



Universidade de
Aveiro
2014/2015

Departamento de Química

Ana Patrícia Teixeira
dos Santos

**ESTUDO DE VARIAÇÕES DE SEQUÊNCIA DO
PROMOTOR DO GENE *CYP21A2* EM PACIENTES
COM SUSPEITA DE HIPERPLASIA SUPRA-
RENAL CONGÊNITA**



**Ana Patrícia Teixeira
dos Santos**

**ESTUDO DE VARIAÇÕES DE SEQUÊNCIA DO
PROMOTOR DO GENE *CYP21A2* EM PACIENTES
COM SUSPEITA DE HIPERPLASIA SUPRA-RENAL
CONGÊNITA**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica do ramo Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Filipa Gomes Abreu de Carvalho, Professora Auxiliar com Agregação, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

o júri

presidente

Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutora Cristina Joana Marques
Investigador Auxiliar da Escola de Ciências da Saúde da Universidade do
Minho

Professora Doutora Filipa Abreu Gomes de Carvalho
Professora Auxiliar com Agregação da Faculdade de Medicina da Universidade
do Porto

agradecimentos

À Professora Doutora Filipa Carvalho e à Mestre Berta Lima de Carvalho, pelo acompanhamento, disponibilidade, orientação e conhecimentos científicos e práticos que me transmitiram ao longo deste ano de trabalho.

Ao Professor Doutor Alberto Barros, director do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina do Porto, pela oportunidade de realização deste estágio bem como pela cedência de todos os meios necessários e condições favoráveis à realização do mesmo.

Aos colegas do Departamento de Genética, um sincero agradecimento pelo companheirismo, ajuda na integração no grupo de trabalho e pelos conhecimentos transmitidos que irão, certamente, ser essenciais na próxima etapa que se aproxima.

Aos meus amigos, em especial à Mariana, à Bárbara e à Raquel, por estarem presentes e terem sempre a palavra certa ao longo destes seis anos de formação académica.

À Ana e ao Pedro por todo o apoio e motivação, sem o qual este mestrado não seria possível.

Ao Joel, por toda a força e optimismo transmitidos que tanto me motivaram a terminar mais uma etapa.

Por fim, não menos importante, à minha mãe, por ser a melhor mãe do mundo e, apesar dos obstáculos e dificuldades apresentados, me ter sempre apoiado, da melhor maneira que podia.

A todos, um enorme obrigado!

palavras-chave

Hiperplasia surpa-renal congênita, gene *CYP21A2*, promotor, mutações, variações de sequência, fatores de transcrição

resumo

A Hiperplasia Supra-Renal Congénita (HSRC), causada por deficiência na enzima 21-hidroxilase, constitui uma das doenças autossómicas recessivas mais frequentes. Mutações no gene *CYP21A2* estão, maioritariamente, na causa desta patologia. A correlação entre o genótipo e o fenótipo nos pacientes com HSRC está bem estabelecida ou seja, mutações no gene da 21-OH estão em concordância com as manifestações clínicas apresentadas na maioria dos casos. As regiões regulatórias do gene *CYP21A2* têm sido pouco estudadas nestes pacientes e nelas pode estar a resposta para os casos que permanecem por esclarecer relativamente à relação genótipo-fenótipo.

No presente trabalho foi estudada a região promotora do gene *CYP21A2* em 40 pacientes com HSRC e em 50 controlos. Neste grupo foram encontradas as variações de sequência -4C/T, -189insT, -210C/T, -282T/G, -284A/G, -295A/C, -296T/C, -308G/C/T. A mesma região foi estudada num grupo controlo que revelou a presença das variações de sequência -4C/T, -282T/G, -284A/G, -295A/C, -296T/C. Adicionalmente, foram usadas ferramentas bioinformáticas-*Software* TRANSFAC®, para o estudo dos locais de ligação de factores de transcrição na região promotora analisada.

Não foram encontradas diferenças significativas relativamente às frequências alélicas das variações de sequência entre o grupo dos pacientes e o grupo controlo. As variações de sequência -189insT, -210T/C e -308G/C/T não estavam presentes no grupo controlo, Não foi claramente encontrada nenhuma relação entre as variações de sequência detetadas e o fenótipo apresentado pelos pacientes. Na análise relativa aos factores de transcrição, verificaram-se diferenças de ligação destes elementos, aquando da presença de determinadas variações de sequência. Este foi o primeiro estudo da região promotora do gene *CYP21A2* efectuado na população Portuguesa e os resultados obtidos servem como ponto de partida para trabalhos futuros nos quais seria de interesse aumentar o número de pacientes e de controlos bem como o investigar o papel de determinados factores de transcrição.

keywords

Congenital adrenal hyperplasia, CYP21A2 gene, promoter, mutations, sequence variation, transcription factors.

abstract

Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH), caused by 21-OH deficiency, is one of the most common autosomic recessive disorders. Mutations in CYP21A2 gene are, in most cases, the main cause for this disease. There is a good correlation between genotype and phenotype, however, there are some cases for which this correlation is not well established and regulatory regions may be involved. In the present study the promoter region on CYP21A2 gene was studied in 40 patients diagnosed with CAH. The polymorphisms found: -4C/T, -189insT, -210C/T, -282T/G, -284A/G, -295A/C, -296T/C, -308G/C/T. The same region was studied in a control group which revealed the polymorphisms -4C/T, -282T/G, -284A/G, -295A/C, -296T/C. Additionally, bioinformatic tool - Software TRANSFAC® was used to study the binding of the transcription factors to the promoter region of the CYP21A2 gene. The results didn't show significant differences between the allelic frequencies of the patient and control groups. The polymorphisms -189insT, -210T/C and -308G/C/T were not detected in the control group. NO correlation was observed between the presence of specific polymorphisms and the phenotype presented by the patients.. In concern to transcription factors ligation sites, some differences were observed regarding binding dependent of the sequence polymorphisms. This was the first study on the CYP21A2 promoter made in the Portuguese population and the results obtained should be the start point to next extended studies with larger number of patients and controls studied as well as to focus on transcription factors specific of the adrenal region.

Índice Geral

I. Introdução.....	23
1. Produção de hormonas esteróides no córtex adrenal.....	25
2. Hiperplasia Supra-Renal Congénita.....	27
2.1. HSRC causada por deficiência da 21-OH.....	27
2.2. Manifestações clínicas da HSRC	28
2.2.1. Forma Perdedora de Sal (PS).....	28
2.2.2. Forma Virilizante Simples (VS).....	29
2.2.3. Forma Não-Clássica (NC).....	30
2.3. Diagnóstico Bioquímico.....	30
2.4. Diagnóstico Pré-Natal e tratamento.....	30
3. Genética Molecular da HSRC	31
3.1. Estrutura do gene <i>CYP21A2</i>	31
3.2. Mutações do gene <i>CYP21A2</i>	33
3.3. Diagnóstico Molecular.....	35
4. Estudo de variações de sequência no promotor do gene <i>CYP21A2</i>	36
II Objetivos.....	39
III Material e Métodos.....	43
1. População estudada.....	45
2. Métodos.....	45
2.1. Reação da polimerase em cadeia (PCR).....	45
2.2. Purificação.....	46
2.3. Reação de Sequenciação.....	47
2.4. Precipitação.....	48
2.5. Análise de sequências.....	48
2.6. <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> (MLPA).....	49
3. Técnicas bioinformáticas para análise da região promotora - TRANSFAC®.....	51
IV Resultados.....	53
1. Variações de sequência do promotor do gene <i>CYP21A2</i>	55
2. Fatores de Transcrição da região promotora do gene <i>CYP21A2</i>	59
V Discussão.....	61
VI Referências Bibliográficas.....	69

Índice de figuras

Figura 1- Via metabólica da biossíntese de esteróides.	26
Figura 2- Representação esquemática do grau de virilização do sexo feminino e masculino, classificadas usando a escala desenvolvida por <i>Prader</i>	29
Figura 3- Representação esquemática da localização do gene <i>CYP21A2</i> na região <i>HLA</i> no cromossoma 6 (6p21.3).	32
Figura 4- Representação esquemática do <i>crossing-over</i> desigual dos genes da 21-OH, durante a meiose.	33
Figura 5- Representação da abordagem de amplificação e sequenciação do gene <i>CYP21A2</i>	35
Figura 6- Ilustração dos passos do processo de purificação.	47
Figura 7- Ilustração dos passos do processo de precipitação.	48
Figura 8- Porção de um electroferograma obtido pela sequenciação da região promotora do gene <i>CYP21A2</i>	49
Figura 9- Porção de um electroferograma obtido pela sequenciação da região promotora do gene <i>CYP21A2</i> dos pacientes em estudo.	57
Figura 10- Fatores de transcrição presentes numa região do promotor do gene <i>CYP21A2</i>	60

Índice de tabelas

Tabela 1- Mutações mais comuns no gene <i>CYP21A2</i> em pacientes com HSRC.	34
Tabela 2- <i>Primers</i> utilizados para a reação de PCR.	46
Tabela 3- <i>Primers</i> utilizados para a reação de sequenciação.	47
Tabela 4- Sondas da <i>mix</i> SALSA P050-C1 CAH utilizadas na reação de MLPA.	50
Tabela 5- Mutações na região codificante detetadas nos pacientes com HSRC.	55
Tabela 6- Variações de sequência encontradas na região promotora em quatro pacientes do grupo em estudo.	56
Tabela 7- Variações de sequência encontradas no promotor do gene <i>CYP21A2</i> – Grupo em estudo.....	58
Tabela 8- Variações de sequência encontradas no promotor do gene <i>CYP21A2</i> – Grupo controle.	58
Tabela 9- Fatores de transcrição associados às variações de sequência encontradas no promotor do gene <i>CYP21A2</i>	59
Tabela 10- Fatores de transcrição associados às variações de sequência que aparecem em conjunto no promotor do gene <i>CYP21A2</i> , nos pacientes em estudo.	60

I. Introdução

I. Introdução

I 1. Produção de hormonas esteróides no córtex adrenal

As hormonas esteróides são moléculas químicas sinalizadoras essencialmente produzidas pelas glândulas endócrinas e transportadas pela corrente sanguínea para tecidos e órgãos distantes ¹. Ao ligarem-se a recetores específicos, vão desencadear um grande número de respostas fisiológicas pela ativação ou repressão de genes específicos ².

O córtex adrenal é responsável pela produção de glucocorticóides, mineralocorticóides e hormonas sexuais que constituem as três principais classes de hormonas esteróides ¹. A síntese de glucocorticóides, mineralocorticóides e androgénios, a partir do colesterol, é um processo metabolicamente complexo que requer várias enzimas, tendo algumas mais do que uma função. A aldosterona, considerada o principal mineralocorticóide, regula a excreção de eletrólitos no rim e mantém o volume intravascular e a pressão sanguínea, pelo aumento da reabsorção de sódio no tubo coletor do rim, o que causa retenção de água e cloreto bem como a excreção de potássio e iões hidrogénio ². As hormonas sexuais desidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona, produzidas e secretadas pelas glândulas adrenais, são convertidas em hormonas mais potentes como a testosterona, dihidro-testosterona (DHT) e estradiol, levando ao desenvolvimento das características sexuais secundárias ³.

A produção de hormonas esteróides é regulada por feedback negativo por parte da região anterior do hipotálamo. A hormona libertadora de corticotrofina (CRH), libertada pelo hipotálamo, estimula a produção da hormona adrenocorticotropica (ACTH), evento este controlado, em parte, pelos níveis de cortisol e estímulos exteriores – situações de “stress”. A ACTH estimula o crescimento das células do córtex adrenal e a síntese de hormonas esteróides. A falta de ACTH provoca a diminuição considerável dos níveis de glucocorticóides e a produção de mineralocorticóides é reduzida a 50% ¹.

A via metabólica que leva à produção de esteróides (**Figura 1**) é complexa e de grande importância para o desenvolvimento do organismo, estando implicada em algumas patologias, como é o caso da Hiperplasia Supra-Renal Congénita (HSRC).

