PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA PCR ALELO ESPECÍFICO PARA INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE CYP21A2

Aluísio Antônio Brito de Mesquita

Universidade Federal de Alagoas

alumesquita123@gmail.com

Gustavo Maffra Monteiro

Universidade Federal de Alagoas

gustavo.monteiro@famed.ufal.br

Carlos Virgílio Rocha de Sousa Silva

Universidade Federal de Alagoas

virgilio_rocha@hotmail.com

Susane Vasconcelos Zanotti

Universidade Federal de Alagoas

susanevz@yahoo.fr

Isabella Lopes Monlleó

Universidade Federal de Alagoas

isabella.monlleo@gmail.com

Reginaldo José Petroli

Universidade Federal de Alagoas

rjpetroli@gmail.com

Tipo de Apresentação: Pôster

Resumo:

A Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC) é um erro inato do metabolismo caracterizado pela deficiência de uma das cinco enzimas envolvidas na esteroidogênese adrenal, a partir do colesterol. Cerca de 95% dos casos ocorre devido a deficiência da enzima codificada pelo

gene *CYP21A2*. Mutações nesse gene podem surgir a partir de eventos de recombinação com seu pseudogene (*CYP21A1P*), inserções, deleções e mutações de ponto. Os fenótipos associados à HAC são divididos em forma clássica, caracterizada pelos fenótipos perdedor de sal e virilizante simples; e forma não clássica ou de início tardio. O rastreamento de mutações frequentes no *CYP21A2* pode ser realizado pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase Alelo Específica (PCR-AS), cujos dados moleculares são de grande importância para a elucidação diagnóstica. Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi padronizar a PCR-AS no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH/HUPAA/UFAL) e estabelecer protocolo padrão para investigação 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 de reconhecida frequência, provenientes do pseudogene *CYP21A1P*. Como metodologia adotada, foram realizadas PCR-AS utilizando amostras controle positivas e negativas para cada mutação. Oligonucleotídeos, com e sem variantes, foram utilizados em diferentes reações para amplificação dos fragmentos de interesse, que foi confirmada com auxílio de marcador de peso molecular, observados por meio de eletroforese em gel de agarose. A técnica da PCR-AS foi padronizada para todas as mutações propostas e com os resultados alcançados será possível ofertar o teste diagnóstico molecular aos pacientes do Serviço de Genética Clínica do HUPAA/UFAL e da demanda gerada pela fase IV do Programa Nacional de Triagem Neonatal em Alagoas. Além disso, será possível reconhecer as mutações mais frequentes no *CYP21A2* na população alagoana e ampliar o conhecimento sobre as correlações genótipo-fenótipo em cada caso.

Palavras-chave: Reação em Cadeia da Polimerase, gene *CYP21A2*, Hiperplasia Adrenal Congênita

1. Introdução

Os Distúrbios da Diferenciação do Sexo (DDS) são condições congênitas onde o desenvolvimento genital ou gonadal é incompleto ou desordenado, levando a uma discordância entre o sexo genético, gonadal e fenotípico do indivíduo afetado. Entre os inúmeros casos de DDS, encontramos à Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC), com prevalência global de 1:5.000 a 1:15.000 recém-nascidos (KOLHADOUZ, et al. 2015; PANG; CLARK, 1993).

À HAC é um erro inato do metabolismo caracterizado pela deficiência de uma das cinco enzimas envolvidas na esteroidogênese adrenal, a partir do colesterol. Cerca de 95% dos casos ocorre devido a deficiência da enzima CYP21A2, codificada pelo gene *CYP21A2*. Os fenótipos associados à HAC são divididos em duas formas, a forma clássica, com os fenótipos perdedor de sal (PS) e virilizante simples (VS); e a forma não clássica (NC) ou de início tardio (NEW et al., 2013).

O rastreamento de mutações frequentes no *CYP21A2* pode ser realizado pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase Alelo Específica (PCR-AS), cujos dados moleculares são de grande importância para a elucidação diagnóstica. Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi padronizar a PCR-AS no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH/HUPAA/UFAL) e estabelecer protocolo padrão para investigação 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 de reconhecida frequência e associadas aos fenótipos PS, VS e NC.

Os principais pontos que nortearam este trabalho foram:

- a casuística do ambulatório integrado de genética e psicanálise do SGC/HUPAA/UFAL mostra que a HAC é o DDS mais prevalente em nosso meio;
- não existem estudos anteriores sobre o perfil e a prevalência de mutações no gene *CYP21A2* na população de Alagoas;
- no estado de Alagoas, o programa nacional de triagem neonatal está na fase IV desde março de 2016, fase em que é realizada a dosagem de 17-OHP para rastreamento de indivíduos com HAC e
- implementação do Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) do HUPAA/UFAL.

