

VITOR GUILHERME BRITO DE ARAÚJO

ESTUDO DOS GENES CYP21A2 E HSD3B2 EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE
HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA RESIDENTES DO DISTRITO FEDERAL

BRASÍLIA

2013

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

VITOR GUILHERME BRITO DE ARAÚJO

ESTUDO DOS GENES CYP21A2 E HSD3B2 EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE
HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA RESIDENTES DO DISTRITO FEDERAL

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Lofrano Alves Porto

Co-orientadora: Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

BRASÍLIA

2013

Dedico este trabalho àqueles que usufruirão do conhecimento alcançado e a todos que acreditaram e apoiaram esta obra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço Àquele que me criou e redimiu, e me dá forças para que eu siga incessantemente meus objetivos, trilhando o caminho em busca da excelência humana.

Agradeço especialmente à minha mãe, Ana Maria, fonte de ternura e segurança, por desempenhar um papel fundamental em todas as minhas conquistas, desde a primeira divisão celular até meu futuro último suspiro, ainda que ela não saiba disso.

À minha namorada, Luana, pela paciência, apoio e compreensão com as faltas inerentes às grandes vitórias. Obrigado por construir sua história junto a minha, multiplicando minhas alegrias.

À minha família, especialmente Josenilson, Gabriela e Juliana, Breno e Roberto, pelo apoio e compreensão com a ausência frequente.

À minha orientadora, Adriana Lofrano, talentosa e motivadora. Obrigado pelo conhecimento e por acreditar que tudo daria certo, mesmo diante de tantas, tantas adversidades.

Aos meus amigos, que torceram e rezaram, e compreenderam os momentos que não pude estar presente para viver com eles momentos inesquecíveis.

Ao meu tio, Jaime, por me ensinar a sonhar alto.

A todo o grupo de pesquisa, especialmente a Olivia Laquis, pelas inúmeras vezes em que fui ajudado e assim pude concluir esse trabalho.

À Universidade de Brasília, pela formação que me proporcionou desde o segundo semestre de 2005.

À minha co-orientadora, Juliana Mazzeu, pelo direcionamento acadêmico e conhecimento proporcionado.

À Renata Santarem, pelo auxílio e pela parceria durante o projeto.

Ao meu orientador da iniciação científica, Eduardo Melo, pelo profundo conhecimento adquirido que me capacitou para a pós-graduação e para a vida profissional.

Ao Programa de Triagem Neonatal e ao Núcleo de Genética do Hospital de Apoio de Brasília, em especial à Ana Beatriz Melo pela disposição em ajudar sempre que preciso, ao Marcone Viegas pela compreensão com as adversidades provenientes da pós-graduação e às médicas Kallianna Gameleira e Karine Santiele pelo apoio.

Ao Laboratório de Pediatria, especialmente ao Dr. Riccardo Pratesi, pelo apoio técnico e financeiro.

Finalmente, a todos que se envolveram e se preocuparam, muito obrigado.

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADRO

Figura 1. Esteroidogênese adrenal normal.

Figura 2. Módulo RCCX bimodular. Gene *CYP21A2* e pseudogene *CYP21A1P* posicionados em *tandem* com os genes *RP*, *C4* e *TNX*.

Figura 3. Correlação genótipo-fenótipo na HAC pela deficiência da 21-hidroxilase baseado na atividade do *CYP21A2 in vitro*.

Figura 4. Gene *CYP21A2* com suas mutações mais frequentes, provenientes do pseudogene.

Figura 5. Representação esquemática de um *crossing-over* desigual e dos nove tipos de quimeras já descritas.

Figura 6. Parâmetros para o diagnóstico da deficiência da 21-OH após a infância.

Figura 7. Mutações encontradas nesta pesquisa.

Figura 8. Imagens geradas a partir do *software* PolyPhen-2.

Figura 9. Eletroferograma parcial do éxon 4 do gene *HSD3B2*.

Tabela 1. Condições da PCR dos fragmentos F1 e F2.

Tabela 2. *Primers* utilizados para realizar a *Nested-PCR*.

Tabela 3. Condições da PCR dos fragmentos F1seq, F2Aseq e F2Bseq.

Tabela 4. *Primers* utilizados para o sequenciamento.

Tabela 5. Condições da PCR para os fragmentos do gene *HSD3B2*.

Tabela 6. *Primers* utilizados para o sequenciamento do gene *HSD3B2*.

Tabela 7. Distribuição das mutações encontradas no gene *CYP21A2*.

Tabela 8. Genótipos identificados em 29 indivíduos portadores de hiperplasia adrenal congênita por deficiência de 21-hidroxilase residentes no DF.

Tabela 9. Comparação entre a frequência das mutações entre trabalhos brasileiros de diferentes regiões.

Quadro1. Considerações adicionais aos resultados.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

HAC – Hiperplasia adrenal congênita

21-OH – 21-hidroxilase

21-OHD – Deficiência da 21-hidroxilase

17OHP – 17-hidroxiprogesterona

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

PS – Forma perdedora de sal

VS – Forma virilizante simples

NC – Forma não-clássica

Δ^5 17OHP – 17-hidroxipregnelona

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PCR-AE – PCR alelo-específico

MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

DF – Distrito Federal

I2 Splice – Mutação IVS2-13C/A>G

E3 Δ 8pb – Deleção de oito pares de base no éxon 3

E6 *Cluster* – *Cluster* das mutações p.I236N, p.V237E e p.M239K no éxon 6

UnB – Universidade de Brasília

RESUMO

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) é o grupo hereditário de desordens na esteroidogênese adrenal causada por uma deficiência enzimática. O gene *CYP21A2* codifica a enzima 21-hidroxilase (21-OH) e mutações nesse gene podem provocar HAC. Localizado no em 6p21.3 ele integra o módulo RCCX formado pelos genes *RP*, *C4*, *CYP21* e *TNX*, que estão organizados em repetições em *tandem*, submetendo-o a eventos de recombinações gênicas não-alélicas o que resulta em região altamente polimórfica. *CYP21A2* e seu homólogo, o pseudogene *CYP21A1P*, são similares em 96% na região intrônica e de 98% na região exônica, o que promove a troca de fragmentos de DNA entre eles. HAC pela deficiência da 21-OH é autossômica recessiva e é classificada nas formas perdedora de sal (PS) e virilizante simples (VS), ambas com virilização pré-natal da genitália externa feminina. A deficiência de aldosterona caracteriza a forma perdedora de sal, que constitui 75% dos casos da forma clássica. A deficiência da 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (3 β HSD2) representa uma rara variante da HAC. Também é autossômica recessiva, codificada pelo gene *HSD3B2*, localizado em 1p13.1. Esta enzima afeta todas as três vias esteroidogênicas e o espectro fenotípico é amplo e varia desde perdedor de sal grave até a forma não-perdedora, com ou sem formação de genitália ambígua em neonatos 46,XY. Este trabalho tem por objetivo investigar e descrever a variabilidade genética numa série de indivíduos com o diagnóstico clínico da forma clássica de HAC pela deficiência da 21-OH ou pela deficiência da 3 β -HSD residentes no Distrito Federal (DF) e padronizar um método eficiente de diagnóstico molecular para HAC no DF. Foram selecionados 29 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de deficiência de 21-hidroxilase e 1 paciente com deficiência de 3 β -HSD, atendidos no Ambulatório de Endocrinologia de Gônadas e Adrenais e na

Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Universitário de Brasília. O DNA genômico foi extraído pelo método de *Salting-out* e a análise molecular foi realizada inicialmente pelo método de sequenciamento automático; nos indivíduos com deficiência de 21-OH, associou-se o Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification – MLPA. Foram descritas as mutações presentes nos 30 portadores de HAC. No *CYP21A2*, foram descritas 13 mutações de ponto e uma nova mutação *missense*, p.L12M. Adicionalmente, foram identificados oito alelos apresentando grandes deleções, quatro alelos com inserções e quatro com grandes conversões. A mutação mais frequente foi 12 Splice (IVS2-13A/C>G) ocorrendo em 34,5% dos indivíduos. Além disso, 72,4% dos indivíduos são heterozigotos compostos e a correlação genótipo-fenótipo foi observada em 64,2% dos indivíduos. No gene *HSD3B2* foi encontrada uma homozigose para p.P222Q. O caso descrito aqui corrobora a forte correlação entre o genótipo e o fenótipo associado à mutação p.P222Q. A investigação molecular do gene *CYP21A2* é interessante por ser altamente polimórfico. O estudo molecular do *HSD3B2* é importante pela raridade e necessidade de maior conhecimento sobre suas características genéticas. Por fim, descrevemos os defeitos genéticos responsáveis pela HAC nessa série de indivíduos e padronizamos o sequenciamento associado ao MLPA como um método eficaz para o diagnóstico molecular da HAC por deficiência da 21-hidroxilase.

Palavras-chave: Hiperplasia adrenal congênita; Deficiência da 21-OH; Deficiência da 3 β -HSD; *CYP21A2*; *HSD3B2*.

ABSTRACT

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is a group of inherited disorders of steroidogenesis caused by an enzyme deficiency. The CYP21A2 gene encodes the enzyme 21-hydroxylase (21-OH) and mutations in this gene can cause CAH. Located in the 6p21.3, it integrates the RCCX module, formed by the genes RP, C4, CYP21 and TNX, which are arranged in tandem repeats. This leads to a highly polymorphic region, in which events of non-allelic genetic recombination frequently occur. CYP21A2 and its counterpart, the pseudogene CYP21A1P, are similar at 96% in the intronic region and 98% in the exonic, which promotes the exchange of DNA fragments between them. Classic HAC caused by 21-OH deficiency is autosomal recessive and is classified as salt wasting (PS) and simple virilizing (SV) forms, both with prenatal virilization of female external genitalia. Aldosterone deficiency characterizes the salt-wasting form, which constitutes 75% of cases of classical form. 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (3 β HSD2) deficiency is a rare variant of CAH. It is also autosomal recessive, encoded by the HSD3B2 gene, located at 1p13.1. This disorder affects all three steroidogenic pathways, and the phenotypic spectrum is broad, ranging from severe salt-losing to a non-loser, with or without formation of ambiguous genitalia in newborns 46, XY. Our aims were to investigate and describe the genetic variability in a series of individuals from the Federal District, Brazil, with a clinical diagnosis of the classic form of CAH due to 21-OH deficiency or to 3 β -HSD deficiency, and to standardize an efficient method of molecular diagnosis of CAH. We selected 29 patients with clinical and laboratory diagnosis of 21-hydroxylase deficiency and one patient with deficiency of 3 β -HSD from the Gonadal and Adrenal Diseases Clinics and Pediatric Endocrinology Unit, at the University Hospital of Brasilia. Genomic DNA was extracted by the salting-out method and

molecular analysis was initially performed by automatic sequencing; in the subjects with 21-OH deficiency, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - MLPA was also performed. A significant variable profile of mutations were present in the 30 patients with CAH. In CYP21A2, 13 point mutations and a new missense mutation, p.L12M, were described. Additionally, we identified eight alleles presenting large deletions, four alleles with large insertions and four conversions. The most frequent mutation was I2 splice (IVS2-13A / C> G) occurring in 34.5% of the subjects. Furthermore, 72.4% of the individuals were compound heterozygotes. Genotype-phenotype correlations were observed in 64.2% of the cases. In the HSD3B2 gene, the homozygous p.P222Q mutation was found. The case described herein confirms the strong correlation between genotype and phenotype associated with this mutation. Molecular investigation of the highly polymorphic CYP21A2 gene is interesting and useful. Molecular analysis of the *HSD3B2* gene is important for the rarity of the disorder and the need for greater knowledge of their genetic characteristics. Finally, we described the genetic defects associated with the classic forms of CAH in these subjects, and standardized genetic sequencing associated with MLPA as an efficient method for the molecular diagnosis of CAH due to 21-hydroxylase deficiency.

Keywords: Congenital adrenal hyperplasia; 21-OH deficiency; 3 β -HSD deficiency; CYP21A2; HSD3B2.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 DEFICIÊNCIA DA 21-HIDROXILASE	12
1.1.1 Aspectos clínicos e fisiopatológicos	12
1.1.2 Aspectos genéticos	16
1.2 DEFICIÊNCIA DA 3β-HIDROXIESTEROIDE DESIDROGENASE TIPO 2	23
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVO	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 SUJEITOS DA PESQUISA	27
4.2 ANÁLISE MOLECULAR	30
4.2.1 Protocolo geral	30
4.2.2 Análise molecular do CYP21A2	30
4.2.2.1 Nested-PCR	31
4.2.2.2 PCR Alelo-específico	32
4.2.2.3 Sequenciamento automático de Sanger	32
4.2.2.4 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification	33
4.2.3 Análise molecular do HSD3B2	35
4.2.3.1 Sequenciamento automático de Sanger	35
5. RESULTADOS	36
5.1 CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS	41
6. DISCUSSÃO	46
6.1 CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO	49
6.2 “ARMADILHAS” NO DIAGNÓSTICO GENÉTICO DA DEFICIÊNCIA DA 21-HIDROXILASE: PAPEL DAS ABORDAGENS COMPLEMENTARES COM SEQUENCIAMENTO E MLPA	51
6.3 OUTROS ACHADOS RELEVANTES	55
6.4 RESULTADOS AINDA NÃO DESCRITOS (NOVOS ACHADOS)	59
6.5 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO DUVIDOSA OU INEXISTENTE	60
6.6 DEFICIÊNCIA DA 3β-HIDROXIESTEROIDE DESIDROGENASE TIPO 2	63
7. CONCLUSÃO	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APÊNDICE	74
ANEXO	95

1. INTRODUÇÃO

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) consiste em um grupo de distúrbios hereditários da esteroidogênese da adrenal, que resultam em deficiência de uma das cinco enzimas necessárias para a síntese normal do cortisol (1). O fenótipo clínico e bioquímico depende do defeito enzimático específico e da atividade residual da enzima. Os sintomas, nas diferentes formas clínicas, resultam de desvios nas vias de síntese de cortisol, aldosterona e/ou testosterona, com graus variados de deficiência desses hormônios e acúmulo de seus precursores. A deficiência da enzima 21-hidroxilase afeta apenas a esteroidogênese adrenal, enquanto a deficiência da 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 impacta também a síntese de esteroides gonadais (2).

Cada variante de HAC é caracterizada por um padrão hormonal distinto que reflete um bloqueio específico na via metabólica, porém todas as variantes estão associadas com a deficiência da produção de glicocorticóide. Formas clássicas de diferentes tipos de HAC manifestam-se por genitália ambígua em indivíduos com cariótipo 46,XX e 46,XY, a depender do defeito enzimático subjacente. (2).

1.1 DEFICIÊNCIA DA 21-HIDROXILASE

1.1.1 Aspectos clínicos e fisiopatológicos

A hiperplasia adrenal congênita decorrente da deficiência da enzima 21-hidroxilase (21-OHD) é uma doença monogênica autossômica recessiva que causa um erro inato no metabolismo dos esteroides. É responsável por cerca de 90-95%

de todos os casos de HAC (3). A incidência varia entre 1:10000 até 1:20000 nascimentos (4). Diferentes incidências da doença podem ser encontradas, de acordo com a etnia e a região analisada. As maiores frequências foram registradas em populações isoladas, com incidência de 1:282 em esquimós (Yupik, Alasca), e 1:2100 nascidos vivos na Ilha francesa de *La Reunion*, no Oceano Índico. As menores incidências foram encontradas na população japonesa, 1 em 21000 e em Taiwan, 1 em 28000 (2).

O principal componente fisiopatológico consiste na diminuição ou ausência da atividade da enzima 21-hidroxilase (21-OH), a qual leva à redução ou eliminação da síntese do cortisol e da aldosterona, e à conseqüente bioacumulação de seus precursores. Dessa maneira, ocorre o desvio da esteroidogênese, com aumento da produção de compostos androgênicos precursores do cortisol e da aldosterona, os quais são substratos para as vias de biossíntese de andrógenos. Isto ocorre porque no córtex da adrenal, a enzima 21-OH normalmente converte 17-hidroxiprogesterona (17OHP) em 11-deoxicortisol e progesterona em 11-deoxicorticosterona. Esses esteroides são convertidos em cortisol e aldosterona, respectivamente. A deficiência na síntese desses hormônios resulta em um aumento na produção e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula hipofisária e à subsequente hiperprodução dos hormônios andrógenos (3). Abaixo, segue a figura 1, modificada de Speiser, 2010⁴, que mostra a via metabólica da esteroidogênese.

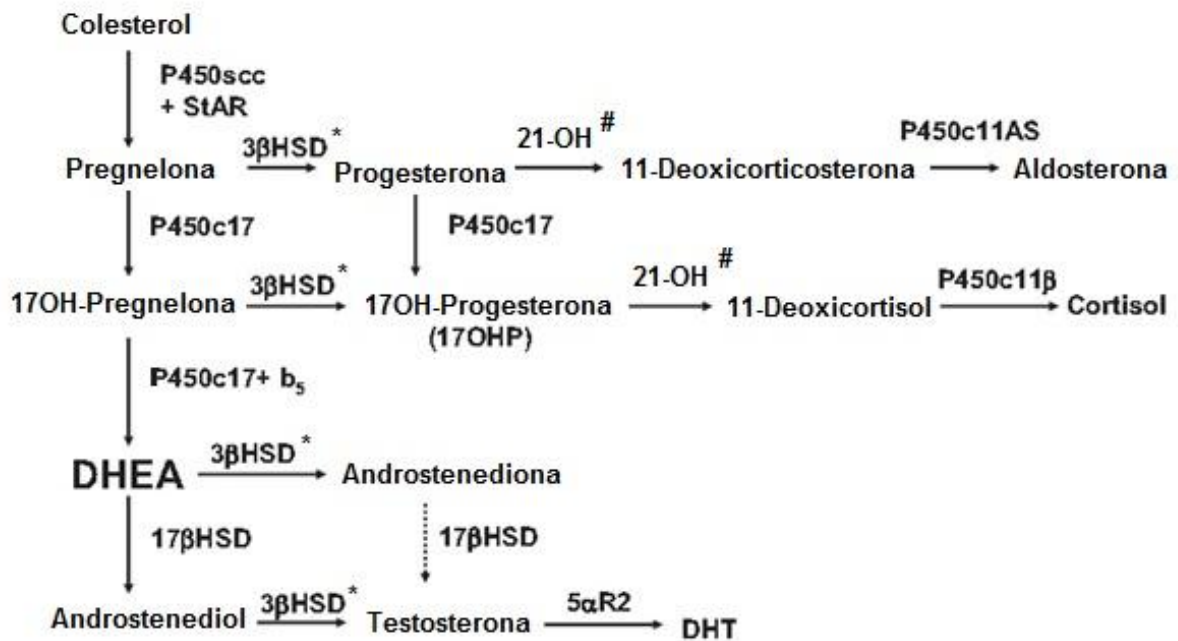


Figura 1: Esteroidogênese adrenal normal. Em destaque as enzimas (#) 21-hidroxiase (21-OH) e a enzima (*) 3β-hidroxiesteroide desidrogenase (3β-HSD). Adaptado de Speiser⁴, 2010.

O córtex adrenal é formado na quarta semana de gestação a partir do mesoderma epitelial celômico. Em torno da sexta ou sétima semana, o córtex adrenal funcional começa a secretar esteroides. O momento crítico para a diferenciação sexual da genitália externa ocorre entre 7 a 12 semanas de gestação. Durante esse período, a exposição excessiva do feto feminino 46,XX aos andrógenos adrenais ocasiona a virilização da genitália externa (5). Assim, após o nascimento, tanto meninos quanto meninas que apresentam comprometimento significativo da atividade da enzima 21-hidroxiase evoluem com quadro de virilização, que pode incluir progressivo aumento do pênis ou clitóris, crescimento precoce de pêlos pubianos, hirsutismo, acne, desenvolvimento avançado das epífises e pseudopuberdade precoce. Além disso, pode ocorrer a redução da fertilidade e anormalidades menstruais em mulheres não tratadas (1).

Sendo assim, o espectro de manifestações clínicas na HAC por deficiência de 21-hidroxilase inclui duas formas clínicas bem definidas: a forma clássica, mais grave, cujos sinais podem ser identificados ao nascimento ou infância, e a forma não-clássica, de aparecimento mais tardio, com sintomas mais leves ou completamente assintomática. A forma clássica, por sua vez, é subdividida em duas formas de acordo com o fenótipo: a forma perdedora de sal (PS) e a virilizante simples (VS). Em ambas, ocorre virilização pré-natal da genitália externa feminina e virilização pós-natal nos dois gêneros. A deficiência de aldosterona é o que caracteriza a forma perdedora de sal. Na forma não-clássica (NC), mais amena, os pacientes permanecem assintomáticos por tempo variável, e não apresentam genitália ambígua ao nascimento ou perda de sal. Ocasionalmente, podem desenvolver sintomas durante os anos pré-puberis, na adolescência ou apenas na vida adulta (3).

Nas formas clássicas, a virilização da genitália feminina nos neonatos é preponderante e pode ser classificada usando-se a escala dos cinco-estágios desenvolvida por Prader (6). Além dos sinais de hiperandrogenismo, a Forma Perdedora de Sal apresenta inadequada secreção de aldosterona provocando hiponatremia, hipercalemia, hiper-reninemia e choque hipovolêmico durante o primeiro mês de vida, o que pode ser fatal. Essa problemática é particularmente crítica para os meninos recém-nascidos já que esses não apresentam ambiguidade genital e assim não levantam suspeita de HAC antes do episódio de desidratação e choque (3).

Nesse contexto, a triagem neonatal da HAC apresenta um papel importante, com o objetivo de identificar recém-nascidos afetados pela forma clássica da doença, evitando ou permitindo o reconhecimento precoce da crise adrenal que traz

riscos à vida. Esse rastreamento é adequado, pois a HAC é um erro inato do metabolismo comum e potencialmente fatal. Além disso, o rápido diagnóstico e tratamento podem prevenir a mortalidade e as comorbidades decorrentes das complicações da doença (4). Por outro lado, o tratamento precoce acaba criando dificuldades na caracterização da forma clínica, tendo em vista que pode dificultar a exata distinção da forma PS da VS (7).

A triagem neonatal da HAC ocorre a partir da dosagem da 17-OHP, que está em alta concentração no sangue das crianças afetadas. Porém, indivíduos prematuros, doentes, com baixo peso ou em situação de estresse também apresentam 17-OHP elevada e acima do valor de corte, caracterizando assim os resultados falso-positivos (4). Nessas situações, é necessária a realização de um exame confirmatório. Vários estudos tem sugerido que a determinação do genótipo do gene que codifica a 21-hidroxilase em amostras de neonatos provenientes dos programas de triagem é potencialmente útil como exame confirmatório em associação com a dosagem hormonal plasmática (4).

1.1.2 Aspectos genéticos

A enzima 21-hidroxilase é codificada pelo gene *CYP21A2* (Citocromo P450, família 21, subfamília A, polipeptídeo 2, também chamado de *CYP21* ou *CYP21B* nas nomenclaturas antigas) que está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3), inserido na região do HLA de classe III. Esse gene integra uma unidade genética chamada módulo RCCX, formado pelos genes *RP*, *C4*, *CYP21* e *TNX*, os quais estão organizados em repetições em *tandem*, como mostra a figura 2. No genoma humano, geralmente estão presentes dois desses módulos, porém

haplótipos monomodulares ou trimodulares são encontrados em diversas populações. O RCCX apresenta três pseudogenes, o *CYP21A1P*, *TNXA* e o *RP2*, localizados entre os *loci* do C4, os quais não produzem proteínas funcionais. Por causa da alta homologia e da organização em *tandem* dessa região, o módulo RCCX está sujeito a eventos de recombinações gênicas não-alélicas (desiguais) que levam a grandes rearranjos incluindo duplicações, deleções, conversões e fusões gênicas (1,8), fazendo com que essa região tenha alto grau de variabilidade. Essa organização específica do *locus* do *CYP21A2* provavelmente foi causada por uma duplicação ancestral conjuntamente com o gene *C4* (9).

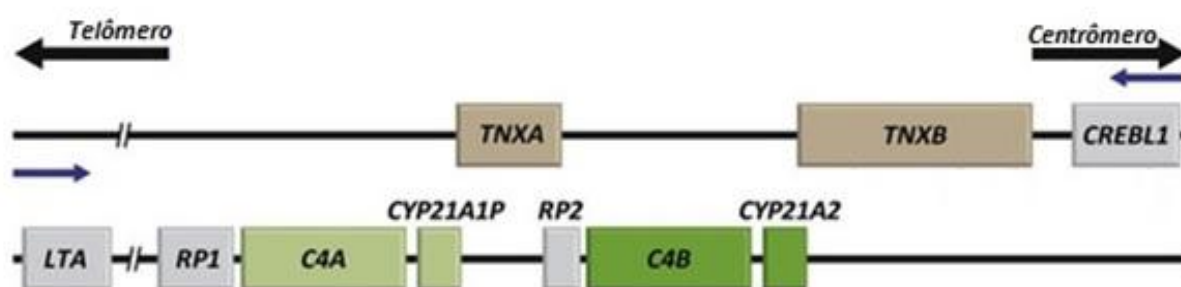


Figura 2: Módulo RCCX bimodular. Gene *CYP21A2* e pseudogene *CYP21A1P* posicionados em *tandem* com os genes *RP*, *C4* e *TNX*. Adaptado de Krone e Arlt², 2009.

O gene *CYP21A2* e seu homólogo, o pseudogene *CYP21A1P*, possuem 10 éxons e se estendem por 3 kb cada. Possuem similaridade entre si de 96% na região intrônica e de 98% na região exônica. Essas características favorecem, especificamente, dois tipos de eventos de recombinação: o *crossing-over* desigual durante a meiose, resultando em grandes deleções e duplicações do gene *CYP21A2* e eventos de conversões gênicas que transferem mutações deletérias presentes no pseudogene para o *CYP21A2*, tornando-o inativo (1).

A figura 3, adaptada do trabalho de Krone e Arlt² de 2009, apresenta as mutações mais comuns no gene *CYP21A2* e sua correlação com o fenótipo. Vários

estudos tem demonstrado que o fenótipo clínico possui boa correlação com a mutação menos deletéria entre os dois alelos mutados, pois este codifica uma proteína com maior atividade enzimática residual. Porém, é preciso atentar-se para o fato de que divergências entre o genótipo e o fenótipo podem ocorrer em vários casos (2). Na HAC é possível observar um amplo espectro de fenótipos, pois muitos pacientes são heterozigotos compostos, com duas ou mais mutações nos alelos (4).