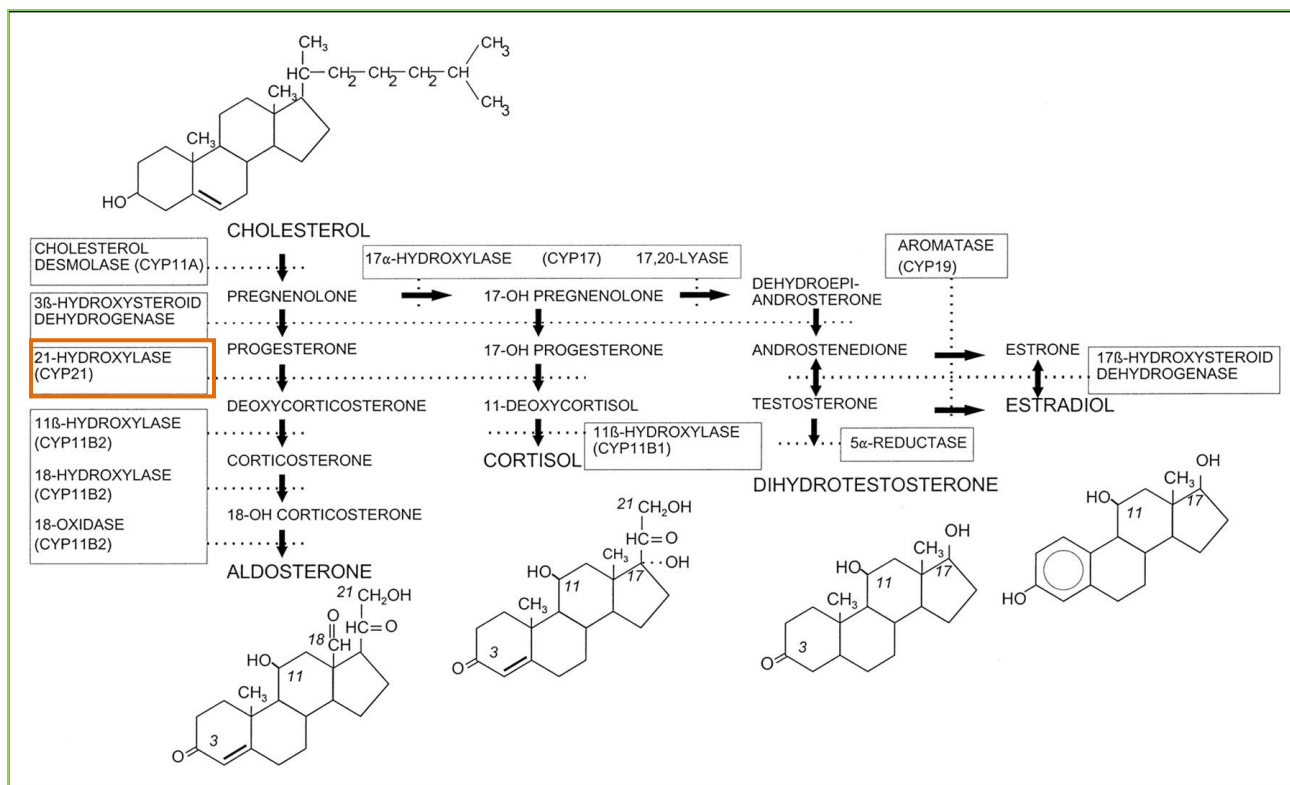


Figura 1: Via metabólica da biosíntese de esteróides. Via para a síntese de progesterona e mineralocorticóides (aldosterona), glucocorticoides (cortisol), androgénios (testosterona e dihidrotestosterona) estão representados da esquerda para a direita. Em caixas estão os nomes das enzimas que catalisam as bioconversões e entre parêntesis está o seu nome sistemático. A caixa em destaque evidencia a enzima 21-hidroxilase, foco deste trabalho. ⁴.

Defeitos enzimáticos nesta via provocam o seu desvio para a produção anormal de outros intermediários, em especial para via de produção de androgénios que leva, por sua vez, à hiperplasia adrenal e excesso de produção de metabolitos secundários.

I 2. Hiperplasia Supra-renal Congénita

A hiperplasia supra-renal congénita constitui um dos principais erros inatos do metabolismo ⁵, por perda ou diminuição da atividade de uma das cinco enzimas esteroidogénicas envolvidas na biossíntese de hormonas esteróides ⁶. A deficiência da enzima 21-hidroxilase (21-OH) é responsável por cerca de 90-95% dos casos desta doença (5-6). Os restantes casos devem-se a défices raros noutras enzimas tais como: 11 β -hidroxilase (11 β -OH), 17 α -hidroxilase (17 α -OH), 3 β -desidrogenase hidroesteróide (3 β -HSD) e da proteína *StaR* (enzima de clivagem de cadeia lateral do colesterol) e colesterol 20-22-desmolase. A incidência do défice na 21-OH é de 1/15000 nascimentos na população geral e de 1/120 se um dos pais apresentar HSRC ^{3,4,7}.

A clínica, que resulta da deficiência dos produtos finais (glucocorticóides, mineralocorticóides e androgénios) e da acumulação dos precursores que requerem a atividade da enzima, pode ser grave, moderada, ou leve. É uma patologia de transmissão autossómica recessiva, necessitando de dois alelos mutados para que ocorra a doença ⁸. Na maioria dos casos (65-75%) os indivíduos são heterozigóticos compostos, isto é, apresentam duas mutações distintas, uma em cada alelo ⁶. As manifestações clínicas são variadas e, de uma maneira geral, correspondem à atividade enzimática do alelo com a mutação menos grave ^{6,9,10}.

I 2.1. HSRC causada por deficiência da 21-OH

A enzima 21-hidroxilase pertencente ao grupo de enzimas do citocromo P450 e é responsável pela conversão da progesterona em desoxicorticosterona e pela conversão da 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) em 11-desoxicortisol ^{8,11}. Como referido anteriormente, a deficiência nesta enzima é responsável pela maioria dos casos de HSRC. Os precursores acumulados, que são o substrato da 21-hidroxilação, tendem a ser desviados para a síntese de androgénios, levando a níveis elevados de androstenediona, testosterona, dihidrotestosterona e estrogénios aromatizados periféricamente ^{4,8,11,12}. Os glucocorticóides endógenos são essenciais para o desenvolvimento e função da medula supra-renal ^{8,13,14}. Na ausência de cortisol e, conseqüentemente, défice de catecolaminas, principalmente a adrenalina, a organogénese da medula da supra-renal é severamente alterada ⁸. O hiperandrogenismo e a deficiência de adrenalina podem causar ou agravar o hiperinsulinismo e a hiperleptinémia, que contribuem para os vários distúrbios metabólicos observados na deficiência da 21-OH ⁸.

A hiperplasia supra-renal congénita por deficiência da 21-OH é uma das doenças autossómicas recessivas conhecidas mais frequentes ⁹. A prevalência da forma clássica da doença na população caucasiana é de cerca de 1:10000 a 1:15000 nados vivos, enquanto que a prevalência da forma não-clássica é de 0,2% ^{9,11}; contudo, existe uma prevalência significativamente superior entre algumas populações nomeadamente em judeus *Ashkenazy*, hispânicos e jugoslavos cuja prevalência varia de 1,0-3,7% ¹⁵. A heterozigotia para a deficiência da 21-OH está estimada em 1/60 em caucasianos não judeus e em 1/3 em judeus *Ashkenazy* ^{8,11,15}.

I 2.2. Manifestações clínicas da HSRC

O excesso de andrógenios produzidos durante a gestação de indivíduos com deficiência na 21-OH ou 11 β -hidroxilase provoca a virilização dos fetos femininos resultando em pseudo-hermafroditismo dos mesmos ⁴. Os rapazes, regra geral, não apresentam sinais de excesso de produção de androgénios verificando-se apenas hiperpigmentação da zona genital. O seu diagnóstico, nesses casos, pode ser feito pelos sinais aparentes de desidratação e choque hipovolémico no período neo-natal ¹⁶.

Dadas as diferentes manifestações que os pacientes com HSRC apresentam, a doença foi classificada em duas formas distintas: forma clássica, subdividida em perdedora de sal (PS) e virilizante simples (VS) e em forma não-clássica ou de expressão tardia ¹⁷. Em ambas as formas, a síntese diminuída de cortisol provoca o aumento de secreção de ACTH, que por sua vez estimula a glândula supra-renal para a produção de precursores de cortisol, incluindo androgénios e os seus intermediários. Deste modo vai haver uma hiperplasia do córtex adrenal, como referido anteriormente ¹⁸.

I 2.2.1. Forma Perdedora de Sal (PS)

A forma perdedora de sal da HSRC constitui a forma mais grave desta doença representando 75% dos casos da forma clássica da doença ¹⁸. Esta forma é caracterizada por uma ausência completa de atividade enzimática com consequente deficiência de cortisol e aldosterona ¹⁴. No que diz respeito aos órgãos genitais externos, a forma PS manifesta-se do mesmo modo que a forma VS, tornando-se esta ainda mais grave devido à deficiência na produção de mineralocorticóides, refletindo-se numa acrescida dificuldade de manutenção do balanço eletrolítico do organismo ¹². Se a terapêutica adequada não for administrada atempadamente, esta forma pode apresentar-se desde formas graves com quadro de desidratação, hiponatremia, hipercalémia, vômitos, acidose metabólica, choque hipovolémico e morte, até quadros mais discretos, onde se observa baixa progressão

ponderal e alterações hidroeletrolíticas, com atividade da renina plasmática aumentada ¹⁹. Nestes casos, a produção diminuída de cortisol e aldosterona representa uma ameaça à sobrevivência pelo que pode surgir uma insuficiência adrenal aguda entre a 1ª e a 3ª semanas de vida ²⁰. Aproximadamente 50% das crises de perda de sal ocorrem entre os 6 e os 14 anos de vida ¹⁹.

I 2.2.2. Forma Virilizante Simples (VS)

Ao contrário da forma perdedora de sal, na forma virilizante simples da hiperplasia supra-renal congénita não há um défice enzimático total mas sim parcial, marcado pela diminuição acentuada de cortisol ²¹. Esta apresenta-se com hipocortisolismo, virilização simples, também no período perinatal, e ambiguidade genital nos fetos do sexo feminino ²². Nos indivíduos do sexo feminino, o diagnóstico é efetuado, regra geral, pouco tempo após o nascimento devido à virilização da zona genital. A virilização pode ser classificada segundo uma escala – *Prader Stages*, sendo o estadio 5 o mais grave (**Figura 2**) ⁴. Apesar dessas alterações externas, os órgãos internos femininos não são afetados ⁴. Verificam-se também sinais de virilização precoce em indivíduos do sexo masculino, devido ao excesso de androgénios (por exemplo: pelos púbicos, pelos faciais, acne), resultantes do desvio da via metabólica do cortisol, no entanto, a subvalorização dos sinais de virilização precoce podem retardar o diagnóstico desta doença no sexo masculino ^{4,20}.

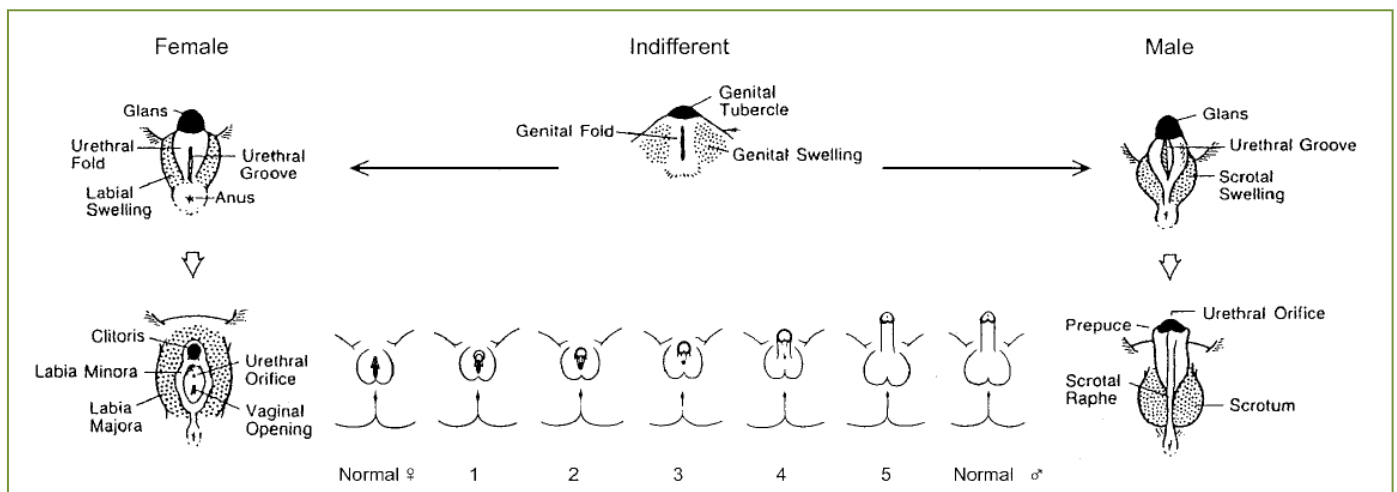


Figura 2: Representação esquemática do grau de virilização do sexo feminino e masculino, classificadas usando a escala desenvolvida por *Prader* ⁴.