2. Referencial Teórico

O espectro clínico da HAC é amplo, e pode variar de acordo com atividade residual da enzima CYP21A2 alterada. Os fenótipos mais graves são aqueles em que a CYP21A2

apresenta atividade nula ou inferiro a 2%, caracterizando a forma clássica perdedora de sal e virilizante simples, respectivamente (NEW et al., 2013).

Na HAC clássica não tratada, sinais clínicos de hiperandrogenismo podem ser observados em todas as faixas etárias desde o nascimento até a idade adulta. Esses sinais compreendem ambiguidade genital de diferentes graus em sujeitos 46,XX, puberdade precoce, hirsutismo, amenorreia/oligomenorreia e infertilidade. Na forma perdedora de sal, que corresponde a 75% dos casos, a deficiência de cortisol e mineralocorticoides pode estar associada a alterações hidroeletrolíticas como desidratação, hiponatrêmica e hipercalêmica, vômitos, acidose metabólica, choque hipovolêmico, com significativo aumento da mortalidade, especialmente no período neonatal (HORT et al., 2014).

Segundo "*The Human Gene Mutation Database*" (2017), um total de 288 mutações foram descritas no *CYP21A2* relacionada a HAC. Destas alterações, nove mutações derivadas do pseudogene *CYP21A1P* são encontradas com maior frequência nos indivíduos afetados, são elas: p.Pro30Leu, c.290-13A/C>G, p.Gly110*fs*, p.Ile172Asn, Cluster6 (p.Ile236Asn+p.Val237Glu+p.Met239Lys), p.Val281Leu, p.Leu307*fs*, p.Gln318* e p.Arg356Trp.

O rastreamento das mutações acima citadas pode ser realizado pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase Alelo Específica (PCR-AS), cujos dados moleculares são de grande importância para o conhecimento sobre as correlações genótipo-fenótipo, estabeleciamento do perfil e a prevalência de mutações no gene *CYP21A2* na população de Alagoas e aconselhamento genético.

3. Metodologia

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA). A verba para a execução desse projeto é proveniente do projeto Universal - FAPEAL intitulado: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FAMÍLIAS COM HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA EM ALAGOAS: ESTUDO PILOTO (EDITAL UNIVERSAL FAPEAL Nº 04/2016 - PROCESSO Nº 600301071/2016).

O DNA genômico de pacientes previamente estudados com alelo normal ou alelo mutante serviram como controles das PCRs. Os controles foram gentilmente cedidos pela Dra. Maricilda Palandi de Mello do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Universidade Estatual de Campinas. As mutações analisadas foram: p.Pro30Leu, c.290-13A/C>G, p.Gly110fs, p.Ile172Asn, *Cluster* 6 (p.Ile236Asn+p.Val237Glu+p.Met239Lys), p.Val281Leu, p.Gln318* e p.Arg356Trp.

As amplificações dos fragmentos de interesse foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, com auxílio de régua de peso molecular *1kb DNA Ladder.* Os géis foram corados em solução de Brometo de Etidio. Os resultados foram analisados em transluminador de bancada, onde foram capturadas as fotos dos géis com auxílio de câmera fotográfica.

4. Resultados e Discussões:

A amplificação dos fragmentos de interesse através da técnica da PCR-AS foi alcançada para as 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.

A mutação p.Pro30Leu é caracterizada pela troca de uma prolina por uma leucina no aminoácido 30 da enzima CYP21A2 e é observada em 17% dos alelos na forma Não Clássica.

A mutação c.290-13A/C>G é caracterizada pela transição dos alelos A/C para G na região doadora de *splicing* do íntron 2, sendo a mutação mais frequente descrita na literatura. Com isso, há a ativação de uma região doadora de *splicing* anômala e está associada a uma grave deficiência da CYP21A2 e está associada ao fenótipo PS (HIGASHI et al., 1988).

A alteração p.Gly110fs é caracterizada pela deleção de oito nucleotídeos na posição 707-714 no *exon* 3 do gene da *CYP21A2,* gerando uma enzima sem atividade funcional, e consequentemente associada a forma perdedora de sal.

A mutação denominada p.Ile172Asn é uma alteração *missense* devido a troca de uma timina por uma adenina no aminoácido 172, no éxon 4 do gene *CYP21A2*. Essa mutação está associada ao fenótipo VS, permitindo uma pequena produção de aldosterona, sendo

suficiente para que seja evitada as crises de perda de sal. Esta mutação tem uma frequência de 5% a 10% nos alelos afetados.