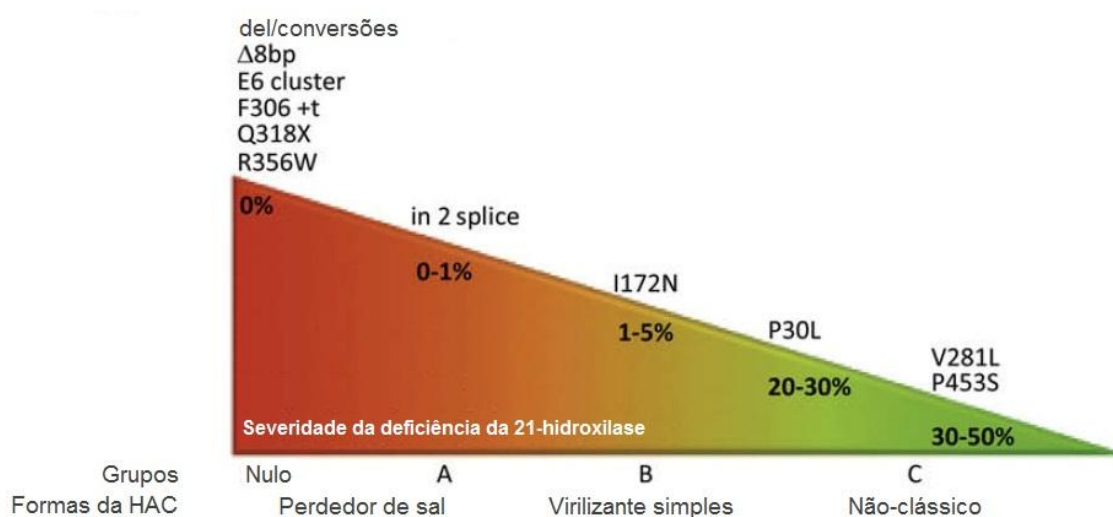


Figura 3: Correlação genótipo-fenótipo na HAC pela deficiência da 21-hidroxilase baseado na atividade do CYP21A2 *in vitro*. Adaptado de Krone e Arlt², 2009.

As mutações na HAC são divididas em quatro grupos. Em 2009, Krone e Arlt² apresentaram uma atualização das estimativas do percentual da atividade residual da enzima nos diferentes grupos de mutações, com base numa compilação de diversos estudos. Esses grupos são definidos como:

- I. Nulo. Neste grupo estão classificados os alelos que contêm mutações que causam completa inativação da enzima, incluindo deleções do gene, mutações em *frameshift*, mutações que criam códons precoces de parada, algumas mutações missense que demonstraram a extinção da atividade

enzimática *in vitro* posterior à transfecção e geralmente mutações em sítio de *splicing*. Tais mutações foram associadas à forma PS.

- II. Grupo A. Inclui a mutação na base 655 no sítio de *splicing* do íntron 2 (I2 Splice) que é deletéria e mostra baixa, porém mensurável, atividade enzimática após transfecção *in vitro* e está associada principalmente à forma perdedora de sal.
- III. Grupo B. Inclui a mutação I172N, que é menos deletéria e frequentemente é associada à virilização neonatal sem distúrbios eletrolíticos, mas já foi identificada em indivíduos PS.
- IV. Grupo C. Composto por mutações mais amenas associadas à forma não-clássica (10).

As mutações de ponto mais comuns no gene ativo estão presentes no pseudogene (1), o que sugere fortemente que essas mutações de ponto resultam de conversões gênicas, já que eventos mutagênicos que recriem essas mutações são raros. Recombinações intergênicas são responsáveis por 95% das mutações associadas com a 21-OHD (11). Essas mutações deletérias presentes no *CYP21A1P* e que sofrem microconversões incluem: a substituição no nucleotídeo 655 A/C>G no íntron 2, posicionada 13 bases antes do éxon 3 que gera um *splicing* aberrante no RNA (IVS2-13 A/C>G, a qual será identificada neste trabalho pelo nome I2 Splice); a deleção de 8 pares de base no éxon 3 (E3Δ8pb); a inserção de uma Timina no éxon 7 no códon do aminoácido F306 (F306 + t) causando um erro na fase de leitura; a mutação nonsense no éxon 8 que substitui o nucleotídeo na posição 1996 e substitui o códon CAG por TAG, criando um códon de parada no lugar de uma Glutamina (Q318X); as mutações missense P30L no éxon 1, I172N no éxon 4, V281L no éxon 7 e a R356W no éxon 8; e as 3 mutações de ponto missense

I236N, V237E e M239K que sempre são transferidas juntas caracterizando um *cluster* no éxon 6 (E6 *cluster*). Todas elas costumam ser observadas em pacientes com 21-OHD e estão ilustradas na figura 4, adaptada de New *et al*¹², 2013. Aproximadamente, 5% de todas as mutações raras causadoras de 21-OHD não são originadas do pseudogene (6).

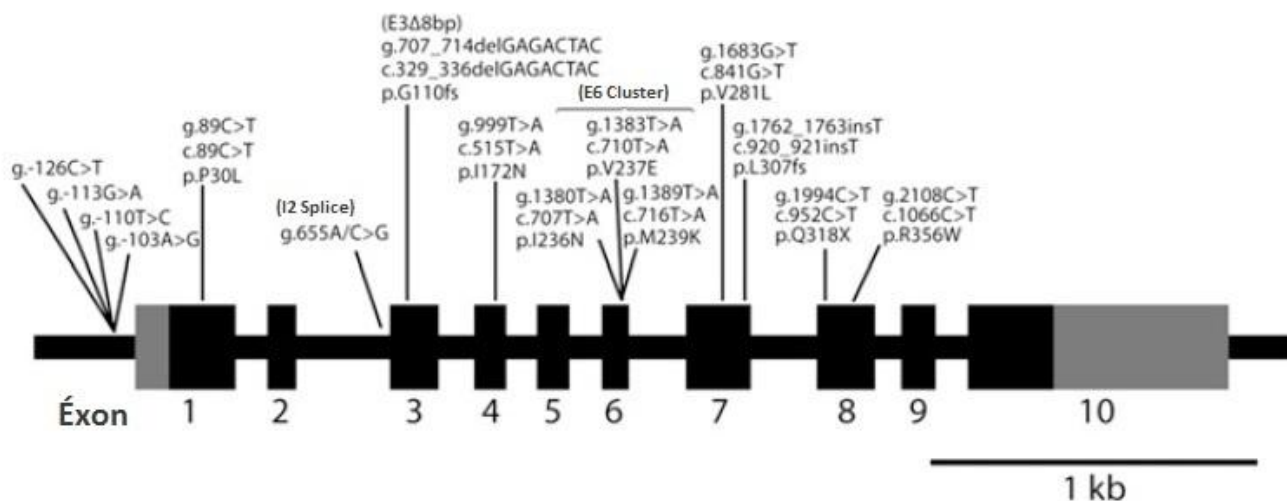


Figura 4: Gene CYP21A2 com suas mutações mais frequentes, provenientes do pseudogene. Adaptado de New *et al*¹², 2013.

A 21OHD é observada ao redor do mundo e a especificidade étnica das mutações no gene da *CYP21A2* é interessante (1). As diferentes frequências de algumas mutações em determinadas populações, como a alta frequência da mutação V281L em judeus (Ashkenazi Jews), e da mutação I2 Splice em esquimós (Yupik, Alasca), ou a alta frequência de grandes deleções em nativos norte-americanos demonstra uma especificidade étnica das mutações do *CYP21A2*. Isso pode resultar de um efeito fundador ancestral, ou de *hot-spot's* nesse gene, *crossing-over* desiguais e conversões com o pseudogene. Na população judaica, em especial, observa-se essa relação, pois, além de endogâmica, ela sofreu sucessivos

genocídios no continente europeu o que contribuiu para o efeito genético do gargalo de garrafa ou *bottleneck*. Essa especificidade resultou da drástica redução populacional o que reduziu a diversidade genética. Já nas populações norte-americanas nativas e asiáticas a mutação V281L não é encontrada. Essa mutação resulta em uma deficiência leve da enzima e costuma estar relacionada com o fenótipo não-clássico (1).

Dados da literatura sugerem que as deleções ocorrem exclusivamente na meiose enquanto as conversões gênicas podem ocorrer durante a meiose e a mitose, ou talvez apenas na mitose. Assim, as conversões gênicas ocorrem por mecanismos diferentes do *crossing-over* desigual (13).

Desalinhamentos e recombinações dos genes de RCCX geram duplicações, deleções e conversões e isso promove diversidade na região do MHC de classe III (14), porém essas anormalidades gênicas como as duplicações parciais resultantes de *crossing-over* desigual entre sequências homólogas são importantes causas de doenças genéticas humanas (15). Por exemplo, a fusão do TNXA/TNXB é associada à síndrome de Ehlers-Danlos (14) além da Hiperplasia Adrenal Congênita que também é associada a eventos de recombinação.

A deleção de 26 a 32 kb da sequência gênica envolvendo a porção final 3' do *CYP21A1P* e a porção 5' do *CYP21A2* contendo o fragmento *TNXA-RP2-C4B*, produz um único gene quimérico, que consiste na combinação do pseudogene e do gene ativo. Este gene quimérico não é totalmente funcional, pois mutações deletérias presentes no *CYP21A1P* podem incapacitar a produção de uma enzima ativa pelo gene (6,16), uma vez que essas mutações presentes nos pseudogenes não sofrem pressão seletiva e tendem a permanecer na população (14). Até o

momento foram descritos nove quimeras (CH1-CH9) com diferentes tipos de junções (12), como mostrado na figura 5.

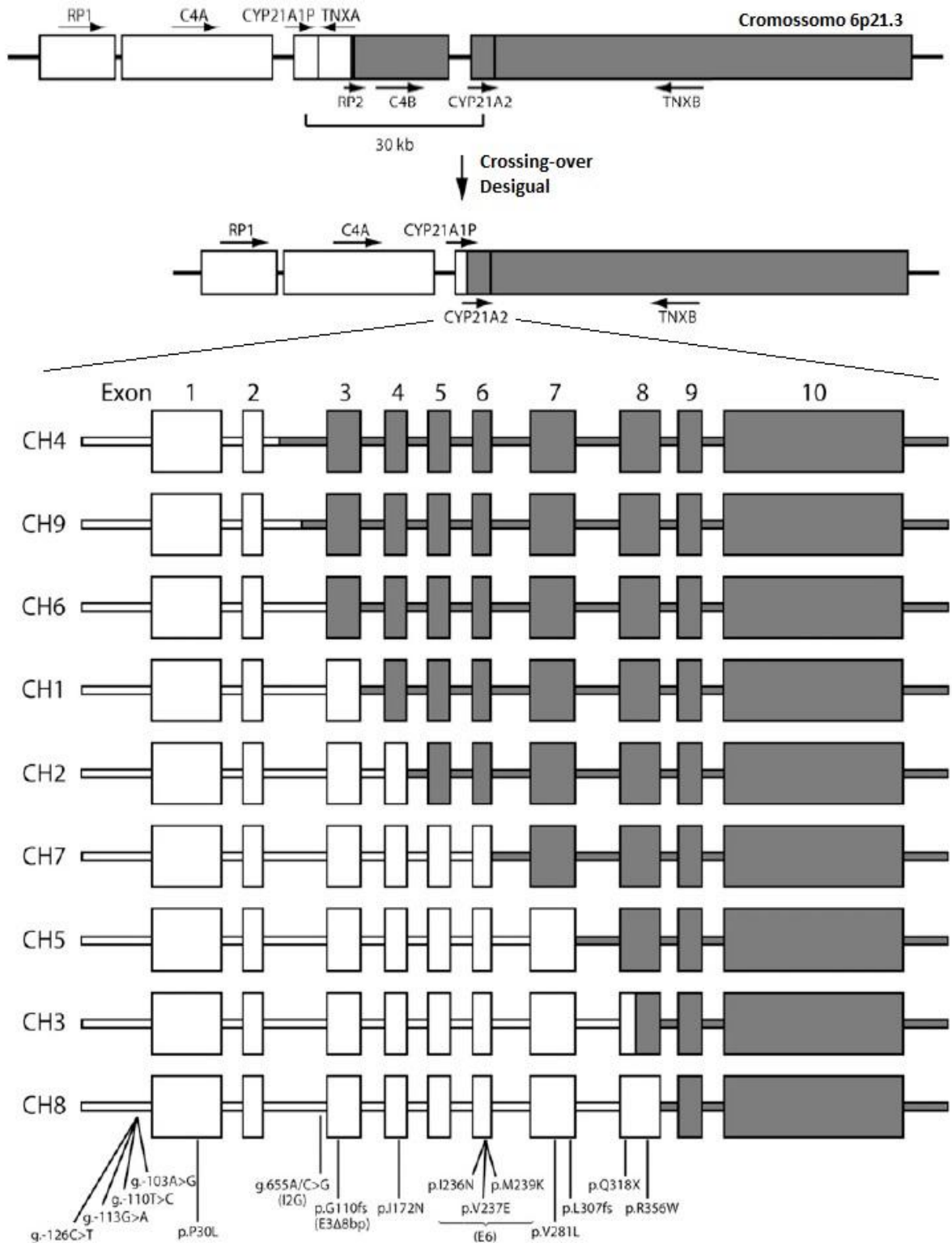


Figura 5: Representação esquemática de um *crossing-over* desigual e dos nove tipos de quimeras já descritas resultantes de rearranjos entre as regiões *RP1-C4A-CY21A1P-TNXA* e *RP2-C4B-CYP21A2-TNXB*. Em branco os éxons do CYP21A1P e em cinza os éxons do CYP21A2. Adaptado de New *et al*¹², 2013.

1.2 DEFICIÊNCIA DA 3 β –HIDROXIESTEROIDE DESIDROGENASE TIPO 2

A Hiperplasia Adrenal Congênita decorrente da deficiência da 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (3 β HSD2) representa uma rara variante da HAC. Também é autossômica recessiva codificada pelo gene *HSD3B2*, localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p13.1), constituído por quatro éxons, onde apenas os éxons 2, 3 e 4 são traduzidos. Os dados sobre sua incidência são pobres. Essa enzima catalisa três reações esteroidogênicas: a conversão de Δ^5 esteroide pregnelona, 17-hidroxipregnelona e DHEA em Δ^4 esteroide progesterona, 17OHP e androstenediona, respectivamente. Assim, esta enzima afeta todas as três vias esteroidogênicas (mineralocorticóides, glicocorticóides e hormônios sexuais). O espectro fenotípico é amplo e varia desde perdedor de sal grave até a forma não-perdedora, com ou sem ocorrência de genitália ambígua em neonatos masculinos 46,XY. (2). A enzima 3 β -HSD2 é necessária para a síntese de testosterona pelas células de Leydig nos testículos, por isso os fetos masculinos com essa deficiência podem apresentar pseudo-hermafroditismo, com genitália externa feminina (17). Os sintomas da forma mais amena da doença ainda são pouco definidos, mas podem incluir acne precoce, pubarca precoce e aceleração do crescimento em crianças (18).

A deficiência da 3 β -HSD tipo 2 é causada por mutações no gene *HSD3B2*. Duas isoformas da 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase, tipo 1 e 2, existem e são codificadas pelos genes *HSD3B* e *HSD3B2*, respectivamente. *HSD3B* é expresso principalmente na placenta e em tecidos periféricos como a glândula mamária, a próstata e a pele, enquanto *HSD3B2* é expresso principalmente na adrenal e na gônada. Ambos são homólogos e estão localizados no mesmo cromossomo (17).

2. JUSTIFICATIVA

A 21-hidroxilase e a 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase são enzimas essenciais para a esteroidogênese. O conhecimento dos mecanismos que provocam suas deficiências são fundamentais para o melhor entendimento e acompanhamento dos portadores da Hiperplasia Adrenal Congênita. Segundo Wilson *et al*¹, em 2007, a caracterização genética molecular é um excelente método para um seguro diagnóstico da hiperplasia adrenal congênita. Em 2009, Krone e Alrt² defenderam que a confirmação do diagnóstico pela análise molecular possui uma grande importância clínica, tendo em vista a forte relação genótipo-fenótipo em todas as variantes, com exceção da deficiência da P450 oxidoreductase, onde outros estudos estão em andamento. Assim, o conhecimento do defeito genético é uma ferramenta desejável, com conhecido impacto prático para a realização do aconselhamento genético, para a confirmação da doença em recém-nascidos com o teste da 17-OHP positivo na triagem neonatal e para o diagnóstico pré-natal, entre outras.

Frente a essa demanda, nos últimos anos, verificou-se um aumento significativo do número de estudos sobre HAC que contribuíram para caracterização do perfil genético populacional no Brasil (19, 20, 21). A caracterização da distribuição das mutações nos genes *CYP21A2* e *HSD3B2* associadas à HAC no Distrito Federal (DF), de nosso conhecimento, ainda não foi realizada. Com a implementação recente do Programa de Triagem Neonatal para HAC no DF, acredita-se ser cada vez mais importante a realização do diagnóstico genético em nossa região, por meio do estudo dos genes *CYP21A2* e *HSD3B2* entre portadores da doença ou em crianças com diagnóstico suspeito pelos exames de triagem. Além disso, é interessante o conhecimento do perfil de mutações encontradas,

considerando a **alta diversidade genética presente na população do Distrito Federal, constituída de indivíduos procedentes de diversas regiões do Brasil.**

3. OBJETIVOS

I. Investigar e descrever a variabilidade genética numa série de indivíduos com o diagnóstico clínico da forma clássica de HAC pela deficiência da 21-hidroxilase e com o diagnóstico clínico da deficiência da 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase, residentes no Distrito Federal.

II. Padronizar um método eficiente de diagnóstico molecular para hiperplasia adrenal congênita no Distrito Federal.

III. Buscar correlação dos genótipos identificados com o fenótipo dos indivíduos avaliados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SUJEITOS DA PESQUISA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, registro 112/11 (Anexo A), e realizado com o consentimento de todos os pacientes ou seus responsáveis (Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido).

Foram selecionados trinta pacientes com o diagnóstico clínico e laboratorial de hiperplasia adrenal congênita atendidos no Ambulatório de Endocrinologia de Gônadas e Adrenais e na Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Universitário de Brasília, Universidade de Brasília – UnB. Quatro indivíduos foram encaminhados ao Hospital Universitário pela Unidade de Endocrinologia do Programa de Triagem Neonatal, Núcleo de Genética do Hospital de Apoio de Brasília, todos eles com a dosagem da 17OHP em amostra seca colhida em papel filtro alterada. A idade desses indivíduos variou entre 0 e 25 anos, onde a mediana das idades é de 13,5 anos.

Dentre os 30 sujeitos da pesquisa, 29 são portadores da forma clássica da deficiência da 21-hidroxilase, sendo 15 com a forma perdedora de sal e 14 com a forma virilizante simples, provenientes de 24 famílias. E um sujeito portador da forma perdedora de sal da deficiência da 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2. A crise adrenal com perda de sal no período neonatal foi o critério utilizado para caracterizar a forma perdedora de sal.

Foram incluídos indivíduos com apresentação clínica compatível com HAC por 21-OHD, ou seja, presença de ambiguidade genital, sinais de virilização pós-

natal e desidratação com hiponatremia e hipercalemia. Seguiu-se também os critérios bioquímicos, sendo eles:

- Na infância: 17-OHP acima do valor de 20 ng/mL em amostra seca em papel filtro confirmada por uma dosagem de 17-OHP plasmática elevada, a partir da triagem neonatal, ou 17-OHP plasmática elevada dosada após a suspeita diagnóstica.
- Após a infância: seguindo os valores estabelecidos pelo Consenso de 2010 da Sociedade de Endocrinologia (*Endocrine Society*) mostrados na figura 6 (4).

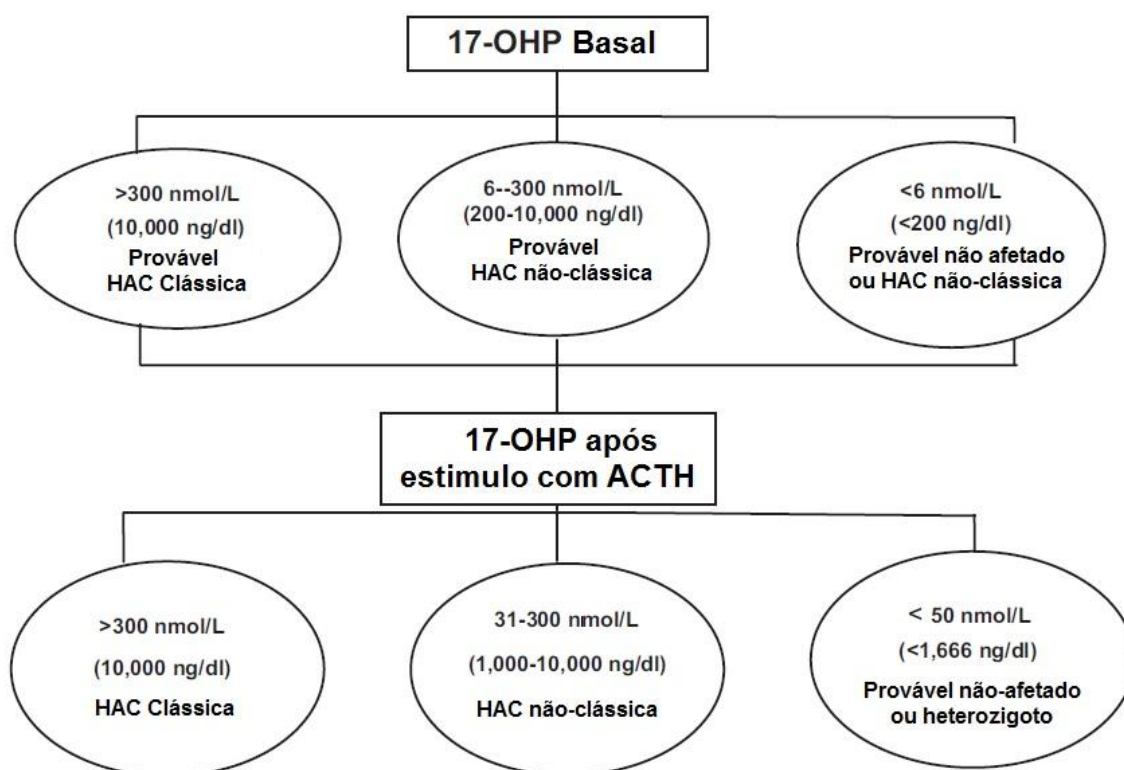


Figura 6: Parâmetros para o diagnóstico da deficiência da 21-OH após a infância. Adaptado de Speiser⁴, 2010.

Para o estudo do gene *HSD3B2* foi selecionado um sujeito com diagnóstico clínico de deficiência de 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2, forma clássica, perdedora de sal. Tratava-se de uma criança com ambiguidade genital, cariótipo

46,XY, em que foi observado valor aumentado de 17OHP no teste de triagem neonatal (5170 ng/dL; valor normal para peso ao nascer e idade na data da coleta: <2000ng/dL). Aos 3 meses de vida, apresentou vômitos recorrentes, desidratação, hiponatremia e hipercalemia. Na ocasião, foi confirmado o diagnóstico da deficiência de 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 por meio de elevada dosagem da 17OHP plasmática (2.430 ng/dL; normal: <200), 17OH-pregnenolona (Δ^5 17OHP) (1.080 ng/dL; normal <10 ng/dL; critério proposto para neonatos com deficiência de 3 β -HSD tipo 2 comprovada pelo genótipo: ≥ 84 nmol/L). A relação Δ^5 17OHP/cortisol foi de 224, isto é, acima do critério proposto para deficiência de 3 β -HSD tipo 2, isto é, maior ou igual a 94 (22).

Foram excluídos os indivíduos que possuísem manifestações clínicas sugestivas de outras formas de HAC por deficiência de outras enzimas esteroidogênicas (por exemplo, a presença de hipertensão arterial, sugestiva de deficiência de 11 β -hidroxilase ou 17 α -hidroxilase) ou pacientes com 17-OHP plasmática abaixo dos valores de referência para o diagnóstico determinados pelo programa de triagem neonatal ou pelo Consenso de 2010 da Sociedade de Endocrinologia⁴.

A caracterização clínica dos sujeitos foi realizada pelos médicos responsáveis nos respectivos ambulatórios, os quais possuem ampla experiência no diagnóstico clínico e seguimento dessa condição. Os dados clínicos foram obtidos a partir de revisão dos prontuários localizados no acervo do Hospital Universitário de Brasília.

4.2 ANÁLISE MOLECULAR

4.2.1 Protocolo geral

O DNA genômico foi extraído pelo método de *Salting-out* descrito por Miller *et al.*²³ em 1988, a partir de leucócitos do sangue periférico colhido por punção venosa. As amostras foram quantificadas e avaliadas quanto à pureza utilizando-se o espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Eletronics). Todas as amostras utilizadas demonstraram concentração de DNA acima de 100 ng/μl e a relação 260/280 (pureza) maior que 1,70.

Em todas as fases da pesquisa, a reação em cadeia da polimerase ocorreu com o uso da GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation) nos termocicladores TC-3000 (Techne) e T100™ (BIO-RAD), cuja eficiência foi avaliada por meio da visualização dos produtos em gel de agarose a 1% em TAE, com Brometo de Etídeo a 10mg/mL, e comparação visual do padrão de migração dos produtos no gel com o marcador molecular 1Kb Plus (Invitrogen™). Controles positivo e negativo foram utilizados em todas as reações.

A predição do efeito funcional e a severidade de novas mutações (que não constam nos bancos de dados genéticos) foram avaliadas com o uso do *software* público PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>).

4.2.2 Análise molecular do CYP21A2

A análise molecular do gene *CYP21A2* foi realizada com a associação de três técnicas visando à investigação das mutações mais comuns, de rearranjos gênicos e finalmente mutações raras ou possivelmente não descritas.

4.2.2.1 Nested-PCR

Tendo em vista a similaridade entre gene e pseudogene, o primeiro passo para o diagnóstico molecular foi uma amplificação específica. A abordagem mais utilizada na literatura é a amplificação com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para o *CYP21A2*. Para isso são construídos *primers* que se anelam no éxon 3 ou no éxon 6 onde estão contidas, no *CYP21A1P*, as mutações E3Δ8pb (deleção de oito pares de base) ou E6 *Cluster* (*Cluster* de três mutações de ponto missense: I236N, V237E e M239K), respectivamente. Utilizou-se então, baseado no trabalho de Wedell e Luthman²⁴ de 1993, *primers* específicos para o alelo selvagem da mutação E3Δ8pb em combinação com *primers* complementares nas regiões 5'-UTR e 3'-UTR, incluindo a região promotora, produzindo então dois fragmentos chamados de F1 (P1-P48 (1107 pb)) e F2 (P55-P4 (2162 pb)), que são os moldes para as novas amplificações na *Nested-PCR*. As amplificações ocorreram conforme as condições descritas na tabela 1.