I 2.2.3. Forma Não-Clássica (NC)

Na forma não-clássica da HSRC o bloqueio enzimático também é parcial, não ocorrendo, normalmente, deficiência de cortisol com significado clínico ²³. É a forma mais ligeira e tardia, manifestando-se por sinais de puberdade precoce, irregularidades menstruais, acne, maturação esquelética precoce, hirsutismo e/ou infertilidade, que podem ocorrer numa fase tardia da infância ou no início da idade adulta ¹⁴. Não ocorre virilização pré-natal. Algumas mulheres não apresentam sintomas e muitos homens permanecem assintomáticos sendo identificados como doentes apenas em estudos familiares ²³.

I 2.3. Diagnóstico Bioquímico

O diagnóstico bioquímico da HSRC é feito com recurso a doseamentos hormonais. A 17-hidroxiprogesterona é o marcador preferencial de diagnóstico desta doença ²⁰, no entanto, outros marcadores podem ser usados, tais como a DHEA, cortisol, testosterona, aldosterona e renina. A medição direta da atividade da 17-OHP não pode ser efetuada porque esta enzima expressa-se principalmente no córtex adrenal. Os portadores da forma não-clássica podem apresentar valores normais de 17-OHP pelo que a estratégia de diagnósticos nestes casos passa pela estimulação com ACTH sintética e posterior medição da hormona após 60 minutos. Uma concentração superior a 15ng/mL, de 17-OHP é indicadora de uma provável deficiência de 21-OH, no entanto, muitos portadores têm uma concentração apenas ligeiramente aumentada desta hormona após estimulação ⁸.

No que diz respeito aos indivíduos com a forma clássica da HSRC, estes apresentam um aumento acentuado de 17-OHP sérica, com valores superiores a 100 ng/mL, sem aumento de 11-desoxicortisol e com aumento menos acentuado de dehidroepiandrosterona e testosterona basais ¹⁴. Na forma perdedora de sal verifica-se ainda um aumento da atividade da renina plasmática, hiponatremia e hipercalémia ²².

I 2.4. Diagnóstico Pré-Natal e tratamento

O diagnóstico e tratamento pré-natal da hiperplasia supra-renal congénita têm como finalidade principal evitar a ambiguidade genital nos indivíduos do sexo feminino e evitar a puberdade precoce nos indivíduos do sexo masculino bem como os problemas psicológicos e físicos daí provenientes ²⁴.

Existem, atualmente, 3 formas de diagnóstico pré-natal: doseamento de 17-OHP no líquido amniótico, tipagem *HLA* das células das vilosidades coriônicas, para estabelecimento de *linkage*, e identificação das mutações do gene por técnicas de biologia molecular utilizando DNA extraído das células das vilosidades coriônicas ou amniócitos ¹⁶. É possível a realização deste tipo de diagnóstico a partir da 10ª semana de gestação pela biópsia das vilosidades coriônicas, ou, mais tarde, por volta das 16-17 semanas através de amniocentese ²⁴. A realização deste tipo de diagnóstico é aconselhável a famílias com crianças afetadas ou em casais portadores com risco elevado de virem a gerar filhos com a forma clássica da HSRC ²⁴.

O tratamento pré-natal desta doença faz-se recorrendo à administração de dexametasona à grávida, a partir da 6ª-7ª semana de gestação, que visa minimizar os efeitos da ambiguidade genital nos fetos do sexo feminino, afetados ²⁵. A dexametasona é um glucocorticoide muito potente, com fraca atividade mineralocorticóide. A presença de determinados grupos funcionais essenciais à atividade glucocorticoide, fazem com que esta molécula não seja ativada pela 11β-hidroxiesteróide desidrogenase e desta forma é suprimida a produção excessiva de androgéneos. Esta terapêutica permite normalizar os níveis de 17-OHP no líquido amniótico dos fetos afetados. A eficácia do tratamento ronda os 75%, sendo os eventuais efeitos adversos na grávida e no feto a longo prazo ainda não completamente conhecidos ^{7,25}.

O tratamento pós-natal pode ser de administração crónica ou aguda, sendo o último necessário aquando de uma crise perdedora de sal. Em ambos os casos é necessário administrar cloreto de sódio (NaCl) e hidrocortisona sendo a quantidade prescrita superior no caso agudo ¹⁹. A avaliação da eficácia e adequação da terapêutica glucocorticóide efetua-se pela monitorização da excreção urinária de 17-cetoesteróides e pregnanetriol e pelos níveis plasmáticos de 17-OHP ¹⁹.

I 3. Genética Molecular da HSRC

A hiperplasia supra-renal congénita, causada pela deficiência na enzima 21-OH é devida, maioritariamente por mutações no gene *CYP21A2* que codifica esta enzima ⁷. Deste modo, torna-se essencial o estudo e compreensão deste gene bem como das alterações moleculares, complementando o diagnóstico clínico desta doença.

I 3.1. Estrutura do gene *CYP21A2*

O *CYP21A2* está localizado na região do Complexo Maior de Histocompatibilidade (*MHC*) de classe III, no braço *p* do cromossoma 6 (6p21.3) próximo do seu pseudogene

inativo – *CYP21A1P*. O *CYP21A2* e o seu pseudogene estão afastados aproximadamente 30 kb e têm 98% de homologia nos exões e 96% nas sequências intrônicas ^{7,26,27}. Gene e pseudogene intercalam com genes que codificam para um dos componentes do Sistema Complemento – *C4* (*C4B* e *C4A*) e, em conjunto, pertencem ao módulo *RCCX*, ao qual pertencem também *RP1* (que codifica uma proteína nuclear da DNA helicase), *RP2* (versão não funcional da *RP1* e truncada), *TNXB* (codifica a proteína tenascina X, da matriz extracelular e que se sobrepõe ao *CYP21A2* do outro lado da cadeia de DNA) e o *TNXA* (cópia truncada do *TNXB*, que também se sobrepõe ao *CYP21A2* na cadeia *antisense*) ^{7,28} (Figura 3).

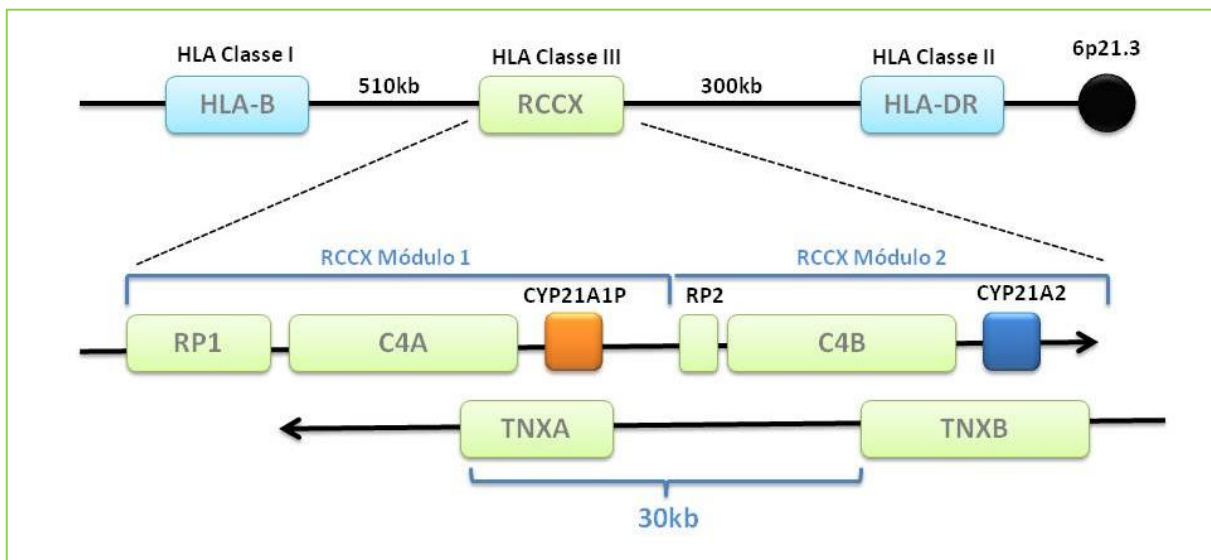


Figura 3: Representação esquemática da localização do gene *CYP21A2* na região *HLA* no cromossoma 6 (6p21.3). *HLA-DR* é a região mais próxima do *CYP21A2* que corresponde ao *HLA* Classe II enquanto que o *HLA-B* corresponde ao de Classe I. Entre estes dois componentes encontra-se o *HLA* Classe III que inclui o módulo *RCCX*. O *RCCX* está representado no bloco inferior. As setas indicam a direção da transcrição do *CYP21A2* e do *CYP21A1P* que estão afastados aproximadamente 30 kb. Os componentes *C4A* e *C4B*, que codificam para componentes do sistema complemento, o *RP1*, *RP2*, que codificam para proteínas nucleares putativas e *TNXB* e *TNXA* estão também alternados nesta região fazendo parte do bloco *RCCX* (Adaptado de ¹¹).

Ambos, *CYP21A2* e *CYP21A1P*, são compostos por 10 exões numa extensão de 3.1kb. O pseudogene, *CYP21A1P*, é inativo dado que foi adquirindo mutações patogénicas ao longo da evolução, como por exemplo uma deleção de 8 bases, no exão 3 (p.Gly110ValfsX21), uma inserção de uma timina no exão 7 (p.Leu307PhefsX5) e uma mutação *nonsense* no exão 8 (p.Gln318Ter). Aproximadamente 95% das mutações no gene *CYP21A2* são devido à ocorrência de recombinações genéticas entre este e o seu pseudogene, causando deficiência na enzima 21-OH ⁵. Aproximadamente 75% das

mutações do pseudogene foram transferidas para o gene durante a mitose por conversão génica, na qual porções do *CYP21A1P* são transferidas para o *CYP21A2* o que o impede de codificar a sua enzima funcional ¹¹. A conversão génica ocorre quando um alelo é perdido ou substituído por um alelo alternativo. Neste processo podem ocorrer transferências de apenas uma base (microconversão) ou de segmentos maiores ⁷.

Aproximadamente 20% das mutações presente neste gene são recombinações resultantes de fenómenos de *crossing-over* desigual (**Figura 4**) durante a meiose, na qual ocorre um emparelhamento incorrecto dos cromossomas. Os restantes 5% correspondem a mais de 100 mutações, regra geral *missense*, onde a alteração de um nucleótido resulta na substituição de um aminoácido. Mutações *de novo* representam aproximadamente 1 a 2 % dos casos ²⁹.

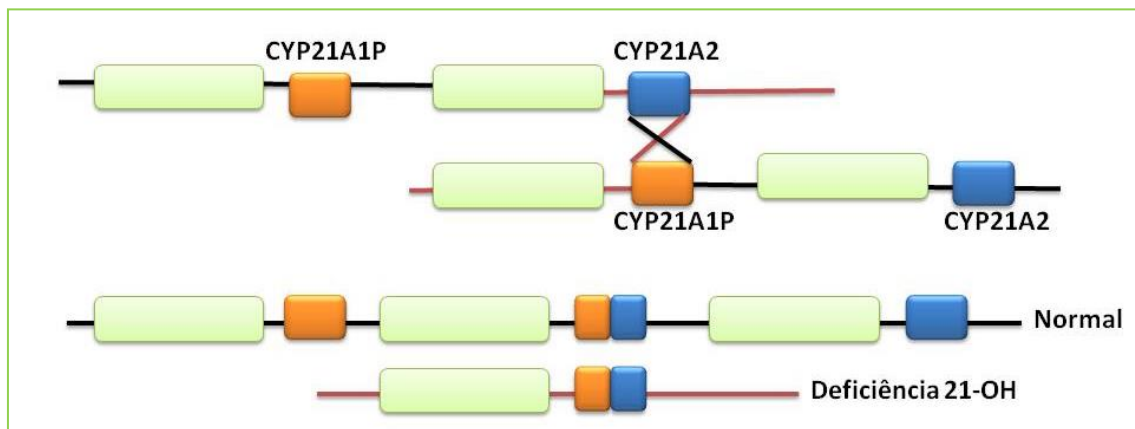


Figura 4: Representação esquemática do *crossing-over* desigual dos genes da 21-OH, durante a meiose. Este fenómeno faz com que os cromossomas filhos tenham um número anormal de genes *CYP21A2* devido a uma grande deleção (Adaptado de ¹¹).

