



**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia  
**2009**

**Ana Filipa  
Quintela Vieira**

**Mutações no gene da 21-hidroxilase e sua correlação  
fenotípica**



**Ana Filipa  
Quintela Vieira**

**Mutações no gene da 21-hidroxilase e sua correlação  
fenotípica**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Regina Silva da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto – Instituto Politécnico do Porto e da Professora Doutora Adelaide de Almeida do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

## **o júri**

presidente	Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro
arguente	Prof. Doutora Isabel dos Santos Cardoso Investigadora Doutorada do Serviço de Neurobiologia Molecular do Instituto de Biologia Molecular e Celular Assistente Convidada a 30% da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto
orientadora	Professora Doutora Regina Augusta Alves Pereira da Silva Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto
co-orientadora	Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Quero manifestar publicamente a minha dívida de gratidão a todos quanto contribuíram para tornar possível a concretização deste trabalho.

À Professora Doutora Regina Silva o meu agradecimento mais especial, por gentilmente me ter aceite como sua orientanda, me ter ajudado em tudo o que precisei, pela partilha de experiências e conhecimentos, pela compreensão e paciência em tempos difíceis, pela crítica e motivação constantes.

À Professora Doutora Adelaide Almeida por me ter aceite como orientanda, por toda a ajuda e disponibilidade.

Ao Doutor José Carlos por ter disponibilizado todos os meios logísticos e apoiado o desenvolvimento deste projecto no laboratório da UPSS do IPATIMUP.

Ao Doutor Duarte Pignatelli por todo o apoio e colaboração neste estudo.

Ao Cirnes e à Rute um grande obrigada pela boa amizade que criamos e que guardarei sempre com carinho. Obrigada por tudo o que partilharam comigo, todo o saber que me transmitiram, toda a ajuda que me deram para conseguir concretizar este trabalho e, principalmente, pela boa disposição contagiante que fez com que tudo fosse mais fácil.

À Inês e à Carina pela ajuda que me deram, pelo incentivo e amizade.

Ao Fábio pela paciência, carinho e apoio durante esta fase desgastante.

E, não menos importante, aos meus queridos pais, que estiveram sempre do meu lado e foram uns verdadeiros companheiros. A eles que me apoiaram em tudo, que me confortaram nos momentos difíceis, que não me deixaram desistir, demonstro a minha gratidão eterna.

## palavras-chave

CYP-21, 21-hidroxilase, Hiperplasia Supra-renal Congénita, Forma não clássica.

## resumo

A Hiperplasia Supra-renal Congénita (HSC) constitui um grupo de doenças hereditárias decorrentes da deficiência de enzimas necessárias para a biossíntese dos esteróides corticais. 90 a 95% dos casos de HSC decorrem da deficiência da 21-hidroxilase, codificada pelo gene CYP21. Mutações neste gene são correlacionadas com as diferentes formas clínicas da doença.

O objectivo deste estudo foi determinar o espectro mutacional do CYP21 em 39 indivíduos e correlacioná-lo com o fenótipo apresentado. 17 indivíduos apresentam a forma não clássica (FNC) da HSC, enquanto os restantes 22 apresentam sinais suspeitos da referida forma clínica.

Para tal, após optimização das técnicas utilizadas neste estudo, procedeu-se à amplificação do gene CYP21 por PCR a partir de DNA genómico isolado dos leucócitos do sangue periférico dos indivíduos em estudo. Os produtos de amplificação foram sequenciados e o espectro mutacional foi detectado e analisado tendo em consideração a sequência normal do gene CYP21.

Foram identificadas 11 mutações, estando apenas 7 associadas a alterações funcionais na actividade da 21-hidroxilase. As mutações encontradas nos indivíduos do grupo da FNC podem ser correlacionadas com o fenótipo demonstrado, sendo a alteração V281L a mais frequente (64,7%). Na maioria dos casos do grupo com suspeita de HSC não foram detectadas mutações valorizáveis no CYP21 (95,45%).

Estes resultados apontam para uma associação entre a mutação V281L em heterozigotia e a forma não clássica da HSC, sendo necessário aumentar amostra para uma possível confirmação. A maioria dos indivíduos com suspeita da forma não clássica da HSC não apresenta a referida mutação, resultado que sugere que outros factores estão envolvidos na manifestação deste fenótipo.

**keywords**

CYP-21, 21-hydroxylase, Congenital Adrenal Hyperplasia, Non-classical form.

**abstract**

Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) is a group of inheritable diseases associated with a lack of important enzymes in the biosynthesis of corticosteroids. 90 to 95% of the CAH cases are caused by 21-hydroxylase deficiency, an enzyme encoded by the CYP21 gene. CYP21 mutations are correlated with different phenotypic presentations of the disease.

The aim of this study was to determine the mutational spectrum of CYP21 in 39 patients and correlate it with their clinical condition. 17 patients presented the non-classical form (NCF) of CAH and 22 had suspected symptoms of the same form.

After optimization of the technical procedure, isolation of the genomic DNA from peripheral blood was made and the CYP21 gene was amplified by Multiplex-PCR. The amplification products were then sequenced to determine the mutational spectrum of the CYP21 gene.

We detected 11 mutations, but only 7 were related to a decrease of the 21-hydroxylase activity. The patients of NCF group presented mutations that can be correlated with their phenotype, being V281L the most frequent (64,7%). The great majority of the suspected CAH cases did not present mutations with functional significance (95,45%).

These results suggest an association of heterozygosity of V281L with the non-classical form of the CAH, but it will be necessary a larger sample for confirmation. The majority of patients with suspected non-classical form of CAH did not present this mutation, which points to other factors be involved.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1. GENE CYP21</b>	<b>1</b>
1.1.1. Caracterização do gene	1
1.1.2. O papel da 21-hidroxilase no metabolismo das hormonas esteróides	2
<b>1.2. A HIPERPLASIA SUPRA-RENAL CONGÉNITA</b>	<b>4</b>
1.2.1. Desenvolvimento da genitália	5
1.2.2. Mutações no gene CYP21 e fenótipos da Hiperplasia Supra-renal Congénita	7
1.2.3. Diagnóstico	8
<b>2. OBJECTIVOS</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>12</b>
<b>3.1. AMOSTRAS</b>	<b>12</b>
<b>3.2. EXTRACÇÃO DE DNA</b>	<b>12</b>
<b>3.3. AMPLIFICAÇÃO DO GENE CYP21</b>	<b>12</b>
<b>3.4. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR</b>	<b>14</b>
<b>3.5. REACÇÃO DE SEQUENCIAÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>3.6. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE SEQUENCIAÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>3.7. SEQUENCIAÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>17</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>18</b>
<b>4.1. QUALIDADE E CONCENTRAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO</b>	<b>18</b>
<b>4.2. OPTIMIZAÇÃO DO PCR E PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>4.3. SEQUENCIAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS</b>	<b>20</b>
<b>5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO</b>	<b>26</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>32</b>

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 1** - Representação esquemática da localização dos genes C4 e CYP21. **1**

**Figura 2** - Representação das principais vias de síntese das hormonas esteróides a partir do colesterol, onde se evidenciam os genes codificadores das enzimas envolvidas nessas vias. CYP11A1: 20-22-colesterol-desmolase; 3 $\beta$ -HSD: 3 $\beta$ -hidroxiesteróide-desidrogenase; CYP21: 21-hidroxilase; CYP11: 11 $\beta$ -hidroxilase, 18-hidroxilase e 18-oxidase; CYP11B1: 11 $\beta$ -hidroxilase; CYP17: 17 $\alpha$ -hidroxilase; 17-HSD: 17 $\beta$ -hidroesteróide-desidrogenase; 5-ER: 5 $\alpha$ -redutase; CYP19A1: Aromatase. **2**

**Figura 3** - Fluxograma representativo das relações feedback positivo (verde) e negativo (vermelho) entre CRH, ACTH e Cortisol. **3**

**Figura 4** - Representação esquemática do local de emparelhamento dos primers utilizados nas reacções de amplificação do gene CYP21 pela técnica de PCR. **13**

**Figura 5** - Fotografia exemplificativa da qualidade do DNA extraído das amostras. Gel de Agarose a 0,8% onde são observadas bandas de DNA de alto peso molecular sem rasto. **18**

**Figura 6** - Produtos de amplificação obtidos na reacção de PCR com o par de primers 1F-6R a diferentes temperaturas de annealing. M – Marcador de peso molecular. **19**

**Figura 7** - Produtos de amplificação obtidos na reacção de PCR com o par de primers 3F-10R a diferentes temperaturas de annealing. M- Marcador de peso molecular. **20**

**Figura 8** - Produtos de sequenciação obtidos com diferentes primers para leitura do exão 3. A- Utilizando o primer 1F há uma perda da qualidade da sequência, impossibilitando a leitura. B - Utilizando o primer 3F só é possível ler a extremidade 3' do exão 3. C - Com o primer A é possível ler a sequência completa do exão 3. O sombreado corresponde à sequência do exão 3 para exemplificação. **21**

**Figura 9** - Percentagem de indivíduos com mutações em homozigotia e heterozigotia.

Gráfico A: Representação dos indivíduos com diagnóstico clínico de FNC (Grupo A).

Gráfico B: Representação dos indivíduos com suspeita de FNC (Grupo B). **24**

---

## **ÍNDICE DE TABELAS**

- Tabela 1** - Sequência dos dois pares de primers utilizados nas reacções de amplificação do gene CYP21 e tamanho dos respectivos produtos de amplificação. **13**
- Tabela 2** - Registo da temperatura, da duração e do número de ciclos das diferentes etapas da técnica de PCR otimizada para os pares de primers utilizados. **14**
- Tabela 3** - Registo da sequência dos primers utilizados na reacção de sequenciação do gene CYP21 e os exões sequenciados com cada primer. **15**
- Tabela 4** - Registo das condições optimizadas (temperatura e duração das diferentes etapas) para a sequenciação dos produtos de amplificação do gene CYP21. **16**
- Tabela 5** - Registo das mutações detectadas no gene CYP21 por sequenciação. Fenótipo associado: adaptado de Speiser e White<sup>4</sup>. **22**
- Tabela 6** - Frequência alélica das diferentes mutações detectadas nos exões do gene CYP21 e sua distribuição nos grupos de indivíduos com diagnóstico clínico de FNC (Grupo A) e com suspeita de FNC (Grupo B). **23**
- Tabela 7** - Registo dos casos em que foi detectada heterozigotia composta. **25**
- Tabela 8** - Frequências alélicas das principais mutações identificadas em indivíduos com FNC em populações diferentes. O sombreado realça a mutação com maior frequência. **26**
- Tabela 9** - Mutações detectadas e respectivo significado funcional (adaptado de White e Speiser<sup>4</sup>). **29**

## 1. Introdução

### 1.1. Gene CYP21

#### 1.1.1. Caracterização do gene

O gene CYP21 codifica uma enzima, a 21-hidroxilase, que pertence à via de biossíntese das hormonas esteróides. Esse gene está localizado no complexo major de histocompatibilidade (MHC), no cromossoma 6p21.3, em *tandem* com o seu homólogo, o pseudogene CYP21P, distanciados por 30kb e situados adjacente e alternadamente com os genes C4A e C4B, responsáveis pela codificação de proteínas do sistema complemento (Figura 1)<sup>1,2</sup>.



