centrifugadas por 8 minutos a 4°C e 3000 rpm.
- O sobrenadante foi novamente descartado e as células foram ressuscitadas em 10 mL de TBF2 gelado;
- Foram distribuídas alíquotas de 100 μ L de células em tubos de 1,5 mL e armazenadas em freezer –70°C.

Meio TYM

Peptona..... 6g
Extrato de Levedura..... 1,5g
NaCl..... 1,74g

Meio TBF1

C₂H₃O₂K..... 0,44g
MnCl₂.4H₂O..... 1,48g
KCl..... 1,11g

| | | | |
|---|--------|---|--------|
| MgSO ₄ .7H ₂ O..... | 0,75g | CaCl ₂ .2H ₂ O..... | 0,22g |
| H ₂ O destilada q.s.p..... | 300 mL | Glicerol..... | 15% |
| | | H ₂ O destilada q.s.p..... | 150 mL |

Meio TBF2

| | |
|--|-------|
| MOPS pH 7 0,01M..... | 0,03g |
| CaCl ₂ . 2H ₂ O..... | 0,16g |
| KCl..... | 0,01g |
| Glicerol..... | 15% |
| H ₂ O destilada q.s.p..... | 15 mL |

4.3- Clonagem em pGEM-T easy

O Kit *pGEM- T Easy Vector System* (Promega Corporation, Estados Unidos), que usa como vetor o plasmídeo pGEM, permite a clonagem direta de produtos de PCR sem a necessidade de digestão e purificação usando a propriedade da enzima *Taq* DNA Polimerase de adicionar um nucleotídeo A (adenina) nas extremidades 3' dos fragmentos amplificados, estes vetores ficaram conhecidos como de clonagem do tipo T-A. A clonagem inicial em pGEM-T foi realizada para selecionar o fragmento de interesse, possibilitando assim obter uma maior quantidade do fragmento clonado com menor manuseio.

A mistura de reação para a ligação dos fragmentos utilizando o vetor pGEM-T, foi incubada em geladeira durante 16 horas (~15°C) e foi preparada da seguinte forma:

| | |
|--|-------|
| Tampão 2x <i>Rapid Ligation</i> (fornecido pelo fabricante)..... | 5 µL |
| Enzima <i>T4 DNA ligase</i> (3 U/µL)..... | 1 µL |
| Vetor pGEM (50 ng/µL)..... | 1 µL |
| Produto de PCR (~100 ng)..... | 3 µL |
| H ₂ O ultra-pura q.s.p..... | 10 µL |

O processo de transformação ocorreu por método de transformação química, segundo Levy *et al.* (1991):

- Foram adicionados os 10 μ L da ligação a 40 μ L de tampão de transformação (descrito a seguir), permanecendo por 5 minutos em gelo;
 - Concomitantemente, uma alíquota de 100 μ L de células competentes foi descongelada lentamente (mantidas em gelo);
 - Adicionou-se a ligação com tampão às células competentes, permanecendo em seguida 30 minutos no gelo;
 - Após a incubação em gelo, permaneceu por 10 minutos à temperatura ambiente;
 - Adicionou-se 500 μ L de meio LB e incubou-se a 37°C por 50 minutos;
 - 200 μ L de meio líquido com as bactérias transformadas foi plaqueado em placas de LB agar com ampicilina (25 mg/mL) e X-gal/IPTG (20 mg/mL);
- As placas permaneceram em 37°C de 16 a 20 horas.

Tampão de Transformação

| | |
|---|--------|
| KCM 10x (KCl 1M; CaCl ₂ 0,3M; MgCl ₂ 0,5M)..... | 1 mL |
| PEG 10% (polietilenoglicol 6000)..... | 1,5 mL |
| H ₂ O ultra-pura | 7,5 mL |

O vetor pGEM-T possui, além do gene de resistência à ampicilina, o gene da β -galactosidase, que permite selecionar as colônias transformadas utilizando um análogo da lactose, X-gal/IPTG como substrato, que produz um composto de cor azul com o vetor selvagem. Assim, as colônias recombinantes foram selecionadas, por apresentarem a cor branca.

As colônias recombinantes foram selecionadas e inoculadas em 5 mL de meio LB líquido contendo 10 μ L de ampicilina (25 mg/mL), seguida de incubação durante 12 horas a 37°C e 200 rpm. As colônias que cresceram foram isoladas para as mini-preparações para extração dos plasmídios e, em seguida, a presença do inserto foi confirmada por reação de

PCR com *primers* específicos para o vetor pGEM-T (Tabela 14), próximos ao *polylinker* de clonagem do vetor.

Tabela 14. Seqüências dos *primers* específicos para o vetor pGEM-T.

| <i>Seqüência do primer (5'→3')</i> | <i>Sentido</i> | <i>Fragmento (pb)</i> |
|---|------------------|-----------------------|
| pGEM T7- TAA TAC GAC TCA CTA CTA TAG GG | <i>sense</i> | 126 s/inserto |
| pGEM SP6- TAT TTA GGT GAC ACT ATA G | <i>antisense</i> | |

4.4- Extração de plasmídeo em pequena escala (Mini-preparação)

A mini-preparação foi realizada de acordo com as seguintes etapas:

- 1,5 mL da cultura de bactérias foram adicionados a tubos de 1,5 mL;
- A suspensão foi centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos;
- O sobrenadante foi descartado;
- Foram adicionados outros 1,5 mL de cultura que foram também centrifugados, e o sobrenadante descartado;
- Ao *pellet* de bactéria foram adicionados 300 µL de solução P1 seguido de agitação em vortex;
- Ao *pellet* homogeneizado com P1 foram adicionados 300 µL de solução de lise (P2) e invertido lentamente;
- O lisado foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos;
- Foram adicionados 300 µL de solução P3;
- Centrifugou-se a 13.000 rpm por 10 minutos;
- Um volume de 600 – 800 µL do sobrenadante foram colhidos, aos quais foram adicionados 400 µL de isopropanol;
- A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 13.000 rpm;
- O sobrenadante foi descartado e 600 µL de etanol 70% foram adicionados;
- A mistura foi homogeneizada por inversão lenta do tubo e, centrifugada por 5 minutos a 13.000 rpm;

- O sobrenadante foi descartado e após o etanol evaporar foram adicionados 60 µL de TE 1x para ressuspender os plasmídios aderidos a parede do tubo.

Solução P 1

Glicose 1 M..... 2,5 mL
EDTA 0,5 M..... 1 mL
Tris-HCl pH 8,0 2 M..... 0,625 mL
H₂O destilada q.s.p..... 50 mL

Solução P 2

SDS 20%..... 1 mL
NaOH 10 N..... 400 µL
H₂O destilada q.s.p..... 20 mL

Solução P 3

CH₃COOH..... 11,5 mL
C₂H₃O₂K 5 M..... 60 mL
H₂O destilada q.s.p..... 100 mL

A partir dos plasmídios que continham os insertos foram realizadas reações de seqüenciamento para a confirmação da inserção correta dos sítios de restrição de *Xba* I e *Bam*H I incluídos nos terminais 5' dos *primers* e, para verificar a acuidade das seqüências amplificadas. O seqüenciamento foi realizado utilizando-se *primers* T7 e SP6 do vetor pGEM-T.

4.5- Clonagem em pSVL

A quantificação do plasmídio pSVL foi realizada utilizando um marcador de peso molecular quantitativo, o 1 Kb *High DNA Mass Ladder* (Invitrogen Corporation, Estados Unidos). A partir da quantificação do plasmídio foi possível calcular a quantidade de inserto a ser utilizada na reação de ligação, usando a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{ng vetor} \times \text{tamanho (Kb) inserto} \times 3}{\text{Tamanho (Kb) vetor}} = \text{quantidade do inserto em ng}$$

Tanto o vetor pSVL (Pharmacia, GE Healthcare, Reino Unido) quanto o inserto (produto da PCR ou fragmento clonado em pGEM) foram previamente digeridos com as enzimas de restrição *Xba* I e *Bam*H I. A digestão do vetor e do inserto ocorreram de acordo com o seguinte protocolo:

Inserto (fragmento amplificado)

produto de PCR..... 5 µL
Tampão *One Phor All 10X* (Pharmacia)..... 1 µL
Enzima de restrição *Xba* I (10 U/µL)..... 0,4 µL
Enzima de restrição *Bam*H I (10 U/µL).... 1,5 µL
H₂O ultra-pura..... q.s.p. 10 µL

Plasmídio pSVL

pSVL (500 µg/mL)..... 1,5 µL
Tampão *One Phor All 10X* (Pharmacia)..... 1 µL
Enzima de restrição *Xba* I (10 U/µL)..... 0,4 µL
Enzima de restrição *Bam*H I (10 U/µL).... 1,5 µL
H₂O ultra-pura..... q.s.p. 10 µL
Incubados simultaneamente a 37⁰C por 2 horas em banho-Maria.

Após as digestões, fez-se as reações de ligação do plasmídio pSVL aos insertos. As quantidades do vetor pSVL e do inserto a serem colocadas na reação foram diferentes de acordo com a concentração e tamanho dos últimos. As reações de ligação foram realizadas utilizando os reagentes do kit do vetor pGEM-T (Promega Corporation, Estados Unidos), conforme especificado abaixo:

Tampão 2x *Rapid Ligation* (kit *pGEM-T easy*)..... 5 µL
Enzima *T4 DNA ligase* 3U/µL (kit *pGEM-T easy*)..... 1 µL
Vetor pSVL (50 ng/µL)..... 1 µL
Inserto..... 3 µL

H₂O ultra-pura.....q.s.p. 10 µL

A reação foi incubada em geladeira a ~15⁰C durante 16 horas.

Os plasmídios resultantes contendo os fragmentos de interesse foram introduzidos em células competentes *E. coli* DH5α, por transformação química seguindo o protocolo descrito anteriormente (item 3.4.3).

No caso do vetor pSVL, a resistência à ampicilina é a única forma de seleção das colônias que obtiveram êxito na transformação e que contém plasmídios.

4.6- Identificação do inserto por PCR das colônias

Após o crescimento das colônias, foram feitas placas réplicas apoiadas sobre papel quadriculado, para facilitar a identificação após o reconhecimento de quais colônias possuíam o inserto de interesse. As colônias foram triadas por PCR utilizando *primers* flanqueadores do *polylinker* de clonagem do vetor (Tabela 15).

Tabela 15. Seqüências dos *primers* específicos para o vetor pSVL.

| <i>Seqüência do primer (5'→3')</i> | <i>Sentido</i> | <i>Fragmento (pb)</i> |
|-------------------------------------|------------------|-----------------------|
| pSVL F- TCA CTG CAT TCA AGT TGT GGT | <i>sense</i> | 86 s/inserto |
| pSVL R- CTT CTG CTC TAA ACC GGA TC | <i>antisense</i> | |

A reação de PCR para identificação das colônias foi realizada como descrito a seguir:

Tampão Invitrogen 10X..... 5 µL

MgCl₂ 50 mM..... 1,5 µL

dNTPs 2 mM..... 5 µL

Primer (sense e antisense) 20 pmoles 1 µL (de cada)

Taq DNA polymerase 5U/ µL (Invitrogen)..... 2,5 U

H₂O ultra-pura..... q.s.p. 50 µL

Confirmados os plasmídios com os insertos apresentando tamanhos correspondentes aos fragmentos esperados, os mesmos foram seqüenciados para verificação das seqüências.

4.7- Descongelamento e cultura das células COS-7

As células COS-7 utilizadas neste experimento foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Carlos Menck, do Departamento de Microbiologia, ICB-USP. Foram descongeladas conforme protocolo estabelecido no laboratório de origem:

- A assepsia na capela do fluxo laminar foi realizada com álcool 70% e, antes do uso, a lâmpada de UV e o exaustor permaneceram ligados durante 2 horas;
- O meio DMEM (Invitrogen Corporation, Estados Unidos) foi inicialmente suplementado com 10% soro fetal bovino estéril (Nutricell, Brasil), e neste foi acrescentada a solução de 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Nutricell, Brasil);
- As células foram descongeladas em banho-maria a 37° C, evitando que a temperatura das mesmas atingisse 37°C e, evitando a presença de cristais;
- Sob a capela de fluxo laminar o conteúdo do tubo foi homogeneizado lentamente com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* e todo o volume foi repassado para o fundo de um frasco de cultura T25;
- Gotejou-se lentamente 10 mL de meio DMEM suplementado (+/+) com uma pipeta automática, agitando suavemente o frasco;
- Para verificar a viabilidade das células foi separada uma alíquota de 50 µL do conteúdo total do frasco de cultura, a qual foi diluída em solução de azul de Tripán 1% e, em seguida o número de células viáveis foi contado em câmara de *Neubauer*.

4.8- Manutenção das células COS-7

Após 24 horas de incubação a 37°C em estufa com 5% de CO₂, o meio DMEM suplementado (+/+) foi retirado e substituído pelo mesmo volume de meio DMEM+/+ novo. A primeira passagem foi realizada 72 horas após o descongelamento, o meio foi descartado e as células foram gentilmente lavadas com 2 mL de PBS (Invitrogen Corporation, Estados

Unidos) em temperatura ambiente, o qual foi descartado e, em seguida foi adicionado 1 mL de tripsina. Após descolamento, as células foram coletadas e homogeneizadas com 1 mL de meio em seguida repassadas para um frasco T50, ao qual foram adicionados 10 mL de DMEM+/. Seguiu-se uma incubação de 48 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂, até o primeiro repique, quando metade das células foi descartada e a outra metade foi inoculada novamente em 10 mL de meio. Após dois repiques em frascos T50 as células foram tripsinizadas e todo o volume foi colocado em um frasco T75 contendo 15 mL de DMEM+/. No frasco T75 as células foram mantidas até o momento da preparação para transfecção.

4.9- Preparação das células para transfecção

Quando as células no frasco T75 apresentaram cerca de 80% de confluência o meio DMEM foi descartado e, a elas foram gentilmente adicionados 4 mL de PBS; após descarte do sobrenadante foram adicionados 5 mL de tripsina, seguido de incubação por cerca de 10 minutos. Durante o período de incubação as placas de *Petri* de 100 mm foram preparadas com 8 mL de meio DMEM+/. As células então foram colocadas em um tubo *Falcon*® de 50 mL. Foram adicionados ao frasco de cultura 10 mL de PBS para retirar as células ainda aderidas, esse volume foi repassado para o tubo de 50 mL. Em seguida o material foi centrifugado por 7 minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi lentamente descartado e ao tubo foram adicionados 20 mL de PBS, o *pellet* foi ressuspendido após uma leve agitação manual, sendo centrifugado em seguida. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido com o auxílio de uma pipeta em 3,5 mL de meio DMEM+/, dos quais uma alíquota de 0,5 mL foi colocada em cada placa de *Petri* de 100 mm preparada anteriormente e homogeneizados manualmente, aproximadamente 1×10^6 células/ placa. Após 24 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂, a confluência observada foi de 60-75%, ideal para prosseguir com o procedimento da transfecção.

4.10- Transfecção com as construções dos mini-genes

Cerca de 2 horas antes da transfecção o meio das células foi descartado e colocado igual volume de meio DMEM com soro fetal bovino, sem antibióticos (+/-). A transfecção das células COS-7 foi realizada utilizando o reagente *Lipofectamine 2000*® (Invitrogen Corporation, Estados Unidos). Para cada amostra foram preparados: 36 µL do reagente *Lipofectamine 2000*® em 600 µL de meio DMEM puro (-/-) em um tubo de 1,5 mL (mistura 1). Em um segundo tubo (mistura 2), 16 µg dos plasmídios (pSVL) contendo os fragmentos de interesse foram diluídos lentamente em 600 µL de meio DMEM-/- . Cuidadosamente, com o auxílio de uma pipeta adicionou-se toda a mistura 2 ao tubo contendo a mistura 1. O volume total (mistura 1 + mistura 2) permaneceu incubado por 15 minutos em temperatura ambiente antes de ser adicionado à placa de *Petri* contendo as células COS-7. A placa foi incubada a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas.

4.11- Extração do RNA total

Esta etapa foi realizada inicialmente seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante para extração de RNA de cultura de células animais do kit *RNeasy*® (Qiagen, Alemanha), no entanto não apresentou a eficiência esperada por problemas de degradação. Assim optou-se por coletar as células diretamente no tampão de lise, reduzindo assim etapas de manuseio do material.

Passadas 24 horas da transfecção, o meio foi descartado e foram feitas duas lavagens com 2 mL de PBS cada. Após descartar o PBS, 350 µL do tampão RLT (*RNeasy*® kit, Qiagen, Alemanha) contendo 1% de β-mercaptoetanol foram adicionados diretamente sobre as células, a placa de *Petri* foi agitada manualmente de forma a cobrir toda superfície com o tampão. Com o auxílio de um *rubber policeman* as células foram descoladas da placa, e em seguida coletadas em tubos de 1,5 mL. As células foram homogeneizadas com o auxílio de uma seringa de 1 mL com agulha de 21G, o tubo permaneceu em gelo seco até posterior estocagem a -80°C. A extração do RNA total prosseguiu de acordo com o seguinte protocolo:

- O volume total de células contidas no tampão de lise RLT (*RNeasy*® kit, Qiagen, Alemanha) descrito acima foi transferido para uma coluna de separação com filtro (fornecida no kit) a qual foi acoplado a um tubo de 2 mL (fornecido no kit) e o sistema foi centrifugado por 2 minutos a 13.000 rpm;
- Ao filtrado adicionou-se 350 µL de etanol 70% gelado, homogeneizando com o auxílio de pipeta;
- O homogeneizado anterior foi transferido para uma segunda coluna com filtro (fornecida no kit) a qual foi também acoplada a um tubo de 2 mL (fornecido no kit), o sistema foi centrifugado por 1 minuto a 10.000 rpm;
- Descartou-se o filtrado e à coluna foram adicionados 700 µL de tampão RW1 (fornecido no kit), centrifugando por 1 minuto a 10.000 rpm;
- A coluna foi transferida para um novo tubo de 2 mL, à coluna foram adicionados 500 µL de tampão RPE (fornecido no kit), seguido de centrifugação por 1 minuto a 10.000 rpm;
- Descartou-se o eluato e, a etapa anterior foi repetida;
- Centrifugou-se por mais 1 minuto a 10.000 rpm, para retirar o excesso de etanol da coluna;
- A coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, adicionou-se 30 µL de água livre de RNase (tratada com DEPC);
- Centrifugou-se por 1 minuto a 10.000 rpm, a coluna foi descartada e o tubo foi armazenado a -80°C.

Quando observada a contaminação do RNA total por DNA, o mesmo foi tratado com *DNase I* (Invitrogen Corporation, Estados Unidos) conforme protocolo do fabricante, para digerir qualquer DNA presente.

4.12- Síntese do cDNA

A concentração do RNA extraído foi verificada através da quantificação por leitura de absorbância óptica a 260 nm em espectrofotômetro *DU-65 Spectrophotometer* (Beckman). Água tratada com DEPC foi utilizada como amostra referência (branco) para calibrar o aparelho, 1 µL da amostra de RNA foi diluída em 49µL de água tratada com DEPC (fator de diluição= 50). A concentração das amostras foi obtida por:

$$[\text{RNA } (\mu\text{g/ mL})] = 40 \times \text{Absorbância } 260 \times \text{fator de diluição}$$

A síntese do cDNA foi então realizada utilizando o *First-Strand cDNA Synthesis kit* (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Reino Unido). Em um tubo de 1,5 mL foi colocado 1 µg de RNA total, o volume foi completado para 12 µL com H₂O livre de RNase (tratada com DEPC). Essa solução de RNA foi aquecida a 65°C por 10 minutos e, em seguida mantida em gelo. Durante a incubação do RNA foram colocados em outros tubos de 1,5 mL, 7 µL da mistura de reação (fornecido no kit), 1 µL de solução de DTT (fornecido no kit) e 1 µL do *primer* randômico Not I-d(T)18 (fornecido no kit). Ao tubo contendo a mistura foi adicionado o RNA desnaturado, homogeneizando a reação com o auxílio de uma pipeta. Incubou-se a reação por 1 hora a 37°C. Após a incubação o cDNA sintetizado pode ser utilizado para a amplificação por PCR.

4.13- Amplificação dos fragmentos de cDNA

A amplificação dos fragmentos de cDNA foi realizada por PCR com os *primers* descritos a seguir (Tabela 16).

Tabela 16. *Primers* para amplificação dos cDNAs.

| Primer | Seqüência do primer (5'→3') | Localização |
|---------------|------------------------------------|----------------------|
| cDNA21_1s | ATCTACAGGCTCCACCTTGG | exon 1 |
| cDNA21_2as | GGTAAGTGGCTCAGGTCTGC | exon 2 |
| cDNA21_3as | AAGGACAGGTCCGGGTAGTT | exon 3 |
| cDNA21_5e6as | TTGGCGAAGAACCTGAGAAAG | junção exon 5-exon 6 |
| cDNA11_3s | AAGTGCTGTCGCCCAACGCT | exon 3 |
| cDNA11_3e4s | CACCATAGAAGCCAGCAACT | junção exon 3-exon 4 |
| cDNA11_5as | CCTTGGCATCTGGCGACA | exon 5 |

A reação de PCR foi realizada de acordo com o que foi previamente descrito, distinguindo apenas o ciclo utilizado para as ampliações:

96 °C – 30 segundos
T_{média} do par de *primers* °C – 30 segundos
72°C – 1-2 minutos

} 30 ciclos

RESULTADOS

1- Triagem de mutações novas ou raras

A triagem de mutações novas ou raras foi realizada para os pacientes relacionados nas Tabelas 3 e 4 (Casuística e Métodos, item 3.1). Os fragmentos seletivamente amplificados do gene *CYP21A2* foram inteiramente seqüenciados com o intuito de se esclarecer o genótipo de cada paciente. Nestes experimentos foram amplificados separadamente os alelos portadores da variante C na posição nucleotídica g.656 nos indivíduos heterozigotos A/C ou C/G, para os quais há sabidamente o efeito de *dropout* do alelo contendo g.656C nas ampliações ProEx1s-Ex3nas e ProEx1s-Ex6nas (Day *et al.*, 1996; Lau *et al.*, 2001; Lee, 2004). As alterações novas, as raras não originárias do *CYP21A1P* e as raras provenientes do pseudogene que foram identificadas encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17. Alterações encontradas por seqüenciamento no gene *CYP21A2* dos pacientes com deficiência de CYP21A2.

| <i>Exon/Intron</i> | <i>Troca de Nucleotídica</i> | | <i>Posição</i> | <i>CYP21A1P</i> | <i>Tipo de mutação</i> |
|--------------------|------------------------------|------------------------|----------------|-----------------|--|
| | <i>Posição Gênica</i> | <i>Posição no cDNA</i> | | | |
| Ex 1 | g.101C>T | c.101C>T | p.P34L | não | <i>missense</i> |
| Ex 1 | g..185A>T | c.185A>T | p.H62L | não | <i>missense</i> |
| Ex 1 | g.166G>A | c.166G>A | p.G56R | não | <i>missense</i> |
| IVS2 | g.391G>A | - | IVS2+5G>A | não | sítio de <i>splicing</i> |
| Ex 4 | g.992_993insA | c.508_509insA | S170Frameshift | não | <i>frameshift</i> |
| IVS4 | g.1104C>A | - | IVS4-15C>A | sim | sítio de <i>splicing</i> |
| IVS4 | g.1111T>C | - | IVS4-8T>C | sim | sítio de <i>splicing</i> |
| Ex 5 | g.1121C>G | c.549C>G | p.D183E | sim | sítio de <i>splicing</i> <i>/missense</i> |
| Ex 7 | g.1762_1763insT | c.920_921insT | F306Frameshift | sim | <i>frameshift</i> |
| Ex 10 | g.2443C>T | c.1222C>T | p.R408C | não | <i>missense</i> |
| Ex 10 | g. 2551C>T | c.1330C>T | p.R444X | não | <i>nonsense</i> |
| Ex 10 | g.2657G>T | c.1436C>T | p.R479L | não | <i>missense</i> |

Resultados

A mutação p.G56R, que surge em decorrência da troca nucleotídica g.166G>A, foi identificada no alelo paterno de uma paciente (Figura 8A), na qual se verificou a heterozigose composta com a mutação IVS2-13A/C>G (g.656) (Tabela 3). O alelo paterno na posição nucleotídica g.656 apresenta o nucleotídeo C, que configura um polimorfismo nesta posição. Este polimorfismo (IVS2-13C) sofre exclusão alélica (Lau *et al.*, 2001), portanto a mutação p.G56R foi identificada somente quando *primers* específicos para essa região foram utilizados na amplificação do fragmento a ser seqüenciado (Figura 8B). Por este motivo a alteração não foi observada quando seqüenciado o fragmento exon 1- exon 6 (Figura 8C), por outro lado, quando utilizado o fragmento exon 1- Intron 2Cas (IVS2-13C) a troca g.166G>A foi observada em hemizigose (Figura 8D).