O alto grau de homologia entre *C4B*, *CYP21A2*, *C4A* e *CYP21A1P* facilita a ocorrência de emparelhamento desigual durante a meiose entre os cromossomas homólogos e as cromátides irmãs ²⁹. Assim, podem formar-se gâmetas com organização dos genes *CYP21/C4* alternada ³⁰.

I 3.2. Mutações do gene *CYP21A2*

Vários estudos têm demonstrado elevados níveis de concordância entre o genótipo e o fenótipo em doentes com HSRC ²⁹. Essa concordância verifica-se tanto em doentes com as formas mais ligeiras como os que apresentam as formas mais graves da doença. Existe, no entanto, menor concordância genótipo-fenótipo nas formas moderadas da doença.

Muitos doentes são heterozigotos compostos e o fenótipo clínico está, geralmente, relacionado com o alelo com a mutação menos grave. No entanto, é de salientar que existem outros fatores que também influenciam o fenótipo apresentado e que são variáveis consoante a etnia dos pacientes ^{7,9,20}.

As formas clássica e não-clássica da doença estão associadas a diferentes genótipos ⁷. Estudos da expressão da proteína CYP21A2 *in vitro*, permitiram determinar a taxa de atividade enzimática associada à presença de uma determinada mutação (**Tabela 1**).

Tabela 1: Mutações mais comuns no gene CYP21A2 em pacientes com HSRC.

Mutação	Localização no gene CYP21A2	Atividade Enzimática (%)	Frequência (%)	Manifestação Clínica
p.Pro30Leu	Exão 1	30-60	0-9	NC
c.290-13A/C<G	Intrão 2	< 5	12-31	PS ou VS
p.Gly110ValfsX21	Exão 3	0	0-5	PS
p.Ile172Asn	Exão 4	1	2-29	VS
p.Ile236Asn	Exão 6	0	-	PS
p.Val273Glu	Exão 6	0	-	PS
p.Met239Lys	Exão 6	0	-	PS
p.Val281Leu	Exão 7	20-50	0-17	NC
p.Gln318X	Exão 8	0	0-14	PS
p.Arg356Trp	Exão 8	0	4-14	PS

Legenda: NC- forma não-clássica; PS- forma perdedora de sal; VS- forma virilizante simples. (Adaptado de³¹).

O genótipo da forma não clássica apresenta mutações moderadas em ambos os alelos ou uma mutação grave e uma mutação moderada (heterozigóticos compostos) ²³. As mutações *missense* no exão 7 (p.Val281Leu) e exão 1 (p.Pro30Leu) estão, predominantemente, associadas a esta forma com aproximadamente 20-50% da atividade enzimática normal ²³.

No que diz respeito à forma clássica da hiperplasia supra-renal congénita, está geralmente associada à presença de mutações graves em ambos os alelos e é acompanhada por uma atividade enzimática da 21-OH nula ou inferior a 5% ²¹. No intrão 2, mais especificamente, na posição 13, ocorre com alguma frequência uma mutação pontual na qual os nucleótidos A/C são substituídos por uma guanina ⁷, o que constitui uma mutação grave dado que origina a ocorrência de *splicing* alternativo gerando uma proteína disfuncional resultante da alteração da fase de leitura e de um subsequente codão de terminação prematuro. Muitos doentes têm esta mutação em homozigotia e apresentam níveis muito baixos, ou ausentes, de aldosterona, característicos da PS. Por sua vez os doentes com a forma VS apresentam com frequência a mutação no exão 4 (p.Ile172Asn)

associada a uma actividade enzimática de 1-2% que, apesar de ser baixa, permite a síntese de aldosterona ²³.

I 3.3. Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular da hiperplasia supra-renal congénita baseia-se na detecção de mutações pontuais, pequenas deleções ou inserções, maioritariamente transferidas do pseudogene para o gene ativo ³¹. A análise completa do *CYP21A2*, por sequenciação, permite a detecção de mutações já descritas, assim como a detecção de novas variações de sequência ³². O estudo molecular do gene *CYP21A2* implica a sua amplificação com *primers* específicos de modo a isolar o gene funcional do pseudogene inativo *CYP21A1P* ²⁰.

Dado que o *CYP21A2* é composto por dez exões e os seus intrões são de tamanho reduzido, é possível amplificar toda a região codificante, juntamente com a região intrónica, e, posteriormente, sequenciar todos os 10 exões e respetivas regiões flaqueantes intrão-exão ^{32,33}. A necessidade de amplificar especificamente o gene ativo e não o pseudogene, obriga a uma criteriosa seleção dos *primers* a ser utilizados na reação de PCR. Para conseguir esta especificidade, a estratégia mais comum é selecionar um *primer* que esteja situado no local com sequência específica e única do gene (**Figura 5**) ^{32,33}.

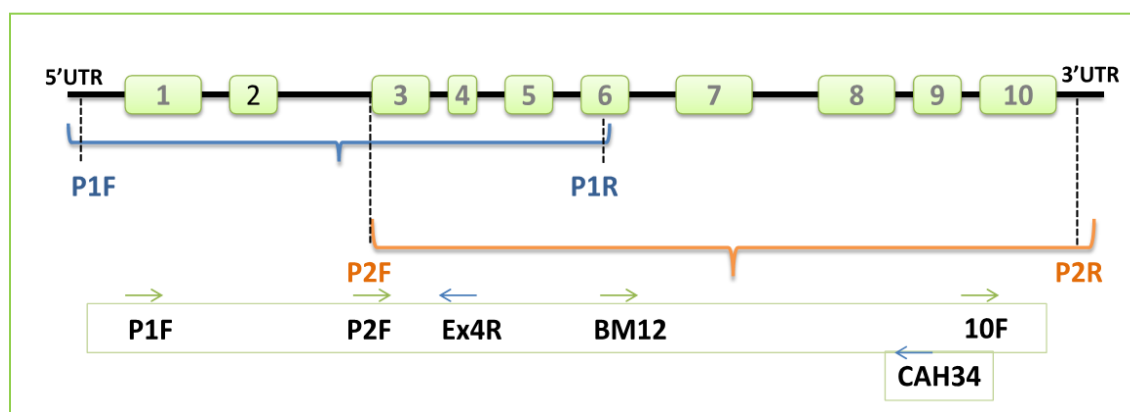


Figura 5: Estratégia de amplificação e sequenciação do gene *CYP21A2*. P1: fragmento (azul) de 1517bp desde a região 5'UTR até ao exão 6, (P1F e P1R: *primers* usados na amplificação). P2: fragmento (laranja) de 2214bp desde o exão 3 até à região 3'UTR (P2F e P2R: *primers* usados na amplificação). P1F, Ex4R, P2F, BM12, CAH34 e 10F: *primers* internos usados na sequenciação pelo método de *Sanger*.

A sequenciação completa do gene *CYP21A2* nem sempre é efetuada usando o mesmo conjunto de *primers*. A ocorrência de certas variações de sequência, patogénicas ou não, pode provocar alterações na leitura da sequência pelo que devem ser desenhados e utilizados diferentes *primers forward* ou *reverse* de modo a analisar essa zona e permitir

fazer a leitura completa do que não era possível analisar com a abordagem de rotina ³². Isto reflete a complexidade da genômica da HSRC e a necessidade de um cuidado particular para cada amostra aquando do seu diagnóstico molecular.

A abordagem molecular a utilizar na identificação de deleções e/ou duplicações é diferente da utilizada para análise de mutações pontuais ou pequenas alterações de sequência. A técnica de *Southern blot* foi utilizada durante muitos anos como *gold standard* no estudo de grandes deleções no gene *CYP21A2* mas revelou ter algumas desvantagens, como por exemplo, o trabalho moroso a nível laboratorial, o uso da radioatividade e a necessidade de usar grandes concentrações de DNA de boa qualidade. A técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) tem vindo a substituir os métodos previamente utilizados para detetar deleções ou duplicações do gene ou outros rearranjos que também levam a alterações na atividade enzimática ²⁰. Nesta técnica são adicionadas sondas específicas ao DNA que serão amplificadas e, depois, quantificadas relativamente a amostras controlo. A sua vantagem relativamente às técnicas até então utilizadas é que é mais sensível, fácil, necessita de menor quantidade de DNA (25-250 ng), possibilitando o estudo de várias amostras em simultâneo ^{20,34}.

I 4. Estudo de variações de sequência no promotor do gene *CYP21A2*

O estudo de variações de sequência do gene da 21-OH foi focado durante muito tempo na análise das regiões codificantes ²⁹. No entanto, uma percentagem significativa de casos com suspeita clínica permanece sem confirmação molecular, como por exemplo, os casos em que apenas foi identificada uma mutação ³⁵. Isto pode dever-se à presença adicional de mutações ou polimorfismos que não são detetados nos estudos convencionais ou, eventualmente, à ocorrência de *splicing* alternativo ³⁵.

Têm surgido, em algumas populações, estudos das regiões reguladoras da transcrição como é o caso da região promotora ³⁶. Estes estudos têm por base a sequenciação do promotor do gene na tentativa de encontrar variações de sequência que, juntamente com algumas das mutações descritas mais conhecidas, possam contribuir para a elucidação dos casos que não estão totalmente justificados pelo diagnóstico genético e clínico. A maioria dos trabalhos incide, particularmente, em doentes com diagnóstico clínico de HSRC nos quais foi encontrada apenas uma mutação, em heterozigotia, o que, por si só, não explica as características fenotípicas apresentadas ³⁷⁻³⁹.

Araújo e colaboradores (2007), mostraram que a microconversão da variante -126C<T, entre o promotor do *CYP21A1P* e do *CYP21A2*, reduz a atividade transcripcional

para 52% resultando na forma não-clássica do fenótipo da 21-OH ³⁷. A presença de variações de sequência no promotor, em *cis* com a mutação p.Pro30Leu, parece estar, também, fortemente associadas à forma virilizante simples ³⁶. No entanto, não se sabe se variações no promotor, por si só, estão associadas com a forma clássica da HSRC. *Kagawa e Waterman* (1991) e *Chang e Chung* (2012) demonstraram, também, que algumas substituições de nucleótidos tais como -103A>G, -110T>C, -113G>a e -126C>T têm como consequência a ligação menos eficaz dos fatores de transcrição Sp-1 (*Specificity Protein 1*) e ASP (*Adrenal-Specific Protein Factor*) à região promotora do gene *CYP21A2*. Estão ainda descritas outras variações de sequência localizadas um pouco mais afastados, nomeadamente: -447A>G, -443InsA, -306G>C, -295T>C, -294A>C, -283A>G, -281T>G, -210T>C, -199C>T, identificados em pacientes com a forma virilizante simples da deficiência na 21-OH, que acompanham a mutação p.Gln318X ³⁹⁻⁴¹.

Estes dados destacam a importância do estudo da região promotora do gene dado que esta está envolvida no processo de transcrição e contém locais de ligação para o fator de transcrição Sp1 e para fatores de transcrição adrenais específicos, em especial nos 167 nucleótidos que estão antes do codão ATG ⁴². Consequentemente, alterações de sequência nesta região podem alterar a ligação destes e outros fatores, contribuindo para características fenotípicas dos doentes com HSRC ^{36,37,39}.

II Objetivos

II Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo o estudo de variações de sequência da região promotora do gene *CYP21A2* em pacientes com diagnóstico clínico, ou suspeita, de hiperplasia supra-renal congênita, apenas com uma mutação identificada por diagnóstico molecular e os efeitos que essas variações de sequência podem ter quanto à regulação da transcrição do gene.

III Material e Métodos

III Material e Métodos

III 1. População estudada

A análise do gene *CYP21A2* foi efetuada em 40 pacientes com diagnóstico clínico, ou suspeita, de hiperplasia supra-renal congénita, seguidos nas consultas de Endocrinologia e Genética, no Centro Hospitalar S.João, Porto. Todos os pacientes apresentavam uma só mutação no gene *CYP21A2* e valores de 17-OHP aumentados ou manifestações clínicas características de uma das formas de HSRC. Paralelamente, foi efetuado o estudo de um grupo controlo, constituído por 50 indivíduos, dadores voluntários do Centro de Histocompatibilidade do Centro Hospitalar S. João. Todas as amostras foram analisadas de forma anonimizada.

III 2. Métodos

A região promotora do gene *CYP21A2* foi definida usando o programa de predição de promotores e regiões 5'terminal de exões, disponível *online*, *First EF (first-exon and promoter prediction program for human DNA)*⁴³, usando a sequência de referência *FASTA* do gene do *National Center for Biotechnology Information-NCBI*⁴⁴ (NM_000500.7), que originou as posições de início e de fim do promotor, resultando um fragmento de 570pb de tamanho, contido entre as posições genómicas: 4601 e 5171pb do gene *CYP21A2*.