Figura 1 - Representação esquemática da localização dos genes C4 e CYP21.

Os genes CYP21 (também denominado CYP21B ou CYP21A2) e CYP21P (também denominado CYP21A ou CYP21A1) são constituídos por 10 exões que se distribuem por aproximadamente 3kb, apresentando uma homologia, entre si, na sequência exónica de aproximadamente 98% e uma homologia na sequência intrónica de 96%<sup>1-5</sup>. Embora o gene CYP21P apresente uma grande homologia com o gene CYP21, o gene CYP21P é um pseudogene por apresentar uma deleção de 8bp no exão 3 e outras mutações que o tornam incapaz de codificar uma proteína funcionalmente activa. A título de exemplo de uma das alterações apresentadas no pseudogene é a troca de uma citosina por uma guanina (C/G) no nucleótido 656 na extremidade 3' do intrão 1 do gene CYP21 que impede um splicing correcto, levando à exclusão dos exões um e dois<sup>5</sup>. Uma das hipóteses explicativas para a presença do pseudogene nesta região é ser o produto de um evento de recombinação não-homóloga. Deste modo, é possível esclarecer o aparecimento de uma duplicação em *tandem* de uma unidade de 40kb, na qual estão presentes os genes C4 e CYP21 (Figura 1). A duplicação desta região favorece uma alta taxa de recombinação, facto que é evidenciado pela frequência significativa de produtos meióticos alterados resultantes do *crossing-over*. Nestes produtos são encontradas deleções ou duplicações parciais no gene CYP21, devido a um *crossing-over* desigual; ou a presença de

regiões do pseudogene, originadas por translocação de um ou mais pares de bases, aquando de um *crossing-over* igual<sup>6</sup>.

### 1.1.2. O papel da 21-hidroxilase no metabolismo das hormonas esteróides

A 21-hidroxilase é uma enzima envolvida na síntese do cortisol e da aldosterona. Quando a sua actividade enzimática está comprometida, há uma deficiência na produção das referidas hormonas e um aumento na produção de progesterona e da 17-hidroxiprogesterona (Figura 2). Na ausência da CYP21, esses intermediários são desviados para a síntese dos androgénios sexuais, levando à produção de altos níveis de testosterona e desidrotosterona, que afectam a diferenciação sexual, principalmente das mulheres, a partir da sua oitava semana de gestação<sup>3</sup>.

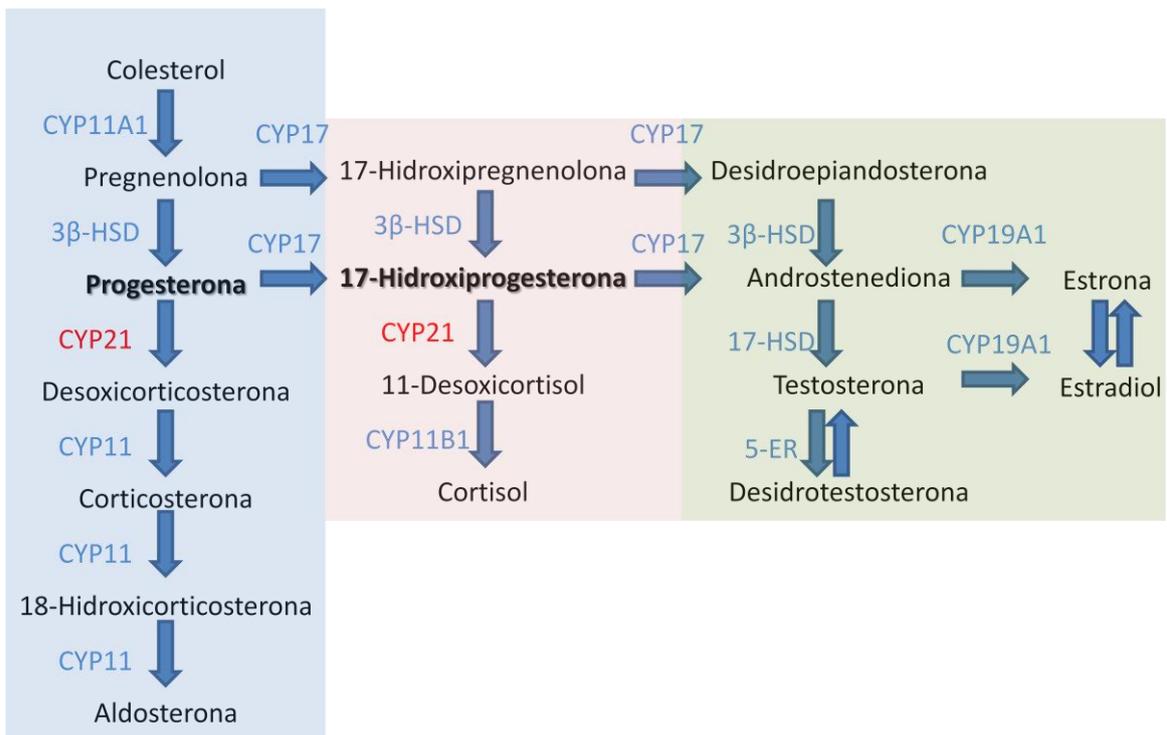
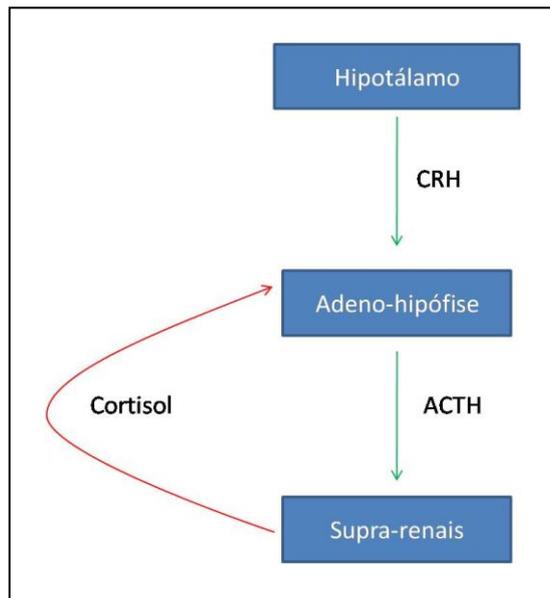


Figura 2 - Representação das principais vias de síntese das hormonas esteróides a partir do colesterol, onde se evidenciam os genes codificadores das enzimas envolvidas nessas vias. CYP11A1: 20-22-colesterol-desmolase; 3β-HSD: 3β-hidroesteróide-desidrogenase; CYP21: 21-hidroxilase; CYP11: 11β-hidroxilase, 18-hidroxilase e 18-oxidase; CYP11B1: 11β-hidroxilase; CYP17: 17α-hidroxilase; 17-HSD: 17β-hidroesteróide-desidrogenase; 5-ER: 5α-redutase; CYP19A1: Aromatase.

Um déficit da enzima 21-hidroxilase, nos casos mais extremos, leva a níveis reduzidos ou inexistentes de cortisol e de aldosterona<sup>3</sup>.

A produção de cortisol é estimulada pela hormona adrenocorticotrofina (ACTH) produzida pela pituitária anterior ou adeno-hipófise, cuja produção é controlada positivamente, pela hormona libertadora de adrenocorticotrofina (CRH) secretada pelo hipotálamo, e negativamente, pelo cortisol (Figura 3)<sup>3</sup>.



**Figura 3 - Fluxograma representativo das relações feedback positivo (verde) e negativo (vermelho) entre CRH, ACTH e Cortisol.**

Assim, quando há um decréscimo na produção de cortisol, há uma estimulação contínua da adeno-hipófise, levando a um aumento da síntese de ACTH, que, por sua vez, estimula a supra-renal a produzir cortisol. O contínuo estímulo desta glândula pela ACTH leva a uma hiperplasia do tecido que a constitui<sup>3</sup>.

O cortisol tem múltiplas funções como a manutenção dos níveis de açúcar no sangue, a promoção da gluconeogénese em períodos de stress físico e psicológico, a regulação e homeostase da pressão sanguínea, e o suporte das funções imunológicas e cardiovasculares<sup>3,4</sup>.

Foi demonstrado que durante as primeiras 8 a 10 semanas de gestação o cortisol suprime a produção de androgénios por bloqueio do eixo hipotálamo-pituitária-supra-renal,

permitindo condições fisiológicas transitentes propícias para a diferenciação normal da genitália externa feminina<sup>3,4</sup>.

Quando a síntese da aldosterona está comprometida há um desregulamento da excreção/absorção de electrólitos ao nível renal, levando à perda de cloro e sódio, também denominada por perda de sal. Tal acontece, por esta hormona ser responsável pela regulação da excreção de electrólitos no rim, pela manutenção do volume intravascular e da pressão sanguínea, através da promoção da reabsorção do sódio, acompanhada pela retenção de água e cloro, e excreção de potássio na urina. A produção de aldosterona é regulada pelos níveis de potássio e pelo sistema renina-angiotensina. A renina é produzida pelo rim, em resposta à hipotensão, ao decréscimo do volume intravascular ou à hipercalémia, e converte o angiotensinogénio em angiotensina I. Esta última, por acção da enzima conversora da angiotensina, é convertida em angiotensina II, que estimula a síntese de aldosterona<sup>3</sup>.

A desidroepiandrosterona e androestenediona, duas hormonas esteróides sexuais fracas, não têm qualquer papel no âmbito da diferenciação sexual, no início do desenvolvimento fetal. No entanto, a sua acumulação no organismo leva a um aumento da produção de testosterona e de desidrotestosterona e, sendo estas hormonas androgénios fortes, vão influenciar o desenvolvimento sexual, levando a ambiguidade da genitália em diferentes graus de expressividade, principalmente em as crianças do sexo feminino<sup>3</sup>.

## **1.2. A Hiperplasia Supra-renal Congénita**

As glândulas supra-renais são órgãos endócrinos pares, com duas regiões anatómica e funcionalmente diferentes, o córtex e a medula. Uma situação de stress prolongado, como agonia após uma doença crónica prolongada, pode levar a um aumento substancial da glândula supra-renal, devido à ocorrência, nesta situação, de hipertrofia e hiperplasia das células corticais<sup>7</sup>.

Na zona cortical são sintetizados três tipos diferentes de esteróides: os glicocorticóides, principalmente o cortisol; os mineralocorticóides, dos quais o mais importante é a aldosterona; e os esteróides sexuais, como os estrogénios e os androgénios. A zona medular sintetiza e secreta catecolaminas<sup>7</sup>.

As doenças do córtex supra-renal são convenientemente divididas em doenças associadas à hiperfunção cortical e doenças caracterizadas por hipofunção cortical<sup>7</sup>.