Tabela 1: Condições da reação em cadeia da polimerase para os fragmentos F1 e F2.

Fragmento F1	Fragmento F2
Gotaq: 20 ul	Gotaq: 25 ul
Primer: 1,75 ul	Primer: 1,25 ul
Condições:	Condições:
25X 95° - 5'	30X 96° - 5'
95° - 1'	96° - 1'
60° - 30"	60° - 30"
72° - 1'	72° - 2'
72° - 10'	72° - 10'
4° - ∞	4° - ∞

A tabela 2 mostra a sequência dos *primers* utilizados nessa etapa, e a respectiva posição de anelamento e sua orientação.

Tabela 2: *Primers* utilizados para realizar a *Nested-PCR*. Em destaque a região que se sobrepõe no sítio da E3Δ8pb. Retirados de Wedell e Luthman²⁴, 1993.

<i>Primer</i>	Posição (g.)	Orientação	Sequência (5' → 3')
P1	- 418/-399	Sense	TTC AGG CGA TTC AGG AAG GC
P48	711/729	Antisense	CAG AGC AGG <u>GAG TAG TCT C</u>
P55	700/719	Sense	CCT GTC CTT <u>GGG AGA CTA CT</u>
P4	2892/2911	Antisense	TCT CGC ACC CCA GTA TGA CT

4.2.2.2 PCR Alelo-específica

Após a amplificação específica, foi executada a PCR alelo-específico (PCR-AE) sobre os fragmentos F1 e F2, onde *primers* específicos para as mutações mais comuns e os respectivos *primers* para os alelos selvagens são utilizados possibilitando, assim, a genotipagem. O trabalho de Wedell e Luthman²⁴, em 1993, embasou esta etapa.

4.2.2.3 Sequenciamento automático de Sanger

O sequenciamento automático pelo método de Sanger seria aplicado para investigar as amostras em que as mutações mais comuns não fossem encontradas pela PCR-AE, buscando mutações raras ou mutações não descritas. No entanto, utilizou-se a metodologia, que é o padrão-ouro para genotipagem, para confirmar aquilo que era mostrado na PCR-AE. Logo, foi observado que, em alguns casos o resultado obtido pelo Alelo-específico não se confirmava, além do fato de ser um método trabalhoso e pouco reprodutível, ao menos no que tange a esse gene e suas particularidades estruturais e homologias. Assim, o sequenciamento automático foi

realizado em todos os indivíduos da pesquisa, por gerar um resultado confiável, simples e completo, tendo em vista que possibilita identificar toda mutação pontual.

Assim, os fragmentos F1 e F2 foram novamente submetidos a uma PCR que produziu fragmentos menores e mais específicos. Essas amplificações ocorreram conforme as condições descritas na tabela 3. Os *primers* utilizados nessa nova reação estão mostrados na tabela 4 e originaram três novos fragmentos: F1seq (P70-P48 (967 pb)), F2Aseq (P55-P19 (1346 pb)) e F2Bseq (P45-P4 (730 pb)). Esses produtos foram purificados pelo *kit* de purificação QIAquick® (QIAGEN) e enviados para sequenciamento automático, tanto no sentido *sense* (5'>3') quanto *antisense* (3'>5'), o qual foi realizado pela empresa especializada MacroGen Inc. que utiliza os aparelhos ABI3730XL e ABI3700 (Applied Biosystems). O resultado produzido foi avaliado pelo *software* Sequencher 5.0 (Genes Codes, Ann Arbor, Mich., USA) e comparado com a sequência referência do *CYP21A2* (NCBI Reference Sequence: NG_007941.2). Os achados foram comparados com o banco de dados do Catálogo de Variações Genéticas Humanas – 1000Genomes, tendo como referência o transcrito ENST00000418967.

Tabela 3: Condições da reação em cadeia da polimerase para os fragmentos F1seq, F2Aseq e F2Bseq.

Fragmento F1seq	Fragmento F2Aseq	Fragmento F2Bseq																																				
Gotaq: 20 ul	Gotaq: 20 ul	Gotaq: 20 ul																																				
Primer: 1,25 ul	Primer: 1,00 ul	Primer: 1,25 ul																																				
Condições:	Condições:	Condições:																																				
25X <table border="0" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">95° - 3'</td><td>95° - 3'</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">95° - 45''</td><td>95° - 1'</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">60° - 30''</td><td>60° - 30''</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">72° - 45''</td><td>72° - 2'</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">72° - 10'</td><td>72° - 10'</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">4° - ∞</td><td>4° - ∞</td></tr> </table>	95° - 3'	95° - 3'	95° - 45''	95° - 1'	60° - 30''	60° - 30''	72° - 45''	72° - 2'	72° - 10'	72° - 10'	4° - ∞	4° - ∞	30X <table border="0" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">96° - 5'</td><td>96° - 5'</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">96° - 1'</td><td>96° - 1'</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">60° - 30''</td><td>60° - 30''</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">72° - 2'</td><td>72° - 2'</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">72° - 10'</td><td>72° - 10'</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">4° - ∞</td><td>4° - ∞</td></tr> </table>	96° - 5'	96° - 5'	96° - 1'	96° - 1'	60° - 30''	60° - 30''	72° - 2'	72° - 2'	72° - 10'	72° - 10'	4° - ∞	4° - ∞	25X <table border="0" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">95° - 5'</td><td>95° - 5'</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">95° - 1'</td><td>95° - 1'</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">60° - 30''</td><td>60° - 30''</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">72° - 1'</td><td>72° - 1'</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">72° - 10'</td><td>72° - 10'</td></tr> <tr><td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">4° - ∞</td><td>4° - ∞</td></tr> </table>	95° - 5'	95° - 5'	95° - 1'	95° - 1'	60° - 30''	60° - 30''	72° - 1'	72° - 1'	72° - 10'	72° - 10'	4° - ∞	4° - ∞
95° - 3'	95° - 3'																																					
95° - 45''	95° - 1'																																					
60° - 30''	60° - 30''																																					
72° - 45''	72° - 2'																																					
72° - 10'	72° - 10'																																					
4° - ∞	4° - ∞																																					
96° - 5'	96° - 5'																																					
96° - 1'	96° - 1'																																					
60° - 30''	60° - 30''																																					
72° - 2'	72° - 2'																																					
72° - 10'	72° - 10'																																					
4° - ∞	4° - ∞																																					
95° - 5'	95° - 5'																																					
95° - 1'	95° - 1'																																					
60° - 30''	60° - 30''																																					
72° - 1'	72° - 1'																																					
72° - 10'	72° - 10'																																					
4° - ∞	4° - ∞																																					

Tabela 4: Primers utilizados para o sequenciamento. Retirados de Wedell e Luthman²⁴, 1993.

<i>Primer</i>	Posição (g.)	Orientação	Sequência (5' → 3')
P70	- 279/-261	Sense	ATG TGG AAC CAG AAA GCT G
P19	2066/2084	Antisense	TTG AGC AAG GC AGC CGT G
P45	2144/2161	Sense	GCA CCA CAC GGC CCA GCA

4.2.2.4 *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

O *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* – MLPA (amplificação múltipla dependente da ligação de sondas) avalia grandes rearranjos gênicos, como deleções e duplicações. Funciona a partir da hibridação de sondas construídas para determinadas regiões do DNA, que se ligam pela reação com a enzima ligase e são amplificadas por uma reação em cadeia da polimerase. Cada sonda possui uma região fluorescente que é ativada e posteriormente detectada por eletroforese capilar. Caso a região tenha sofrido uma deleção ou uma duplicação, toda essa reação se modifica, podendo ser percebida pela variação da fluorescência. Para sua realização utilizou-se o *kit* SALSA MLPA P050B CAH comercializado pela MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands. O ensaio seguiu as recomendações do fabricante. Esse *kit* é composto por 33 sondas diferentes que geram produtos de amplificação com tamanho entre 130 e 391 pb. Dentre essas sondas encontram-se: cinco sondas específicas para *CYP21A2*; uma localizada 18 nucleotídeos antes do éxon 1, na região 5'UTR (éxon 1), e as outras quatro sondas complementares à sequência do alelo selvagem para as mutações E3Δ8pb (g.329-336 no éxon 3), I172N (éxon 4), *cluster* E6 (éxon 6) e Q318X (éxon 8); três sondas específicas para o pseudogene *CYP21A1P*; três sondas para o TNXB, uma para o C4A e uma para o C4B; três localizadas no 6p21.3; uma específica para o cromossomo Y (UTY-gene)

e 16 sondas referências. A leitura da fluorescência das sondas foi realizada no aparelho ABI3130 (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados por meio do *software* Coffalyser.net (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).

4.2.3 Análise molecular do HSD3B2

4.2.3.1 Sequenciamento automático de Sanger

A análise do gene *HSD3B2* foi realizada por meio da amplificação de toda região codante (éxons 2-4) e dos sítios de *splicing* adjacentes, conforme as condições descritas na tabela 5, a partir de *primers* descritos por Jeadron e Sahakitrungruang²⁵, 2012, mostrados na tabela 6.

Tabela 5: Condições da reação em cadeia da polimerase para os fragmentos do gene HSD3B2.

Fragmentos de HSD3B2	
Gotas: 25 ul	
Primer: 1,25 ul	
Condições:	
25X	95° - 3'
	95° - 30''
	60° - 30''
	72° - 45''
	72° - 10'
4° - ∞	

Tabela 6: Primers utilizados para o sequenciamento do gene *HSD3B2*. Retirados de Jeandron e Sahakitrungruang²⁵, 2012.

<i>Primer</i>	Posição (g.)	Orientação	Sequência (5' → 3')
2f	-154/-134	Sense	AAA AAT GGG GTG GAG GAA AAT
2r	459/479	Antisense	GCA CAG CAA TCG CCA AGA CA
3f	3774/3797	Sense	AAT AAG ATG GGG TAG AAA CAG ATG
3r	4515/4533	Antisense	CGG GGA GCC AAG GAG TAG C
4f	6262/6283	Sense	GAA TGC ACC CTG AGT CTG TTA T
4r	7393/7417	Antisense	TTG TCT TCT GGT GTA TGA TTA GGA

Foram obtidos três fragmentos, ÉXON 2 (2f-2r (633 pb)), ÉXON 3 (3f-3r (759 pb)) e ÉXON 4 (4f-4r (1147 pb)). Posteriormente, assim como foi realizado para o gene *CYP21A2*, esses produtos foram purificadas pelo kit de purificação QIAquick® (QIAGEN) e enviadas para sequenciamento, tanto no sentido *sense* quanto *antisense*, pela Macrogen Inc. com os aparelhos ABI3730XL e ABI3700 (Applied Biosystems). O resultado foi avaliado pelo *software* Sequencer 5.0 (Genes Codes, Ann Arbor, Mich., USA) e comparado com a sequência referência do *HSD3B2* (NCBI *Reference Sequence*: NG_013349.1). Os achados foram comparados com o banco de dados do Catálogo de Variações Genéticas Humanas – 1000Genomes, tendo como referência a transcrito ENST00000369416.

5. RESULTADOS

No presente estudo, são descritas as mutações presentes nos 30 indivíduos portadores de HAC, pela deficiência da 21-hidroxilase ou da 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 provenientes do Distrito Federal.

Foram identificadas no gene *CYP21A2*, 13 mutações de ponto previamente descritas por outros estudos, sendo as comumente encontradas **I2 Splice**, **p.I172N**, **E6 cluster**, **p.F306+t**, **p.V281L**, **p.Q318X** e **p.P453S**, e as mais raras **IVS2+5G>A**, **p.D183E**, **p.S268T**, **p.R444X**, **p.R479L** e **p.S493N**, mostradas na figura 7-A.

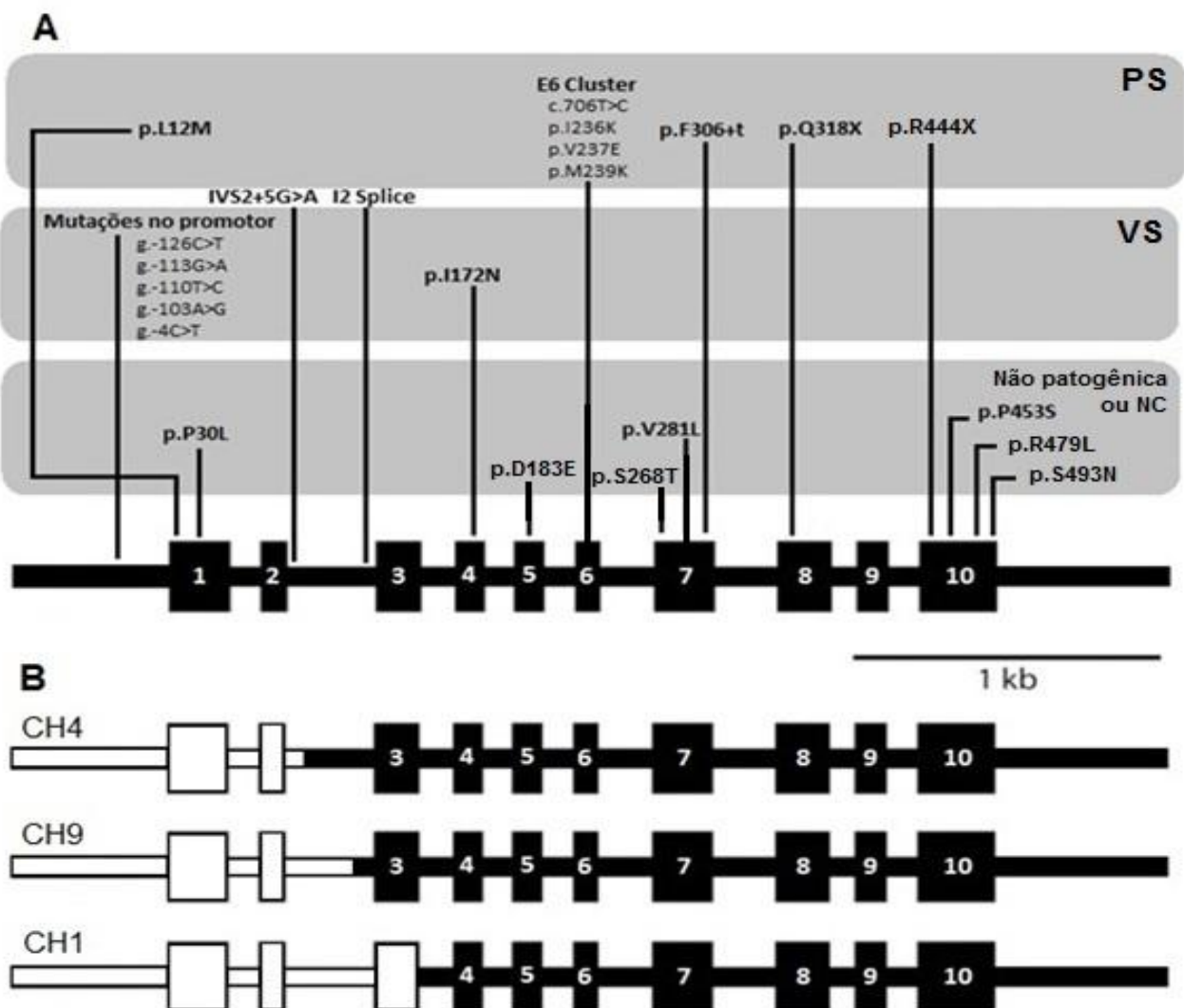
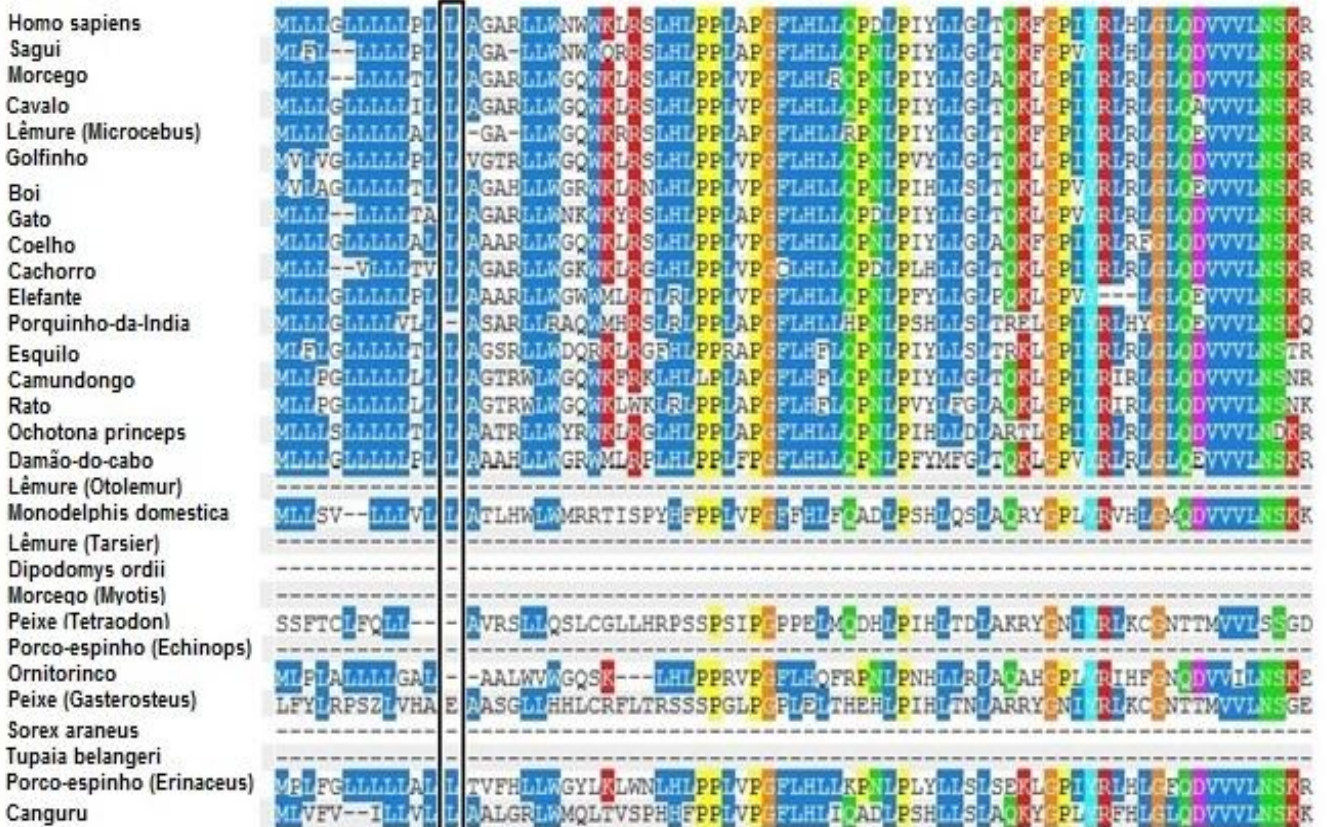


Figura 7: Mutações encontradas nesta pesquisa. (A) Mutações de ponto em relação a sua localização no gene, agrupadas de acordo com o fenótipo esperado. (B) Quimeras encontradas no presente estudo. Em branco, regiões provenientes do pseudogene e em preto, os éxons do gene ativo.

Destaca-se no indivíduo PS3, a nova mutação p.L12M que ocorre num aminoácido altamente conservado, como mostra a figura 8-A. Tem impacto funcional provavelmente deletério com o score de 0,999, onde 0 indica mutação benigna e 1 indica mutação deletéria, pelo software PolyPhen-2 (figura 8-B). Essa mutação não consta nos bancos de dados públicos (HGMD, 1000Genomes, PubMed).

A



B

A previsão para essa mutação é de PROVAVELMENTE DELETÉRIA com o score de 0,999 (sensibilidade: 0,14; especificidade: 0,99)

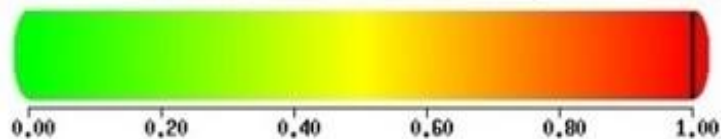


Figura 8: Imagens geradas a partir do software PolyPhen-2. (A) Comparação do aminoácido na posição 12 entre diversas espécies. (B) Demonstração da previsão da gravidade da mutação.

Adicionalmente, foram identificados oito alelos apresentando grandes deleções, quatro alelos apresentando inserções e quatro alelos com grandes conversões, onde formaram-se as quimeras CH1, CH4 e CH9, identificadas na figura 7-B.

A tabela 7 mostra a frequência das mutações encontradas, a região onde ocorreram e a quantidade de alelos encontrados em relação à forma clínica do sujeito portador desse alelo.

Tabela 7: Distribuição das mutações encontradas no gene CYP21 em relação à região, a quantidade de alelos e a frequência com que ocorreram em 30 indivíduos portadores de hiperplasia adrenal congênita por deficiência de 21-hidroxilase residentes no Distrito Federal.

	Mutação	Total de alelos		Frequência das mutações (%)
		PS	VS	
Éxon 1	p.L12M	1	0	1,7
Íntron 2	IVS2+5G>A	0	1	1,7
	I2Splice	6	8	25,0
Éxon 4	p.I172N	1	6	12,5
Éxon 5	p.D183E	1	0	1,7
Éxon 6	E6 <i>Cluster</i>	1	0	1,7
Éxon 7	p. S268T	2	5	12,5
	p.V281L	2	2	7,1
	p.F306+t	2	0	3,5
Éxon 8	p.Q318X	7	2	16,0
Éxon 10	p.R444X	0	1	1,7
	p.P453S	0	1	1,7
	p.R479L	1	0	1,7
	p. S493N	2	3	8,9
(Grandes rearranjos)	Deleções	6	2	14,2
	Inserções	3	1	7,1
	Conversões	2	2	7,1

A inserção de três pares de base, TGC, no éxon 1 esteve presente em vários indivíduos, mas este polimorfismo não se mostra patogênica. 55,2% dos indivíduos são homozigotos para essa inserção, 24,1% são heterozigotos e apenas 20,7% possuem o alelo selvagem.

Houve correlação genótipo-fenótipo, para a 21-OHD, em 22 casos (75,9%) e em sete casos (24,1%) o genótipo identificado não justificou o fenótipo apresentado. Em um caso, com genótipo p.R444X/IVS2+5G>A + p.V281L, não foi possível estabelecer um genótipo esperado, pela baixa quantidade de informações disponíveis sobre essas mutações. A tabela 8 mostra os genótipos de todos os indivíduos da pesquisa e assinala a correlação genótipo-fenótipo. Nessa tabela, também pode ser observado que 72,4% dos indivíduos são heterozigotos compostos.

Tabela 8: Genótipos identificados em 29 indivíduos portadores de hiperplasia adrenal congênita por deficiência de 21-hidroxilase residentes no DF, agrupados de acordo com o fenótipo apresentado e a correlação genótipo-fenótipo.

Forma clínica	Genótipos	Demais mutações encontradas [#]	Quantidade (indivíduos)	Correlação Genótipo-fenótipo
Perdedor de Sal (n=15)	I2Splice/I2Splice		1	+
	I2Splice/Del	R479L	1	+
	I2Splice/Conv	S493N	1	+
	I2Splice/Q318X		1	+
	Q318X/Q318X	Inserção	1	+
	L12M/Q318X		1	+
	F306+t/Del	V281L	1	+
	F306+t/Del	D183E e V281L	1	+
	Conv/Del		1	+
	Del/Ins		1	+
	E6Cluster	S268T	1	+
	Q318X/Ins		1	+
	Q318X/Q318X		1	+
	S493N/Del	S268T	1	-
I2splice/I172N		1	-	
Virilizante Simples (n=14)	I172N/I172N		2	+
	I172N/Q318X		2	+
	Conv/Conv		1	+
	IVS2+5G>A/R444X	V281L	1	**
	I2Splice/I2Splice		1	+
	I2Splice/I2Splice	S268T	1	+
	I2 Splice/Del		1	+
	I2Splice/I2Splice	Del/ S268T	1	+
	V281L /Del	S493N	1	-
	P453S/Ins	S268T	1	-
	I2Splice/ S493N		2	-

Del: Grande deleção; Ins: Inserções; Conv: Conversão; +: houve correlação genótipo-fenótipo; -: não houve correlação genótipo-fenótipo; **: correlação desconhecida. #: Demais mutações encontradas. Os polimorfismos D183E, S268T e S493N ou foram encontrados em alelos normais ou resultaram em atividade enzimática normal após transfecção *in vitro* (26).

No indivíduo portador da deficiência de 3 β -HSD, foi encontrada gene *HSD3B2* a mutação missense P222Q no éxon 4 em homozigose, mostrada na figura 9. Houve boa correlação genótipo-fenótipo, tendo em vista que o indivíduo avaliado recebeu o diagnóstico da forma que era esperada para os portadores dessa mutação, a forma perdedora de sal.

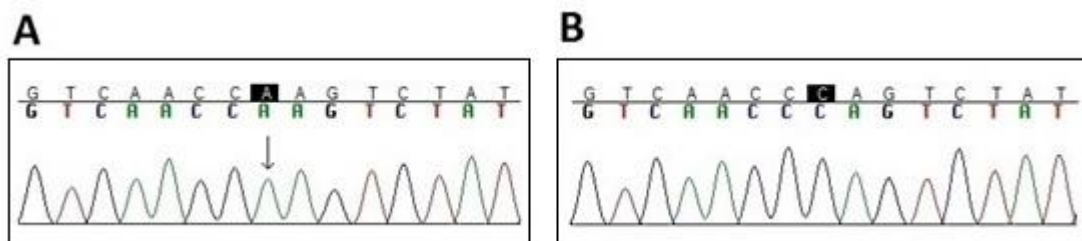


Figura 9: Eletroferograma parcial do éxon 4 do gene *HSD3B2*. (A) Mutação p.P222Q no indivíduo com deficiência de 3 β HSD. (B) Alelo normal (controle). A seta destaca o local da mutação.

5.1 CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS

Abaixo, no quadro 1, seguem as considerações adicionais aos resultados, com detalhes sobre o genótipo dos indivíduos apresentados de forma agrupada segundo sua semelhança. As imagens do sequenciamento e do MLPA de todos os pacientes são apresentadas no Apêndice B.

