

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Caracterização da Base Molecular da Hiperplasia Supra-
renal Congénita em Doentes com Suspeita de Deficiência em
11 β -hidroxilase**

Ana Maria dos Santos Guerreiro

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2008

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Caracterização da Base Molecular da Hiperplasia Supra-
renal Congénita em Doentes com Suspeita de Deficiência em
11 β -hidroxilase**

Ana Maria dos Santos Guerreiro

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

O presente trabalho teve como orientadores o Doutor João Gonçalves (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge) e o Professor Doutor Octávio Paulo (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa).

2008

Abstract

Congenital adrenal hyperplasia (CAH), characterized by a total or partial deficit in cortisol, is due in about 90% of the cases to 21-hydroxylase deficiency and in 5-8% of the cases to 11 β -hydroxylase (11 β -OH) deficiency. Considering that a diagnosis directly associated with 11 β -OH deficiency is difficult to establish and a screening of this disease has never been done in the Portuguese patients, the aim of this project was to characterize the molecular basis of CAH in patients with suspected 11 β -OH deficiency. For this purpose, genomic DNA was obtained from peripheral blood samples of patients with CAH possibly due to 11 β -OH deficiency. The molecular analysis of *CYP11B1* gene was based on PCR, DHPLC and automatic sequencing of the DNA samples from the patients under study. Molecular alterations were searched in the coding region as well as in the promoter of *CYP11B1*, including Ad1, Ad4 and Ad5 sites as well as two single nucleotide polymorphisms (SNPs), -1889G>T and -1859A>G.

It was also designed a molecular test to enable the detection of chimeras resulting from unequal crossing-over between *CYP11B2* and *CYP11B1* genes.

Changes were found either in the coding regions as in the intronic regions. All of the changes were point mutations, some of them were silent mutations, others were intronic mutations (two of them with possible effect on *splicing* – IVS8+126C>G and IVS8+213T>C), two were missense mutations (p.Arg43Gln and p.Val378Met) and another one was a nonsense mutation (p.Gln356X). With regard to the promoter region, no changes were found at Ad1, Ad4 and Ad5 sites. The SNP's at the positions -1889 and -1859 were, in all samples, the ones that are not associated to the disease.

Sumário

A hiperplasia supra-renal congénita (CAH) deve-se a um défice, total ou parcial, em cortisol. Cerca de 90% dos casos resultam de deficiência em 21-hidroxilase e cerca de 5-8% dos casos a deficiência em 11 β -hidroxilase (11 β -OH). Pelo facto de a nível clínico ser difícil estabelecer um diagnóstico preciso associado à deficiência em 11 β -OH e por nunca ter sido efectuado qualquer rastreio desta doença em doentes portugueses, o objectivo deste estudo consistiu em fazer a caracterização molecular da CAH em doentes portugueses com suspeita de deficiência em 11 β -OH. Para esse efeito utilizaram-se amostras de ADN genómico de doentes diagnosticados clinicamente com CAH e procedeu-se à análise molecular do gene *CYP11B1* baseada em PCR, DHPLC e sequenciação automática. Esta metodologia foi também utilizada na pesquisa de alterações em regiões reguladoras (promotor) do *CYP11B1*, nomeadamente nos locais Ad1, Ad4 e Ad5, bem como nas posições -1889 e -1859 que embora sejam locais polimórficos (SNPs), foram associados a uma diminuição da actividade enzimática da 11 β -OH.

Concebeu-se ainda o desenho de um ensaio molecular com vista a permitir a detecção de quimeras resultantes de crossing-over desigual entre os genes *CYP11B2* e *CYP11B1*.

Foram encontradas alterações quer nas regiões codificantes quer nas regiões intrónicas. Todas as alterações encontradas consistiam em mutações pontuais, das quais algumas correspondiam a mutações silenciosas em sequências exónicas, outras eram alterações intrónicas (duas das quais com possibilidade de afectarem o *splicing* - IVS8+126C>G e IVS8+213T>C), duas correspondiam a mutações *missense* (p.Arg43Gln e p.Val378Met) e outra a uma mutação *nonsense* (p.Gln356X). No que diz respeito à região do promotor, não foi encontrada qualquer alteração nos locais Ad1, Ad4 e Ad5, o mesmo se tendo verificado no caso das posições -1889 e -1859 nas quais o nucleótido presente correspondeu sempre ao que não se encontra associado à redução da actividade enzimática.

Keywords: Congenital adrenal hyperplasia; 11 β -hydroxylase deficiency; *CYP11B1*.

Palavras-Chave: Hiperplasia supra-renal congénita; deficiência em 11 β -hidroxilase; *CYP11B1*.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço ao Doutor João Gonçalves pela forma como orientou o meu trabalho. A utilidade das suas recomendações, a sua sempre presente disponibilidade e empenho, foram decisivas para a realização deste projecto.

Em segundo lugar gostaria de agradecer ao Professor Doutor Octávio Paulo pelo facto de ter aceite a função de me orientar como mestranda e pela sua disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas.

Gostaria também de agradecer a Lourdes Loidi (Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Unidad de Medicina Molecular, Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela, A Coruña, Espanha), pela disponibilização de material biológico, permitindo assim a existência de controlos positivos, sem os quais os resultados deste trabalho não seriam correctamente validados.

Agradeço igualmente aos médicos das diferentes Unidades de Endocrinologia pelo encaminhamento dos doentes para este estudo, bem como aos indivíduos ou familiares destes pelo seu consentimento e disponibilização do material biológico para analisar.

Por fim deixo também uma palavra de agradecimento às Professoras Coordenadoras do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente bem como aos meus colegas pela ajuda dispensada ao longo da realização deste projecto.

Índice de Figuras

Figura 1.1- Corte da glândula supra-renal (figura adaptada de http://www.vivo.colostate.edu)...3	3
Figura 1.2 -via metabólica das hormonas da glândula supra-renal (figura adaptada de www.emedicin.com).4	4
Figura 1.3- a)Influência da ACTH nas glândulas supra-renais (figura adaptada de www.hopkinschildrens.org); b) Mecanismo de feedback no controlo da síntese do cortisol (esquema adaptado de www.vivo.colostate.edu).5	5
Figura 1.4- Desenvolvimento dos genitais externos (figura adaptada de www.hopkinschildrens.org).7	7
Figura 1.5- Representação esquemática do gene <i>CYP11B1</i>9	9
Figura 1.6- <i>Crossing-over</i> desigual entre <i>CYP11B2</i> e <i>CYP11B1</i> . Legenda: CAH- hiperplasia supra-renal congénita; GRA- Hiperaldosteronismo.10	10
Figura 1.7- Esquematização da via de transdução de sinal da cAMP (figura adaptada de http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch6F1.htm).12	12
Figura 1.8 -Regiões reguladoras de <i>CYP11B1</i>12	12
Figura 1.9- Representação dos SNP's de <i>CYP11B1</i> (-1889T e -1859G) em desequilíbrio de <i>linkage</i> coma posição -344T de <i>CYP11B2</i> (Barr <i>et al.</i> 2006).13	13
Figura 2.1- Representação esquemática de uma reacção de PCR (Figura adaptada de http://www.e-escola.pt).17	17
Figura 2.2- Esquematização da estratégia utilizada na análise molecular do gene <i>CYP11B1</i>18	18
Figura 2.3- (a) Descrição da técnica de DHPLC (figura adaptada de www.mhereseearchfoundation.org/DHPLC_Genetic_Testing.html); (b) Distinção entre homodímeros e heterodímeros (figura adaptada de http://www.uni-saarland.de/fak8/huber/dhplc)...23	23
Figura 2.4- Representação esquemática da análise de fragmentos de ADN por sequenciação automática (from: “Sequenciação em análises Clínicas”).....24	24
Figura 3.1- Fotografia de gel de agarose com os diferentes produtos de PCR.....26	26
Figura 3.2- Perfil de DHPLC alterado: (a) exemplo de alteração no exão 9; (b) exemplo de alteração no intrão 4..26	26
Figura 3.3- (a) Electroferograma da sequência parcial do fragmento que contém o exão 9 (incluindo sequências flaqueadores) cujo perfil de DHPLC se encontra na figura 3.2 (a). (b) Electroferograma da sequência de um segmento do intrão 4,cujo perfil de DHPLC se encontra na figura 3.2 (b).....27	27
Figura 6.1- Iniciadores utilizados na construção do gene quimérico.41	41
Figura 6.2- Locais de emparelhamento dos primers desenhados para o OE-PCR.42	42
Figura 6.3- Representação do método de OE-PCR aplicado às quimeras <i>CYP11B2_CYP11B1</i> , nomeadamente ao caso da reacção A+B.43	43
Figura 7.1- Fotografia de gel de agarose com os fregmentos obtidos na primeira fase do OE-PCR.44	44

Índice de Tabelas

Tabela 1- Agrupamento dos doentes em estudo consoante o diagnóstico clínico.	16
Tabela 2- condições experimentais dos PCR's <i>Pré-Nested</i>	19
Tabela 3- Condições experimentais dos PCR's <i>Nested</i>	20
Tabela 4- Condições experimentais dos PCR's da região reguladora	21
Tabela 5- Condições experimentais das Reacções de sequenciação.....	24
Tabela 6- Controlos positivos	27
Tabela 7- Alterações encontradas nas sequências exónicas e intrónicas analisadas, das amostras em estudo.....	28
Tabela 8- Alterações encontradas na sequência reguladora das amostras em estudo.....	29
Tabela 9- Resultados dos testes de avaliação do <i>splicing</i> para as alterações encontradas: quanto a criarem ou anularem locais de splice (a); quanto a criarem <i>exonic splicing enhancers</i> ou <i>silencers</i> (b).	30
Tabela 10- Condições e reagentes do OE-PCR.	43

Índice de abreviaturas

ACTH – Hormona adrenocorticotrófica

ADN- Ácido desoxirribonucleico

AMPc- Adenosina Monofosfato cíclica

ATP- Adenosina trifosfato

CAH- *Congenital Adrenal Hyperplasia*

CRE- *cAMP response elements*

CREB- *cAMP response element binding*

ddNTPs - Didesoxirribonucleotídeos trifosfatados

DG-INSA- Departamento de Genética, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

DHPLC- *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EHW- Equilíbrio de Hardy-Weinberg

FCUL- Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

GDP- Guanosina difosfato

GRA- *Glucocorticoid Remediabale Hyperaldosteronism*

GTP- Guanosina trifosfato

HGMD- *Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff*

Hosp.- Hospital

LDL- *Low density lipoprotein*

NCBI- *National Center for Biotechnology Information*

OE-PCR – *Overlap Extension Polymerase Chain Reaction*

Pb- Pares de bases

PCR- *Polymerase chain reaction*

PKA- Proteína Cinase A

ÍNDICE

Abstract	i
Sumário	i
Agradecimentos	iii
Índice de Figuras	iv
Índice de Tabelas	v
Índice de abreviaturas	vi
Nota introdutória	1
1ª Parte	3
Capítulo 1 – Introdução	3
1. Enquadramento teórico.....	3
1.1 Aspectos fisiológicos da glândula supra-renal.....	3
1.2 Causas da Hiperplasia Supra-Renal Congénita.....	4
1.3 Características fenotípicas da deficiência em 11 β -OH.....	6
1.4 Diagnóstico laboratorial da deficiência em 11 β -OH.....	8
1.5 As isozimas CYP11B.....	9
1.6 Os genes CYP11B.....	9
1.7 Mutações na sequência codificante de CYP11B1.....	10
1.8 Mutações na sequência reguladora de CYP11B1.....	11
1.9 Incidência da CAH.....	14
2. Objectivos.....	15
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	16
3. Obtenção do material biológico.....	16
4. Análise Molecular do Gene CYP11B1	17
4.1 PCR da sequência codificante	18
4.2 PCR da sequência reguladora	21
4.3 Controlo de qualidade dos produtos de PCR.....	21
4.3.1 Purificação dos Produtos de PCR.....	22
4.4 DHPLC e Sequenciação Automática.....	22
4.4.1 DHPLC	22
4.4.2 Sequenciação Automática.....	23
4.5 Testes a alterações intrónicas.....	25
Capítulo 3 - Resultados	26
5. Alterações encontradas na sequência codificante.....	26
6. Alterações encontradas na sequência reguladora	28
7. Testes às regiões intrónicas	29
Capítulo 4 - Discussão	32
8. Alterações nas sequências codificante e reguladora.....	32
2ª Parte	40

Capítulo 5 - Introdução.....	40
10. Quimeras <i>CYP11B2/B1</i>	40
11. Objectivo	41
Capítulo 6 – Material e Métodos.....	41
12. Desenho dos primers para a construção do gene quimérico.....	41
13. Construção do gene quimérico <i>CYP11B2/B1</i>	42
Capítulo 7 – Resultados e Discussão	44
14. Resultados da construção do gene quimérico <i>CYP11B2_B1</i>	44
15. Discussão.....	44
Conclusões Gerais.....	46
Referências	48
Anexos.....	50

Nota introdutória

Este projecto dividiu-se em duas partes. A primeira parte teve como objectivo principal proceder à caracterização molecular da Hiperplasia Supra-renal Congénita (CAH) em doentes os quais se suspeitava possuírem deficiência total ou parcial da enzima 11 β -hidroxilase (11 β -OH).

A CAH pode ter como causa a deficiência de uma de diferentes enzimas da esteroidogénese. Trata-se de um erro inato do metabolismo dos esteróides, que corresponde a uma doença genética de natureza autossómica recessiva. Pelo facto de poder ter origem na deficiência de uma de entre diferentes enzimas, é importante a identificação da deficiência enzimática em causa para: i) compreender a fisiopatologia da doença; ii) melhorar o aconselhamento genético; iii) adequar melhor o tratamento; iv) conhecer a base molecular da deficiência enzimática; v) contribuir para melhorar a qualidade de vida dos doentes e seus familiares. No entanto, a distinção entre as diferentes deficiências enzimáticas não é simples, uma vez que as manifestações fenotípicas são semelhantes. É frequente fazer-se o diagnóstico considerando apenas a deficiência enzimática mais comum (em 21-hidroxilase). Por esta razão, até à data em Portugal, ainda não tinha sido realizado nenhum estudo para caracterização da base molecular da deficiência em 11 β -OH. Tornou-se então relevante a realização deste estudo, não só por haver total desconhecimento da base molecular desta deficiência em doentes portugueses como para traçar a estratégia mais adequada para a análise deste gene, de modo a ser utilizada futuramente em diagnóstico.

Outra razão que levou à realização deste estudo surgiu do facto de ter sido realizado o diagnóstico molecular da deficiência em 21-hidroxilase (21-OH) em diversos doentes com CAH, no DG-INSA, tendo esse diagnóstico revelado que alguns não possuíam alterações moleculares no gene que codifica esta enzima, o que levou a crer que seria outra deficiência enzimática a responsável pela CAH destes doentes. Assim, a possibilidade da deficiência enzimática em causa ser em 11 β -OH apresentava-se como mais provável, já que esta é a segunda causa mais comum de CAH, pelo que a caracterização molecular da mesma assumiu grande importância.

Por outro lado, também surgiu a hipótese de alguns doentes poderem possuir um défice misto em 21-OH e 11 β -OH.

Tem sido postulado também que a prevalência da CAH devida a deficiência em 11 β -OH poderá ser maior na população portuguesa do que na população caucasiana em geral. Estudos anteriores demonstraram que esta frequência é maior em determinadas populações, como por exemplo os judeus oriundos de Marrocos. Parte destes judeus terão como antecedentes judeus Sefarditas que abandonaram Portugal durante a Inquisição, altura em que eram forçados a converterem-se ao catolicismo. Contudo, alguns mantiveram-se em Portugal e outros regressaram após o fim da

Nota Introdutória

Inquisição, integrando-se na população. Esta integração poderá ter gerado um efeito fundador, tal como o que ocorreu quando os seus concidadãos migraram para Marrocos e posteriormente para Israel, aquando da criação do estado de Israel (onde a prevalência da doença também é mais elevada).

A segunda parte deste projecto teve por objectivo a construção de um gene quimérico *CYP11B1/B2*. Estes genes híbridos podem ocorrer naturalmente, levando também a deficiência em 11 β -OH. Contudo, a frequência destes genes quiméricos é rara, tendo-se decidido proceder à construção de um gene quimérico visando usá-lo como um controlo positivo no diagnóstico molecular desta patologia.

1ª Parte

Capítulo 1 – Introdução

1. Enquadramento teórico

1.1 Aspectos fisiológicos da glândula supra-renal

A hiperplasia supra-renal congénita (CAH) é uma doença que afecta primariamente a glândula supra-renal. Esta glândula endócrina localiza-se acima do rim e é composta por duas regiões histologicamente distintas: córtex e medula. O córtex corresponde à parte externa da glândula, possui cor amarelada (devido à presença de colesterol), tem origem embrionária na mesoderme e encontra-se subdividida em três regiões:

- Zona glomerulosa, mais exterior.
- Zona fasciculada, de localização intermédia.
- Zona reticulada, mais interna.

A medula corresponde à parte interna, de cor vermelha escura ou cinza e tem origem na crista neural.

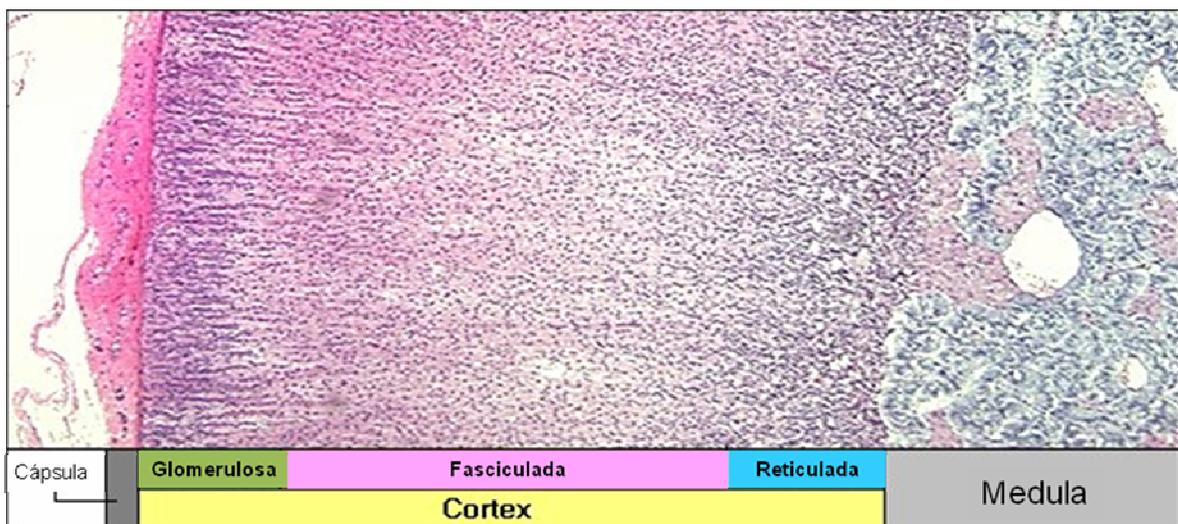


Figura 1.1-Corte da glândula supra-renal (figura adaptada de <http://www.vivo.colostate.edu>).

Estas regiões para além de serem histologicamente diferentes, também diferem na sua função. As células do córtex supra-renal são responsáveis pela produção de glucocorticóides, mineralocorticóides e androgénios, sendo que a síntese destas substâncias difere consoante a região do córtex (“Phathophysiology of The Endocrine System”)

- Zona glomerulosa: sintetiza mineralocorticóides (predominantemente aldosterona).
- Zona fasciculada e zona reticulada: secretam glucocorticóides, sendo o mais importante o cortisol.

O cortisol tem diversas funções que permitem restaurar a homeostasia do organismo quando este se encontra em situações de stress. Tem acção fisiológica antagonista à da insulina por promover a quebra

Introdução – 1ª Parte

de hidratos de carbono, lípidos e proteínas, mobilizando assim as reservas energéticas. Isto aumenta a glicémia e a produção de glicogénio pelo fígado. Exerce também um efeito de aumento da pressão arterial e de diminuição da acção do sistema imune. Para além destes efeitos, o cortisol promove, também, a diminuição da osteogénese (formação óssea)

Estas regiões do córtex supra-renal secretam, para além do cortisol, esteróides sexuais, dos quais os principais são a dehidroepiandrosterona e a androstenediona (que são periféricamente convertidas em testosterona e dehidrotestosterona).