No que respeita à hiperfunção cortico-supra-renal, esta pode ser devida a um excesso de corticoesteróides, nomeadamente de cortisol, de aldosterona e de androgénios, causando Síndrome de *Cushing*, Hiperaldosteronismo e Síndromes Adrenogenitais, respectivamente<sup>7</sup>.

As possíveis causas para um aumento da síntese de androgénios são a presença de uma neoplasia supra-renal, como um carcinoma supra-renal, ou de uma hiperplasia supra-renal congénita (HSC), que é causada por um défice na actividade de algumas enzimas envolvidas na síntese dos esteróides corticais<sup>3,7</sup>.

A HSC consiste num grupo de doenças autossómicas recessivas que afectam a biossíntese dos esteróides corticais, principalmente do cortisol<sup>3</sup>, sendo um dos erros inatos do metabolismo mais frequentes nos seres humanos<sup>7</sup>. Este distúrbio pode ser devido a deficiências em enzimas pertencentes a esta via metabólica, nomeadamente na 11-hidroxilase (CYP11B1), na 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD), na 17-hidroxilase (CYP17) (Figura 2), sendo a principal causa uma deficiência na 21-hidroxilase (CYP21)<sup>1-5</sup>. Alguns estudos mostram que 90 a 95% dos casos de HSC são causados por uma deficiência da enzima 21-hidroxilase<sup>1-5</sup>, facto que leva a uma acumulação de intermediários da via biossintética, os quais são desviados para a síntese de hormonas esteróides sexuais, sendo a manifestação clínica desta anomalia uma perturbação no desenvolvimento sexual primário e secundário, que pode ocorrer desde o feto até à idade adulta<sup>3</sup>. Além disso, esta deficiência na 21-hidroxilase leva a uma baixa produção de cortisol, não havendo por este motivo, uma regulação negativa da produção de ACTH pela adeno-hipófise (Figura 3). Deste modo, a glândula supra-renal está continuamente a ser estimulada pela ACTH e, como consequência, ocorre uma hiperplasia desta glândula<sup>3</sup>.

### **1.2.1. Desenvolvimento da genitália**

No início da gestação as gónadas são indiferenciadas e bipotenciais. Durante a sétima semana, é iniciado o processo de diferenciação das gónadas masculinas, sendo os ovários reconhecíveis às 10 semanas. Pela acção de um factor glicoproteico sintetizado pelas células de Sertoli, são desenvolvidos os ductos Mullerian e são formadas as

estruturas internas do sexo feminino, nomeadamente, as trompas de Falópio, o útero, o cervix e a porção superior da vagina. A acção desse factor é inibida por concentrações locais elevadas de testosterona, secretada pelas células de Leydig, levando ao desenvolvimento das estruturas masculinas derivadas dos ductos Wolffian<sup>4</sup>.

As estruturas da genitália externa também são bipotenciais no início da gestação e a sua diferenciação em estruturas masculinas ocorre pela acção da 5-dihidrotestosterona nos receptores de androgénios<sup>4</sup>.

O córtex adrenal é formado a partir da 4ª semana de gestação, sendo as hormonas esteróides sintetizadas a partir da 6-7ª semana pelo córtex provisório. O córtex adulto ou permanente está completamente formado entre as 9-10 semanas de gestação, envolvendo rapidamente no período neonatal. O desenvolvimento do córtex permanente é regulado principalmente pela ACTH, secretada pela adenohipófise, estando envolvidas também as catecolaminas e os neuropéptidos, sintetizados pela medula adrenal<sup>4</sup>.

A secreção excessiva de precursores de androgénios não afecta a diferenciação sexual masculina. No entanto, os níveis elevados destas hormonas em fetos do sexo feminino, com HSC, levam ao impedimento da separação dos canais uretral e vaginal<sup>4</sup>. Simultaneamente, essas hormonas interagem com os receptores de androgénios na pele genital, induzindo um aumento clitórico e promovendo quer a fusão das pregas labiais, quer a migração rostral do orifício uretral/vaginal. Contrariamente ao que acontece com a genitália externa, as estruturas sexuais masculinas internas não se desenvolvem, presumivelmente porque exigem concentrações de testosterona locais ainda mais elevadas<sup>4</sup>.

Situações de HSC podem ser detectadas durante o período fetal através de exames radiológicos e bioquímicos, podendo ser iniciado um tratamento com hormonas esteróides, com o intuito de prevenir ou reverter alterações no desenvolvimento da genitália<sup>4,8,9</sup>.

Nem todas as mulheres com HSC desenvolvem o mesmo tipo e a mesma severidade de manifestações, podendo dever-se não só a diferenças nos níveis elevados de androgénios e seus precursores, mas também à eficiência com que os androgénios são convertidos em produtos mais potentes, como a desidrotestosterona<sup>3</sup>.

### **1.2.2. Mutações no gene CYP21 e fenótipos da Hiperplasia Supra-renal Congénita**

A presença de mutações mais ou menos graves no gene CYP21 e suas possíveis combinações são manifestadas no grau de severidade da HSC e conduzem a um vasto leque de possíveis fenótipos<sup>4,8,10</sup>. White e Speiser descreveram exaustivamente algumas das mutações encontradas no gene CYP21, associando-as aos fenótipos da doença<sup>4</sup>.

Devido a essa grande variedade de manifestações, os pacientes com HSC foram classificados em dois grandes grupos: a forma clássica (FC), subdividida em forma clássica perdedora de sal (FPS) e forma clássica virilizante simples (FVS); e a forma não clássica (FNC). No entanto, esta distinção nem sempre é fácil de estabelecer. Exemplificando, alguns indivíduos com a forma FVS da HSC podem apresentar crises de perda de sal<sup>4</sup>.

As formas clássicas são as mais graves e severas<sup>3,4</sup>, tendo sido descritas algumas mutações associadas<sup>4,8,10</sup>. Uma das mutações frequentemente encontrada nos indivíduos com a forma perdedora de sal da HSC é a alteração de uma adenina ou citosina por uma guanina no intrão 2, que está associada a um fenótipo grave da doença<sup>8</sup>. Esta forma é a predominante da FC da Hiperplasia Supra-renal Congénita, correspondendo a cerca de 75% destes casos<sup>4</sup>. Estes doentes não conseguem manter a homeostase de sódio por insuficiência na produção de aldosterona. As características fenotípicas mais evidentes são a alteração da genitália, principalmente no sexo feminino, podendo ocorrer macrogenitossomia no sexo masculino<sup>3</sup>. As crianças do sexo feminino podem apresentar variados graus de virilização e de ambiguidade da genitália, com presença de criptorquidismo bilateral, que poderão ser o reflexo de diferentes mutações no gene CYP21<sup>3,4,8</sup>. Nas crianças do sexo masculino, devido às poucas manifestações fenotípicas presentes, só é detectada a doença aquando das crises de perda de sal. As condições críticas de saúde destes doentes podem levar à sua morte se não forem tomados cuidados médicos adequados<sup>3</sup>.

Os indivíduos com a forma FVS da HSC têm uma actividade da 21-hidroxilase residual mas não completa e, devido à estimulação da supra-renal pelo sistema renina-angiotensina, há produção de aldosterona, permitindo que estes tenham uma homeostase de sódio normal<sup>4</sup>. Por estimulação contínua dessas glândulas pela ACTH pode haver uma produção aproximadamente normal de cortisol, no entanto, os precursores de androgénios acumular-se-ão e serão convertidos em hormonas sexuais masculinas. A virilização da

genitália feminina pode variar, desde uma hipertrofia clitorica e fusão parcial das pregas labiais, até uma uretra fálica e uma completa fusão das referidas pregas. À nascença, as crianças do sexo masculino não apresentam qualquer alteração fenotípica ao nível da sua genitália<sup>4</sup>. Crianças de ambos os sexos, desenvolvem precocemente sinais de excesso de androgénios, como o aparecimento de pelos púbicos e axilares, acne, pelos faciais, rápido crescimento, avanço no desenvolvimento ósseo, levando a que, por fusão epifisária prematura, estes pacientes, na sua forma adulta, apresentem baixa estatura. Pacientes do sexo feminino não tratadas não desenvolvem uma puberdade normal, apresentando na maioria das vezes, um aumento clitorico, hirsutismo, cistos ováricos, irregularidades menstruais e, conseqüentemente, infertilidade ou redução da fertilidade. Os pacientes do sexo masculino podem também apresentar problemas de fertilidade, aumento do pénis e testículos pequenos<sup>3</sup>. A mutação I172N é uma das mutações frequentemente associadas a essas disfunções características da FVS<sup>8</sup>.

Os indivíduos com a FNC da HSC apresentam sintomas mais atenuados da doença, devido a terem apenas uma deficiência média da 21-hidroxilase e níveis ligeiramente alterados dos seus substratos. A síntese de aldosterona não se encontra comprometida. A genitália externa nas crianças do sexo feminino é usualmente normal, podendo ocorrer apenas uma ligeira clitoromegalia. Em ambos os sexos, podem ser desenvolvidos sinais típicos do excesso de androgénios, que podem estar associados a uma grande variabilidade fenotípica<sup>3,4,8,11,12</sup>. Muitas vezes, são assintomáticos os pacientes com esta forma de doença, só sendo diagnosticados durante um screening familiar por aparecimento de indivíduo(s) afectado(s)<sup>3,11,12</sup>.

As mutações mais frequentemente encontradas nos indivíduos com a FNC da HSC são a P30L<sup>13</sup>, V281L<sup>11,12,14</sup>, R339H<sup>15</sup> e P453S<sup>15</sup>, que se encontram nos exões 1, 7, 8 e 10, respectivamente.

### **1.2.3. Diagnóstico**

Como já referido, a HSC é caracterizada por uma série de manifestações fenotípicas características, que auxiliam o diagnóstico clínico. No entanto, as mesmas características fenotípicas podem estar associadas a diferentes causas, facto que obriga a uma confirmação do diagnóstico por métodos bioquímicos<sup>3,4</sup>.

O diagnóstico bioquímico da deficiência da 21-hidroxilase não pode ser realizado através de medições directas da actividade enzimática desta enzima, uma vez que ela só é expressa no córtex adrenal<sup>3</sup>. Assim, o diagnóstico da deficiência da 21-hidroxilase é baseado em medições dos níveis de 17-hidroxiprogesterona no soro, uma vez que este é o principal substrato da enzima em questão<sup>3,4</sup>. Além disso, os pacientes com a forma clássica da doença também secretam progesterona, desidroepiandrosterona, androstenediona e testosterona em excesso. Os pacientes com FPS demonstram níveis elevados de 17-hidroxiprogesterona (>20000ng/dl), comparativamente aos pacientes com a FVS (10000-20000ng/dl) e aos pacientes com FNC (<10000ng/dl)<sup>3</sup>. No entanto, nem sempre se verificam estes valores, podendo os indivíduos heterozigóticos para ambas formas clássica e não clássica da doença apresentar níveis semelhantes aos homozigóticos<sup>3</sup>.