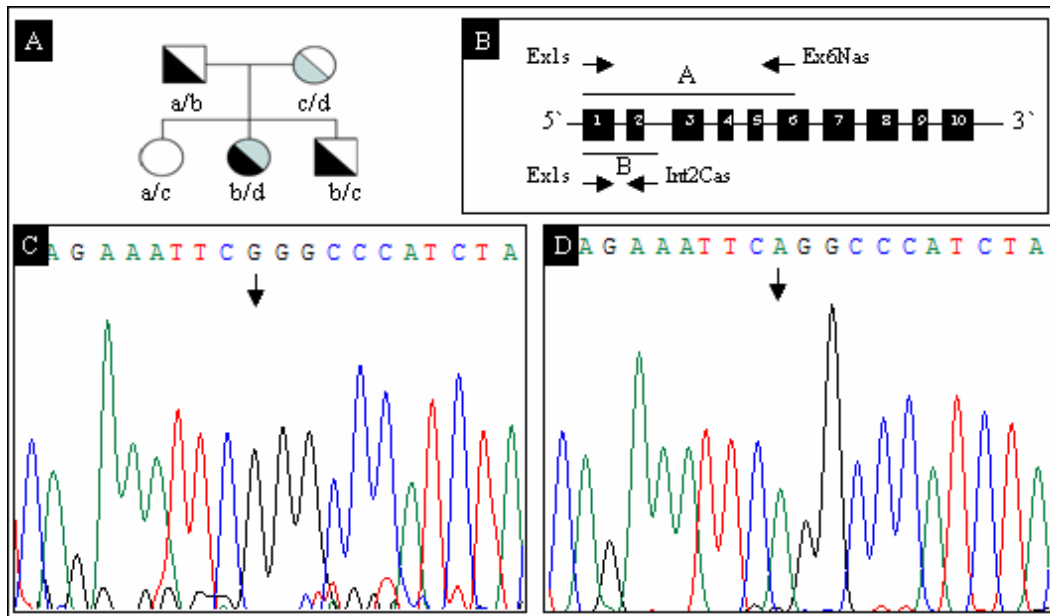


Figura 8. A) Heredograma, onde: a- alelo normal; b- alelo com a mutação p.G56R; c- alelo normal; d- alelo com a mutação IVS2-13A/C>G. B) Esquema do gene *CYP21A2*, ilustrando os fragmentos amplificados (A e B) para posterior seqüenciamento. C) Seqüenciamento do gene *CYP21A2* da paciente a partir do fragmento exon 1- exon 6. D) Seqüenciamento do gene *CYP21A2* da paciente a partir do fragmento exon 1- intron 2C, onde a mutação aparece em hemizigose devido à amplificação de um único alelo.

Normalmente quando se estuda as mutações do gene *CYP21A2* deve-se avaliar a combinação dos efeitos das mutações presentes em cada alelo do genótipo, para assim verificar se este apresenta uma boa correlação com o fenótipo clínico estabelecido ao diagnóstico. Desta forma, com os resultados dos seqüenciamentos, foi feita primeiramente a avaliação dos pais e irmãos dos pacientes para definir a correta segregação das mutações, que está detalhada na Tabela 18.

Com relação à definição do fenótipo baseada no genótipo, deve-se lembrar que a combinação de dois alelos com mutações PS no genótipo deverá produzir um fenótipo também PS. Desta forma, cinco genótipos foram considerados esclarecidos (Tabela 18).

Na paciente 114Xa₁, para a qual já se havia caracterizado o alelo materno como portador de deleção, foram identificadas por seqüenciamento duas trocas nucleotídicas no exon 1 que geram as mutações p.P34L e p.H62L e, a inserção de T no exon 7 (g.1762_1763insT), esta última sendo uma microconversão rara que é somente detectada por seqüenciamento. O estudo de segregação destas mutações na família indicou que as p.P34L e p.H62L foram herdadas no alelo materno inseridas no gene híbrido *CYP21A1P/CYP21A2* formado pela deleção de 30 Kb no locus *C4/CYP21*. Como este gene híbrido carrega na sua formação as mutações IVS2-13A/C>G e g.707_714delGAGACTAC, ambas provenientes do *CYP21A1P* e associadas ao fenótipo PS, o alelo materno da paciente foi considerado como sendo PS na composição do genótipo, e no alelo paterno carrega a mutação g.1762_1763insT também relacionada à forma PS (Tabela 18). Como a paciente tinha diagnóstico de deficiência de *CYP21A2* da forma PS, não houve necessidade de se investigar o efeito funcional destes alelos.

Pela análise as famílias, verificou-se também que a mutação IVS2+5G>A segrega juntamente com a mutação não-clássica p.V281L nos três pacientes portadores desta alteração, sugerindo um efeito funcional diferente do esperado para alelos portadores somente da mutação p.V281L.

As alterações do tipo *frameshift* (g.992_993insA e g.1762_1763insT) e *nonsense* (p.R444X), provenientes ou não do pseudogene, foram consideradas como associadas ao fenótipo PS por serem mutações graves que putativamente gerarão proteínas alteradas com atividade enzimática nula, não sendo necessários estudos funcionais.

Resultados

Outra alteração que dispensa estudo adicional é a mutação *missense* p.R479L, pois a mesma foi recentemente descrita como não-clássica, devido à alta porcentagem de atividade retida na conversão dos substratos: 75,5% frente à 17-OHP e 79,6% frente à progesterona (Robins *et al.*, 2007). Como o portador desta mutação havia sido encaminhado para a análise por apresentar um pequeno aumento na dosagem de 17-OHP, porém não apresentava quadro clínico de deficiência de CYP21A2, encerrou-se a investigação considerando-o não afetado, apenas portador da mutação p.R479L.

Tabela 18. Genótipo de pacientes com deficiência de CYP21A2 com mutações novas ou raras.

| <i>Pacientes</i> | <i>Mutação Paterna</i> | <i>Mutação Materna</i> | <i>Genótipo¹</i> | <i>Fenótipo</i> |
|---|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| 8Ya ₁ /8Xa ₂ | <i>g.992_993insA</i> | p.R356W | PS / PS | PS |
| 11Xa ₁ /11Xa ₂ /11Ya ₃ | <i>p.R408C</i> | IVS2-13A/C>G | ? / PS | PS |
| 27Xa ₁ | <i>p.G56R</i> | IVS2-13A/C>G | ? / PS | VS |
| 31Xa ₁ | <i>IVS2-2A>G</i> | <i>IVS2-2A>G</i> | ? / ? | PS |
| 31primoYa ₁ | <i>IVS2-2A>G</i> | p.V281L | ? / NC | NC |
| 44Xa ₂ | <i>p.R444X</i> | <i>IVS2-2A>G</i> | PS / ? | PS |
| 53Xa ₂ | p.I172N | <i>IVS2+5G>A+V281L</i> | VS / ? | PS |
| 79Ya ₃ | p.I172N | <i>IVS2-2A>G</i> | VS / ? | VS |
| 95Ya ₁ ² | <i>p.R479L</i> ou ? | ? ou <i>p.R479L</i> | N / NC | N ³ |
| 101Xa ₁ | <i>IVS2-2A>G</i> | <i>IVS2-2A>G</i> | ? / ? | PS |
| 104Xa ₁ | <i>p.R408C</i> | p.I172N | ? / VS | VS |
| 114Xa ₁ | <i>p.P34L+p.H62L</i> (Deleção de 30 Kb) | g.1762_1763insT | PS / PS | PS |
| 129Ya ₁ | p.V281L | <i>IVS2+5G>A+p.V281L</i> | NC / ? | NC |
| 131Xa ₁ | p.R356W | <i>IVS2-2A>G</i> | PS / ? | PS |
| 136Ya ₁ | <i>IVS2-2A>G</i> | Deleção de 30 Kb | ? / PS | PS |
| 139Ya ₁ | Deleção de 30 Kb | <i>g.1762_1763insT</i> | PS / PS | PS |
| 164Ya ₁ | IVS2-13A/C>G | <i>p.R444X</i> | PS / PS | PS |
| 175Ya ₁ | p.V281L | <i>IVS4-Exon5</i> | NC / ? | N? |
| 179Ya ₁ | <i>g.992_993insA</i> | IVS2-13A/C>G | PS / PS | PS |

Resultados

| <i>Pacientes</i> | <i>Mutação Paterna</i> | <i>Mutação Materna</i> | <i>Genótipo¹</i> | <i>Fenótipo</i> |
|--------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------|
| 181Ya ₁ | <i>IVS2+5G>A+p.V281L</i> | p.R356W | ? / PS | PS |
| 182Xa ₁ | <i>p.R408C</i> | p.R356W | ?/ PS | PS |

Em negrito e itálico, as alterações encontradas por seqüenciamento. Linhas ressaltadas com fundo cinza denotam genótipos esclarecidos pelo seqüenciamento.

¹Efeito de cada mutação presente no genótipo sobre a atividade enzimática ou no processo de transcrição: paterna/materna. ²O DNA dos pais não estava disponível para análise. ³N=normal.

Para estimar a frequência das alterações aqui identificadas, foi realizada uma triagem em alelos normais de portadores obrigatórios (pais dos pacientes) e de indivíduos controles (não associados à HCA), os resultados estão descritos na Tabela 19. Além dos alelos normais, os alelos afetados foram incluídos neste rastreamento para verificar a recorrência das mutações. Das onze mutações avaliadas neste procedimento apenas três foram encontradas em apenas um indivíduo, as outras oito foram identificadas em mais de um alelo no grupo de indivíduos afetados (Tabela 19).

Tabela 19. Triagem das mutações novas ou raras encontradas por seqüenciamento.

| <i>Mutação</i> | <i>Método de análise¹</i> | <i>Nº alelos em indivíduos afetados com 21-OHD²</i> <i>(encontrados/triados)</i> | <i>Nº alelos em indivíduos normais²</i> <i>(encontrados/triados)</i> |
|----------------|--------------------------------------|--|--|
| p.G56R | <i>Apa I/seq</i> | 1/ 268 | 0/ 270 |
| p.P34L | seq | 4/257 | 0/182 |
| p.H62L | seq | 8/253 | 0/185 |
| p.L107R | <i>Pin AI/seq</i> | 1/112 | 0/96 |
| p.L142P | <i>Pvu II/seq</i> | 1/117 | 0/98 |
| p.R408C | seq | 3/107 | 0/17 |
| p.R444X | ASO-PCR/seq | 2/201 | 0/42 |
| p.R479L | seq | 1/107 | 0/15 |
| IVS2+5G>A | ASO-PCR/seq | 3/354 | 0/171 |
| IVS2-2A>G | <i>Pst I/seq</i> | 7/364 | 1/215 |
| g.992_993insA | <i>Pst I/seq</i> | 2/274 | 0/86 |

¹Método de análise: digestão com enzima de restrição/seq (seqüenciamento) ou ASO-PCR (PCR alelo-específica). ²Alelos onde a mutação foi encontrada/alelos triados. Em negrito: mutações recorrentes em alelos associados à deficiência de CYP21A2.

2- Investigação da atividade enzimática

As primeiras alterações incluídas no estudo funcional foram as mutações novas p.L107R e p.L142P (Casuística e Métodos, Tabela 2), que haviam sido identificadas em um trabalho anterior (Lau, 2000). Após a triagem por seqüenciamento acima descrita, foram também incluídas no estudo da atividade enzimática três outras mutações *missense*, uma nova (p.G56R,) e duas raras (p.H62L e p.R408C).

Para se avaliar o grau de gravidade das substituições de aminoácidos resultantes de cada uma das mutações, a conservação desses aminoácidos, foi verificada pelo alinhamento das seqüências da proteína CYP21 de várias espécies de mamíferos (Figura 9). Observa-se que os aminoácidos p.G56, p.L142 e p.R408 são altamente conservados. Porém, comparando-se as seqüências de CYP21 de várias espécies, verifica-se que o aminoácido leucina não é muito conservado na posição 107, mas o caráter hidrofóbico é mantido nessa posição para todas as CYP21 analisadas (Figura 9). Da mesma forma, para o aminoácido p.H62, embora pouco conservado, o caráter hidrofílico da posição.é conservado.

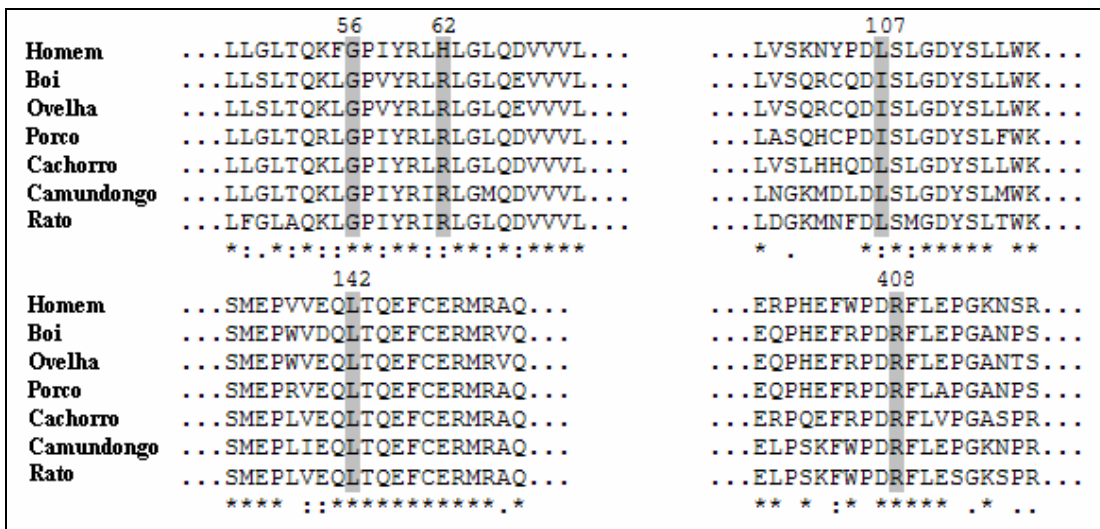


Figura 9. Alinhamento das seqüências de vários genes *CYP21* de mamíferos com o gene *CYP21A2* humano (*ClustalW*). O número de acesso *UniProt* das seqüências são: Homem (P08686), boi (P00191), ovelha (Q7M366), porco (P15540), cachorro (Q8WNW0), camundongo (P03940) e rato (Q64562).

Resultados

Os dados e conservação deram suporte à questão do efeito deletério das mutações. Assim investigou-se quantitativamente este efeito através da medida da atividade enzimática de proteínas nas quais cada mutação foi inserida.

Para as medidas pudessem ser comparáveis entre si, havia necessidade de se estimar a eficiência da expressão de cada proteína mutante. O *Western blot* (Figura 10) confirmou que a expressão de cada uma das proteínas CYP21A2 normal e mutantes foram equivalentes, indicando uma homogeneidade de quantidade de proteínas nos experimentos de medida da atividade enzimática que se seguiram.

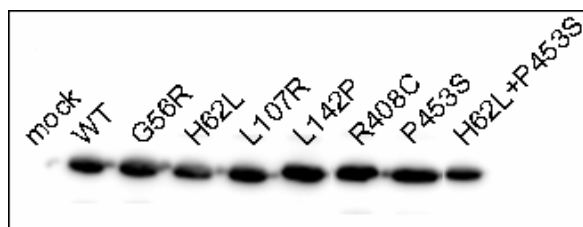


Figura 10. *Western blot* das proteínas CYP21A2 expressas em células COS-1. As proteínas foram coletadas diretamente dos poços da placa de cultura com tampão de lise, em seguida foram separadas em gel SDS-PAGE. As proteínas, normal e mutantes, foram detectadas em quantidades equivalentes nos *immunoblottings* utilizando anticorpo policlonal de coelho.

As atividades das variantes mutantes foram comparadas com a atividade da proteína normal, a qual foi arbitrariamente definida como 100% (Figura 11).

Como pode ser observado na Figura 11, as mutações p.L107R, p.L142P e p.R408C causaram a redução da atividade enzimática para valores abaixo de 1% frente ao substrato progesterona, portanto atividade residual <1% na via dos mineralocorticóides. Este resultado sugere que, se estas alterações ocorrerem em homozigose serão responsáveis pela forma clássica PS de deficiência de CYP21A2. Já frente a 17-OHP como substrato da via dos glicocorticóides as mutações p.L107R e p.L142P apresentaram atividade residual inferior a 1% ao passo que a p.R408C apresentou um valor de 1,3%.

Resultados

A variante p.G56R reduziu a atividade enzimática da CYP21A2 para 0,7% quanto à conversão de 17-OHP, mas manteve uma atividade mínima de 1.4% frente à conversão da progesterona, atividade residual que sugere a associação desta mutação com a forma VS da deficiência.

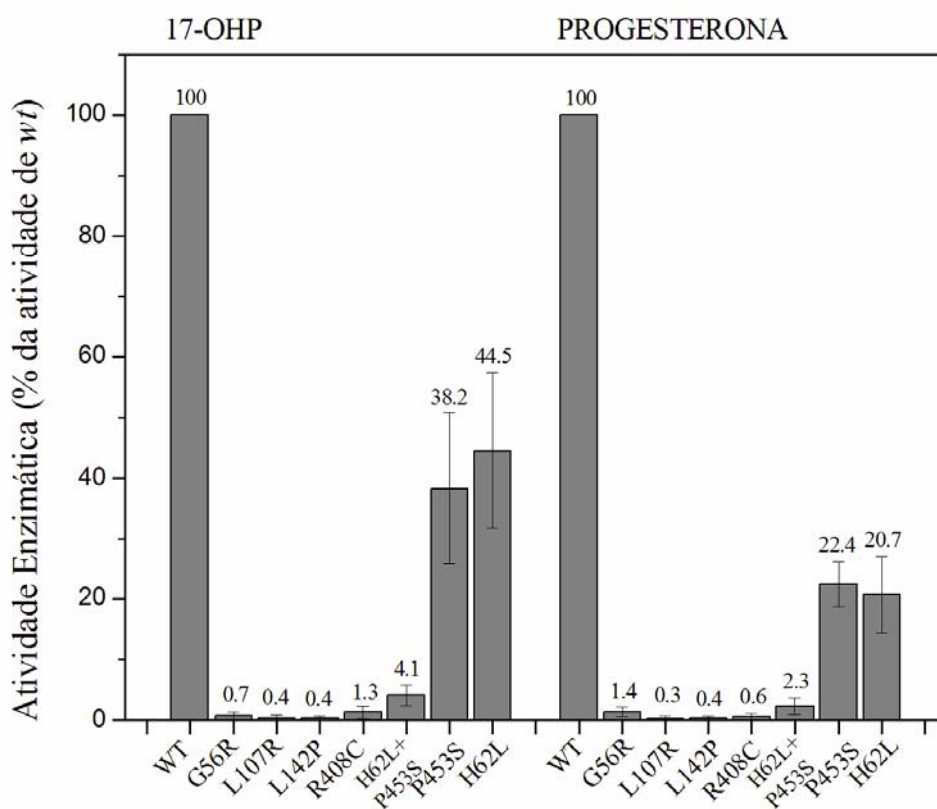


Figura 11. As atividades relativas das proteínas CYP21A2 mutantes em células COS-1, onde os valores de conversão apresentados de 17-OHP para 11-desoxicortisol e de progesterona para 11-desoxicorticosterona, em 2 μ M/L de concentração do substrato. As barras correspondem à média \pm 1DP (desvio padrão) para n=5 (número de experimentos).

A mutação p.H62L, quando introduzida como única mutação na proteína, reduziu a atividade enzimática para 44% e 21%, frente 17-OHP e progesterona, respectivamente. Por ter sido a única mutação que conservou uma alta taxa de conversão, os parâmetros cinéticos

Resultados

para esta mutação foram investigados (Tabela 20), uma vez que a cinética enzimática estuda as velocidades de consumo de substrato e de produção de produto. Os valores encontrados indicaram uma redução significativa da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) da proteína mutante quando comparada a normal (*T-test*, $P < 0.05$), enquanto que os valores da constante de Michaelis-Menten (K_m) apresentaram a mesma variação de magnitude para ambos os substratos. O valor de $V_{m\acute{a}x}$ para a proteína mutante em relação à proteína normal indicou que ocorreu uma redução da velocidade de utilização do substrato pela enzima. Entretanto o valor de K_m manteve-se constante, o que indica que mesmo alterada a proteína mutante manteve a afinidade pelo substrato.

Tabela 20. Constantes cinéticas aparentes para a proteína normal (*wt*) e para a mutante p.H62L, demonstrando uma diferença significativa entre o $V_{m\acute{a}x}$ da proteína *wt* e o da mutante (*T-test*, $P < 0.05$). Os valores apresentados correspondem à média $\pm 1DP$ (desvio padrão) para $n=3$ (número de experimentos).

| | K_m (μM) | $V_{m\acute{a}x}$ ($pmol\ l^{-1}mg^{-1}min^{-1}$) | $V_{m\acute{a}x}/K_m$ |
|---------------------|---------------------|---|-----------------------|
| 17-OHP | | | |
| WT | 5,8 \pm 1,4 (n=3) | 386,7 \pm 118,4 (n=3) | 67,2 |
| H62L | 1,1 \pm 0,4 (n=3) | 50,3 \pm 9 (n=3) | 47,9 |
| Progesterona | | | |
| WT | 2,8 \pm 1,4 (n=3) | 216 \pm 78,9 (n=3) | 77,1 |
| H62L | 0,3 \pm 0,1 (n=3) | 18,7 \pm 1,5 (n=3) | 74,7 |

Para ter um valor de referência da atividade enzimática de mutações não-clássicas, a mutação p.P453S foi avaliada sob as mesmas condições experimentais usadas para a mutação p.H62L e, apresentou atividade residual dentro da mesma faixa (20-45%). Assim, a mutação p.H62L foi individualmente classificada como responsável pela forma NC da deficiência de CYP21A2.

No entanto, a mutação p.H62L havia sido identificada em pacientes Escandinavos em um alelo que continha também a mutação p.P453S (Tabela 5). Assim, foi investigada a

ação conjunta das mutações numa mesma construção. A atividade enzimática residual foi reduzida para 4.1% e 2.3% frente a 17-OHP e a progesterona, respectivamente, indicando um efeito sinérgico para esta combinação de mutações (Figura 11). Esta faixa de atividade está situada em valores limítrofes entre a forma NC e VS.

3- Estudo estrutural das proteínas mutantes

O estudo estrutural das variantes p.G56R, p.H62L, p.L107R, p.L142P e p.R408C foi realizado com a intenção de compreender os efeitos da troca de aminoácidos na proteína CYP21A2, usando como modelo uma estrutura hipotética CYP21A2 humana previamente publicada (PDB-ID 2GEG), a qual foi modelada sobre a estrutura cristalizada da proteína de coelho CYP2C5 (PDB-1N6B), uma progesterona hidroxilase.

A análise dos modelos foi realizada para verificar o posicionamento dos resíduos (Figura 12) e, assim, a relevância das alterações na proteína ficou ressaltada, uma vez que interações internas entre os resíduos foram perdidas ou novas interações foram estabelecidas com as trocas dos aminoácidos (Figura 13).

Na análise estrutural a mutação p.G56R aparentemente não afeta diretamente a estrutura da proteína. No entanto, por estabelecer uma nova interação com o aminoácido p.Y376 (Figura 13), a flexibilidade da região envolvida com a interação entre a α -hélice A e a folha β 1-1 com a membrana do retículo endoplasmático fica comprometida. Da mesma forma o resíduo p.L62, também localizado na região de interação com a membrana, parece favorecer um melhor ancoramento da proteína à membrana. Assim, um aminoácido hidrofóbico nesta posição aumenta o tamanho da segunda região de ancoramento da proteína à membrana. Observando os contatos internos para esta mutação (Figura 13), verifica-se que interações intra-moleculares foram perdidas, o que possibilitaria uma maior flexibilidade a este resíduo.

Na análise estrutural das mutações p.L107R, p.L142P e p.R408C foram observadas graves alterações na estrutura da proteína. A variante hidrofílica p.R107 perde a função de ligante do aminoácido, estabelecendo várias interações novas (Figura 13), o que sugere uma grave interferência na atividade de hidroxilação da proteína. A variante p.P142 rompe a

estrutura da α -hélice D onde o aminoácido se localiza (Figura 12), estabelecendo interações com outros aminoácidos (Figura 13). O aminoácido p.R408 é um importante estabilizador da estrutura 3D da proteína, como observado no gráfico dos contatos internos (Figura 13), quando mutado perde sua função.

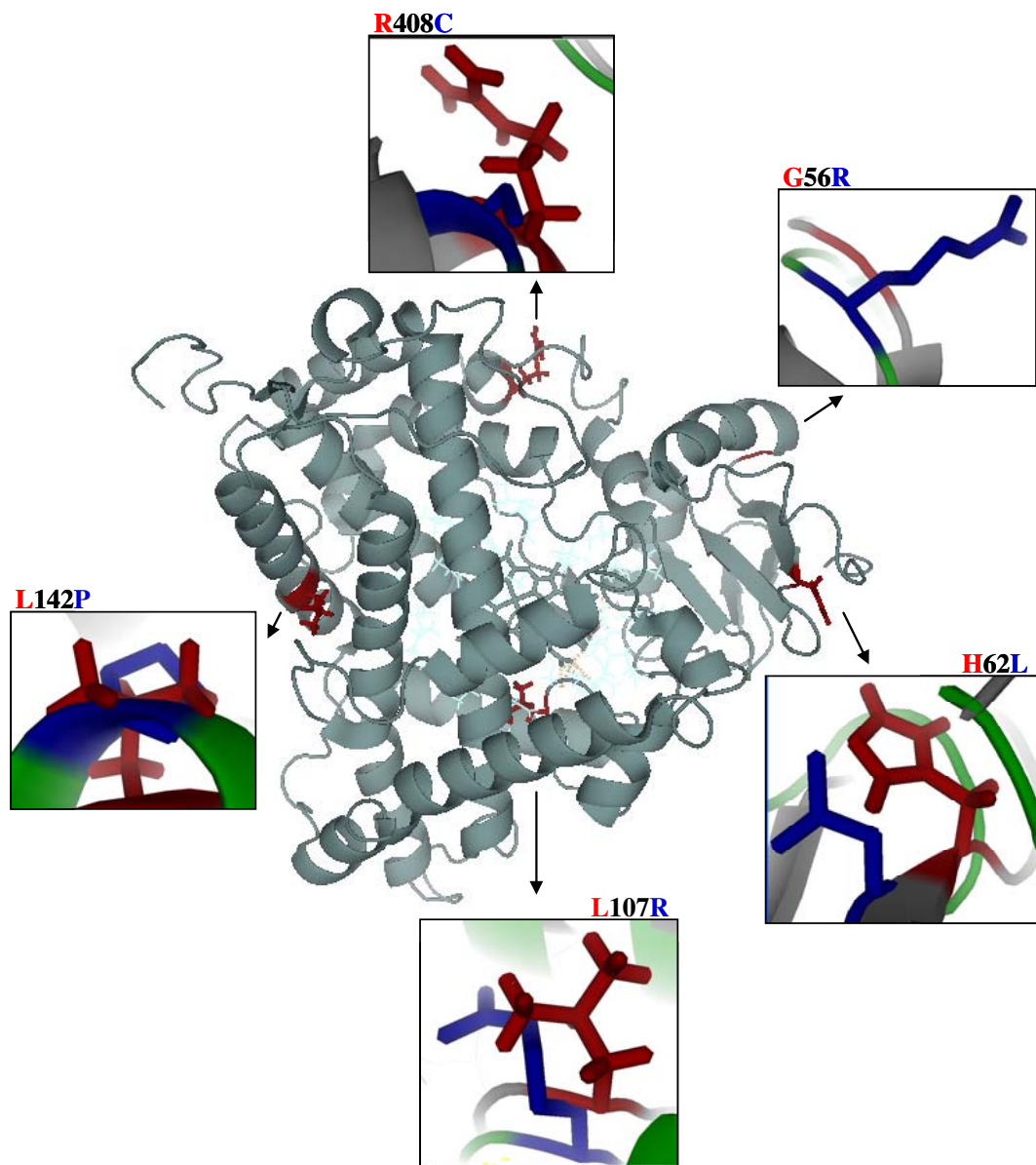


Figura 12. Modelo de CYP21A2 normal (PDB-ID 2GEG), com o grupamento heme em seu centro (PyMol, programa livre na internet, <http://pymol.sourceforge.net/>). Em destaque, na estrutura da proteína os aminoácidos que sofreram alterações

e foram alvos deste estudo (em vermelho). A sobreposição do modelo normal (PDB-ID 2GEG) ao modelo contendo a base mutante (em azul), demonstrando a conformação estrutural discrepante entre os resíduos, encontra-se evidenciado nos quadros.