No caso da medula, esta não apresenta uma função endócrina mas sim neurológica. Por ter origem na crista neural tem como função a síntese e libertação de neuromediadores, sobretudo a adrenalina e noradrenalina.

1.2 Causas da Hiperplasia Supra-Renal Congénita

A síntese de glucocorticóides, mineralocorticóides e androgénios a partir do colesterol é um processo metabólico bastante complexo e que envolve diversas enzimas (ver Figura 1.2 e Figura 1 Anexos), pelo que a existência de bloqueios enzimáticos na via condiciona não só a produção das hormonas como também leva à acumulação de alguns metabolitos e produção excessiva de outros. Estas anomalias levam ao surgimento de várias doenças, entre elas a hiperplasia supra-renal congénita (CAH).

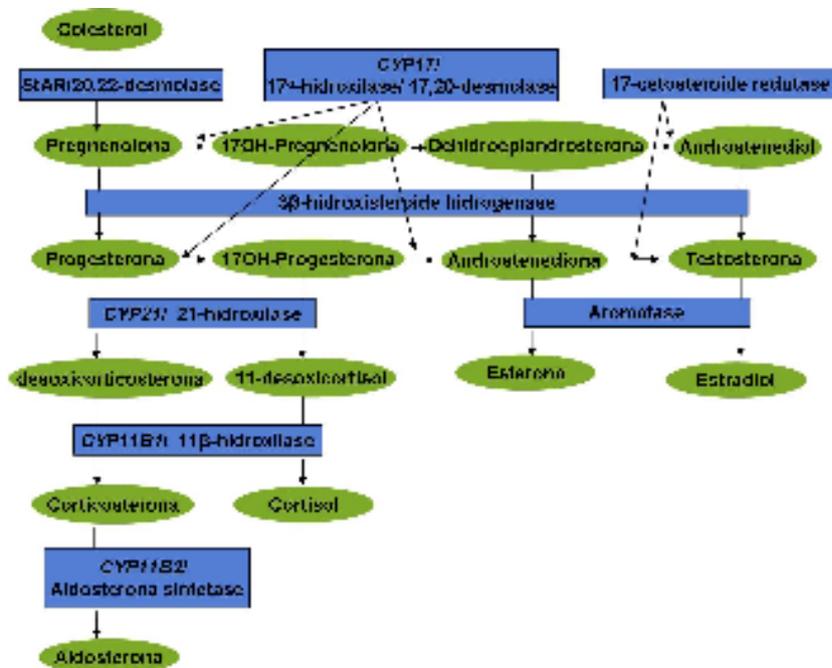


Figura 1.2 -via metabólica das hormonas da glândula supra-renal (figura adaptada de www.emedicin.com).

A CAH é uma doença autossómica recessiva que afecta em igual frequência ambos os sexos e que se caracteriza por um défice em cortisol o qual se deve à deficiência de alguma(s) das enzimas que

Introdução – 1ª Parte

participam na sua síntese. A anomalia mais frequente é o défice em 21-hidroxilase ($\approx 90\%$), seguindo-se o défice em 11 β -hidroxilase (5-8%), o défice em 17 α -hidroxilase (1%) e por fim o défice em 3 β HSD (3- β -Desidrogenase hidroesteróide) e o défice em Proteína StAR (enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol) ambos considerados raros (fig1 anexos) (Gonçalves *et al.*, 2007). A nível clínico é difícil estabelecer um diagnóstico preciso associado à deficiência em 11 β -OH pelo facto das manifestações fenotípicas associadas à deficiência em 21-OH e em 11 β -OH serem muito semelhantes.

A síntese do cortisol é regulada pela hormona adrenocorticotrófica (ACTH). Esta hormona é sintetizada na glândula pituitária (hipófise anterior) sobre controlo da hormona libertadora da corticotropina (CRH) que por sua vez é sintetizada no hipotálamo. A regulação da síntese do cortisol ocorre através de um mecanismo de *feedback* negativo (ver Figura 1.3).

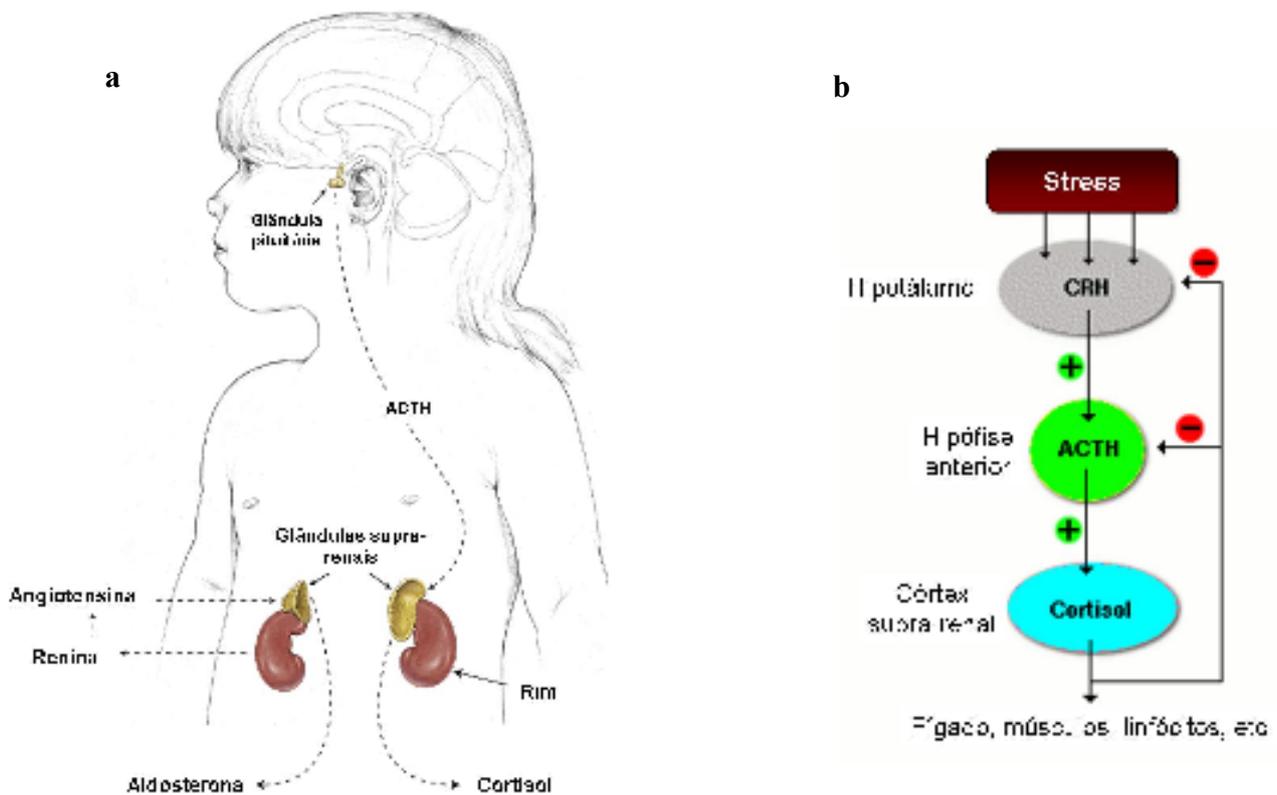


Figura 1.3- a) Influência da ACTH nas glândulas supra-renais (figura adaptada de www.hopkinschildrens.org); b) Mecanismo de feedback no controlo da síntese do cortisol (esquema adaptado de www.vivo.colostate.edu).

A diminuição da síntese de cortisol devido a uma das deficiências enzimáticas referidas atrás, induz um aumento da secreção de ACTH que por sua vez estimula continuamente a zona fasciculada, promovendo a hiperplasia da glândula supra-renal, com a consequente produção excessiva dos esteróides supra-renais precursos ao ponto de bloqueio (Mello M *et al.*, 2002).

Introdução – 1ª Parte

Este bloqueio da síntese do cortisol, tem também como consequência o desvio de metabolitos para a via de síntese dos androgénios, o que leva a um excesso de androgénios (como por exemplo testosterona), sendo estes os grandes responsáveis pelos efeitos fenotípicos (predominantemente masculinização e virilização precoce) associados à diferenciação sexual na CAH.

1.3 Características fenotípicas da deficiência em 11 β -OH

O fenótipo associado à deficiência em 11 β -OH depende do sexo do indivíduo e da gravidade da anomalia genética que está na sua base. A CAH devida a défice em 11 β -OH pode ser classificada em “forma clássica” ou “forma não-clássica”. A forma clássica da CAH corresponde à apresentação clínica mais precoce e mais exuberante, sendo aquela em que as alterações fenotípicas estão presentes desde o nascimento.

A secreção excessiva intra-útero de androgénios supra-renais causa virilização dos indivíduos do sexo feminino, evidenciada pelo crescimento do tubérculo genital, que leva a vários graus de clitoromegalia e fusão das pregas lábio-escrotais (ver Figura 1.4). Dependendo da gravidade da virilização, o seio urogenital pode abrir-se no períneo, na base do falo ou até mesmo na glande. Se a fusão for completa, a estrutura resultante é indistinguível da bolsa escrotal masculina, com a excepção de que os testículos estão ausentes e nos casos mais graves pode haver presença de um orifício genital único (Gonçalves *et al.*, 2007; Mello *et al.*, 2002). No entanto, apesar desta alteração dos genitais externos, as estruturas genitais internas não sofrem alterações tão drásticas, desenvolvendo-se normalmente. Isto permite que, caso a deficiência na genitália externa seja corrigida cirurgicamente e a produção excessiva de androgénios seja controlada, as meninas afectadas possuam o seu potencial reprodutivo intacto (Mello *et al.*, 2002). Apesar disso geralmente é necessário que o parto ocorra por cesariana, devido ao facto das parturientes possuírem estenose vaginal (estreitamento vaginal) ou pélvis andróide.

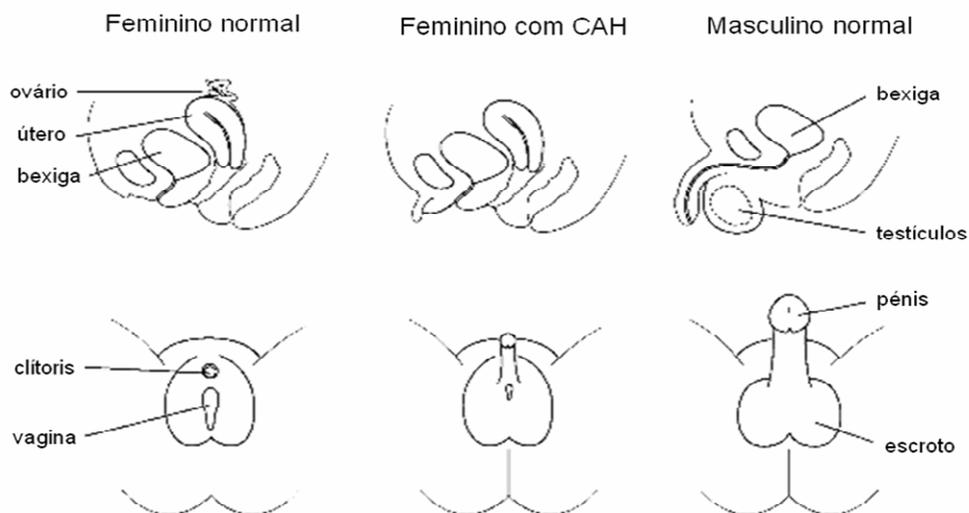


Figura 1.4- Desenvolvimento dos genitais externos (figura adaptada de www.hopkinschildrens.org).

Para além destas alterações pré-natais ocorrem também alterações pós-natais. Verifica-se, em crianças com esta deficiência enzimática, um crescimento somático e maturação esquelética acelerados, o que origina o encerramento prematuro das epífises e consequentemente uma baixa estatura na idade adulta. Podem ter também desenvolvimento sexual e adrenarca prematuros e presença de acne. Para além disto, tendo em conta que o excesso de androgénios influencia o eixo hipotalâmico-pituitária-gonadal, pode promover também a ocorrência de amenorreia e anovulação crónica persistente em indivíduos do sexo feminino, puberdade precoce (aparecimento de pelos púbicos antes dos 8 anos de idade), e espermatogénese reduzida nos indivíduos do sexo masculino (White *et al.*, 1994).

Os indivíduos afectados podem sofrer também de hipertensão arterial com hipocalcemia (K^+) devido à acumulação de desoxicorticosterona (DOC), já que esta substância exibe uma acção de retenção de sal e de supressão da actividade da renina plasmática. No entanto, a hipertensão arterial é apenas observada em 30-60% dos casos (Levine *et al.*, 1980).

Numa fase inicial a falta de glucocorticóides causa sintomas de insuficiência supra-renal (anorexia, náuseas, vómitos, dor abdominal, astenia), posteriormente o tratamento aumenta o valor dos glucocorticóides, podendo originar ganho de peso excessivo, características cushingóides, hipertensão, hiperglicémia, cataratas e insuficiência no crescimento.

Em alguns casos a deficiência em 11β -OH é referida como sendo não-clássica ou parcial. A deficiência em 11β -OH parcial é menos grave, a virilização pré-natal do sexo feminino ocorre apenas em alguns casos (ao passo que na forma clássica está geralmente presente) e a hipertensão também só está presente em alguns casos ao contrário do que acontece na forma clássica em que ocorre mais frequentemente.

Introdução – 1ª Parte

Doentes que possuam a forma não-clássica da deficiência enzimática nascem com genitais externos normais, sendo que apenas algumas meninas afectadas nascem com clitoromegalia suave (ver Figura 1 Anexos), mas apresentam sinais de produção excessiva de androgénios em crianças. Quando adultas, as mulheres apresentam hirsutismo e oligoamenorreia (ver Quadro 1 Anexos) (Mello *et al.*, 2002). Embora seja frequentemente citada, a forma não-clássica da deficiência em 11 β -OH aparenta não ser frequente e ainda não foram completamente estabelecidos os parâmetros endocrinológicos e moleculares para o seu diagnóstico.

1.4 Diagnóstico laboratorial da deficiência em 11 β -OH

A grande parte dos esteróides produzidos em excesso é secretada na urina sob a forma de tetra-hidro metabolitos do 11-desoxicortisol. O diagnóstico laboratorial da deficiência em 11 β -OH tem sido estabelecido com base num teste de estímulo com ACTH exógeno, em que se verificam níveis elevados, basais ou estimulados, de 3 hormonas principais: 11-desoxicortisol, DOC séricos e respectivos metabolitos urinários (tetrahydrocomposto S – metabolito do desoxicortisol; tetrahydrocomposto F- metabolito do cortisol; 17-cetoesteróides; metabolitos urinários dos androgénios). Podem, no entanto, ser também doseados outros componentes associados à via de síntese do cortisol, como a androstenediona, 17-hidroxipregnenolona, progesterona, 17-hidroxiprogesterona e o próprio cortisol.

Estudos anteriores demonstraram que doentes com deficiência em 11 β -OH apresentavam: níveis baixos de cortisol, níveis elevados de ACTH bem como de testosterona e sulfato de dehidroepiandrosterona; níveis extremamente elevados de 11-desoxicortisol e níveis basais de 17-hidroxiprogesterona aumentados (Mello *et al.*, 2004). A forma clássica da doença apresenta geralmente supressão da actividade da renina plasmática e hipocalcemia. No caso de pacientes com suspeita de deficiência em 11 β -OH não-clássica o diagnóstico deve ser feito usando o critério de elevação do 11-desoxicortisol em pelo menos 3 vezes dos valores máximos obtidos em 95% da população após estímulo com ACTH exógeno. No entanto este critério é muito questionado devido à sua falta de eficácia (Joehrer *et al.*, 1997). A ausência de hipertensão ou de sintomatologia mais grave no período neo-natal podem dificultar o diagnóstico. Outro factor que pode levar a um erro de diagnóstico é o doseamento isolado 17OH-progesterona, uma vez que esta também existe em níveis elevados na deficiência em 21-OH (White *et al.*, (1994). Por estes motivos torna-se importante a realização de um diagnóstico molecular de forma a excluir a possibilidade de haver um diagnóstico errado de deficiência em 21-OH quando se pode tratar de uma deficiência em 11 β -OH e na medida em que as outras ferramentas de diagnóstico (diagnóstico endocrinológico e técnicas de imagem:

Introdução – 1ª Parte

ultrasonografia pélvica, uroginotografia, estudos de idade óssea) podem não ser claras. A distinção entre uma deficiência em 11 β -OH e em 21-OH é importante para permitir o tratamento adequado.

1.5 As isozimas CYP11B

As isozimas 11 β -OH são da família do citocromo P-450 mitocondriais chamadas CYP11B. Cada uma é composta por 503 resíduos de aminoácidos mas após a tradução, a proteína sofre processamento, sendo eliminado o péptido sinal de 24 aminoácidos, o que origina proteínas maduras com 479 aminoácidos. As enzimas maduras apresentam 93% de homologia, diferindo em apenas 29 resíduos de aminoácidos localizados fora das regiões de reconhecimento dos substratos. Tal como outras enzimas P450, a 11 β -OH usa oxigénio molecular e agentes redutores mediados pelo NADPH para catalisar reacções de hidroxilação.

As isozimas CYP11B são responsáveis pela síntese da aldosterona e do cortisol, promovendo nos dois casos, uma hidroxilação na posição 11 (posição 11 da 11-desoxicorticosterona e do 11-desoxicortisol respectivamente). A enzima responsável pela hidroxilação da 11-desoxicorticosterona é a aldosterona sintetase enquanto que a enzima responsável pela hidroxilação do 11-desoxicortisol é a 11 β -hidroxilase (Mello *et al.*, 2004). Os genes que codificam estas enzimas localizam-se no cromossoma 8, sendo que o gene codificante para a aldosterona sintetase é o *CYP11B2* (8q21-q22), distando este apenas 40kb do gene que codifica para a 11 β -hidroxilase, o *CYP11B1* (8q21-q22). Estudos *in vitro* demonstraram que a enzima codificada por *CYP11B1* tem elevada actividade de 11-hidroxilação do 11-desoxicortisol e da 11-desoxicorticosterona; baixa actividade de 18-hidroxilase e actividade nula de 18-oxidase. Isto diferencia-a da enzima codificada pelo *CYP11B2*, já que esta apresenta actividade 11-OH apenas na 11-desoxicorticosterona e apresenta actividade 18-oxidase. Para além disto, também são distinguíveis *in vivo* pelo facto de o esteróide hidroxilado por *CYP11B1* ser libertado após a 11-hidroxilação, ao passo que o processo é mais complexo no caso de *CYP11B2*, em que a enzima executa 3 conversões oxidativas consecutivas (Fisher *et al.*, 2001).

1.6 Os genes CYP11B

Os genes *CYP11B* apresentam 9 exões e 8 intrões, dispostos em 7kb de extensão (Figura 1.5), sendo 95% homólogos na sequência nucleotídica dos exões e 90% homólogos ao nível da sequência dos intrões.

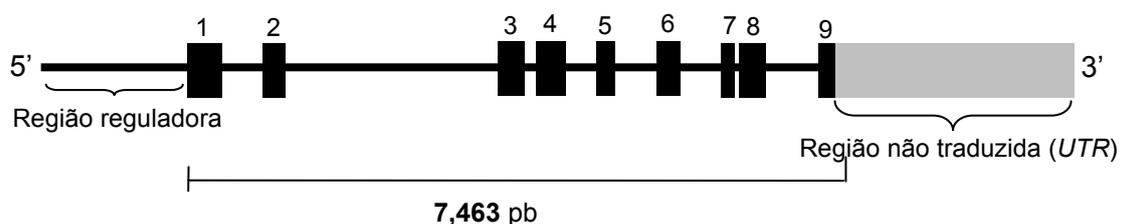


Figura 1.5- Representação esquemática do gene *CYP11B1*.

As regiões que mais diferem entre os genes são as regiões 5' (Ferrari *et al.*,2002). Como seria de esperar, pelo facto de codificarem enzimas diferentes, alterações nas sequências destes 2 genes originam patologias diferentes, mais concretamente, mutações que ocorram no gene *CYP11B1* causam CAH ao passo que mutações no gene *CYP11B2* causam hipoadosteronismo.