Tem sido relatado que recém-nascidos sujeitos a stress ou nascidos antes do término da gestação também apresentam níveis elevados de 17-hidroxiprogesterona no soro, gerando falsos positivos. Por esse motivo, foram definidos valores *cut-off* com base na idade gestacional ou peso do recém-nascido, não sendo, mesmo assim, possível determinar eficientemente recém-nascidos com a FNC da doença. É também importante realçar, que deficiências em outras hormonas, como as deficiências da 11 $\beta$ -hidroxilase e da 3 $\beta$ -HSD, podem mimetizar a deficiência da 21-hidroxilase, sendo, por esse motivo, importante realizar um completo perfil completo das hormonas adrenocorticais e avaliar a razão entre os precursores e os produtos, após estimulação com ACTH<sup>3</sup>.

Ao nível pré-natal pode ser também avaliada a concentração de 17-hidroxiprogesterona no fluído amniótico por amniocentese. Recentemente, o diagnóstico bioquímico foi substituído pelo diagnóstico molecular de células fetais obtidas por amniocentese ou por amostras de vilosidades coriônicas, sendo o último método de colheita preferível por se poder realizar mais precocemente<sup>9</sup>. Contudo a possibilidade de contaminação com DNA materno é maior, sendo necessário realizar em simultâneo a análise de DNA satélite para despiste da contaminação materna<sup>9</sup>.

Alguns autores dão particular ênfase ao diagnóstico molecular no âmbito dos meios complementares de diagnóstico. Contudo, é necessário discriminar o gene CYP21A2 do seu pseudogene CYP21A1 ou CYP21P, uma vez que este último é inactivo e apresenta a maioria das mutações de interesse. Para tal, é necessário desenhar primers de forma a excluir amplificações inespecíficas e a amplificação do pseudogene<sup>16,17</sup>.

As técnicas para a pesquisa das mutações no gene são baseadas na amplificação e posterior corte com enzimas de restrição<sup>18</sup>, ou por *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)* a qual permite separar electroforeticamente fragmentos amplificados com os primers específicos<sup>17,19</sup>. Quando as mutações detectadas não explicam os sintomas dos pacientes, são procuradas novas mutações, utilizando técnicas de *Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)*<sup>20,21</sup>, *Denaturing High-performance Liquid Chromatography (DHPLC)*<sup>22</sup> ou sequenciação directa dos vários exões e regiões não codificantes do gene CYP21<sup>1</sup>.

No âmbito pré-natal, as técnicas moleculares têm uma posição relevante quer ao nível do diagnóstico quer ao nível terapêutico<sup>9</sup>. Ao nível do diagnóstico é mais fiável e sensível, excluindo com maior precisão outras patologias<sup>9</sup>. Ao nível terapêutico previne a corticoterapia de mulheres grávidas cujos fetos têm historial familiar de HSC<sup>9</sup>. Usualmente, as mulheres grávidas com uma probabilidade acrescida de terem filhos com a HSC são submetidas a tratamentos profiláticos com dexametasona de forma a suprimir o efeito dos androgénios em excesso no desenvolvimento da genitália do feto. Assim, por uma análise molecular às células fetais é possível detectar a presença de mutações no gene CYP21 e, conseqüentemente, saber se é necessário ou não a realização do tratamento até ao termo da gestação<sup>9</sup>.

Alguns autores mostraram que sinais de hiperandrogenemia, nomeadamente o acne, o hirsutismo e a infertilidade, comuns na população, podem ser causados por mutações no gene CYP21, sendo estes indivíduos submetidos a terapias não dirigidas para uma deficiência funcional e parcial da 21-hidroxilase<sup>12</sup>. A título de exemplo, terapia para os casos de infertilidade em indivíduos com a forma não clássica de HSC não diagnosticados, podem levar a custos exorbitantes e sem sucesso, os quais poderiam ser resolvidos através de uma medicação por via oral de baixo custo, como com os glucocorticóides. Por este motivo, é sugerido que no caso de haver sinais fenotípicos inespecíficos, deve ser realizada uma análise molecular que, apesar de ser relativamente dispendiosa, permite excluir/diagnosticar a HSC evitando, deste modo, uma terapia não adequada<sup>12</sup>.

## **2. Objectivos**

As mutações no gene codificador da 21-hidroxilase, o CYP21, são uma das principais causas da hiperplasia da supra-renal congénita e de sinais fenotípicos como hirsutismo e alterações menstruais, frequentemente não diagnosticadas como HSC. A dificuldade encontrada no diagnóstico dos indivíduos com a forma FNC da HSC poderá estar associada à variabilidade de mutações presentes no gene CYP21, à homozigotia/heterozigotia de uma dada mutação, bem como à presença de várias mutações em um e/ou em ambos os alelos.

Assim, pretendemos com este estudo:

1. otimizar as técnicas utilizadas para sequenciar o gene CYP21;
2. estudar o espectro de mutações nos exões e nos intrões 1, 2 e 7 do gene CYP21 em pacientes com a forma não clássica de hiperplasia supra-renal congénita e em pacientes com sinais e sintomas suspeitos da mesma forma da doença;
3. estudar possíveis associações entre as mutações encontradas e os fenótipos descritos;
4. determinar as frequências alélicas das mutações encontradas nos dois diferentes grupos de pacientes para avaliar a possível existência de um perfil mutacional característico de cada grupo.

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Amostras

De 39 indivíduos foi realizada a colheita de 5 mL de sangue periférico em tubos com EDTA para análise do espectro mutacional do gene CYP21. Dos 39 indivíduos, 17 são de origem portuguesa, do sexo feminino, com um diagnóstico da forma não clássica da HSC (grupo A) e 22 são de origem turca, de ambos os sexos, com um fenótipo sugestivo de HSC (grupo B). Os indivíduos do grupo A foram caracterizados clinicamente, apresentando hirsutismo, irregularidades na menstruação e níveis de 17-hidroxiprogesterona elevados. Dos indivíduos do grupo B não é conhecido qualquer estudo complementar realizado, tendo sido as amostras enviadas para a Unidade de Prestação de Serviços de Susceptibilidade Genética (UPSS) do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP) para uma avaliação do espectro mutacional do gene CYP21.

#### 3.2. Extração de DNA

O DNA genómico foi extraído a partir de 1mL de sangue periférico colhido em EDTA, no extractor automático MagNA Pure LC (Roche, Indianopolis), utilizando o kit *MagNA Pure LC DNA Isolation Kit – Large Volume* (Roche, Indianopolis), segundo o protocolo do fornecedor.

A concentração e o grau de pureza do DNA extraído foram determinados por leitura espectrofotométrica no Nanadrop (Thermo Scientific, Waltham) aos comprimentos de onda 230nm, 260nm e 280nm, segundo as razões 260/230 e 260/280. A qualidade do DNA foi avaliada por electroforese em gel de agarose a 0,8%.

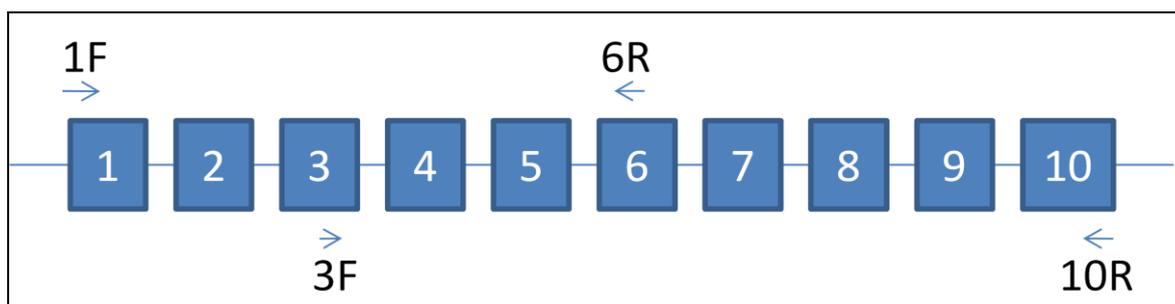
#### 3.3. Amplificação do gene CYP21

A amplificação do gene CYP21 foi realizada pela técnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR) no termociclador MyCycler Personal Thermal Cycler (*Biorad, Hercules*), utilizando o kit *Multiplex PCR Using Q-solution* (*Quiagen, Frankfurt*). A mistura da

reação foi preparada de forma a todos os reagentes estarem com uma concentração final igual à descrita no protocolo do kit. A quantidade de DNA utilizada para a amplificação foi de 50 a 100ng por mistura de reação. Para cada amostra foram realizadas duas reações de PCR, utilizando, em cada uma, um par de primers específico (Tabela 1) e complementares a sequências presentes nos exões 1 e 6, 3 e 10 (Figura 4), originalmente descritos por Loidi *et al*<sup>1</sup>. Após otimização de algumas etapas da técnica do PCR, nomeadamente da temperatura e da duração do *annealing*, do tempo da extensão e do número de ciclos, as reações de amplificação foram realizadas de acordo com as condições registadas na Tabela 2.

**Tabela 1 - Sequência dos dois pares de primers utilizados nas reações de amplificação do gene CYP21 e tamanho dos respectivos produtos de amplificação.**

Primers	Produto amplificado
Forward (1F): 5'-TCGGTGGGAGGGTACCTGAAG-3'	1517 bp
Reverse (6R): 5'-GCATCTCCACGATGTGA-3'	
Forward (3F): 5'-TGTCCTTGGGAGACTACTCC-3'	2214 bp
Reverse (10R): 5'-ACCTCTCGCACCCCAGTATGACT-3'	



**Figura 4 - Representação esquemática do local de emparelhamento dos primers utilizados nas reações de amplificação do gene CYP21 pela técnica de PCR.**

De forma a avaliar a qualidade da técnica de PCR as misturas pós-reação de PCR (5µL) foram submetidas a uma electroforese horizontal em gel de agarose a 2% em TBE-1x com brometo de etídio durante 15 a 20 minutos a 100-150V para a visualização dos

produtos de amplificação. A observação do gel com luz ultravioleta permite distinguir duas bandas: uma banda de 1517bp que corresponde ao produto de amplificação obtido com o par de primers 1F-6R; e uma banda de 2214bp relativa ao produto de amplificação obtido com o par de primers 3F-10R (Tabela 1).

**Tabela 2 - Registo da temperatura, da duração e do número de ciclos das diferentes etapas da técnica de PCR otimizada para os pares de primers utilizados.**

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>N.º de ciclos</b>
<i>Desnaturação</i>	95	15'	1
<i>Desnaturação</i>	95	1'	
<i>Annealing</i>	60	45''	39
<i>Extensão</i>	72	2'30''	
<i>Extensão</i>	60	20'	1

### **3.4. Purificação dos produtos de PCR**

O produto de amplificação obtido pelo par de primers 1F-6R foi purificado segundo o protocolo descrito por Werl et al<sup>23</sup>, de forma a eliminar os primers e os dNTPs livres presentes na mistura pós reaccional. Para tal, após a adição de 1 µL da enzima exonuclease e 0,5 µL da enzima FasAp a 5 µL da mistura pós reaccional, esta foi incubada a uma temperatura de 37°C durante 15 minutos, para ocorrer a digestão dos primers e de possível DNA em cadeia simples, bem como dos dNTPs livres, seguida de uma incubação a 85°C durante 15 minutos para inactivação das duas enzimas.