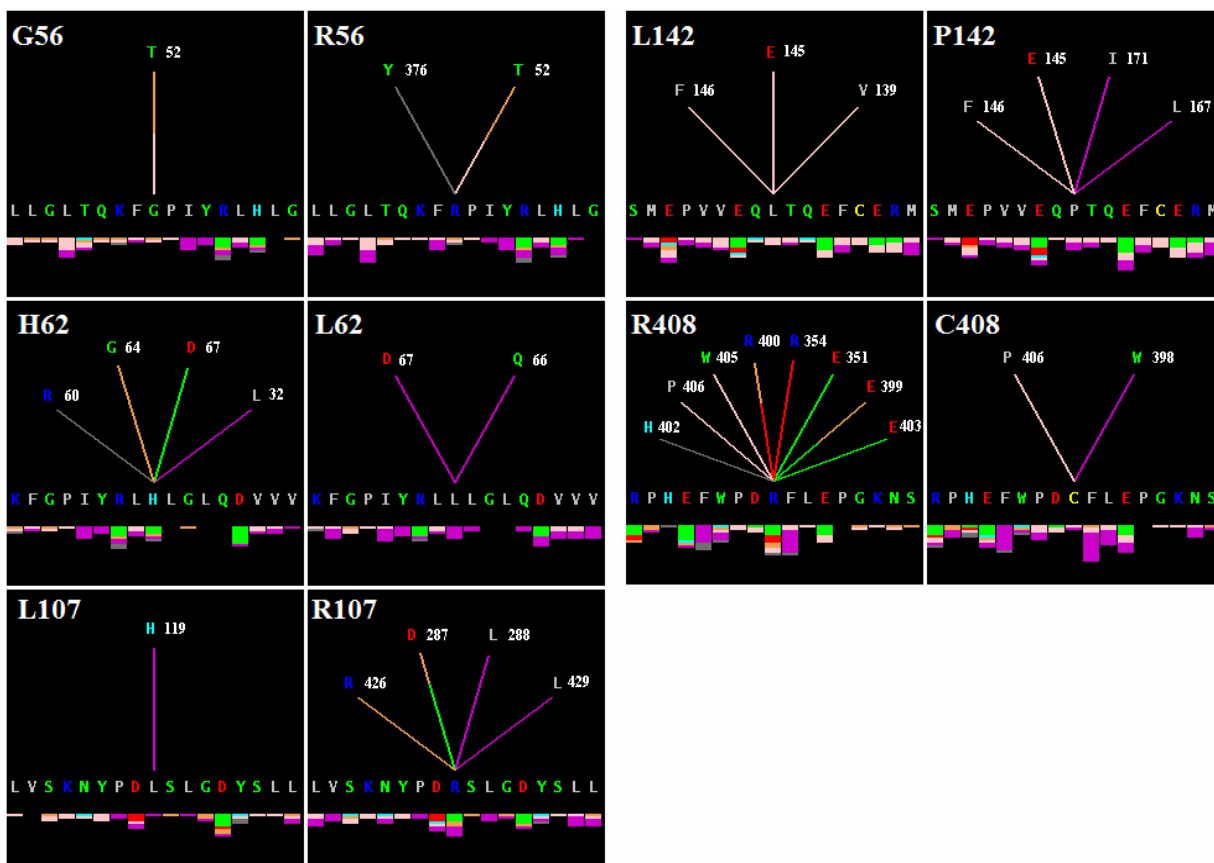


Figura 13. Gráfico de contatos internos perdidos ou estabelecidos pelas trocas de aminoácidos (fornecido pelo programa *STING Report*). A troca de uma glicina por uma arginina no aminoácido 56 cria mais uma interação, além das pontes de hidrogênio na cadeia principal (em rosa) e lateral (em laranja) com o aminoácido p.T52 um empilhamento aromático foi estabelecido com o p.Y376 (em cinza). O aminoácido mutante p.L62 perde as interações estabelecidas pelo aminoácido normal, e estabelece interações hidrofóbicas (de baixa energia) com os aminoácidos p.Q66 e p.D67. O aminoácido p.L107

apresenta apenas uma interação hidrofóbica com o aminoácido p.H119 (em roxo), entretanto, quando alterado para uma arginina novas interações são estabelecidas: duas interações hidrofóbicas com os aminoácidos p.L288 e p.L429 (em roxo), duas interações por pontes de hidrogênio na cadeia lateral (em laranja) com os aminoácidos p.R426 e p.D287, este último, também interage por atração de carga com o aminoácido p.R107 (em verde). O aminoácido mutante p.R142 apresenta novas interações hidrofóbicas com os aminoácidos p.L167 e p.L171 (em roxo), e perde a interação por ponte de hidrogênio da cadeia principal com o aminoácido p.V139 (em rosa no gráfico do aminoácido p.L142). O aminoácido p.R408 apresenta contatos por atração de cargas (em verde: p.E351, p.E399, p.E403), por repulsão de cargas (em vermelho: p.R354, p.R400), por ponte de hidrogênio na cadeia principal (em rosa: p.W405, p.P406), por ponte de hidrogênio na cadeia lateral (em laranja: p.E399, p.R400) e por empilhamento aromático (em cinza: p.H402). O aminoácido mutante p.C408 perde praticamente todas as interações em relação ao aminoácido p.R408, permanecendo destas apenas o contato por ponte de hidrogênio de cadeia principal com o aminoácido p.P406. A cisteína cria um novo contato por interação hidrofóbica com o p.W398.

4- Investigação de sítios de *splicing*

Foram estudadas, por expressão de mini-genes *in vitro*, quatro alterações quanto ao papel desempenhado em regiões de *splicing* para formação do pré-mRNA. No gene *CYP21A2* foram investigadas três variações alélicas: IVS2+5G>A, localizada no intron 2 próxima ao sítio doador de *splicing*; IVS2-2A>G, localizada no sítio acceptor de *splicing* também do intron 2; e, um alelo apresentando as variações IVS4-15C>A + IVS4-8T>C, localizadas no intron 4 próximas ao sítio acceptor de *splicing*, combinadas à troca c.549C>G no exon 5 que se traduzida levaria à troca p.D183E. No gene *CYP11B1* foi investigada a alteração g.1753G>A, que se localiza no último nucleotídeo do exon 4 que se traduzido levaria à mutação missense p.G267S.

4.1- Alteração IVS2+5G>A no gene *CYP21A2*

Numa análise *in silico* para a predição de sítios de *splice* (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), verificou-se a supressão do sítio doador normal do processo de *splicing* causada pela alteração IVS2+5G>A.

Assim iniciou-se a investigação *in vitro* do efeito desta alteração. No entanto, após inúmeras tentativas de se amplificar o cDNA produzido pelo mini-gene contendo o fragmento exon 1 – exon 3, o resultado do seqüenciamento do produto desta amplificação pela análise dos eletroferogramas não foi esclarecedor. O exon 3 estava inteiro presente na seqüência, mas não era possível a leitura da seqüência antes do início deste exon (Figura 14).

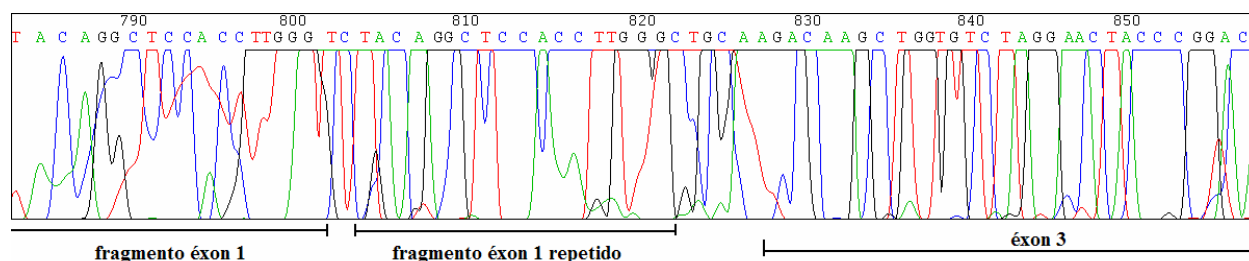


Figura 14. Seqüenciamento da amplificação exon 1- exon 3 do cDNA com alteração IVS2+5G>A com o *primer* exon 3Nas.

A seqüência parecia apresentar um artefato, onde se observava a repetição de uma pequena região do exon 1, porém a qualidade do seqüenciamento não nos permitiu afirmar a perda do exon 2 com este experimento (Figura 14).

Devido às dificuldades encontradas para análise do mini-gene exon1- exon 3, a estratégia de estudo foi modificada para a construção de um mini-gene contendo do exon 1 ao exon 5 do gene *CYP21A2*.

Após a transcrição do mini-gene formado pelo fragmento exon 1 – exon 5 portador da alteração IVS2+5G>A pelas células COS-7, o transcrito foi transformado em cDNA e

seqüenciado. Observou-se a perda do exon 2 (Figura 15), causando o uso alternativo de exon 3 (Figura 5).

Para a alteração IVS2+5G>A, o cDNA produzido a partir do fragmento exon 1- exon 5 do gene *CYP21A2* foi amplificado e em seguida seqüenciado, o produto do seqüenciamento evidenciou que o mini-gene com a alteração havia perdido todo o exon 2 (*exon skipping*) durante o processamento do RNA (Figura 15). Assim, devido à troca G>A na posição +5 do sítio doador de *splicing*, ocorreu uma alteração na região doadora consenso de reconhecimento pelo spliceossomo, permitindo a junção da região doadora do exon 1 com a região aceptora do exon 3, causando a excisão do exon 2 juntamente com o intron 1 e intron 2.

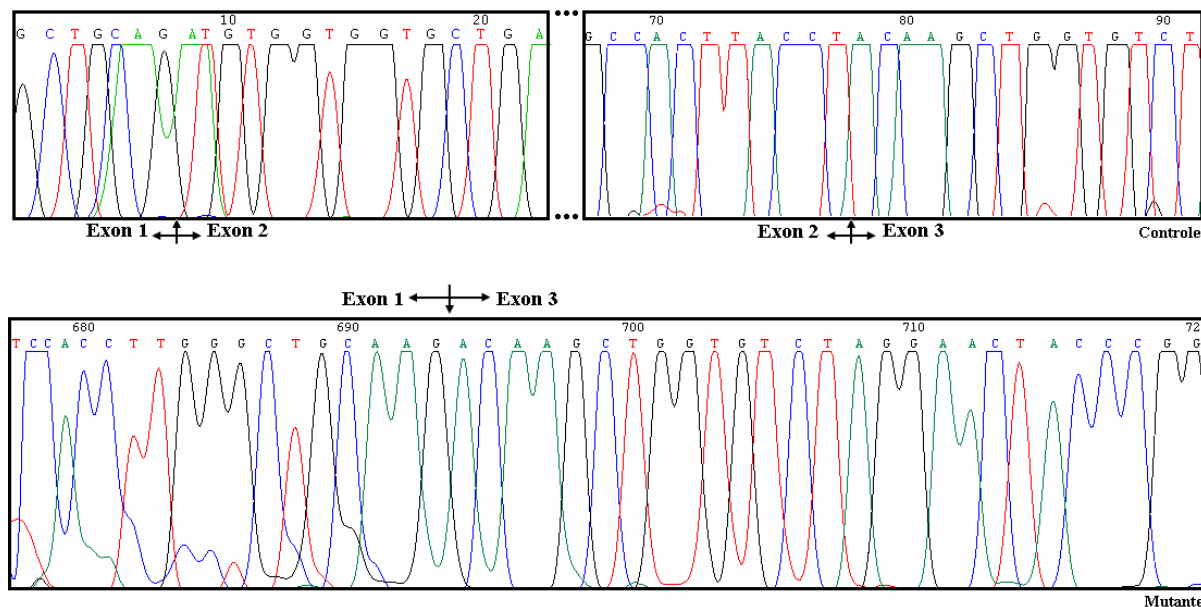


Figura 15. Seqüenciamentos dos fragmentos exon1 – exon5, onde estão evidenciadas as junções exon-exon. No seqüenciamento do cDNA do mini-gene normal (controle) estão evidenciadas as junções exon1- exon2 e exon2- exon3; no cDNA do mini-gene mutante a junção exon1- exon 3 devido ao não reconhecimento do exon 2 como região codificante pelo spliceossomo fica evidenciada.

4.2- Alteração IVS2-2A>G no gene *CYP21A2*

A segunda alteração investigada quanto ao processo de *splicing* foi a IVS2-2A>G no gene *CYP21A2*.

Neste caso, da mesma forma que no anterior, na predição *in silico* o sítio acceptor normal g.647-g.687 foi suprimido pela alteração, no entanto com a troca de A>G na posição g.667 há um aumento na possibilidade de ser reconhecido um sítio alternativo de *splicing* na região g.628_g.668 (Figura 16).

| Seqüência consenso de sítio acceptor de <i>splice</i> | | | | | |
|--|-------|-------|---------|-------------------------------|-------------------------------|
| Início | Final | Score | Intron | Exon | |
| 647 | _ 687 | 0.93 | ctcctgc | <u>A</u> Gacaagct | Seqüência Normal |
| 628 | _ 668 | 0.11 | accctcc | <u>A</u> Gccccacctcctcctgcaga | Seqüência Normal |
| 628 | _ 668 | 0.20 | accctcc | <u>A</u> Gccccacctcctcctgcgga | Seqüência IVS2-2A>G |

Figura 16. Análise das alterações na função de *splicing* da alteração IVS2-2A>G através do programa de predição de sítio de *splice* (*Splice site prediction*, http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

O cDNA proveniente do mini-gene com a alteração apresentou tamanho aumentado quando comparado ao controle em gel de agarose 2% (Figura 17), indicando uma possível inserção de nucleotídeos no cDNA mutante.

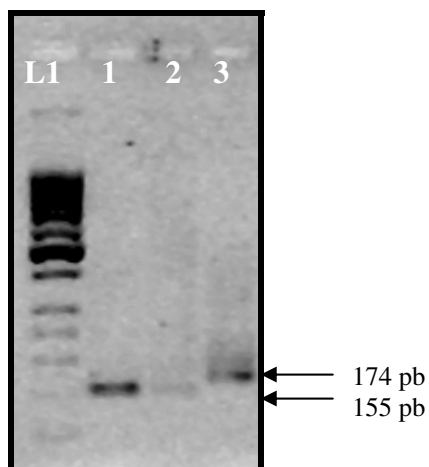


Figura 17. Amplificação do fragmento interno exon1- exon3, onde: L1-marcador de 50 pb (*Fermentas*); 1- amplificação do cDNA do mini-gene controle, utilizando 4 μ L de cDNA para a reação da PCR; 2- amplificação do cDNA do mini-gene controle, utilizando 2 μ L de cDNA para a reação da PCR; 3- amplificação do cDNA do mini-gene da paciente 39Xa₁, utilizando 4 μ L de cDNA para a reação da PCR.

Para verificar a seqüência inserida no fragmento, o mesmo foi sequenciado utilizando os *primers* da amplificação. A alteração na posição -2 do intron 2 está localizada no sítio acceptor AG do processamento do transcrito, o resultado observado no seqüenciamento indicou que a troca para GG impediu a atuação do sítio normal de *splicing* e, ao mesmo tempo evidencia a ativação de um novo sítio AG *upstream* na posição -19 dentro do intron 2, onde houve a junção do exon 2, indicando que este sítio crítico foi capaz de acionar o sinal de *splicing*, oferecendo um *splice* alternativo à seqüência (Figura 18).

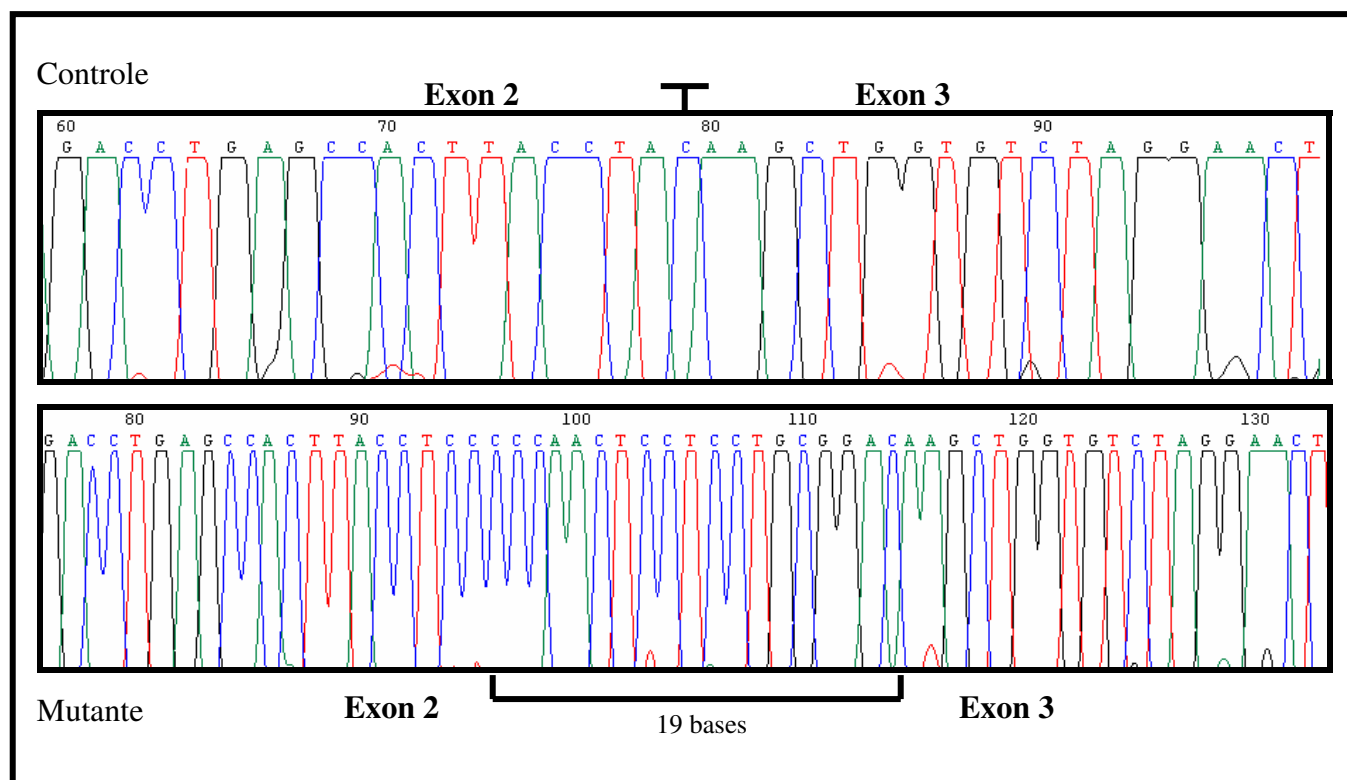


Figura 18. Seqüenciamentos dos fragmentos exon 1 – exon 3. O eletroferograma do cDNA do mini-gene normal (controle), evidenciando a junção exon 2- exon3. E o eletroferograma do cDNA do mini-gene mutante, onde destaca-se a inserção de 19 bases provenientes do intron 2 entre os exons 2 e 3.

4.3- Variações nucleotídicas g.1104A>C (IVS4-15A>C) + g.1111C>T (IVS4-8C>T) + g.1121C>G (p.D183E) no gene *CYP21A2*

As variações nucleotídicas na região acceptora de *splice* no intron 4 e no início do exon 5, foram encontradas por seqüenciamento (Figura 19), todas no mesmo alelo e, em relação ao sítio acceptor de *splicing* do intron 4 estão posicionadas da seguinte forma: IVS4-15A>C, IVS4-8C>T e Ex5+3C>G, esta última provoca a troca aminoacídica p.D183E. Este conjunto de trocas nucleotídicas será chamado agora de IVS4-Ex5.

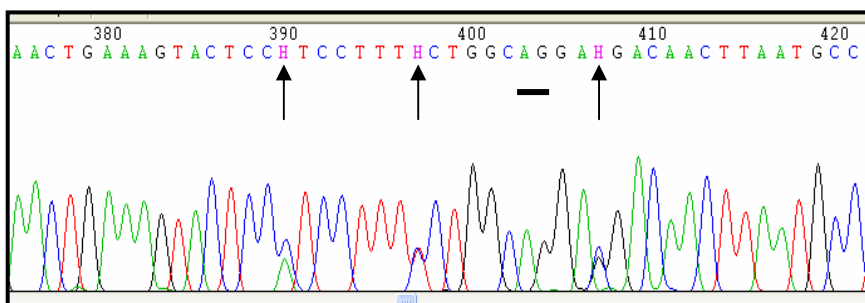


Figura 19. Fragmento do eletroferograma do fragmento ProEx1s-Ex6nas do paciente 175Ya1 evidenciando as trocas nucleotídicas g.1104A>C e g.1111C>T no intron 4 e a g.1121C>G no exon 5, todas em heterozigose, esta última levando à alteração p.D183E. Pela proximidade entre si e por serem provenientes do pseudogene, supõe-se uma microconversão. Os nucleotídeos AG sublinhados correspondem ao sítio aceptor do *splicing* do intron 4, sendo o G seguinte o início do exon 5.

Neste caso, a predição *in silico* do sítio de *splicing* demonstrou uma pequena alteração no *score* provocada pelas alterações, no entanto este se manteve acima de 0.9 (Figura 20), alteração esta que não é suficiente para interferir na atividade do mesmo.

| Seqüência consenso de sítio aceptor de <i>splice</i> | | | | | |
|--|--------|-------|-----------------|---------------------------|----------------------------|
| Início | Final | Score | Intron | Exon | |
| 1098 | _ 1138 | 0.97 | ccctccttttctggc | <u>AG</u> gacgacaacttaatg | Seqüência Normal |
| 1098 | _ 1138 | 0.93 | ccatcctttctggc | <u>AG</u> gaggacaacttaatg | Seqüência IV4+Exon5 |

Figura 20. Análise das alterações na função de *splicing* da alteração IVS4-Exon5 (g.1104+g.1111+g.1121), através do programa de predição de sítio de *splice* (*Splice site prediction*, http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

Resultados

Os testes quanto ao processamento de *splicing* foram realizados amplificado o cDNA do mini-gene construído com o fragmento do exon 2 ao exon 6. Não foram observadas diferenças em gel de agarose quanto ao tamanho dos fragmentos. O seqüenciamento demonstrou que apesar das variações estarem presentes na região de processamento do pré-mRNA, estas não interferiram no processamento normal do mesmo (Figura 21). Desta forma, essas alterações intrônicas e exônica juntas não produzem *splicing* alternativo do gene *CYP21A2*.

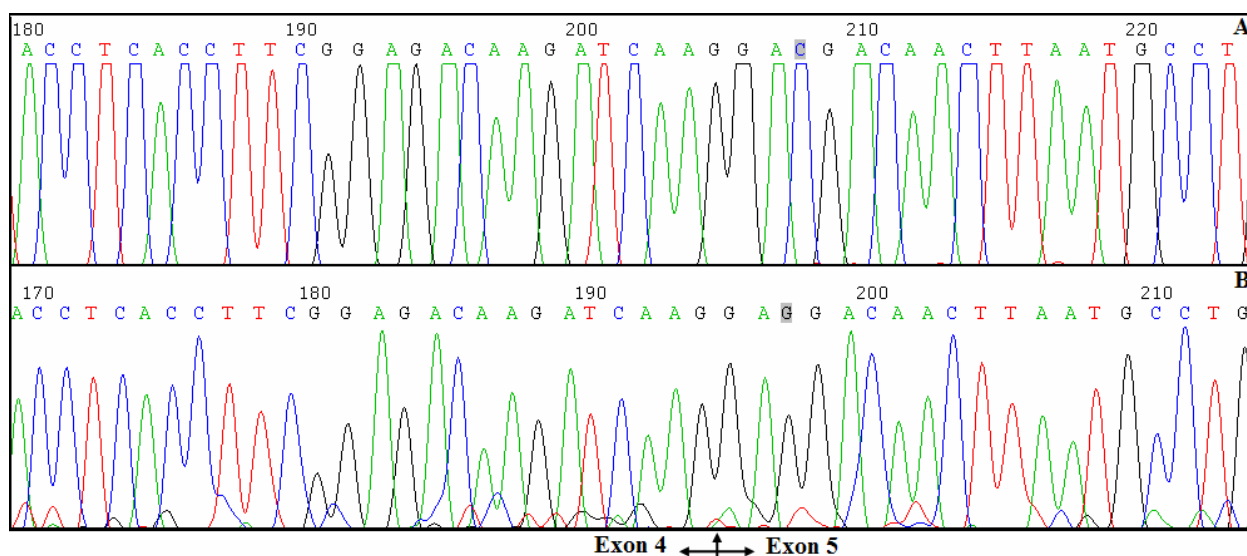


Figura 21. Seqüenciamento da amplificação exon 2- exon 6, com o *primer* exon3Ns, onde: A- seqüência do mini-gene do controle normal, B- seqüência do mini-gene do paciente 175Ya1, marcado em cinza a alteração do códon 183 (GAC>GAG). A junção exon 4- exon 5 está indicada na base da figura.