A análise genética das variações de sequência do gene foi realizada com recurso a DNA genómico existente em banco no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. O DNA foi extraído pelo *kit* de extração de DNA da *Citogene (Citomed)*, a partir de sangue periférico.

A concentração e pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria, usando um espectrómetro- *NanoDrop 2000c Spectrophotometer*. A concentração de DNA utilizada na reação de PCR foi de 100ng/μL.

III 2.1. Reação da polimerase em cadeia (PCR)

A reação da *polimerase* em cadeia tem como objetivo a amplificação de uma região específica do DNA. Para isso recorre-se a *primers* específicos, que são pequenas sequências de nucleótidos que se ligam nas extremidades da zona alvo e permitem a sua amplificação exponencial. Para amplificar a região promotora do gene *CYP21A2* desenhou-se um par de *primers*, cujo *primer forward* localiza-se na região promotora (-420bp) e o *primer reverse* localiza-se no exão 3 do *CYP21A2* para que seja amplificado o gene e não o seu pseudogene (**Tabela 2**).

Tabela 2: *Primers* utilizados na reação de PCR.

Primer	Sequência (5'-3')	Produto (bp)	Temperatura de Annealing	Localização
PF	TTC AGG CGA TTC AGG AAG GC	1151	60°C	Promotor
PR	TCC AGA GCA GGG AGT AGT CT			Exão 3

A reação de PCR efetuou-se para um volume final de 25µL, contendo 1µL de DNA genômico (100ng), 1µL de cada *primer* (25pmol/µL), 2,5µL de tampão (*10X Expand Long Template Buffer PCR System*), 3,5µL de *mix* de dNTPs (10mM) e 0,3µL da enzima *Expand Long Template Enzyme* (ROCHE®). A PCR decorreu com uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, 2 minutos a 68°C e uma extensão final de 7 minutos a 68°C. O termociclador utilizado foi o *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*). O produto final, de 1151 pb, foi corrido em eletroforese capilar no aparelho *Qiaxel Analyzer* (QIAGEN) para verificar confirmação de tamanho.

III 2.2. Purificação

Os produtos amplificados foram sujeitos ao processo de purificação (**Figura 6**), que consiste na depuração da amostra de excesso de *primers*, nucleótidos, sais, enzimas e outros contaminantes. O sistema utilizado denomina-se *Agencourt® AMPure XP® PCR Purification system*, da marca *Beckman Coulter*, que recorre a partículas magnéticas e permite a obtenção de produtos purificados com diferentes aplicações tais como sequenciação, análise de fragmentos e clonagem.

Os passos gerais seguidos no processo de purificação foram os seguintes:

- 1- Adição de 1µL de AMPure XP por cada µL de produto PCR.
- 2- Ligação das *beads* ao DNA.
- 3- Separação das *beads* com DNA dos restantes contaminantes numa placa magnética.
- 4- Lavagem com 180µL de etanol a 70%. Secagem das *beads* durante 5 minutos à temperatura ambiente.
- 5- Adição de 35µL de *buffer* de eluição às *beads* secas e eluição da amostra na placa magnética.
- 6- Transferência de 20µL de amostra eluída para novos tubos (guardar a -20°C).

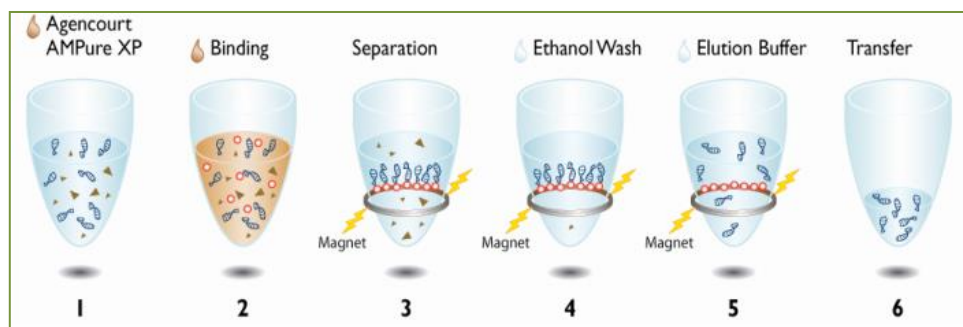


Figura 6: Ilustração dos passos do processo de purificação (Disponível em: www.beckmancoulter.com)

III 2.3. Reação de Sequenciação

Após a purificação dos produtos de PCR, a reação de sequenciação da região alvo vai permitir obter a sequência exata de nucleótidos da cadeia de DNA em estudo. Utiliza-se a sequenciação pelo método de *Sanger* que consiste na síntese de cadeias a partir do fragmento de DNA. Para a síntese das cadeias de diferentes tamanhos são usados ddNTPs (didesoxirribonucleótidos trifosfato), que, ao contrário dos dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato), não possuem o grupo 3'-OH, o que vai impedir a formação da ligação fosfodiéster com outro nucleótido trifosfato, terminando a cadeia, aquando da sua incorporação. A reação assemelha-se a uma reação de PCR, na qual ocorre uma desnaturação inicial do fragmento de DNA de dupla cadeia, com síntese in vitro de DNA a partir dessa cadeia molde. São, igualmente, necessários *primers* específicos para a zona que queremos sequenciar e uma mistura que contém baixas concentrações de ddNTPs e altas concentrações de dNTPs. Assim, em cada reação, um ddNTP é incorporado aleatoriamente na posição do dNTP correspondente, provocando a terminação da polimerização. As cadeias obtidas são separadas por eletroforese para determinação da sequência alvo.

A reação de sequenciação da região promotora do gene *CYP21A2* foi efetuada recorrendo ao *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)* e o aparelho de PCR *GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)* e os *primers* utilizados estão descritos na **tabela 3**.

Tabela 3: *Primers* utilizados para a reação de sequenciação.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Localização	Produto Sequenciado (pb)
PF	TTC AGG CGA TTC AGG AAG GC	Promotor	424
SAR3'	ACG TCC CAA GGC CAA TGA GAC T	Promotor	

III 2.4. Precipitação

Os produtos resultantes da reação de sequenciação são posteriormente submetidos ao processo de precipitação, usando um sistema semelhante ao de purificação – *Agencourt CleanSEQ system* da marca *Beckman Coulter*. Este sistema usa também partículas magnéticas – *Agencourt SPRI® (Solid Phase Reversible Immobilization)* e permite a remoção de contaminantes (**Figura 7**).

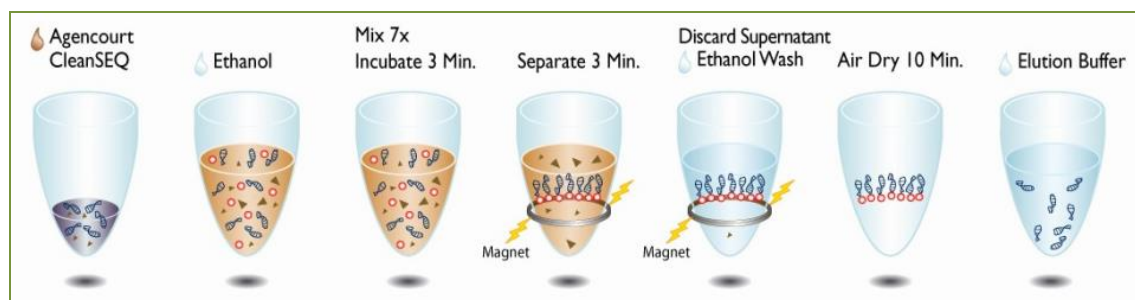


Figura 7: Ilustração dos passos do processo de precipitação. (Disponível em: www.beckmancoulter.com)

O processo de precipitação do DNA consiste no seguinte procedimento:

- 1- Adição de 10 μ L de *Agentcourt® CleanSEQ®* e 42 μ L de etanol a 85% à amostra – homogeneizar.
- 2- Separação das *beads* com DNA dos restantes contaminantes numa placa magnética e remoção do etanol.
- 3- Lavagem (duas vezes) com 100 μ L de etanol a 85%. Secagem das *beads* durante 5 minutos à temperatura ambiente.
- 4- Adição de 20 μ L de *buffer* de eluição às *beads* secas e eluição da amostra na placa magnética.
- 5- Transferência de 10 μ L de amostra eluída para a placa de sequenciação.

III 2.5. Análise de sequências

Os produtos resultantes da reação de sequenciação e, posteriormente precipitados, são analisados num sequenciador automático - *3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems)*. A inclusão de fluorocromos com diferentes cores para cada tipo de ddNTP permite a distinção das cadeias terminadas em diferentes pontos, pela respetiva fluorescência emitida. O aparelho faz a deteção da fluorescência e distingue os quatro

fluorocromos, aquando da sua passagem pelo detetor laser, dando, no final, a sequência exata da cadeia de DNA complementar à cadeia usada como molde (Figura 8).

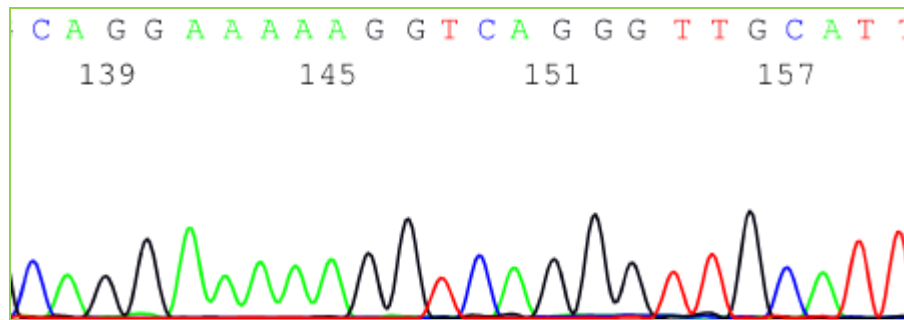


Figura 8: Porção de um electroferograma obtido pela sequenciação da região promotora do gene *CYP21A2*.

As sequências obtidas são comparadas com uma sequência de referência NM_000500.7 da base de dados NCBI usando a ferramenta BLAST, para o alinhamento das sequências. Deste modo, podem verificar-se variações de sequência das amostras em estudo, comparativamente com a sequência de referência para o genoma humano. Essas variações, na sua maioria, estão descritas nesta base de dados (SNPs *database*-NCBI), bem como na base de dados ENSEMBL, também usada para a análise das sequências em estudo.

III 2.6. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)*

A técnica de MLPA permite a quantificação relativa de várias sequências de DNA diferentes com recurso a uma pequena quantidade de amostra (aproximadamente 20 ng de DNA) ⁴⁵. Essa quantificação é feita com recurso a sondas específicas que se vão ligar ao DNA e vão ser amplificadas e quantificadas. A cada região do genoma vai corresponder uma sonda, constituída por dois oligonucleótidos, que hibridam em locais diferentes e, posteriormente, voltam a ligar-se. Um dos oligonucleótidos é sintético e o outro é derivado do fago M13. As sondas são separadas por 6 a 9 pb e, após hibridação durante 16 horas com o DNA alvo, são unidas por uma ligase. A região terminal destas sondas contém uma sequência idêntica, de modo a que se possa proceder à sua amplificação por PCR com um só par de *primers*. Deste modo, os produtos amplificados são separados por eletroforese capilar e os produtos originados por cada sonda são dispostos consoante o seu tamanho. A cada fragmento amplificado vai corresponder uma área que é calculada de forma automática numa folha de *Excel* através dos dados importados do programa *GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems)*.

Nas amostras dos pacientes em estudo foi efetuada a técnica de MPLA para avaliar a existência de deleções ou duplicações no gene *CYP21A2*. Este procedimento faz parte do diagnóstico genético desta patologia, efetuado no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, bem como a sequenciação total da parte codificante e não codificante do gene. As 40 amostras foram processadas com *kit* SALSA P050-C1 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Este *kit* de sondas contém 8 sondas para o *CYP21A2* e 4 sondas específicas para o pseudogene *CYP21A1P*. Contém ainda 6 sondas para o gene *TNXB* e uma para o gene *ATF6B*, bem como 8 sondas de referência em vários cromossomas (Tabela 4).

Tabela 4: Sondas da *mix* SALSA P050-C1 CAH utilizadas na reação de MLPA das amostras em estudo.