O produto de amplificação obtido pelo par de primers 3F-10R foi isolado através do corte da banda de 2214 bp, obtida após electroforese da mistura pós reaccional, e foi purificado por cromatografia. Para a purificação do produto de amplificação foi utilizado o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Piscataway)*, tendo sido efectuado o protocolo recomendado pelo fabricante.

### 3.5. Reacção de Sequenciação

A reacção de sequenciação dos produtos de amplificação purificados foi realizada com o kit BigDye Terminator Kit (*Applied Biosystems, Foster City*) no termociclador da MyCycler Personal Thermal Cycler (*Biorad, Hercules*). A mistura da reacção de sequenciação foi preparada de forma a todos os reagentes estarem com a concentração final sugerida pelo fabricante do kit, tendo sido usado 1,5µl de produto de amplificação por mistura reaccional. Numa primeira fase foram utilizados os dois pares de primers usados para a amplificação do gene CYP21 conjuntamente com o seguinte par de primers intermédios: iF: 5'-CTGCATTCTCATGCTTCCTGC-3' e iR: 5'-CTGGAGTTAGAGG-CTGGCCA-3'. Devido à leitura de alguns dos produtos sequenciados ser difícil, houve necessidade de desenhar um outro conjunto de primers para proceder a uma nova reacção de sequenciação e subsequente leitura. Na Tabela 3 está registada a sequência desses primers bem como os exões sequenciados pelos mesmos.

**Tabela 3 - Registo da sequência dos primers utilizados na reacção de sequenciação do gene CYP21 e os exões sequenciados com cada primer.**

<b>Primers</b>	<b>Exões sequenciados</b>
1F 5'-TCGGTGGGAGGGTACCTGAAG-3'	1 a 2
A: 5'-GAAGAAGGTCAGGCCCTC-3'	3 a 5
B: 5'-GAGAGGCTGGGGTGGAGGGAG-3'	6 a 7
C: 5'-GCTGAGGGAGCGGCTGGAGGC-3'	8 a 9
D: 5'-GTGGTGGAGGCTGGTCCCCG-3'	10

Na Tabela 4 está indicada a descrição do programa utilizado na reacção de sequenciação dos produtos de amplificação, independente do conjunto de primers usados, após optimização de alguns parâmetros (temperatura e duração dos diferentes passos).

Tabela 4 - Registo das condições optimizadas (temperatura e duração das diferentes etapas) para a sequenciação dos produtos de amplificação do gene CYP21.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>	<b>N.º de ciclos</b>
<i>Desnaturação</i>	95	5'	1
<i>Desnaturação</i>	94	30''	
<i>Annealing</i>	60	1'	35
<i>Extensão</i>	72	1'30''	
<i>Extensão</i>	72	10'	1

### 3.6. Purificação dos produtos de sequenciação

A purificação dos produtos de sequenciação foi realizada por cromatografia utilizando colunas de Sephadex G50 (*GE Healthcare, Piscataway*). Após uma lavagem da coluna, foi adicionado o produto de sequenciação, tendo sido recolhido o produto purificado através de uma centrifugação a 4400rpm durante 4 minutos.

### 3.7. Sequenciação

Após a desnaturação dos produtos da reacção de sequenciação purificados, através da adição de 12µl de formamida (*GE Healthcare, Piscataway*), os produtos foram sequenciados no sequenciador automático *ABI 3130 XL Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City)*. As sequências foram analisadas por comparação com a sequência normal do gene CYP21A2 (*Ensembl protein\_coding Gene: ENSG00000168482*), tendo sido registadas todas as alterações detectadas nos exões e nos intrões 1, 2 e 7.

### **3.8. Análise estatística**

A análise dos resultados foi realizada através da estatística descritiva, por determinação das frequências absolutas e relativas dos indivíduos com mutações no gene CYP21 por grupos fenotípicos, assim como das frequências alélicas das diferentes mutações encontradas. Para tabulação dos dados e construção gráfica utilizou-se o programa *Microsoft Excel, Microsoft Office 2007*.

## 4. Resultados

### 4.1. Qualidade e concentração do DNA extraído

O DNA genómico extraído dos leucócitos do sangue periférico de todas as amostras apresentou valores na razão de 260/280 e de 260/230 entre 1,8 e 2,0, facto que demonstra não ter havido contaminação por proteínas ou sais. A qualidade do DNA dessas amostras foi avaliada através da observação do DNA, após ser submetido a uma electroforese em gel de agarose a 0,8%, com luz ultravioleta, não se detectando qualquer rasto (Figura 5) que corresponde a não ter havido degradação do DNA durante todo o processo de extracção.



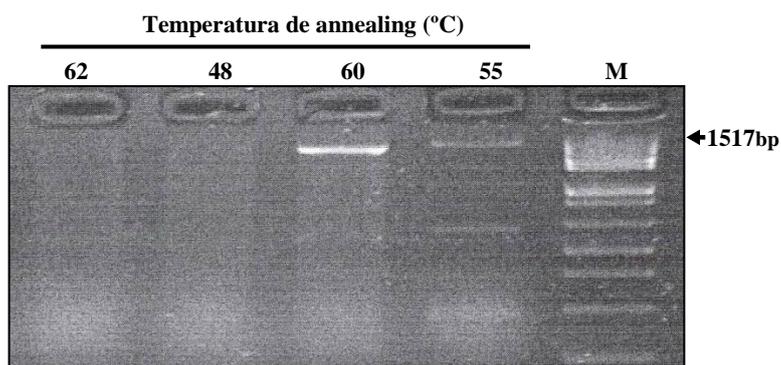
Figura 5 - Fotografia exemplificativa da qualidade do DNA extraído das amostras. Gel de Agarose a 0,8% onde são observadas bandas de DNA de alto peso molecular sem rasto.

Após a quantificação e avaliação da qualidade do DNA, as amostras de DNA foram diluídas, quando necessário, para obtenção de uma concentração entre 50 e 100ng/ $\mu$ l.

### 4.2. Optimização do PCR e purificação dos produtos de amplificação

Antes de se ter iniciado à amplificação do gene CYP21 das amostras de DNA do presente estudo, procedeu-se à optimização da temperatura e da duração das várias etapas da reacção, nomeadamente das temperaturas de desnaturação e de *annealing*, tendo sido utilizadas as condições em que foram obtidos melhores resultados para a obtenção de uma boa amplificação com o mínimo de produtos de amplificação inespecíficos.

Exemplificando, no estudo da melhor temperatura de *annealing* verificou-se que a temperatura de 60°C é a melhor, quer se use o par de primers 1F-6R quer se use o par de primers 3F-10R. Na verdade, os produtos de amplificação obtidos na reacção de PCR com o par de primers 1F-6R quando se usa uma temperatura de *annealing* de 60°C, são visualizados à luz ultravioleta após electroforese em gel de agarose a 2% sob a forma de uma única banda com um peso molecular de 1517bp, que corresponde ao esperado (Figura 6).



**Figura 6 - Produtos de amplificação obtidos na reacção de PCR com o par de primers 1F-6R a diferentes temperaturas de annealing. M – Marcador de peso molecular.**

No entanto, a esta temperatura de *annealing* os produtos de amplificação obtidos com os primers 3F-10R não são apenas os presentes na banda de 2214bp mas também os presentes noutras bandas inespecíficas (Figura 7), facto que revela a existência de amplificação inespecífica com este par de primers quando se usa a temperatura de *annealing* de 60°C. É de salientar que esta temperatura de *annealing* (60°C) foi a que originou menor quantidade de produtos de amplificação inespecíficos (Figura 7).

Uma das formas para a resolução deste problema foi realizar a reacção de PCR com a temperatura de *annealing* para a qual se obtinha uma maior amplificação do produto de amplificação de 2214bp e menor amplificação de produtos inespecíficos (temperatura de *annealing* de 60°C) e optar por um método de purificação que permita excluir os produtos de amplificação não específicos. Assim, após a electroforese dos produtos de amplificação obtidos com o par de primers 3F-10R, a banda pretendida (2214bp) foi cortada do gel de agarose, tendo sido purificado o produto de amplificação presente na referida banda por cromatografia.

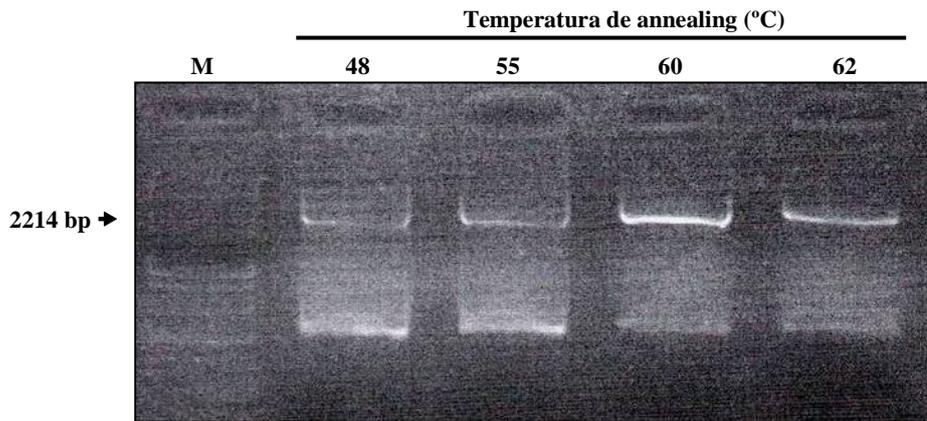


Figura 7 - Produtos de amplificação obtidos na reacção de PCR com o par de primers 3F-10R a diferentes temperaturas de annealing. M- Marcador de peso molecular.

### 4.3. Sequenciação dos produtos amplificados

O primeiro exão a ser sequenciado foi o 7, por ser o exão com maior frequência mutacional nos casos de FNC de HSC<sup>3,4,8,11,12</sup>. Verificou-se uma percentagem significativa de mutações no exão 7 nos indivíduos com diagnóstico clínico de FNC (64,7%), enquanto que foi encontrada apenas uma mutação num dos alelos dos indivíduos com fenótipo sugestivo desta forma de HSC.

Uma vez que não foram encontradas mutações explicativas dos fenótipos observados em vários indivíduos de ambos os grupos, procedeu-se à sequenciação dos restantes exões deste gene.

Os primers utilizados para a sequenciação de todos os exões do CYP21 foram os utilizados no PCR conjuntamente com dois primers internos. Os produtos de sequenciação obtidos são muito longos, facto que leva a que haja uma baixa sensibilidade na técnica e, conseqüentemente, uma leitura incompleta (Figura 8A e 8B). Assim, foram desenhados novos primers, de forma a serem obtidos produtos de sequenciação mais pequenos, sem sobreposição da sequenciação de determinadas regiões do gene CYP21 em diferentes produtos de sequenciação, assim como tentar que cada exão pudesse ser lido numa só sequência.