Devido à grande homologia entre os genes é possível a ocorrência de *crossing-over* desigual e de acontecimentos de conversão, embora não sejam geradores importantes de alelos deletérios. É possível a ocorrência de genes híbridos *CYP11B1/2* resultantes de duplicações por recombinação intergénica que originam quimeras com o promotor de *CYP11B1* e sequência codificante de *CYP11B2* (hiperaldosteronismo) ou vice-versa, isto é, promotor de *CYP11B2* com restante sequência codificante de *CYP11B1* (associado a CAH) (Figura 1.6).

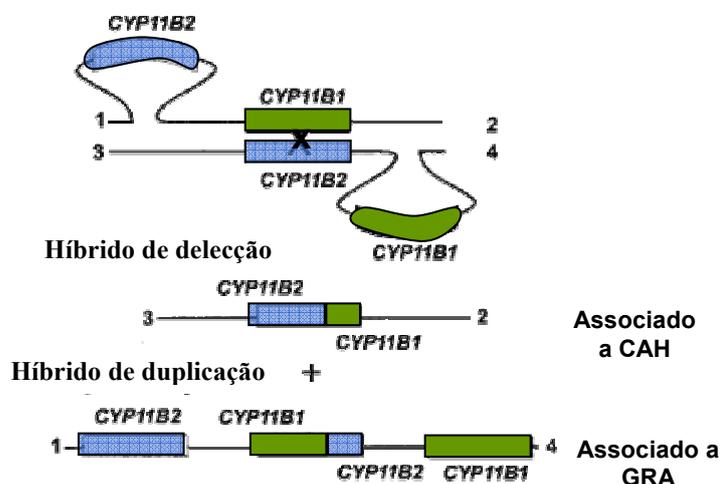


Figura 1.6- *Crossing-over* desigual entre *CYP11B2* e *CYP11B1*. Legenda: CAH- hiperplasia supra-renal congénita; GRA- Hiperaldosteronismo.

1.7 Mutações na sequência codificante de *CYP11B1*

Mutações deletérias no gene *CYP11B1* têm sido encontradas em doentes com deficiência em 11 β -OH, e estão correlacionadas com alterações em resíduos importantes para a actividade enzimática ou com alterações na transcrição normal do gene, gerando assim mRNAs alterados, e consequentemente proteínas truncadas¹⁵⁻¹⁷.

Até à actualidade já foram descritas diversas mutações, sendo que 49 geram trocas de aminoácidos (ver Tabela1 Anexos), 11 alteram a grelha de leitura devido a inserções ou deleções de nucleótidos e 5 alteram ou geram sítios de *splicing* alternativos (ver Tabela3 Anexos).

Para além destas mutações já descritas, no *CYP11B1* também já foram descritos vários polimorfismos que podem resultar de conversões envolvendo o *CYP11B2* ou de substituição de nucleótidos representando alterações silenciosas ou variações intrónicas não associadas a patologia

(SNPs encontram-se disponíveis para consulta na base de dados do NCBI, através da seguinte ligação electrónica http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=1584)

1.8 Mutações na sequência reguladora de *CYP11B1*

A estimulação da produção de hormonas esteróides através do ACTH ocorre através da via de sinalização da AMPc. Esta via consiste numa série de interações a nível celular que permitem a transdução de sinal. A ACTH após ser sintetizada entra na circulação sanguínea dirigindo-se para a glândula supra-renal, local onde exerce o seu efeito. Ao atingir a glândula supra-renal, liga-se ao seu receptor que se encontra na membrana plasmática das células da zona fasciculada e reticulada. Esta ligação origina uma interacção indirecta do receptor à subunidade α da proteína G que promove a transformação do GDP em GTP. Esta transformação promove a interacção entre a subunidade α da proteína G e a enzima transmembranar adenilato ciclase. Esta enzima entra assim em acção, levando à síntese da AMPc a partir de ATP.

A AMPc desempenha um papel de mensageiro secundário. O aumento da sua concentração no citosol conduz à activação das proteínas cinases dependentes da AMPc, que por sua vez fosforilam outras enzimas, promovendo a sua activação ou inactivação. Esta cascata de reacções de fosforilação permite a activação da proteína cinase A (PKA) que ao entrar no núcleo da célula activa a proteína CREB (factor de transcrição) que se liga a um local CRE (*cAMP response element*), que por sua vez conduz ao início da transcrição do gene (Figura 1.7). A via de transdução da AMPc envolve ainda o SF-1 (*steroidogenic factor-1*). Trata-se de uma proteína que faz parte da subfamília 5 dos receptores nucleares que actua como factor de transcrição quando activado pela PKA através da fosforilação das proteínas CREB. Para além do efeito de aceleração da transcrição do gene *CYP11B1*, a ACTH exerce um efeito ao nível do recrutamento do colesterol (ligação deste aos receptores de LDL) e ao nível da sua conversão a pregnenolona na mitocôndria, local onde induz a fosforilação de uma proteína que estimula a conversão do colesterol a pregnenolona (“Fisiologia da Adrenal”, disponível em rede na localização www.fisfar.ufc.br).

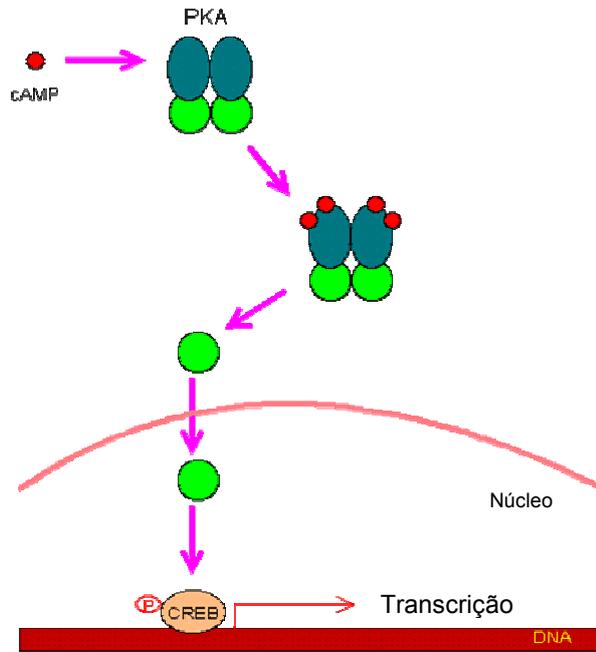


Figura 1.7- Esquematização da via de transdução de sinal da cAMP (figura adaptada de <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch6F1.htm>).

Estudos anteriores demonstraram que podem ocorrer alterações ao nível do promotor que alteram a regulação da transcrição do gene *CYP11B1*, o que por sua vez afecta a actividade da enzima [Wang X *et al.* (2000)]. Foram identificadas três regiões no promotor de *CYP11B1* importantes para a regulação da sua expressão (ver Figura 1.8). A transcrição de *CYP11B1* requer a presença de dois elementos em cis: Ad1 (nt.-71 a -64), que corresponde a um local CRE e Ad4 (nt.-244 a -233) ao qual se liga o SF-1. Foi também identificada outra região, designada de Ad5 (nt.-121 a -112) a qual também se demonstrou ser importante para a transcrição do gene (Wang *et al.*, 2000).

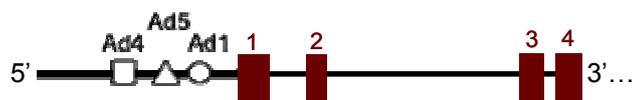


Figura 1.8 -Regiões reguladoras de *CYP11B1*. Legenda: Ad4 – nt -244 a -233; Ad5- nt -212 a -112; Ad1- nt -71 a -64.

Estes estudos demonstraram que a região -214 a -65 do promotor de *CYP11B1* é essencial para a transcrição do gene. Estudos de expressão génica, realizados *in vitro*, que consistiram na clonagem do promotor de *CYP11B1* a montante do gene da luciferase, demonstraram que a deleção da região -214 a -65 afectava significativamente a expressão da luciferase. Em condições de estimulação com (BU)₂cAMP verificou-se que a deleção até à região -65 do promotor eliminou também a indução da expressão do gene repórter. Estes resultados demonstraram que o segmento do promotor entre -214 e -65 contém as regiões mínimas essenciais tanto para a transcrição basal como para a transcrição regulada pela cAMP. Wang constatou que uma deleção do local Ad4 não afectava a expressão basal

Introdução – 1ª Parte

do gene repórter nem quando a expressão era induzida por cAMP. No entanto, quando as células eram co-transfectadas com o plasmídeo de expressão de SF-1, uma deleção até à região -214 diminuía a actividade da luciferase em cerca de 50% comparativamente com construções até à região -330. Esta observação sugere que o local Ad4 é necessário para a indução máxima da transcrição sob acção de SF-1.

Mutações no local Ad5 não afectaram significativamente a actividade da luciferase, no entanto quando em simultâneo com mutações em Ad4 a actividade de luciferase resultante foi semelhante à de um vector vazio.

Estes estudos evidenciaram que o local Ad1 é o local do promotor mais provável de ser o elemento chave na indução da transcrição de *CYP11B1* pelo ACTH, uma vez que é necessário à expressão basal e estimulada por cAMP. Provaram também que o local Ad4 é essencial para que ocorra transcrição máxima do gene (Wang *et al.*, 2000).

Por estas razões tornou-se evidente a importância de expandir o estudo do gene *CYP11B1* à região do promotor.

Num estudo realizado por Barr e colaboradores, (Barr *et al.*, 2006) foi demonstrado que o alelo -344T em *CYP11B2* se encontra em desequilíbrio de *Linkage* relativamente às variantes -1889T e -1859G do *CYP11B1* (ver Figura 1.9). Verificou-se, *in vitro*, que quando estas posições estão alteradas (-1889G>T e -1859A>G) ocorre uma diminuição da actividade enzimática de 11 β -OH. Estas posições podem assim alterar a regulação da transcrição do gene *CYP11B1*, e assim, contribuir para a diminuição da actividade da 11 β -OH (Barr *et al.*, 2006).

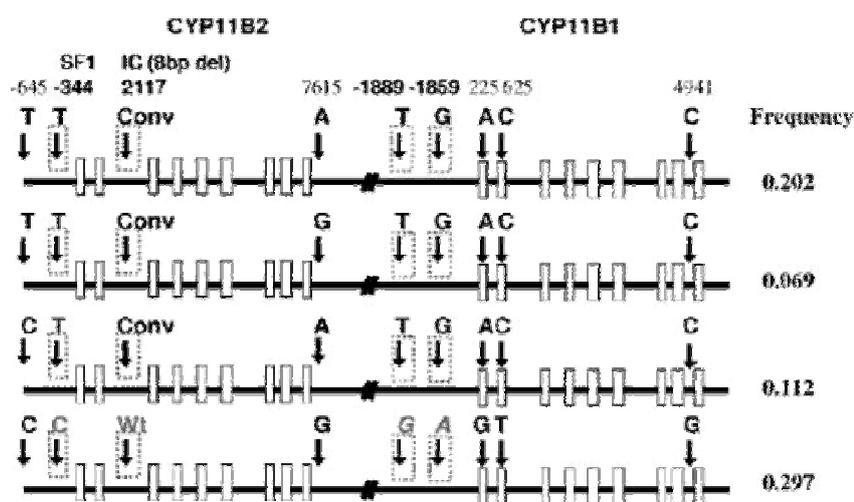


Figura 1.9- Representação dos SNP's de *CYP11B1* (-1889T e -1859G) em desequilíbrio de *linkage* com a posição -344T de *CYP11B2* (Barr *et al.* 2006).

Introdução – 1ª Parte

Uma vez que Barr e colaboradores só investigaram a associação das referidas alterações com hipertensão, ainda não existem estudos que tenham investigado se as alterações em causa podem estar associadas com a CAH. A análise da região do promotor de *CYP11B1* que compreende as posições -1889 e -1859 mostrou-se de elevado interesse, já que podem afectar a actividade enzimática e consequentemente, as alterações -1889G>T e -1859A>G poderão estar associadas à CAH.

1.9 Incidência da CAH

Tal como foi referido anteriormente, a deficiência em 21-OH – forma clássica, é a mais frequente, ocorrendo em 1/15000 nascimentos da população geral. Embora a incidência de CAH, na população caucasiana, devida a deficiência em 11 β -hidroxilase seja menos frequente, cerca de 1/50000 – 1/100000, estima-se que na população portuguesa a incidência desta patologia possa ser superior devido à existência de um possível efeito fundador. Em estudos anteriores verificou-se que em populações com elevada endogamia a frequência desta deficiência enzimática é superior, como é exemplo a população de Israel (1:30-40 000) e da Arábia Saudita em que pode chegar a 25% dos casos de CAH (Al-Jurayyan N, 1995). Sabe-se que em Judeus Israelitas oriundos de Marrocos a incidência estimada é de 1/7000 – 1/50000 (White *et al.*, 1991; Rösler *et al.*, 1992). Parte destes judeus terá na base da sua origem judeus sefarditas que deixaram Portugal no tempo da Inquisição. Nesta época estabeleceram-se em Marrocos, migrando posteriormente (quando foi fundado o estado de Israel) para Israel, onde constituíram uma comunidade. Este facto levou à ocorrência de casamentos intra-comunidade, o que terá permitido a fixação de determinados alelos na população, resultando daí a elevada incidência da CAH devida a deficiência em 11 β -OH na população dos judeus oriundos de Marrocos. Tendo em conta que estes judeus têm raízes ancestrais em Portugal, pensa-se que nem todos terão migrado nessa época, tendo parte ficado integrada na população portuguesa e outra parte terá regressado a Portugal após o final da Inquisição (“A brief social history of the jews in Morocco”). Desse modo poderá ter ocorrido a fixação de alguns alelos, o que poderá contribuir para um eventual aumento da incidência da deficiência em 11 β -OH na população portuguesa, comparativamente à incidência na população caucasiana em geral.

2. Objectivos

Pelas razões já referidas, isto é, desconhecimento quanto à base molecular da deficiência em 11 β -OH em doentes portugueses com CAH, dificuldade em estabelecer um diagnóstico clínico e endocrinológico preciso, necessidade de estabelecer um diagnóstico efectivo e dada a possibilidade de existência de uma frequência de CAH devida a deficiência em 11 β -OH mais elevada na população portuguesa que em outras populações europeias, tornou-se relevante a realização de um estudo que compreendesse a caracterização molecular da deficiência em 11 β -OH.

Assim, foram estabelecidos os seguintes objectivos:

- 1- Estabelecer as condições experimentais de análise molecular do gene *CYP11B1* baseada em PCR, DHPLC e sequenciação automática.
- 2- Identificar a base molecular da hiperplasia supra-renal congénita diagnosticada em doentes portugueses com suspeita de deficiência em 11 β -hidroxilase.
- 3- Testar alterações identificadas nas regiões intrónicas quanto a poderem causar *splicing* alternativo, utilizando para isso, software adequado acessível via Internet.
- 4- Pesquisar alterações no promotor do gene *CYP11B1*, nomeadamente, nas regiões em cis Ad1, Ad4 e Ad5 e ainda nas posições -1889 e -1859, que possam afectar a expressão de *CYP11B1* e actividade de 11 β -hidroxilase.

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

3. Obtenção do material biológico

Os doentes com CAH e com suspeita de deficiência em 11 β -hidroxilase provieram de consultas de endocrinologia pediátrica ou de endocrinologia de adultos dos hospitais centrais (ex. Hosp. D. Estefânia, Hosp. St^a Maria, Hosp. Pediátrico de Coimbra, Hosp. Geral St^o António). O material biológico a analisar consistiu no ADN genómico do sangue periférico, tendo sido obtido o consentimento informado dos doentes (no caso dos doentes em idade adulta) ou dos responsáveis pelos doentes (no caso dos doentes menores de idade) para a realização deste estudo. Foram seleccionadas 52 amostras de ADN obtidas de doentes com CAH e suspeita de possuírem deficiência enzimática em 11 β -OH. A forma de CAH diagnosticada nos doentes em estudo encontra-se referida na tabela... Foi utilizado um controlo normal (indivíduo saudável) e 3 controlos positivos, cujas mutações já tinham sido identificadas noutra laboratório (ADN cedido por Lourdes Loidi, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Unidad de Medicina Molecular, Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela). Apesar de já caracterizadas, estas amostras foram analisadas utilizando a mesma estratégia de análise que as restantes amostras em estudo, uma vez que me foram entregues sem ser revelada a alteração molecular que cada amostra possuía.

O ADN genómico foi obtido por extracção automática utilizando o equipamento Magna-Pure da Roche, ou por *salting-out*, tendo-se usado o kit “WizardTM Genomig DNA Purification System” da Promega.

Tabela 1- Agrupamento dos doentes em estudo consoante o diagnóstico clínico.

Total Indivíduos N=52	
Forma clássica N=6	
3♀	3♂
Forma virilizante simples (VS) N=25	
12♀	13♂
Forma não clássica (NC) N=18	
12♀	6♀
Diagnóstico inconclusivo (NC/VS) N=3	

4. Análise Molecular do Gene *CYP11B1*

A análise molecular do gene *CYP11B1* baseou-se na técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) recorrendo a um termociclador Biometra T Gradient. A técnica de PCR consiste numa amplificação enzimática *in vitro*, na qual o principal componente é a DNA polimerase. Esta enzima promove a replicação do ADN a partir dele próprio (molde) com o auxílio de iniciadores específicos, os primers. O ADN molde é então amplificado exponencialmente, através de sucessivas reacções, podendo originar milhões de cópias do ADN alvo. Usualmente a DNA polimerase que se utiliza nas reacções de PCR é a Taq polimerase, que foi originalmente isolada da bactéria *Thermus aquaticus* e é uma polimerase termo-estável (Griffiths *et al.*, 2005, p.360).

Os PCR's encontram-se subdivididos em cinco fases: iniciação (aquecimento prévio a 94-98°C); desnaturação (aquecimento a 94-98°C que promove separação das cadeias do ADN); *annealing* (arrefecimento a 50-65°C que permite a ligação dos iniciadores ao ADN); extensão (aquecimento a 75-80°C para ocorrer a síntese da nova cadeia de ADN); elongação final (a 70-74°C para garantir que todas as cadeias foram completamente sintetizadas). Cada reacção envolve vários ciclos desnaturação-*annealing*-extensão e a selectividade do PCR resulta da utilização de primers directo (5') e reverso (3') que são complementares às regiões do ADN que delimitam a região que se pretende amplificar (ver Figura 2.1).

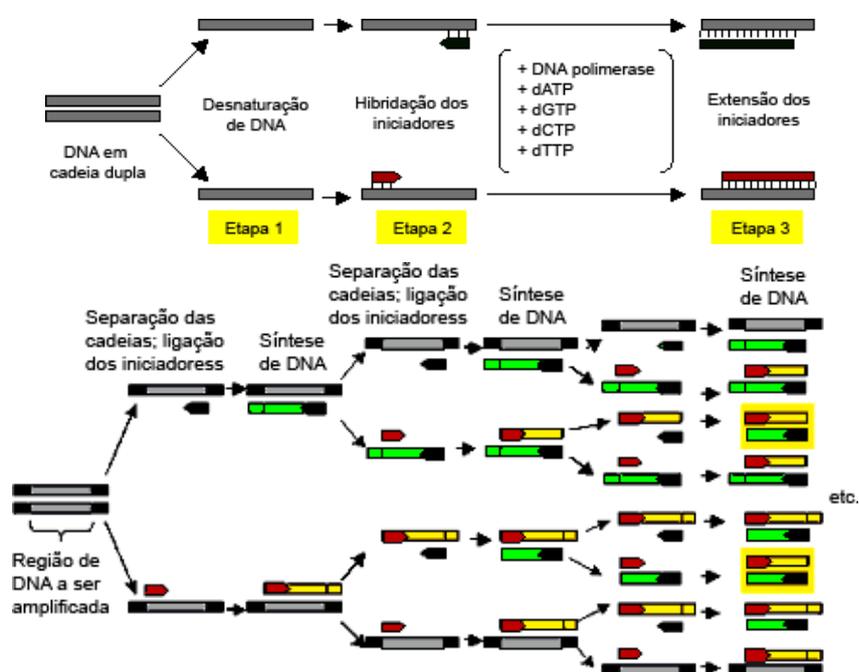


Figura 2.1- Representação esquemática de uma reacção de PCR (Figura adaptada de <http://www.e-escola.pt>).