Sondas <i>CYP21A1P</i> (NM_000500.7)		
Tamanho (nt)	Sonda MLPA SALSA	Gene/Exão
292	15945-L18079	CYP21A1P- Exão 1
184	15221-L20252	CYP21A1P- Exão 3
272	15220-L20668	CYP21A1P- Exão 4
220	1761-L21170	CYP21A1P- Exão 7
Sondas <i>CYP21A2</i> (NM_000500.5)		
309	15944-L18351	CYP21A2- Exão 1
254	16645-L20231	CYP21A2- Exão 3
259	16645-L20299	CYP21A2- Exão 3
190	15221-L20299	CYP21A2- Exão 3
265	15220-L20667	CYP21A2- Exão 4
232	17270-L16990	CYP21A2- Exão 6
238	17271-L16989	CYP21A2- Exão 6
214	17261-L21169	CYP21A2- Exão 7
Sondas <i>TNXB</i> (NM_019105.6)		
148	19037-L14637	TNXB- Exão 35
318	15230-L14636	TNXB- Exão 35
355	15232-L01515	TNXB- Exão 31
373	15233-L15002	TNXB- Exão 26
326	19038-L17756	TNXB- Exão 23
364	15235-L04400	TNXB- Exão 19
346	01979-L20800	ATF6B, Exão 1

(Disponível em: www.MRC-Holland.com)

Protocolo de MLPA:

- Desnaturação do DNA e hibridação das sondas SALSA:

- Adição 5µL de DNA da amostra ao tubo de PCR e 5µL de água estéril (*B/Braun*) ao tubo do controlo negativo. Incubação a 95°C durante 5 minutos no termociclador *GeneAmp PCR 9700* (*Applied Biosystems*).
- Juntar, à temperatura ambiente: 1,5µL de SALSA *Probe-mix* + 1,5µL MLPA *buffer* e adicionar 3µL da mistura a cada tubo.
- Incubação durante 1 minuto a 95°C e, posteriormente, 16 horas a 60°C.

- Reação de ligação

Misturar em gelo: 1,5µL de *Ligase-65 buffer A* + 1,5µL de *Ligase-65 buffer B* + 12,5µL de água estéril (*B/Braun*) e 0,5µL de *Ligase-65*.

- Redução da temperatura do aparelho termociclador para 54°C.
- Adição de 16µL mistura *Ligase-65* a cada amostra.
- Incubação durante 15 minutos a 54°C e 5 minutos a 98°C, para inativar a *ligase*.

- Reação de PCR

Misturar, em gelo: 1µL de SALSA PCR-*primers* + 0,25 µL de SALSA *Polimerase* + 3,75µL de água estéril (*B/Braun*)

- Distribuir 5µL da mistura por cada amostra e efetuar o programa de PCR.

III 3. Técnicas bioinformáticas para análise da região promotora - TRANSFAC®

Para o estudo da ligação de fatores de transcrição à região promotora do gene *CYP21A2* foi usada a ferramenta bioinformática TRANSFAC® da *BIOBASE- Biological Databases*. Esta base de dados permite prever quais os fatores de transcrição que se vão ligar a uma dada sequência nucleotídica e, conseqüentemente, comparar duas sequências alvo. Uma vez feito o *upload* das sequências no programa e escolhido o organismo em questão, pode visualizar-se o local de ligação de cada fator de transcrição, a região conservada que lhe diz respeito, o nome do fator de transcrição e breve descrição do

mesmo, bem como um esquema de toda a sequência estudada e os elementos a que ela se ligam, representados por diferentes cores.

Para o presente estudo foi usada a ferramenta *Match Analysis- Predict TF (Transcription Factor) Binding Sites* com o perfil – *Vertebrate Non Redundant min SUM*, contidas no *software* TRANSFAC®. Esta opção permite a consulta de matrizes de resultados de fatores de transcrição para os vertebrados. Inicialmente, analisou-se a sequência do promotor do gene (570 pb) *CYP21A2* sem variações de sequência e, de seguida, a mesma abordagem foi feita para a sequência do promotor com as variações de sequência encontradas com o objetivo de analisar as potenciais diferenças na regulação da transcrição.

IV Resultados

IV Resultados

IV 1. Variações de sequência do promotor do gene *CYP21A2*

Foram estudados 40 pacientes que apresentavam uma só mutação no gene *CYP21A2* (Tabela 5) e 50 indivíduos controlo.

Tabela 5: Mutações na região codificante detetadas nos pacientes com HSRC, estudados.

Paciente	Mutações – Região codificante	Paciente	Mutações – Região codificante
1	p.Val281Leu	21	p.Gln318Ter
2	p.Val281Leu	22	p.Val281Leu
3	p.Val281Leu	23	p.Val281Leu
4	p.Ile172Asn	24	Conversão Génica Promotor
5	p.Val281Leu	25	p.Val281Leu
6	p.Val281Leu	26	p.Val281Leu
7	p.Val281Leu	27	p.Val281Leu
8	p.Ile172Asn	28	p.Gln318Ter
9	p.Val281Leu	29	p.Val281Leu
10	p.Val281Leu	30	p.Val281Leu
11	p.Val281Leu	31	p.Val281Leu
12	p.Val281Leu	32	p.Val281Leu
13	p.Val281Leu	33	p.Val281Leu
14	p.Ile172Asn	34	p.Val281Leu
15	p.Val281Leu	35	p.Val281Leu
16	p.Ile172Asn	36	p.Val281Leu
17	p.Val281Leu	37	p.Val281Leu
18	p.Gln318Ter	38	p.Val281Leu
19	c.290-13A/C<G	39	p.Val281Leu
20	p.Gln318Ter	40	p.Val281Leu

Resumidamente, dos 40 casos, 30 apresentavam a mutação p.Val281Leu, 4 apresentavam a p.Ile171Asn, 4 apresentavam a p.Gln318Ter, 1 apresentava a c.290-13A/C>G e 1 apresentava uma conversão génica do promotor, mutações detetadas pelo diagnóstico genético de rotina da HSRC.

A sequenciação da região promotora do gene *CYP21A2* permitiu identificar variações de sequência em quatro pacientes: -4C/T, -189 insT, -210C/T, -282T/G, -284A/G, -295A/C, -296T/C e -308G/C/T (Tabela 6).

Tabela 6: Variações de sequência encontradas na região promotora estudada em 4 pacientes do grupo em estudo.

Paciente	Idade ao diagnóstico	Mutações – Região codificante	Variações de sequência – Promotor <i>CYP21A2</i>
3	45	p.Val281Leu	-4C/T
24	27	Conversão Génica Promotor	-189 ins T -210T/C -282T/G, -284A/G -295A/C -296T/C -308G/C/T
25	42	p.Val281Leu	-4C/T
29	9	p.Val281Leu	-282T/G -284A/G -295A/C -296T/C -308G/C/T

Na **figura 9** está representada uma porção do electroferograma obtido pela sequenciação da região promotora do *CYP21A2*. A zona apresentada contém as variações de sequência -282T/G, -284A/G, -295A/C, -296T/C.

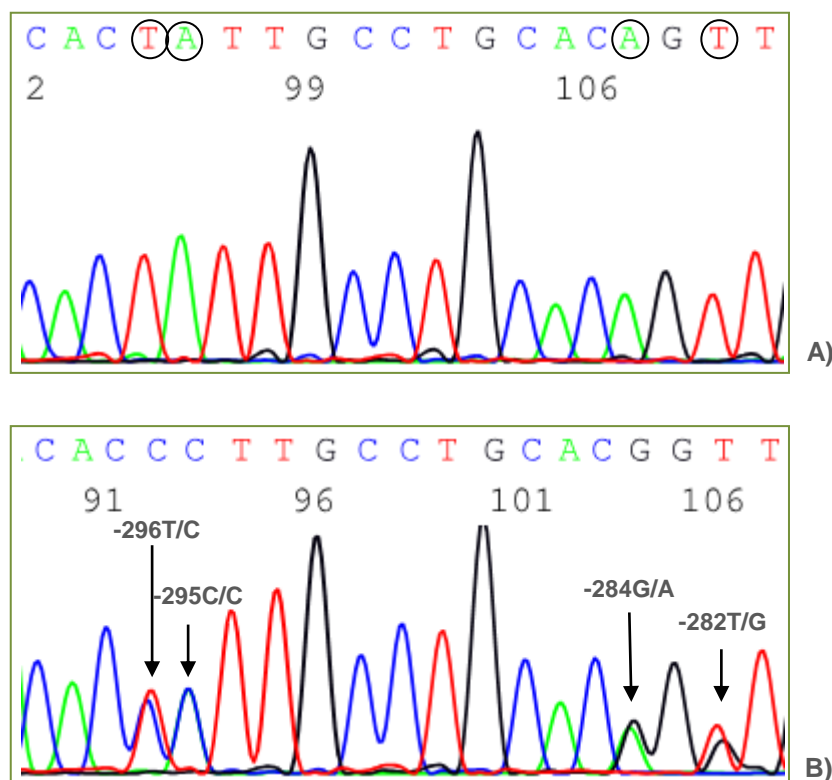


Figura 9: Porção de um electroferograma obtido pela sequenciação da região promotora do gene *CYP21A2* dos pacientes em estudo. A- Sequência normal; B- Sequência com as variações de sequência: -282T/G, -284G/A, -295C/C, -296T/C.

Dos 40 pacientes, 5% apresentaram as variações de sequência -4C/T -282T/G, -284A/G, -295A/C, -296T/C e -308G/C/T e 2,5% apresentaram as variações -210T/C e -189insT.

No que diz respeito ao grupo controlo, também se verificou a existência de variações de sequência na região promotora do gene *CYP21A2*. Em 2% verificou-se a presença da variação de sequência -4C/T, em 6% estavam presentes as variações de sequência -282T/G, -284A/G, -295A/C, -296T/C e, não foram detectados em nenhum controlo as variações -189 insT, -210T/C e -308G/C/T.

As frequências alélicas de cada variação de sequência, para os dois grupos, estão representadas nas **tabelas 7 e 8**, bem como a referência da base de dados NCBI.

Tabela 7: Variações de sequência encontradas no promotor do gene *CYP21A2* – Grupo em estudo.

Variação de Sequência	Ref. SNP - NCBI	Frequência alélica – grupo em estudo	Frequência alélica- NCBI	Alelo ancestral- NCBI
-4C/T	rs6470	C/T (0.975/ 0.025)	C/T (0.675/0.325)	-
-189 ins T	-	-/T (0.988/ 0.012)	-	-
-210T/C	-	T/C (0.988/ 0.012)	-	-
-282T/G	rs79899926	T/G (0.975/ 0.025)	T/G (1/0)	G
-284A/G	rs78873743	A/G (0.975/ 0.025)	A/G (1/0)	G
-295A/C	rs3130495	A/C (0.950/ 0.050)	A/C (0.950/0.050)	C
-296T/C	rs3130677	T/C (0.975/ 0.025)	T/C (0.986/ 0.014)	C
-308G/C/T	rs3130676	G/C (0.975/ 0.025)	G/C (1/0)	G

Legenda: (-) Informação não disponível na base de dados NCBI

Tabela 8: Variações de sequência encontradas no promotor do gene *CYP21A2* – Grupo controle.

Variação de Sequência	Ref SNP - NCBI	Frequência alélica – grupo controle	Frequência alélica- NCBI	Alelo ancestral- NCBI
-4C/T	rs6470	C/T (0.990/ 0.010)	C/T (0.675/ 0.325)	-
-282T/G	rs79899926	T/G (0.970/ 0.030)	T/G (1/ 0)	G
-284A/G	rs78873743	A/G (0.970/0.030)	A/G (1/ 0)	G
-295A/C	rs3130495	A/C (0.970/0.030)	A/C (0.950/ 0.050)	C
-296T/C	rs3130677	T/C (0.970/ 0.030)	T/C (0.986/ 0.014)	C

Legenda: (-) Informação não disponível na base de dados NCBI

Pela análise das frequências obtidas, não se verificam diferenças entre os grupos em estudo e controle. Do mesmo modo, não se verificam diferenças entre os valores do estudo e os descritos na base de dados NCBI.

IV 2. Fatores de Transcrição da região promotora do gene CYP21A2

A ferramenta bioinformática TRANSFAC® permitiu a análise da região onde se encontram as variações de sequência identificadas, no grupo em estudo. Esta análise permitiu analisar os efeitos de cada variação individualmente (Tabela 9), ou em conjunto, num mesmo indivíduo (Tabela 10), relativamente à ligação, ou não, de fatores de transcrição.

Tabela 9: Fatores de transcrição associados com a posição no promotor do gene *CYP21A2* das variações de sequência encontradas nos pacientes em estudo.