Quadro 1: Considerações adicionais aos resultados.

Indivíduo	Genótipos incomuns, identificados em famílias com história de consanguinidade
PS1	Inserção dos éxons 4-8 e mutação Q318X (éxon 8) em homozigose. No MLPA, o éxon 8 aparenta estar deletado em heterozigose, isso ocorre porque a inserção aumenta a fluorescência em 50% e a mutação diminui em 100%. Filho de casamento consanguíneo (primos de primeiro grau) e primo do

	PS10.
PS10	Inserção do éxon 6 e mutação Q318X em heterozigose. Primo do PS1.
VS13	Homozigoto para p.I172N. Irmão do VS14. Filhos de pais consanguíneos.
VS14	Homozigoto para p.I172N. Irmão do VS13. Filhos de pais consanguíneos.
Indivíduo	I2 Splice e mutações associadas
VS6	Hemizigoto para a mutação I2 Splice deleção dos éxons 3-6. Provável deleção do íntron 2 juntamente com o éxon 3 e por isso uma provável hemizigose.
VS7	I2 Splice e o polimorfismo S493N em heterozigose. Irmão do VS8.
VS8	I2 Splice e o polimorfismo S493N em heterozigose. Irmão do VS7.
VS10	Homozigoto para a mutação I2 Splice. Além disso, VS10 possui o polimorfismo p.S268T em homozigose.
VS11	Homozigoto para a mutação I2 Splice. O sequenciamento dos fragmentos F2Aseq e F2Bseq encontra-se em andamento; não foi realizado o MLPA. Irmão do VS12 e filhos de pais consanguíneos.
VS12	Homozigoto para a mutação I2 Splice e para p. S268T. Deleção do éxon 8 em heterozigose. Irmão do VS11 e filhos de pais consanguíneos.
PS11	Heterozigoto para I2 Splice e p.Q318X.

PS12	Heterozigoto para I2 Splice e p.I172N.
PS14	Homozigoto para a mutação I2 Splice.
Indivíduo	Genótipo com associação entre três mutações
VS5	Deleção do éxon 8, p.V281L e p. S493N em heterozigose.
VS9	Inserção do éxon 6, p.P453S e p. S268T em heterozigose.
PS5	Deleção do éxon 8, p. S268T e p. S493N em heterozigose. Filho de pais consanguíneos.
PS8	Deleção do éxon 8 e mutação I2Splice, ambas em heterozigose, o que justifica a doença. Adicionalmente, possui o polimorfismo p.R479L no éxon 10.
VS1	Mutação nonsense p.R444X, IVS2 + 5 G>A e p.V281L em heterozigose.
Indivíduo	Mutações no éxon 7 (provável conversão)
PS4	Grande deleção, englobando C4B e os éxons 1-6 e provavelmente o éxon 7 pois, as mutações presentes nesse éxon estão todas aparentando homozigose no sequenciamento, ou seja, provavelmente é uma hemizigose se esse éxon estiver deletado. Essas mutações são: a inserção de uma timina na posição g.1768 (p.F306+t), a mutação p.V281L, e as mutações sinônimas rs6477 (C>G) e rs55695018 (T>C).
PS7	Muito semelhante ao PS4, possui uma grande deleção no gene e as mutações no éxon 7 em homozigose (inserção de uma timina no nucleotídeo na posição g.1768 (p.F306+t), a mutação p.V281L, e as mutações sinônimas rs6477 (C>G) e rs55695018 (T>C)). Além disso, apresenta o polimorfismo D183E no éxon 5.

Indivíduo	Formação de quimeras
PS2	<p>Deleção total do gene em um alelo. No outro alelo, uma grande conversão da região promotora e dos éxons 1 e 2, formando a quimera CH9. No MLPA é possível visualizar a diminuição da fluorescência no <i>CYP21A2</i> e no C4B e uma diminuição maior na região do éxon 1; em contrapartida observa-se uma elevação da fluorescência do <i>CYP21A1P</i>, especialmente na sonda relativa ao éxon 1. Além disso, no sequenciamento foram detectadas as mutações, g.-126C>T, g.-113G>A, g.-110T>C, g.-103A>G e g.-4C>T na região promotora e a mutação P30L no éxon 1, todas essas patológicas e geralmente provenientes do pseudogene. Os íntrons 1 e 2 também possuem diversas mutações, porém, o segundo não apresenta a mutação I2Splice que geralmente está presente no <i>CYP21A1P</i>.</p>
VS3	<p>Duplicação total do pseudogene e do C4B. O éxon 1 do pseudogene mostra uma fluorescência acima de todas as outras sondas e o éxon 1 do gene ativo mostra uma deleção em homozigose. Formou-se uma quimera CH4 em homozigose, um evento raro, porém o indivíduo é filho de pais consanguíneos. Assim como no indivíduo PS2, VS3 apresentou no sequenciamento as mutações, g.-126C>T, g.-113G>A, g.-110T>C, g.-103A>G e g.-4C>T na região promotora e a mutação p.P30L no éxon 1 em homozigose, todas essas patológicas e geralmente provenientes do pseudogene.</p>
PS9	<p>MLPA mostra uma deleção dos éxons 1-3 no <i>CYP21A2</i> e uma</p>

	<p>duplicação nos éxons 1-3 no <i>CYP21A1P</i>, evidenciando a formação de uma quimera CH1, neste caso em heterozigose. No sequenciamento, observa-se a mutação I2 Splice em homozigose. Adicionalmente, possui o polimorfismo S493N no éxon 10.</p>
Indivíduo	<p>Mutações p.I172N/p.Q318X identificadas no sequenciamento com padrão confirmado no MLPA</p>
VS2 e VS4	<p>Ambos possuem p.I172N e p.Q318X em heterozigose e o fenótipo virilizante simples, como era esperado a partir de outros trabalhos. VS2 possui uma deleção total do pseudogene e uma duplicação de C4A.</p> <p>O MLPA confirmou as mutações encontradas no sequenciamento.</p>
Indivíduo	<p>Nova versão do E6 <i>cluster</i></p>
PS13	<p>Possui uma nova versão da mutação E6 <i>cluster</i> com mais um nucleotídeo mutado na posição g.708 C>G, formando então o <i>cluster</i> com as mutações p.I236K, p.V237E e p.M239K, além de uma mutação sinônima no aminoácido 234, c.706T>C. Adicionalmente, possui a mutação p. S268T. Tudo isso em homozigose, o que evidência uma provável hemizigose.</p>
Indivíduo	<p>Outros</p>
PS6	<p>Inserção dos éxons 1-6 e deleção do éxon 8. Não foram encontradas mutações pontuais no sequenciamento</p>
PS15	<p>Homozigoto para a mutação p.Q318X.</p>

6. DISCUSSÃO

A investigação molecular do gene *CYP21A2* é interessante, tendo em vista as peculiaridades dessa região altamente polimórfica. Segundo a definição de Concolino *et al*²⁷, em 2009, o *locus* do gene da 21-hidroxilase possui uma estrutura complexa e o *CYP21A2* é considerado um dos genes mais polimórficos no ser humano. Um grande número de mutações e polimorfismos estão presentes ao longo do gene e microdeleções/inserções são muito frequentes. Assim, o diagnóstico molecular da 21-OHD é mais complicado do que outras doenças monogênicas devido à alta variabilidade do *locus* (27).

O estudo molecular do *HSD3B2* tem sua importância pela raridade e baixa incidência de indivíduos com essa deficiência enzimática e assim é necessário conhecer mais para melhor caracterizar a doença e suas variações gênicas. Pouco se conhece, por exemplo, a respeito dos defeitos moleculares subjacentes às formas não clássicas da doença, cuja frequência populacional também não está bem definida.

Este é o primeiro estudo realizado com uma amostragem do Distrito Federal, território administrativo constituído há pouco mais de 50 anos e caracteristicamente formado por indivíduos provenientes de todas as regiões do Brasil. Sabe-se que o movimento migratório para a região de Brasília e arredores foi amplo à época da construção e inauguração da nova capital e ainda ocorre de maneira significativa frente às características sócio-demográficas e econômicas próprias dessa região. Assim, espera-se encontrar uma população geneticamente diversa, o que de fato foi demonstrado na pesquisa, tendo em vista alta taxa de 72,4% de heterozigotos compostos para o gene *CYP21A2*. Valores diferentes foram encontrados na Europa

central (Áustria, Eslovênia, Eslováquia e Hungria), 33% (28), na população turca, 34,8% (29), na Tunísia com 17,6% (30) entre outros, e valores próximos foram encontrados na Alemanha, 72,25% (31) e nos EUA, 79% (32). Mesmo considerando que os sujeitos da pesquisa pertencem a uma amostra de conveniência, formada por pacientes de um hospital universitário e composta apenas por portadores da forma clássica e em alguns casos, indivíduos com relação de parentesco, a diversidade genética é evidente.

A hipótese de que as características próprias da composição da população do DF possam ter desviado as frequências em que as mutações ocorreram nessa amostra, em comparação com outros trabalhos, deve ser considerada. É necessário considerar ainda que foram selecionados apenas pacientes com a forma clássica da deficiência de 21-hidroxilase, portanto, dentre os pacientes analisados não havia nenhum com a forma não-clássica. Isso pode ter influenciado algumas diferenças nas frequências de certas mutações, como por exemplo, a mutação p.V281L, que em vários trabalhos foi a variante mais encontrada no Brasil (33) e em outros países (34). Ela usualmente associa-se a fenótipo não-clássico, o que está de acordo com sua baixa frequência identificada nesse estudo (7,1% dos alelos).

Várias metodologias foram desenvolvidas para detectar as mutações mais comuns, incluindo PCR Alelo-específico, PCR tempo-real, Análise por DHPLC, multiplex mini-sequenciamento, entre outras. No entanto, o sequenciamento direto do DNA, de toda região codante, ainda parece ser a melhor alternativa para garantir que novas mutações não sejam perdidas (6). No presente trabalho o método de PCR-AE demonstrou baixa reprodutibilidade, pois sob as mesmas condições não obteve êxito em dias distintos para os mesmos indivíduos ou para indivíduos diferentes. Mostrou-se também muito trabalhosa, tendo em vista as numerosas

reações de PCR que eram necessárias para determinação do genótipo de um mesmo indivíduo, o que resulta em custo proporcionalmente considerável. Mais especificamente, na PCR-AE são 21 reações para cada indivíduo enquanto no sequenciamento são cinco reações. Além disso, parte dos resultados adquiridos pela PCR-AE não foram confirmadas por outra metodologia, no caso, o sequenciamento.

Diante dessa realidade, optou-se por fazer a investigação molecular das mutações de ponto apenas pela metodologia de sequenciamento automático de Sanger, ainda que a PCR-AE seja uma técnica muito utilizada e há muito tempo recomendada por cientistas de diversos centros de pesquisa do mundo. Com a maior disponibilidade do método de sequenciamento, e progressiva redução do custo, a associação dos métodos de sequenciamento e do MLPA pode se tornar uma forma mais adequada para a genotipagem dos pacientes portadores da HAC, como foi verificado no presente trabalho. A esse fato devem-se somar suas vantagens em termos de confiabilidade, de simples execução e possibilidade de detecção de todas as mutações de ponto e grandes rearranjos gênicos. Observou-se que é necessário um profundo conhecimento da genética da HAC bem como experiência específica para uma adequada interpretação dos dados gerados.

Alguns cuidados e limitações da abordagem utilizada devem ser considerados e são discutidos a seguir.

6.1 CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Jang *et al*³⁵, em 2011, mostraram que a interpretação dos resultados do sequenciamento requer cuidado, pois quando um único pico é detectado, sugerindo a ocorrência de uma mutação em homozigose, por exemplo, é sempre possível que se trate na verdade de uma hemizigose, caso haja uma grande deleção no outro alelo, levando assim a interpretação errônea. Esse fato é de extrema relevância quando se avalia regiões genômicas altamente polimórficas, como é o caso da região onde se situa o gene CYP21. Dessa forma, uma análise isolada, por metodologia única, parece ser inadequada para o diagnóstico da HAC (35).

Por outro lado, é necessário considerar que a estratégia da amplificação específica com *primers* localizados em locais onde o pseudogene possui a E3Δ8pb ou o E6 *Cluster* pode falhar, caso o indivíduo possua alguma dessas mutações, uma grande conversão que inclua essas mutações ou grandes deleções nessas regiões. Embora essa situação seja teoricamente rara, nesse caso, a amplificação não ocorreria ou só ocorreria no alelo selvagem em caso de heterozigotos, gerando um falso diagnóstico. No presente estudo, caso algum paciente fosse portador da mutação E3Δ8pb em homozigose a amplificação dos fragmentos F1 e F2 não seria concretizada, o que não ocorreu em nenhum indivíduo.

Os *primers* P19 e P45 situam-se separados por 59 pb no éxon 8. Logo, pelo delineamento da estratégia de amplificação utilizada, essa região não pôde ser explorada pelo sequenciamento. Nesse fragmento encontra-se o sítio da mutação comum p.R356W, a qual é grave e que costuma gerar o fenótipo PS. É possível que alguns indivíduos nessa casuística sejam portadores dessa mutação, a qual não pôde ser verificada. Assim, os indivíduos cujo genótipo não teve correlação com o

fenótipo perdedor de sal (n=2) deverão ser foco de investigação complementar específica para essa mutação. Tal ocorrência extrapolou o delineamento inicial do presente estudo, mas essa informação deve ser obtida futuramente e poderá ser feita de maneira simples a partir do trabalho já executado.

Pelo exposto, dentre as mutações mais comumente descritas, as que não foram encontradas neste estudo foram p.R356W e E3Δ8pb, o que ocorreu por limitações técnicas impostas pelo método selecionado. Também dentre as variantes recorrentes, a mutação p.P30L foi encontrada apenas nos indivíduos que sofreram conversões que incluíam o éxon 1, juntamente como as mutações situadas no promotor. Tais conversões foram detectadas pelo MLPA.

Concolino e colaboradores⁶, em 2010, definiram como “estressante” o uso do MLPA e que sua utilização demanda um profundo conhecimento do *CYP21A2* (6). O MLPA foi utilizado para conhecer a número de cópias do gene e identificar genes quiméricos em pacientes com HAC, num experimento único, sem necessidade de radioatividade, como ocorria anteriormente pelo uso de *Southern Blot*. Entretanto, resultados falso-positivos podem ocorrer na presença de mutações ou polimorfismos localizados perto o suficiente de regiões de ligação das sondas, evitando assim as etapas de ligação e hibridação (27).

Uma limitação teórica é que, como as sondas do MLPA para os éxons 3, 4, 6 e 8 do *CYP21A2* contém a sequência do tipo selvagem das mutações E3Δ8pb, p.I172N, E6 *cluster* e p.Q318X respectivamente, o método implica em assumir essas mutações estão presentes no pseudogene. Caso contrário, as sondas também iriam hibridar num pseudogene *CYP21A1P* “mutado”, isto é, com sequências usuais do gene e, conseqüentemente, produzindo interpretações equivocadas (36). Outra

característica a ser observada é que, se o indivíduo possuir uma dessas quatro mutações, a sonda respectiva não se ligaria nesse alelo e o resultado do MLPA aparentaria uma deleção.

6.2 “ARMADILHAS” NO DIAGNÓSTICO GENÉTICO DA DEFICIÊNCIA DA 21-HIDROXILASE: PAPEL DAS ABORDAGENS COMPLEMENTARES COM SEQUENCIAMENTO E MLPA

As ocorrências específicas mencionadas anteriormente e outras tantas apontadas a seguir só puderam ser detectadas graças à utilização de métodos moleculares complementares, direcionados à identificação de variantes pontuais ou grandes rearranjos, inserções ou deleções gênicas. Assim, verifica-se a necessidade de abordagens múltiplas e complementares, a fim de se evitar o podem ser consideradas verdadeiras “armadilhas” no diagnóstico genético da deficiência de 21-hidroxiase. De fato, “armadilhas diagnósticas” foram verificadas em alguns casos estudados, como os sujeitos VS2 e VS4, cujo genótipo é p.I172N/p.Q318X. Segundo o resultado do MLPA, esses indivíduos parecem possuir deleções no éxon 4 e 8 em heterozigose, porém esse achado é decorrente na verdade das mutações pontuais que apresentam.

Segundo o mesmo raciocínio, o indivíduo PS1, que é homozigoto para p.Q318X segundo consta no sequenciamento, deveria mostrar uma deleção do éxon 8 em homozigose, contudo o MLPA mostra uma deleção em heterozigose. Possivelmente isso ocorre porque existe uma inserção dos éxons 4 a 8, o que eleva parcialmente o sinal da fluorescência, anulando assim a queda que era esperada.

Outras situações específicas podem acontecer, por exemplo, com pacientes que apresentem um alelo com a quimera C4B/A ou C4A/B, associada à heterozigose composta com RCCX trimodular. Nesse caso, a ausência de ligação da sonda do C4 poderá gerar a interpretação errônea de uma deleção do C4B, caso o MLPA seja a única metodologia utilizada (37).

A despeito de limitações próprias, o MLPA tem se mostrado um método complementar essencial, que é capaz de preencher algumas lacunas no diagnóstico molecular. Por exemplo, os genótipos dos pacientes com HAC 21-OHD que pareciam inexplicáveis por segregação parental, no trabalho de Coeli-Lacchini *et al*³³, 2013, foram elucidados pelo uso de MLPA. Com essa técnica foi possível mostrar que os pacientes eram hemizigotos ou possuíam genes quiméricos (33).

Infelizmente, no tempo necessário à conclusão do presente trabalho, não foi possível realizar o, MLPA para os indivíduos VS1, VS11, VS13, VS14, PS11, PS12, PS13, PS14 e PS15. Isso ocorreu por limitações orçamentárias (número pré-definido de reações disponíveis) do projeto, e ainda, diante do longo tempo requerido para importação de um novo *kit*. Por este motivo, as frequências alélicas reais totais não puderam ser estabelecidas até o momento e os resultados aqui apresentados devem ser considerados ainda parciais, no que diz respeito à toda a série de indivíduos estudada. Sendo assim, a frequência das mutações em relação à quantidade total de alelos, também não revela valores definitivos.

Ainda assim, embora a frequência alélica ainda não esteja estabelecida para essa amostra de pacientes do DF, foi possível abordar esses dados por meio da avaliação das frequências das mutações em relação ao número de indivíduos portadores. A partir dessa análise, a mutação mais comum encontrada foi a I2 Splice

ocorrendo em 34,5% dos indivíduos, seguida da mutação p.Q318X em 20,7%, p.I172N, p. S268T e p. S493N em 17,2%, p.V281L em 13,8% e F306+t em 6,9%. As mutações, p.L12M, IVS2+5G>A, p.D183E, E6 *Cluster*, p.R444X, p.P453S e p.R479L foram encontradas em apenas 1 indivíduo cada (3,4%).

Nessa mesma linha, os grandes rearranjos podem ser analisados em relação ao número de indivíduos, porém, somente com aqueles cujo MLPA foi realizado. Sendo assim, as deleções foram encontradas em 40,0% dos indivíduos, inserções foram encontradas em 20% e grandes conversões em 15% dos indivíduos. Dentre essas deleções encontradas, destaca-se a deleção do éxon 8 que foi verificada em 5 indivíduos que não apresentam a mutação p.Q318X, a qual poderia confundir a interpretação do MLPA. Além disso, a deleção dos éxons 3-6 ocorreu em dois casos e a grande deleção do fragmento englobando C4B e os éxon 1-6 foi encontrada em um indivíduo. A deleção total do gene, um evento raro, também foi verificada em um indivíduo. Trabalhos brasileiros, argentinos e mexicanos mostram uma baixa frequência da deleção total do gene em comparação a outras populações mundiais (33, 38, 39, 40).

Neste estudo, o resultado do MLPA também evidenciou a fusão do pseudogene com o gene nos indivíduos PS2 e VS3. Curiosamente, a interpretação inicial do sequenciamento, revelou a mutação p.P30L em homozigose no éxon 1 dos dois indivíduos, além de diversas mutações sinônimas nos éxons 1 e 2 e mutações nos íntrons 1 e 2. Entretanto, esse achado não justificaria o fenótipo (PS e VS) dos pacientes, uma vez que esta mutação é sabidamente associada à forma não-clássica. Diante da inconsistência da interpretação inicial do sequenciamento em relação ao fenótipo, análise subsequente e mais detalhada permitiu determinar a presença das mutações g.-126C>T, g.-113G>A, g.-110T>C, g.-103A>G e g.-4C>T

na região promotora do gene, já descritas como patogênicas (41). Essas variantes no promotor justificam a forma virilizante simples de VS3, de maneira idêntica ao caso descrito no trabalho de Araújo *et al*⁴¹ em 2005, no qual o fenótipo virilizante simples, equivocadamente associado à presença da mutação p.P30L, era na verdade decorrente de mutações na região promotora (41). Entretanto, tais mutações ainda não justificavam a forma perdedora de sal de PS2. Com a realização do MLPA nesses casos, foi possível observar a deleção total de um dos alelos do *CYP21A2* de PS2, com a transferência de toda a região “promotor/éxon 1/íntron 1/éxon 2/parte de íntron 2” do pseudogene, que passou a incorporar-se no gene ativo. Assim formaram-se a quimera CH9 em hemizigose no PS2, e a homozigose de CH4 em VS3, que é filho de pais consanguíneos. Chang e colaboradores⁴², em 1995 demonstraram que as mutações provenientes do promotor do *CYP21A1P*, quando inseridas junto ao gene ativo, reduzem a atividade transcricional do *CYP21A2* para 20% (42), enquanto a variante p.P30L reduz a atividade enzimática para 30%. Conseqüentemente, a associação das mutações no promotor mais a p.P30L geram o fenótipo virilizante simples (41).

Os resultados de MLPA também evidenciam a formação da quimera CH1 no indivíduo PS9 em heterozigose, pois as sondas para os éxons 1 e 3 estão duplicadas no pseudogene e deletadas no gene ativo (Apêndice B).

Os indivíduos PS4 e PS7 apresentam o mesmo padrão de mutações no éxon 7, englobando a inserção de uma timina na posição g.1768 (p.F306+t), a mutação p.V281L, e as mutações sinônimas rs6477 (C>G) e rs55695018 (T>C), todas elas em homozigose. Já o MLPA mostrou que alguns éxon, incluindo o éxon 6,, possivelmente, e o éxon 7, estão deletados em heterozigose. Isso sugere que o outro alelo está deletado e essa aparente homozigose é, na verdade, uma

hemizigose. Esse grupo de mutações presentes no mesmo éxon também sugere que tenha ocorrido uma conversão, transferindo uma parte do pseudogene, juntamente com as diversas mutações, para o éxon 7 do gene ativo. O mesmo evento foi descrito no trabalho de Friães *et al*⁴³, em 2006, baseado apenas nas mutações p.V281L e p.F306+t. Adicionalmente, PS7 possui uma mutação rara, D183E, descrita em indivíduos aleatórios não afetados na população espanhola pelo trabalho de Parajes e colaboradores⁴⁴, em 2008. A presença dessa mutação não mostrou alteração funcional na enzima produzida após transfecção *in vitro* (45).

6.3 OUTROS ACHADOS RELEVANTES

Curiosamente, em 82,1% dos indivíduos foi identificada a inserção de três nucleotídeos na éxon 1. Os nucleotídeos T-G-C são inseridos numa região onde estão situados quatro códons CTG, que codificam o aminoácido Leucina. Assim, onde havia a sequência de quatro aminoácidos iguais (leucinas), há cinco, o que aparentemente não causa grande mudança na conformação da proteína, pois esta inserção não é patogênica. Essa inserção ocorre próximo ao domínio hidrofóbico N-terminal e também ocorre em elevada frequência em outras populações (46). No entanto, observou-se que essa inserção gera uma problemática com relação à nomenclatura das mutações, pois se ela estiver presente, o aminoácido 30, por exemplo, será o 31, e a mutação p.P30L deverá ser apresentada como p.P31L. Essa divergência é comum nos trabalhos sobre o *CYP21A2* e torna evidente a necessidade de atualização e padronização das sequências referências e nomenclatura das mutações nos bancos de dados genéticos. Por outro lado, considerando o enorme volume de informações geradas e genótipos obtidos em

trabalhos realizados em todo o mundo, é esperada grande dificuldade e tempo para uma compilação mais adequada desses dados.

Os indivíduos VS10 e VS12 possuem as mutações I2 Splice e p. S268T em homozigose. O MLPA é normal no VS10, enquanto o VS12 apresenta uma deleção do éxon 8. Tendo em vista a informação obtida em anamnese de que eles não são filhos de pais consanguíneos, esse genótipo seria raro, apontando para a necessidade de investigações complementares nesses indivíduos, especificamente para a mutação E3Δ8pb. Entretanto, o fenótipo por eles apresentado (VS) não sugere a presença de uma mutação tão severa como a deleção de 8 pares de bases. Assim, o mais indicado é que seja feito o estudo de segregação parental.

No indivíduo PS9 a quimera formada resultou na transferência dos éxons 1-3 do pseudogene para um dos alelos do gene ativo. Nessa situação, é muito provável que a transferência tenha incluído a mutação E3Δ8pb, justificando assim o fato das mutações I2 Splice, no intro 2 e p. S493N no éxon 10 aparentarem homozigose. O mesmo ocorre com o VS6, onde o éxon 3 foi deletado e a mutação I2 Splice aparenta homozigose pelo sequenciamento. Não é possível descartar que condições semelhantes tenham contribuído para a elevada frequência alélica identificada em estudos anteriores da mutação I2 Splice e em associação a fenótipos muito diferentes. Na verdade, considerações sobre “armadilhas” diagnósticas desse tipo mediadas por grandes fenômenos de conversão e fusão gênicas ainda são escassas na literatura, embora venham ganhando importância cada vez maior.