4.4- Mutação g.1753G>A (p.G267S), mini-gene do *CYP11B1*

O quarto mini-gene foi construído com a alteração exônica g.1753G>A no gene *CYP11B1*, alteração que foi identificada em homozigose numa paciente com a forma clássica da deficiência de *CYP11B1*. A alteração g.1753G>A está situada no último

Resultados

nucleotídeo do exon 4 o qual, juntamente com os dois primeiros nucleotídeos do exon 5 formam o códon 267 da proteína. Esta alteração, se traduzida provocaria a troca de aminoácido p.G267S. O resíduo 267 no gene *CYP11B1* não é conservado entre diferentes espécies de mamíferos (Figura 22), e encontra-se em uma região variável entre os genes da família dos citocromos P450 (Roumen *et al.*, 2007).

| | | |
|---------------------------|-----|--|
| Homem | 241 | PRSLSRWTSFKVWKEHFEAWDCIFQYGDNCIQKIYQELAFSRPQQYTSIVAEALLNAELS |
| Rato | 241 | PKSLTRWTSTRVWKEHFDSWDIIEYVTKCIKNVYRELAEGRQQSWS-VISEMVAQSTLS |
| Porco | 241 | PRSLSRWTSTGTWKEHFEAWDCIFQYANKAIQRLYQELTLGHPWHYSGVVAELLTHANMT |
| Ovelha | 241 | PRRLSRWTSSSMWREHFEAWDYIFQYANRAIQRIYQELALGHPWHYSGIVAELLMRADMT |
| Boi | 241 | PRRLSRWMSTNMWREHFEAWDYIFQYANRAIQRIYQELALGHPWHYSGIVAELLMRADMT |
| Porquinho-da-Índia | 242 | PRSLSRWMRSQAWKEHFEAWDYISEYENRIQKYEELARGC-SQYNSIVANLMLQGNL- |
| Hamster | 241 | PSGLTRWISTRVWKENFDSWDFVSEYVTKNVKNVYQEVQSGGPQSWS-VISQLVAEGALT |
| | | * *:* . *:*:*:*:* : :* . :. *:* . :. :*:*:* : . : |

Figura 22. Alinhamento das seqüências da proteína CYP11B1 humana com as de seis espécies distintas de mamíferos (*ClustalW*), ressaltando a posição 267 não conservada. O número de acesso *UniProt* das seqüências são: Homem (P15538), rato (P15393), porco (Q29552), ovelha (P51663), boi (P15150), porquinho-da-Índia (Q64408) e hamster (P97720).

Por outro lado, a alteração g.1753G>A sendo uma transição na última base do exon 4, pode afetar a atividade de *splicing* do sítio doador do intron 4. Assim, realizamos testes *in silico* (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), para a mutação g.1753G>A. Observa-se a redução no *score* do sítio doador de *splice* de 0.98 (seqüência normal) para 0.42 (seqüência mutante) (Figura 23).

| Seqüência consenso de sítio doador de <i>splice</i> | | | | | |
|---|-------|-------|---------|------------------|--|
| Início | Final | Score | Exon | Intron | |
| 1747 | 1761 | 0.98 | cagtacg | <u>GT</u> gaggcc | Seqüência Normal |
| 1747 | 1761 | 0.42 | cagtaca | <u>GT</u> gaggcc | Seqüência Mutante g.1753 G>A (p.G267S) |

Figura 23. Análise da alteração na função de *splicing* da variante g.1753G>A através do programa de predição de sítio de *splice* (*Splice site prediction*, http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

A partir desses dados, passamos para a análise *in vitro* da troca nucleotídica. Quando testado em gel de agarose 1,5% o produto da amplificação do cDNA construído com o fragmento dos exons 3-5 apresentou variação de tamanho, a banda referente ao mini-gene alterado apresentou menor tamanho do que a banda do mini-gene do controle normal (Figura 24A). O seqüenciamento deste fragmento esclareceu o que de fato havia acontecido com o mini-gene mutante. Este perdeu 45 nucleotídeos na região 3' do exon 4 pela criação de um sítio alternativo de *splice upstream* ao GT original. Esta perda modificou o *frame* de leitura do mRNA depois do aminoácido 251 criando no códon 280 a parada prematura da transcrição (Figura 24B e Figura 24C).

Devido a este códon de parada prematura a tradução da proteína pode não ocorrer, uma vez que mRNAs contendo códons de parada prematura antes dos 55 nucleotídeos anteriores a última junção exon-exon, podem ser degradados no citoplasma por *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) (Cartegni *et al.*, 2002; Stamm *et al.*, 2005).

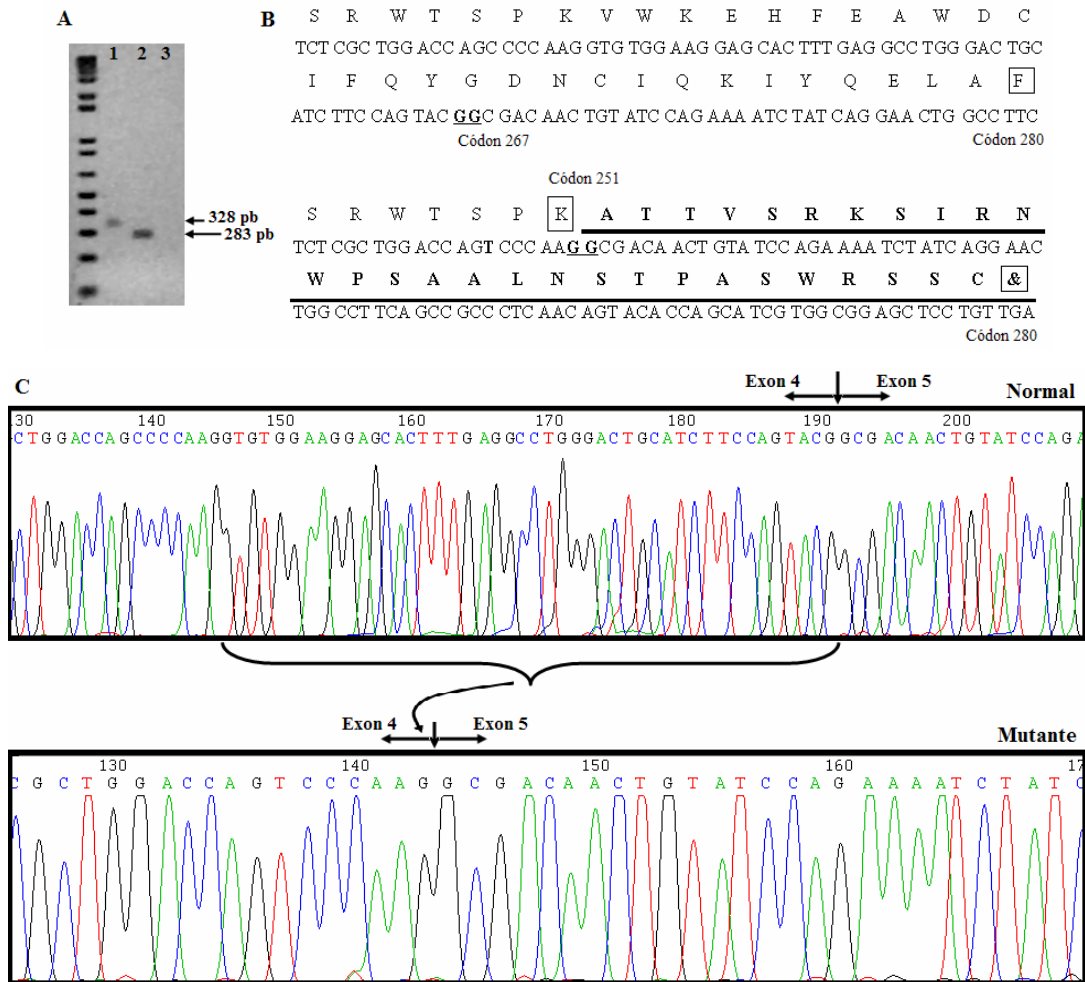


Figura 24. A) Eletroforese dos produtos da amplificação do cDNA proveniente dos minigênes CYP11B1 normal (1), mutante (2). Como controle branco (3) foi realizada a PCR sem cDNA. B) Seqüência dos aminoácidos normal de CYP11B1, seguida pela seqüência mutante onde está evidenciado o início da alteração do quadro de leitura, pós códon 251, e o códon de parada prematura no aminoácido 280. C) Seqüenciamento da amplificação exon 3- exon 5 do cDNA, com o primer exon 3- exon 4 *sense*, na seqüência normal está evidenciada a junção exon 4- exon 5 (*splice* normal), na seqüência mutante a perda de 45 nucleotídios do exon 4 está indicada na junção alternativa do exon 4 parcial com o exon 5.

5- Correlação genótipo-fenótipo

Neste estudo foram identificadas por seqüenciamento mutações no gene *CYP21A2* originárias ou não do *CYP21A1P*, dos tipos *frameshift*, *nonsense*, *missense* e de *splicing* (Tabela 17).

As análises funcionais e estruturais das mutações *missense* p.G56R, p.H62L, p.L107R, p.L142P e p.R408C para o gene *CYP21A2*, elucidaram a atividade das proteínas mutantes. Foram classificadas como associadas à forma PS as alterações p.L107R, p.L142P e p.R408C por praticamente abolirem a atividade enzimática. A mutação p.G56R por apresentar uma atividade mínima frente a progesterona foi considerada como mutação VS. Enquanto a p.H62L, apesar de não ter sido encontrada isoladamente em nossa triagem, apresentou valores de conversão esperados para uma mutação NC.

Da mesma forma, as investigações de processo de *splicing* realizadas para as alterações IVS2-2A>G, IVS2+5G>A e IVS4-Exon5 com os mini-genes de *CYP21A2* e g.1753G>A (p.G267S) com o mini-gene do *CYP11B1* elucidaram o papel de cada troca nucleotídica quanto à produção do transcrito. A variação IVS4-Exon5 demonstrou ser um conjunto de trocas nucleotídicas normais. Já as alterações IVS2-2A>G e IVS2+5G>A em *CYP21A2* e g.1753G>A em *CYP11B1*, apresentaram diferentes formas de *splicings* alternativos, responsáveis por alterações drásticas na produção do mRNA e, consequentemente na tradução das proteínas, caso sejam traduzidas.

Reunindo todos esses dados na tabela 21 observa-se que dos 31 pacientes incluídos neste trabalho, 27 (87,1%) apresentaram boa correlação genótipo-fenótipo. As exceções foram 4 pacientes (12,9%) que apresentavam heterozigose composta com a mutação p.I172N.

Resultados

Tabela 21. Descrição dos genótipos esclarecidos dos pacientes que apresentam as mutações nos genes *CYP21A2* e *CYP11B1*. Em destaque nas linhas em cinza, as correlações entre genótipo-fenótipo que permaneceram inconclusivas devido ao alelo com a mutação p.I172N.

| <i>Pacientes (CYP21A2)</i> | <i>Mutação Paterna</i> | <i>Mutação Materna</i> | <i>Genótipo</i> | <i>Fenótipo</i> |
|---|--|--------------------------------------|-----------------|-----------------|
| 8Ya ₁ /8Xa ₂ | g.992_993insA | p.R356W | PS / PS | PS |
| 179Ya ₁ | g.992_993insA | IVS2-13A/C>G | PS / PS | PS |
| 139Ya ₁ | Deleção de 30 Kb | g.1762_1763insT | PS / PS | PS |
| 114Xa ₁ | p.P34L+p.H62L +Deleção de 30 Kb | g.1762_1763insT | PS / PS | PS |
| 11XaE | p.H62L +p.P453S ¹ | IVS2-13A/C>G ¹ | VS / PS | VS |
| 12YaE | p.H62L +p.P453S ¹ | g.1762_1763insT+p.Q318X ¹ | VS / PS | VS |
| 164Ya ₁ | IVS2-13A/C>G | p.R444X | PS / PS | PS |
| 44Xa ₂ | p.R444X | IVS2-2A>G | PS / PS | PS |
| 31Xa ₁ | IVS2-2A>G | IVS2-2A>G | PS / PS | PS |
| 31primoYa ₁ | IVS2-2A>G | p.V281L | NC / NC | NC |
| 101Xa ₁ | IVS2-2A>G | IVS2-2A>G | PS / PS | PS |
| 131Xa ₁ | p.R356W | IVS2-2A>G | PS / PS | PS |
| 136Ya ₁ | IVS2-2A>G | Deleção de 30 Kb | PS / PS | PS |
| 39Xa ₆ | IVS2-2A>G | <i>p.I172N</i> | VS / PS | PS |
| 79Ya ₃ | <i>p.I172N</i> | IVS2-2A>G | VS / PS | VS |
| 11Xa ₁ /11Xa ₂ / 11Ya ₃ | p.R408C | IVS2-13A/C>G | PS / PS | PS |
| 104Xa ₁ | p.R408C | p.I172N | PS / VS | VS |
| 182Xa ₁ | p.R408C | p.R356W | PS / PS | PS |
| 10Xa ₁ /10Xa ₂ | p.I172N | p.L107R | VS / PS | VS |
| 27Xa ₁ | p.G56R | IVS2-13A/C>G | VS / PS | VS |
| 24Xa ₁ | <i>p.I172N</i> | p.L142P | VS / PS | PS |
| 53Xa ₂ | <i>p.I172N</i> | IVS2+5G>A +p.V281L | VS / PS | PS |
| 181Ya ₁ | IVS2+5G>A +p.V281L | p.R356W | PS / PS | PS |
| 129Ya ₁ | p.V281L | IVS2+5G>A + p.V281L | NC / NC | NC |

Resultados

| <i>Pacientes</i> <i>(CYP21A2)</i> | <i>Mutação Paterna</i> | <i>Mutação Materna</i> | <i>Genótipo</i> | <i>Fenótipo</i> |
|--|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| 95Ya ₁ | p.R479L ou ? | ? ou p.R479L | NC / N | N |
| 175Ya ₁ | p.V281L | IVS4-Exon5 | NC / N | N |

| <i>Paciente</i> <i>(CYP11B1)</i> | <i>Mutação Paterna</i> | <i>Mutação Materna</i> | <i>Genótipo</i> | <i>Fenótipo</i> |
|---|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| 3Xa ₁ | g.1753G>A | g.1753G>A | clássico | clássico |

¹DNA parental não foi obtido para análise de segregação, mas as mutações encontradas em heterozigose composta estão aqui descritas.

DISCUSSÃO

1- Mutações presentes ou ausentes no pseudogene que dispensaram estudo funcional

Dentre os pacientes com os quais iniciamos este trabalho, vinte e dois apresentavam uma única ou nenhuma mutação (Tabela 3) originária do pseudogene, e outros dois pacientes apresentavam o fenótipo discordante do genótipo (Tabela 4). Como a deficiência de CYP21A2 é uma doença autossômica recessiva, para justificar o fenótipo é necessária a presença de uma mutação em homozigose ou heterozigose composta de mutações. Em caso de heterozigose composta, o fenótipo é definido pela mutação que provoca menor dano à atividade enzimática.

Algumas mutações que foram identificadas por seqüenciamento são provenientes do pseudogene: g.1762_1763insT e IVS4-Exon5 (Higashi *et al.*, 1988; Higashi *et al.*, 1986). A mutação *frameshift* g.1762_1763insT, devido às características intrínsecas dos *primers* necessários para a distinção ente os alelos normal e mutante, não é amplificada por PCR alelo-específica, assim sua identificação ocorre somente por seqüenciamento. Já o conjunto de alterações IVS4-Exon5, que é descrito no *CYP21A1P*, foi encontrado pela primeira vez no gene *CYP21A2* em nossa casuística, tratando-se provavelmente de uma microconversão.

As mutações p.P34L e p.H62L são mutações raras das quais não se tem informação sobre a presença no pseudogene. No entanto, foram encontradas em um alelo portador de um gene quimérico no qual desde a região 5'UTR até o exon 3 incluindo as mutações IVS2-13A/C>G (intron 2) e g.707_714delGAGACTAC (exon 3) são semelhantes ao *CYP21A1P*. Esse gene foi formado provavelmente em um evento de deleção de 30 Kb envolvendo também o gene *C4B*. Genes quiméricos são geralmente encontrados pela análise de *Southern Blot* (Lee, 2005). Como a paciente aqui estudada apresentava somente a deleção no alelo materno, foi realizado o seqüenciamento para identificar a mutação do alelo paterno. Assim, pelo estudo de segregação na família, ficou claro que a paciente era heterozigota composta das mutações g.1762_1763insT (alelo paterno) e deleção de 30 Kb (alelo materno), esta última carregando o gene quimérico com as mutações p.P34L+p.H62L+IVS2-13A/C>G+g.707_714delGAGACTAC.

Dentre as mutações novas ou raras identificadas, foi encontrada a troca na posição nucleotídica g.2551C>T no exon 10 que cria um *stop codon*. Esta troca provoca a mutação

rara p.R444X que certamente irá produzir uma proteína truncada, devido a este códon estar localizado próximo ao códon de terminação normal do transcrito. A proteína truncada produzida irá com certeza causar um prejuízo grave na atividade enzimática por eliminar sítios importantes para a ligação do grupamento heme (White e Speiser, 2000; Krone *et al.*, 2005). A mutação p.R444X foi triada em controles normais e em pacientes com deficiência de CYP21A2 por PCR alelo-específica ou seqüenciamento (Tabela 19), sendo encontrada em um outro paciente. Além disso, esta mutação, durante a execução deste trabalho, foi descrita na população Espanhola (Loidi *et al.*, 2006), onde foi identificada em sete pacientes não relacionados, destes, seis pacientes apresentavam o mesmo haplótipo para alteração, alta recorrência que sugere a origem desta mutação em um único ancestral comum na população Espanhola (Loidi *et al.*, 2006). Krone *et al.*, (2006) encontraram esta mutação em apenas um paciente na triagem por mutações em pacientes Alemães com deficiência de CYP21A2, entretanto o haplótipo não foi definido.

A mutação rara g.992_993insA no exon 4, insere um nucleotídeo A entre as posições g.992 e g.993 gerando um deslocamento do quadro de leitura da proteína e, com isto faz com que o aminoácido p.S170 seja substituído por um K e, conseqüentemente todos os aminoácidos posteriores também são substituídos até surgir no códon de terminação de síntese precoce no códon 294 e como resultado ocorre a produção de um mRNA anormal. Esta mutação foi encontrada em dois pacientes (irmãos) os quais tiveram seus genes *CYP21A2* seqüenciados. Na triagem por digestão com a enzima de restrição *Pst* I, a qual tem um sítio suprimido pela alteração, outro paciente (de família não-relacionada) foi identificado com a mutação. A inserção de uma adenina na posição nucleotídica g.995_996insA foi descrita em pacientes Holandeses por Stikkelbroeck *et al.* (2003). Neste trabalho a numeração genômica da inserção difere da aqui descrita, apenas devido à existência de duas numerações distintas para o gene *CYP21A2*. Uma segue a numeração a partir do ATG inicial da seqüência que foi publicada por Higashi *et al.* (1986) (*National Center for Biotechnology Information*, no. M12792) e a outra segue a de Rowen *et al.* (1997) (*National Center for Biotechnology Information*, no. AF019143), sendo a diferença entre elas a presença de 4 e 5 códons de leucina no exon 1, respectivamente. Além disso, na seqüência de Rowen *et al.* (1997) existe um C adicional no intron 3. O exon 4 parece ser

suscetível a inserções do nucleotídeo adenina, uma mutação g.997insA foi descrita em pacientes Norte-Americanos (Zeng *et al.*, 2004) e, em pacientes Brasileiros foi previamente descrita uma outra inserção do nucleotídeo A entre as posições nucleotídicas g.1003 e g.1004 (Billerbeck *et al.*, 2002). A mutação g.992_993insA foi triada em controles normais e em pacientes com deficiência de CYP21A2 por digestão com a enzima de restrição *Pst* I ou por seqüenciamento (Tabela 19), sendo encontrada em um outro paciente.

A mutação rara p.R479L, que é resultado de uma troca de um códon CGG (p.R479) para CTG (p.L479) no exon 10 foi encontrada em um indivíduo encaminhado para estudo molecular devido a um leve aumento de 17-OHP, cujos pais não estavam disponíveis para análise. Esta alteração foi encontrada em um trabalho que descreve a triagem de mutações por *peptide mass signature genotyping* (PMSG) (Zeng *et al.*, 2004) e sua atividade enzimática frente aos substratos foi recentemente descrita como associada à forma não-clássica da deficiência de CYP21A2 (Robins *et al.*, 2007). Além disso, não foi encontrada outra mutação no indivíduo aqui estudado, portanto o genótipo sugere que ele seja apenas um heterozigoto normal. Como este indivíduo não retornou ao ambulatório nas consultas agendadas, não foi possível convocar os pais para confirmar o genótipo. Na triagem de alelos normais e afetados realizada por seqüenciamento a mutação p.R479L não foi encontrada em nenhum outro indivíduo.

2- Mutações *missense* novas ou raras e estudo funcional

2.1- Mutação p.G56R

A troca nucleotídica c.166G>A no exon 1 do gene *CYP21A2* causa a mutação p.G56R, identificada no alelo paterno de uma paciente, cujo alelo materno apresentava a mutação IVS2-13A/C>G (Tabela 21). A investigação da mutação p.G56R foi realizada por digestão do fragmento exon1- intron2Cas com a enzima de restrição *Apa* I, cujo sítio de restrição é suprimido pela mutação. A mutação p.G56R foi observada pela primeira vez neste trabalho e não foi identificada em nenhum outro paciente de nossa casuística (Tabela 19), indicando que se trata de uma mutação inédita e rara.

A análise estrutural demonstrou que a variante p.R56 está localizada em uma região altamente conservada da proteína. Hasemann *et al.* (1995) descreveram esta região como uma seqüência XG na proteína P450 BM-3 de bactéria, onde X é um largo resíduo hidrofóbico. O resíduo hidrofóbico ancora a região terminal da α -hélice A, enquanto a glicina (p.G56) inicia o giro para a folha β 1-1 (Figura 6). A próxima região hidrofóbica na proteína localiza-se entre as folhas β 1-1 e β 1-2; este sistema de folha β tem sido indicado como uma região adicional de contato a membrana (Williams *et al.*, 2000). Como o aminoácido glicina não apresenta cadeia lateral pode adotar uma extensa variação na estrutura da proteína (Figura 12), proporcionando assim uma flexibilidade de torsão para a estrutura e, por isso freqüentemente é encontrada próxima a regiões de folha β ou em alças compactas de giro β , como observado para p.G64 em CYP21A2 (Mornet *et al.*, 2000 e Wester *et al.*, 2003). A alteração deste aminoácido de superfície para básico com caráter hidrofílico na região da proteína em que se localiza (Figura 12), entre uma alfa-hélice (A) e uma folha beta (β 1-1), pode interferir na flexibilidade da interação da α -hélice A com a membrana do retículo endoplasmático, por estabelecer uma nova interação com o aminoácido p.Y376 (Figura 13).

Pelo estudo funcional a variante p.R56 apresentou valores praticamente nulos de conversão de 17-OHP a 11-desoxicortisol, que são substrato e produto, respectivamente, na via dos glicocorticóides impedindo a produção de cortisol. Por outro lado, os valores mínimos (cerca de 1,4%) de conversão de 17-hidroxiprogesterona em progesterona na via dos mineralocorticóides (Figura 11) faz com que não haja a perda de sal, pois quantidades mínimas de aldosterona poderão ainda ser sintetizadas. Como a razão de síntese de cortisol e aldosterona estão numa proporção de 1.000:1, a redução parcial da atividade enzimática causa apenas a deficiência na síntese de cortisol (Helmbert, 1993). Assim, a gravidade da mutação se estabeleceu tanto pelo estudo bioquímico quanto pela avaliação estrutural.

2.2- Mutação p.L107R

A troca nucleotídica c.320T>G no exon 3 do gene *CYP21A2* causa a mutação p.L107R, identificada no alelo materno de dois irmãos, cujo alelo paterno apresentava a mutação p.I172N (Tabela 21).

A mutação p.L107R cria um sítio de restrição para a enzima de restrição *Pin* AI e assim, foi triada em outros pacientes e em indivíduos normais (Tabela 19). Nenhum outro indivíduo apresentou esta mutação, indicando que se trata de uma mutação inédita que surgiu eventualmente nesta família.

O resíduo 107 se localiza na região de conexão entre B`-C (Figura 6), a região B-B`-C desempenha um papel extremamente importante na estrutura da proteína por facilitar o acesso do substrato e liberação do produto (Wester *et al.*, 2003). Como este aminoácido está localizado na região de encaixe induzido do substrato na proteína CYP21A2 (Figura 25), poucas interações com outros aminoácidos devem ocorrer, pois tais interações delimitariam a flexibilidade da região ligante.

