

INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *CYP21A2* EM FAMÍLIAS AFETADAS POR HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA EM ALAGOAS

Rayane Ferreira da Silva

Gustavo Maffra Monteiro

Susane Vasconcelos Zanotti

Isabella Lopes Monlleó

Reginaldo José Petroli

Resumo: Os Distúrbios da Diferenciação Sexual (DDS) são condições congênitas onde o desenvolvimento do cromossomo sexual, das gônadas ou da anatomia sexual são atípicos. Os DDS são classificados de acordo com suas causas, podendo ser divididas em três grandes grupos: DDS 46,XX; DDS 46,XY e DDS associadas à anormalidades cromossômicas. Entre os inúmeros casos de DDS, encontramos a Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC), que é uma das desordens endócrinas inatas mais frequentes, com prevalência global variável desde 1:5.000 a 1:15.000 recém-nascidos. A HAC apresenta padrão de herança autossômica recessiva e é causada pela deficiência de uma das cinco enzimas que participam dos vários passos da síntese dos esteroides adrenais a partir do colesterol. Aproximadamente 95% dos casos de HAC são decorrentes da deficiência da enzima *CYP21A2*. O objetivo deste trabalho foi a investigação de mutações no gene *CYP21A2* em 10 famílias com diagnóstico clínico de HAC, oriundas do Serviço de Genética Clínica do HUPAA/UFAL. A metodologia utilizada consistiu inicialmente na extração de DNA genômico seguida de PCR alelo específica (PCR-AS) para estudo das mutações: p.Pro30Leu, c.290-13A/C>G, p.Gly110fs, p.Ile172Asn, Cluster6 (p.Ile236Asn+p.Val237Glu+p.Met239Lys), p.Val281Leu, p.Gln318* e p.Arg356Trp, todas derivadas do pseudogene *CYP21A1P*. Para os casos que não foi identificado as mutações por PCR-AS, foi realizado o sequenciamento completo do gene *CYP21A2* dos afetados e seus familiares para elucidação do diagnóstico clínico. Foram identificadas cinco mutações, sendo quatro derivadas do pseudogene e relacionadas a forma perdedora de sal e uma mutação nunca descrita na literatura. A HAC é a forma mais frequente dos casos de DDS e a principal causa de ambiguidade genital. As mutações identificadas neste trabalho representam um perfil inicial das mutações presentes no estado de Alagoas. O diagnóstico molecular aqui realizado é de fundamental importância para incrementar a abordagem diagnóstica, o tratamento, o aconselhamento genético e a prevenção.

Palavras-chave: Hiperplasia Adrenal Congênita. PCR-AS. Gene *CYP21A2*.

Abstract: Disorders of sex development (DSD) are congenital conditions where the development of sexual, gonadal or sexual anatomy are atypical. DSD are classified in three main groups: DSD 46, XX; DSD 46, XY and DSD associated with chromosomal abnormalities. The Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) is a frequent DSD and an inborn endocrine disorders, with a global prevalence ranging from 1: 5.000 to 1: 15.000 newborns. CAH has an autosomal recessive inheritance pattern caused by the deficiency in an enzyme involved in the synthesis of adrenal steroids from cholesterol. Approximately 95% of CAH cases are due CYP21A2 deficiency. The aim this project was to investigate mutations in the *CYP21A2* gene in 10 families with clinical diagnosis of CAH from the Serviço de Genética Clínica do HUPAA/UFAL. The methodology consisted in genomic DNA extraction followed by Allele-Specific Polymerase Chain Reaction to investigate the mutations p.Pro30Leu, c.290-13A/C>G, , p.Gly110fs, p.Ile172Asn, Cluster6 (p.Ile236Asn+p.Val237Glu+p.Met239Lys), p.Val281Leu, p.Gln318* and p.Arg356Trp. *CYP21A2* sequencing was performed for the affected individuals and their relatives when no mutations were observed by PCR-AS. Five mutations were identified, four derived from the pseudogene *CYP21A1P* and one novel mutation, all related to the salt-losing form of CAH. The results of this project contribute to the initially profile of mutations in the *CYP21A2* gene in Alagoas and the increase of knowledge about the genotype-phenotype correlations in each case.

Keywords: Congenital Adrenal Hyperplasia. AS-PCR. *CYP21A2* Gene.

1 INTRODUÇÃO

Os Distúrbios da Diferenciação do Sexo (DDS) são condições congênitas onde o desenvolvimento do cromossomo sexual, das gônadas ou da anatomia sexual são atípicos (MONLLEÓ et al., 2012; GAZZANEO et al., 2015). Os DDS são classificados de acordo com suas causas, podendo ser divididas em três grandes grupos: DDS 46,XX; DDS 46,XY e DDS associadas à anormalidades cromossômicas. Entre os inúmeros casos de DDS, encontramos a Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC), que pode ser classificada tanto como DDS 46,XY como DDS 46,XX (MONLLEÓ et al., 2012; GAZZANEO et al., 2015).