Variação de Sequência	Fator de Transcrição	Palavras-chave
-4C/T	<i>p53 decamer</i>	Crescimento celular.
	NF-1	Polimerização filamentos de actina, ciclo celular, apoptose.
-189insT	FAC-1	Regulação transcrição, proliferação celular.
-210C/T	TTF-1	Transcrição de genes específicos da tiroide.
-282T/G	<i>deltaEF1</i>	Transição epitelial e mesenquimal.
	<i>Nkx-2.5</i>	Apoptose, ossificação endocondral, desenvolvimento cartilágneo.
	<i>Ebox</i>	<i>Protein-binding site</i> , expressão genética.
	<i>c-Myb</i>	Fase G1-S do ciclo celular, transição mitótica, diferenciação de eritrócitos, angiogénese, eventos anti-apoptóticos.
-284A/G	ZF5	Transcrição.
-295A/C	<i>p53 decamer</i>	Crescimento celular.
-296T/C	-	-
-308G/C	<i>AP-2alphaA</i>	Desenvolvimento de alguns órgãos, migração neuronal, apoptose, percepção sensorial.
	<i>Churchill</i>	Transição entre gastrulação e neurulação.
	CPBP	Hematopoiese, desenvolvimento de alguns órgãos, vasculogénese, diferenciação celular, apoptose.
	<i>deltaEF1</i>	Transição epitelial e mesenquimal.
	<i>Nkx-2.5</i>	Apoptose, ossificação endocondral, desenvolvimento cartilágneo.
	CTCF	Sinalização <i>NF-KappaB</i> , remodelação da cromatina, mitose, miogénese, desenvolvimento embrionário.
	<i>Ebox</i>	<i>Protein-binding site</i> , expressão genética.
<i>Egr-1</i>	Diferenciação, mitogénese.	

Legenda: (-) não foi encontrada nenhuma alteração; fatores de transcrição que aparecem no local das alterações (verde); fatores de transcrição que desaparecem do local onde aparecem as variações de sequência (rosa).

Das variações de sequência encontradas no grupo em estudo, cinco aparecem conjuntamente nos pacientes 24 e 29: -282T/G, -284A/G, -295A/C, -296T/C e -308G/C/T. A

tabela 10 descreve os fatores de transcrição que ligam ou desligam nessa região, quando surgem as variações de sequência em simultâneo.

Tabela 10: Fatores de transcrição associados às variações de sequência que aparecem em conjunto no promotor do gene *CYP21A2*, nos pacientes em estudo.

Variações de Sequência	Fator de Transcrição - Aparece	Fator de Transcrição - Desaparece
-282T/G -284A/G -295A/C -296T/C -308G/C	ZF5	<i>c-Myb</i>
	<i>p53 decamer</i>	<i>deltaEF1</i>
	<i>p53</i>	<i>Nkx-2.5</i>
	<i>Churchil</i>	CTCF
	CPBP	<i>Ebox</i>
	<i>AP-2alphaA</i>	<i>Egr-1</i>

Legenda: fatores de transcrição que aparecem no local das alterações (verde); fatores de transcrição que desaparecem do local onde aparecem as variações de sequência (vermelho).

A análise no *software* TRANSFAC® permite visualizar a localização dos pontos de ligação dos fatores de transcrição na sequência, quer na sequência que contém o alelo ancestral (**Figura 10A**) e, quer na sequência em que aparecem as variações de sequência em heterozigotia (**Figura 10B**). Na figura abaixo está ilustrado apenas uma pequena porção do promotor em que aparecem as variações de sequência -282TG, -284A/G, -296T/C e -308G/C/T.

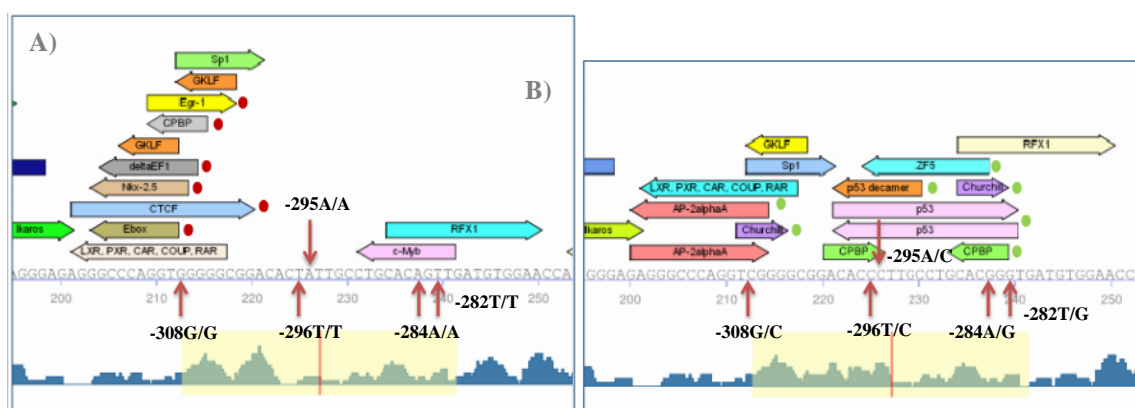


Figura 10: Fatores de transcrição presentes numa região do promotor do gene *CYP21A2*. A região representada inclui a porção do promotor na qual estão localizados as variações de sequência: -282T/G, -284A/G, -295A/C, -296T/C e -308G/C; locais das variações (setas vermelhas). **A-** sequência normal; **B-** sequência com variações de sequência; círculos vermelhos - FT que desaparecem aquando do surgimento das variações de sequência; círculos verdes- FT que aparecem de novo.

V Discussão

V Discussão

A correlação entre genótipo e fenótipo na HSRC, na maioria dos pacientes, que sofrem de deficiência na enzima 21-hidroxilase, está bem estabelecida. As mutações do gene *CYP21A2* estão em concordância, com as manifestações clínicas, em, aproximadamente, 80 a 100% dos casos reportados^{6,46}. O conhecimento da genética desta patologia e dos eventos que levam à ocorrência de variações de sequência, permitiram o desenvolvimento e implementação de diagnósticos genéticos moleculares para a HSRC. No entanto, alguns estudos apresentam discrepâncias entre genótipo-fenótipo, que se devem à presença adicional de mutações não detetadas pela metodologia normalmente utilizada ou, possivelmente, a *splicing* alternativo do gene *CYP21A2*^{36,37,39}. Deste modo, surge a necessidade de analisar possíveis variações de sequência em regiões reguladoras da transcrição, como é o caso da região promotora. A região 5'UTR, incluída na porção promotora do gene *CYP21A2*, está envolvida na atividade transcripcional do mesmo, em especial as 167pb precedentes ao codão de iniciação, ATG, e que contêm locais de ligação a fatores de transcrição como Sp-1 e fatores de transcrição específicos da região adrenal^{37-39,47}. Nesta região, o *CYP21A2* difere do seu pseudogene, *CYP21A1P*, em quatro nucleótidos nas posições -103, -110, -113 e -126, o que causa uma diferença na afinidade de ligação dos fatores de transcrição ao pseudogene^{41,47,48}. Pensa-se que possam ocorrer microconversões entre o gene e o pseudogene, nestas posições, e que levem à alteração destas bases em alguns casos de pacientes com HSRC^{34,35}. A alteração destas, e de outras, posições no gene, pode, igualmente, provocar uma diminuição da eficiência de ligação de elementos reguladores da transcrição, o que evidencia a importância do estudo destas regiões³⁷. Além das quatro posições mencionadas, que diferem do pseudogene para o gene, outras podem estar presentes e provocar, do mesmo modo, microconversões que acompanhem as mutações mais comuns do *CYP21A2*. As posições -189, -210, -282, -284, -295, -296 e -308 fazem parte desse grupo e foram descritas por outros autores^{36,37,39,47,49}.

Um estudo de 2007 demonstrou que a microconversão -126C>T entre o *CYP21A2* e o *CYP21A1P* provoca a diminuição da atividade transcripcional para 52%, resultando num fenótipo não clássico de deficiência na enzima 21-hidroxilase³⁷. Adicionalmente, foi também descrito que, mutações no promotor do gene da 21-OH, em *cis* com a mutação p.Pro30Leu, estão associadas à forma virilizante simples³⁶. Um outro estudo, de 2009, fez a pesquisa de variações do promotor do gene *CYP21A2* na qual encontrou 15 variações de sequência, as quais propõe contribuir, em conjunto com a mutação p.Gln318X, para a forma virilizante simples da deficiência na enzima 21-OH³⁹.

Tendo em conta os estudos apresentados e a importância do diagnóstico genético da hiperplasia supra-renal congénita, tornou-se de interesse o estudo da região promotora

do gene *CYP21A2*, em casos em que o genótipo determinado não justifica a clínica, ou seja, o fenótipo. Assim, os pacientes selecionados para este trabalho eram indivíduos portadores de uma mutação no gene *CYP21A2* e em que o objetivo seria encontrar variações de sequência no promotor que acompanhassem a mutação detetada no diagnóstico, o que permitiria, eventualmente, justificar a clínica apresentada.

Dos 40 pacientes estudados, apenas 4 revelaram a presença de variações de sequência no promotor do gene *CYP21A2*. Nenhuma das variações de sequência encontradas corresponde aos já descritos por Zhang e colaboradores (2009), e Araújo e colaboradores (2007), como potenciais contribuidores para a justificação clínica da doença. Foi encontrada uma inserção de uma timina na posição -189 (-189insT) num dos pacientes do grupo em estudo, assim como a variação de sequência da posição -210 (-210C>T) que, apesar de não constar da base de dados NCBI ou ENSEMBL, tinha já sido descrita por outros autores ^{36,37,39}. Foram também estudados 100 alelos (50 indivíduos) que correspondem ao grupo controlo. As frequências alélicas do grupo em estudo não diferem, das do grupo controlo pelo que não se pode concluir que alguma variação de sequência seja mais ou menos frequente no grupo dos doentes face ao que se verifica nos controlos. Comparando as frequências alélicas obtidas nos pacientes, com os dados do NCBI, apenas as variações de sequência das posições -282 e -284 é que apresentam valores ligeiramente diferentes, o que pode ser explicado pelo reduzido número de elementos estudados, quer do grupo em estudo, quer dos integram o grupo publicado na base de dados. As variações de sequência -189insT, -210C/T e -308G/C/T, que apresentavam uma frequência de 2,5% para os dois primeiros e 5% para a posição -308, não foram encontrados no grupo controlo, no entanto dada a frequência encontrada (>1%) não é possível concluir em absoluto que se trata de uma variação patogénica. Contudo, o número de indivíduos da amostra analisada é reduzido servindo, ainda assim, como estudo preliminar e sugestivo para o alargamento do estudo e do número de amostras. Apesar de não se terem detetadas as variações de sequência -103A/G, -110T/C, -113G/A e -126C/T, que se revelam estar associados com alguns fenótipos de HSRC, as variações -282, -284, -295, -296 e -308, encontrados neste trabalho, foram abordados em estudos anteriores ^{36,37,39}. A região que contém estas alterações demonstrou ser um local de ligação a proteínas reguladoras pelo desaparecimento de complexos proteicos, em estudos de EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), o que indica que investigações futuras possam ter esta zona como foco ³⁷.

De futuro, o aumento do número de indivíduos do grupo controlo permitirá uma melhor aferição da frequência alélica das variações de sequência numa amostra na população portuguesa. Para além de aumentar o número de elementos dos dois grupos analisados, seria de interesse aumentar o tamanho da região promotora sequenciada até -

710pb, abordado em trabalhos anteriores ^{37,41,48}. Deste modo, o aumento da região analisada e possível identificação de novas variações de sequência, poderá elucidar quanto à existência de mais elementos reguladores da transcrição. Esta abordagem permitirá o conhecimento alargado do gene responsável pela deficiência na enzima 21-hidroxilase e, deste modo, contribuirá, potencialmente, para o auxílio no diagnóstico genético da HSRC, em especial, para casos em que não se verifica uma relação clara entre o genótipo e o fenótipo.

Apesar de, com este trabalho, não se ter estabelecido nenhuma relação entre as variações de sequência encontradas nos pacientes e as mutações apresentadas pelos mesmos, os resultados obtidos são os primeiros no que diz respeito ao estudo do promotor do gene *CYP21A2* na população portuguesa, não havendo, até então, nenhum resultado publicado.