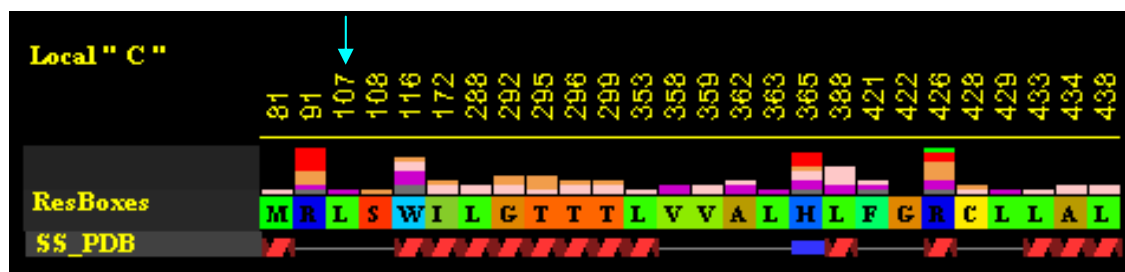


Figura 25. Identificação dos aminoácidos que compõem a região de encaixe induzido do substrato na proteína CYP21A2 normal (adaptado do *Ligand Pocket Residues, STING Report*), destacado pela seta o aminoácido p.L107. Onde, *ResBoxes* são os resíduos da proteína CYP21A2, com a sobreposição em cores das interações com outros aminoácidos na proteína (contatos internos) e, na *SS_PDB* observa-se a distribuição estrutural dos resíduos na proteína (linha em cinza: região de *loop*, em vermelho: α -hélice e em azul: folha β).

Quando sobreposto ao modelo da proteína normal (Figura 12), o aminoácido p.R107 mutante, além de mudar o caráter hidrofóbico do resíduo, se posiciona na estrutura da proteína em sentido a estabelecer interações com os aminoácidos das α -hélices vizinhas, diferentemente do aminoácido leucina, que permanece com sua cadeia lateral direcionada para a cavidade do sítio ativo. Assim, a variante hidrofílica p.R107 perde a função de ligante, estabelecendo várias interações (Figura 13), e conseqüentemente, induzindo a proteína a uma incorreta atividade de hidroxilação.

Assim sendo, mais uma vez pode-se dizer que a gravidade da mutação se estabeleceu tanto pelo estudo bioquímico quanto pela avaliação estrutural.

2.3- Mutação p.L142P

A mutação p.L142P resulta da troca nucleotídica c.425T>C encontrada no exon 3 em heterozigose composta com a mutação p.I172N. A troca c.425T>C suprime um sítio de restrição da enzima *Pvu* II. A triagem desta mutação foi realizada para pacientes com deficiência de CYP21A2 e também para controles normais; não foi encontrada em nenhum outro alelo (Tabela 19), demonstrando que esta é também uma mutação inédita que surgiu eventualmente nesta família.

A comparação de seqüências indicou que o aminoácido p.L142 é altamente conservado (Figura 9) na α -hélice D (Figura 6) e, quando substituído por uma prolina (p.P142) mantém a função hidrofóbica. Em contra partida, a estrutura do aminoácido leucina que é alifática (flexível), é trocada pela estrutura do aminoácido prolina que possui um anel aromático (rígido). Esta troca, potencialmente é capaz de romper α -hélices e assim, imprimir uma curvatura à estrutura protéica (Robins *et al.*, 2006).

O rompimento de uma α -hélice trata-se de uma alteração estrutural grave por imprimir uma curvatura à região, alterando a direção da seqüência polipeptídica, devido ao efeito geométrico imposto pelo aminoácido prolina.

A sobreposição dos aminoácidos foi realizada em caráter ilustrativo (Figura 12), uma vez que o modelo não apresenta a modificação estrutural causada pela prolina na α -hélice, porém, demonstra diferenças estruturais entre os aminoácidos. Interações com outros

aminoácidos foram estabelecidas pelo resíduo mutante (Figura 13), podendo fornecer indícios da direção de curvatura imposta à região.

Assim, a alteração estrutural na proteína é grave e concorda com a redução da capacidade enzimática observada nos ensaios *in vitro* (Figura 11).

2.4- Mutação p.R408C

A mutação p.R408C encontrada no exon 10 foi previamente descrita como PS em outro paciente Brasileiro (Billerbeck *et al.*, 2002). Similar ao caso descrito na literatura, os três irmãos afetados possuem esta alteração em heterozigose composta com a mutação de *splice* alternativo do intron 2 (IVS2-13A/C>G) e um fenótipo associado à forma PS da deficiência de CYP21A2.

Estudos estruturais da mutação p.R408C foram realizados recentemente por dois grupos de pesquisa distintos (Robins *et al.*, 2006 e Janner *et al.*, 2006). Tais estudos sugerem que a variante p.C408 interfere na conformação adequada da proteína por formar uma ponte dissulfeto intramolecular com p.C428, a qual é fundamental para a ligação da proteína com o grupamento heme. Janner *et al.* (2006) vão mais longe ao sugerirem que a variante p.C408 pode se ligar diretamente ao grupamento heme, o que interferiria na ligação do grupo heme com p.C428, resultando assim em uma proteína parcialmente inativa.

O resíduo p.R408 é o terceiro resíduo da tríade ERR (juntamente com p.E351 e p.R354, Figura 6). A tríade ERR atua no *meander* da proteína como um importante estabilizador para a estrutura tridimensional do *Cys-pocket* (do aminoácido 421 ao 428), em uma posição que certifica a ligação covalente do grupamento heme com o CYP (Hasemann *et al.* 1995). Como a atividade de hidroxilação de CYP21A2 é dependente da ligação da proteína ao grupamento heme, uma interrupção na formação da tríade ERR representa grave alteração na estrutura da proteína e conseqüentemente, em sua atividade (Robins *et al.*, 2006). A importância do aminoácido p.R408 como estabilizador da estrutura 3D da proteína é observada no gráfico dos contatos internos (Figura 13), além disso, o aminoácido p.R408 é um dos aminoácidos com o maior número de contatos e um dos que apresenta maior energia envolvida no estabelecimento destes contatos (Figura 26) na proteína CYP21A2. Nos

ensaios *in vitro* a capacidade enzimática foi praticamente abolida, apresentando 1,3% para 17-OHP e 0,6% para progesterona (Figura 11), conforme predito pelos estudos estruturais.

| Chain: C | | Chain: C | |
|----------|------------------|----------|--------------------|
| Residue | Energy(Kcal/mol) | Residue | Number of Contacts |
| HIS 0244 | 109.90 | ARG 0354 | 15 |
| ASP 0258 | 98.40 | HIS 0244 | 15 |
| CYS 0169 | 95.40 | PHE 0439 | 13 |
| ASP 0255 | 90.40 | ARG 0435 | 13 |
| CYS 0173 | 90.20 | GLU 0351 | 13 |
| ARG 0341 | 83.80 | ASP 0258 | 13 |
| ASP 0322 | 82.60 | PHE 0409 | 12 |
| ARG 0408 | 81.90 | ARG 0408 | 12 |
| ARG 0435 | 79.40 | ASP 0338 | 12 |
| ARG 0366 | 74.70 | ASP 0255 | 12 |

Figura 26. Aminoácidos com maior energia (Kcal/mol) envolvida no estabelecimento de contatos e aminoácidos com maior número de contatos internos (dados extraídos pelo *Millenium Sting Report* da proteína CYP21A2, PDB-ID 2GEG), em vermelho o aminoácido p.R408.

Na sobreposição dos aminoácidos normal e mutante, divergências entre as estruturas dos resíduos são evidentes (Figura 12). Além disso, o aminoácido cisteína é o único a conter enxofre em sua composição, por isso, uma troca de qualquer aminoácido para cisteína, independentemente da localização na proteína, imprime alterações drásticas à sua estrutura. A desestabilização da estrutura 3D da proteína pode resultar em uma menor compactação da mesma, o que pode causar uma rápida degradação da proteína *in vivo* (Mornet *et al.*, 2000). Assim, a variante p.C408 consiste em uma mutação grave relacionada à forma PS da deficiência de CYP21A2, pois este resíduo de superfície tornando-se não-polar acaba perdendo sua função como estabilizador estrutural (Robins *et al.*, 2006).

A alteração p.R408C, é causada pela troca nucleotídica c.1222C >T em um alelo contendo o polimorfismo g.656C. O estudo funcional desta variante demonstrou que a mesma praticamente aboliu a atividade enzimática frente aos substratos (Figura 11), sendo assim associada à forma PS, forma mais grave da deficiência de CYP21A2. Esta alteração

no exon 10 foi triada por seqüenciamento tanto para alelos associados à deficiência de CYP21A2 quanto para alelos normais, sendo identificada em mais dois pacientes de famílias não-relacionadas (Tabela 19).

2.5- Mutação p.H62L

A mutação p.H62L não foi encontrada isoladamente em um alelo em nossa casuística, entretanto questionamentos quanto à conseqüência da mesma na atividade da enzima devido à incidência em combinação com outras mutações levou-nos a estudá-la individualmente. Essa alteração foi previamente descrita por Pinto *et al.* (2003) em um paciente do sexo masculino com fenótipo indeterminado VS/NC.

Em humanos o aminoácido 62 da proteína CYP21A2 é uma histidina, para as outras seis espécies analisadas (Figura 9) na mesma posição encontra-se uma arginina altamente conservada, porém, ambos os aminoácidos possuem caráter hidrofílico. Entretanto, quando o aminoácido muda para uma leucina o resíduo torna-se hidrofóbico. Em um recente estudo estrutural (Robins *et al.*, 2006), a mutação p.H62L foi considerada como responsável pela forma menos grave de deficiência de CYP21A2 (NC).

No estudo funcional a mutação p.H62L manteve uma atividade residual relativamente alta, 44% frente à 17-OHP e 21% frente à progesterona (Figura 11), devido a essa atividade foram investigadas as propriedades cinéticas da mesma (Tabela 20). Os resultados cinéticos apresentaram redução na velocidade máxima ($V_{máx}$), enquanto que os valores para a constante de Michaelis-Menten (K_m) apresentaram a mesma variação para ambos os substratos e a mesma magnitude. A redução de $V_{máx}$ na proteína mutante indica que ocorreu uma redução da velocidade de utilização do substrato pela enzima. Considerando que a velocidade de utilização dos substratos em uma via enzimática é determinada pelas velocidades de cada etapa da via, uma alteração em uma das etapas pode alterar a velocidade da via inteira, podendo interferir na atividade normal da via ou na relação com outras vias enzimáticas. Ou seja, apesar de reconhecer e converter o substrato, a proteína mutante p.H62L altera a velocidade deste processo, o que confirma a classificação NC.

O aminoácido p.H62 encontra-se no fim da folha $\beta 1-1$ próximo à alça compacta de giro β na proteína (Figura 6), localizado junto à segunda região hidrofóbica (do aminoácido 63 ao 66), região de importância no ancoramento a membrana do retículo endoplasmático (como descrito no tópico da mutação p.G56R). A troca por um aminoácido hidrofóbico nesta região sugere um aumento do resíduo hidrofóbico, o que pode aumentar a região de ancoramento da proteína à membrana. Observando os contatos internos (Figura 13), verifica-se que interações foram perdidas, permanecendo apenas duas interações de baixa energia (interações hidrofóbicas), o que possibilitaria uma maior flexibilidade a este resíduo.

A triagem da mutação p.H62L foi realizada por seqüenciamento, a mutação sozinha não foi identificada em nenhum alelo seqüenciado, mas combinada com a mutação p.P34L e a deleção de 30 Kb foi identificada em outros 3 alelos, e combinada somente à conversão em larga escala em outros 4 alelos associados à deficiência de CYP21A2 (Tabela 19).

Da mesma forma que identificada em pacientes Brasileiros, a troca nucleotídica c.185A>T foi encontrada em pacientes Escandinavos combinada a outra mutação no mesmo alelo. Os pacientes Escandinavos carregam no alelo portador da mutação p.H62L a mutação não-clássica p.P453S (Nikoshkov *et al.*, 1997). O DNA dos pais destes pacientes não foi coletado, dessa forma, a segregação dos alelos não pode ser estabelecida. Porém, ambos apresentam um fenótipo mais grave do que o normalmente associado à mutação p.P453S (Tabela 21), demonstrando assim que os dados bioquímicos para a combinação p.H62L+p.P453S estão de acordo com o fenótipo dos pacientes.

A mutação p.P453S também foi analisada individualmente para posterior comparação da atividade isolada das duas mutações em relação à atividade combinada (p.H62L, p.P453S e p.H62L+p.P453S). Os valores de conversão de p.P453S foram similares aos observados para a mutação p.H62L, 38% e 22%, respectivamente (Figura 11). A mutação p.P453S foi estudada anteriormente apresentando diferentes valores para a conversão (62% para 17-OHP e 64% para progesterona) (Lajic *et al.*, 2002). No entanto essas diferenças podem refletir as diferentes condições e metodologias dos experimentos. Ambos os resultados indicam porcentagens de conversão na faixa de mutações não-

clássicas (NC), devido à conservação de boa capacidade de conversão frente aos seus substratos.

Quando a mutação p.H62L foi expressa em combinação com a mutação p.P453S, observou-se sinergismo de mutações, onde a atividade da enzima foi reduzida significativamente levando a atividade residual para 4,1% frente à 17-OHP e 2,3% frente à progesterona (Figura 11), valores comparáveis aos encontrados para a mutação p.I172N, responsável pelo fenótipo VS (Krone *et al.*, 2006). Um efeito similar foi previamente encontrado para a combinação das mutações não-clássicas, p.P453S e p.P105L (Nikoshkov *et al.*, 1997).

Não foi necessário testar a atividade enzimática para a combinação p.P34L+p.H62L inseridas na deleção de 30 Kb, pois o gene quimérico que também carrega as mutações IVS2-13A/C>G e a deleção de 8 pb no exon 3 (c.329_336delGAGACTAC) é responsável por abolir a atividade da enzima (Higashi *et al.*, 1988).

Na sobreposição do aminoácido 62, normal e mutante (Figura 12), as divergências entre as estruturas dos resíduos não são tão evidentes, com exceção da região da cadeia cíclica da histidina.

Assim, combinando informações de modelagem e propriedades dos resíduos, a análise estrutural corrobora com os resultados obtidos no estudo funcional de proteínas mutantes configurando duas formas diferentes de avaliação de mutações novas na enzima CYP21A2 e, relaciona estas mutações com as diferentes formas da deficiência.

3- Mutações em sítios de *splicing*

Com os resultados obtidos pelo estudo funcional dos mini-genes foi identificada uma alteração responsável pela exclusão do exon 2 (IVS2+5G>A) no gene *CYP21A2* e duas responsáveis pela formação de sítios de *splice* alternativos, a IVS2-2A>G no gene *CYP21A2* e a g.1753G>A no gene *CYP11B1*. Assim, o estudo de mini-genes para as alterações IVS2+5G>A, IVS2-2A>G no gene *CYP21A2* e g.1753G>A no gene *CYP11B1* classificou estas alterações como mutações em sítio de *splice* responsáveis pela forma mais grave das deficiências de CYP21A2 e de CYP11B1. Enquanto o conjunto de alterações IVS4-Exon5

(g.1104C>A + g.1111T>C + g.1121C>G) demonstrou ser uma microconversão rara normal na proteína, não influenciando diretamente na deficiência de CYP21A2.

Essas variantes foram testadas por seqüenciamento, PCR alelo-específica ou por digestão com enzimas de restrição, as alterações IVS4-Exon 5 em *CYP21A2* e g.1753G>A em *CYP11B1* não foram encontradas em outros pacientes. Entretanto, IVS2+5G>A e IVS2-2A>G foram recorrentes em outros pacientes com deficiência de CYP21A2 (Tabela 19).

Em complemento ao estudo funcional foram realizadas análises *in silico* para a predição de sítios de *splice* (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) (Reese *et al.*, 1997), para todas as alterações, com o intuito de compreender os efeitos das trocas nucleotídicas nos sítios ou regiões de *splicing*. No entanto, a predição foi utilizada apenas como um complemento ao estudo funcional destas variantes, uma vez que programas de predição consideram apenas alguns fatores para estimar sítios de *splice*, o que pode algumas vezes interferir no reconhecimento de regiões normais ou alternativas de *splicing*. Exemplificando tal situação, a mutação proveniente do pseudogene IVS2-13A/C>G no gene *CYP21A2* por análise de predição *in silico* não alteraria o processamento do sítio de *splicing* e, de fato, ela gera a mutação de *splice* alternativo mais freqüente na deficiência de CYP21A2.

3.1- Alteração IVS2+5G>A no gene CYP21A2

A alteração IVS2+5G>A causou a perda do exon 2 (Figura 15), fazendo a junção alternativa do exon 1 ao exon 3 (Figura 5).

Lee e Chang (2001), realizaram estudos *in vitro* da mutação IVS2+1G>A no sítio doador de *splice* no gene *CYP21A2*. Onde observaram a presença de dois transcritos para essa alteração, o transcrito predominantemente apresentava a junção exon 1/exon 3 com a perda do exon 2. Entretanto, o segundo transcrito observado apresentava 19 bases provenientes do intron 2 inseridas entre a junção exon 1/exon 3, curiosamente, a mesma inserção observada por Higashi *et al.*, (1988) para a mutação IVS2-13A>G.

A ativação de sítios críticos de *splice* 5' por mutações pontuais é principalmente causada por alterações no primeiro nucleotídeo do intron (+1), seguido de troca do quinto

nucleotídeo (+5). Substituições na posição +5 da região consenso doadora de *splicing*, são quase que exclusivamente transições G>A, o que é largamente atribuído à alta mutabilidade de C/G>T/A (Buratti *et al.*, 2007).

Alterações na posição +5G modificam a região consenso de reconhecimento de *splice 5'* para a snRNP U1, a primeira snRNP a se ligar ao pré-mRNA, que acaba não reconhecendo o sítio doador GT e assim, não estabelece pontes de hidrogênio com 4-7 nucleotídeos da região consenso (Reed, 2000). Esta região importante para o primeiro passo da ativação do *spliceossomo*, depende do desligamento da U1 do sítio de *splice 5'* e emparelhamento de U6 ao sítio (Staley e Guthrie, 1999; Dou *et al.*, 2006), a snRNP U6 é considerada o núcleo catalítico do *spliceossomo*. Se não ocorre o reconhecimento e ligação das snRNPs U1 e U6, a snRNP U2 que se liga ao sítio 3', não consegue montar o *spliceossomo* nesta região. Uma vez que Robberson *et al.*, (1990) observaram que a ligação de U1 no sítio de *splice 5'* dependia diretamente da ligação de U2 no sítio de *splice 3'* do mesmo exon, ou seja, a interação sítio 3'+exon+sítio 5', é crucial para uma correta formação do *spliceossomo* sobre o exon e, conseqüentemente para um correto *splicing*. Como não houve reconhecimento do exon 2 pelo *spliceossomo* devido à mutação IVS2+5G>A, ocorreu uma forma alternativa de junção: a junção da região doadora do exon 1 à região acceptora do exon 3.

A alteração IVS2+5G>A foi previamente descrita em um paciente de origem Portuguesa com a forma PS da deficiência de CYP21A2 (Friães *et al.*, 2006), apesar de ter sido descrita como alteração de sítio de *splicing*, os autores não descrevem estudos funcionais. Na triagem em alelos dos controles normais e de pacientes com deficiência de CYP21A2 esta alteração foi encontrada em outros dois pacientes de famílias não-relacionadas (Tabela 19), em todos os casos estava combinada com a mutação p.V281L no mesmo alelo, indicando um certo grau de recorrência.

3.2- Alteração IVS2-2A>G no gene CYP21A2

O seqüenciamento do cDNA produzido com o mini-gene contendo a alteração IVS2-2A>G identificada no gene CYP21A2 confirmou a inserção de 19 bases provenientes do

intron 2 na junção exon 2/exon 3. A alteração na posição -2 do intron 2 trata-se de uma troca exatamente na sequência consenso AG do sítio aceptor, sequência extremamente conservada no sítio de *splice* 3' de eucariotos (Buratti *et al.*, 2007).

A troca para GG inativa o sítio normal de *splicing*, fazendo com que o spliceossomo reconheça um sítio críptico no intron, um novo sítio AG *upstream* do sítio normal na posição -19 do intron 2, oferecendo um *splice* alternativo à sequência (Figura 5). A inserção destes 19 nucleotídeos corresponde ao reconhecimento pelo spliceossomo da região g.628_g.668 como região de *splice*, previsto na análise *in silico* (Figura 16). De fato, sequências semelhantes ao sítio consenso de *splicing* sinalizam tão bem quanto os sítios de *splicing* naturais, são muito frequentes dentro dos introns, e são definidos como um grupo de pseudo-exons, são em maior número do que os exons genuínos, mas normalmente não são incluídos no mRNA (Cartegni *et al.*, 2002). No entanto, podem ser reconhecidos com sítios críticos de *splice* quando sítios naturais de *splice* são rompidos por alterações (Cartegni *et al.*, 2002).

A inserção das mesmas 19 bases do intron 2 no RNA transcrito do gene *CYP21A2* foi previamente encontrada na análise *in vitro* das mutações IVS2-13A/C>G (Higashi *et al.*, 1988) e IVS2+1G>A (Lee e Chang, 2001). A criação deste sítio de *splicing* alternativo causa uma alteração do quadro de leitura no exon 3, gerando um *stop codon* prematuro no códon 103, resultando assim na produção de uma proteína truncada e inativa devido ao fato de não serem transcritos os aminoácidos fundamentais para a ligação da proteína *CYP21A2* ao grupamento heme (Higashi *et al.*, 1988). Na realidade, este mRNA gravemente alterado, provavelmente será degradado antes de ser traduzido em proteína (Cartegni *et al.*, 2002).

A mutação IVS2-2A>G foi encontrada por seqüenciamento em cinco pacientes. Na triagem com enzima de restrição *Pst* I foi encontrada em outros três pacientes em heterozigose: 1) em heterozigose composta com a mutação p.V281L, em um primo em primeiro grau de uma das pacientes homozigotas da mutação IVS2-2A>G identificada no seqüenciamento; 2) em heterozigose composta com a mutação p.R356W; 3) em heterozigose composta com a deleção de 30 Kb. A alteração foi previamente descrita na população Brasileira como sendo uma mutação de sítio de *splicing* (Billerbeck *et al.*, 2002), entretanto estudos funcionais não foram realizados. A variante IVS2-2A>G foi

identificada em duas famílias não-relacionadas, tendo sido encontrada em gêmeos bivitelinos com a forma VS e, em um paciente com a forma PS da deficiência de CYP21A2 (Billerbeck *et al.*, 2002). A variante não foi encontrada na triagem de 80 pseudogenes no mesmo estudo. Esta incidência em pacientes com deficiência de CYP21A2 sugere que esta seja a segunda mutação de *splice* mais freqüente em nossa população, como não é proveniente do pseudogene, provavelmente representa um evento randômico. A presença do mesmo evento randômico em pacientes de famílias não relacionadas sugere a possibilidade de uma origem comum para a mutação, ou seja, um efeito fundador para esta alteração (Billerbeck *et al.*, 2002).

3.3- Variações nucleotídicas IVS4-Exon5 no gene CYP21A2

Foi construído um mini-gene para testar o efeito destas variações no sítio de *splice*, incluindo o exon 2 - intron 2 - exon 3 - intron 3 - exon 4 - intron 4 - exon 5- intron 5- exon 6. Os cDNAs dos mini-genes, normal e com a alteração, foram seqüenciados e se observou que apesar das variações estarem presentes na região de processamento do mRNA, estas não interferiram no processamento normal (Figura 21), não sendo comprovada nenhuma alteração no transcrito por *splicing* alternativo como predito pela análise *in silico* (Figura 20).

A troca nucleotídica g.1121C>G no exon 5 (Figura 19) que provoca a alteração p.D183E poderia representar uma mutação. Porém, essa variação, que está presente também no pseudogene foi investigada por Higashi *et al.* (1991) quanto seu efeito na atividade enzimática e não apresentou alteração. Além disso, a troca p.D183E foi descrita uma única vez no gene ativo (Ordoñez-Sánchez *et al.*, 1998).

No caso aqui descrito, a alteração no exon 5 aparece combinada com duas outras alterações no intron 4, g.1104A>C e g.1111C>T (Figura 19), também provenientes do pseudogene e muito próximas entre si, caracterizando uma possível origem através de microconversão, uma vez que as alterações foram encontradas em conjunto no mesmo alelo.

3.4- Mutação g.1753G>A (p.G267S), mini-gene do *CYP11B1*

A troca nucleotídica g.1753G>A está localizada no último nucleotídeo do exon 4 que juntamente com os dois primeiros nucleotídeos do exon 5 formam o códon 267 da proteína. Quando se identifica uma alteração em exon, o primeiro passo é verificar qual seria seu efeito na sequência da proteína. Considerando a posição na proteína, esta troca resultaria na mutação missense p.G267S. Outras duas mutações já haviam sido descritas neste mesmo códon a p.G267R e a p.G267D (Skinner *et al.*, 1996). Porém, a posição nucleotídica faz parte do sítio doador de *splice* do intron 4.

Por seqüenciamento foram triados 26 alelos de pacientes com deficiência de *CYP11B1*, a variante g.1753G>A não foi encontrada em nenhum outro alelo.

A idéia de que esta alteração não se tratava de uma mutação *missense* com efeito sobre a atividade da proteína começou a tomar corpo considerando as propriedades dos resíduos nesta posição. A troca de uma glicina por uma serina mantém a carga neutra e a característica polar do resíduo na proteína, em uma posição não conservada (Figura 22), dentro de uma região variável entre os genes da família dos citocromos P450 (Roumen *et al.*, 2007).

Considerando a hipótese de estar favorecendo um *splice* alternativo, a troca g.1753G>A foi investigada pela construção do mini-gene contendo o fragmento exon 3-exon 5. A análise dos transcritos produzidos com os mini-genes normal e portador da alteração demonstraram a ativação de um sítio crítico de *splice* alternativo interno ao exon 4. Sítios críticos de *splice* são usados somente quando sítios naturais de *splice* são rompidos por alterações (Cartegni *et al.*, 2002). A sequência 5' ss alternativa AGGTGTGG no exon 4 foi utilizada neste caso, num processo anômalo de *splicing* eliminando do transcrito resultante os últimos 45 nucleotídeos do exon 4.