A HAC é uma das desordens endócrinas inatas mais frequentes, com prevalência global variável desde 1:5.000 a 1:15.000 recém-nascidos, apresenta padrão de herança autossômica recessiva e é causada pela deficiência de uma das cinco enzimas que participam dos vários passos da síntese dos esteroides adrenais a partir do colesterol (NEW et al., 2013).

A expressão clínica da HAC está relacionada diretamente com a atividade residual da enzima CYP21A2. A forma clássica de HAC ocorre quando a atividade enzimática varia entre 0% e 5%. No fenótipo mais grave, o perdedor de sal (PS), a atividade da enzima é inferior a 1% resultando no comprometimento da biossíntese do cortisol e aldosterona. Enquanto o fenótipo virilizante simples ocorre quando a atividade da enzima está entre 1% a 5%, resultando na deficiência isolada do cortisol. Já a forma não clássica possui atividade superior a 10% (NIMKARN et al., 2011).

Mutações no gene *CYP21A2* prejudicam ou abolem a atividade da enzima CYP21A2. Essas mutações podem ser investigadas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase Alelo Específica (PCR-AS) ou sequenciamento completo do gene *CYP21A2*.

A pergunta científica que norteou este trabalho foi “Quais as mutações mais frequentes no gene *CYP21A2* nos casos de HAC em Alagoas?”

Para responder essa questão, o objetivo deste estudo foi investigar mutações no *CYP21A2* através da PCR-AS e sequenciamento automático em indivíduos afetados por HAC atendidos no Serviço de Genética Clínica (SGC) do HUPAA/UFAL.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A HAC é causada pela deficiência de uma das cinco enzimas que participam dos vários passos da síntese dos esteroides adrenais a partir do colesterol (NEW et al., 2013).

O tipo mais frequente de HAC é devido a deficiência da enzima CYP21A2, causada por mutações no gene *CYP21A2*. O gene *CYP21A2* está localizado no braço curto do

cromossomo 6, *locus 6p21.33*, apresenta 10 éxons e codifica a enzima CYP21A2, uma proteína com 494 aminoácidos. Esse gene apresenta um pseudogene, o *CYP21A1P*, também com 10 éxons. Ambos possuem similaridade de 98% entre os éxons e 96% entre os íntrons (MELLO et al., 2002).

Mutações no *CYP21A2* podem causar desvio da rota metabólica com superprodução de andrógenos. Sendo assim, sujeitos do sexo feminino afetados pela forma PS apresentam ambiguidade genital. Isso pode ser identificado precocemente pelo aumento da concentração de 17 hidroxiprogesterona (17OHP) logo ao nascimento, através do teste do pezinho.

Entre os fenótipos encontrados na HAC, a forma PS é caracterizada como uma emergência pediátrica por estar associada a alterações hidroeletrólíticas como desidratação, hiponatrêmica e hipercalêmica, vômitos, acidose metabólica, choque hipovolêmico, com altíssimo risco de evolução para óbito caso o tratamento não seja realizado precocemente (ZACHMANN et al, 1983).

Segundo “*The Human Gene Mutation Database*” (acesso em outubro de 2018), um total de 302 alterações estão descritas no gene *CYP21A2* relacionada à HAC. Dessas, oito mutações derivadas do pseudogene *CYP21A1P*, são encontradas em cerca de 90% dos casos, sendo elas: p.Pro30Leu, c.290-13A/C>G, p.Gly110fs, p.Ile172Asn, Cluster6 (p.Ile236Asn+p.Val237Glu+p.Met239Lys), p.Val281Leu, p.Gln318* e p.Arg356Trp (WITCHEL, 2011).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi a investigação de mutações no gene *CYP21A2* em indivíduos afetados por HAC e seus familiares.

3 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) do HUPAA/UFAL. A verba para a execução desse projeto foi proveniente do

projeto Universal - FAPEAL intitulado: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FAMÍLIAS COM HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA EM ALAGOAS: ESTUDO PILOTO.

Participaram deste estudo 10 famílias de pacientes diagnosticados clinicamente com HAC por deficiência da CYP21A2 em tratamento no SGC/HUPAA. Este trabalho foi conduzido sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (CEP 57072-900) e os dados clínicos/familiares foram colhidos utilizando protocolo próprio (GAZZANEO et al., 2015).

A extração de DNA foi realizada conforme Araújo (1996). A integridade do DNA genômico extraído foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose, seguida de quantificação em espectrofotômetro.

Após a quantificação do DNA genômico, foram realizadas as PCR-AS para as oito mutações provenientes do pseudogene *CYP21A1P*. Controles para o alelo selvagem e alelo mutante foram utilizados em todas as reações. As amostras controles e as sequências dos oligonucleotídeos foram cedidos pela Dra. Maricilda Palandi de Mello do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Os produtos das PCR-AS foram testados em gel de agarose 1%. A análise dos resultados das reações foi realizada através da presença ou ausência do fragmento de interesse.