A análise molecular do gene *CYP11B1* seguiu a estratégia que se encontra indicada na Figura 2.2.

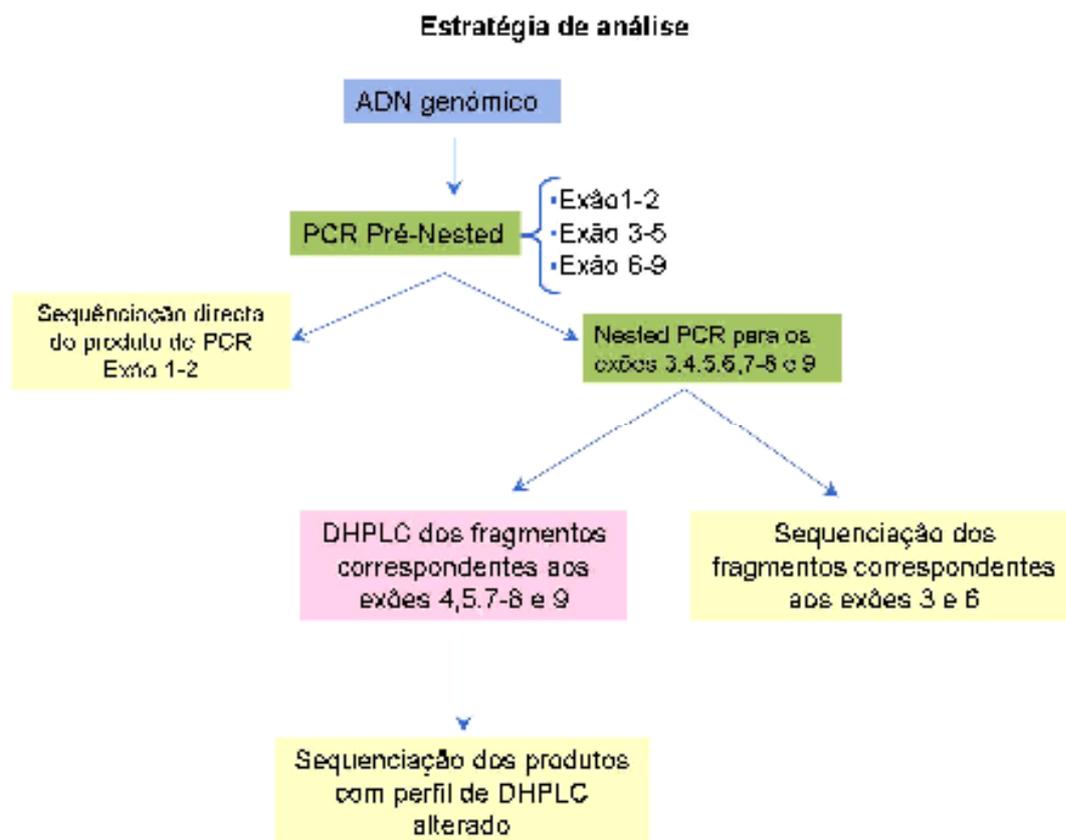


Figura 2.2- Esquematização da estratégia utilizada na análise molecular do gene *CYP11B1*.

Nas situações em que não foi possível obter produto de PCR Pré-Nested do fragmento que inclui os exões 1 e 2 ou quando o produto obtido não permitia a realização da sequenciação directa, foi realizado o PCR Nested dos exões 1 e 2.

4.1 PCR da sequência codificante

A mistura de reacção perfazia um volume final de 30µl e os reagentes utilizados bem como as condições de reacção encontram-se discriminados na Tabela 2 (no caso dos PCRs Pré-*Nested*) e na Tabela 3.

Tabela 3

Tabela 2- Condições experimentais dos PCR's *Pré-Nested*

PCR Pré-Nested	Primers	Outros reagentes	Reacção
Exão 1-2 (1010pb)	3µl E1-2F (100ng/µl) +3µl E1-2R1 (100ng/µl)	Kit Expand High Fidelity da Roche (3µl Tampão2; 0.4µl Taq 3.5U/µl) + 0.25 µl dNTP's (25mM) +1µl ADN (100ng/µl) +H ₂ O (para perfazer volume final)	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 2 min • 94°C 30s • 62°C 1min • 72°C 1min30s } (10x) <ul style="list-style-type: none"> • 94°C 30s • 62°C 1min • 72°C 1min30s c/inc. 5s } (20x) <ul style="list-style-type: none"> • 72°C 7min
Exão 3-5 (1480pb)	3µl E3-5F (100ng/µl) + 3µl E3-5R (100ng/µl)	Kit Expand High Fidelity da Roche (3µl Tampão2; 0.4µl Taq 3.5U/µl; 1.2µl MgCl ₂ 25mM) + 0.25 µl dNTP's (25mM) +2µl ADN (100ng/µl) +H ₂ O (para perfazer volume final)	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 2 min • 94°C 30s • 67°C 1min • 72°C 1min30s } (10x) <ul style="list-style-type: none"> • 94°C 30s • 67°C 1min • 72°C 1min30s c/inc. 5s } (20x) <ul style="list-style-type: none"> • 72°C 7min
Exão 6-9 (1933pb)	3µl E6-9F (100ng/µl) + 3µl E6-9R (100ng/µl)	Kit Expand High Fidelity da Roche (3µl Tampão2; 0.4µl Taq 3.5U/µl; 1.8µl MgCl ₂ 25mM) + 0.25 µl dNTP's (25mM) +1µl ADN (100ng/µl) +1.5 µl DMSO +H ₂ O (para perfazer volume final)	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 2 min • 94°C 30s • 63°C 1min • 72°C 1min30s } (10x) <ul style="list-style-type: none"> • 94°C 30s • 63°C 1min • 72°C 1min30s c/inc 5s } (20x) <ul style="list-style-type: none"> • 72°C 7min

O volume de produto do PCR *Pré-Nested* a adicionar à mistura de reacção do PCR *Nested* encontra-se indicado na tabela seguinte. Contudo, este volume era ajustado consoante a quantidade de produto de PCR obtido, isto é, PCR's com elevado rendimento originavam um produto de PCR de maior concentração que era necessário diluir. Nos casos em que o rendimento era menor, a quantidade de produto de PCR a adicionar poderia ser superior ao volume indicado na tabela.

Tabela 3- Condições experimentais dos PCR's *Nested*

PCR Nested	Primers	Reagentes	Reacção
Exão 1 (390pb)	3µl E1-2F (50ng/µl) + 3µl E1-R1 (50ng/µl)	3µl tampão AB + 0.1µl GOTaq (5U/µl) + 0.5µl dNTP's (25mM) +1µl DNA (100ng/µl) + H ₂ O	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 3min • 94°C 1min 62°C 1min 72°C 1 min (30x) <ul style="list-style-type: none"> • 72°C 5min
Exão 2 (434pb)	3µl E2-F1 (50ng/µl) 3µl + E1-2R1 (50ng/µl)	3µl tampão AB + 0.1µl GOTaq (5U/ µl) + 0.5µl dNTP's (25mM) +2µl DNA (100ng/µl) + H ₂ O	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 3min • 94°C 1min 61°C 1min 72°C 1 min (30x) <ul style="list-style-type: none"> • 72°C 5min
Exão 3 (472pb)	4µl E3-F1 (50ng/µl) + 4µl E3-R1 (50ng/µl)	3µl tampão AB + 0.1µl GOTaq (5U/µl) + 0.5µl dNTP's (25mM) + 2µl Produto PCR Pré-Nested + H ₂ O	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 3min • 94°C 1min 56°C 1min 72°C 1 min (30x) <ul style="list-style-type: none"> • 72°C 5min
Exão 4 (419pb)	4µl E4-F1 (50ng/µl) + 4µl E4-R1 (50ng/µl)	3µl tampão AB + 0.1µl GOTaq (5U/ µl) + 0.5µl dNTP's (25mM) + 2µl Produto PCR Pré-Nested + H ₂ O	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 3min • 94°C 1min 56°C 1min 72°C 1 min (30x) <ul style="list-style-type: none"> • 72°C 5min
Exão 5 (349pb)	4µl E5-F1 (50ng/µl) + 4µl E3-5R (50ng/µl)	3µl tampão AB + 0.1µl GOTaq (5U/ µl) + 0.5µl dNTP's (25mM) + 2µl Produto PCR Pré-Nested + H ₂ O	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 3min • 94°C 1min 56°C 1min 72°C 1 min (30x) <ul style="list-style-type: none"> • 72°C 5min
Exão 6 (513pb)	3µl E6-9F (50ng/µl) + 3µl E6-R1 (50ng/µl)	3µl tampão AB + 0.1µl GOTaq (5U/ µl) + 0.5µl dNTP's (25mM) + 1µl Produto PCR Pré-Nested + H ₂ O	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 3min • 94°C 1min 60°C 1min 72°C 1 min (30x) <ul style="list-style-type: none"> • 72°C 5min
Exão 7-8 (529pb)	3µl E7-F1 (50ng/µl) + 4µl E8-R1 (50ng/µl)	3µl tampão AB + 0.1µl GOTaq (5U/ µl) + 0.5µl dNTP's (25mM) + 1µl Produto PCR Pré-Nested + H ₂ O	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 3min • 94°C 1min 60°C 1min 72°C 1 min (30x) <ul style="list-style-type: none"> • 72°C 5min

Materiais e Métodos - 1ª Parte

Exão 9 (483pb)	3µl E9F (50ng/µl) + 3µl E6-9R (50ng/µl)	3µl tampão AB + 0.1µl GOTaq (5U/ µl) + 0.5µl dNTP's (25mM) + 1µl Produto PCR Pré-Nested + H ₂ O	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 3min • 94°C 1min 59°C 1min 72°C 1 min • 72°C 5min (30x)
--------------------------	--	--	--

4.2 PCR da sequência reguladora

A detecção de alterações no promotor de *CYP11B1* foi realizada por PCR directo, seguido de sequenciação do respectivo fragmento. Os iniciadores utilizados, bem como as condições experimentais encontram-se referidos na tabela seguinte.

Tabela 4- condições experimentais dos PCR's da região reguladora

PCR	Primers	Reagentes	Reacção
Promotor 1 (360pb)	4µl P1F (100ng/µl) + 4µl P1R (100ng/µl)	3µl tampão AB + 0.2µl GOTaq (5U/ µl) + 0.5µl dNTP's (25mM) + 2µl ADN genómico + H ₂ O	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 3min • 94°C 1min 57°C 1min 72°C 1 min • 72°C 5min (30x)
Promotor 2 (323pb)	3µl P2F (100ng/µl) + 3µl P2R (100ng/µl)	3µl tampão AB + 0.1µl GOTaq (5U/ µl) + 0.5µl dNTP's (25mM) + 2µl ADN genómico + H ₂ O	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 3min • 94°C 1min 61°C 1min 72°C 1 min • 72°C 5min (30x)

4.3 Controlo de qualidade dos produtos de PCR

Os produtos de PCR obtidos para qualquer das análises referidas (sequências codificante e reguladora) foram sujeitos a electroforese em gel de agarose (1%, 1,5% e 2% consoante o tamanho dos fragmentos a observar) sendo posteriormente visualizados por exposição a radiação UV utilizando um espectrofotometro de UV Shimadzu, modelo UV-1603. Uma vez obtidos os produtos de PCR com os tamanhos adequados, estes foram purificados usando o kit “JETquick” da GENOMED ou o kit “NucleoSpin II” da Machinerey Nagel, sendo este segundo kit utilizado quer para purificação do produto de PCR em coluna quer para purificação de produtos de PCR a partir do gel de agarose (seccionando do gel a banda pretendida).

Materiais e Métodos - 1ª Parte

4.3.1 Purificação dos Produtos de PCR

A purificação seguiu as recomendações do fabricante. Os fragmentos purificados foram submetidos a nova electroforese em gel de agarose, para quantificação do produto purificado, usando o Fago X174+HaeIII como ADN de referência, uma vez que possui as suas bandas quantificadas (ver Tabela 4 Anexos). Esta quantificação permitia saber a concentração e quantidade aproximadas de produto purificado necessário à reacção de sequenciação.

4.4 DHPLC e Sequenciação Automática

Após a PCR, os fragmentos foram usados para análise de rastreio de alterações por DHPLC (*Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*), ou por sequenciação automática segundo a estratégia de análise definida (conforme indicado na Figura 2.2).

Inicialmente procedeu-se à análise de um grupo de amostras (N=15), em que não foi realizado DHPLC. Esta análise inicial permitiu identificar alterações que posteriormente foram analisadas por DHPLC permitindo validar este método. Pretendia-se assim avaliar a sensibilidade e eficácia do DHPLC na detecção de alterações conhecidas. Por outro lado, esta análise permitiu também seleccionar os exões que seria vantajoso submeter sistematicamente a DHPLC, e os que não deveriam sofrer essa análise por apresentarem frequentemente alterações, visto que iriam exibir sempre perfil alterado no DHPLC, tendo que ser consequentemente sequenciados. Estes fragmentos foram submetidos somente a sequenciação, uma vez que a realização do DHPLC implicaria empregar gastos e tempo desnecessários. Os exões que foram encaminhados para análise por sequenciação, sem realização de DHPLC consistiram nos exões 4, 5, 7-8 e 9. Os restantes exões (1-2,3 e 6) foram sujeitos a análise por DHPLC, e apenas as amostras que evidenciavam perfil alterado eram depois sequenciadas de modo a identificar a alteração em causa.

4.4.1 DHPLC

O DHPLC consiste num método de rastreio de alterações em fragmentos de ADN. Este método permite detectar heterodímeros de ADN. Dois fragmentos de ADN de cadeia dupla da mesma região em análise, um obtido de um controlo normal e outro da amostra em estudo, são amplificados e os respectivos produtos do PCR são posteriormente misturados em quantidades iguais. Este passo realiza-se com o intuito de poder detectar as heterozigotias e as homozigotias das amostras em estudo (ver Figura 2.3). Nos casos em que os fragmentos diferem em pelo menos um nucleótido, quando são aquecidos e emparelhados, formam heterodímeros, os quais são distinguíveis quando analisados por DHPLC, uma vez que a mobilidade dos heterodímeros é diferente da dos homodímeros (GBETH, 2006).

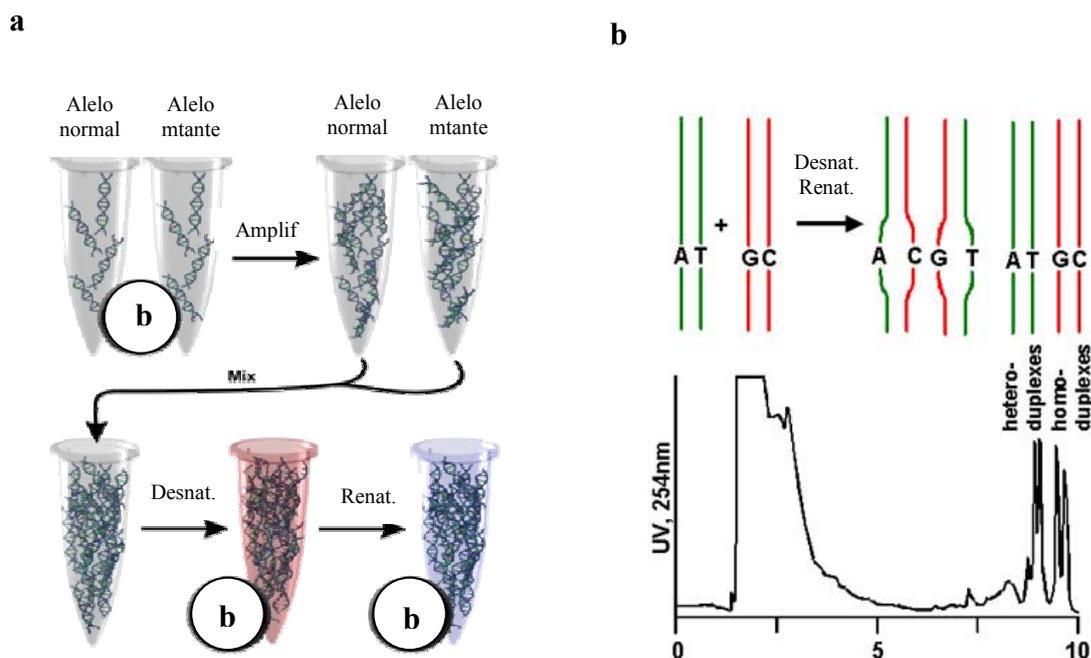


Figura 2.3- a) Descrição da técnica de DHPLC (figura adaptada de www.mheresearchfoundation.org/DHPLC_Genetic_Testing.html); b) Distinção entre homodímeros e heterodímeros (figura adaptada de <http://www.uni-saarland.de/fak8/huber/dhplc>). Legenda: Amplif. – amplificação; Desnat. – desnaturação; Renat. – renaturação.

Os resultados da análise por DHPLC são visualizados através do sistema de análise de fragmentos da Transgenomic (modelo Transgenomic Wave- DHPLC). Nos casos em que o perfil da amostra em análise era diferente do perfil do controlo normal, é obtido um novo produto de PCR, posteriormente purificado e sequenciado.

4.4.2 Sequenciação Automática

A sequenciação de ADN consiste em determinar a sequência de nucleótidos do fragmento em análise. Os primeiros métodos de sequenciação foram publicados quase em simultâneo por Sanger *et al.* (método enzimático), e Maxam-Gilbert (método químico) em 1977. O método de sequenciação automática baseia-se no método de Sanger. Este método consiste na síntese de cadeias (marcadas radioativamente) a partir do fragmento de ADN em estudo e por separação das cadeias por de electroforese, pode estabelecer-se a sequência de nucleótidos (cadeias diferem entre si por um nucleótido) (Griffiths *et al.*, 2005, p.357). A síntese das cadeias truncadas é conseguida pelo uso de ddNTPs (didesoxirribonucleotídeos trifosfatados) os quais, e ao contrário dos dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados), não possuem o grupo 3'-OH, daí serem designados por terminadores.

Na sequenciação automática verificam-se algumas diferenças relativamente ao método de Sanger. Em vez de serem marcados radioativamente (o que permitia apenas a análise de cada

Materiais e Métodos - 1ª Parte

tipo de nucleótido em separado) os terminadores são marcados com fluorocromos diferentes, o que permite a análise simultânea dos quatro tipos de nucleótidos, visto que quando são excitados por um feixe de radiação laser emitem luz com comprimentos de onda distintos (ver Figura 2.4). Os produtos da reacção de sequenciação são separados por electroforese vertical em géis de acrilamida ou por electroforese capilar. Durante a electroforese, o aparelho regista a intensidade de fluorescência e o respectivo comprimento de onda que é detectado na janela de leitura para cada um dos terminadores e para cada fragmento sintetizado (Griffiths *et al.*, 2005, p.358).

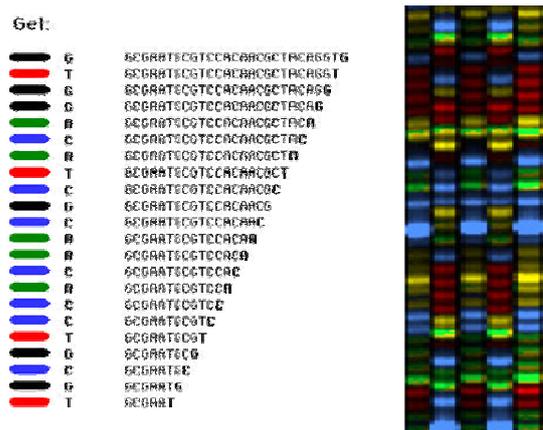


Figura 2.4- Representação esquemática da análise de fragmentos de ADN por sequenciação automática (from: “Sequenciação em análises Clínicas”).

A análise dos fragmentos pelo sequenciador automático requer a realização de uma reacção de sequenciação, que permite a incorporação de cada ddNTP marcado com o respectivo fluorocromo. O método utilizado na reacção de sequenciação consiste num processo de sequenciação cíclica no qual sucessivos ciclos de desnaturação, emparelhamento e extensão são realizados num termociclador, permitindo assim a incorporação dos referidos nucleótidos (ver Tabela 5- Condições experimentais das **Reacções de sequenciação**). Para a realização de sequenciação foi utilizado o kit comercial – “*Big Dye Terminator Ready Reaction v1.1 + Tampão de Sequenciação*”, que é específico do sequenciador automático usado (ABI Prism, modelo 3130XL).