De toda forma, a mutação I2 Splice, a mais frequente na presente análise, ocorreu em 25,0% dos alelos estudados e em 34,5% dos indivíduos analisados, englobando um terço das formas perdedoras de sal e 42,9% das formas virilizantes

simples. Além disso, foi a mutação mais comum em ambas as formas, resultado semelhante ao trabalho de Bas *et al*²⁹ em 2009, na população da Turquia. Em outros estudos brasileiros, com a população dos estados de Goiás (21) e de São Paulo (19), a mutação I2 Splice também se mostra a mais frequente. Ela ocorre no nucleotídeo g.655, 13 nucleotídeos antes do início do éxon 3, onde o nucleotídeo ancestral C ou o polimorfismo A são trocados por uma Guanina, modificando o sítio de *Splicing*. A atividade enzimática residual varia entre 0-1% tendo em vista as formas aberrantes produzidas. Como consequência, atribui-se a ela uma grande variação fenotípica. Em outro estudo realizado no Brasil, com a população proveniente do nordeste (Sergipe), foi demonstrado que a mutação mais comum foi a p.Q318X, com uma alta frequência, afetando 25,7% dos alelos, levantando a suspeita de um fenômeno de efeito fundador (20). No presente estudo, essa mutação atingiu 16% dos alelos (20,7% dos indivíduos).

No trabalho de Wilson *et al*¹, em 2007, é relatada a ausência de correlação genótipo-fenótipo em pacientes com a mutação I2 Splice. Atribuiu-se esse fato aos diferentes efeitos sobre o *splicing* do RNA (1). Interessantemente, no presente estudo, 7 dos 11 (63,3%) indivíduos portadores dessa mutação não apresentaram correlação entre o genótipo e o fenótipo esperado.

A tabela 9 mostra as frequências das mutações em três estudos realizados com a população brasileira em diferentes regiões (estados), em comparação com as frequências encontradas nesta pesquisa.

Tabela 9: Comparação entre a frequência das mutações nos trabalhos brasileiros realizados em diferentes estados da federação.

Mutações	Brasília 2013*	Goiás (21)	Sergipe (20) **	São Paulo (19)
Alelos				
estudados	56	38	26	410
Mutações		Percentual dos alelos (%)		
I2 Splice	25,0	33,0	14,3	34,0
p.Q318X	16,0	15,5	25,7	7,3
p.I172N	12,5	8,9	14,3	14,0
p.R356W	-	15,5	14,3	11,0
p.V281L	7,1	6,7	17,1	18,0
p.F306+t	3,5	4,4	-	3,0
E6 <i>cluster</i>	1,7	0,0	-	0,0
p.P453S	1,7	-	-	1,0
E3Δ8pb	-	0,0	-	1,7
p.P30L	3,5#	0,0	-	1,0
Grandes				
rearranjos	28,4	17,7	-	33,0
gênicos				

*estudo somente com a forma clássica; **não realizou o estudo de grandes rearranjos; #encontrado junto a conversões; - mutação não pesquisada.

6.4 RESULTADOS AINDA NÃO DESCRITOS (NOVOS ACHADOS)

O indivíduo PS13 possui uma nova versão da mutação E6 *Cluster* que inclui as mutações c.706T>C (sinônima), p.I236K (diferente do tradicional p.I236N), p.V237E e p.M239K. Essa combinação não foi descrita até o momento. Além dessas, PS13 também possui o polimorfismo p.S268T, todas em homozigose, evento raro para um filho de pais não-consanguíneos (segundo anamnese). Nesse indivíduo, o MLPA ainda não foi realizado, portanto não foi possível ainda descartar que ele possua a mutação E3 Δ 8pb ou uma grande deleção que envolva o éxon 3, ambas fortemente prováveis. Isso justificaria tantas mutações em homozigose pelo sequenciamento, o que pode ser considerado um critério para investigação adicional ou complementar.

A mutação p.L12M não consta nos bancos de dados genéticos públicos (**HGMD, 1000Genomes, PubMed**). O sítio da leucina 12 é altamente conservado e essa alteração para metionina provavelmente altera a conformação da proteína. No ensaio realizado no *software* PolyPhen-2 a previsão para essa mutação foi provável deletéria. Juntamente com a mutação p.Q318X ela confere o fenótipo PS do indivíduo PS3. Essa mutação está posicionada ao lado da inserção do TGC no éxon1.

6.5 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO DUVIDOSA OU INEXISTENTE

Os indivíduos VS5, VS9 e PS5 possuem os genótipos em que não foi possível correlacionar com um fenótipo específico. Nos três indivíduos, foram identificadas três mutações distintas, um rearranjo grave e duas mutações *missense* amenas. Se essas mutações de ponto ocorressem no mesmo alelo, haveria então a troca de dois aminoácidos na sequência da proteína e isso poderia afetá-la de tal forma que a atividade enzimática residual fosse tão reduzida que justificaria os fenótipos apresentados. Assim, o efeito sinérgico de duas mutações poderia levar ao decréscimo da atividade enzimática (28). Concordante com essa hipótese, VS5 possui o genótipo com uma deleção e as mutações p.V281L e p. S493N, todos em heterozigose. A mutação p.V281L está relacionada a forma NC, mas se no mesmo alelo estiver a mutação *missense* p.S493N e no outro a deleção isso pode gerar o fenótipo VS. Da mesma forma, VS9 possui uma inserção e as mutações p.P453S e p.S268T, todas em heterozigose. A mutação p.P453S gera um fenótipo NC, mas, em associação com p.S268T no mesmo alelo, seus efeitos ainda são desconhecidos. Possivelmente poderiam justificar a forma VS apresentada.

Finalmente, PS5 (filho de pais consanguíneos) possui uma deleção e as mutações não associadas à patogenia, p. S268T e p. S493N, todas em heterozigose. Se elas ocorressem no mesmo alelo, talvez pudessem justificar o fenótipo PS. No entanto, este é um alvo para investigação da mutação p.R356W, a qual não pode ser identificada por meio da estratégia de amplificação utilizada nesse trabalho, como mencionado anteriormente. Em outros trabalhos, foi observado que 7% (19), 14,3%(20) e 15%(21) dos alelos apresentam duas ou mais mutações. No presente estudo, foi identificado que 42,8% dos alelos possuem pelo menos duas

mutações, o que pode estar associado à grande heterogeneidade genética da população do DF.

No indivíduo PS12, não houve correlação entre o genótipo e o fenótipo, já que a combinação das mutações em heterozigose I2 Splice com p.I172N geralmente é associada a forma virilizante simples. Assim, esse também é um alvo para a investigação da mutação p.R356W e de grandes rearranjos por MLPA.

Na mutação *nonsense* p.R444X ocorre uma troca do códon CGA por TGA, ou seja, forma-se um códon de parada que gera uma proteína truncada, sem os últimos 50 aminoácidos. O indivíduo VS1 possui essa mutação em heterozigose, associada às mutações IVS2+5G>A e p.V281L também em heterozigose. O nucleotídeo +5 no íntron 2 é o mais conservado desse sítio e a presença da mutação IVS2+5G>A suprime o sítio de *splicing* provocando formas aberrantes (43). As variantes p.R444X e IVS2+5G>A foram descritas pela primeira vez na população portuguesa no trabalho de Friães *et al*⁴³, em 2006, porém em indivíduos com a forma PS. No mesmo ano, p.R444X foi encontrada em elevada frequência na população espanhola, em indivíduos PS e NC, sempre em heterozigose, o que sugere um provável efeito fundador naquela região (34). É importante resaltar que essas duas populações foram protagonistas na colonização e habitação do território brasileiro, e por consequência, na formação genética do país. Também em 2006, Krone *et al*⁴⁷ encontraram p.R444X na população alemã (47). Entretanto, diferentemente dos raros casos descritos na literatura, o indivíduo VS1 possui o fenótipo virilizante simples, sem histórico de perda de sal. Nesse caso, a correlação genótipo-fenótipo é de difícil avaliação, pois o fenótipo esperado para as mutações que ele apresenta ainda não estão bem estabelecidas.

Os irmãos VS7 e VS8 possuem o mesmo genótipo composto pelas mutações I2 Splice e p. S493N em heterozigose, essa última descrita como não patogênicas. Assim, não existe correlação entre o fenótipo-genótipo, já que eles são virilizantes simples.

No presente estudo, correlação genótipo-fenótipo foi observada em 75,8% dos indivíduos (22 dos 29 pacientes), sendo 86,6% nos pacientes PS e 64,3% nos pacientes VS. Apenas os indivíduos portadores da mutação p.I172N obtiveram boa correlação dentre os VS, corroborando os dados da literatura.

Esses resultados contrapõe-se a outros estudos brasileiros, 96,4%(33) e mundiais, 92,9% (43) e 88,9% (32). Pode ainda ter sido influenciado pelo significativo número de genótipos ainda incompletos, nos quais ainda não foi possível obter o resultado do MLPA. Nos indivíduos com a forma PS, a não correlação pode ainda estar relacionada à presença de mutação não detectada na região de 59 pb que não foi avaliada nesse estudo.

De toda forma, é também necessário considerar que mutações na enzima P450 oxidoreductase (POR), que interage com a 21-OH e transfere elétrons para o NADP, pode modular o fenótipo na 21-OHD (48).

Por fim, é digno de nota que pacientes com mutações graves e que não apresentam sinais significativos de perda de sal podem apresentar mecanismos compensatórios como, por exemplo, a grande ingestão de sódio, alta sensibilidade dos receptores de mineralocorticóides ou ainda atividade elevada de outra enzima que efetue a hidroxilação da progesterona na posição 21 (3). As enzimas hepáticas CYP2C19 e CYP3A4 possuem essa capacidade de “21-hidroxilar” a progesterona com a eficiência em relação a 21-OH de 17% e 10% respectivamente. Como a

adrenal produz muito menos aldosterona do que cortisol, baixas quantidade de hidroxilação da posição 21 da progesterona são suficientes para o balanço hidroeletrólítico (49). Assim, a ação dessas enzimas pode modificar o fenótipo esperado, dependendo das condições necessárias envolvidas para a expressão delas nos indivíduos afetados.

6.6 DEFICIÊNCIA DA 3 β -HIDROXIESTEROIDE DESIDROGENASE TIPO 2

Com relação à deficiência da 3 β -HSD, com o presente trabalho foi possível identificar o defeito genético associado à condição de HAC da criança afetada. Trata-se do primeiro relato de uma criança portadora de HAC por deficiência de 3 β -HSD, cujo diagnóstico foi confirmado pelo genótipo e cuja suspeição foi proveniente do teste de Triagem Neonatal, por ocasião de um valor alterado de 17-OHP.

Embora a triagem neonatal tenha por objetivo a detecção das formas clássicas da deficiência da 21-OH, a elevação da 17OHP pode ser encontrada também em outras formas de HAC, como foi aqui demonstrado. Esse achado ressalta que a sensibilidade desse teste para detecção de outros defeitos enzimáticos ainda não foi estabelecida (50). O aumento da 17-OHP plasmática provavelmente se deve ao fato de uma conversão periférica do excesso de esteroides Δ 5 (17-hidroxipregnelona, pregnelona e DHEA) pela isoenzima *HSD3B* situada em outros tecidos. Os valores de androstenediona e testosterona provavelmente também estão maiores que o esperado.

O paciente descrito é homocigoto para a mutação p.P222Q o que confirma o diagnóstico clínico e laboratorial, em indivíduo 46XY com genitália ambígua e desidratação.

A mutação apresentada resulta em troca de aminoácido que gera uma mudança no sítio de ligação com o substrato, reduzindo a atividade da proteína (51). Este resíduo se manteve conservado entre vários mamíferos (51, 52) o que demonstra seu papel crítico no correto funcionamento da enzima. Outra mutação descrita na mesma posição, p.P222T, foi associada a pubarca precoce, porém ausência de perda de sal. O estudo funcional *in vitro* sugeriu total instabilidade da proteína anômala, uma vez que a mesma não foi detectada, o que levanta a suspeita de outros mecanismos envolvidos na estabilidade proteica (53).

A mutação p.P222Q no gene *HSD3B2* foi descrita primeiramente em uma família da Argélia, constituída por dois irmãos, 46XY e 46XX, portadores da forma clássica da deficiência de 3 β -HSD (18). Desde então, ela foi detectada apenas em trabalhos brasileiros, apresentando o mesmo quadro clínico (51, 54, 55, 56).

O caso descrito aqui corrobora a forte correlação entre o genótipo e o fenótipo associado à mutação p.P222Q no gene *HSD3B2* que gera a forma perdedora de sal e levanta a discussão a respeito da sensibilidade dos testes de triagem e possível papel prático, ainda que secundário, para identificação precoce dos casos de formas mais raras de HAC, como a deficiência de 3 β -HSD.

7. CONCLUSÃO

O estudo dos mecanismos genéticos causadores da hiperplasia adrenal congênita são importantes para a compreensão dos aspectos clínicos e da diversidade fenotípica entre os pacientes.

Os resultados obtidos no estudo do gene CYP21 por meio de sequenciamento genético e MLPA nessa série de 29 indivíduos portadores de HAC residentes no Distrito Federal permitiram concluir que:

- Diversos defeitos genéticos associados às formas perdedora de sal e virilizante simples da deficiência de 21-hidroxilase foram identificados: 14 mutações de ponto, comuns e raras, e diversas recombinações gênicas, sendo 8 deleções e 4 inserções e 4 quimeras. Dentre as mutações de ponto, foi identificada a mutação p.L12M não descritas nos bancos de dados disponíveis, em 1 indivíduo portador da forma perdedora de sal, e uma nova variante do E6 *cluster*, que inclui as mutações p.I236K, p.V237E e p.M239K.
- Os genótipos obtidos foram bastante heterogêneos e complexos. Sua determinação adequada requer análise detalhada do padrão das variantes genéticas encontrado.
- Verificou-se ampla variabilidade genotípica entre os sujeitos estudados, o que é esperado considerando as características próprias da população do Distrito Federal, constituída de indivíduos procedentes de várias regiões do Brasil.
- As mutações que apresentaram maior frequência alélica nessa amostra de portadores das formas clássicas de 21-hidroxilase foram I2 Splice (25%),

p.Q318X (16%) e p.I172N (12,5%). Nos alelos estudados com o MLPA, 28,4% apresentou grandes rearranjos gênicos.

- Foi possível estabelecer correlações genótipo-fenótipo em 75,8% dos casos. Nos demais casos, a conclusão do estudo do gene, incluindo os resultados do MLPA e sequenciamento da região onde se situam as mutações E3Δ8pb e p.R356W é necessária, além da análise de segregação familiar em casos particulares.

- A população estudada apresenta variabilidade genética, observada com a alta frequência de indivíduos heterozigotos compostos (72,4%), fato que ilustra a diversidade da população do Distrito Federal.

- A associação entre as técnicas de sequenciamento automático e do Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification – MLPA foi essencial para determinação precisa dos genótipos.

O estudo do gene HSD3B2, por meio de sequenciamento, em um indivíduo com fenótipo compatível com deficiência de 3β-HSD inicialmente sugerida por um teste positivo na Triagem Neonatal revelou a presença da mutação p.P222Q em homozigose, o que justifica o fenótipo apresentado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wilson RC, Nimkarn S, Domic M, Obeid J, Azar M, Najmabadi H, Safari F, New MI. Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metabol.* 2007; 90:414-421.
2. Krone N, Arlt W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009; 23:181–192.
3. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev.* 2000; 21:245–291.
4. Speiser PW et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95:4133–4160.
5. Villegre DB. The development of steroidogenesis. *Am J Med* 1972; 53:533–544. *in* Nimkarn S, New MI. Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 300:192–196.
6. Concolino P, Mello E, Zuppi C, Capoluongo E. Molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: an update of new *CYP21A2* mutations. *Clin Chem Lab Med.* 2010; 48(8):1057–1062.
7. Pinto G, Tardy V, Trivin C, Thalassinou C, Lortat-Jacob S, Nihoul-Fekete C, Morel Y, Brauner R. 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.
8. Yang Z, Mendoza AR, Welch TR, Zipf WB, Yu CY. 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* 1999; 274:12147–12156.

9. Tsai LP, Cheng CF, Chuang SH, Lee HH. Analysis of the CYP21A1P pseudogene: indication of mutational diversity, and CYP21A2-like, and duplicated CYP21A2 genes. *Anal Biochem.* 2011; 413(2):133-141.
10. Wedell A, Thilen A, Ritzen EM, Stengler B, Luthman H. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78:1145–1152.
11. Lee HH. CYP21 mutations and congenital adrenal hyperplasia. *Clin Genet.* 2001; 59:293–301.
12. New MI, Abraham M, Gonzalez B, Dumic M, Razzaghy-Azar M, Chitayat D, Sun L, Zaidi M, Wilson RC, Yuen T. Genotype–phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Pnas.* 2013; 110(7):2611–2616.
13. Tusie-Luna MT, White PC. Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci.* 1995; 92:10796–800.
14. Jaatinen T, Chung EK, Ruuskanen O, Lokki ML. An unequal crossover event in RCCX modules of the human MHC resulting in the formation of a TNXB/TNXA hybrid and deletion of the CYP21A. *Hum Immunol.* 2002; 63(8):683–689.
15. Hu X, Worton RG. Partial gene duplication as a cause of human disease. *Hum Mutat.* 1992; 1(1):3-12.
16. Lee HH. Chimeric CYP21P/CYP21 and TNXA/TNXB genes in the RCCX module. *Mol Genet Metab.* 2005; 84:4–8.
17. Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH. Molecular Biology of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4-isomerase Gene Family. *Endoc Rev.* 2005; 26(4):525-582.

18. Moisan AM, Ricketts ML, Tardy V, Desrochers M, Mebarki F, Chaussain JL, Cabrol S, Raux-Demay MC, Forest MG, Sippell WG, Peter M, Morel Y, Simard J. New insight into the molecular basis of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: identification of eight mutations in the HSD3B2 gene in eleven patients from seven new families and comparison of the functional properties of twenty-five mutant enzymes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:4410–4425.
19. Bachega TASS, Billerbeck AEC, Parente, EB, Lemos-Marini SHV, Baptista MTM, Mello MP, et al. Estudo multicêntrico de pacientes brasileiros com deficiência da 21-hidroxilase: correlação do genótipo com o fenótipo. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004; 48:697-704.
20. Campos VC, Pereira RMC, Torres N, Castro M, Aguiar-Oliveira MH. High frequency of Q318X mutation in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Northeast Brazil. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009; 53(1):40-46.
21. Silveira EL, Elnecave RH, dos Santos EP, Moura V, Pinto EM, van der Linden I, Mendonca BB, Bachega TASS. Molecular analysis of *CYP21A2* can optimize the follow-up of positive results in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Clin Genet*. 2009; 76: 503–510.
22. Lutfallah C, Wang W, Mason JI, Chang YT, Haider A, Rich B, Castro-Magana M, Copeland KC, David R, Pang S. Newly proposed hormonal criteria via genotypic proof for type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:2611–2622.
23. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res*. 1988; 16(3):1215.
24. Wedell A, Luthman H. Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. *Hum Mol Genet* 1993; 2:499–504.

25. Jeandron D, Sahakitrungruang T. A Novel Homozygous Q334X Mutation in the HSD3B2 Gene Causing Classic Deficiency: An Unexpected Diagnosis after a Positive Newborn Screen for 21-Hydroxylase Deficiency. *Horm Res Paediatr.* 2012; 77:334-338.
26. 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.* 1992; 89:7232-7236.
27. Concolino P, Mello E, Toscano V, Ameglio F, Zuppi C, Capoluongo E. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for the detection of CYP21A2 gene deletions/duplications in congenital adrenal hyperplasia: first technical report. *Clin Chim Acta.* 2009; 402:164–170.
28. Dolzan V, Solyom J, Fekete G, Kovacs J, Rakosnikova M, Votava F, Lebl J, Pribilincova Z, Baumgartner-Parzer SM, Riedl S, Waldhauser F, Frisch H, Stopar-Obreza M, Krzisnik C, Battelino T. Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. *Euro J Endocrinol.* 2005; 153:99–106.
29. Bas F, Kayserili H, Darendeliler F, Uyguner O, Günöz H, Yüksel-Apak M, Atalar F, Bundak R, Wilson RC, New MI, Wollnik B, Saka N. CYP21A2 Gene mutations in Congenital Adrenal Hyperplasia: Genotype-phenotype correlation in Turkish children. *J Clin Res Ped Endo.* 2009; 1(3):116–128.
30. Kharrat M, Tardy V, M'Rad R, Maazoul F, Jemaa LB, Refai M, Morel Y, Chaabouni H. Molecular genetic analysis of Tunisian patients with a classical form of 21-hydroxylase deficiency: Identification of four novel mutations and high prevalence of Q318X mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:368-374.
31. 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.

32. Finkelstein GP, et al. Comprehensive genetic analysis of 182 unrelated families with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(1):161–172.
33. Coeli-Lacchini FB, et al. A rational, non-radioactive strategy for the molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Gene.* 2013; *Article in press.*
34. Loidi L, et al. High variability in CYP21A2 mutated alleles in Spanish 21-hydroxylase deficiency patients, six novel mutations and a founder effect. *Clin Endocrinol.* 2006; 64(3):330–336.
35. Jang JH, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification assay for diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Ann Clin Lab Sci.* 2011; 41:44–47.
36. Concolino P, Mello E, Minucci A, Giardina B, Capoluongo E. Genes, pseudogenes and like genes: The case of 21-hydroxylase in Italian population. *Clin Chim Acta.* 2013; 424:85–89.
37. Coeli FB, Soardi FC, Bernardi RD, Araújo M, Paulino LC, Lau IF, Petroli RJ, Lemos-Marini SHV, Baptista MTM, Guerra-Júnior G, de-Mello MP. Novel deletion alleles carrying *CYP21A1P/A2* chimeric genes in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *BMC Medical Genetics.* 2010.
38. Bachega TASS, et al. Low frequency of CYP2B deletions in Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Hered.* 1999; 49:9–14.
39. 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.
40. Tusie-Luna MT, et al. Low frequency of deletion alleles in patients with steroid 21-hydroxylase deficiency in a Mexican population. *Hum Genet.* 1996; 98:376–379.

41. Araújo RS, Billerbeck AEC, Madureira G, Mendonça BB, Bachega TASS. Substitutions in the CYP21A2 promoter explain the simple virilizing form 21-hydroxylase deficiency in patients harbouring a P30L mutation. *Clin Endocrinol.* 2005; 62:132-6.
42. Chang SF, Chung BC. Differences in transcriptional activity of two homologous CYP21A genes. *Mol Endocrinol.* 1995; 9:1330–1336.
43. Friães A, Rego AT, Aragues JM, Moura LF, Mirante A, Mascarenhas MR, Kay TT, Lopes LA, Rodrigues JC, Guerra S, Dias T, Teles AG, Goncalves J. 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.
44. Parajes S, Quinteiro C, Domínguez F, Loidi L. High frequency of copy number variations and sequence variants at CYP21A2 locus: implication for the genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. *PLoS One.* 2008; 3:2138.
45. Higashi Y, Hiromasa T, Tanae A, Miki T, Nakura J, Kondo T, Ohura T, Ogawa E, Nakayama K, Fujii-Kuriyama Y. Effects of individual mutations in the P-450(C21) pseudogene on the P-450(C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biochem.* 1991; 109:638-644.
46. Blaskó B, Bánlaki Z, Gyapay G, Pozsonyi E, Sasvári-Székely M, Rajczy K, Füst G, Szilágyi A. Linkage analysis of the C4A/C4B copy number variation and polymorphisms of the adjacent steroid 21-hydroxylase gene in a healthy population. *Mol Immunol.* 2009; 46(13):2623-9.
47. Krone N, Riepe FG, 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.
48. Scott RR, Gomes LG, Huang N, Vliet VG, Miller WL. Apparent manifesting heterozygosity in P450 oxidoreductase deficiency and its effect on coexisting 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:2318–2322.

49. Gomes LG, Huang N, Agrawal V, Mendonça BB, Bachega TA, Miller WL. Extraadrenal 21-hydroxylation by CYP2C19 and CYP3A4: effect on 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94:89–95.
50. Kösel S, Burggraf S, Fingerhut R, Dörr HG, Roscher AA, Olgemöller. Rapid second-tier molecular genetic analysis for congenital adrenal hyperplasia attributable to steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Chem.* 2005; 51:298-304.
51. Lusa ALG, Lemos-Marini SHV, Soardi FC, Ferraz LFC, Guerra-Júnior G, Mello MP. Structural aspects of the p.P222Q homozygous mutation of HSD3B2 gene in a patient with congenital adrenal hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2010; 54(8):768-774.
52. Morel Y, Mébarki F, Rhéaume E, Sanchez R, Forest M, Simard J. Structure-function relationships of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Steroids* 1997; 62:176-184.
53. Pang S, Wang W, Rich B, David R, Chang YT, Carbutaru G, Myers SE, Howie AF, Smillie KJ, Mason JI. A novel nonstop mutation in the stop codon and a novel missense mutation in the type II 3 β - Hydroxysteroid Dehydrogenase (3 β -HSD) gene causing, respectively, nonclassic and classic 3 β -HSD Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(6):2556–2563.
54. Mendonca B, Russel A, Vasconcelos-Leite M, Arnhold I, Bloise W, Wajchenberg B, et al. Mutation in 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II associated with pseudohermaphroditism in males and premature pubarche or cryptic expression in females. *J Mol Endocrinol.* 1994;12:119-22.
55. Marui S, Castro M, Latronico AC, Elias LLK, Arnhold IJP, Moreira AC, Mendonça BB. Mutations in the type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3B2) gene can cause premature pubarche in girls. *Clin Endocrinol* 2000; 52:67-75.
56. Mermejo L, Elias L, Marui S, Moreira A, Mendonca B, de Castro M. Refining hormonal diagnosis of type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency in patients with premature pubarche and hirsutism based on HSD3B2 genotyping. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(3):1287-93.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília – FS/UnB

O(a) senhor(a) _____, ou o responsável legal pelo paciente _____ está sendo convidado a participar da pesquisa: **“Estudo molecular de genes relacionados ao diagnóstico, evolução e resposta ao tratamento em indivíduos portadores de hiperplasia adrenal congênita”** que tem como objetivo caracterizar o perfil das mutações da Hiperplasia Adrenal Congênita e correlacioná-lo com as características clínicas da doença nos pacientes do Hospital Universitário de Brasília (HUB). Para tanto, será necessária uma amostra de sangue que será coletada durante a realização de exames periódicos solicitados para o acompanhamento habitual da doença (Hiperplasia Adrenal Congênita) e que não acarreta riscos à saúde. As informações pessoais a respeito da doença em estudo serão coletadas durante as consultas ou na forma de revisão de prontuário.

A partir do material colhido será realizado um exame de laboratório para definir o diagnóstico molecular da doença. Este exame poderá identificar alterações no DNA que possam estar relacionadas a essa doença ou que possam ajudar a definir melhor o tratamento. O DNA é a substância presente em todo o nosso organismo que é responsável pelas características individuais que podem ser herdadas de pais para filhos. O DNA obtido a partir do material colhido do sangue será guardado por tempo indeterminado e ficará sob a responsabilidade dos pesquisadores responsáveis por esse estudo. Esse DNA estocado poderá ser utilizado futuramente exclusivamente para estudos semelhantes a este, isto é, para realização de exames para identificar alterações que possam ser relacionadas a hiperplasia adrenal congênita ou que ao seu tratamento.