Embora seja crítico para um mecanismo de *splicing* o correto reconhecimento de uma região consenso 5' ss íntegra, frequentemente seqüências auxiliares tanto em exons quanto em introns podem ser requeridas, como silenciadores ou acentuadores de *splicing* (Cartegni *et al.*, 2002, Buratti *et al.*, 2007). Cartegni *et al.* (2002) observaram que

polimorfismos, mutações *missense* e silenciosas podem também estar diretamente envolvidos no processo alternativo de *splicing*.

Em complemento, Roca *et al.* (2003) observaram uma ampla distribuição de distâncias entre sítios autênticos e críticos 5'ss (com média de 63 nucleotídeos de distância). Essa distribuição indica que sítios críticos 5'ss podem em alguns casos se localizar muito distantes do sítio original.

Alterações no aminoácido p.G267 foram previamente descritas no gene *CYP11B1* humano: p.G267R (GGC>CGC) e p.G267D (GGC>GAC) (Skinner *et al.*, 1996). Entretanto, análises experimentais da atividade destas alterações como mutações *missense* ou de *splicing* alternativo não foram realizadas embora os autores proponham um efeito deletério no processamento normal do mRNA.

A mutação p.G267S causa redução no *score* do sítio doador de *splice* de 0.98 (seqüência normal) para 0.42 (seqüência mutante) (Figura 23). Comparando os dados previstos *in silico* para as duas mutações diferentes, observa-se que a mutação p.G267D suprime o sítio acceptor de *splice* e mutação p.G267R reduz o *score* para 0.61.

Outro exemplo de alteração no processo de *splicing* é a troca G>C no último nucleotídeo do exon 5 do gene *CYP11B1* descrita por Chabre *et al.* (2000). Esta troca que representaria uma mutação silenciosa p.T318T na proteína CYP11B1, criou na verdade uma alteração no sítio de *splicing* e, conseqüentemente, alterou a proteína formada. No mesmo estudo, através da análise do mRNA obtido da glândula adrenal do paciente, verificou-se que a variação intrônica IVS8+4G>A era responsável pela perda do exon 8 devido a criação de um sítio alternativo levando ao exon *skipping*.

5- Correlação genótipo-fenótipo

Neste estudo foram identificadas mutações no gene *CYP21A2* originárias ou não do *CYP21A1P*, dos tipos *frameshift*, *nonsense*, *missense* e de *splicing*. Os dois primeiros tipos, por serem deletérios sem necessidade de comprovação funcional, foram discutidos anteriormente e os genótipos dos pacientes, composto de duas mutações PS, estão de acordo com os fenótipos (Tabela 18).

As análises funcionais e estruturais das mutações *missense* para o gene *CYP21A2*, elucidaram a atividade das proteínas mutantes. As alterações p.L107R, p.L142P e p.R408C praticamente aboliram a conversão dos substratos nos produtos esperados, portanto foram associadas à forma mais grave da deficiência de *CYP21A2*, a forma perdedora de sal. A mutação p.G56R por apresentar uma quantidade mínima de conversão de progesterona em desoxicorticosterona, foi considerada como mutação clássica da deficiência de *CYP21A2*, associada ao fenótipo virilizante simples. Enquanto a p.H62L, apesar de não ter sido encontrada isoladamente em nossa triagem, apresentou valores de conversão esperados para uma mutação não-clássica.

A mutação p.G56R foi encontrada na paciente 27Xa₁, do sexo feminino, em heterozigose composta com a mutação IVS2-13A/C>G, identificada anteriormente na triagem por PCR alelo-específica. Como a paciente é heterozigota composta de uma mutação VS (p.G56R) e uma PS (IVS2-13A/C>G), considera-se que o fenótipo predito pelo genótipo seja VS. Assim, este está de acordo com o fenótipo definido pelas características clínicas e hormonais (Tabela 1). Assim, pelo estudo molecular o fenótipo ficou definido pela atividade residual da nova mutação presente no genótipo.

A mutação p.H62L foi encontrada em combinação com a mutação p.P34L, ambas em um alelo portador da deleção de 30 Kb. A paciente 114Xa₁ é heterozigota composta com a mutação g.1762_1763insT, também identificada neste trabalho. Devido a esta heterozigose o fenótipo predito pelo genótipo é o PS, que concordou com a forma clínica diagnosticada (Tabela 1). A mutação p.H62L combinada com a mutação p.P453S foi encontrada em dois pacientes de origem Escandinava, essa combinação demonstrou um efeito sinérgico em nossos estudos produzindo um efeito limítrofe entre VS e NC. Este resultado corrobora os resultados obtidos para essa combinação de mutações nos ensaios enzimáticos realizados por Menassa *et al.*, (2008) e explica os fenótipos descritos para os pacientes (Tabela 1).

Os dois irmãos (10Xa₂ e 10Ya₃) portadores da mutação p.L107R no alelo materno carregam no alelo paterno a mutação p.I172N derivada do *CYP21A1P*. A mutação p.L107R foi considerada neste trabalho como uma mutação grave relacionada à forma PS, porém como os pacientes são heterozigotos compostos com a mutação p.I172N e esta, na maioria dos casos, está relacionada à forma VS (Grigorescu Sido *et al.*, 2005), considera-se que o

fenótipo predito pelo genótipo seja VS, estando de acordo com o fenótipo clínico (Tabela 1). Neste caso o fenótipo ficou definido pela ação residual da mutação p.I172N .

A mutação p.L142P reduz a atividade enzimática para níveis compatíveis aos encontrados para mutações PS. A paciente 24Xa₁ apresenta heterozigose composta com a mutação p.I172N, que, como dito anteriormente é uma mutação típica da forma VS. A mutação p.L142P foi considerada neste trabalho como uma mutação grave relacionada à forma PS, porém a paciente é heterozigota composta com a mutação p.I172N, portanto o fenótipo predito pelo genótipo seria VS. Assim, neste caso o genótipo está discordante do fenótipo que foi definido como perdedor de sal pelo diagnóstico clínico e bioquímico ((Tabela 1 e Tabela 21).

A mutação p.R408C foi encontrada em três irmãos (11Xa₁, 11Xa₂ e 11Ya₃) que apresentaram heterozigose composta com a mutação IVS2-13A/C>G. Além destes, foi identificada também na paciente 104Xa₁, heterozigota composta com a mutação p.I172N e, na paciente 182Xa₁ em heterozigose composta com a mutação p.R356W. Em todos os casos o fenótipo predito pelo genótipo foi concordante com a forma clínica diagnosticada (Tabela 1 e Tabela 21).

Da mesma forma, o estudo de mini-genes para as alterações do *CYP21A2* e do *CYP11B1* elucidaram o papel de cada troca nucleotídica quanto à produção de transcritos normais ou alterados.

O mini-gene contendo as variações IVS4-Exon5 não apresentou efeito deletério. As variações haviam sido encontradas em um recém-nascido do sexo masculino, 175Ya₁, com leve aumento de 17-OHP e sem fenótipo da deficiência de CYP21A2. O paciente 175Ya₁ foi incluído na casuística desta tese pela necessidade de diagnóstico por parte da família, a qual teve o filho através de fertilização assistida após várias tentativas mal sucedidas. A criança acusou alteração na dosagem de 17-OHP no teste do pezinho, mas não apresentava as características clínicas das formas clássicas de deficiência de CYP21A2. Como o casal desejava ter outra criança através do mesmo método, procurou o diagnóstico molecular para o aconselhamento genético. Pela triagem alelo-específica das mutações provenientes do pseudogene, verificou-se que o paciente é portador da mutação p.V281L herdada do pai, que é normalmente classificada como NC. Este fato fez com que se

investigasse o alelo materno por seqüenciamento para definição do genótipo e o possível diagnóstico da forma não-clássica da deficiência de CYP21A2. Estudos funcionais da variação alélica materna indicaram que a criança é apenas portador da mutação p.V281L (Tabela 19).

Na triagem dos alelos, a alteração IVS2-2A>G no gene *CYP21A2* foi encontrada em oito pacientes, sendo dois pacientes homozigotos (Tabela 21). Ambos os pacientes homozigotos (31X_{a1} e 101X_{a1}) da mutação apresentam um fenótipo PS da deficiência de CYP21A2, concordando com o fato desta alteração ser realmente grave por interferir no reconhecimento do sítio de *splicing*. Três pacientes eram heterozigotos compostos com mutações PS (44X_{a2}, 131X_{a1}, 136Y₁) e um (31Y_{a1}) com a mutação p.V281L, nestes quatro casos o fenótipo predito pelo genótipo foi concordante com o fenótipo clínico de cada paciente (Tabela 21). Por outro lado, dois pacientes eram heterozigotos compostos da mutação IVS2-2A>G e da p.I172N (39X_{a1} e 79Y_{a3}). Nestes casos o fenótipo predito pelo genótipo é da forma VS, no entanto, houve divergência na correlação em na paciente 39X_{a1} que apresentava o fenótipo da forma PS (Tabela 1).

A alteração IVS2+5G>A foi encontrada em combinação com a mutação não-clássica proveniente do pseudogene p.V281L. A paciente 53X_{a2}, portadora desta mutação foi primeiramente investigada por apresentar aparente dissociação entre a forma clínica (fenótipo) que era perdedora de sal + ambigüidade genital e, o genótipo: inicialmente correspondente à forma não-clássica sem ambigüidade genital. O estudo molecular preliminar mostrou duas mutações freqüentes: o alelo paterno com mutação p.I172N e o materno com p.V281L. Tal genótipo costuma associar-se à forma não-clássica sem ambigüidade genital, divergência que motivou o estudo através de seqüenciamento do gene. Uma nova mutação no alelo materno, que já era portador da mutação p.V281L, foi revelada na posição nucleotídica g.391. No presente estudo ficou comprovada a gravidade da mutação por provocar o exon *skipping* do exon 2, fazendo com que o alelo, embora portador da mutação p.V281L, seja causador da forma PS. Na triagem em alelos de pacientes com a deficiência de CYP21A2 esta alteração foi encontrada em outros dois pacientes (129Y_{a1} e 181Y_{a1}) de famílias não-relacionadas (Tabela 21), em todos os casos estava combinada com

a mutação p.V281L. Apenas na paciente 53Xa₂, heterozigota composta com a mutação p.I172N, mais uma vez, o genótipo foi discordante do fenótipo (Tabela 21).

A paciente homozigota para a mutação g.1753G>A no gene *CYP11B1*, apresentava o fenótipo clássico da deficiência de CYP11B1, concordando com o fato desta alteração ser realmente grave por interferir no reconhecimento do sítio de *splicing*.

Dos pacientes incluídos neste trabalho apenas 4 (12,9%) não tiveram a correlação genótipo-fenótipo esclarecida (Tabela 21), todos devido a heterozigose composta com a mutação p.I172N. Como citado anteriormente, a mutação p.I172N, é geralmente associada ao fenótipo VS, entretanto, não é rara a descrição de casos onde encontra-se associada ao fenótipo PS (Krone *et al.*, 2000). Esta variabilidade na correlação genótipo-fenótipo para esta mutação pode ocorrer devido a uma característica própria do alelo portador da mutação ou, como resultado de uma somatória da baixa atividade da proteína portadora da mutação com o *background* genético do indivíduo afetado. Apesar das causas aqui levantadas, estudos adicionais mais específicos para esta mutação devem ser realizados para se entender esta variabilidade, como por exemplo, estudo funcional desta mutação associada a diferentes haplótipos.

CONCLUSÕES

- No gene *CYP21A2* dos alelos de pacientes incluídos na investigação por sequenciamento de mutações relacionadas à deficiência de *CYP21A2* foram identificadas mutações novas, raras e alterações provenientes do pseudogene.
- A investigação da atividade enzimática esclareceu o papel funcional das mutações *missense*, que foram classificadas em:
 - Mutações PS: p.L107R, p.L142P, p.R408C - praticamente aboliram a atividade da enzima.
 - Mutação VS: p.G56R - preservou um 1,4% de atividade frente à progesterona.
 - Mutação NC: p.H62L - reduziu a atividade da enzima em valores percentuais semelhantes aos da mutação não-clássica p.P453S.
- Ficou esclarecido que a combinação das mutações não-clássicas p.H62L+p.P453S, resultou no sinergismo de mutações, com valores de conversão limítrofes entre mutação NC e VS.
- A investigação de sítios de *splicing* esclareceu a função das alterações na síntese do mRNA da proteína *CYP21A2*:
 - IVS2-2A>G: mutação PS – por eliminar a função de sítio de *splicing* e incluir 19 pb do intron 2 no mRNA.
 - IVS2+5G>A: mutação PS – por eliminar o exon 2 do mRNA.
 - IVS4-Exon5: variação normal proveniente do pseudogene.
- A investigação de sítios de *splicing* esclareceu a função da alteração g.1753G>A na síntese do mRNA da proteína *CYP11B1*:
 - g.1753G>A: mutação clássica – por eliminar a região doadora de *splicing* do intron 4 juntamente com os últimos 45 pb do exon 4 levando a um mRNA alterado.
- Correlação genótipo-fenótipo para a deficiência de 21-hidroxilase foi:
 - Concordante: em 23 pacientes.
 - Discordante: em 4 pacientes heterozigotos compostos com uma mutação rara e a mutação freqüente p.I172N.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL JURAYYAN NA, ABDULLAH MA, AL HERBISH AS, ABO-BAKR AM. Congenital adrenal hypoplasia: A disorder frequently missed. *Ann Saudi Med.* 1995; 15:563-565.
- AL KANDARI H, KATSUMATA N, ALEXANDER S, RASOUL MA. Homozygous mutation of P450 side-chain cleavage enzyme gene (CYP11A1) in 46, XY patient with adrenal insufficiency, complete sex reversal, and agenesis of corpus callosum. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:2821-2826.
- AMOR M, PARKER KL, GLOBERMAN H, NEW MI, WHITE PC. Mutation in the CYP21B gene (Ile 172Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:1600-1604.
- ARAÚJO M, SANCHES MR, SUZUKI LA, GUERRA JR.G, FARAH SB, DE MELLO MP. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29:1-13.
- ASANUMA A, OHURA T, OGAWA E, SATO S, IGARASHI Y, MATSUBARA Y, *et al.* Molecular analysis of Japanese patients with steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Hum Genet* 1999; 44:312-317.
- BACHEGA TA, BILLERBECK AE, MADUREIRA G, ARNHOLD IJ, MEDEIROS MA, MARCONDES JA, *et al.* Low frequency of CYP21B deletions in Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Hered* 1999; 49:9-14.
- BAIROCH A, APWEILER R, WU CH, BARKER WC, BOECKMANN B, FERRO S, *et al.* The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 2005; 33:D154-159.
- BALSAMO A, CICOGNANI A, BALDAZZI L, BARBARO M, BARONIO F, GENNARI M, *et al.* CYP21 genotype, adult height, and pubertal development in 55 patients treated for 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:5680-5688.
- BARBARO M, LAJIC S, BALDAZZI L, BALSAMO A, PIRAZZOLI P, CICOGNANI A, *et al.* Functional analysis of two recurrent amino acid substitutions in the CYP21 gene from Italian patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2402-2407.
- BILLERBECK AE, BACHEGA TA, FRAZATTO ET, NISHI MY, GOLDBERG AC, MARIN ML, *et al.* A novel missense mutation, GLY424SER, in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2870-2872.
- BILLERBECK AEC, MENDONÇA BB, PINTO EM, MADUREIRA G, ARNHOLD IJP, BACHEGA TASS. Three Novel Mutations in CYP21 Gene in Brazilian patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency due to a founder effect. *J Clin Endocrinol Metabol* 2002; 87:4314-4317.
- BIGLIERI EG, HERRON MA, BRUST N. 17-hydroxylation deficiency in man. *J Clin Invest* 1966; 45:1946-1954.
- BLUESTAR STING SUITE HOMEPAGE. Disponível em: <http://sms.cbi.cnptia.embrapa.br/SMS/>.

BOBBA A, IOLASCON A, GIANNATTASIO S, ALBRIZIO M, SINISI A, PRISCO F, *et al.* Characterization of CAH alleles with non-radioactive DNA single strand conformation polymorphism analysis of the CYP21 gene. *J Med Genet* 1997; 34:223-228.

BONGIOVANNI AM, EBERLEIN WR. Clinical and metabolic variations in the adrenogenital syndrome. *Pediatrics* 1955; 5:628-636.

BONGIOVANNI AM. The adrenogenital syndrome with deficiency of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Clin Invest* 1962; 41:2086-2092.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.

BRANDEN C-U, TOOZE J. Introduction to protein structure. In: Garland Science, ed. New York: Garland Science, 1999. 2nd edition, p 410.

BRETT D, POSPISIL H, VALCÁRCEL J, REICH J, BORK P. Alternative splicing and genome complexity. *Nat Genet* 2002; 30:29-30.

BURATTI E, CHIVERS M, KRÁLOVICOVÁ J, ROMANO M, BARALLE M, KRAINER AR, *et al.* Aberrant 5' splice sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization. *Nucleic Acids Res* 2007; 35:4250-4263.

CALLIARI LP. Hiperplasia adrenal congênita. Em: Monte, O & Carlos, A, ed. Editora Rio de Janeiro, Livraria Atheneu 1992; 115-124.

CARROL MC, CAMPBELL RD, PORTER RP. Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:521-525.

CARTEGNI L, CHEW SL, KRAINER AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002; 3:285-298.

CHABRE O, PORTRAT-DOYEN S, VIVIER J, MOREL Y, DEFAYE G. Two novel mutations in splice donor sites of CYP11B1 in congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. *Endocrine Res* 2000; 26:797-801.

CHEN GF, INOUYE M. Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:1465-1473.

CHIOU SH, HU MC, CHUNG BC. A missense mutation at Ile172-Asn or Arg356-Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biol Chem* 1990; 265:3549-3552.

CHUNG B, MATTESON KJ, VOUTILAINEN R, MOHANDAS TK, MILLER WL. Human cholesterol side-chain cleavage enzyme P450_{sc}. *Proc Nat Acad Sci USA* 1986; 83:8962-8966.

CINGÖZ S, OZKAN B, DÖNERAY H, SAKIZLI M. Familial pericentric inversion chromosome 3 and R448C mutation of CYP11B1 gene in Turkish kindred with 11beta-hydroxylase deficiency. *J Endocrinol Invest* 2007; 30:285-291.

CONCOLINO P, CORSELLO S, CARROZZA C, MINUCCI A, SANTONOCITO C, LOVICU RM, *et al.* First case of V281+I172N/V281L CYP21A2 genotype associated with congenital adrenal hyperplasia form. A case report from South Italy. *Clin Biochem* 2007; 40:1435-1436.

COOPER DN, YOUSOUFIAN H. The CpG dinucleotide and human disease. *Hum Genet* 1988; 78:151-155.

CHROMAS LITE FREEWARE. Disponível em: http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html.

CURNOW KM, TUSIE-LUNA MT, PASCOE L, NATARAJAN R, GU JL, NADLER JL, *et al.* The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol Endocrinol* 1991; 5:1513-1522.

CURNOW KM, SLUTSKER L, VITEK J, COLE T, SPEISER PW, NEW MI, *et al.* Mutations in CYP11B1 causing congenital adrenal hyperplasia and hypertension cluster in exons 6,7 and 8. *Proc Nat Acad Sci USA* 1993; 90:4552-4556 .

DARDIS A, BERGADA I, BERGADA C, RIVAROLA M, BELGOROSKY A. Mutations of the steroid 21-hydroxylase gene in an Argentinian population of 36 patients with classical congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1997; 10:55-61.

DAY DJ, SPEISER PW, SCHULZE E, BETTENDORF M, FITNESS J, BARANY F, *et al.* Identification of non-amplifying CYP21 genes when using PCR-based diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia (CAH) affected pedigrees. *Hum Mol Genet* 1996; 5:2039-2048.

DE CARVALHO CE, CASTRO M, MOREIRA AC, DE MELLO MP. CYP11B1 Mutations and polymorphisms in congenital adrenal hyperplasia due to 11-beta hydroxylase deficiency. *J Endocrine Genetics* 1999; 1:79-86.

DE SMIT MH, VAN DUIN J. Control of prokaryotic translational initiation by mRNA secondary structure. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1990; 38:1-35.

DHIR V, IVISON HE, KRONE N, SHACKLETON CH, DOHERTY AJ, STEWART PM, *et al.* Differential inhibition of CYP17A1 and CYP21A2 activities by the P450 oxidoreductase mutant A287P. *Mol Endocrinol* 2007; 21:1958-1968.

DOLZAN V, STOPAR-OBREZA M, ZERJAV-TANSEK M, BRESKVAR K, KRZISNIK C, BATTELINO T. Mutational spectrum of congenital adrenal hyperplasia in Slovenian patients: a novel Ala15Thr mutation and Pro30Leu within a larger gene conversion associated with a severe form of the disease. *Eur J Endocrinol* 2003; 149:137-144.

DOLZAN V, SÓLYOM J, FEKETE G, KOVÁCS J, RAKOSNIKOVA V, VOTAVA F, *et al.* Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2005; 153:99-106.

DOU Y, FOX-WALSH KL, BALDI PF, HERTEL KJ. Genomic splice-site analysis reveals frequent alternative splicing close to the dominant splice site. *RNA* 2006; 12:2047-2056.

DREYFUS, M. What constitutes the signal for the initiation of protein synthesis on *Escherichia coli* mRNAs? *J Mol Biol* 1988; 204:79–94.

DUPONT B, OBERFIELD SE, SMITHWICK EM, LEE TS, LEVINE IS. Close genetic linkage between HLA and congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *Lancet II* 1977; 1309-1311.

DUPONT B, POLLACK MS, LEVINE LS, O'NEILL GJ, HAWKINS BR, NEW MI. In: TERASAKI PI, ed. *Histocompatibility testing*. University of California at Los Angeles, Los Angeles, 1980. p.693-706.

ERDMANN B, DENNER K, GERST H, LENZ D, BERNHARDT R. Human adrenal CYP11B1: localization by in situ-hybridization and functional expression in cell cultures. *Endocr Res* 1995; 21:425-435.

FRIÃES A, RÊGO AT, ARAGÜÉS JM, MOURA LF, MIRANTE A, MASCARENHAS MR, *et al.* CYP21A2 mutations in Portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia: identification of two novel mutations and characterization of four different partial gene conversions. *Mol Genet Metab* 2006; 88:58-65.

GELEY S, KAPELARI K, JÖHRER K, PETER M, GLATZL J, VIERHAPPER H, *et al.* CYP11B1 mutations causing congenital adrenal hyperplasia due to 11 beta-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:2896-2901.

GENE RUNNER FOR WINDOWS. Disponível em: <http://www.generunner.net/>.

GLENTHØJ A, NIELSEN MD, STARUP J. Congenital adrenal hyperplasia due to 11 beta-hydroxylase deficiency: final diagnosis in adult age in three patients. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1980; 93:94-99.

GLOBERMAN H, AMOR M, PARDER KL, NEW MI, WHITE PC. Nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 1988; 82:139-144.

GRIGORESCU SIDO A, WEBER MM, GRIGORESCU SIDO P, CLAUSMEYER S, HEINRICH U, SCHULZE E. 21-Hydroxylase and 11beta-hydroxylase mutations in Romanian patients with classic congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:5769-5773.

GUALERZI CO, PON CL. Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* 1990; 29:5881–5889.

GLUZMAN Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 1981; 23:175-182.

HAMPF M, DAO NT, HOAN NT, BERNHARDT R. Unequal crossing-over between aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase genes causes congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4445-4452.

- 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* 1987; 84:8091-8094.
- HASEMANN CA, KURUMBAIL RG, BODDUPALLI SS, PETERSON JA, DEISENHOFER J. Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* 1995; 3:41–62.
- HEGELE RA, HUFF MW, YOUNG TK. Common genomic variation in LMNA modulates indexes of obesity in Inuit. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:2747-2751.
- HELMBERG A, TUSIE-LUNA MT, TABARELLI M, KOFLER R, WHITE PC. R339H and P453: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. *Mol Endocrinol* 1992a; 6:1318-1322.
- HELMBERG A, AUSSERER B, KOFLER R. Frame Shift by Insertion of 2 Basepairs in Codon 394 of CYP11B1 Causes Congenital Adrenal Hyperplasia due to Steroid 11 β -Hydroxylase Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1992b; 75:1278-1281.
- HELMBERG A. Twin genes and endocrine disease: CYP21 and CYP11B genes. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1993; 129:97-108.
- HIGASHI Y, YOSHIOKA H, YAMANE M, GOTOHASE O, FUJI-KURUYAMA Y. Complete nucleotide sequence of 2 steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:2841-2845.
- 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* 1988; 85:7486-7490.
- HIGASHI Y, HIROMASA T, TANAE A, MILI T, NAKURA J, KONDO T, *et al.* 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* 1991; 109:638-644.
- HIGASHI Y, FUJII-KURIYAMA Y. Functional analysis of mutant P450(C21) genes in COS cell expression system. *Methods Enzymol* 1991; 206:166–173.
- HOCHBERG Z, SCHECHTER J, BENDERLY A, LEIBERMAN E, ROSLER A. Growth and pubertal development in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 11-beta-hydroxylase deficiency. *Am J Dis Child* 1985; 139:771-776.
- HSU LC, HSU NC, GUZOVA JA, GUZOV VM, CHANG SF, CHUNG BC. The common I172N mutation causes conformational change of cytochrome P450c21 revealed by systematic mutation, kinetic, and structural studies. *J Biol Chem* 1996; 271:3306–3310.
- HU MC, CHUNG BC. Expression of human 21-hydroxylase (P450c21) in bacterial and mammalian cells: a system to characterize normal and mutant enzymes. *Mol Endocrinol* 1990; 4:893–898.