Tabela 5- Condições experimentais das Reacções de sequenciação

Reagentes	Reacção
0.5µl Big Dye v1.1 + 3.5µl Tampão sequenciação +1µl <i>primer</i> (4pmol/µl) directo ou reverso +ADN purificado (2-7µl) + H ₂ O	<ul style="list-style-type: none"> • 96°C 30s • 96°C 10s 55°C 5s 60°C 4 min (25x)

Materiais e Métodos - 1ª Parte

As reacções de sequenciação tinham como volume final de mistura de reacção 10µl. O volume de produto purificado a adicionar à mistura de reacção variou consoante a quantidade de ADN que possuíam. Nos casos em que houve necessidade de adicionar o volume máximo de produto de PCR o volume de tampão era ajustado para perfazer o volume de mistura final de 10µl. Nos casos em que os volumes de produto de PCR a utilizar eram os volumes mais baixos, era adicionada água para perfazer o volume final.

4.5 Testes a alterações intrónicas

Para determinar se as alterações intrónicas encontradas criam novos locais de *splice*, se competem ou se anulam os locais de *splicing* endógenos, ou se criam ou anulam ESE (*exonic splicing enhancers*) ou ESS (*exonic splicing silencers*), foram utilizados programas informáticos disponibilizados em rede (ESEfinder3.0, GeneSplicer e NetGene2). As sequências em que existem as alterações foram introduzidas no programa (segundo critérios do programa em causa), comparando depois os resultados obtidos com os da sequência normal.

Capítulo 3 - Resultados

5. Alterações encontradas na sequência codificante

De acordo com a estratégia estabelecida, os produtos de PCR obtidos foram visualizados em gel de agarose, confirmando assim que os fragmentos obtidos eram os esperados (ver Figura 3.1) prosseguindo-se com os passos seguintes. Exemplifica-se na Figura 3.2 dois perfis de DHPLC que sugerem a existência de alteração na sequência de ADN do fragmento em análise. Todas as amostras que se verificou possuírem perfil alterado foram sequenciadas de modo a caracterizar a alteração que estaria presente no fragmento em causa. Relativamente aos controlos positivos, tal como já havia sido referido, foram analisados segundo a mesma estratégia de análise e as alterações neles encontradas encontram-se descritas na Tabela 6.

Esta análise permitiu identificar 27 alterações diferentes na sequência codificante das diversas amostras em estudo, onze das quais em exões, quinze em intrões e uma na região 3' não traduzida (3'UTR). Das onze alterações encontradas em exões apenas três provocam alteração de aminoácido (ver Tabela 6 e Figura 3.3). A nomenclatura atribuída às alterações encontradas baseou-se nas recomendações da *Human Genome Variation Society*.

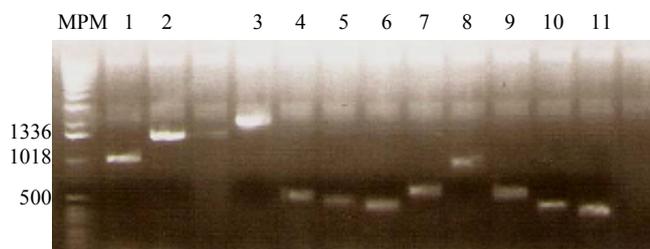


Figura 3.1- Fotografia de gel de agarose com os diferentes produtos de PCR. MPM- marcador de peso molecular de 1kb; Linha1- Exão1-2; Linha2- Exão3-5; Linha3- Exão6-9; Linha4- Exão3; Linha5- Exão4; Linha6- Exão5; Linha7- Exão6; Linha8- Exão7-8; Linha9- Exão9; Linha10- Promotor1; Linha11- Promotor2.

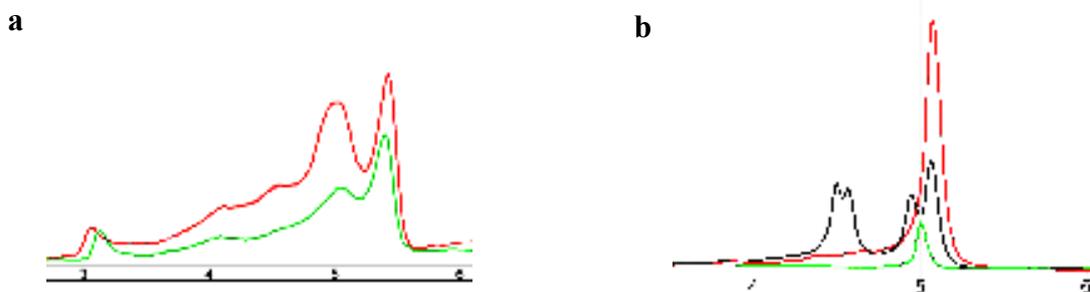


Figura 3.2- Perfil de DHPLC alterado: (a) exemplo de alteração no exão 9. Linha verde - perfil do controlo normal; linha vermelha - perfil da amostra com sequência nucleotídica presumivelmente alterada; (b) exemplo de alteração no intrão 4. Linha vermelha – perfil do controlo normal; Linha preta – perfil da amostra com alteração na sequência nucleotídica.

Resultados – 1ª Parte

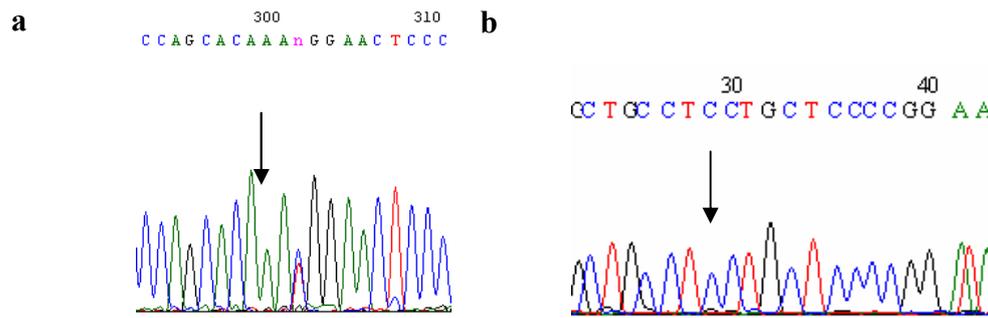


Figura 3.3- (a) Electroferograma da sequência parcial do fragmento que contém o exão 9 (incluindo sequências flaqueadores) cujo perfil de DHPLC se encontra na figura 3.2 (a). A alteração representada corresponde à 3'UTR c*132T>C (heterozigotia). (b) Electroferograma da sequência de um segmento do intrão 4, cujo perfil de DHPLC se encontra na figura 3.2 (b). A alteração representada corresponde IVS4-14 C>T (homozigotia).

As alterações identificadas nas amostras utilizadas como controlos positivos encontram-se descritas na tabela seguinte.

Tabela 6- Controlos positivos

Amostra	Alteração	Exão	
L0801L	c.264G>A (p.Met88Ile)	2	Heterozigotia
L0802L	c.1096C>T (p.Arg366Cys)	6	Heterozigotia
L0804L	c.194A>G (p.His65Arg)	1	Heterozigotia
	c.1201A>G (p.Thr401Ala)	8	Homozigotia

As alterações identificadas nas amostras em estudo, sua caracterização, frequência de ocorrência e o facto de se encontrarem ou não em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW), encontram-se descritas na Tabela 7.

Tabela 7- Alterações encontradas nas sequências exónicas e intrónicas analisadas, das amostras em estudo.

Exão/ Intrão	Alterações cDNA	Alterações Proteína	Tipo	AA	aa	Aa	p	q	EHW
1/1	c.225A>G	p.Leu75Leu	SS	8	8	30	0,500	0,500	Não
	IVS1-23T>C	-	INT	40	0	4	0,955	0,045	Sim
	c.128G>A	p.Arg43Gln	MS	43	0	1	0,989	0,011	Sim
	IVS1+20T>A	-	INT	43	0	1	0,989	0,011	Sim
2/2	c.246C>T	p.Asp82Asp	SS	22	7	22	0,647	0,353	Sim
	c.243C>T	p.Tyr81Tyr	SS	49	0	1	0,990	0,010	Sim
	IVS2-150T>G	-	INT	47	0	3	0,970	0,030	Sim
	IVS2-42C>T	-	INT	48	0	2	0,980	0,020	Sim
	IVS2-58G>A	-	INT	49	0	1	0,990	0,010	Sim
3/3	IVS3+12G>A	-	INT	11	5	19	0,586	0,414	Sim
	IVS3-41C>T	-	INT	26	0	9	0,871	0,129	Sim
	c.495C>G	p.Ala165Ala	SS	34	0	1	0,986	0,014	Sim
4/4	IVS4-14C>T	-	INT	44	1	0	0,978	0,022	Não
5/5	IVS5-111T>G	-	INT	17	10	20	0,600	0,400	Sim
6/6	c.1047C>G	p.Ala349Ala	SS	37	0	1	0,987	0,013	Sim
	c.1066C>T	p.Gln356X	NS	37	0	1	0,987	0,013	Sim
	c.1086G>C	p.Leu362Leu	SS	37	0	1	0,987	0,013	Sim
	c.1014G>A	p.Gln338Gln	SS	37	0	1	0,987	0,013	Sim
	c.1120C>A	p.Arg374Arg	SS	36	1	1	0,961	0,039	Não
	IVS6-20A>G	-	INT	37	1	0	0,974	0,026	Não
	IVS6+113T>C	-	INT	37	0	1	0,987	0,013	Sim
	IVS6+163T>C	-	INT	6	11	21	0,434	0,566	Sim
7/-	c.1132G>A	p.Val378Met	MS	46	0	1	0,989	0,011	Sim
-/8	IVS8-14G>C	-	INT	38	2	7	0,883	0,117	Sim
	IVS8+126C>G	-	INT	46	1	0	0,979	0,021	Não
	IVS8+213T>C	-	INT	45	0	2	0,979	0,021	Sim
“9”	3'UTR c*132T>C	-	SS	37	2	8	0,872	0,128	Sim

Legenda: Tipo- tipo de alteração : SS –samesense (origina o mesmo aminoácido), MS- missense (origina um aminoácido diferente), INT- intrónica (alteração num intrão); NS- nonsense (origina um codão stop); AA- alelo normal em homozigotia, aa- alelo alterado em homozigotia; Aa- heterozigóticos; p- frequência alélica do alelo normal; q- frequência alélica do alelo alterado; EHW- equilíbrio de Hardy-Weinberg.

6. Alterações encontradas na sequência reguladora

A análise à sequência reguladora permitiu verificar que nenhuma das regiões (alvos de factores de transcrição) seleccionadas para análise se encontrava alterada. Contudo foram identificadas algumas variantes localizadas nos fragmentos analisados, sendo a porção PM2 aquela que apresenta uma maior variabilidade. As variantes identificadas encontram-se descritas na tabela seguinte.

Tabela 8- Alterações encontradas na sequência reguladora das amostras em estudo

Região	Alterações encontradas	Tipo
Promotor1	-64T>C	Heterozigotia
	-216A>G	Heterozigotia
	-266G>A	Heterozigotia
Promotor2	-1969A>G	Heterozigotia
	-1962A>G	Homozigotia
	-1892A>G	Heterozigotia
	-1891A>T	Homozigotia
	-1890G>T	Homozigotia
	-1862T>C	Heterozigotia
	-1793A>G	Heterozigotia
	-1779G>A	Heterozigotia
	-1763G>A	Heterozigotia
	-1751A>G	Homozigotia
	-1706C>T	Heterozigotia
	-1694A>G	Heterozigotia

7. Testes às regiões intrónicas

Foram usados quatro programas diferentes, disponíveis em rede, e cujos resultados se apresentam na Tabela 9. O software ESEfinder3.0 (Cartegni L *et al.*, 2003) permite detectar *Exonic Splicing Enhancers* e *Silencers* (pequenas sequências consensus nos exões que potenciam ou inibem, respectivamente, o *splicing* do pré-mRNA); o Genesplicer (Mihaela Pertea *et al.*, 2001) e o NetGene2 (S.M. Hebsgaard *et al.*, 1991) permitem avaliar se as alterações encontradas (sinónimas e intrónicas) podem ou não afectar o *splicing* normal, originando sítios alternativos, ou afectando a eficiência do *splicing* normal. Foram utilizados dois programas diferentes para a avaliação de *splicing* alternativo com o objectivo de fortalecer os resultados dos testes por eles efectuados e de os intervalar. As sequências (normal e alterada) foram introduzidas no programa conforme as instruções do programa em causa.

Resultados – 1ª Parte

Tabela 9- Resultados dos testes de avaliação do *splicing* para as alterações encontradas: quanto a criarem ou anularem locais de splice (**a**); quanto a criarem *exonic splicing enhancers* ou *silencers* (**b**).

a

Alteração	Genesplicer		NetGene2	
	WT	Alt	WT	Alt
IVS1-23T>C	-	NAS	-	NAS
IVS1+20T>A	-	NAS	-	NAS
IVS2-150T>G	-	NAS	-	NAS
IVS2-42C>T	-	NAS	-	NAS
IVS2-58G>A	-	NAS	-	NAS
IVS3+12G>A	-	NAS	-	NAS
IVS3-41C>T	-	NAS	-	NAS
IVS4-14C>T	-	NAS	-	NAS
IVS5-111T>G	-	NAS	0.80	CLD (0.34)
IVS6+113T>C	-	NAS	-	NAS
IVS6+163T>C	-	NAS	-	NAS
IVS8-14G>C	-	NAS	-	NAS
IVS8+126C>G	-	NAS	0.19	AES-D/ ALA (0.07)/ AES-A
IVS8+213T>C	-	NAS	0.90	AES-D/ CLD(0.32)
c.225A>G	-	NAS	-	NAS
c.246C>T	-	NAS	0.96	AES-D/ CLA (0.32)
c.243C>T	-	NAS	-	NAS
c.495C>G	-	NAS	-	NAS
c.1014G>A	-	NAS	-	NAS
c.1047C>G	-	NAS	-	NAS
c.1086G>C	-	NAS	-	NAS
c.1120C>A	-	NAS	-	NAS

b

Alteração	ESEfinder3.0	
	WT	Alt
c.225A>G	10.69	ESE (6.78)
c.246C>T	-	NAS
c.243C>T	-	NAS
c.495C>G	-	NAS
c.1014G>A	-	NAS
c.1047C>G	-	NAS
c.1086G>C	-	NAS
c.1120C>A	-	NAS

Legenda: NAS- Não afecta o *splicing*.; WT(wildtype)- Valor consensus do local de *splicing* constitutivo; Alt- valor consensus do local alternativo; AES- afecta eficiência do *splicing* (A- local aceitador; D- local dador); ALA- anula local aceitador de *splicing*; CLD- cria local dador.

No que diz respeito à alteração IVS8+126C>G, esta variante afecta a eficiência reduzindo o valor de confiança de 3 locais de *splicing* alternativos (1-0.55 para 0.31; 2- 0.81 para 0.71; 3- 0.87 para 0.82). Por outro lado causa também a anulação de 2 locais de *splicing* alternativos (com valor de 0.07) e a diminuição do valor do local aceitador normal (de 0.19 para 0.17).

A alteração IVS8+213T>C verificou-se ser a que revela mais efeitos ao nível dos valores consensus do *splicing* uma vez que no software NetGene2 evidenciou diversas consequências.

Resultados – 1ª Parte

Para além de introduzir um local dador de splice (com valor de 0.32) afecta o *splicing* no que diz respeito à sua eficiência, nomeadamente diminuindo o valor de 2 locais dadores alternativos (1- 0.55 para 0.52; 2- 0.81 para 0.80) e aumentando o valor de um terceiro local dador de 0.87 para 0.94.

As alterações sinónimas foram também testadas através dos programas GeneSplicer e NetGene2. Os resultados do programa NetGene2 evidenciam a possibilidade da alteração c.246C>T afectar o *splicing*, uma vez que promove uma redução da cotação do local dador normal (0.67 para 0.61) que, apesar de não ser uma redução significativa faz com que a cotação do local alternativo, mais provável de ser utilizado no *splicing*, se torne superior (0.63).

Capítulo 4 - Discussão

8. Alterações nas sequências codificante e reguladora

A hiperplasia supra-renal congénita (CAH) é uma doença autossómica recessiva que afecta em igual frequência ambos os sexos e que se caracteriza por um défice em cortisol o qual se deve à deficiência de alguma(s) das enzimas que participam na sua síntese. A anomalia mais frequente é o défice em 21-hidroxilase ($\approx 90\%$), seguindo-se o défice em 11 β -hidroxilase (5-8%) (Mello M *et al.*, 2002).

Com o objectivo de identificar alterações moleculares que pudessem estar na base da CAH em doentes com suspeita de possuírem deficiência em 11 β -hidroxilase (11 β -OH), procedeu-se à análise do gene *CYP11B1*. Foram seleccionados 52 indivíduos diagnosticados com as três formas da doença (forma clássica, forma virilizante simples e forma não clássica) conforme a distribuição indicada na Tabela 1. Dos indivíduos diagnosticados com a forma clássica dois apresentavam a forma perdedora de sal. Dos doentes diagnosticados com a forma virilizante simples três indivíduos do sexo feminino e um indivíduo do sexo masculino possuíam suspeita de défice misto em 11 β -OH e 21-OH. No grupo de doentes diagnosticados com forma não clássica também havia a possibilidade de existência de défice misto em 5 indivíduos do sexo feminino e num indivíduo do sexo masculino. Estas hipóteses de défice misto surgiram pelo facto do diagnóstico clínico e endocrinológico apresentarem características comuns à deficiência em 11 β -OH (níveis elevados de 11-desoxicortisol) e em 21-OH (17-hidroxiprogesterona e renina elevadas). Os resultados das análises endocrinológicas, que evidenciaram valores elevados de 11-desoxicortisol, 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) e valores reduzidos de cortisol e o diagnóstico clínico sugeriam a possibilidade dos indivíduos com estas características possuírem deficiência em 11 β -OH. Apesar de possuírem valores de 17-OHP elevados este critério, por si só, não é suficiente para estabelecer um diagnóstico em deficiência em 11 β -OH pelo facto da elevação deste intermediário da via de síntese do cortisol também ocorrer nos casos de deficiência em 21-OH (sendo o critério principal para o diagnóstico de deficiência em 21-OH).

Para avaliar a nível molecular a possibilidade de deficiência em 11 β -OH, quer nos casos de suspeita desta deficiência quer nos casos de suspeita de défice misto, foi efectuada a análise molecular do gene *CYP11B1* através das técnicas de PCR e *Nested-PCR* que permitiram a amplificação dos 9 exões dos gene, que foram posteriormente sujeitos a rastreio de alterações por DHPLC (exões 4, 5, 7-8 e 9) e por sequenciação automática (exão 1-2, 3 e 6 bem como restantes exões quando o seu perfil de DHPLC indicava a existência de alteração). Para além da pesquisa de alterações na região codificante do gene foi efectuada igualmente a pesquisa de alterações na

região do promotor, tendo sido realizado um rastreio nos locais Ad1, Ad4 e Ad5 e nas posições -1889 e -1859.

No que diz respeito à sequência codificante foram encontradas alterações nos exões 1, 2, 3, 6 e 7. Todas as alterações encontradas correspondem a alterações sinónimas com excepção da alteração no exão 1 (c.128G>A) que origina alteração de aminoácido (p.Arg43Gln), de uma alteração no exão 6 (c.1066C>T) que origina um codão de terminação (p.Gln356X) e da alteração no exão 7 (c.1132G>A) que origina troca de aminoácido (p.Val378Met). Nos restantes exões não foram identificadas quaisquer alterações. Relativamente às regiões não traduzidas foram encontradas 13 alterações diferentes distribuídas pelos intrões 1, 2, 3, 5, 6 e 8 e região 3'UTR. Estas alterações foram testadas quanto ao facto de poderem afectar o *splicing*, do mesmo modo que as alterações exónicas sinónimas foram testadas quanto à possibilidade de poderem afectar o *splicing*, ESE (*exonic splicing enhancers*) ou ESSE (*exonic splicing silencers*).