A provável aplicação prática dos resultados do estudo será no aconselhamento e tratamento de gestações de alto risco dos pacientes envolvidos.

As informações pessoais colhidas para o estudo em consultas ou durante a coleta de sangue não acarretará em tempo adicional de permanência no HUB.

O(A) senhor(a) terá a qualquer momento as informações sobre possíveis riscos e benefícios da pesquisa, para que não fique nenhuma dúvida, e a qualquer momento poderá desistir da participação no estudo ou se recusar a responder qualquer questão que lhe traga constrangimento sem que haja prejuízo ao tratamento nesta instituição.

No caso de dúvida, o sr (a) poderá entrar em contato com a pesquisadora Renata Santarem de Oliveira (médica) nos telefones 34485234 (Pediatria) ou 99877786.

Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB: 3107 1947.

O resultado do exame será confidencial e em nenhum momento o nome do paciente irá aparecer. Ademais, todas as informações ficarão sob a guarda da pesquisadora Renata Santarem de Oliveira.

Os dados coletados serão utilizados somente para pesquisa e os resultados serão veiculados através de artigos científicos em revistas especializadas e/ou em encontros científicos e congressos, sem nunca tornar possível a sua identificação.

O termo de consentimento se encontra redigido em duas vias, sendo uma para o participante e outra para o pesquisador.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar da presente pesquisa.

Data _____/_____/_____

Assinatura do paciente ou responsável

Paciente:

Responsável Legal:

Natureza (parentesco, tutor):

Fone: ()

Data _____/_____/_____

Rubrica do paciente (se não competente legal)

Data _____/_____/_____

Assinatura do(a) pesquisador(a)

Vitor Guilherme Brito de Araújo

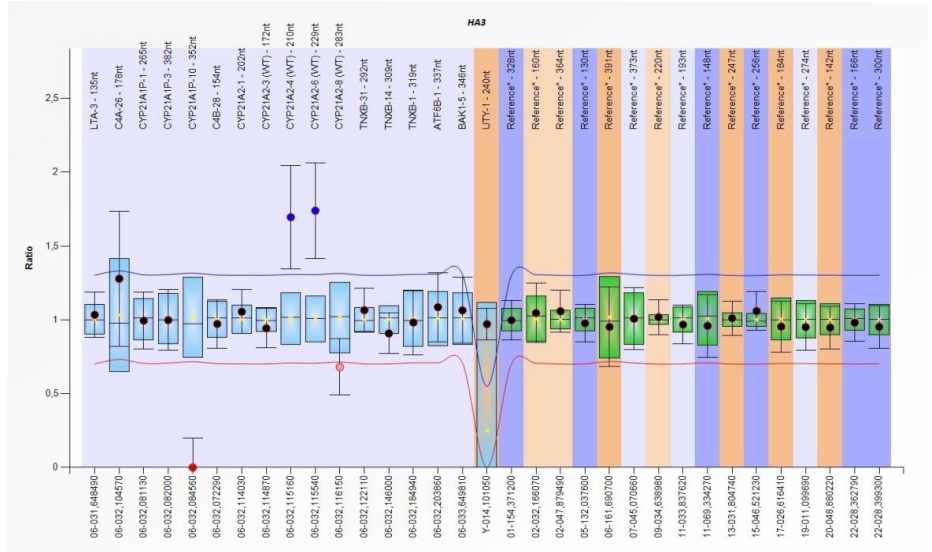
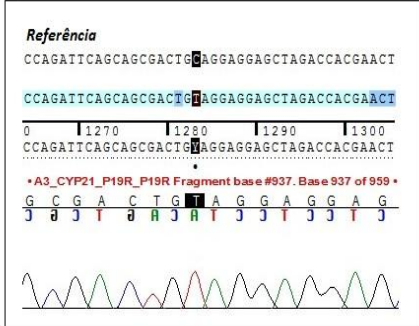
Renata Santarem de Oliveira

Adriana Lofrano Alves Porto

APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

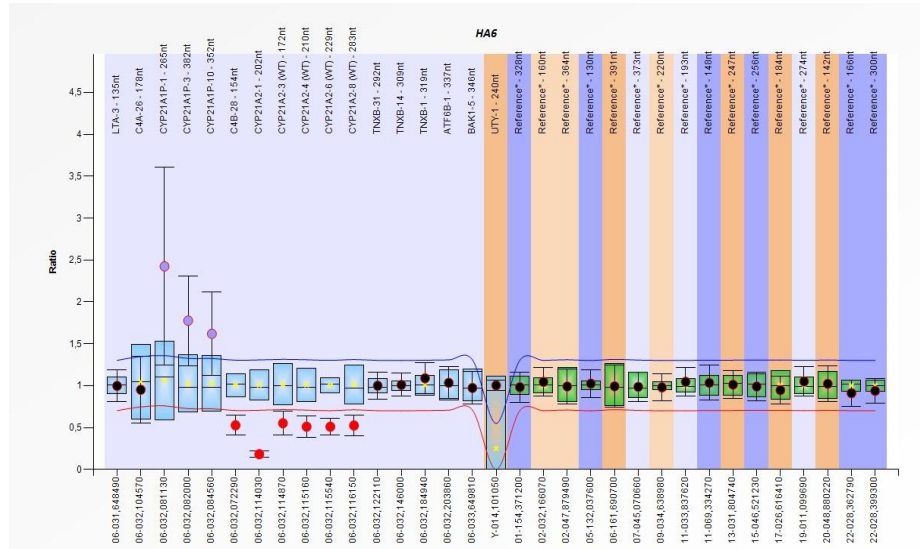
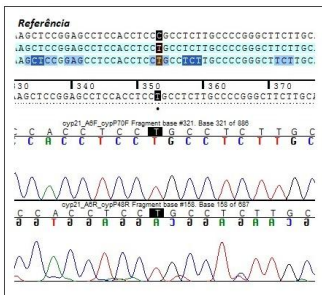
Indivíduo	Genótipo
PS1	p.Q318X/p.Q318X + Ins 4-8

Q318X

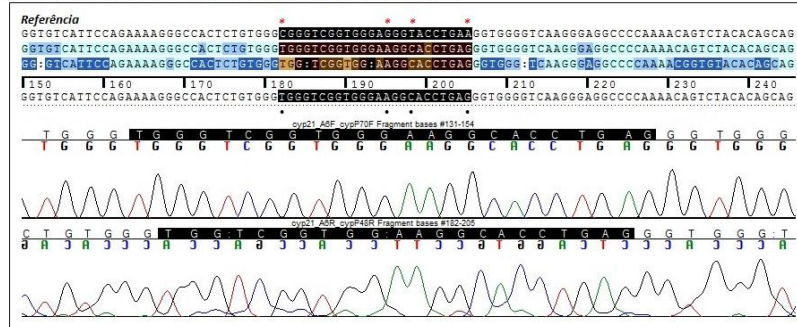


Indivíduo	Genótipo
PS2	Del/Conv

P30L - HA6



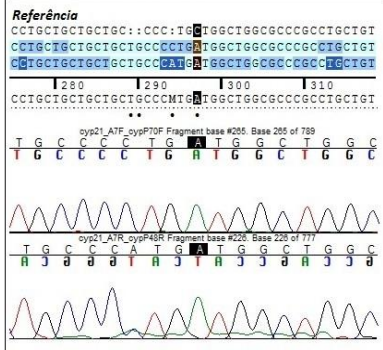
Mutações no promotor do CYP21A2 (g.-126C>T; g.-113G>A; g.-110T>C e g.-103A>G)*



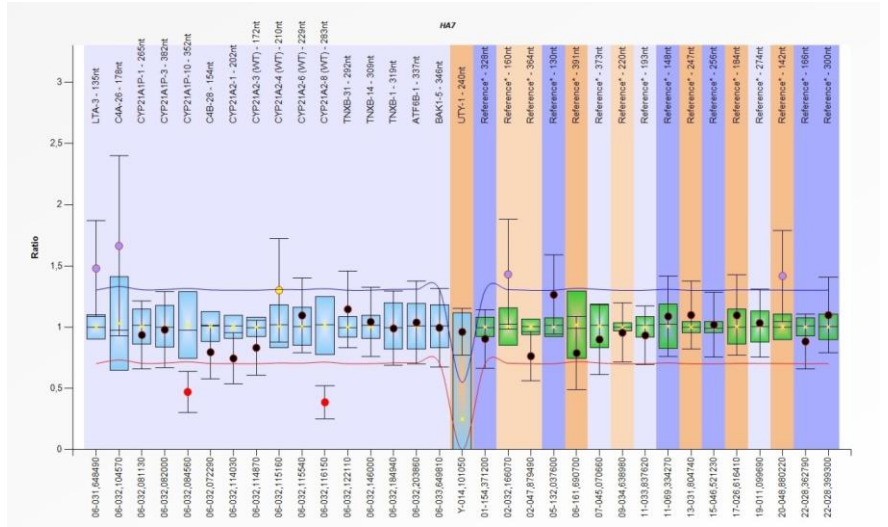
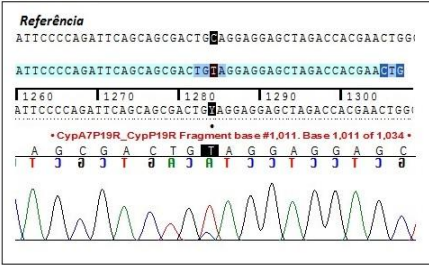
APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

Indivíduo	Genótipo
PS3	p.Q318X/p.L12M

Inserção TGC e Leu13Met - HA7

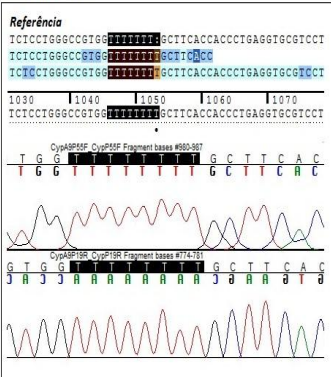


Q318X - HA7

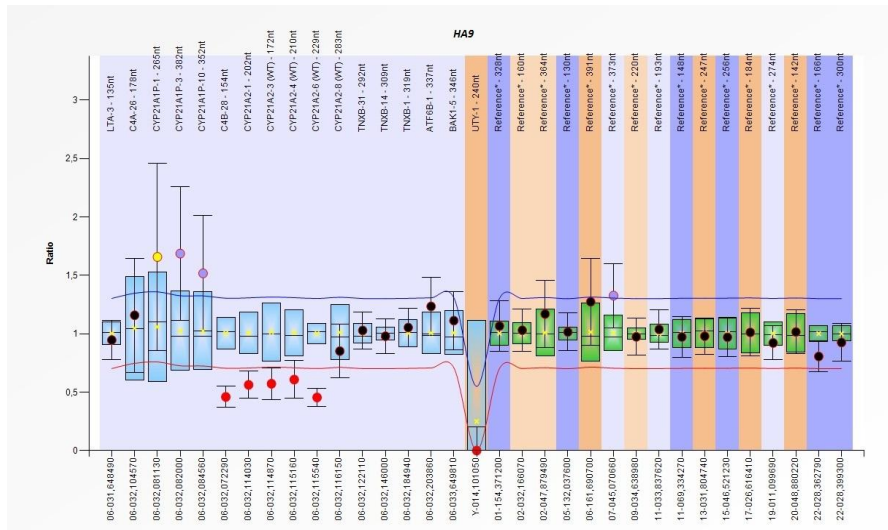
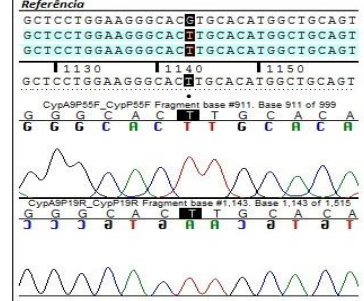


Indivíduo	Genótipo
PS4	Del/F306+

F306 ins T - HA9



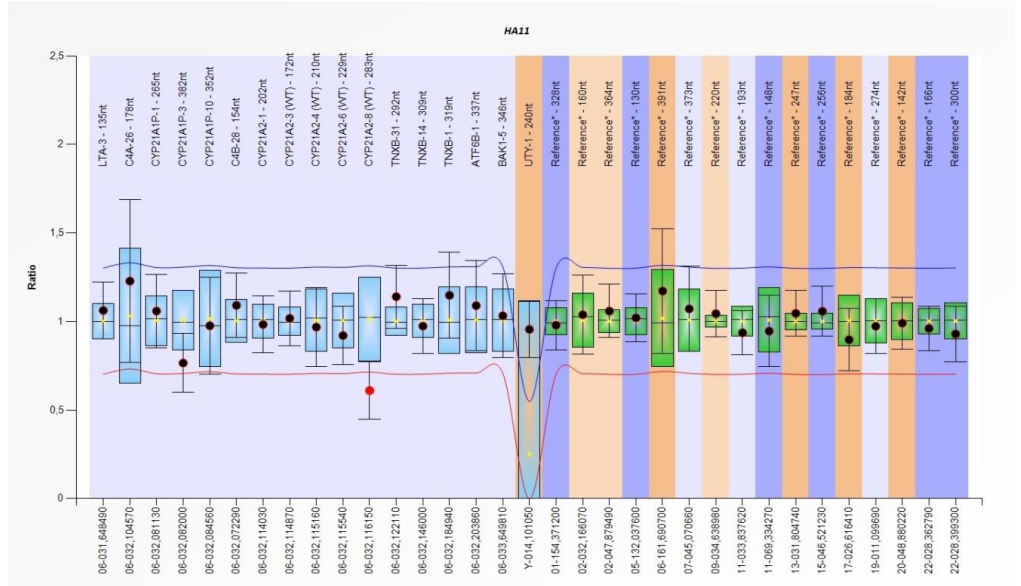
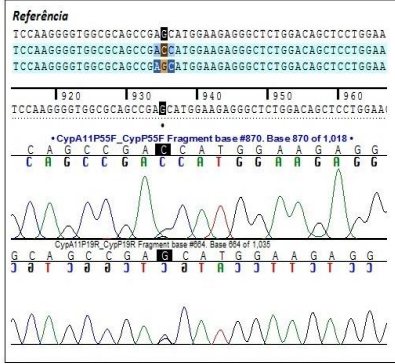
V281L



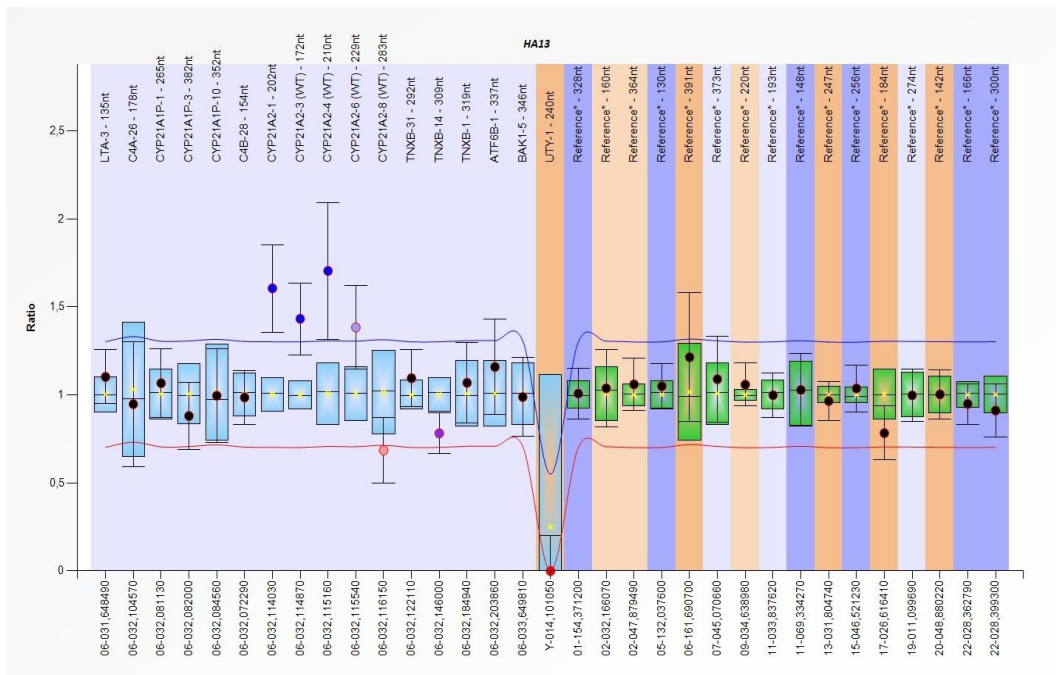
APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

Indivíduo	Genótipo
PS5	Del/p.S269T + p.S494N

Ser269Thr - HA11

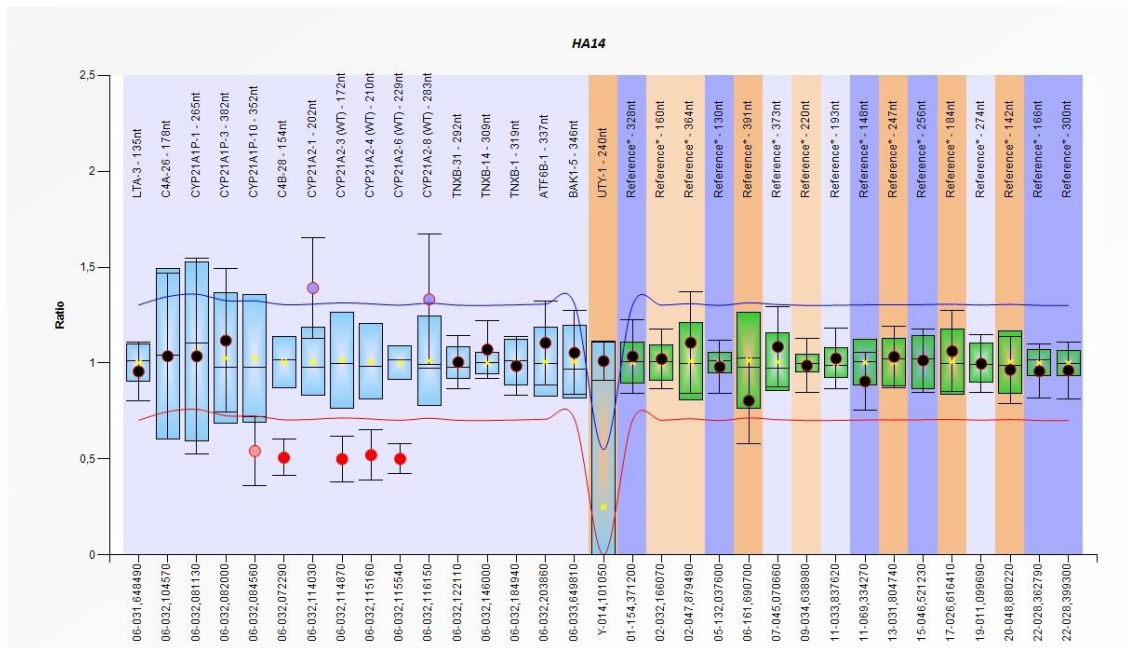


Indivíduo	Genótipo
PS6	Del/Ins

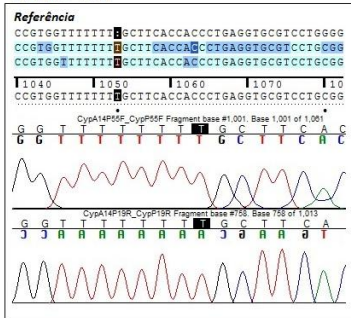


APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

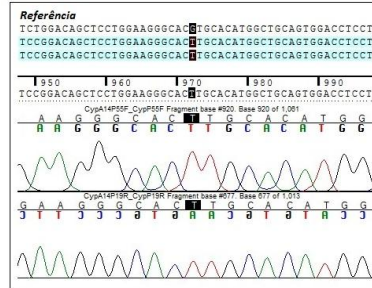
Indivíduo	Genótipo
PS7	Del/F306+t + p.D184E



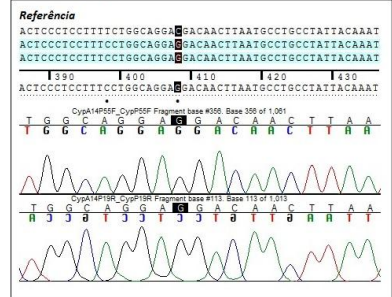
F306 ins T - HA14



V281L - HA14

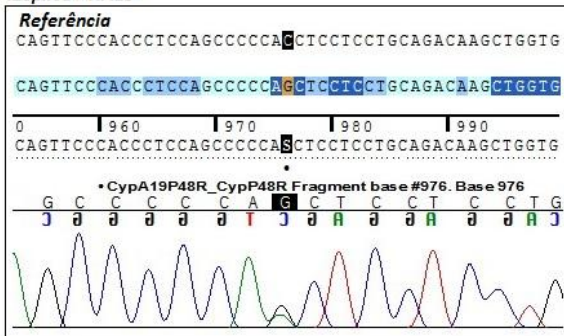


Asp184Glu - HA14

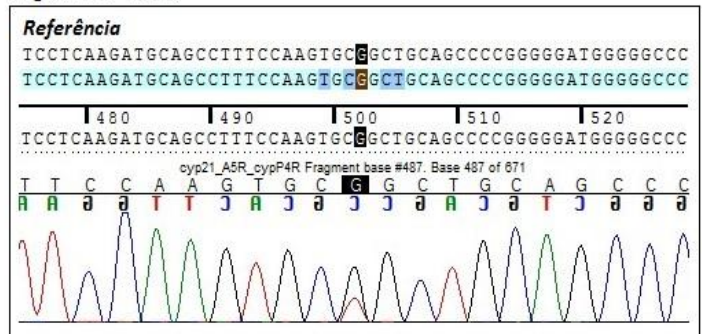


Indivíduo	Genótipo
PS8	I2 Splice/Del + R480L

I2Splice - HA19

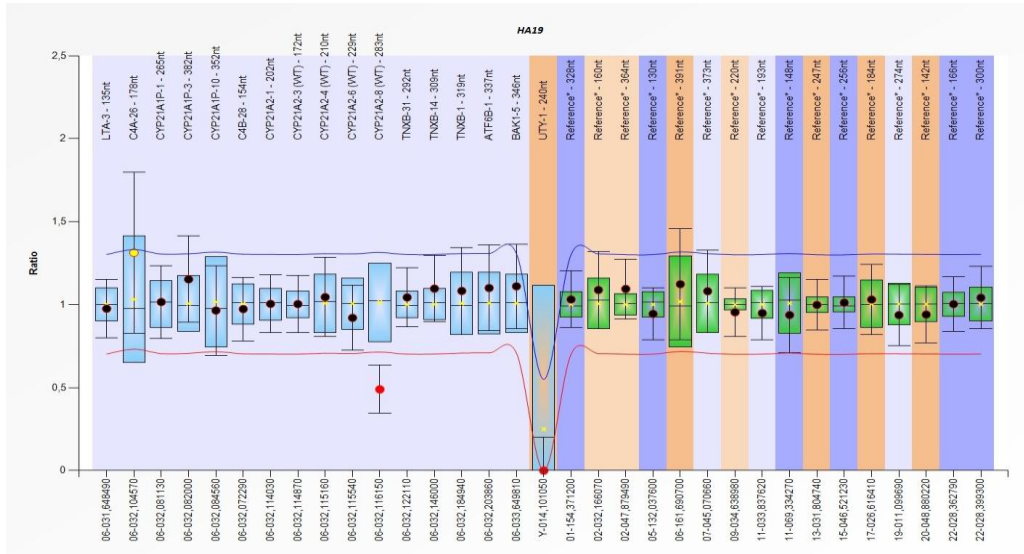


Arg480Leu - HA19

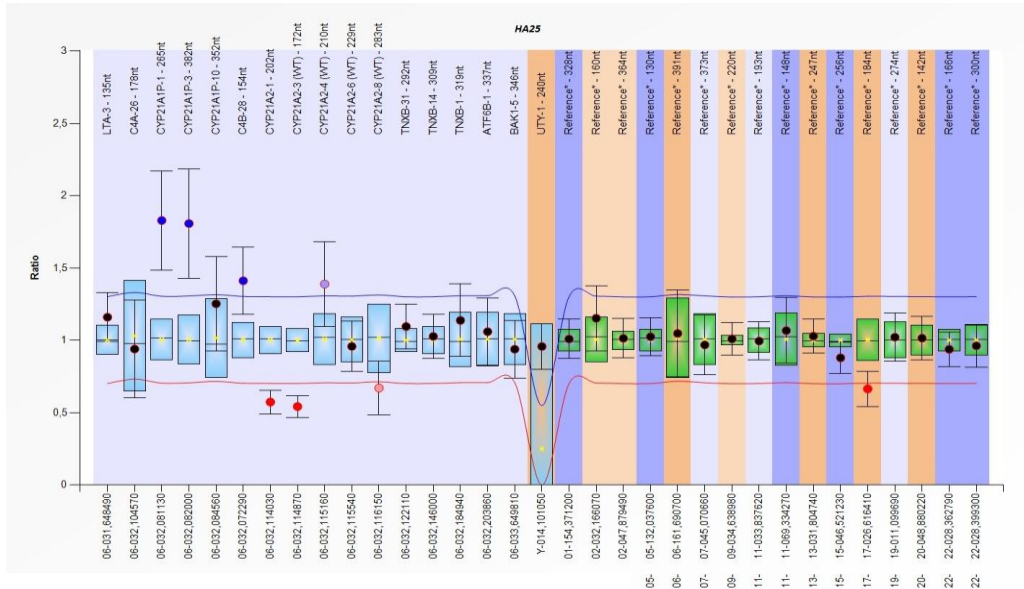


APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

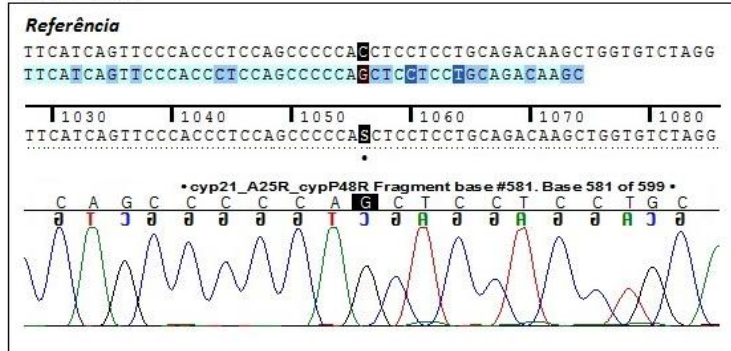
Indivíduo	Genótipo
PS8	I2 Splice/Del + R480L