A utilização dos novos pares de primers na reacção de sequenciação permitiu uma análise fácil e rápida dos produtos sequenciados (Figura 8C) e a uma diminuição do

número de reacções de sequenciação (de seis para cinco reacções de sequenciação), que se repercute nos custos e tempo gasto na sequenciação.

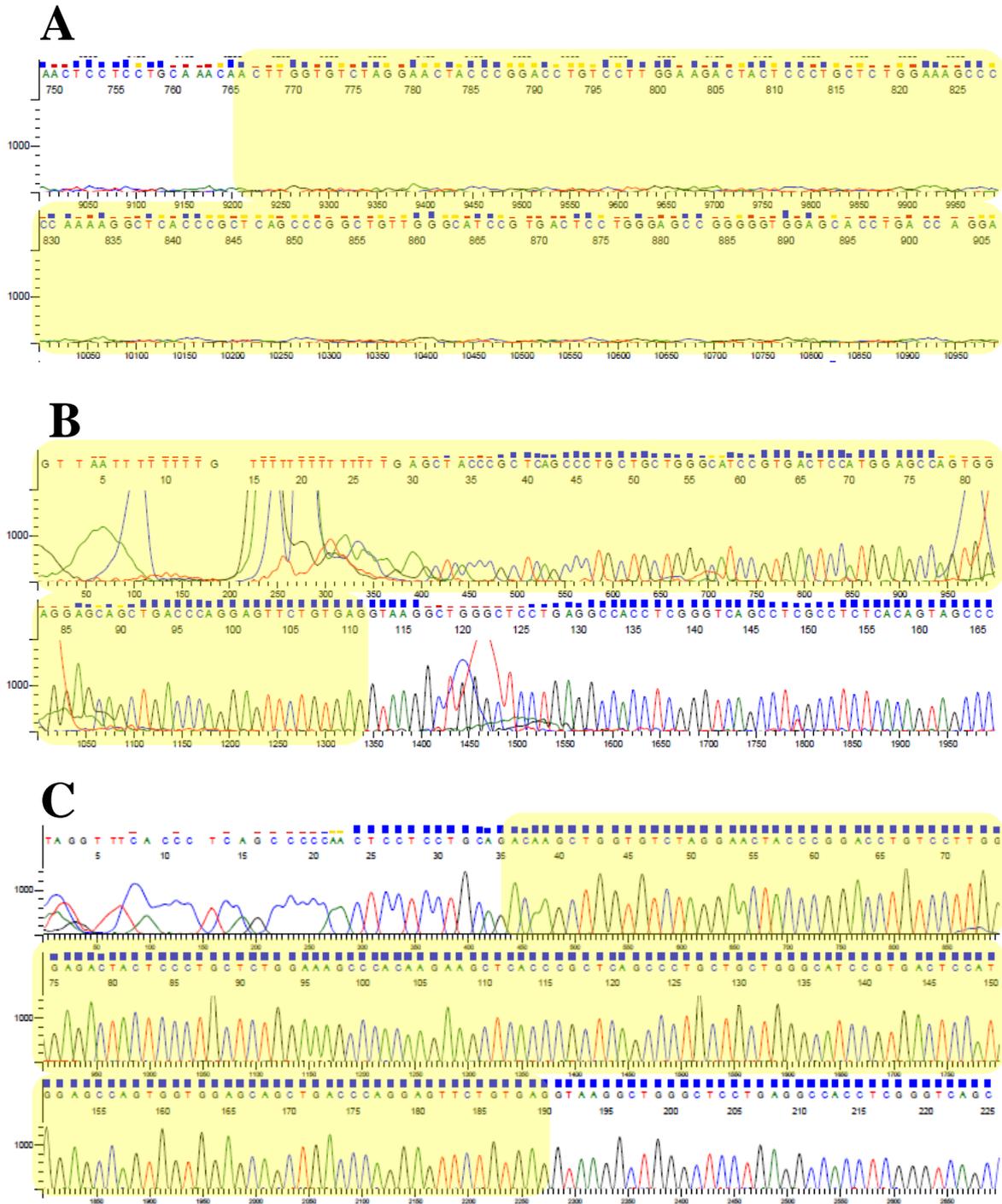


Figura 8 - Produtos de sequenciação obtidos com diferentes primers para leitura do exão 3. A- Utilizando o primer 1F há uma perda da qualidade da sequência, impossibilitando a leitura. B - Utilizando o primer 3F só é possível ler a extremidade 3' do exão 3. C - Com o primer A é possível ler a sequência completa do exão 3. O sombreado corresponde à sequência do exão 3 para exemplificação.

Com estes novos primers, não foram detectadas quaisquer alterações na sequência dos exões 2, 5 e 9, tendo sido encontradas algumas mutações nos outros exões (Tabela 5). As mutações encontradas no presente estudo já foram descritas em estudos anteriores, tendo-lhe sido associado o fenótipo normal ou um dos fenótipos da HSC<sup>4</sup>.

**Tabela 5 - Registo das mutações detectadas no gene CYP21 por sequenciação. Fenótipo associado: adaptado de Speiser e White<sup>4</sup>.**

Denominação da mutação	Posição e Alteração de Nucleótidos	Exão	Fenótipo Associado <sup>4</sup>
-L9	28 -CTG	1	Normal
K102R	684 A→G	3	
S268T	1647 G→C	7	
S493N	2702 A→G	10	
V281L	1685 G→T	7	Forma Não Clássica
I172N	1001 T→A	4	Forma Clássica
I236N	1382 T→A	6	
V237E	1385 T→A	6	
+T 306	1756 +T	7	
G318X	1996 C→T	8	
del GG+insC 483	2672-2273 GG → C	10	

É de referir, que neste estudo foi detectada uma mutação não descrita, nomeadamente a deleção CTG no aminoácido 9 (Tabela 5). Outros estudos encontraram, no mesmo local, uma inserção deste trinucleótido<sup>4</sup>.

Uma análise detalhada à Tabela 5 revela que na população em estudo foram encontrados polimorfismos não associados a uma alteração da actividade da enzima 21-hidroxilase, e mutações associadas à HSC.

Relativamente às mutações associadas à HSC, a mutação V281L é a mais frequente (Tabela 6), estando esta associada à FNC<sup>4</sup>, enquanto que restantes mutações apresentam frequências alélicas muito baixas e estão associadas à forma clássica da HSC (Tabela 6).

Os diferentes polimorfismos detectados apresentaram frequências alélicas semelhantes entre si (Tabela 6).

Tabela 6 - Frequência alélica das diferentes mutações detectadas nos exões do gene CYP21 e sua distribuição nos grupos de indivíduos com diagnóstico clínico de FNC (Grupo A) e com suspeita de FNC (Grupo B).

<b>Alteração</b>	<b>Grupo A n (%)</b>	<b>Grupo B n (%)</b>	<b>Total n (%)</b>
<b>-L9</b>	3 (8,8)	20 (45,5)	<b>23 (29,5)</b>
<b>K102R</b>	2 (5,9)	21 (47,7)	<b>23 (29,5)</b>
<b>S268T</b>	2 (5,9)	2 (4,5)	<b>4 (5,1)</b>
<b>S493N</b>	4 (11,8)	20 (45,5)	<b>24 (30,8)</b>
<b>V281L</b>	13 (38,2)	1 (2,3)	<b>14 (18,0)</b>
<b>I172N</b>	1 (2,9)	0 (0,0)	<b>1 (1,3)</b>
<b>I236N</b>	1 (2,9)	0 (0,0)	<b>1 (1,3)</b>
<b>V237E</b>	1 (2,9)	0 (0,0)	<b>1 (1,3)</b>
<b>+T 306</b>	1 (2,9)	0 (0,0)	<b>1 (1,3)</b>
<b>G318X</b>	3 (8,8)	0 (0,0)	<b>3 (3,9)</b>
<b>del GG+insC 483</b>	2 (5,9)	0 (0,0)	<b>2 (2,6)</b>
<b>Número de alelos</b>	<b>34</b>	<b>44</b>	<b>78</b>

Avaliando este espectro de alterações no gene, verificamos que a sua frequência não é semelhante nos indivíduos com diagnóstico clínico de FNC (Grupo A) e nos indivíduos em que há uma suspeita da mesma forma (Grupo B). Assim, a mutação V281L é mais frequente no grupo A (38,2%) do que no grupo B (2,3%) (Tabela 6). Similarmente, a frequência alélica dos polimorfismos no grupo B (-L9, K102R e S493N) é muito superior à observada no grupo A (Tabela 6).

Avaliando o espectro mutacional de cada indivíduo, 66,7% dos indivíduos do presente estudo não apresentam mutações associadas à HSC. Na verdade, existe uma discrepância significativa quando esta frequência é analisada nos dois grupos em estudo, em que 95,45% dos indivíduos com suspeita de FNC (grupo B) não apresentam alterações

génicas com significado funcional versus 29,41% dos indivíduos com diagnóstico de FNC (grupo A). É de referir que apenas um indivíduo do grupo B, apresenta uma mutação descrita como tendo influência na actividade enzimática da 21-hidroxilase, sendo as restantes mutações detectadas nos indivíduos desse grupo, descritas como polimorfismos. Estes resultados apontam para a existência de alterações a nível intrónico com algum significado biológico, pelo que se procedeu à leitura dos intrões 1, 2 e 7, não se encontrando quaisquer alterações, nem mesmo as previamente descritas<sup>2,24,25</sup>.

Das mutações detectadas nos indivíduos de ambos os grupos foi efectuada a distribuição das mesmas mediante a presença de mutações em homozigotia e heterozigotia simples e composta (Figura 9 e Tabela 7).