HU MC, HSU LC, HSU NC, CHUNG BC. Function and membrane topology of wild-type and mutated cytochrome P-450c21. *Biochem J* 1996; 316:325-329.

HUGHES IA. Management of fetal endocrine disorders. *Growth Horm IGF Res* 2003; 13 Suppl A:S55-61.

HUMA Z, CRAWFORD C, NEW MI. Congenital adrenal hyperplasia. In: Blackwell Science, ed. *Clinical Paediatric Endocrinology*. 3rd Edition, 1995. chap. 30, p.536.

JANJANIN N, DUMIC M, SKRABIC V, KUSEC V, GRUBIC Z, SPEHAR UROIC A. Five patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency (one with associated neuroblastoma) discovered in three generations of one family. *Horm Res* 2007; 67:111-116.

JANNER M, PANDEY AV, MULLIS PE, FLÜCK CE. Clinical and biochemical description of a novel CYP21A2 gene mutation 962_963insA using a new 3D model for the P450c21 protein. *Eur J Endocrinol* 2006; 155:143-151.

JIDDOU RR, WEI WL, SANE KS, KILLEEN AA. Single-nucleotide polymorphisms in intron 2 of CYP21P: evidence for a higher rate of mutation at CpG dinucleotides in the functional steroid 21-hydroxylase gene and application to segregation analysis in congenital adrenal hyperplasia. *Clin Chem* 1999; 45:625-629.

JOHNSON JM, CASTLE J, GARRETT-ENGELE P, KAN Z, LOERCH PM, ARMOUR CD, *et al.* Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* 2003; 302:2141-2144.

KAWAMOTO T, MITSUUCHI Y, TODA K, MIYAHARA K, YOKOYAMA Y, NAKAO K, *et al.* Cloning of cDNA and genomic DNA for human cytochrome P-45011 beta. *FEBS Lett* 1990; 269:345-349.

KIM YW, KIM YK, KIM DK, SHEEN YY. Identification of human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of IN-1130, a novel activin receptor-like kinase-5 (ALK5) inhibitor. *Xenobiotica* 2008; 38:451-464.

KOHN B, DAY D, ALEMZADEH R, ENERIO D, PATEL SV, PELCZAR JV, *et al.* Splicing mutation in CYP21 associated with delayed presentation of salt-wasting congenital adrenal hyperplasia. *Am J Med Genet* 1995; 57:450-454.

KOPPENS PF, HOOGENBOEZEM T, HALLEY DJ, BARENDSE CA, OOSTENBRINK AJ, DEGENHART HJ. Family studies of the steroid 21-hydroxylase and complement C4 genes define 11 haplotypes in classical congenital adrenal hyperplasia in the Netherlands. *Eur J Pediatr* 1992; 151:885-892.

KOPPENS PF, HOOGENBOEZEM T, DROP SL, de MUINCK-KEIZER-SCHRAMA SM, DEGENHART HJ. Aldosterone production despite absence or defectiveness of the CYP21 genes in two patients with salt-losing congenital adrenal hyperplasia caused by steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 49:815-822.

KOPPENS PF, HOOGENBOEZEM T, DEGENHART HJ. Duplication of the CYP21A2 gene complicates mutation analysis of steroid 21-hydroxylase deficiency: characteristics of three unusual haplotypes. *Hum Genet* 2002; 111:405-410.

KOTASKA K, LISÁ L, PRŮSA R. Common CYP21 gene mutations in Czech patients and statistical analysis of worldwide mutation distribution. *Cent Eur J Public Health* 2003; 11:124-128.

KOYAMA S, TOYOURA T, SAISHO S, SHIMOZAWA K, YATA J. Genetic analysis of Japanese patients with 21-hydroxylase deficiency: identification of a patient with a new mutation of a homozygous deletion of adenine at codon 246 and patients without demonstrable mutations within the structural gene for CYP21. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2668-2673.

KRONE N, BRAUN A, ROSCHER AA, KNORR D, SCHWARZ HP. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1059-1065.

KRONE N, RIEPE FG, ÖTZE D, KORSCH E, RISTER M, COMMENTZ J, *et al.* Congenital adrenal hyperplasia due to 11-hydroxylase deficiency: functional characterization of two novel point mutations and a three-base pair deletion in the CYP11B1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:3724- 3730.

KRONE N, RIEPE G, PARTSCH CJ, VORHOFF W, BRAMSWIG J, SIPPELL WG. Three novel point mutations of the CYP21 gene detected in classical forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006; 114: 111-117.

KURIBAYASHI I, MASSA G, VAN DEN TOOREN-DE GROOT HK, OOSTDIJK W, WIT JM, SHIZUTA Y. A novel nonsense mutation in the CYP11B1 gene from a subject with the steroid 11beta-hydroxylase form of congenital adrenal hyperplasia. *Endocr Res* 2003; 29:377-381.

L'ALLEMAND D, TARDY V, GRÜTERS A, SCHNABEL D, KRUDE H, MOREL Y. How a patient homozygous for a 30-kb deletion of the C4-CYP 21 genomic region can have a nonclassic form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:4562-4567.

LAJIC S, WEDELL A. An intron 1 splice mutation and a nonsense mutation (W23X) in CYP21 causing severe congenital adrenal hyperplasia. *Hum Genet* 1996; 98:182-184.

LAJIC S, LEVO A, NIKOSHKOV A, LUNDBERG Y, PARTANEN J, WEDELL A. A cluster of missense mutations at Arg356 of human steroid 21-hydroxylase may impair redox partner interaction. *Hum Genet* 1997; 99:704-709.

LAJIC S, CLAUIN S, ROBINS T, VEXIAU P, BLANCHE H, BELANNE-CHANTELOT C, *et al.* Novel mutations in CYP21 detected in individuals with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2824-2829.

LAMBETH JD, SEYBERT DW, KAMIN H. Ionic effects on adrenal steroidogenic electron transport. The role of adrenodoxin as an electron shuttle. *J Biol Chem* 1979; 254:7255-7264.

LASKOWSKI RA, MACARTHUR MW, MOSS DS, THORNTON JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallography* 1993; 26:283.

LAU, Ivy Freitas. Análise molecular de alelos mutantes raros no complexo gênico da enzima 21-hidroxilase [tese de mestrado]. Campinas: Instituto de Biologia; Universidade Estadual de Campinas, 2000.

LAU IF, SOARDI FC, LEMOS-MARINI SHV, GUERRA JR G, BAPTISTA MTM, DE MELLO MP. The insertion H28+C in the CYP21 gene: a novel frameshift mutation in a Brazilian patient with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5877-5880.

LEE HH, CHANG SF. Multiple transcripts of the CYP21 gene are generated by the mutation of the splicing donor site in intron 2 from GT to AT in 21-hydroxylase deficiency. *J Endocrinol* 2001; 171:397-402.

LEE HH. The chimeric CYP21P/CYP21 gene and 21-hydroxylase deficiency. *J Hum Genet* 2004; 49:65-72.

LEE HH. Diversity of the CYP21P-like gene in CYP21 deficiency. *DNA Cell Biol*. 2005; 24:1-9.

LEE C, WANG Q. Bioinformatics analysis of alternative splicing. *Brief Bioinform* 2005; 6:23-33.

LEVO A, JÄÄSKELÄINEN J, SISTONEN P, SIRÉN MK, VOUTILAINEN R, PARTANEN J. Tracing past population migrations: genealogy of steroid 21-hydroxylase (CYP21) gene mutations in Finland. *Eur J Hum Genet* 1999; 7:188-196.

LOIDI L, QUINTEIRO C, PARAJES S, BARREIRO J, LESTÓN DG, CABEZAS-AGRÍCOLA JM, *et al*. High variability in CYP21A2 mutated alleles in Spanish 21-hydroxylase deficiency patients, six novel mutations and a founder effect. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64:330-336.

MACCONNACHIE AA, KELLY KF, MCNAMARA A, LOUGHLIN S, GATES LJ, INGLIS GC, *et al*. Rapid diagnosis and identification of cross-over sites in patients with glucocorticoid remediable aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:4328-4331.

MATLIN AJ, CLARK F, SMITH CW. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:386-398.

MENASSA R, TARDY V, DESPERT F, BOUVATTIER-MOREL C, BROSSIER JP, CARTIGNY M, *et al*. p.H62L, a rare mutation of the CYP21 gene identified in two forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:1901-1908.

Referências Bibliográficas

- MICHAEL IP, KURLENDER L, MEMARI N, YOUSEF GM, DU D, GRASS L, *et al.* Intron retention: a common splicing event within the human kallikrein gene family. *Clin Chem* 2005; 51:506-515.
- MILLER WL, MOREL Y. The molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. *Annu Rev Genet* 1989; 23:371-393.
- MILLER, WL. Congenital Adrenal Hyperplasias. *Endocrinol Metab Clin North America* 1991; 20:721-740.
- MIMOUNI M, KAUFMAN H, ROITMAN A, MORAG C, SADAN N. Hypertension in a neonate with 11 beta-hydroxylase deficiency. *Eur J Pediatr* 1985; 143:231-233.
- MITANI F, OGISHIMA T, MIYAMOTO H, ISHIMURA Y. Localization of P450aldo and P45011 beta in normal and regenerating rat adrenal cortex. *Endocr Res* 1995; 21:413-23.
- MODELLER A PROGRAM FOR PROTEIN STRUCTURE MODELING HOMEPAGE. Disponível em: <http://salilab.org/modeller/>.
- MODREK B, LEE CJ. Alternative splicing in the human, mouse and rat genomes is associated with an increased frequency of exon creation and/or loss. *Nat Genet* 2003; 34:177-180.
- MORNET E, DUPONT J, VITEK A, WHITE PC. Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11) beta). *J Biol Chem* 1989; 264:20961-20967.
- MORNET E, CRETE P, KUTTENN F, RAUX-DEMEY MC, BOUÉ J, WHITE PC, *et al.* Distribution of deletion and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 1991; 48:79-88.
- MORNET E, GIBRAT J-F. A 3D model of human P450c21: study of the putative effects of steroid 21-hydroxylase gene mutations. *Hum Genet* 2000; 106:3309-3339.
- MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT BY CLUSTALW HOMEPAGE. Disponível em: <http://align.genome.jp/>.
- NAIKI Y, KAWAMOTO T, MITSUUCHI Y, MIYAHARA K, TODA K, ORII T, *et al.* A nonsense mutation (TGG [Trp116] ⇒ TAG [stop] in CYP11B1 causes steroid 11β-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metabol* 1993; 77:166-168.
- NAKAGAWA Y, YAMADA M, OGAWA H, IGARASHI Y. Missense mutation in CYP11B1 (CGA[Arg-384]→GGA[Gly]) causes steroid 11 beta-hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol* 1995; 132:286-289.
- NESHICH G, TOGAWA RC, MANCINI AL, KUSER PR, YAMAGISHI ME, PAPPAS G JR, *et al.* STING Millennium: A web-based suite of programs for comprehensive and simultaneous analysis of protein structure and sequence. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:3386-3392.
- NEW MI, LEVINE LS. Recent advances in 21-hydroxylase deficiency. *Annu Rev Med* 1984; 35:649-663.

NEW MI, GERTNER JM, SPEISER PW, DEL BALZO P. Growth and final height in classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Endocrinol Invest* 1989; 12:91-95.

NEW MI. 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1994; 48:15-22.

NEW MI. Diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia. *Annu Rev Med* 1998; 49:311-328.

NEW MI. An update of congenital adrenal hyperplasia. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1038:14-43.

NICHOLLS CD, SHIELDS MA, LEE PWK, ROBBINS SM, BEATTIE TL. UV-dependent alternative splicing uncouples p53 activity and PIG3 gene function through rapid proteolytic degradation. *J Biol Chem* 2004; 279:24171-24178.

NICOD J, DICK B, FREY FJ, FERRARI P. Mutation analysis of CYP11B1 and CYP11B2 in patients with increased 18-hydroxycortisol production. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 214:167-174.

NIKOSHKOV A, LAJIC S, HOLST M, WEDELL A, LUTHMAN H. Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:194-199.

NIMKARN S, NEW MI. Steroid 11beta- hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19:96-99.

NIKOSHKOV A, LAJIC S, VLAMIS-GARDIKAS A, TRANEBJAERG L, HOLST M, WEDELL A, *et al.* Naturally occurring mutants of human steroid 21-hydroxylase (P450c21) pinpoint residues important for enzyme activity and stability. *J Biol Chem* 1998; 273:6163-6165.

NISHIMURA A, MORITA M, NISHIMURA Y, SUGINO Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:6169.

ORDONEZ-SANCHEZ ML, RAMIREZ-JIMENEZ S, LOPEZ-GUTIERREZ AU, RIBA L, GAMBOA-CARDIEL S, CERRILLO-HINOJOSA M, *et al.* Molecular genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population: identification of possible new mutations and high prevalence of apparent germ-line mutations. *Hum Genet* 1998; 102:170-177.

OWERBACH D, CRAWFORD YM, DRAZNIN MB. Direct analysis of CYP21 genes in 21-hydroxylase deficiency using polymerase chain reaction amplification. *Mol Endocrinol* 1990; 4:125-131.

OWERBACH D, SHERMAN L, BALLARD AL, AZZIZ R. Pro-453 to Ser mutation in CYP21 is associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency. *Mol Endocrinol* 1992; 6:1211-1215.

PALDOSTIR A, FOSSDAL R, ARNASON A, EDWARDS JH, JENNSON, O. Heterogeneity of human C4 gene size. A large intron (6.6 Kb) is present in all C4A genes and some C4B genes *Immunogenetics* 1987; 25:299-304.

PANG S. The Molecular and Clinical Spectrum of 3beta-hydroxysteroid Dehydrogenase Deficiency Disorder. *Trends Endocrinol Metab* 1998; 9:82-86.

PASQUALINI T, ALONSO G, TOMASINI R, GALICH AM, BUZZALINO N, FERNANDEZ C, *et al.* Congenital adrenal hyperplasia clinical characteristics and genotype in newborn, childhood and adolescence. *Medicina (B Aires)* 2007; 67:253-261.

PAULINO LC, ARAUJO A, GUERRA JR G, LEMOS-MARINI SHV, DE MELLO MP. Mutation distribution and CYP21/C4 locus variability in Brazilian families with the classical form of the 21-hydroxylase deficiency. *Acta Pediatr* 1999; 88:275-283.

PENACHIONI, Júnia Yara. Determinação de mutações e polimorfismos no gene CYP11B1 humano em indivíduos com deficiência de 11β-hidroxilase [tese de mestrado]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas; Universidade Estadual de Campinas, 2001.

PINTO G, TARDY V, TRIVIN C, THALASSINOS C, LORTAT-JACOB S, NIHOULFEKETE C, *et al.* Follow-up of 68 children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: relevance of genotype for management. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2624–2633.

PORTRAT S, MULATERO P, CURNOW KM, CHAUSSAIN JL, MOREL Y, PASCOE L. Deletion hybrid genes, due to unequal crossing over between CYP11B1 (11beta-hydroxylase) and CYP11B2 (aldosterone synthase) cause steroid 11beta-hydroxylase deficiency and congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3197-3201.

RAMAZANI A, KAHRIZI K, RAZAGHIAZAR M, MAHDIEH N, KOPPENS P. The frequency of eight common point mutations in CYP21 gene in Iranian patients with congenital adrenal hyperplasia. *Iran Biomed J* 2008; 12:49-53.

REED R. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12:340-345.

REESE MG, EECKMAN FH, KULP D, HAUSSLER D. Improved Splice Site Detection in Genie. *J Comp Biol* 1997; 4:311-323.

RIEPE FG, MAHLER P, SIPPELL WG, PARTSCH CJ. Longitudinal study of plasma pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone in full-term and preterm neonates at birth and during the early neonatal period. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:4301-4306.

RIEPE FG, HIORT O, GRÖTZINGER J, SIPPELL WG, KRONE N, HOLTERHUS PM. Functional and structural consequences of a novel point mutation in the CYP21A2 gene causing congenital adrenal hyperplasia: potential relevance of helix C for POR-CYP21 interaction. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; DOI: 10.1210/jc.2007-2646.

ROBBERSON BL, COTE GJ, BERGET SM. Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol Cell Biol* 1990; 10:84-94.

ROBINS T, CARLSSON J, SUNNERHAGEN M, WEDELL A, PERSSON B. Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia. *Mol Endocrinol* 2006; 20:2946-2964.

ROBINS T, BELLANNE-CHANTELOT C, BARBARO M, CABROL S, WEDELL A, LAJIC S. Characterization of novel missense mutations in CYP21 causing congenital adrenal hyperplasia. *J Mol Med* 2007; 85:247-55.

ROCA X, SACHIDANANDAM R, KRAINER AR. Intrinsic differences between authentic and cryptic 5' splice sites. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:6321-6333.

RODRIGUES NR, DUNHAN I, YUNG YC, CARROL MC, PORTER RR, CAMPBELL RD. Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. *EMBO J* 1987; 6:1653-1661.

RÖSLER A, LEIBERMAN E, SACK J, LANDAU H, BENDERLY A, MOSES SW, *et al.* Clinical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. *Horm Res* 1982; 16:133-141.

RÖSLER A, LEIBERMAN E, COHEN T. High frequency of congenital adrenal hyperplasia (classic 11 beta-hydroxylase deficiency) among Jews from Morocco. *Am J Med Genet* 1992; 42:827-834.

ROUMEN L, SANDERS MP, PIETERSE K, HILBERS PA, PLATE R, CUSTERS E, *et al.* Construction of 3D models of the CYP11B family as a tool to predict ligand binding characteristics. *J Comput Aided Mol Des* 2007; 21:455-471.

ROWEN L, MAHAIRAS G, HOOD L. Sequencing the human genome. *Science* 1997; 278:605-607.

RUMSBY G, CARROLL MC, PORTER RR, GRANT DB, HJELM M. Deletion of the steroid 21-hydroxylase and complement C4 genes in congenital adrenal hyperplasia, *J Med Genet* 1986; 23:204-209 .

SALI A, BLUNDELL TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 1993; 234:779-815.

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

SANCHEZ R, PIEPER U, MELO F, ESWAR N, MARTI-RENOM MA, MADHUSUDHAN MS, *et al.* Protein structure modeling for structural genomics. *Nat Struct Biol* 2000; 7(Suppl):986-990.

SHETH N, ROCA X, HASTINGS ML, ROEDER T, KRAINER AR. Comprehensive splice-site analysis using comparative genomics. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:3955-3967.

SIMARD J, COUET J, DUROCHER F, LABRIE Y, SANCHEZ R, BRETON N, *et al.* Structure and tissue-specific expression of a novel member of the rat 3 beta-hydroxysteroid

Referências Bibliográficas

dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta-HSD) family. The exclusive 3 beta-HSD gene expression in the skin. *J Biol Chem* 1993; 268:19659-19668.

SIMARD J, MOISAN AM, MOREL Y. Congenital adrenal hyperplasia due to 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta(5)-Delta(4) isomerase deficiency. *Semin Reprod Med* 2002; 20:255-276.

SINGH G, COOPER TA. Minigene reporter for identification and analysis of cis elements and trans factors affecting pre-mRNA splicing. *Biotechniques* 2006; 41:177-181.

SINNOTT PJ, LIVIERI C, SAMPIETRO M, MARCONI M, HARRIS R, SEVERI F, *et al.* CYP21/C4 gene organization in Italian 21-hydroxylase deficiency families. *Hum Genet* 1992; 88:545-551.

SKINNER CA, RUMSBY G. Steroid 11 β -hydroxylase deficiency caused by a five base pair duplication in the CYP11B1 gene. *Hum Mol Genet* 1994; 3:377-378.

SKINNER CA, RUMSBY G, HONOUR JW. Single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis for the detection of mutations in the CYP11B1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:2389-2393.

SKINNER CA, YOUSAF N, HONOUR JW, RUMSBY G. Characterization of polymorphisms at the 11 beta-hydroxylase (CYP11B1) locus. *Ann Hum Genet* 1998; 62(Pt 2): 181-183.

SPEISER PW, DUPONT B, RUBINSTEIN P, PIAZZA A, KASTELAN A, NEW MI. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985; 37:650-667.

SPEISER PW, DUPONT J, SHU D, SERRAT J, BUEGELEISEN M, TUSIE-LUNA MT, *et al.* Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 1992; 90:584-595.

SPLICE SITE PREDICTION BY NEURAL NETWORK HOMEPAGE. Disponível em: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html.

STALEY JP, GUTHRIE C. An RNA switch at the 5' splice site requires ATP and the DEAD box protein Prp28p. *Mol Cell* 1999; 3(1):55-64.

STAMM S, BEN-ARI S, RAFALSKA I, TANG Y, ZHANG Z, TOIBER D, *et al.* Function of alternative splicing. *Gene* 2005; 344:1-20.

STIKKELBROECK NM, HOEFSLOOT LH, DE WIJS IJ, OTTEN BJ, HERMUS AR, SISTERMANS EA. CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in The Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:3852-3859.

STENSTRÖM CM, JIN H, MAJOR LL, TATE WP, ISAKSSON LA. Codon bias at the 3'-side of the initiation codon is correlated with translation initiation efficiency in *Escherichia coli*. *Gene* 2001; 263:273-284.

STRACHAN T. Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Trends Endocrinol Metab* 1989; 1:68-72.

STRACHAN T. Molecular pathology of congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1990; 32:373-393.

STRACHAN T, WHITE PC. Molecular pathology of steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1991; 40:537-543.

TAJIMA T, FUJIEDA K, NAKAE J, TOYOURA T, SHIMOZAWA K, KUSUDA S, *et al.* Molecular basis of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency detected by neonatal mass screening in Japan. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2350-2356.

THE HUMAN CYTOCHROME P450 (CYP) ALLELE NOMENCLATURE COMMITTEE HOME PAGE. Disponível em: <http://www.cypalleles.ki.se/>.

THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:4673- 4680.

TUSIE-LUNA MT, TRAKTMAN P, WHITE PC. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *J Biol Chem* 1990; 265:20916-20922.

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

TUSIÉ-LUNA MT, RAMÍREZ-JIMÉNEZ S, ORDÓÑEZ-SÁNCHEZ ML, CABELLO-VILLEGAS J, ALTAMIRANO-BUSTAMANTE N, CALZADA-LEÓN R, *et al.* Low frequency of deletion alleles in patients with steroid 21-hydroxylase deficiency in a Mexican population. *Hum Genet* 1996; 98:376-379.

URABE K, KIMURA A, HARADA F, IWANAGA T, SASAZUKI T. Gene conversion in steroid 21-hydroxylase genes. *Am J Hum Genet* 1990; 46:1178-1186.

WEDELL A, RITZEN EM, HAGLUND-STENGLER B, LUTHMAN H. Steroid 21-hydroxylase deficiency: Three additional mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:7232-7236.

WEDELL A, THEILÉN A, RITZÉN EM, STENGLER B, LUTHAMAN H. Mutation spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:1145-1152.

WESTER MR, JOHNSON EF, MARQUES-SOARES C, DANSETTE PM, MANSUY D, STOUT CD. Structure of a substrate complex of mammalian cytochrome P450 2C5 at 2.3 Å resolution: evidence for multiple substrate binding modes. *Biochemistry* 2003; 42:6370-6379.

WERKMEISTER JW, NEW MI, DUPONT B, WHITE PC. Frequent deletion and duplication of the steroid 21-hydroxylase genes. *Am J Hum Genet* 1986; 39:461-469.

Referências Bibliográficas

WHITE PC, GROSSBERGER D, ONUFER BJ, CHAPLIN DD, NEW MI, DUPONT B, *et al.* Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth complement in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:1089-1093.

WHITE PC, NEW MI, DUPONT B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:5111-5115.

WHITE PC, CRAWFORD C, NEW MI. Steroid 21-hydroxylase deficiency. *Current Opinion in Pediatrics* 1989; 1:436-440.

WHITE PC, DUPONT B, NEW MI, LEIBERMAN E, HOCHBERG Z, RÖSLER A. A mutation in CYP11B1 (Arg-448 \Rightarrow His) associated with steroid 11 β -hydroxylase deficiency in Jews of Moroccan origin. *J Clin Invest* 1991; 87:1664-1667.

WHITE PC, NEW MI. Genetic basis of endocrine disease. 2. Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:6-11.

WHITE PC. Genetic Diseases of steroid metabolism. *Vitam Horm* 1994; 49:131-159.

WHITE PC, CURNOW KM, PASCOE L. Disorders of steroid 11 beta-hydroxylase isozymes. *Endocr Rev* 1994; 15:421-438.

WHITE PC, SLUTSKER L. Haplotype analysis of CYP11B2. *Endocr Res* 1995; 21:437-442.

WHITE PC, SPEISER PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000; 21:245-291.

WILLIAMS PA, COSME J, SRIDHAR V, JOHNSON EF, MCREE DE. Microsomal cytochrome P450 2C5: comparison to microbial P450s and unique features. *J Inorg Biochem* 2000; 81:183-190.

WILSON RC, WEI JQ, CHENG KC, MERCADO AB, NEW MI. Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the 21-hydroxylase gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1995a; 80:1635-1640.

WILSON RC, MERCADO A, CHENG K, NEW M. Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 1995b; 80:2322-2329.

WILSON RC, NIMKARN S, DUMIC M, OBEID J, AZAR MR, NAJMABADI H, *et al.* Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 2007; 90:414-421.

WON GS, CHIU CY, TSO YC, JENQ SF, CHENG PS, JAP TS. A compound heterozygous mutation in the CYP17 (17 α -hydroxylase/17,20-lyase) gene in a Chinese subject with congenital adrenal hyperplasia. *Metabolism* 2007; 56:504-507.

WU DA, CHUNG BC. Mutations of P450c12 (steroid 21-hydroxylase) at Cys428, Val281, and Ser268 result in complete, partial, or no loss of enzymatic activity, respectively. *J Clin Invest* 1991; 88:519-523.