A alteração do nucleótido G para A na posição 128 da sequência codificante (c.128G>A; p.Arg43Gln) foi descrita pela primeira vez em 2002 por Amin (HGMD) e origina a troca do aminoácido arginina para o aminoácido glutamina, a qual foi associada ao fenótipo de CAH (HGMD). Esta alteração encontra-se identificada na base de dados do NCBI como sendo um polimorfismo. Trata-se de uma alteração não conservativa uma vez que para além de haver troca de aminoácido nesta posição, os aminoácidos envolvidos possuem estrutura e propriedades diferentes. A arginina é um aminoácido básico (cadeia lateral carregada positivamente em pH neutro) que apresenta um radical com o grupo amino ao passo que o aminoácido glutamina corresponde a um aminoácido polar neutro (a sua cadeia lateral polar não possui cargas, sendo electricamente neutra em pH neutro), cujo radical tende a formar pontes de hidrogénio. Estas diferenças poderão afectar a funcionalidade da proteína, o que poderá estar na base da deficiência da actividade enzimática da 11 β -OH. O doente no qual foi identificada a supracitada mutação tinha sido diagnosticado com a forma virilizante simples da CAH, uma vez que desenvolveu uma virilização precoce, com existência de pêlos púbicos aos três meses de idade.

A segunda mutação encontrada (c.1066C>T; p.Gln356X) foi descrita por Kathleen Curnow em 1993 (HGMD) num indivíduo americano com puberdade precoce, idade óssea avançada, hipertensão e níveis elevados de algumas hormonas (11-desoxicortisol, 11-desoxicorticosterona, androstenediona e testosterona). Esta mutação localiza-se no exão 6 e origina a troca do aminoácido glutamina para um codão de terminação que, presumivelmente origina uma paragem prematura da tradução, o que originará uma proteína mais curta (deficitária nos aminoácidos codificados pelos exões 7, 8, 9 e final do exão 6). Esta redução no tamanho da proteína terá como consequência a perda de função da mesma. As transições C>T são o tipo de mutação pontual mais comum em humanos e pensa-se que surgirão devido a uma desaminação do nucleótido C. A região

Discussão - 1ª Parte

que compreende os exões 6 a 8 é bastante rica em dinucleótidos CG, o que sugere que as mutações C>T ocorrerão com alguma frequência nesta região (Kathleen Curnow, 1993). No caso da mutação C>T encontrada neste estudo (p.Gln356X) sabe-se que tem como efeito anular a actividade da 11 β -OH uma vez que ao originar uma proteína truncada, esta não terá qualquer actividade devido à perda do local heme de ligação ao péptido e o suposto local de ligação ao esteróide (Kathleen Curnow, 1993). O doente no qual a referida mutação foi encontrada corresponde a um indivíduo do sexo feminino diagnosticado com a forma virilizante simples (uma vez que não apresentava efeitos fenotípicos à nascença) desenvolvendo posteriormente na infância clitoromegalia (aos 4 anos de idade) e idade óssea avançada.

A mutação identificada no exão 7 (c.1132G>A; p.Val378Met) corresponde a uma alteração do aminoácido valina para o aminoácido metionina. Trata-se de dois aminoácidos com propriedades semelhantes uma vez que são ambos hidrofóbicos (possuem radicais apolares) mas com estrutura primária tridimensional diferente pelo facto de possuírem tamanhos díspares, a valina é classificada como um aminoácido de tamanho pequeno ao passo que a metionina é classificada como um aminoácido de tamanho grande. Esta diferença estrutural poderá exercer um efeito na conformação da proteína que poderá alterar a sua afinidade para o substrato, podendo afectar a sua actividade enzimática. A mutação p.Val378Met foi identificada num indivíduo do sexo masculino, cujo diagnóstico indicava possuir a forma não clássica da doença (indicado pelas análises endocrinológicas e pelo surgimento de pêlos púbicos aos 4 anos de idade e pêlos axilares aos 2 anos).

Qualquer uma das mutações referidas anteriormente foi encontrada em heterozigotia. Considerando que a CAH devida a mutação no gene *CYP11B1* é uma doença autossómica recessiva, indivíduos portadores não manifestarão a doença, uma vez que sendo portadores de um alelo capaz de originar uma proteína normal a actividade da enzima não seria nula. As alterações encontradas, só por si, não deverão constituir a causa directa da doença, contudo deverão considerar-se diversas hipóteses:

- I. poderão existir mutações no gene *CYP11B1* (presentes em regiões não analisadas no gene) que associadas a cada uma das referidas mutações sejam, em conjunto, responsáveis pelo fenótipo dos doentes;
- II. estas alterações, que afectam somente um dos alelos, poderão ter um efeito quantitativo que eventualmente associado a uma menor expressão génica, possa contribuir para o fenótipo. Esta hipótese é particularmente válida para a mutação que origina o codão de terminação prematuro;

- III. existe também a hipótese de um défice enzimático misto em 11 β -OH e noutra enzima da via de síntese do cortisol, que poderá resultar em níveis baixos de cortisol e em CAH.

Um dado que apoia a segunda hipótese avançada é o facto de dois dos controlos positivos utilizados neste estudo possuírem também as suas mutações em heterozigotia. Segundo informação obtida junto de Lourdes Loidi, os estudos funcionais realizados relativamente às mutações identificadas nas amostras controlo revelaram que a 11 β -OH perde actividade enzimática, o que poderá contribuir para explicar em parte o fenótipo dos doentes.

Por outro lado também poderá ocorrer um efeito cumulativo que perturba a actividade da 11 β -OH, isto é, por si só poderiam não ter um efeito drástico mas quando em conjunto com outras alterações que por si mesmas também não afectem a actividade da proteína, poderão ter um efeito sinérgico. Esta hipótese parece ser também verosímil uma vez que na literatura já foram descritas algumas situações nas quais polimorfismos aparentemente sem efeito nefasto, quando em conjunto causam um fenótipo de deficiência em 11 β -OH (White *et al.*, 2004).

As alterações intrónicas encontradas foram testadas quanto ao facto de causarem *splicing* alternativo, utilizando para esse efeito dois programas disponíveis em rede, Genesplicer e Netgene2.

O programa Genesplicer não identificou nenhuma modificação, no entanto o programa Netgene2 evidenciou algumas diferenças. Isto poderá dever-se a diferenças de algoritmos e dos testes estatísticos utilizados pelos dois programas.

No caso do programa NetGene2, este identificou a criação de um local dador de *splicing* quando a alteração IVS-111T>G está presente. Apesar deste novo local ter uma cotação inferior à do local normal (0.80), apresenta um valor já considerável (0.34), o que poderá exercer alguma influência ao nível da eficiência do *splicing*. Contudo essa influência não deverá ser expressiva. A alteração IVS8+126C>G por sua vez tem resultados um pouco contraditórios, uma vez que apresenta características que poderiam sugerir um reforço dos locais normais de *splicing*, como sejam o facto de promover uma diminuição da eficiência de 3 locais dadores alternativos; de eliminar dois locais aceitadores alternativos e de aumentar o valor do local dador de *splicing* normal (que passa a ter uma maior diferença relativamente ao valor do local alternativo). Por outro lado esta alteração promove também uma ligeira diminuição do local aceitador de *splicing* normal, que passa a ter a mesma cotação que o local alternativo mais eficiente (ambos com cotação de 0.17), o que poderá efectivamente levar a competição entre os dois locais e consequentemente à ocorrência de *splicing* alternativo.

Discussão - 1ª Parte

Quanto à alteração IVS8+213T>C o programa Netgene2 identificou diversas diferenças como consequência a esta alteração nucleotídica. Evidenciou a criação de um local dador de splice (cotação de 0.32 é no entanto bastante inferior à do local normal, pelo que não terá efeito significativo); o aumento da cotação de 3 locais aceitadores alternativos (tornando a cotação de um deles igual à cotação do local normal, 0.19, o que os torna igualmente prováveis de serem utilizados no *splicing*) e o aumento da cotação de um local dador de splice na sequência directa que passa a ser superior (0.94) à do local dador constitutivo (0.90), podendo então este ser utilizado em substituição do local habitual, originando *splicing* alternativo que poderá afectar a proteína uma vez que os referidos locais distam 206 nucleótidos.

Contudo, apesar da eficácia destes programas será necessário efectuar estudos funcionais de modo a verificar o efeito que as diferentes alterações intrónicas podem ter ao nível da actividade da 11β-OH e da eficiência do *splicing*. Uma possibilidade de estudos a efectuar consiste na utilização da técnica de clonagem, clonando num plasmídeo fragmento normal e fragmento com a alteração, utilizando o vector pSPL3, que é específico para o estudo de *splicing* (Church *et al.*, 1994). Posteriormente o vector seria transfectado para células indicadas para permitir a extracção do ARN resultante para análise. Outra hipótese que se poderia seguir para testar os efeitos das alterações intrónicas ao nível do *splicing* seria a utilização de ferramentas informáticas que permitam o estudo da proteómica, isto é, programas que permitam a detecção de eventos de *splicing* alternativo no transcriptoma humano através da utilização de matrizes binárias para cada transcrito e análise da estrutura tridimensional da proteína.

As alterações sinónimas encontradas foram também sujeitas a testes nestes programas (Genesplicer e Netgene2), uma vez que poderão também criar ou anular algum local de splice, e no programa ESEfinder que permitiu verificar se as alterações criavam *exonic splicing enhancers* e *exonic splicing silencers*.

Os testes efectuados através dos programas GeneSplicer e NetGene2 revelaram que apenas a alteração c.246C>T poderá influenciar o *splicing*, uma vez que promove uma diminuição do valor da cotação do local dador de splice normal, tornando o seu valor inferior ao do segundo local dador mais provável de participar no *splicing*. Isto poderá ter como consequência a competição entre estes dois locais, originando situações de *splicing* alternativo.

Os testes efectuados pelo programa ESEfinder demonstraram que de todas as alterações sinónimas testadas apenas uma tinha efeito ao nível dos *exonic splicing enhancers* (ESE), nomeadamente a alteração c.225A>G que cria um ESE. No entanto aparenta não ser muito significativo uma vez que o valor atribuído pelo programa ao ESE criado é 1.5x menor que o valor do ESE com valor mais elevado. Contudo não se exclui a possibilidade deste novo ESE poder

corresponder a um local que perturbe ligeiramente o *splicing* normal. Por outro lado, estudos anteriores referem que este polimorfismo está associado à deficiência em 11 β -OH, apesar de não causar alteração de aminoácido, provavelmente por afectar a transcrição do gene ou o *splicing* do mesmo (White *et al.*, 2004).

Para além dos testes realizados com a finalidade de verificar se as alterações encontradas afectariam o *splicing* normal do gene, foi também testado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) através do teste do qui-quadrado. A lei de Hardy-Weinberg afirma que numa população mendeliana as frequências alélicas permanecem constantes ao longo das gerações, independentemente do alelo ser raro ou frequente. Os resultados obtidos neste teste permitiram verificar que 5 das alterações encontradas não se encontram em equilíbrio de HW, o que significa que algum dos pressupostos desta lei não estará a ser respeitado. Os desvios ao EHW devem-se mais frequentemente a uma das seguintes causas: acasalamento não-aleatório, deriva genética, selecção natural, uniformidade dentro das populações, aumento de homozigotias à custa das heterozigotias e efeito Wahlund (frequências alélicas e genotípicas que, embora se mantenham dentro de cada sub-população, não se mantêm se as sub-populações forem consideradas como uma única população) (<http://dreyfus.ib.usp.br/bio212/aulas>).

No caso das alterações IVS4-14C>T, IVS6-20A>G e IVS8+126C>G verifica-se que todos os indivíduos analisados são homozigóticos (um para o alelo variante e todos os outros para o alelo normal), o que sugere que o desvio ao EHW se poderá dever a uma fixação das homozigotias, com consequente redução das heterozigotias. A mesma conclusão se poderá tirar em relação à alteração c.1120C>A (p.Arg374Arg), uma vez que de todos os indivíduos analisados apenas um possuía os alelos C e A em heterozigotia.

Quanto à alteração c.225A>G (pLeu75Leu) o desvio ao EHW já não terá a mesma causa, uma vez que 65% dos indivíduos analisados possuem os alelos A e G em heterozigotia.

Estes desvios ao EHW poderão dever-se ao efeito de Wahlund, uma vez que os indivíduos sujeitos a análise eram provenientes de várias regiões do país, podendo haver frequências diferentes em regiões diferentes. Um eventual apoio a esta suposição é a hipótese sugerida da incidência da CAH devida a deficiência em 11 β -OH ser maior na população portuguesa devido à possível fixação de alelos através dos judeus Sefarditas. Poderá haver uma maior frequência de alelos variantes em determinadas regiões nas quais a concentração de judeus possa ter sido mais significativa. Para além disto, os judeus tendem a constituir comunidades restritas, não sendo muito comuns casamentos com indivíduos não pertencentes à comunidade, o que viola o pressuposto dos cruzamentos aleatórios, podendo assim levar a um aumento da fixação de determinados alelos. Contudo, não se pode retirar nenhuma conclusão taxativa dos resultados

Discussão - 1ª Parte

obtidos no teste ao EHW, uma vez que o número de indivíduos sobre os quais o estudo incidiu é reduzido e a amostra seleccionada não abrange toda a população portuguesa (pelo facto de apenas se terem analisado indivíduos com CAH).

Do grupo de doentes seleccionados para a realização deste estudo, num pequeno grupo suspeitava-se que pudessem possuir défice misto em 21-OH e 11 β -OH. Num desses doentes foi encontrada uma mutação no gene que codifica a enzima 21-OH mas não foi identificada nenhuma alteração em *CYP11B1* que pudesse justificar uma deficiência em 11 β -OH. Numa publicação recente, em que também havia suspeita dos indivíduos em estudo possuírem défice misto, chegaram à conclusão que os indivíduos em causa possuíam apenas um défice em 21-OH, isto é, apesar de endocrinologicamente possuírem características que sugerem ambas as deficiências enzimáticas, geneticamente possuíam apenas defeito no gene que codifica a enzima 21-OH. Como explicação, a este facto, foi sugerida a possibilidade de ser a deficiência em 21-OH a mimetizar a deficiência em 11 β -OH, na medida em que ao promover o aumento da concentração de androgénios no interior da glândula supra-renal, estes vão actuar como pseudo-substratos para a enzima 11 β -OH (Tonetto-fernandes, 2008). Já em 2000 Gillis D. havia avançado a hipótese da deficiência em 11 β -OH se dever a um evento secundário, igualmente devido a supressão da sua actividade devido ao excesso de androgénios (Gillis D *et al.*, 2000). Esta parece então ser a hipótese mais provável para explicar o caso deste doente que se suspeitava possuir défice misto e se verificou possuir apenas alterações genéticas em CYP21A2 (gene que codifica a 21-OH).

Nos outros casos de suspeita de défice misto não foi encontrada nenhuma mutação em CYP21A2 nem em *CYP11B1* que justificassem o fenótipo observado. Poderá, nestes casos, haver alguma mutação noutra gene envolvido na biossíntese do cortisol ou algum efeito epigenético que esteja na base dos valores endocrinológicos obtidos nestes doentes e consequentes efeitos fenotípicos.

A análise molecular efectuada à região do promotor designada por 1, nomeadamente aos locais Ad1, Ad4 e Ad5, que já foi demonstrado anteriormente serem locais essenciais à regulação da transcrição do gene através da via da cAMP, não revelou qualquer alteração nestes locais. Estes resultados sugerem que, no âmbito dos domínios estudados, alterações nos locais reconhecidos por SF-1 e envolvidos na via de tradução de sinal do cAMP, não deverão estar associados aos efeitos fenotípicos patológicos da CAH nos doentes analisados. De igual modo foi efectuada um rastreio às posições polimórficas -1889 e -1859. Este rastreio não revelou a presença das alterações associadas à diminuição da actividade enzimática, estando presentes em todas as amostras os alelos selvagens. Foram no entanto encontradas algumas variantes na região do

Discussão - 1ª Parte

promotor designada por 2 (que inclui as posições -1889 e -1859) que, por estarem presentes em quase 100% das amostras analisadas incluindo o controlo normal, pode-se colocar a hipótese de serem polimorfismos sem efeito.

Através da análise dos resultados verificou-se que duas das alterações identificadas poderão estar associadas, constituindo haplótipos, sendo eles c.225G e c246T, IVS5-111G e IVS6+113C. Esta possibilidade parece ser plausível uma vez que quando uma das alterações estava presente no indivíduo, o mesmo se verificava com a outra. (ver Tabela 7) e visto que em estudos anteriores se constatou que determinados haplótipos estão associados à diminuição da actividade da 11 β -OH (Ganapathillai *et al.*, 2004), estas possíveis associações entre os alelos poderão ter algum efeito ao nível da actividade da 11 β -OH.

Algumas das mutações encontradas, quer intrónicas quer exónicas não se encontram ainda descritas, como é o caso da mutação *missense* encontrada no exão7 (ver mutações descritas na Tabela1 dos anexos). Seria de grande importância a pesquisa de mutações em indivíduos da população em geral para que se possa verificar se as mesmas se tratam de polimorfismos. Nenhuma das mutações encontradas, com excepção das alterações c.225 A/G e c246 C/T que já estão descritas como polimorfismos, foram encontradas no controlo negativo (indivíduo saudável). Isto sugere que as alterações encontradas que não estão descritas podem não ser polimórficas, justificando a necessidade de um estudo a nível da população. Das alterações exónicas encontradas que já se encontram descritas, são consideradas polimorfismos as seguintes: c.128G>A (p.Arg43Gln); c.225A>G (p.Leu75Leu); c.246C>T (p.Asp82Asp); c.243C>T (p.Tyr81Tyr); c.1086G>C (p.Leu362Leu).

2ª Parte

Capítulo 5 - Introdução

10. Quimeras *CYP11B2/B1*

Tal como referido anteriormente, pode ocorrer *crossing-over* desigual entre os genes *CYP11B1* e *CYP11B2* originando quimeras *CYP11B2/B1*, as quais originam um défice em 11 β -OH associado a um fenótipo de CAH (ver Figura 4, Anexos). Tendo em conta que o conhecimento relativamente a estas quimeras ainda não é muito vasto e dado que, tanto quanto se sabe, ocorrem raramente, tendo sido descrito pela primeira vez um caso em 2001 por Hampf (Hampf *et al.*, 2001), tem interesse desenvolver um diagnóstico rápido que possa ser usado como método de rastreio em doentes com CAH, nos quais se suspeite da referida alteração estrutural.

Tornou-se assim importante a construção de um gene quimérico, tendo por objectivo usar esta construção como controlo positivo na detecção de quimeras *CYP11B2/B1*, aquando da análise de amostras de doentes com CAH. Para esse efeito utilizou-se a técnica de *Overlap Extension PCR* (OE-PCR). Esta metodologia foi publicada pela primeira vez em 1988 por Higuchi *et al.*, a qual consiste num processo *in vitro* baseado em PCR usado para inserção de mutações pontuais em pontos específicos num fragmento de ADN e para produzir segmentos de polinucleótidos (a partir de iniciadores adequados) originando-se deleções num segmento de ADN (Higuchi *et al.*, 1988; Urban *et al.*, 1997). Até esta data o método usado para a realização de mutagéneses dirigida consistia no crescimento e digestão com enzimas de restrição de plasmídeos recombinantes. A utilização da técnica de PCR veio trazer vantagens em relação à preparação de fragmentos através das enzimas de restrição. Enquanto que a técnica convencional demorava dias a realizar, necessitava de culturas bacterianas, extracções com solventes orgânicos, precipitações e electroforeses, a nova técnica de PCR apenas demora algumas horas e possui um número reduzido de passos na sua realização (Higuchi *et al.*, 1988). Neste primeiro trabalho realizado por Higuchi os autores conseguiram obter a fusão entre a sequência específica de ligação da RNA polimerase de *E.coli* a um promotor e demonstraram que a técnica de PCR pode substituir os métodos de clonagem em bactérias para produzir *in vitro* fragmentos que contenham mutações.