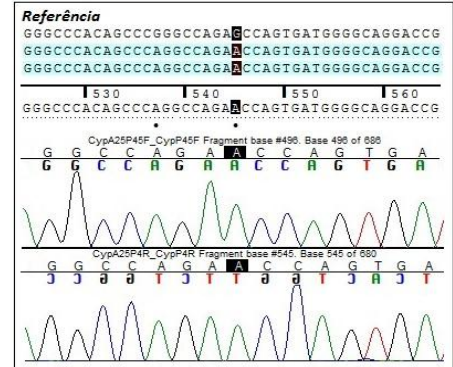
Indivíduo	Genótipo
PS9	I2 Splice/Del + p.S494N



I2Splice - HA25



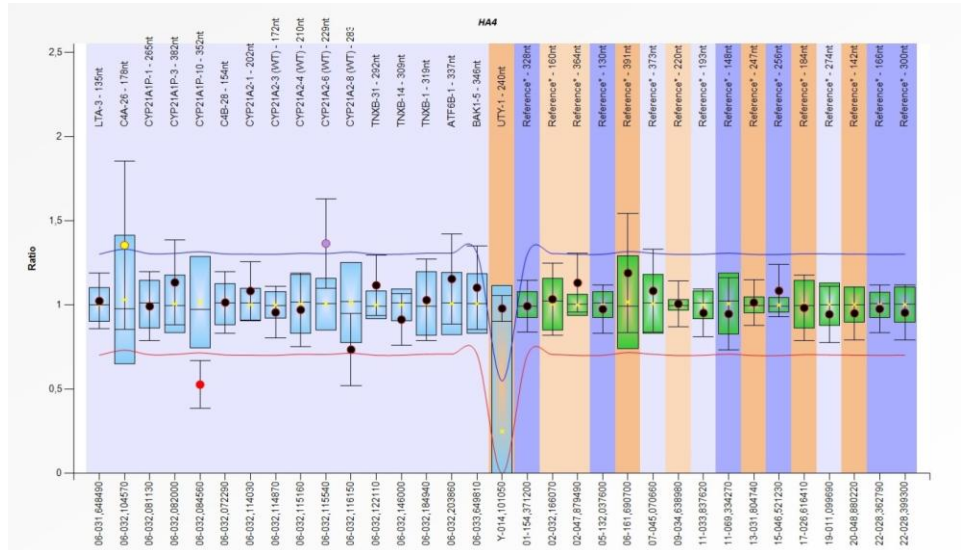
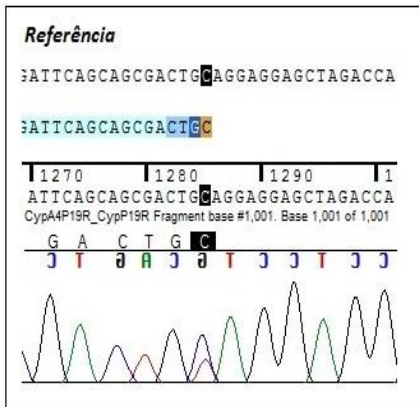
Ser494Asn - HA25



APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

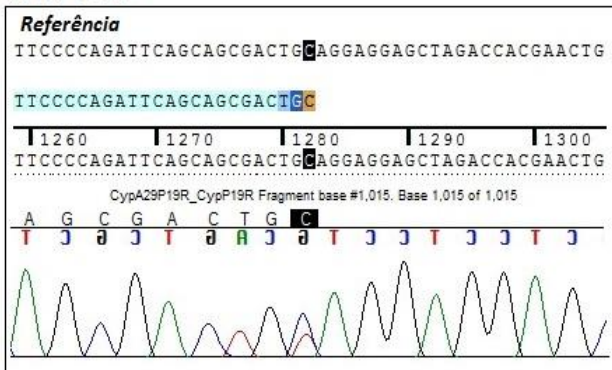
Indivíduo	Genótipo
PS10	p.Q318X/Ins

Q318X

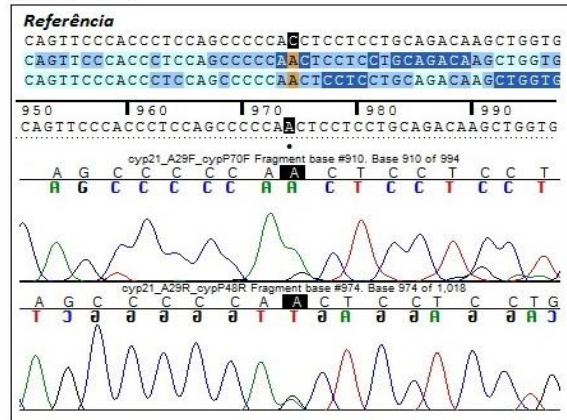


Indivíduo	Genótipo
PS11	I2 Splice/p.Q318X

Q318X - HA29



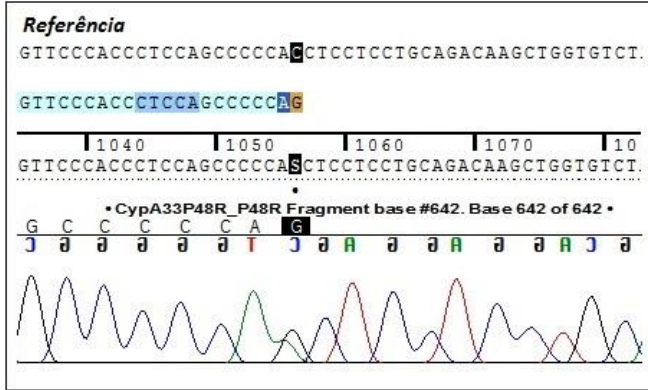
I2Splice - HA29



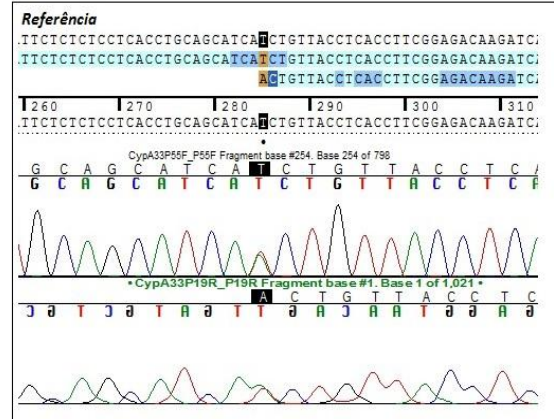
APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

Indivíduo	Genótipo
PS12	I2 Splice/p.I172N

I2Splice - HA33

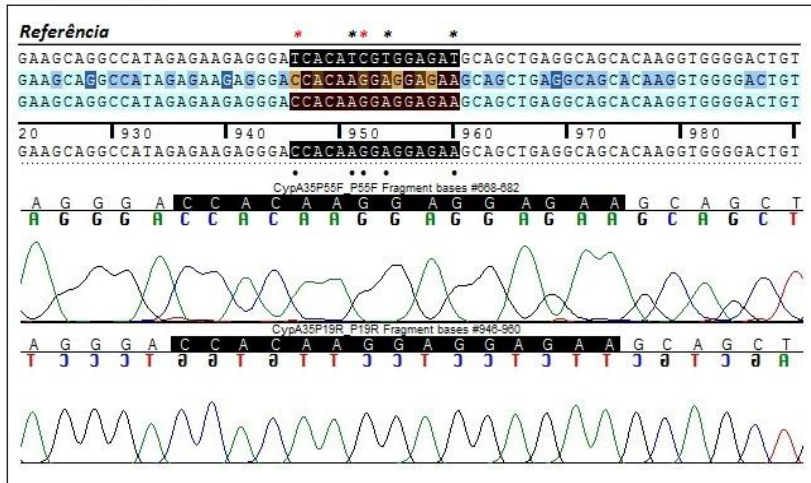


I172N - HA33



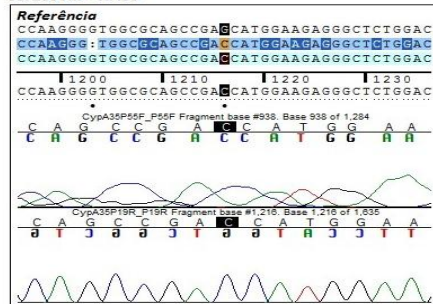
Indivíduo	Genótipo
PS13	E6 Cluster

E6 Cluster - HA35



*** Alelos mutados no E6 Cluster tradicional**
*** Alelos mutados associados com o E6 Cluster no indivíduo HA35**

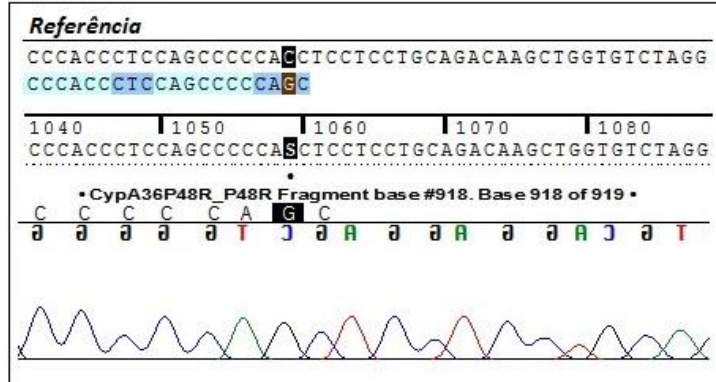
Ser269Thr - HA35



APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

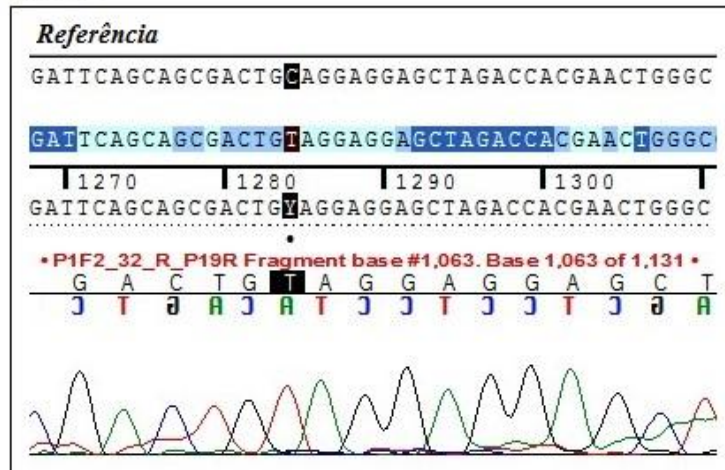
Indivíduo	Genótipo
PS14	I2 Splice/I2 Splice

I2Splice - HA36



Indivíduo	Genótipo
PS15	p.Q318X/p.Q318X

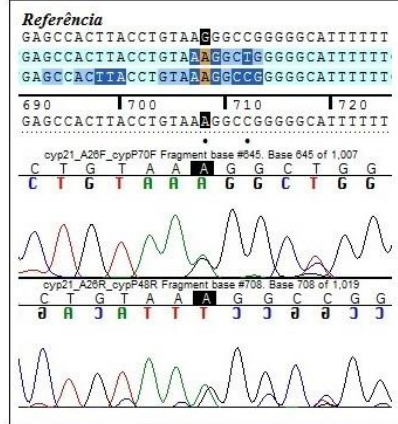
Q318X



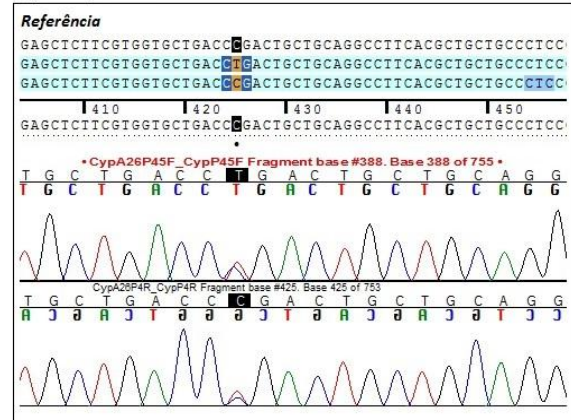
APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

Indivíduo	Genótipo
VS1	p.R445X/IVS2+5G>A + p.V281L

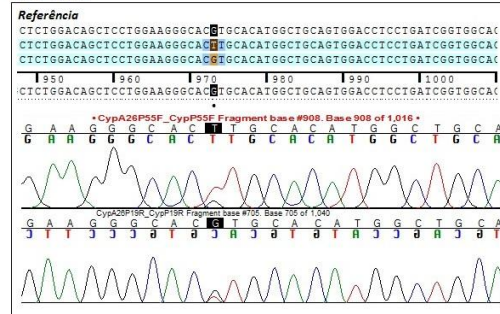
IVS2+5G>A



Arg445Stop - HA26

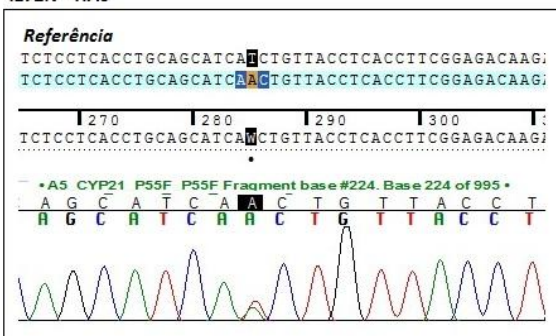


V281L - HA26

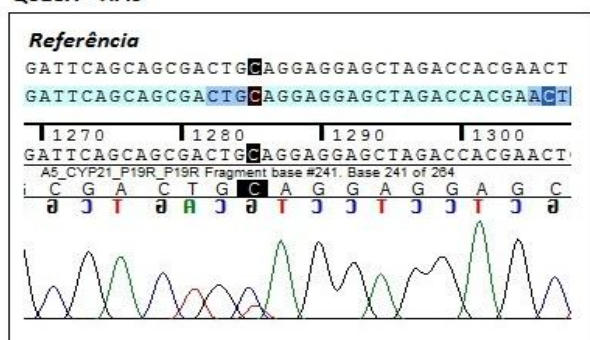


Indivíduo	Genótipo
VS2	p.I172N/p.Q318X

I172N - HA5

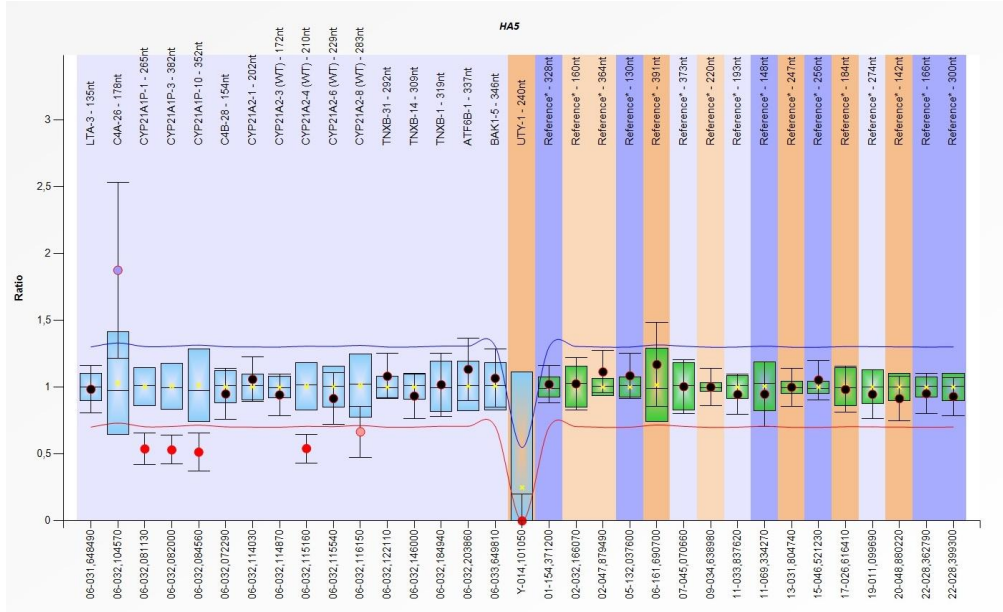


Q318X - HA5



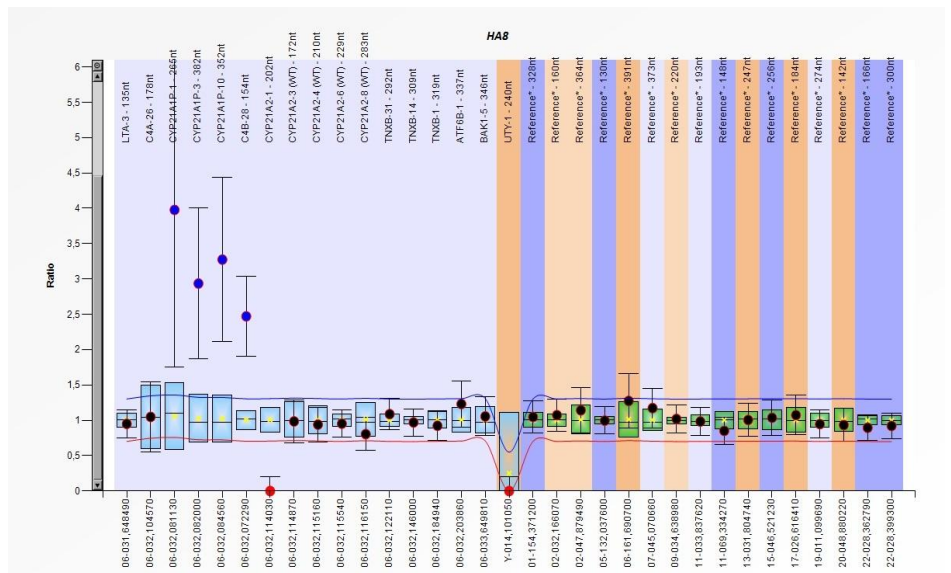
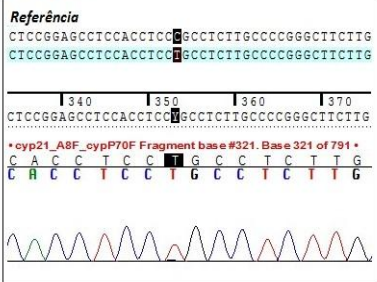
APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

Indivíduo	Genótipo
VS2	p.I172N/p.Q318X



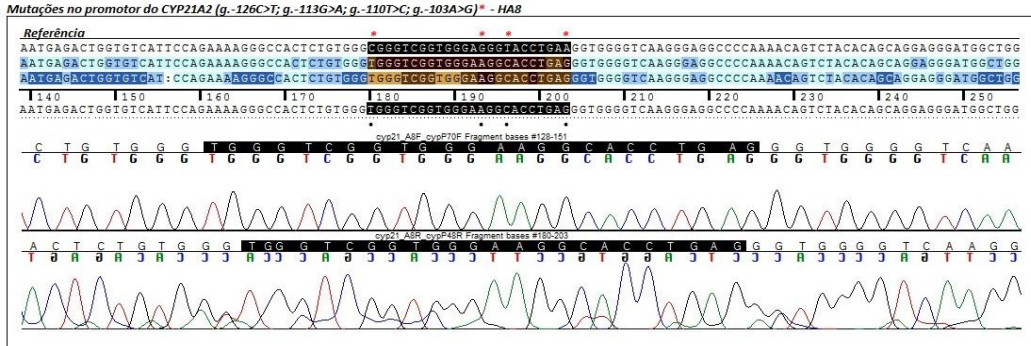
Indivíduo	Genótipo
VS3	Conv/Conv

P30L - HA8

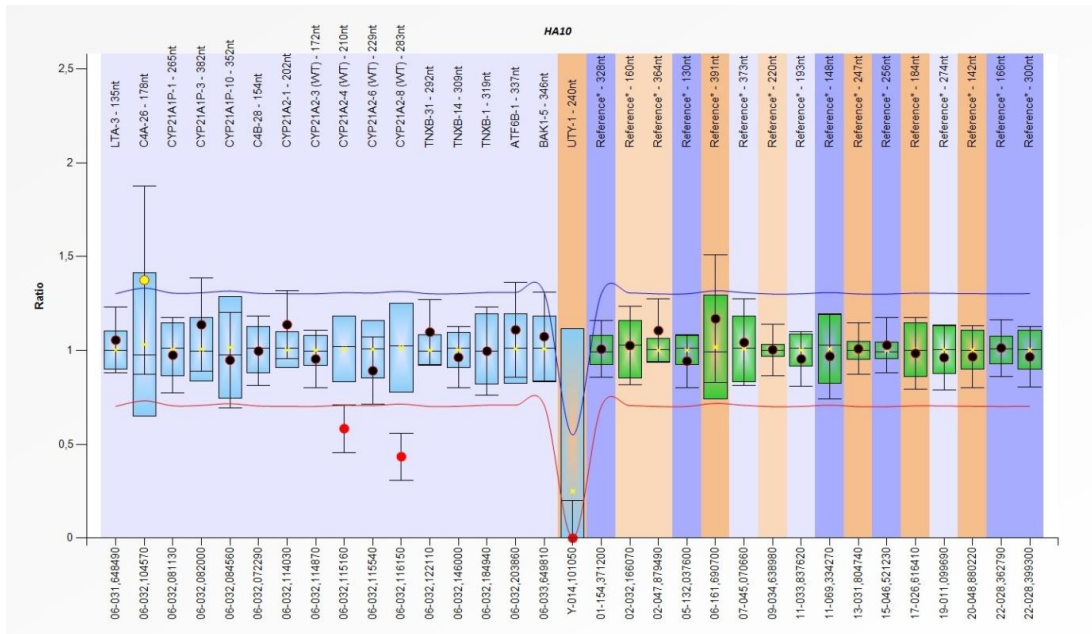


APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

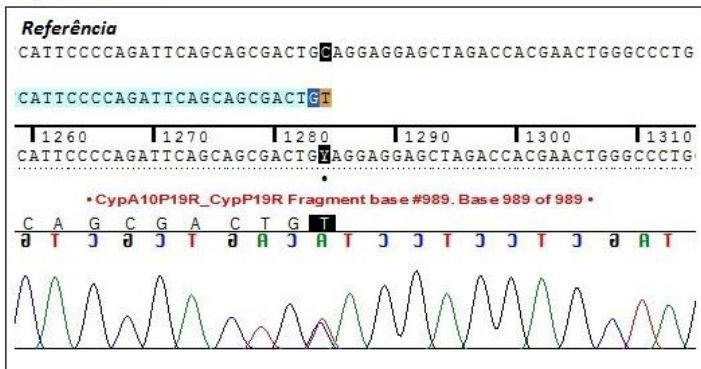
Indivíduo	Genótipo
VS3	Conv/Conv



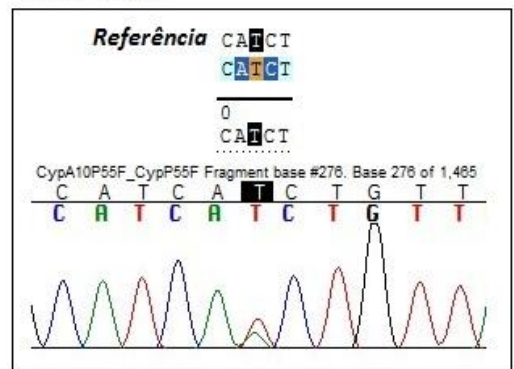
Indivíduo	Genótipo
VS4	p.I172N/p.Q318X



Q318X - HA10

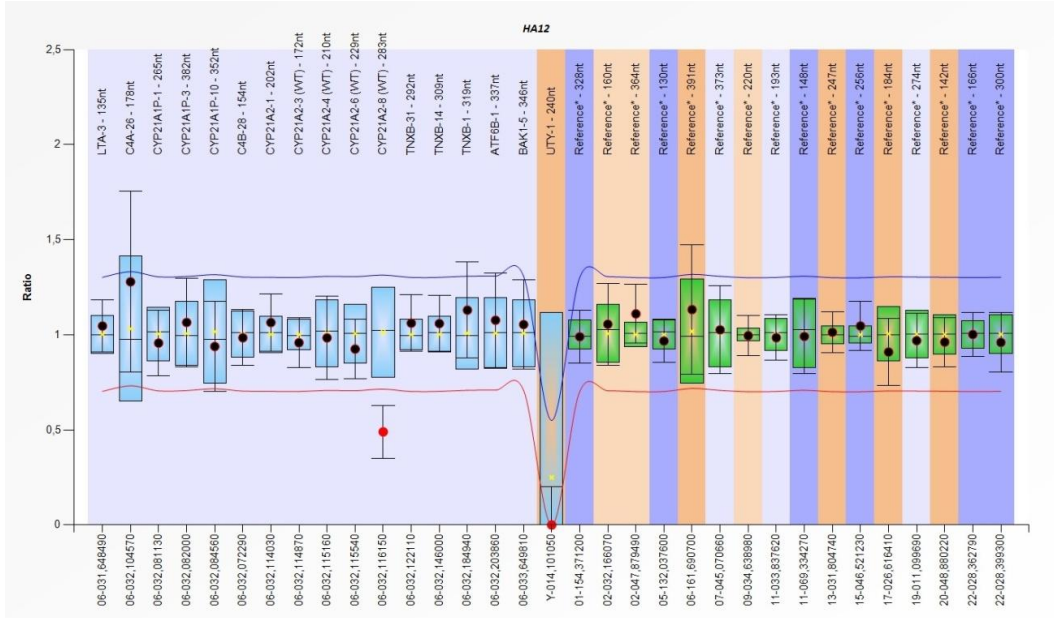


I172N - HA10

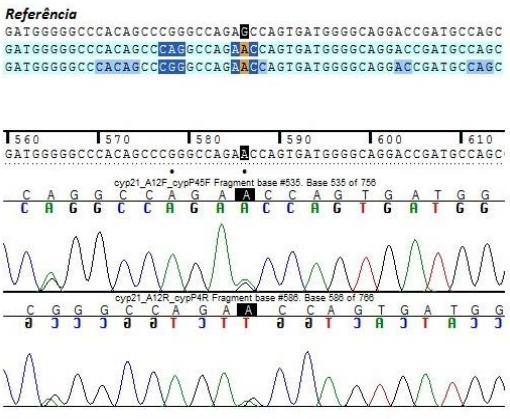


APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

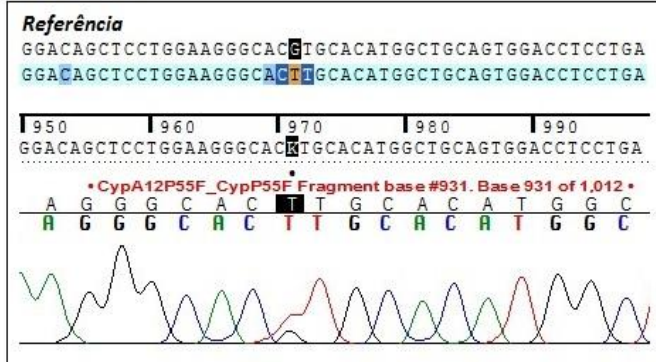
Indivíduo	Genótipo
VS5	Del/p.V281L + p.S494N