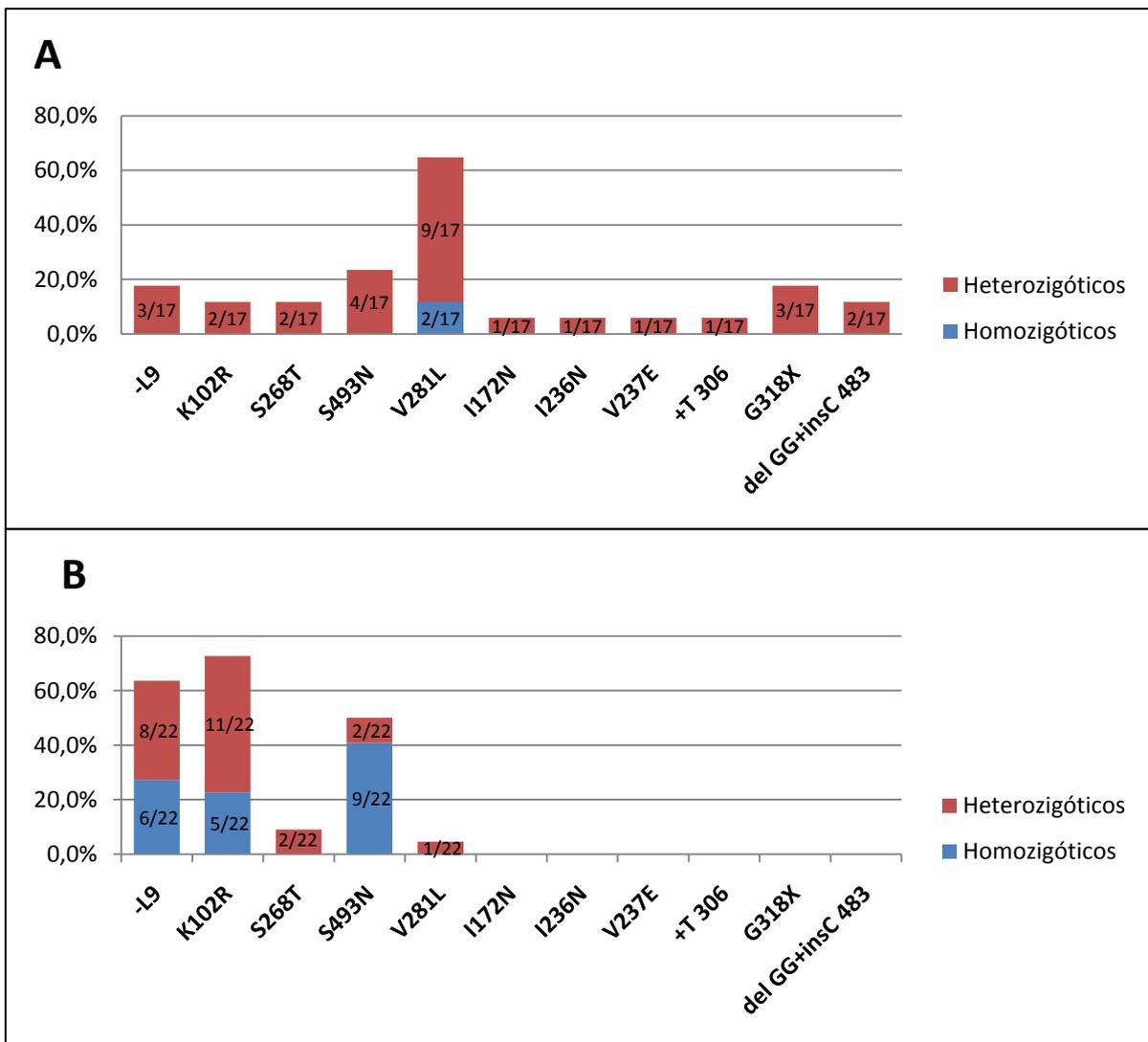


Figura 9 - Percentagem de indivíduos com mutações em homozigotia e heterozigotia. Gráfico A: Representação dos indivíduos com diagnóstico clínico de FNC (Grupo A). Gráfico B: Representação dos indivíduos com suspeita de FNC (Grupo B).

Uma análise dos gráficos da Figura 9 revela que as mutações presentes em homozigotia são raras, no global, e que estão presentes apenas nos polimorfismos -L9, K102R e S493N e na mutação V281L. Adicionalmente, verifica-se que 11 em 17 indivíduos do grupo A (64,7%) apresentam a alteração V281L.

Por análise dos resultados, foi verificado que 29,41% dos indivíduos do grupo com FNC da HSC (grupo A) e 86,36% dos indivíduos do grupo com suspeitas dessa forma da doença (grupo B) apresentam pelo menos um polimorfismo em homozigotia ou em heterozigotia.

Dos indivíduos com mutações associadas a alteração da actividade enzimática da 21-hidroxilase, foi analisado o seu espectro mutacional para averiguar a presença de outras mutações. Essa análise mostrou que 50% dos casos de heterozigotia correspondem a situações de heterozigotia composta (Tabela 7). É de salientar que os dois indivíduos que apresentam homozigotia para a mutação V281L no gene CYP21 não apresentam qualquer outro tipo de mutação com significado funcional no mesmo gene.

Tabela 7 - Registo dos casos em que foi detectada heterozigotia composta.

<b>Mutações em heterozigotia composta</b>	<b>Número de casos</b>
V281 e I172N	1
V281L, G318X e delGG+insC483	1
G318X e delGG+insC483	1
V281L e +T306	1
I236N, V237E, V281L e G318X	1

## 5. Discussão e Conclusão

A Hiperplasia Supra-renal congénita é uma doença metabólica caracterizada por deficiências na síntese das hormonas esteróides, cuja principal causa decorre de mutações no gene codificador da 21-hidroxilase – CYP21. A HSC é dividida nas formas clássica e não clássica, tendo a última uma caracterização fenotípica menos severa mas também de maior diversidade e ambiguidade<sup>3,4,8,11,12</sup>.

O presente estudo compreendeu indivíduos caracterizados ou com suspeita da forma não clássica da doença, pertencentes aos grupos A e B respectivamente. Em contraste com os pacientes da forma clássica, nos pacientes da FNC é prevista a existência de mutações menos graves, como a V281L, em homozigotia ou de uma mutação severa e uma menos grave, em heterozigotia composta<sup>26</sup>.

Por análise dos estudos já realizados (Tabela 8) é constatado que a mutação V281L no exão 7 é a mais frequente<sup>2,6,27-35</sup> tendo já sido associada à FNC<sup>3,4,8,11,12</sup>, pelo que se optou por começar o estudo pela análise deste exão.

**Tabela 8 - Frequências alélicas das principais mutações identificadas em indivíduos com FNC em populações diferentes. O sombreado realça a mutação com maior frequência.**

População	P30L	I2G	V281L	P453S	Referência
Espanha	1,7/-	7,7/-	71,8/37	4,2/-	2/27
Itália	7,7/3,5	8/15	57,7/43,3	-/5	28/29
França	2,7	14,3	51	6,2	30
Inglaterra	10	13,3	46	-	31
Alemanha	13,6	18,2	36,4	4,5	32
Suécia	11,1	5,5	38,8	5,5	33
Brasil	3,8/4,6	6/5,7	57,7/40,2	-/2,3	34/35
Portugal	30,7	32,7	94,2	-	6

No presente estudo, a alteração V281L foi identificada em 38,2% dos alelos dos indivíduos do grupo A, corroborando estudos anteriores<sup>2,6,27-35</sup>. Comparativamente aos

resultados obtidos num estudo a uma população portuguesa<sup>6</sup>, as frequências alélicas encontradas são significativamente diferentes. Contudo, é de salientar que esse estudo bem como o presente têm uma amostragem de indivíduos caracterizados com FNC baixa, nomeadamente de 26 e 17 respectivamente. Assim, para esclarecer o valor real da frequência alélica da mutação V281 na população portuguesa, será necessário realizar um estudo em grande escala.

No presente estudo, a grande maioria das mutações V281L nos indivíduos com a FNC da HSC ocorrem em heterozigotia, facto que apoia um estudo *in vitro* de Felix-Lopez, que demonstrou um efeito dominante da mutação V281L, sugerindo que esta mutação em heterozigotia pode explicar os sintomas observados em pacientes da referida forma clínica<sup>36</sup>. Outro estudo, mostrou que os indivíduos portadores da mutação V281L em heterozigotia têm um maior risco de desenvolver sintomas relativos a excesso de androgénios, comparativamente a indivíduos heterozigóticos para mutações severas no gene CYP21, não apresentando qualquer modelo que explique essa evidência<sup>37</sup>.

Uma análise detalhada das mutações encontradas no exão 7 mostra que em 66,7% dos indivíduos de ambos os grupos não se identificam mutações associadas à alteração da actividade enzimática da 21-hidroxilase, facto que conduziu ao estudo dos restantes exões, assim como de algumas zonas intrónicas. Na verdade, alguns estudos identificaram e descreveram quer alterações na região codificante associadas à HSC, quer alterações em regiões intrónicas<sup>2,24,25,38-41</sup>. No gene CYP21, foram identificadas três alterações nos intrões 1, 2 e 7 que estão envolvidas num incorrecto funcionamento do mecanismo de splicing, tendo sido associadas à HSC, particularmente à forma clássica<sup>2,4,24,25</sup>.

Aquando da sequenciação da totalidade do gene CYP21 surgiram vários problemas, pelo que foi necessário otimizar a técnica, nomeadamente desenhando novos primers. Com os novos primers, para as reacções de sequenciação, foram obtidas sequências do gene CYP21 que possibilitam uma leitura completa e sequencial de todos os exões e intrões. Adicionalmente, a utilização desses primers reduziu para cinco as reacções de sequenciação necessárias para a obtenção da sequência inteira do gene, diminuindo, ainda, o custo e o tempo dispendido por exame.

É de salientar que foram igualmente averiguadas as melhores condições para a reacção de PCR, não se conseguindo evitar a presença de bandas inespecíficas, no caso do produto de amplificação obtido com os primers 3F-10R. No entanto, após purificação dos

respectivos produtos, foi possível obter sequências de boa qualidade sem background relevante.

Como já referido, poderiam ter sido utilizadas outras técnicas para análise mutacional do gene CYP21, como o uso de enzimas de restrição<sup>18</sup>, PCR-multiplex com primers específicos para as diferentes mutações<sup>19</sup>, SSCP<sup>20,21</sup> ou DHPLC<sup>22</sup>. No entanto, a sequenciação está indicada para os estudos em que se pretende determinar o padrão mutacional de genes com alta taxa de mutações<sup>3</sup>. O gene codificante da 21-hidroxilase apresenta uma alta taxa de mutação<sup>3,6</sup>, estando presentes mutações com frequências muito baixas ou mutações de novo, as quais seriam dificilmente identificadas por outras técnicas<sup>3</sup>.

Após sequenciação com os novos primers foi possível avaliar o perfil mutacional de todos os indivíduos. Foram detectadas 11 tipos de alterações, apesar de apenas 7 delas estarem associadas a um decréscimo da actividade da enzima 21-hidroxilase, segundo o estudo de White e Speiser<sup>4</sup> (Tabela 9).

É de referir que na bibliografia consultada, não há consistência na denominação das mutações, assim como na posição do nucleótido(s) e respectivo aminoácido alterado (s). Tais disparidades podem explicar o facto de no presente estudo ter sido descrita uma deleção do trinucleótido CTG na posição 9 (aminoácido), contrariamente à inserção do mesmo trinucleótido descrita por Speiser e White<sup>4</sup>. Apesar disso, optou-se pela nomenclatura utilizada por estes investigadores uma vez ser a utilizada pela maioria dos estudos.

É de salientar que foram detectadas frequências baixas de mutações características da forma clássica da HSC, o que pode ser explicado pelo facto de essas alterações se manifestarem em heterozigotia, levando a que seja observado um fenótipo menos severo.