Concluíram que o método de OE-PCR deve ser capaz de colocar qualquer deleção, inserção ou substituição em qualquer lugar ao longo de um fragmento de ADN. Por estas razões esta foi técnica utilizada para gerar um gene quimérico *CYP11B2/B1*, o qual poderá ocorrer em doentes com CAH.

11. Objectivo

Construção de um gene quimérico *CYP11B2_CYP11B1* recorrendo à técnica de *Overlap Extension PCR* para posterior utilização como controlo positivo na detecção de quimeras.

Capítulo 6 – Material e Métodos

12. Desenho dos primers para a construção do gene quimérico

Foram desenhados dois conjuntos de iniciadores: um primeiro conjunto em que o primer directo emparelha com o gene *CYP11B2* (H1F) e o primer reverso possui dois segmentos distintos, um que emparelha com o gene *CYP11B2* e outro que não emparelha com nenhum dos genes (H1R). O segundo conjunto de primers utilizados consistiu num primer directo que também é constituído por dois segmentos distintos, um que emparelha com o gene *CYP11B1* e outro que é complementar ao segmento que não emparelha do primer referido no primeiro conjunto (H2F), e o primer reverso que emparelha com o gene *CYP11B1* (E6-9R) (ver Figura 6.1). Alternativamente ao primer H1F, foi desenhado outro primer (I2F) que emparelha com a porção inicial do gene *CYP11B2*, originando um fragmento de tamanho menor do que o que é originado por H1F (ver Figura 6.2). Procedeu-se a este passo pelo facto do intrão dois ser de tamanho muito elevado, o que poderia dificultar posteriormente a fusão dos dois fragmentos, uma vez que esta técnica é geralmente utilizada com fragmentos de menores dimensões.

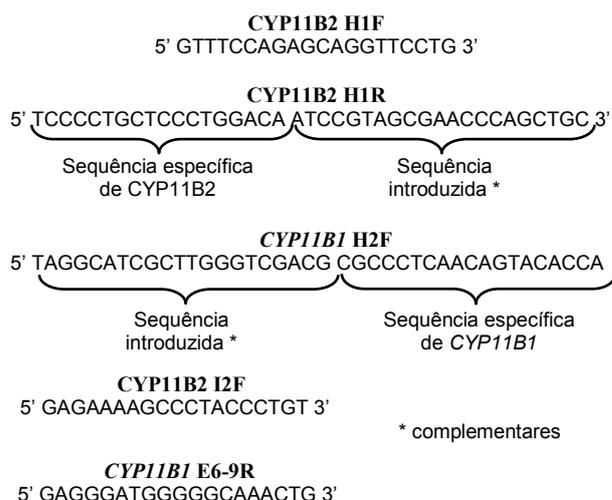


Figura 6.1- Iniciadores utilizados na construção do gene quimérico.

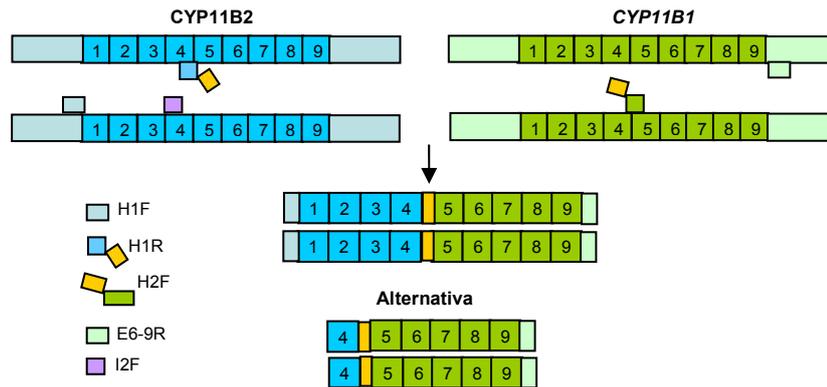


Figura 6.2- Locais de emparelhamento dos primers desenhados para o OE-PCR. Os números de 1 a 9 que se visualizam no esquema pretendem representar os exões dos respectivos genes.

13. Construção do gene quimérico *CYP11B2/B1*

Para a construção do gene quimérico *CYP11B2/B1* foi utilizada a técnica de *Overlap Extension PCR*, para permitir a fusão dos dois genes, deleccionando a sequência nucleotídica que se encontra entre os mesmos.

Realizou-se uma primeira reacção de PCR para obtenção dos dois segmentos pretendidos dos dois genes (em tubos distintos), obtendo-se nesta fase três fragmentos diferentes, A (H1F + H1R), B (H2F + E6-9R) e C (I2F + H1R). O fragmento A obtido nesta primeira fase do OE-PCR tinha uma dimensão de 3480 nucleótidos (nt), o fragmento B possuía uma dimensão de 2280ntC e o fragmento C era constituído por 1200nt. Posteriormente juntaram-se os produtos obtidos para realização de nova reacção de amplificação enzimática, em que os produtos misturados foram A+B e C+B. Esta segunda reacção levaria à fusão dos dois genes no ponto correspondente à zona dos primers que foi introduzida (Figura 6.1) que, portanto, não emparelhava com nenhum dos genes, mas que permitia o emparelhamento dos primers, visto esta região ser complementar entre os primers. (ver Figura 6.3). Consoante os produtos misturados o tamanho do gene híbrido obtido seria de 5760nt, no caso da reacção A+B, ou 3480nt no caso da reacção C+B.

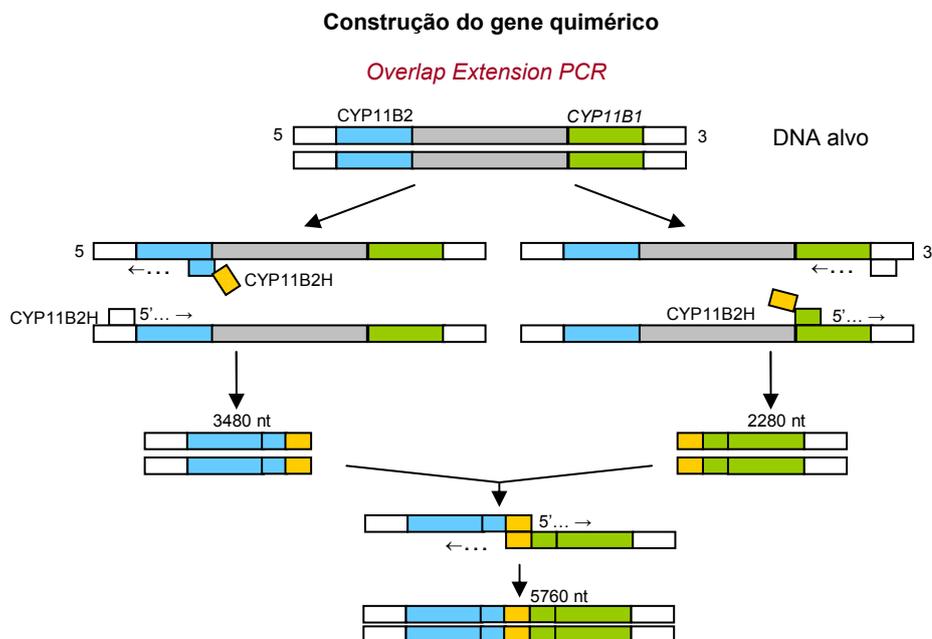


Figura 6.3- Representação do método de OE-PCR aplicado às quimeras *CYP11B2_CYP11B1*, nomeadamente ao caso da reacção A+B. A reacção A+C é em tudo semelhante com a excepção dos tamanhos dos fragmentos que se encontram referidos na figura.

As condições de reacção bem como os reagentes utilizados nos diferentes passos encontram-se descritos na tabela seguinte.

Tabela 10- Condições e reagentes do OE-PCR.

PCR Pré-Nested	Primers	Outros reagentes	Reacção
Frag.A	4µl H1F (100ng/µl) + 4µl H1R (100ng/µl)	Kit Expand High Fidelity da Roche (3µl Tampão2; 0.4µl Taq 3.5U/µl; 1.2µl MgCl ₂ 25mM) + 0.5 µl dNTP's (25mM) +4µl ADN (100ng/µl) +H ₂ O (para perfazer volume final)	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 2 min • 94°C 30s • 58°C 1min • 68°C 3min (10x) <ul style="list-style-type: none"> • 94°C 30s • 58°C 1min • 72°C 3min c/inc. 5s • 68°C 7min (20x)
Frag.B	4µl H2F (100ng/µl) + 4µl E6-9R (100ng/µl)	Kit Expand High Fidelity da Roche (3µl Tampão2; 0.4µl Taq 3.5U/µl;) + 0.5 µl dNTP's (25mM) +4µl ADN (100ng/µl) +H ₂ O (para perfazer volume final)	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 2 min • 94°C 30s • 60°C 1min • 72°C 1min30s (10x) <ul style="list-style-type: none"> • 94°C 30s • 60°C 1min • 72°C 1min30s c/inc. 5s • 72°C 7min (20x)
Frag.C	4µl I2F (100ng/µl) + 4µl H1R (100ng/µl)	Kit Expand High Fidelity da Roche (3µl Tampão2; 0.4µl Taq 3.5U/µl; 1.2µl MgCl ₂ 25mM) + 0.5 µl dNTP's (25mM) +4µl ADN (100ng/µl)	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 2 min • 94°C 30s • 58°C 1min • 68°C 3min (10x)

		+H ₂ O (para perfazer volume final)	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 30s • 58°C 1min • 68°C 3min c/inc. 5s } (20x) <ul style="list-style-type: none"> • 68°C 7min
OE-PCR		Kit Expand High Fidelity da Roche (3µl Tampão2; 0.4µl Taq 3.5U/µl; 1.2µl MgCl ₂ 25mM) + 0.5 µl dNTP's (25mM) +4µl ADN (100ng/µl) +H ₂ O (para perfazer volume final)	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 5 min • 94°C 1min • 60°C 1min • 68°C 8min } (10x) <ul style="list-style-type: none"> • 94°C 1min • 60°C 1min • 68°C 8min c/inc. 5s • 68°C 10min } (20x)

Deste modo, obter-se-ia a fusão dos dois genes, com consequente deleção da sequência de aproximadamente 40kb que se encontra entre estes. Posteriormente à obtenção do gene quimérico, este poderá ser clonado num plasmídeo, com a finalidade de estar disponível para futuras ampliações.

Capítulo 7 – Resultados e Discussão

14. Resultados da construção do gene quimérico *CYP11B2_B1*

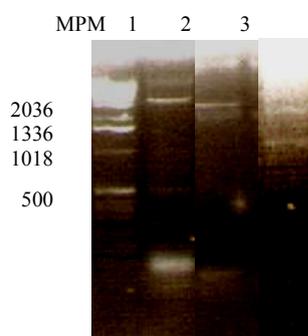


Figura 7.1- Fotografia de gel de agarose com os fregmentos obtidos na primeira fase do OE-PCR. MPM- marcador de peso molecular de 1kb; Linha1- Fragmento A; Linha2- Fragmento B; Linha3- Fragmento C.

15. Discussão

A ocorrência de *crossing-over* desigual entre os genes *CYP11B1* e *CYP11B2* pode originar dois tipos de quimeras (*CYP11B1/B2* ou *CYP11B2/B1*) sendo que as quimeras *CYP11B2/B1* originam um défice em 11β-OH associado a um fenótipo de CAH. Contudo estas quimeras ocorrem raramente e são de difícil detecção. Por esse motivo surgiu a perspectiva de proceder à construção de um gene quimérico de modo a este poder ser utilizado posteriormente como controlo positivo em diagnóstico. Para esse

efeito recorreu-se à técnica de OE-PCR. Inicialmente procedeu-se à reacção de PCR que permitiria obter os fragmentos A e B separadamente, contudo a amplificação do fragmento A foi mais difícil, tendo sido apenas possível após varias tentativas variando as condições de PCR.. A dificuldade de obtenção deste fragmento poderá estar relacionada com o seu elevado tamanho, 3480nt (cerca de 1000nt maior que o fragmento B cuja obtenção foi conseguida à terceira tentativa). Durante as várias tentativas de obtenção do fragmento A fez-se variar a concentração de MgCL₂ adicionada à mistura de reacção, aumentando o volume a adicionar, o mesmo tendo sido realizado com a quantidade de Taq e ADN. Após se verificar que o aumento das concentrações dos reagentes não teve nenhum efeito na eficiência da reacção de amplificação, procedeu-se à diminuição da temperatura de *annealing* o que também não facilitou a amplificação. Posteriormente diminui-se um pouco a temperatura da fase de extensão (de 72° para 68°), bem como o aumento do tempo em que ela deveria decorrer (de 1min30s para 3min), situação que permitiu então obter o fragmento A.

Depois de obtidos os dois fragmentos procedeu-se à segunda fase do OE-PCR, etapa que permitiria a fusão dos dois fragmentos. Por razões relacionadas com a quantidade de produto de PCR obtido na primeira fase (PCR com baixo rendimento) apenas houve possibilidade de efectuar duas tentativas de fusão que não foram conseguidas.

Devido à dificuldade de obtenção do fragmento A, foi utilizado outro iniciador que permitia obter um fragmento de menor dimensão (1200nt), fragmento C. A menor dimensão deste fragmento devia-se ao facto deste não incluir o intrão 2 que possui uma elevada dimensão. Após obtenção deste terceiro fragmento, foram realizadas duas tentativas de fusão C+B. Contudo, também estas tentativas não tiveram sucesso, não tendo sido obtido o gene quimérico.

O insucesso desta experiência poderá ter-se devido ao facto do produto de fusão que era esperado ser de tamanho muito elevado, uma vez que a técnica de OE-PCR é habitualmente utilizada com fragmentos de menores dimensões (Hurban *et al.* .,1997). No entanto seria necessária a realização de mais tentativas para proceder à optimização da reacção de OE-PCR.

Conclusões Gerais

Os resultados obtidos neste estudo permitiram verificar que de todos os doentes que inicialmente se suspeitava possuírem deficiência em 11 β -hidroxilase, apenas três possuem mutações que eventualmente poderão ser associadas à deficiência enzimática. Dois desses doentes possuem mutações *missense* (p.Arg43Gln e p.Val378Met), que ao originarem a alteração de um aminoácido poderão afectar a conformação e/ou actividade da enzima. O terceiro indivíduo possui uma mutação que origina um codão de terminação (p.Gln356X) e conseqüentemente, presumivelmente, deverá originar uma proteína truncada. Contudo as três mutações estão presentes em heterozigotia, o que não é suficiente para suprimir a actividade enzimática, uma vez que a CAH se trata de uma doença autossómica recessiva. Existe no entanto a possibilidade de, apesar de se encontrarem em heterozigotia, poderão estar associados aos efeitos fenotípicos observados nos doentes em questão, por poderem causar uma redução quantitativa da proteína estruturalmente normal e, em conjunto com outras alterações, originarem um efeito sinérgico. Para um melhor esclarecimento do efeito destas mutações *missense* seria oportuna a realização de estudos funcionais nos quais se analisasse a actividade enzimática da proteína resultante *in vitro*.

Na grande maioria dos doentes em estudo foram encontradas varias alterações sinónimas e intrónicas. Ambos os tipos foram testados quanto ao facto de poderem afectar o *splicing* normal, tendo-se verificado pela análise dos dados fornecidos pelos programas utilizados que as alterações mais prováveis de alterarem o *splicing* são as alterações IVS8+126C>T e IVS8+213T>C. Contudo seria de grande importância a realização de estudos funcionais envolvendo estas alterações, de modo a poder confirmar ou refutar esta possibilidade.

No que diz respeito às alterações *missense*, seria relevante avaliar se as mesmas ocorrem em aminoácidos conservados entre espécies para a mesma família de proteínas uma vez que alterações de aminoácidos conservados são indicativas de que o aminoácido é importante, e se alterado, aumentam as hipóteses de se tratar de uma mutação associada a doença.

Este estudo debruçou-se não só na região codificante do gene como também na região do promotor, a fim de identificar possíveis alterações que inviabilizassem a transcrição do gene. O rastreio da região do promotor centrou-se nas regiões Ad1, Ad4 e Ad5, bem como nas posições -1889 e -1859. Este rastreio evidenciou a ausência de alterações em qualquer das regiões mencionadas, assim como a ausência das alterações das posições -1889 e -1859 que se encontram associados à diminuição da actividade enzimática da 11 β -OH, estando presente em todas as amostras o alelo normal.

Em nenhum dos doentes em análise foi encontrada a mutação R448H (p.Arg448His), que é considerada como sendo a mutação mais comumente detectada nos Judeus Oriundos de

Marrocos. Seria de esperar que, havendo a possibilidade de ter ocorrido a fixação de alelos provenientes da comunidade judaica que se manteve em Portugal, fosse encontrada esta mutação bem como uma maior frequência de mutações, como acontece na população dos judeus Sefarditas, que outrora migraram da Península Ibérica para Marrocos. Por outro lado, os desvios ao EHW verificados sugerem que poderá haver algum efeito de fixação de alelos em determinadas sub-populações, o que poderá estar relacionado com os Judeus Sefarditas que outrora se fixaram em Portugal. Contudo, não é possível retirar nenhuma conclusão relativamente ao possível efeito fundador, uma vez que o número de indivíduos que constituíram a amostra não foi suficientemente elevado nem se assentou apenas nos locais onde a comunidade judaica estaria presente.

Seria no entanto interessante a realização de um estudo com um número superior de amostras obtidas de indivíduos com deficiência em 11β -OH comprovada, fundamentada nos doseamentos de 11-desoxicortisol; desoxicorticosterona, cortisol; 17-OHP e androgénios supra-renais e, eventualmente, em novos biomarcadores. Com este estudo demonstra-se que o diagnóstico clínico de CAH sustentado por uma suspeita de deficiência em 11β -OH sem os doseamentos referidos, não é confirmado pela avaliação molecular. Os doseamentos endocrinológicos referidos são indispensáveis e complementarmente, requerem que se conheça os níveis normais de referência para indivíduos normais na população portuguesa e em função da idade e sexo dos mesmos. Este segundo ponto assume alguma importância na medida em que actualmente os valores considerados normais são baseados em estudos efectuados noutras populações (valores que poderão não corresponder ao que acontece na população portuguesa) ou que poderão variar segundo o laboratório onde os doseamentos são efectuados.

Seria igualmente importante a realização de estudos funcionais das alterações encontradas neste estudo, a fim de se poderem caracterizar melhor os seus efeitos, para proporcionar a confirmação ou não a suspeita do diagnóstico clínico. Conseguindo-se um diagnóstico molecular, tal permitirá um melhor acompanhamento e aconselhamento dos doentes com CAH devida a deficiência em 11β -OH.

A análise molecular poderá também ser expandida a outros genes.