Para os casos que não revelaram alterações derivadas do pseudogene, amostras de material biológico destes sujeitos e seus familiares foram enviados ao laboratório de Genética Humana da UNICAMP para o sequenciamento completo do gene *CYP21A2*, a fim de identificar alterações novas ou raras que possam confirmar o fenótipo dos afetados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todas as famílias que revelaram mutações apresentaram o fenótipo HAC-PS. Todos os casos índices apresentaram cariótipo 46,XX, alterações no nível de sódio e potássio, e ambiguidade genital.

Foram identificadas as alterações c.290-13A/C>G, p.Gln318* e p.Arg356Trp todas estão relacionadas a forma perdedora de sal, a causa mais frequente e devastadora de HAC (MELLO et al., 2002).

Na literatura, a mutação no sítio de splicing c.290-13A/C>G (g.655A/C>G) é a mais frequente causadora da deficiência da CYP21A2 (MELLO et al., 2002). Nos casos aqui analisados, essa alteração foi identificada em três famílias, sendo nas famílias 1 e 3 em homozigose e na família 7 em heterozigose composta com a mutação p.Arg356Trp.

A substituição localizada no nucleotídeo g.1994C>T do *CYP21A2* é a causadora da mutação stop códon p.Gln318* (MELLO et al., 2002). No presente estudo, a mutação foi encontrada na família 4 em heterozigose composta com a mutação p.Arg356Trp.

A mutação missense p.Arg356Trp (g.2108C>T) afeta a ligação entre a enzima e o substrato, sua frequência é de 14% na forma perdedora de sal e de 2% para a forma virilizante simples (MELLO et al., 2002). Essa alteração foi observada na família 4 em heterozigose composta com a alteração p.Gln318*, na família 7, também em heterozigose composta com mutação c.290-13A/C>G e em homozigose na família 10.

Para as famílias que não revelaram alterações derivadas do pseudogene, a estratégia foi realizar o sequenciamento automático do gene *CYP21A2*. Cinco famílias enquadraram-se nessa proposta. Destas, uma família revelou alteração e quatro famílias continuam em investigação, sendo elas: família 2, família 5, família 8 e família 9.

O sequenciamento da família 6 revelou a homozigose da mutação p.Ser301Pro, no éxon 7 do gene *CYP21A2*. Essa alteração leva a troca de uma Serina por uma Prolina no aminoácido 301 da proteína CYP21A2. Essa mutação nunca descrita na literatura, não é

derivada do pseudogene. Para entender o real prejuízo que essa mutação causa na proteína, será necessário o estudo funcional para observar a atividade residual da CYP21A2 e só assim, realizar a correta correlação genótipo/fenótipo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa de mutações no gene *CYP21A2* através da PCR-AS e sequenciamento foi realizada em 10 famílias com diagnóstico clínico e laboratorial de HAC. Destas, cinco revelaram mutações derivadas do pseudogene, que confirmaram o diagnóstico clínico e laboratorial e uma família revelou uma mutação nova, que possivelmente está associada a HAC-PS.

A análise molecular aqui apresentada abre novos caminhos para o diagnóstico especializado no estado de Alagoas, ampliando a oferta de teste molecular para os pacientes portadores de HAC, para pacientes atendidos pelo SGC e triados pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal de Alagoas, além de fortalecer o LGMH/HUPAA/UFAL.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, M. et al. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in brazilian families the classical congenital adrenal hyperplasia. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 29, p. 1-13, 1996.

GAZZANELO, I. F. P. et al. Perfil de pacientes com anormalidades genitourinárias atendidos em serviço de genética clínica no sistema único de saúde. **Rev Paul Pediatr**. 2015.

MELLO, M. P. et al. Bases moleculares da hiperplasia adrenal congênita. **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 457-477, 2002.

MONLLEÓ, I. L et al. Prevalence of genital abnormalities in neonates. **Jornal de Pediatria** (Impresso), v. 88, 2012.

NEW, M.I. Inborn errors of adrenal steroidogenesis. **Molecular and cellular endocrinology**, New York, v. 211, p.75-83, 2003.

NIMKARN, S.; NEW, M. I. Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. **Nature - clinical practice: endocrinology & metabolismo**, New York, v. 3, n. 5, p.405-413, 2007.

THE HUMAN GENE MUTATION DATABASE. CYP21A2. Disponível em:<
<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>>. Acessado em: outubro de 2018.

WITCHEL, S.F.; AZZIZ, R. Congenital Adrenal Hyperplasia. **J Pediatr Adolesc Gynecol**. v: 24, 2011.

ZACHMANN, M.; TASSINARI, D.; PRADER, A.; Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 betahydroxylase deficiency. A study of 25 patients. **J Clin Endocrinol Metab** 1983; 561:222-9.