A alteração denominada *Cluster 6* é caracterizada por um grupo de três mutações *missense* que ocorrem simultaneamente nos códons 236, 237 e 239 do éxon 6 do gene *CYP21A2*, causando a substituição de três aminoácidos: Isoleucina (Ile), Valina (Val) e Metionina (Met) por Asparagina (Asn), Ácido Glutâmico (Glu) e Lisina (Lis), respectivamente. Essas alterações fazem com que o gene mutado codifique uma proteína com atividade totalmente comprometida (0% de atividade) (AMOR et al., 1988; TUSIE-LUNA; TRAKTMAN; WHITE, 1990; MELLO et al., 2002), sendo assim, este conjunto de mutações está associado a forma PS quando identificada em homo ou hemizigose e possui uma frequência mundial de 3-17% entre todos os alelos (HIGASHI et al., 1991; WHITE; SPEISER, 2000; MELLO et al., 2002).

A mutação conhecida por p.Val281Leu leva a alteração do aminoácido valina por leucina na posição 281 da proteína, está localizado no éxon 7 do gene *CYP21A2* e relacionada ao fenótipo VS (KHAJURIA et al., 2017).

A mutação p.Gln318* está localizada no éxon 8 do gene *CYP21A2* e é causada por uma substituição de citosina por timina na base 952 do cDNA (c.952C>T) resultando em uma mutação *nonsense.* Como consequência desta mutação, uma glutamina é substituída por um códon prematuro de parada de leitura na posição proteica 318, gerando uma proteína truncada e com atividade nula. Essa alteração está associada a forma PS, devido a grave deficiência da atividade enzimática (0%) (GLOBERMAN et al., 1988; MELLO et al., 2002).

A mutação p.Arg356Trp também está localizada no éxon 8 do gene *CYP21A2* e é causada por é uma substituição de citosina por guanina na base 1066 do cDNA (c.1066C>T) resultanto em uma mutação *missense.* Como consequência desta mutação o aminoácido arginina é substituído por um triptofano na posição 356 da proteína CYP21A2. A atividade enzimática residual devido a essa alteração é de aproximadamente 2%, o que explica a associação com a forma clássica da HAC, principalmente ao fenótipo PS. Essa mutação ocorre em 14% dos alelos (MELLO et al., 2002). No Brasil sua frequência é de 8,2-8,6%,

sendo que no estado de Sergipe a frequência dessa alteração é de 14,3% (GLOBERMAN et al., 1988; MELLO et al., 2002; CAMPOS et al., 2009).

5. Considerações finais

A padronização e a implantação da técnica da PCR-AS para diagnóstico molecular de HAC-CYP21A2 no LGMH/HUPAA proporcionará a elucidação diagnósticas de casos triados no Programa Nacional de Triagem Neonatal e/ou atendidos no Serviço de Genética Clínica (SGC) do HUPAA/UFAL. Além disso, proporcionará o reconhecimento das mutações do gene *CYP21A2* na população de Alagoas, assim como a ampliação do conhecimento sobre as relações genótipo-fenótipo para cada caso de HAC. Este conhecimento é de fundamental importância para incrementar a abordagem diagnóstica, o tratamento, o aconselhamento genético e a prevenção.

Referências

BAŞ, F.; KAYSERILI, H.; DARENDELILER, F.; et al. CYP21A2 gene mutations in congenital adrenal hyperplasia: genotype-phenotype correlation in Turkish children. **Journal of clinical research in pediatric endocrinology**, v. 1, n. 3, p. 116–128, 2009.

BRØNSTAD, I.; BREIVIK, L.; METHLIE, P.; et al. Functional studies of novel CYP21A2 mutations detected in Norwegian patients with congenital adrenal hyperplasia. **Endocrine connections**, v. 3, n. 2, p. 67–74, 2014. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3987286&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. .

DUMIC et al. / **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.**

HIGASHI, Y.; TANAE, A; INOUE, H.; HIROMASA, T.; FUJII-KURIYAMA, Y. Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P-450(C21)] deficiency in humans: possible gene conversion products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 20, p. 7486–7490, 1988.

LEE, H. H.; CHANG, S. F.; TSAI, F. J.; TSAI, L. P.; LIN, C. Y. Mutation of IVS2-12A/C>G in combination with 707-714delGAGACTAC in the CYP21 gene is caused by deletion of the C4-CYP21 repeat module with steroid 21-hydroxylase deficiency. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 6, p. 2726–2729, 2003.

MELLO et al., 2002. Bases Moleculares da Hiperplasia Adrenal Congênita. **Arq Bras Endocrinol Metab vol 46 no 4 Agosto 2002**

NEW, M. I.; ABRAHAM, M.; GONZALEZ, B.; et al. Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 7, p. 2611–2616, 2013. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1300057110>. .

PANG, S.; CLARK, A. Newborn screening, prenatal diagnosis, and prenatal treatment of

congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 1, n. 6, p. 300–7, 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18411135>. .

R. KHAJURIA et al. / **Clinica Chimica Acta 464 (2017).**

WHITE, P. C.; VITEK, A; DUPONT, B.; NEW, M. I. Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. June, p. 4436–4440, 1988.