Ser494Asn - HA 12



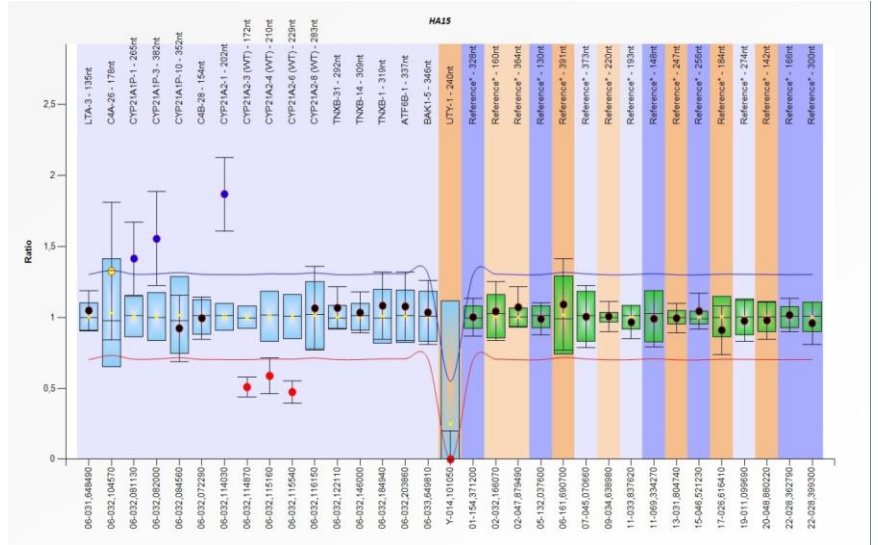
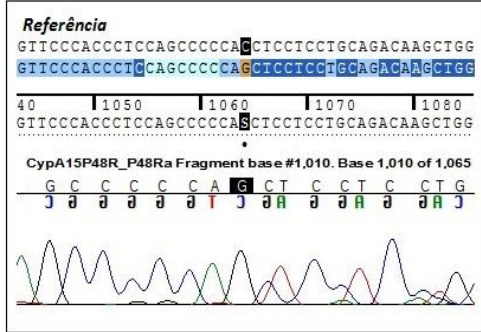
V281L - HA12



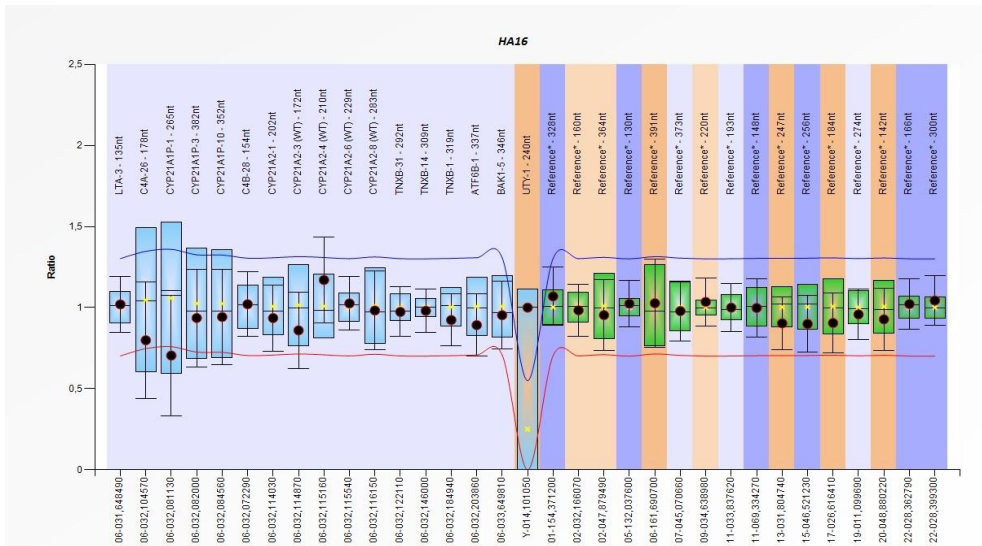
APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

Indivíduo	Genótipo
VS6	I2 Splice/Del

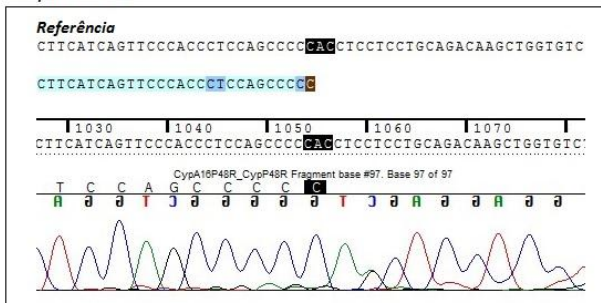
I2Splice - HA15



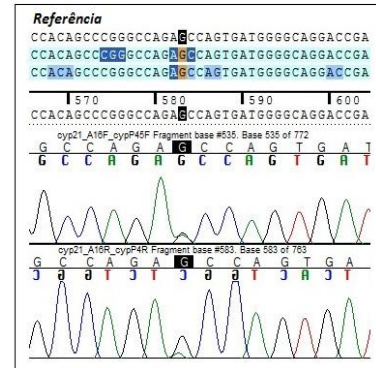
Indivíduo	Genótipo
VS7	I2 Splice/p.S494N



I2Splice - HA16

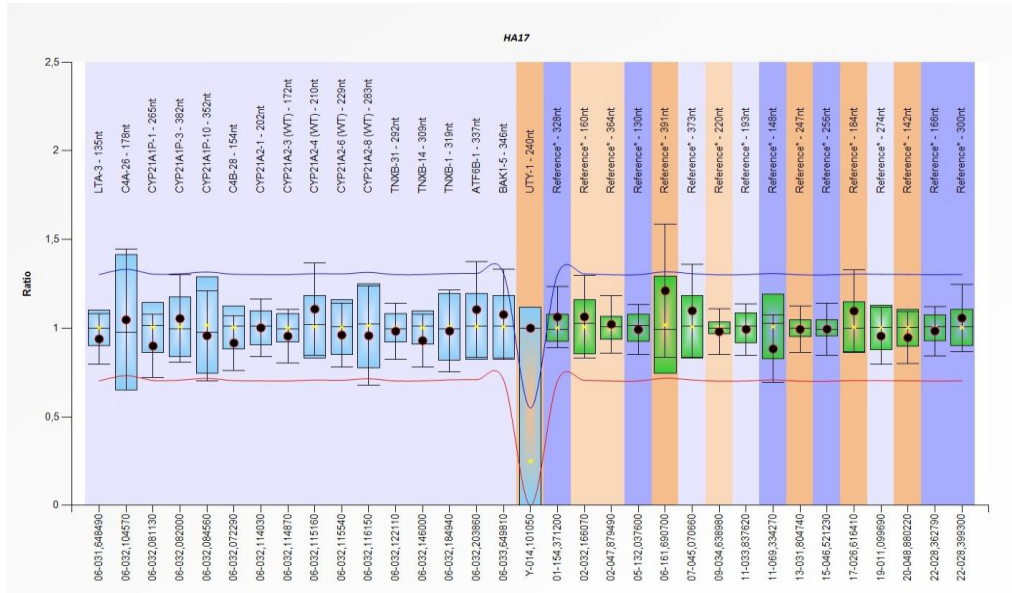


Ser494Asn - HA16

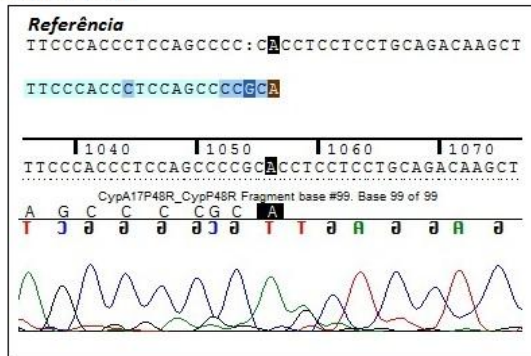


APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

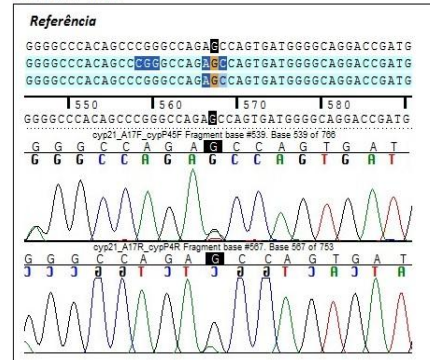
Indivíduo	Genótipo
VS8	I2 Splice/p.S494N



I2Splice - HA17

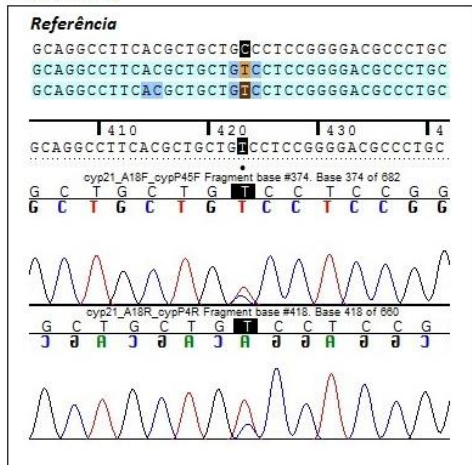


Ser494Asn - HA17

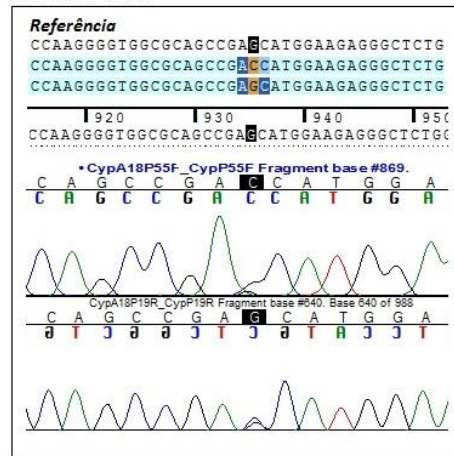


Indivíduo	Genótipo
VS9	Ins/p.P453S + p.S269T

P453S - HA18

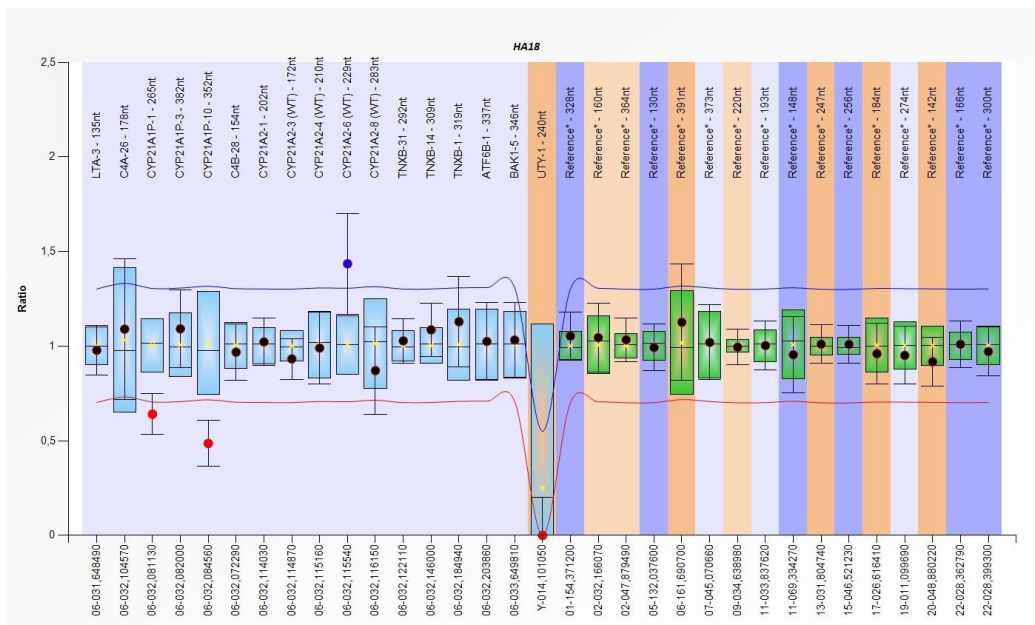


Ser269Thr - HA18

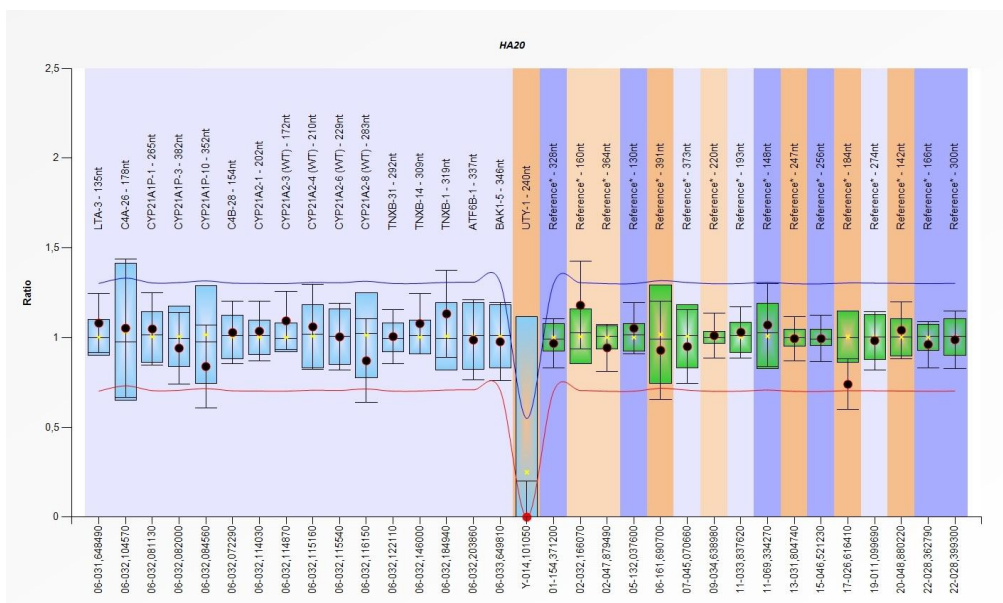


APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

Indivíduo	Genótipo
VS9	Ins/p.P453S + p.S269T



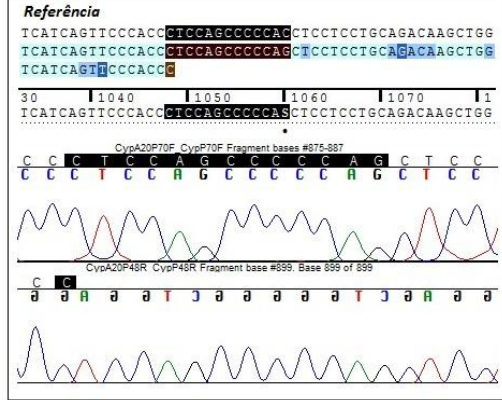
Indivíduo	Genótipo
VS10	I2 Splice/I2 Splice



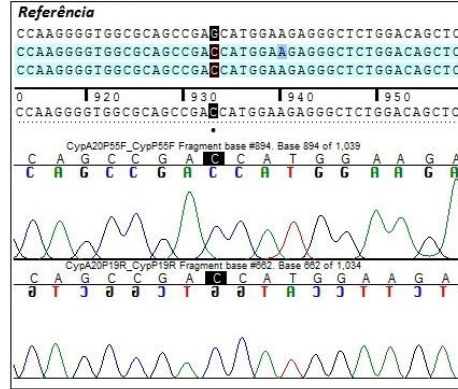
APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

Indivíduo	Genótipo
VS10	I2 Splice/I2 Splice

I2Splice - HA20

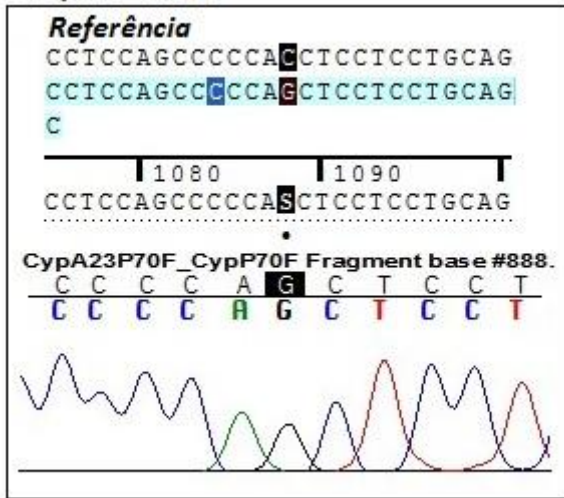


Ser269Thr - HA20



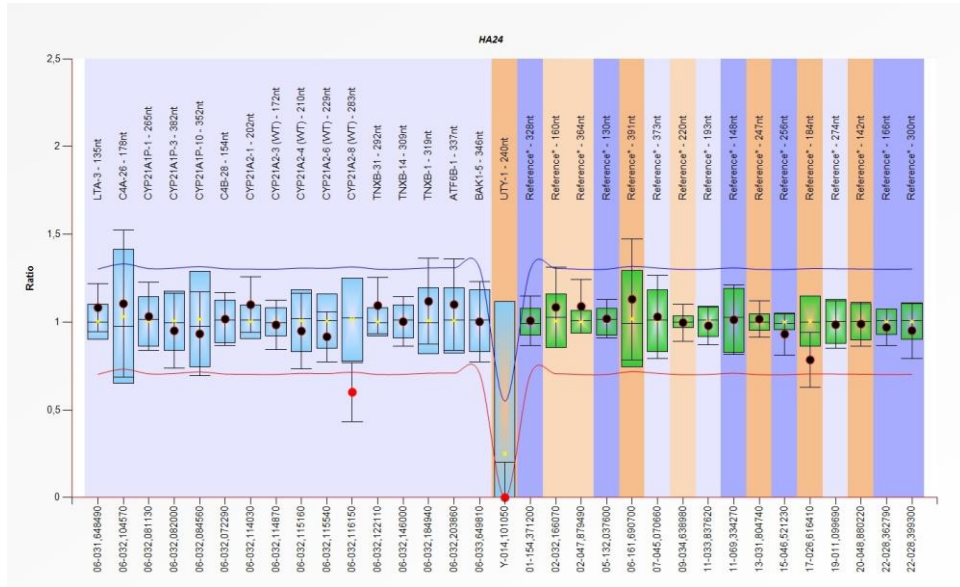
Indivíduo	Genótipo
VS11	I2 Splice/I2 Splice

I2Splice - HA23

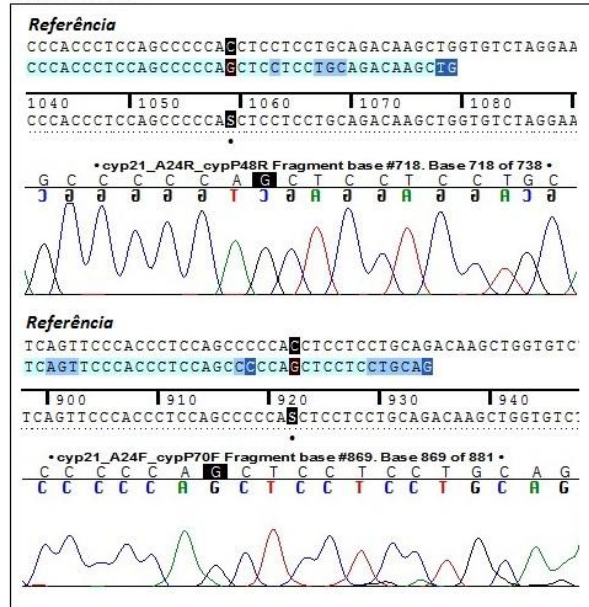


APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

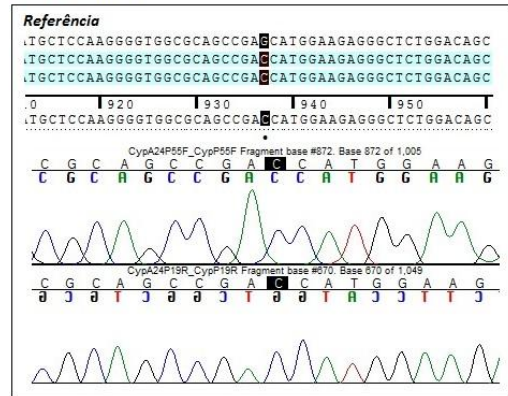
Indivíduo	Genótipo
VS12	I2 Splice/I2 Splice + Del



I2Splice - HA24



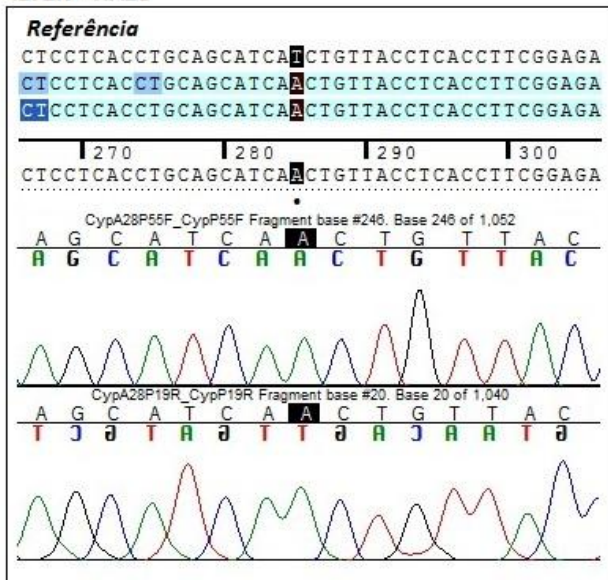
Ser269Thr - HA24



APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

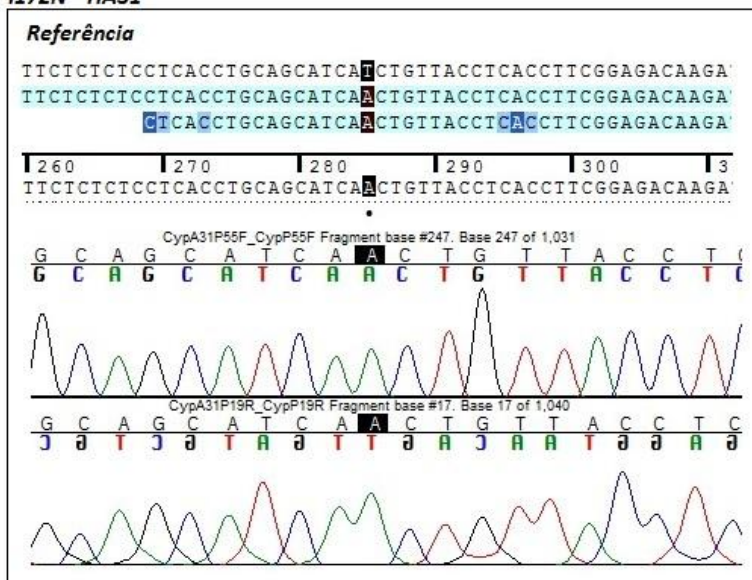
Indivíduo	Genótipo
VS13	p.I172N/p.I172N

I172N - HA28



Indivíduo	Genótipo
VS14	p.I172N/p.I172N

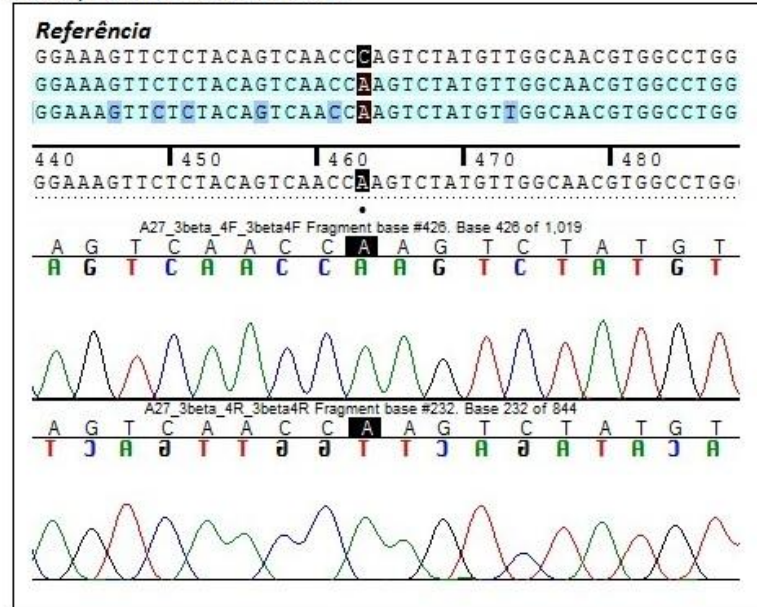
I172N - HA31



APÊNDICE B – IMAGENS DOS RESULTADOS (SEQUENCIAMENTO E MLPA)

Indivíduo	Genótipo
3B1 (3β-HSD)	p.P222Q/p.P222Q

P222Q - Exon 4 HSD3B2 - HA27



**ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA 112/11 PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA
COM SERES HUMANOS DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE.**



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: 112/11

Título do Projeto: “Estudo molecular de genes relacionados ao diagnóstico, evolução e resposta ao tratamento em indivíduos portadores de hiperplasia adrenal congênita”

Pesquisadora Responsável: Vitor Guilherme Brito de Araújo

Data de Entrada: 29/08/11

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto 112/11 com o título: “Estudo molecular de genes relacionados ao diagnóstico, evolução e resposta ao tratamento em indivíduos portadores de hiperplasia adrenal congênita”, analisado na 8ª reunião ordinária realizada no dia 20 de outubro de 2011.

O pesquisador responsável fica, desde já, notificado da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 25 de outubro de 2011.

Thiago Rocha da Cunha
Vice-Coordenador do CEP-FS/UnB