WU DA, HU MC, CHUNG BC. Expression and functional study of wild-type and mutant human cytochrome P450c21 in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell Biol* 1991; 10:201–209.

XING Y, LEE C. Evidence of functional selection pressure for alternative splicing events that accelerate evolution of protein subsequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:13526-13531.

YANG MH, WU XB, LI T, WANG MY. Phenotype-genotype correlation in eight Chinese 17 α -hydroxylase/17,20 lyase-deficiency patients with five novel mutations of CYP17A1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:3619-3625.

ZACHMANN M, TASSINARI D, PRADER A. Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. A study of 25 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 56:222–229.

ZENG X, WITCHEL SF, DOBROWOLSKI SF, MOULDER PV, JARVIK JW, TELMER CA. Detection and assignment of CYP21 mutations using peptide mass signature genotyping. *Mol Genet Metab* 2004; 82:38-47.

ZHOU Z, LICKLIDER LJ, GYGI SP, REED R. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 2002; 419:182-185.

ANEXO 1

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de doutorado intitulada Mutações Novas nos Genes *CYP21A2* e *CYP11B1* e suas Alterações na Atividade Enzimática:

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

(x) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo n° ^{10/2003} ~~008698~~), intitulado Mutações Novas em Genes Esteroidogênicos e suas Alterações na Atividade Enzimática.

() tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo n° _____).

(x) tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (Protocolo n° 683/2005).


Aluna: Fernanda Caroline Soardi


Orientadora: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido



Nome: Manoel Henrique
Função: Coordenador CIBio

ANEXO 2

Inhibition of CYP21A2 Enzyme Activity Caused by Novel Missense Mutations Identified in Brazilian and Scandinavian Patients

F. C. Sordi, M. Barbaro, I. F. Lau, S. H. V. Lemos-Marini, M. T. M. Baptista, G. Guerra-Junior, A. Wedell, S. Lajic, and M. P. de Mello

Laboratório de Genética Molecular Humana (F.C.S., I.F.L., M.P.d.M.), Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Departamento de Pediatria/Centro de Investigação em Pediatria (S.H.V.L.-M., G.G.-J.), and Departamento de Clínica Médica (M.T.M.B.), Disciplina de Endocrinologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 13083-875 Campinas SP, Brasil; and Department of Molecular Medicine and Surgery (M.B., A.W., S.L.), Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital, SE-171 76 Stockholm, Sweden

Background: Most patients with 21-hydroxylase deficiency carry *CYP21A1P*-derived mutations, but an increasing number of novel and rare mutations have been reported in disease-causing alleles.

Objective: Functional effects of three novel (p.G56R, p.L107R, p.L142P) and one recurrent (p.R408C) *CYP21A2* mutations were investigated. The degree of enzyme impairment caused by p.H62L alone or combined to p.P453S was also analyzed.

Design: The study included 10 Brazilian and two Scandinavian patients. To determine the deleterious role of each mutant protein, *in vitro* assays were performed in transiently transfected COS-1 cells. For a correct genotype-phenotype correlation, the enzymatic activities were evaluated toward the two natural substrates, 17-hydroxyprogesterone and progesterone.

Results: Low levels of residual activities obtained for p.G56R, p.L107R, p.L142P, and p.R408C mutants classified them as classical congenital adrenal hyperplasia mutations, whereas the p.H62L showed an activity within the range of nonclassical mutations. Apparent kinetic constants for p.H62L confirmed the nonclassical classification as the substrate binding capacity was within the same magnitude for mutant and normal enzymes. A synergistic effect was observed for the allele bearing the p.H62L+p.P453S combination because it caused a significant reduction in the enzymatic activity.

Conclusions: We describe the functional analysis of five rare missense mutations identified in Brazilian and Scandinavian patients. The p.G56R, p.L107R, and p.L142P are reported for the first time. Most probably these novel mutations are closer to null than the p.I172N, but for the p.G56R, that might not be the case, and the p.H62L is definitely a nonclassical mutation. (*J Clin Endocrinol Metab* 93: 2416–2420, 2008)

More than 90% of cases of congenital adrenal hyperplasia (CAH) are due to 21-hydroxylase deficiency (21OHD), which results from mutations in the 21-hydroxylase gene (*CYP21A2*) (1). The disorder may be classified into clinical forms that vary from a mild/late-onset nonclassical (NC) to a severe/early-onset classical form that can manifest with or without salt wasting (SW or SV), depending on whether the enzymatic deficit affects both the glucocorticoid and mineralocorticoid

pathways or whether the latter is preserved. Additionally, due to androgen overproduction, females are born with virilized external genitalia and males develop precocious puberty (1, 2).

The *CYP21A2* gene maps to the short arm of chromosome 6 (6p21.3) (3). *CYP21A2* and the *CYP21A1P*, a nonfunctional pseudogene, are genomically organized in tandem to the 3'-end of *C4B* and *C4A*, respectively (4). The majority of disease-causing mutations in *CYP21A2* alleles are *CYP21A1P*-derived sequences trans-

0021-972X/08/\$15.00/0

Printed in U.S.A.

Copyright © 2008 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2007-2594 Received November 25, 2007. Accepted March 26, 2008.

First Published Online April 1, 2008

Abbreviations: CAH, Congenital adrenal hyperplasia; NC, nonclassical; 21OHD, 21-hydroxylase deficiency; 17OHP, 17-hydroxyprogesterone; SV, simple virilizing; SW, salt wasting.

ferred to the active gene by deletions or macro- or microconversions (5). In addition, an increasing number of novel and rare mutations have been reported (www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp21.htm).

In general, there is a good genotype-phenotype correlation. Furthermore, there is also a good correlation between *in vitro* studies with mutated enzymes and *in vivo* disease severity. Therefore, *in vitro* analysis is proposed as a good complement to evaluate the residual enzymatic activity caused by novel mutations to establish a genotype-phenotype correlation and enable improved genetic counseling (6, 7).

In this report, we describe the functional analyses of three novel (p.G56R, p.L107R, p.L142P) and one recurrent (p.R408C) mutation (8) identified in Brazilian patients. The rare p.H62L was also analyzed because it was found in alleles bearing two different combinations, p.P34L+p.H62L as part of a chimeric gene in an allele carrying a 30-kb deletion in a Brazilian patient and p.H62L+p.P453S found in two Scandinavian patients.

Patients and Methods

Patients

This study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Campinas (São Paulo, Brazil), and an informed consent was obtained from patients and relatives.

Clinical and molecular data of the 12 patients are summarized in Table 1.

Mutation analysis

Genomic DNA was obtained from peripheral blood by phenol/chloroform extraction (9). *CYP21A2* was specifically amplified in two or three fragments, depending on the presence or absence of the intron 2 variant IVS2–13C (10). Each fragment was sequenced using internal primers as described previously (10). For nonpseudogene-derived mutations, restriction enzyme digestion or allele-specific oligonucleotide PCR was used to follow the segregation in the family and analyze 50 nonrelated normal individuals. Nucleotide and amino acid numbering followed the published sequence (11) (National Center for Biotechnology Information, no. M12792, Bethesda, MD).

Construction of plasmids and mutagenesis

The constructions of pALTER-CYP21 plasmids for site-directed mutagenesis and pCMV4-CYP21 plasmids for expression analyses have been described previously (12, 13). Mutations were introduced into the pALTER-CYP21 with the Stratagene QuickChange site-directed mutagenesis kit (AH Diagnostics, Stockholm, Sweden) following the manufacturer's instructions except that XL1-Blue MRF1' Kan supercompetent cells (Stratagene, Stockholm, Sweden) were used.

Expression of CYP21A2 and enzyme activity assays

After sequencing each cloned *CYP21A2* cDNA carrying the mutations, *in vitro* expression experiments were performed. Transfections in

TABLE 1. Clinical and molecular data of CAH patients

| Case | Sex | Age at diagnosis (months) | Clinical data | Basal 17OHP (nmol/liter) | Na ⁺ /K ⁺ (mmol/liter) | Phenotype | Genotype (paternal allele/maternal allele) | Nationality |
|----------------|-----|---------------------------|---|--------------------------|--|-----------|--|-------------|
| 1 | F | 17 | Preterm (GW 36) and small for gestational age (weight z-score –3.1 and height z-score –4.2); clitoromegaly and partial fusion of the labioscrotal folds at birth; Prader II | >6ndm ^a | 143/4.7 | SV | p.G56R/IVS2–13A/C>G | Brazilian |
| 2 ^b | F | 3 | Ambiguous genitalia at birth; Prader III | >6 ndm | nt | SV | p.L107R/p.I172N | Brazilian |
| 3 ^b | M | 37 | Precocious puberty | >6 ndm | nt | SV | p.L107R/p.I172N | Brazilian |
| 4 | F | 0.8 | Failure to thrive (weight z-score –0.92); clitoromegaly at birth; Prader HF | >6 ndm | 126/5.5 | SW | p.L142P/IVS2–13A/C>G | Brazilian |
| 5 ^d | F | 0.9 | Ambiguous genitalia at birth; Prader III | 49 | 135/7.2 | SW | p.R408C/IVS2–13A/C>G | Brazilian |
| 6 ^d | F | 1 | Ambiguous genitalia at birth; Prader IV | >6 ndm | 127/7.1 | SW | p.R408C/IVS2–13A/C>G | Brazilian |
| 7 ^d | M | 0.5 | Failure to thrive | >6 ndm | 130/6.6 | SW | p.R408C/IVS2–13A/C>G | Brazilian |
| 8 | F | 2 | High basal level of 17OHP in the neonatal screening program; ambiguous genitalia at birth; Prader V | 50 | nt | SV | p.R408C/p.I172N | Brazilian |
| 9 | F | 0.27 | Ambiguous genitalia prenatally diagnosed on a routine ultrasound with 16 GW; Prader IV | 35 | 127/7.1 | SW | p.R408C/p.R356W | Brazilian |
| 10 | F | 0.5 | Ambiguous genitalia; Prader IV | >6 ndm | 119/5.3 | SW | c.920_921insT/p.P34L+p.H62L+IVS2–13A/C>G+c.329_336delGAGACTAC ^e | Brazilian |
| 11 | F | 72 | Pseudoprecocious puberty; advanced bone age | nt | nt | SV | p.H62L+p.P453S/IVS2–13A/C>G ^f | Norwegian |
| 12 | M | 132 | Precocious puberty with 4 yr; accentuated pubertal development at the age of 10 yr resulted in short stature (160 cm) | 151 ^g | nt | SV | p.H62L+p.P453S/c.920_921insT+p.Q318X ^h | Swedish |

^a Reference value for ndm is 5.97 nmol/liter.

^b Siblings.

^c For follow-up, malnourishment was discarded; treatment with hydrocortisone and fludrocortisone (0.05 mg/d) was introduced after the first 24 d of life; at the age of 5 months, she presented with hyponatremia and hyperkalemia; therefore, the fludrocortisone dosage was raised to 0.1 mg/d, resulting in electrolyte equilibrium (Na⁺ = 134 mmol/liter and K⁺ = 4.8 mmol/liter); at the age of 11 yr, due to bad compliance to the treatment, the steroid 17OHP levels raised to 78 nmol/liter in combination with elevated levels androstenedione (4 mg/ml) and high plasma renin activity [17.4 μg/liter-h (normal values between 0.15 and 2.33 μg/liter-h; radioimmunoassay, Incstar, Stillwater, MN; solid phase)].

^d Siblings.

^e Mutations within a chimeric gene in a 30-kb deleted allele.

^f Parental DNA could not be obtained for segregation analysis, but all mutations were found in heterozygous form, and the most likely genotype is shown here.

^g Reference value is 1.6–7.6 nmol/liter.

F, Female; M, male; ndm, nondiluted measurements; nt, not transmitted; GW, gestational weeks.

COS-1 cells with wild-type and mutant CYP21A2 proteins and enzyme activity assays were conducted as described before (14) using 12- instead of 6-well plates.

Detailed description of the *in vitro* CYP21A2 expression assay has recently been covered (14). The experiments were repeated five times for each mutant CYP21A2 using ³H-labeled substrates, either 17-hydroxyprogesterone (17OHP) or progesterone (Amersham Biosciences, Sweden). After thin-layer chromatography, substrates and products were quantified by liquid scintillography. The cells were harvested by trypsination and the ratio of β-galactosidase activity to total protein content was measured to verify the transfection efficiency. Enzyme activities were expressed as a percentage of conversion, taking the apparent specific activity of the wild-type CYP21A2 as 100%.

To determine the apparent kinetic constants, transiently transfected COS-1 cells were incubated with six different steroid concentrations: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, and 7.0 μmol/liter. After incubation, steroids were extracted and analyzed as described above. The experiments were performed three times for each substrate.

Western blotting

Western blot analyses were performed using polyclonal antibodies raised in rabbit against human CYP21 as primary antibody and anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Scandinavian Diagnostic Services, Falkenberg, Sweden) as secondary antibody (14).

Results

The p.G56R mutation (c.166G>A) was identified in the paternal allele of a patient with SV-21OHD. She is compound heterozygous with the IVS2–13A/C>G mutation (Table 1). The novel mutation p.G56R almost abolished the enzyme activity toward 17OHP but retained 1.4% of the activity with progesterone as substrate (Fig. 1A). The p.G56R was not found in other disease-

related (n = 135) or nondisease-related alleles (n = 85), including nonrelated controls and normal alleles in the obligatory heterozygous carriers.

The p.L107R mutation (c.320T>G) was identified in the maternal allele in two siblings. Both the girl and her brother have the SV-21OHD and carry the p.I172N mutation on the other allele (Table 1). The p.L142P (c.425T>C) was detected in the maternal allele of a SW patient who also carries the p.I172N on the other allele (Table 1). Both the p.L107R and the p.L142P reduced the enzyme activity to the level of SW mutations (Fig. 1A). Neither p.L107R nor p.L142P was found in other disease-related (n = 72) or nondisease-related alleles tested (n = 76).

The p.R408C mutation (c.1222C>T) was identified in five Brazilian patients from three nonrelated families (Table 1). The *in vitro* assay resulted in an almost abolished enzyme activity toward progesterone (Fig. 1A).

The p.H62L (c.185A>T) was associated with other mutations in both Brazilian and Scandinavian patients. The maternally inherited allele in the Brazilian patient (Table 1) harbors a chimeric gene present in a 30-kb deletion allele. This gene carries p.P34L (c.101C>T) and p.H62L mutations, in addition to the pseudogene-derived IVS2–13A/C>G and c.329_336delGAGACTAC. The p.P34L and p.H62L were always associated with chimeric genes in 30-kb deleted alleles in Brazilian patients. Such alleles (~20% of deleted alleles; FB Coeli, Lemos-Marini SHV, Araújo M, Paulino LC, Lau IF, Bernardi RD, Petroli RJ, Soardi FC, Guerra-Junior G, and De Mello MP, unpublished data) do not bear the p.P30L mutation, which is usually present in chimeric genes. In the Scandinavian patients (Table 1), p.H62L is associated with the nonclassical p.P453S mutation (12). The p.H62L reduced the enzyme activity to 44 and 21% for 17OHP and progesterone,

respectively (Fig. 1A). Kinetic parameters were investigated for this mutation. Data indicate a reduction in the maximum velocity when compared with wild type (*t* test, *P* < 0.05), whereas the Michaelis-Menten constant values were in the same range of magnitude for both substrates (Fig. 1B). For comparison purposes, p.P453S activity was evaluated under the same experimental conditions as for the p.H62L. Individually, both mutations have similar effects on enzyme activity (Fig. 1A). However, when the p.H62L mutation was expressed in combination with the p.P453S mutation, the activity of the enzyme was reduced to 4.1 and 2.3% toward 17OHP and progesterone, respectively, indicating a synergistic effect.

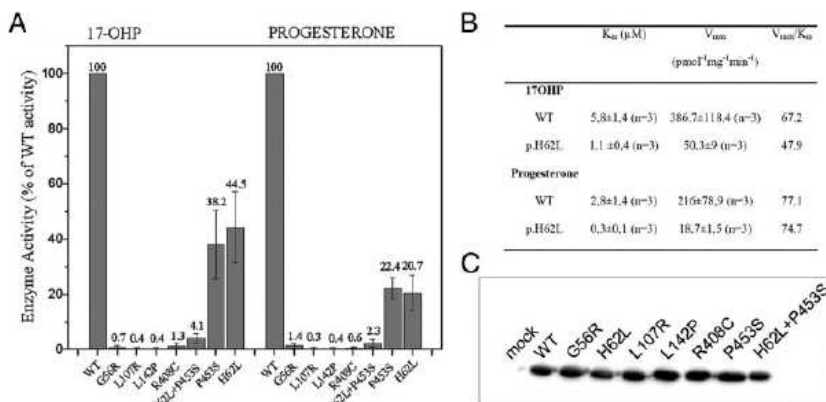


FIG. 1. A, Enzymatic activities of normal and mutant P450c21 expressed intact COS-1 cells. The activities of the mutant enzymes are represented as percentage of the wild-type (WT) activity, which is arbitrarily defined as 100%. The values shown in the figure are for the conversion of 17OHP to 11-deoxycortisol and for the conversion of progesterone to 11-deoxycorticosterone at a substrate concentration of 2 μM. The bars represent the mean ± 1 sd of five independent experiments. B, Apparent kinetic constants for the wild-type (P450c21) and the p.H62L mutant proteins; values are shown as the mean ± 1 sd for three (n = 3) independent experiments. C, Western blot of CYP21A2 proteins expressed in COS-1 cells. The proteins were collected directly from the culture plate wells after treating the cells with lysis buffer followed by protein separation in SDS-PAGE. Normal and mutant CYP21A2 proteins were revealed in immunoblottings by using CYP21 rabbit polyclonal antibodies. V_{max} , Maximum velocity; K_m , Michaelis-Menten constant.

Western blotting (Fig. 1C) confirmed expression of comparable amounts of wild-type and all mutant CYP21A2 proteins.

Discussion

Transient expression of the p.G56R, p.L107R, p.L142P, and p.R408C mutants in COS-1 showed CYP21A2 enzymatic activity values within the range of classical CAH mutations. The result of enzyme activity obtained for p.G56R indicates that it might be a SV-related mutation, whereas p.I172N, usually associated with a SV phenotype, was not used as an internal control. This mutation should be included in the future functional *in vitro* studies of new CYP21A2 mutants. Evidences for the important role of p.G56 residue are its highly conserved position among mammalian CYP21 proteins and its location between two membrane contact regions. The p.G56R changes a neutral residue to a basic hydrophilic in the surface region; this probably disturbs membrane interactions (15).

The p.L142P demonstrated a reduction in the enzyme activity to the level of SW mutations. The importance of p.L142 residue for the enzyme activity is highlighted by its conserved position located within D-helix of the human CYP21A2 (15). The substitution for a proline might lead to an altered structure causing function impairment as proline is known to potentially break α -helix structures (16). Considering the genotype, case 4, who carries p.L142P, would be expected to have SV-21OHD because she is compound heterozygous with p.I172N. However, the biochemical findings at diagnosis indicated the severe form of the disease (Table 1). Furthermore, her clinical and laboratorial follow-up confirmed the SW-21OHD. The p.I172N mutation is reported to present high variability in genotype-phenotype correlations (17). Although this mutation was not analyzed in this study, its variable expression and/or the patient's genetic background may explain the case 4 phenotype.

The p.L107R demonstrated to be a SW mutation. The p.L107 corresponding amino acid in other mammalian CYP21A2 is either a leucine or an isoleucine dictating the conservation of a hydrophobic residue. This position is within an important region for substrate access and product release (18). The substitution for a charged residue (R) is likely to disrupt the enzyme function, as confirmed by the nearly null activity observed in the functional studies (Fig. 1A).

The p.R408C is a rare nonpseudogene-derived mutation described before in Brazilians (9) and was associated with SW-21OHD. The identification of additional patients with this mutation indicates that it is diffusing in this population; therefore, it should be considered in CYP21A2 screening programs. Enzyme activity data described here establish a good genotype-phenotype correlation as cases 5–7 and 9 that are compound heterozygous with null mutations and have a SW phenotype. The p.R408 is the third residue in the ERR-triad (E351/R354/R408), which acts in the meander as an important stabilizer of the three-dimensional structure that allow covalent binding of the heme group (16).

In two Scandinavian patients, p.H62L mutation was identified in association with p.P453S. Both patients also presented a phenotype that was clearly much more severe than the NC-21OHD normally associated with p.P453S. In functional assays the p.H62L mutant protein showed an activity compatible with a NC mutation. Determination of apparent kinetic constants revealed that the substrate binding capacity was within the same magnitude for mutant and normal enzyme (Fig. 1B). *In vitro* activity data revealed a synergistic effect of p.H62L+p.P453, which may explain the mild SV phenotype of the Scandinavian patients. Similar results on these mutations were published during revision of this paper (20).

In summary, we describe five rare, including three novel CYP21A2 mutations causing 21OHD. The novel mutations presented activities closer to null than the p.I172N, except p.G56R that might be SV related. The p.H62L is definitely a NC mutation, but the combination with p.P453S brings the allele closer to mild SV characteristics. Interestingly, all three novel mutations were associated with the IVS2–13C variant, which can be dropped out on CYP21A2 gene PCR selection. We have described before the novel c.82_83insC mutation (10) also present in such alleles. Therefore, the data presented here highlight once again the importance of considering this effect when analyzing IVS2–13A/C or IVS2–13C/G heterozygous individuals. Furthermore, this paper reinforces that biochemical studies on new mutations are important tools to be used when establishing a correct genotype-phenotype correlation, thus improving the clinical management of patients as well as the genetic counseling for the affected families (7, 8, 16).

Acknowledgments

We thank Maria Madalena Vasconcelos Rosa and Ann-Christin Thelander for technical support; Myriano Henriques de Oliveira Junior for assisting with final art; and Marina de Melo Higdon for reading the manuscript.

Address all correspondence and requests for reprints to: Maricilda Palandí de Mello, Ph.D., Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas CBMEG-UNICAMP, Caixa Postal 6010, 13083-875 Campinas, SP, Brasil. E-mail: mmello@unicamp.br.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Grant 05/00981-5 and PhD Grant 03/01785-0 (to F.C.S.); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Grant 1919-5; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brazil); Karolinska Institutet; Sällskapet Barnavård; Stiftelsen Frimurare Barnhuset; Söderberg Foundation (Centrum för Molekylär Medicin); the Swedish Research Council (Grant 12198); the Novo Nordisk Foundation; The Centre of Gender Related Medicine; Karolinska Institutet; and the Stockholm County Council.

Disclosure statement: All authors have nothing to disclose.

References

1. New MI 2003 Inborn errors of adrenal steroidogenesis. *Mol Cel Endocrinol* 211:75–83
2. Lajic S, Clauin S, Vexiau P, Blanche H, Bellanne-Chantelot C, Wedell 2002 A Novel mutations in CYP21 detected in individuals with hyperandrogenism.

- White PC, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin DD, New MI, Dupont B, Strominger JL 1985 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
- Yang Z, Mendoza AR, Welch TR, Zipf WB, Yu CY 1999 Modular variations of the human major histocompatibility complex class III genes for serine/threonine kinase RP, complement component C4, steroid 21-hydroxylase CYP21, and tenascin TNX (the RCCX module). A mechanism for gene deletions and disease associations. *J Biol Chem* 274:12147–12156
- White PC, Speiser PW 2000 Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 21:245–291
- Krone N, Riepe FG, Partsch CJ, Vorhoff W, Bramswig J, Sippell WG 2006 Three novel point mutations of the CYP21 gene detected in classical forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 114:111–117
- Barbaro M, Baldazzi L, Balsamo A, Lajic S, Robins T, Barp L, Pirazzoli, Cacciari E, Cicognani A, Wedell A 2006 Functional studies of two novel and two rare mutations in the 21-hydroxylase gene. *J Mol Med* 84:521–528
- Billerbeck AE, Mendonca BB, Pinto EM, Madureira G, Arnhold IJ, Bachega TA 2002 Three novel mutations in CYP21 gene in Brazilian patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency due to a founder effect. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4314–4317
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TE 1989 *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor
- Lau IF, Soardi FC, Lemos-Marini SH, Guerra Jr G, Baptista MT, De Mello MP 2001 H28+C insertion in the CYP21 gene: a novel frameshift mutation in Brazilian patient with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5877–5880
- Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y 1986 Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2841–2845
- Nikoshkov A, Lajic S, Holst M, Wedell A, Luthman H 1997 Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 82:194–199
- Lajic S, Levo A, Nikoshkov A, Lundberg Y, Partanen J, Wedell A 1997 A cluster of missense mutations at Arg356 of human steroid 21-hydroxylase may impair redox partner interaction. *Hum Genet* 99:704–709
- Robins T, Barbaro M, Lajic S, Wedell A 2005 Not all amino acid substitutions of the common cluster E6 mutation in CYP21 cause congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2148–2153
- Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, McRee DE 2000 Microsomal cytochrome P450 2C5: comparison to microbial P450s and unique features. *J Inorg Biochem* 81:183–190
- Robins T, Carlsson J, Sunnerhagen M, Wedell A, Persson B 2006 Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia. *Mol Endocrinol* 20:2946–2964
- Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP 2000 Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1059–1065
- Wester MR, Johnson EF, Marques-Soares C, Dansette PM, Mansuy D, Stout CD 2003 Structure of a substrate complex of mammalian cytochrome P450 2C5 at 2.3 Å resolution: evidence for multiple substrate binding modes. *Biochemistry* 42:6370–6379
- Pinto G, Tardy V, Trivin C, Thalassinos C, Lortat-Jacob S, Nihoul-Fekete C, Morel Y, Brauner R 2003 Follow-up of 68 children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: relevance of genotype for management. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2624–2633
- Menassa R, Tardy V, Despert F, Bouvattier-Morel C, Brossier JP, Cartigny M, Morel Y 2008 p.H62L, a rare mutation of the CYP21 gene identified in two forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1901–1908