Adicionalmente, e como complemento ao trabalho, utilizaram-se ferramentas bioinformáticas para a análise de factores de transcrição na região onde surgem as variações de sequência encontradas nos pacientes -4C/T, -210C/T, -282T/G, -284G/A, -295A/C, -296T/C, -308G/C/T. Factores de transcrição são proteínas que se ligam ao DNA e que permitem que haja uma ligação entre a RNA-polimerase e o DNA promovendo a transcrição e, posteriormente, a tradução ⁵⁰. São, portanto, elementos muito importantes no desenvolvimento de células e tecidos ⁵⁰. Sendo que os factores de transcrição se vão ligar ao DNA, estes têm sequências de pequenas pares de bases, às quais se vão ligar, e, assim, promover a transcrição. Variações da sequência de DNA, em particular, da região à qual se vão ligar os FT, provoca a não ligação dos mesmos e, conseqüentemente, alteração do seu efeito ⁵⁰.

Os estudos feitos noutras populações, que apontam para a associação entre variações de sequência no promotor e certas mutações do *CYP21A2*, apontam como fator determinante, alterações no processo de transcrição do gene e alteração dos locais de ligação de factores de transcrição, como é o caso do SF-1, Sp-1, Nur77 e CREBP, entre outros ^{37,39,41,47,48}.

Neste trabalho o estudo da região promotora do gene *CYP21A2* e a conseqüente deteção de variações de sequência em quatro pacientes, serviu de impulso para a análise da região onde ocorriam as alterações com efeito nos locais de ligação dos factores de transcrição, face ao alelo ancestral. O estudo inicial que em foi avaliada a presença de cada variação de sequência, individualmente, permitiu constatar que, em todos os casos, à exceção da variação -296T/C, se verificou a alteração de ligação de um, ou mais, factores de transcrição, na zona da variação de sequência. A posição -308, com o alelo G, foi a que revelou provocar o desaparecimento de um maior número de factores de transcrição. A

abordagem utilizada para estudar a ocorrência de cada variação de sequência individualmente foi igualmente utilizada para o estudo da presença, em simultâneo, das cinco variantes: -282T/G, -284G/A, -295A/C, -296T/C e -308G/C/T que aparecem associados nos dois casos do grupo em estudo. O facto de os primeiros quatro estarem, particularmente, a poucas pares de bases de distância, leva a que, a sequência se altere em maior extensão do que se estivessem isolados (**Tabela 9**).

Cada fator de transcrição pode ter várias funções e, inclusive, algumas ainda não conhecidas ⁵⁰. A maioria dos fatores de transcrição referidos nos resultados deste trabalho tem funções biológicas comuns a vários tecidos ou órgãos, o que dificulta a associação dos mesmos especificamente com o gene *CYP21A2*. São inúmeros os fatores de transcrição se ligam ao promotor deste gene e, nem todos são específicos da região adrenal. A função dos factores de transcrição apresentados prende-se, essencialmente, com a regulação do ciclo celular e desenvolvimento de tecidos e órgãos. A HSRC é uma doença na qual ocorre o desenvolvimento anormal dos órgãos sexuais e em que os pacientes apresentam alteração das características sexuais secundárias devido à descompensação hormonal, logo, a alteração da expressão do seu gene *CYP21A2* poderá, em conjunto com as mutações patogénicas, contribuir para o fenótipo dos pacientes ^{9,11,34-36}. Apesar de se verificar que a zona onde surgem estas variações de sequência contém um domínio de ligação a fatores de transcrição, não significa que, ao longo da sequência do *CYP21A2*, não existam mais locais de ligação para esses mesmos fatores. No entanto, a não ligação dos factores de transcrição neste local em específico pode alterar o nível de transcrição e posterior tradução.

Ao contrário dos estudos anteriores, não se verificaram alterações na ligação dos fatores de transcrição adrenais ou do fator de transcrição Sp-1, referido por outros autores como relevante para a HSRC ^{37,39,41,47,48}. Apesar de os resultados apresentados não corroborarem os anteriores, evidenciam a importância do estudo de variações de sequência na região promotora do gene *CYP21A2* que possam contribuir para alterações na transcrição do gene e acompanhar as mutações até então descritas.

A maior limitação dos resultados obtidos neste trabalho prende-se com o reduzido número de amostras analisadas pelo que se sugere o aumento de indivíduos do grupo em estudo. Deste modo, poderiam ser melhor aferidas as frequências alélicas. Essas variações de sequência poderiam, num estudo alargado, ser associados a alguma mutação patogénica e a sua deteção fazer parte do diagnóstico genético da hiperplasia supra-renal congénita, como sugerido por outros autores.

O estudo de novas variações de sequência poderia, igualmente ser associado com a pesquisa do padrão de ligação de fatores de transcrição à região promotora do *CYP21A2*, pelos motivos já apresentados. Uma vez encontradas variações de sequência na zona de ligação de fatores de transcrição, como o Sp-1, podem ser feitos ensaios/ estudos de expressão proteica que confirmem as suspeitas de diminuição da afinidade da ligação dessas proteínas ao DNA.

VI Referências Bibliográficas

VI Referências Bibliográficas

1. Campbell, I. Adrenocortical hormones. *Anaesth. Intensive Care Med.* **12**, 461–464 (2011).
2. Robins, T. *Functional and structural studies on CYP21 mutants in congenital adrenal hyperplasia.* (2005). at <<https://publications.ki.se/xmlui/handle/10616/39922>>
3. Gonçalves, J., Friães, A. & Moura, L. Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency. *Expert Rev. Mol. Med.* **9**, 1–23 (2007).
4. Speiser, P. W. Congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **30**, 31–59, vi (2001).
5. Miller, W. L. in *Brook's Clinical Pediatric Endocrinology* 283–326 (Wiley-Blackwell, 2009). doi:10.1002/9781444316728.ch13
6. Krone, N., Braun, A. & Roscher, A. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2000 Mar**;85(3)1059-65 **85**, 1059–65 (2000).
7. Krone, N. & Arlt, W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **23**, 181–92 (2009).
8. Riepe, F. & Sippell, W. Recent advances in diagnosis, treatment, and outcome of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **8**, 349–363 (2007).
9. Merke, D. P. & Bornstein, S. R. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* **365**, 2125–36 (2005).
10. Deneuve, C. *et al.* Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 207–13 (2001).
11. Speiser, P. W. & White, P. C. Congenital Adrenal Hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* **349**, 776–788 (2003).
12. New, M. I. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 4205–14 (2006).
13. Merke, D. P. *et al.* Adrenomedullary dysplasia and hypofunction in patients with classic 21-hydroxylase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1362–8 (2000).
14. Green-Golan, L. *et al.* Patients with classic congenital adrenal hyperplasia have decreased epinephrine reserve and defective glycemic control during prolonged moderate-intensity exercise. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 3019–24 (2007).
15. Trakakis, E. *et al.* The prevalence of non-classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Greek women with hirsutism and polycystic ovary syndrome. *Endocr. J.* **55**, 33–9 (2008).
16. Forest, M. G. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum. Reprod. Update* **10**, 469–85 (2004).
17. 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.* **48**, 1057–62 (2010).

18. Krone, N., Dhir, V., Ivison, H. E. & Arlt, W. Congenital adrenal hyperplasia and P450 oxidoreductase deficiency. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **66**, 162–72 (2007).
19. Auchus, R. J. Management of the adult with congenital adrenal hyperplasia. *Int. J. Pediatr. Endocrinol.* **2010**, 614107 (2010).
20. Marumudi, E. *et al.* Diagnosis and management of classical congenital adrenal hyperplasia. *Steroids* **78**, 741–6 (2013).
21. Khan, A., Aban, M. & Raza, J. Classic virilizing congenital adrenal hyperplasia presenting late: case series from Pakistan. *J. Pak. Med. Assoc.* **59**, 643–646 (2009).
22. Duarsa, G. SIMPLE VIRILIZING CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA: Presentation in a Female Child with Genital Ambiguity undergoing Genitoplasty (A Case Report). *Bali Med. J.* **1**, 93–97 (2012).
23. Witchel, S. F. & Azziz, R. Nonclassic Congenital Adrenal Hyperplasia. *Int. J. Pediatr. Endocrinol.* **2010**, 1–11 (2010).
24. Van der Kamp, H. J. *et al.* Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia in the Netherlands. *Pediatr.* **108**, 1320–1324 (2001).
25. Dörr, H. G. & Sippell, W. G. Prenatal dexamethasone treatment in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: effect on midgestational amniotic fluid steroid levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **76**, 117–120 (1993).
26. Higashi, Y., Yoshioka, H., Yamane, M., Gotoh, O. & Fujii-Kuriyama, Y. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 2841–5 (1986).
27. White, P. C., New, M. I. & Dupont, B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 5111–5 (1986).
28. White, P. C. *et al.* Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 1089–93 (1985).
29. Lee, H.-H. Variants of the CYP21A2 and CYP21A1P genes in congenital adrenal hyperplasia. *Clin. Chim. Acta.* **418**, 37–44 (2013).
30. Tsai, L.-P., Cheng, C.-F., Chuang, S.-H. & Lee, H.-H. Analysis of the CYP21A1P pseudogene: indication of mutational diversity and CYP21A2-like and duplicated CYP21A2 genes. *Anal. Biochem.* **413**, 133–41 (2011).
31. Rabbani, B., Mahdieh, N., Haghi Ashtiani, M.-T., Akbari, M.-T. & Rabbani, A. Molecular Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia in Iran: Focusing on CYP21A2 Gene. *Iran. J. Pediatr.* **21**, 139–50 (2011).
32. Marques, C. J. *et al.* Mutational characterization of steroid 21-hydroxylase gene in portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **118**, 505–512 (2010).
33. Carvalho, B. *et al.* Comprehensive genetic analysis and structural characterization of CYP21A2 mutations in CAH patients. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **120**, 535–539 (2012).
34. Lee, H. H., Chao, H. T., Ng, H. T. & Choo, K. B. Direct molecular diagnosis of CYP21 mutations in congenital adrenal hyperplasia. *J. Med. Genet.* **33**, 371–5 (1996).

35. Neocleous, V. *et al.* Rare mutations in the CYP21A2 gene detected in congenital adrenal hyperplasia. *Clin. Biochem.* **42**, 1363–7 (2009).
36. Araujo, R. S., Billerbeck, A. E. C., Madureira, G., Mendonca, B. B. & Bachega, T. a S. S. Substitutions in the CYP21A2 promoter explain the simple-virilizing form of 21-hydroxylase deficiency in patients harbouring a P30L mutation. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **62**, 132–6 (2005).
37. Araújo, R. S. *et al.* Microconversion between CYP21A2 and CYP21A1P promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 4028–34 (2007).
38. Araujo, R. S., Billerbeck, A. E. C., Madureira, G., Mendonca, B. B. & Bachega, T. a S. S. Substitutions in the CYP21A2 promoter explain the simple-virilizing form of 21-hydroxylase deficiency in patients harbouring a P30L mutation. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **62**, 132–6 (2005).
39. Zhang, H.-J. *et al.* Variations in the promoter of CYP21A2 gene identified in a Chinese patient with simple virilizing form of 21-hydroxylase deficiency. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **70**, 201–7 (2009).
40. Chang, S.-F. Impact of Genome Complexity of the CYP21A2 Gene on Adrenal Steroidogenesis. *J. Exp. Clin. Med.* **4**, 317–319 (2012).
41. Kagawa, N. & Waterman, M. Evidence that an adrenal-specific nuclear protein regulates the cAMP responsiveness of the human CYP21B (P450C21) gene. *J. Biol. Chem.* **266**, 11199–204 (1991).
42. Bobba, A., Marra, E., Lattanzio, P., Iolascon, A. & Giannattasio, S. Characterization of the CYP21 gene 5' flanking region in patients affected by 21-OH deficiency. *Hum. Mutat.* **15**, 481 (2000).
43. FirstEF. at <<http://rulai.cshl.org/tools/FirstEF/>>
44. NCBI. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>
45. Coffa, J. & Wiel, M. van de. MLPAnalyzer: data analysis tool for reliable automated normalization of MLPA fragment data. *Cell. Oncol.* **30**, 323–335 (2008).
46. Speiser, P. W. *et al.* Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Invest.* **90**, 584–95 (1992).
47. Chin, K. & Chang, S. The– 104G nucleotide of the human CYP21 gene is important for CYP21 transcription activity and protein interaction. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1959–64 (1998).
48. Chang SF, C. B. C. Difference in transcriptional activity of two homologous CYP21A genes. *Mol. Endocrinol.* **9**, 1330–1336 (1995).
49. Lee, H.-H. Variants of the CYP21A2 and CYP21A1P genes in congenital adrenal hyperplasia. *Clin. Chim. Acta.* **418**, 37–44 (2013).
50. Vaquerizas, J. M., Kummerfeld, S. K., Teichmann, S. A. & Luscombe, N. M. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet* **10**, 252–263 (2009).