Referências

1. AL-JURAYYAN, N. **Congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency in Saudi Arabia: clinical and biochemical characteristics.** Acta Paediatrica. 1995. 84:651-4.
2. BARR, Marianne [et al.]. **Functional effects of genetic variants in the 11 β -hydroxylase (CYP11B1) gene.** Clinical Endocrinology. 2006. 65: 816-825
3. BARR, Marianne [et al.]. **Polymorphic Variation in the 11 β -Hydroxylase Gene Associates With Reduced 11 β -Hydroxylase Efficiency.** Hypertension. 2006. 49: 113-119
4. CINGOZ, S. [et al.]. **Familial pericentric inversion chromosome 3 and R448C mutation of CYP11B1 gene in Turkish kindred with 11 beta-hydroxylase deficiency.** Journal of Endocrinological Investigation. 2007. 30: 285-291
5. CURNOW, Kathleen M. [et al.]. **Mutations in CYP11B1 causing congenital adrenal hyperplasia and hypertension cluster in exons 6,7 and 8.** Proceedings of National Academy of Sciences USA 1993;90:4552-6.
6. ELIANY, Marc - **A brief social history of the jews in morocco.** : Mind and Soul, Jewish Thinking in Morocco.
7. FERRARI P. **Genetics of the mineralocorticoid system in primary hypertension.** Current Hypertension Reports. 2002. 4:18-24.
8. FISHER, A. [et al.] **Effects of 18-hydroxylated steroids on corticosteroid production by human aldosterone synthase and 11 β -hydroxylase.** Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2001. 86:4326-9.
9. GANAPATHIPILLAI, Santhirasekaran [et al.]. **CYP11B2-CYP11B1 Haplotypes Associated With Decreased 11 β -Hydroxylase Activity.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2005.: 90 1220-1225
10. GBETH, Grupo De Estudos De Tumores Hereditários - **Dhplc – cromatografia líquida de alta performance denaturante.** : Newsletter 2006, 2008. Volume 04 Número 16.
11. GONCALVES, João; FRIAES, Ana; MOURA Luís, **Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency.** Expert Revision Molecular Medicine; 2007. Vol 9. (11):1-23.
12. GRIFFITHS, Anthony - **Introduction to genetic analysis.** New York : W. H. freeman and company, 2005. ISBN 0-7167-4939-4. 782p.
13. HAMPF, M. [et al.]. **Unequal Crossing-Over between Aldosterone Synthase and 11 β -Hydroxylase Genes Causes Congenital Adrenal Hyperplasia.** Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2001. 86:4445–4452
14. HIGUCHI, R.; KRUMMEL, B.; SAIKI, R. K. **A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions.** Nucleic Acid Research. 1988. Vol.16 NO15 7351-7367
15. ISE, T. [et al.]. **CYP11B1/CYP11B2 gene in glucocorticoid insuppressible familial hyperaldosteronism.** Clinical Endocrinology. 2001. 55, 131±134
16. JOEHRER Karin [et al.]. **CYP11B1 mutations causing non-classic adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency.** Human Molecular Genetics 1997;6(11):1829-34.
17. KEAVNEY, Bernard [et al.] **Genetic Variation at the Eocus encompassing 11- β -Hydroxylase and Aldosterone Synthase Accounts for Heritability in Cortisol Precursor (11-Deoxycortisol) Urinary Metabolite Excretion.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2004. 90 1072-1077
18. Leticia Lotufo. **Fisiologia da Adrenal.** www.fisfar.ufc.br
19. LEVINE, L.S. [et al.]. **New studies of the 11 β -hydroxylase and 18-hydroxylase enzymes in the hypertensive form of congenital adrenal hyperplasia.** Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1980. 50:258-63.
20. MELLO M. [et al.]. **11 β -hydroxylase deficiency.** Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabolismo 2004. 48; n°5
21. MELLO, M. [et al.]. **Bases Moleculares da Hiperplasia Adrenal Congênita.** Arquivo Brasileiro Endocrinologia e Metabolismo. 2002. 46: 457-477
22. MERKE Deborah P. [et al.]. **Novel Mutations in Congenital Adrenal Hyperplasia due to Steroid 11 β -Hydroxylase Deficiency.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1998. 83:270-273
23. MORNET, E [et al.]. **Characterization of two genes encoding human steroid 11 β -hydroxylase (P450(11)beta).** Journal of Biological Chemistry. 1989. 264:20961-7.

24. PAPERNA, Tamar [*et al.*]. **Mutations in *CYP11B1* and Congenital Adrenal Hyperplasia in Moroccan Jews.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2005. 90:5463-5465
25. PASCOE L. [*et al.*]. **Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism results from hybrid genes created by unequal crossovers between *CYP11B1* and *CYP11B2*.** Proceedings of National Academy of Sciences USA. 1992. 89:8327-31.
26. PERTEA, Mihaela; LIN, Xiaoying; SALZBERG, Steven L. **GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction.** Oxford University Press, 2001. 29:1185-1190
27. **Pathophysiology of The Endocrine System.** www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine
28. QUINN S.J.; CORNWALL, M.C.; WILLIAMS, G.H. **Annual Reviews Physiology** .1988. 50:409-26
29. RIEDL, Stefan [*et al.*]. **A homozygous L299P Mutation in the *CYP11B1* Gene Leads to Complete Virilization in 46,XX Individual with 11-Beta-Hydroxylase Deficiency.** Horm. Res. 2008. 70:145-149
30. ROSLER, A.; COHEN, H. **Absence of steroid biosynthetic defects in heterozygote individuals for classic 11 beta-hydroxylase deficiency due to a R448H mutation in the *CYP11B1* gene.** Journal of Clinical Endocrinology Metabolism. 1995. 80:3771-3
31. SKINNER, C.A. [*et al.*] **Characterization of polymorphisms at the 11 β -hydroxylase (*CYP11B1*) locus.** Ann. Hum. Genet, 1998. 62: 181-183
32. TONETTO-FERNANDES, Vania [*et al.*]. **Serum 21-Deoxycortisol, 17-Hydroxyprogesterone, and 11-Deoxycortisol in Classic Congenital Adrenal Hyperplasia: Clinical and Hormonal Correlations and Identification of Patients with 11 β -Hydroxylase Deficiency among a Large Group with Alleged 21-Hydroxylase Deficiency.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2005. 91:2179-2184
33. URBAN, A.; NEUKIRCHEN, S.; JAEGER, K. E. **A Rapid And Efficient Method For Site-Directed Mutagenesis Using One-Step Overlap Extension PCR.** Nucleic Acid Research. 1997. Vol25, NO11 2227-2228
34. WANG, Xiao-Li [*et al.*]. **Transcriptional Regulation of Human 11 β -Hydroxylase (*hCYP11B1*).** Endocrinology. 2000.141: 3587-3594
35. WHITE Perrin C.; RAINEY, William E. **Editorial: Polymorphisms in *CYP11B* Genes and 11 β -Hydroxylase Activity;** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2005; 90 :1252-1255
36. WHITE, Perrin C. [*et al.*] **A mutation in *CYP11B1* (Arg-448>His) associated with steroid 11 β -hydroxylase deficiency in jews of Moroccan origin.** J Clinical Investigation 1991;87:1664-7
37. WHITE, Perrin C.; CURNOW, Kathleen M.; PASCOE, L. **Disorders of steroid 11beta-hydroxylase isozymes.** Endocrinology Reviews. 1994.15:421-38

Anexos

Quadro 1- quadro resumo dos feitos fenotípicos das diferentes formas de gravidade da CAH

Sexo	Forma clássica	Forma virilizante Simples	Forma não Clássica	Outros efeitos
Ambos	Efeitos graves à nascença, com insuficiência da supra-renal, virilização e perdas de sal (raro)	Forma moderada a que se manifesta na infância	Forma menos grave que se manifesta a partir da adolescência	- Acne e hiperpigmentação - Crescimento acelerado e maturação esquelética avançada - Estatura adulta baixa
Feminino	Genitais externos ambíguos	Clitoromegalia, taxa de fertilidade reduzida (anatomia genital anormal, estenose vaginal, ovulação reduzida)	oligoamenorreia, hirsutismo e infertilidade	- Puberdade precoce - Hiponatremia (Na ⁺), hipercalemia (K ⁺), hipoglicémia nos casos de perda de sal
Masculino	Genitais externos normais	Crescimento fático, massas de tecido supra-renal nos testículos (que podem causar oligospermia ou azoospermia e infertilidade)	Infertilidade	- hipertensão (60%) Dificuldade de resposta a situações de stress físico (doença ou lesão)

Tabela 1- Mutações *missense* e *nonsense* já descritas no gene *CYP11B1*. (tabela adaptada da base de dados HGMD e NCBI)

Exão	Alteração	Alteração de a.a.	Nº codão	Fenótipo	Referência
1	G-A	Cys-Tyr	10	Não referido	rs6405_ - NCBI
1	gCAA-TAA	Gln-Term	19	Def. 11β-OH	Merke (1998)
1	gCCC-TCC	Pro-Ser	42	Def. 11β-OH	Joehrer (1997)
1	CGG-CAG	Arg-Gln	43	Hiperplasia	Amin (2002)
1	G-A	Asp-His	63	Não referido	rs5282 - NCBI
2	CCG-CTG	Pro-Leu	94	Def. 11β-OH	Grigorescu Sido (2005)
2	TGG-TAG	Trp-Term	116	Def. 11β-OH	Naiki (1993)
2	TGGg-TGC	Trp-Cys	116	Def. 11β-OH	Krone (2005)
2	cGTG-ATG	Val-Met	129	Hiperplasia	Geley (1996)
3	gAAT-CAT	Asn-His	133	Def. 11β-OH	Joehrer (1997)
3	cCGA-TGA	Arg-Term	141	Def. 11β-OH	Solyom (2001)
3	gAAG-TAG	Lys-Term	174	Def. 11β-OH	Curnow (1993)
3	G-C	Met-Ile	160	Não referido	rs5287 - NCBI
4	TGG-TAG	Trp-Term	247	Hiperplasia	Geley (1996)
4	C-T	Thr- Ile	248	Não referido	rs34620645 - NCBI

4	T-G	Phe-Leu	257	Não referido	rs5288 - NCBI
4	cCAG-TAG	Gln-Term	265	Hiperplasia	Kuribayashi (2003)
4	cGGT-CGT	Gly-Arg	267	Hiperplasia	Skinner (1996)
5	GGT-GAT	Gly-Asp	267	Hiperplasia	Skinner (1996)
5	G-A	Ser-Asn	281	Não referido	rs5291_- NCBI
5	C-G	Leu-Val	293	Não referido	rs5292_NCBI
5	CTG-CCG	Leu-Pro	299	Def. 11 β -OH	Krone (2005)
5	GCC-GTC	Ala-Val	306	Def. 11 β -OH	Lee (2005)
5	aGGG-CGG	Gly-Arg	314	Def. 11 β -OH	Kuribayashi (2005)
5	ACG-AGG	Thr-Arg	318	Def. 11 β -OH	Merke (1998)
5	ACG-ATG	Thr-Met	318	Def. 11 β -OH	Curnow (1993)
5	cACG-CCG	Thr-Pro	318	Def. 11 β -OH	Lee (2005)
6	ACG-ATG	Thr-Met	319	Def. 11 β -OH	Joehrer (1997)
6	gTTT-GTT	Phe-Val	321	Hiperplasia	Amin (2002)
6	GCT-GTT	Ala-Val	331	Hiperplasia	Geley (1996)
6	gCAG-TAG	Gln-Term	338	Def. 11 β -OH	Curnow (1993)
6	gCGC-AGC	Arg-Ser	341	Hiperplasia	Amin (2002)
6	G-A	Ala-Thr	348	Não referido	rs6407 - NCBI
6	cCAG-TAG	Gln-Term	356	Def. 11 β -OH	Curnow (1993)
6	GAG-GGG	Glu-Gly	371	Hiperplasia	Geley (1996)
6	CGG-CAG	Arg-Gln	374	Def. 11 β -OH	Curnow (1993)
7	CGA-CAA	Arg-Gln	384	Def. 11 β -OH	Curnow (1993)
7	gCGA-GGA	Arg-Gly	384	Def. 11 β -OH	Nakayama (1995)
7	GCG-GTG	Ala-Val	386	Hiperplasia	Amin (2002)
8	G-A	Arg-His	404	Não referido	rs4998896 - NCBI
8	G-C	Pro-Ala	414	Não referido	rs4998901 - NCBI
8	TATa-TAG	Tyr-Term	423	Def. 11 β -OH	Joehrer (1997)
8	CGC-CAC	Arg-His	427	Hiperplasia	Skinner (1996)
8	T-C	His-Tyr	439	Não referido	rs5294 - NCBI
8	GTG-GGG	Val-Gly	441	Def. 11 β -OH	Curnow (1993)
8	GGC-GAC	Gly-Asp	444	Def. 11 β -OH	Motaghedi (2005)
8	CGC-CAC	Arg-His	448	Def. 11 β -OH	White (1991)
8	gCGC-TGC	Arg-Cys	448	Hiperplasia	Geley (1996)
8	CTG-CCG	Leu-Pro	461	Hiperplasia	Chang (2004)

Tabela2: Mutações geradas por deleções e inserções no gene *CYP11B1* já descritas (tabela baseada na base de dados HGMD).

Exão/ Intrão	Deleção	Codão	Fenótipo	Reference
1	GCCCGG^GTCCcCAGGACAGTG	31	Def. 11β-OH	Curnow (1993)
3	CCTCCCG^ATGgtgGATGCAGTGG	160	Def. 11β-OH	Solyom (2001)
	GTGCTT^CAGAAcTACCACATC	393	Def. 11β-OH	Cerame (1999)
	GGCAGG^AACTtctACCACGTGCC	437	Def. 11β-OH	Krone (2005)
	Inserção	Codão	Fenótipo	Referência
	CCTAC^AGACAagacaACATCGTGGG	120	Def. 11β-OH	Skinner (1994)
	GTGCTT^CAGAgAaACTACCACAT	393	Def. 11β-OH	Helmberg (1992)
	GATGCTG^CTGctgCTGCTGCACC	462	Hiperplasia	Geley (1996)
	Deleção severa		Fenótipo	Referência
Exão2	28 pb(descrita ao nível do cDNA)		Hiperplasia	Geley (1996)
Exão4	Recombinação com CYP11B2 (descrita ao nível do ADN genómico)		Hipoaldosteronismo	Pascoe (1992)
Intrão2	Recombinação com CYP11B2 (descrita ao nível do ADN genómico)		Hipoaldosteronismo	Pascoe (1992)
Intrão 3	Recombinação com CYP11B2 (descrita ao nível do ADN genómico)		Hipoaldosteronismo	Pascoe (1992)

Tabela3- Mutações que alteram ou geram novos sítios de splice já descritas (adaptada da base de dados HGMD).

Intrão	Dador/ Aceitador	localização	Substituição	Fenótipo	Referência
3	ds	16	G-T	Hiperplasia	Hampf (2001)
5	ds	-1	G-A	Hiperplasia	Skinner (1996)
5	ds	-1	G-C	Def. 11β-OH	Chabre (2000)
5	ds	1	G-A	Def. 11β-OH	Merke (1998)
8	ds	4	A-G	Def. 11β-OH	Chabre (2000)

Quadro 2: Características dos primers utilizados na amplificação do gene *CYP11B*.

Nome	Sequência 5' - 3'	Tamanho (nt)	Localização	Sentido	Alvo de amplificação	Tamanho do fragmento (pb)
<i>CYP11B</i> P1F	CTGAGTTCTAGTTTGATTGC	20	5'-UTR	forward	Locias pa SF1, Ad5 e Ad1	360
<i>CYP11B</i> P1R	TCCACCCTGTTCAGCTGC	18	Exão 1	reverse	Locias pa SF1, Ad5 e Ad2	
<i>CYP11B</i> P2F	TCGCATCCCTTGTAAGTTGG	20	5'-UTR	forward	Posições -1889 e -1859	323
<i>CYP11B</i> P2R	TGTTGGAAGTTCTGGCCAGG	20	5'-UTR	reverse	Posições -1889 e -1859	
<i>CYP11B</i> E 1-2 F	TCTCGAAGGCAAGGCACCA	19	5'-UTR	forward	exão 1 e 2	390
<i>CYP11B</i> E 1-R1	ATGGCAGTGCTGAGTGCCC	19	intrão 1	reverse	exão 1	
<i>CYP11B</i> E 2-F1	AAGCCGCTAATCCAGGAGAG	20	intrão 1	forward	exão 2	434
<i>CYP11B</i> E1-2R1	GCAGACACGACCCACGGA	19	intrão 2	reverse	exão 1 e 2	
<i>CYP11B</i> E 1-2 F	TCTCGAAGGCAAGGCACCA	19	5'-UTR	forward	exão 1 e 2	1010
<i>CYP11B</i> E1-2R1	GCAGACACGACCCACGGA	19	intrão 2	reverse	exão 1 e 2	
<i>CYP11B</i> E 3-5 F	GCAGAAAATCCCTCCCC	18	intrão 2	forward	exão 3, 4, 5	1480
<i>CYP11B</i> E 3-5 R	CAACCTGCAAACGTGTTTATC	21	intrão 5	reverse	exão 3, 4, 5	
<i>CYP11B</i> E3-F1	TAGACCTGAGTGGCCTTTGT	20	intrão 2	forward	exão 3	472
<i>CYP11B</i> E3-R1	CTCAGTCCCCATCCCCG	19	intrão 3	reverse	exão 3	
<i>CYP11B</i> E 4-F1	TGTGGGCCACGTGGGAAGA	19	intrão 3	forward	exão 4	419
<i>CYP11B</i> E 4-R1	CCACTGGGTGGTGGAGAG	18	intrão 4	reverse	exão 4	
<i>CYP11B</i> E 5-F1	GGAGGACACTGAAGGATGTC	20	intrão 4	forward	exão 5	379
<i>CYP11B</i> E 3-5 R	CAACCTGCAAACGTGTTTATC	21	intrão 5	reverse	exão 3, 4, 5	
<i>CYP11B</i> E 6-9 F	GCATTAGGATTTGAAGTCTTG G	22	intrão 5	forward	exão 6, 7, 8, 9	1933
<i>CYP11B</i> E 6-9 R	GAGGGATGGGGGCAAACCTG	19	3'	reverse	exão 6, 7, 8, 9	
<i>CYP11B</i> E 6-9 F	GCATTAGGATTTGAAGTCTTG G	22	intrão 5	forward	exão 6, 7, 8, 9	1933
<i>CYP11B</i> E6-R1	TCCACGTTAATCCCCAGGGC	20	intrão 6	reverse	exão 6	
<i>CYP11B</i> E 7-F1	ATCTGGGACCTCTGCGGGT	19	intrão 6	forward	exão 7,8	529
<i>CYP11B</i> E 8 R1	AGTCCCACATTGCTCAAGC	19	intrão 9	reverse	exão 7,9	
<i>CYP11B</i> E 9 F	CTCTGCAACTTTGAGGGTCT	20	intrão 8	forward	exão 9	483
<i>CYP11B</i> E 6-9 R	GAGGGATGGGGGCAAACCTG	19	3'	reverse	exão 6, 7, 8, 9	

Tabela4: Tabela de equivalências com base no marcador de peso molecular fago X174+ haeIII.

Tamanho (pb)	Quantidade ADN (%)	Quantidade ADN (ng)
1353	25	12.5
1078	20	10
872	16.2	8.1
601	11.2	5.6
310	8.7	2.85
281/271	5.2/5	5.1
234	4.3	0.65
194	3.6	1.8
118	2.2	1.1
72	1.3	0.65

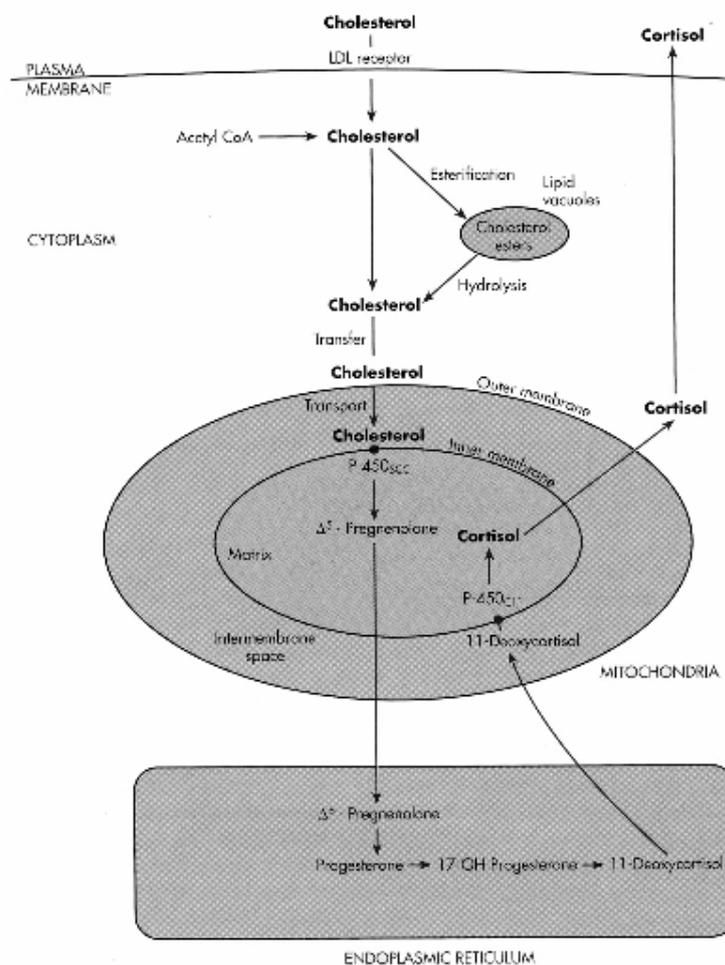


Figura1: Esquematização da via de síntese do cortisol nos respectivos componentes celulares.