No grupo B, dos indivíduos com suspeita da FNC, apenas um apresentou a mutação V281L. A apresentação de sintomas sugestivos da FNC no grupo B, pode ser explicada por uma má avaliação por parte do clínico e/ou pela presença de outros factores, não relacionados com o défice na 21-hidroxilase, que se traduzam em manifestações semelhantes, como deficiências noutras enzimas envolvidas na síntese das hormonas esteróides, nomeadamente na 11-hidroxilase, na 3 $\beta$ -HSD e na 17-hidroxilase<sup>3,4,8,10</sup>, ou outras patologias que se traduzam em elevados níveis de androgénios<sup>7</sup>. O hirsutismo é um dos sinais de virilização que levanta a suspeita da forma não clássica de HSC, estando

descrito que 1 a 10% das mulheres hirsutas apresentam alterações no gene CYP21<sup>41</sup>. Na verdade, a presença deste e outros sinais de virilização numa mulher, pode dizer respeito não só a casos em que há um déficit na 21-hidroxilase, como a casos de tumores produtores de androgénios ou do Síndrome do Ovário Policístico, pelo que deve ser realizado um correcto diagnóstico diferencial<sup>7,42</sup>.

**Tabela 9 - Mutações detectadas e respectivo significado funcional (adaptado de White e Speiser<sup>4</sup>).**

<b>Denominação</b>	<b>Actividade enzimática</b>	<b>Fenótipo</b>
<b>-L9</b>	100%	Normal
<b>K102R</b>	100%	Normal
<b>S268T</b>	100%	Normal
<b>S493N</b>	100%	Normal
<b>V281L</b>	<b>20-50%</b>	FNC
<b>I172N</b>	<b>1%</b>	FVS
<b>I236N</b>	<b>0%</b>	FPS
<b>V237E</b>	<b>0%</b>	FPS
<b>+T 306</b>	<b>0%</b>	FPS
<b>G318X</b>	<b>0%</b>	FPS
<b>del GG+insC 483</b>	<b>0%</b>	FPS

A grande maioria das alterações génicas observadas nos indivíduos do grupo B não está associada à alteração funcional da 21-hidroxilase<sup>4</sup>. Curiosamente a frequência dessas alterações no grupo A foi muito baixa. Provavelmente, essas alterações génicas serão polimorfismos presentes na população normal turca, uma vez que uma grande percentagem de indivíduos do grupo B as apresenta (86,36%). No entanto, no presente estudo não é possível tirar uma conclusão devido ao pequeno número de indivíduos constituintes deste

grupo (22). Para averiguar a possibilidade de as alterações génicas encontradas serem polimorfismos ou terem algum significado biológico seria necessário realizar um estudo exaustivo na população turca, em indivíduos aparentemente saudáveis e sem historial familiar de HSC, para caracterização das referidas alterações.

O grupo A é constituído por indivíduos com espectros mutacionais distintos. Neste grupo foram identificados indivíduos em homozigotia para uma alteração não severa (V281L), assim como indivíduos em heterozigotia simples e composta. Contudo, todos os indivíduos apresentam fenótipos semelhantes, facto que sugere a existência de outros factores envolvidos. Já foi evidenciado que deficiências na conversão eficiente dos androgénios adrenais, níveis de expressão dos genes codificantes dos receptores de androgénios e sua afinidade para a testosterona e disidrotosterona podem explicar as diferenças fenotípicas para o mesmo espectro mutacional<sup>3,10</sup>. Um estudo numa população sueca, revelou numa família afectada com Hiperplasia Supra-renal Congénita a presença de uma mutação no receptor de androgénios<sup>43</sup>. Similarmente, outros genes ou mesmo factores ambientais poderão influenciar as manifestações clínicas de indivíduos com mutações no gene CYP21.

Várias mutações nas regiões intrónicas do gene CYP21 foram descritas, nomeadamente nos locais de splicing, tendo sido associadas à HSC<sup>2,24,25</sup>. Um estudo identificou num indivíduo com a forma não clássica da HSC uma mutação num local de splicing do gene CYP21 em heterozigotia composta com uma alteração na região promotora do mesmo gene<sup>38</sup>. Nesse estudo não foram identificadas outras alterações no gene CYP21, pelo que os autores apontaram que a heterozigotia composta na região intrónica fosse responsável pelo fenótipo apresentado. No nosso estudo não foram detectadas alterações nos locais de splicing, mas há a possibilidade de existirem mutações na região promotora do gene CYP21. Mutações na região promotora do CYP21 foram igualmente descritas e vários estudos apontam para que estejam na origem de alterações da expressão da 21-hidroxilase<sup>38-41</sup>. Chin e seus colaboradores, demonstraram *in vitro* que uma alteração do nucleótido G na posição -104 reduz a taxa transcrição do gene CYP21 em 80%<sup>41</sup>.

Estudos recentes têm identificado outras mutações no gene CYP21 associadas à HSC<sup>44-47</sup>. Apesar de, no presente estudo, as mutações terem sido detectadas pelo método de

sequenciação, não foram identificadas outras mutações que não as descritas por Speiser e White<sup>4</sup>.

Actualmente, a genotipagem do CYP21 revela que a HSC é uma doença complexa com combinação de heterozigotia de mais de 90 diferentes alterações no referido gene<sup>48</sup>. Como referido na introdução, as mutações do gene CYP21 são agrupadas consoante o nível de actividade da 21-hidroxilase, *in vitro*, encontrada em células que apresentam essas mutações<sup>4</sup>. No entanto, seria interessante avaliar *in vitro* o efeito dessas mutações em heterozigotia composta nos níveis da actividade da enzima 21-hidroxilase.

No futuro, pretende-se alargar este estudo a uma amostragem mais significativa de ambas as populações de indivíduos (portuguesa e turca), assim como efectuar uma caracterização hormonal mais exaustiva, principalmente nos indivíduos de origem turca para excluir outro tipo de patologias, para validação dos resultados obtidos. Será também estudada a sequência da região promotora do gene CYP21, assim como a sequência dos genes codificadores de receptores de androgénios desses indivíduos com o intuito de caracterizar geneticamente ambas as populações e, assim, explicar o fenótipos encontrados.

## **6. Referências Bibliográficas**

1. Loidi L, Quinteiro C, Parajes S, et al. High variability in CYP21A2 mutated alleles in Spanish 21-hydroxylase deficiency patients, six novel mutations and a founder effect. *Clinical Endocrinology* 2006; 64: 330–6.
2. Koppens PFJ, Hoogenboezem T, Degenhart HJ. CYP21 and CYP21P variability in steroid 21-hydroxylase deficiency patients and in the general population in the Netherlands. *European Journal of Human Genetics* 2000; 8: 827–36.
3. Gonçalves J, Friães A, Moura L. Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2007; 9 (11).
4. White PC, Speiser PW. Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21- hydroxylase deficiency. *Endocrine Reviews* 2000; 21 (3): 245-64.
5. Endoh A, Yang L, Hornsby PJ. CYP21 pseudogene transcripts are much less abundant than those from the active gene in normal human adrenocortical cells under various conditions in culture. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1998; 137: 13–19.
6. Friães A, Rêgo AT, Aragüés JM, et al. CYP21A2 mutations in Portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia: Identification of two novel mutations and characterization of four different partial gene conversions. *Molecular Genetics and Metabolism* 2006; 88: 58–65.
7. Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia: Saunders. p. 1030-7.
8. Trakakis E, Basios G, Trompoukis P, et al. An update to 21-hydroxylase deficient congenital adrenal hyperplasia. *Gynecological Endocrinology* 2009; 1–9.
9. Nimkarn S, New MI. Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 300: 192–6.

10. Krone N, Arlt W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009; 23:181-92.
11. Speiser PW, Knochelhauer ES, Dewailly D, et al. A Multicenter Study of Women with Nonclassical Congenital Adrenal Hyperplasia: Relationship between Genotype and Phenotype. *Molecular Genetics and Metabolism* 2000; 71: 527-34.
12. New MI. Nonclassical 21-Hydroxylase Deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006; 91 (11): 4205–14.
13. Tusie-Luna MT, Speiser PW, Dunic M, et al. A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol Endocrinol* 1991; 5:685–92.
14. Speiser PW, New MI, White PC. Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14,DR1. *New England Journal of Medicine* 1998; 319:19–2.
15. Helmberg A, Tusie-Luna M, Tabarelli M, et al. R339H and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. *Mol Endocrinol* 1992; 6:1318–22.
16. Day DJ, Speiser PW, Schulze E. Identification of non-amplifying CYP21 genes when using PCR-based diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia (CAH) affected pedigrees. *Human Molecular Genetics* 1996; 5 (12): 2039–48.
17. Day JD, Speiser PW, et al. Detection of Steroid 21-Hydroxylase Alleles Using Gene-Specific PCR and a Multiplexed Ligation Detection Reaction. *Genomics* 1995; 29 (1): 152-62.
18. Yokoyama Y, Michio Teraoka M, Tsuji K. Rapid Screening Method to Detect Mutations in CYP21, the Gene for 21-Hydroxylase. *American Journal of Medical Genetics* 2000; 94: 28–31.
19. Concolino P, Mello E, Toscano V. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for the detection of CYP21A2 gene deletions/duplications in

Congenital Adrenal Hyperplasia: First technical report. *Clinica Chimica Acta* 2009; 402: 164–70.

20. Witchel SF, Smith MDR, Suda-Hartman M. Identification of CYP21 mutations, one novel, by single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis. *Human Mutation* 1999; 13 (2): 172.

21. Bobba A, Iolascon A, Giannattasio S. Characterisation of CAH alleles with non-radioactive DNA single strand conformation polymorphism analysis of the CYP21 gene. *Journal of Medical Genetics* 1997; 34: 223-8.

22. Zeng X, Witchel SF, Dobrowolski SF. Detection and assignment of CYP21 mutations using peptide mass signature genotyping. *Molecular Genetics and Metabolism* 2004; 82: 38–47.

23. Werle E, Schneider C, Renner M, et al. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Research* 1994; 22 (20): 4354-5.

24. Higashi, Y, Tanae A, Inoue H. Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P-450(C21)] deficiency in humans: Possible gene conversion products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; 85: 7486-90.

25. Lee HH, Chang SF. Multiple transcripts of the CYP21 gene are generated by the mutation of the splicing donor site in intron 2 from GT to AT in 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Endocrinology* 2001; 171: 397–402.

26. Tusie-Luna M, Traktman P, White PC. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *Journal of Biological Chemistry* 1990; 265: 20916–22.

27. Ezquieta B, Oliver, A, Gracia R, Gancedo, PG. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Human Genetics* 1995; 96: 198–204.

28. Carrera P, Bordone L, Azzani T, et al. Point mutations in Italian patients with classic, non-classic, and cryptic forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Human Genetics* 1996; 98: 662–5.
29. Balsamo A, Cacciari E, Baldazzi L, et al. CYP21 analysis and phenotype/genotype relationship in the screened population of the Italian Emilia-Romagna region. *Clinical Endocrinology* 2000; 53: 117–25.
30. Deneuve C, Tardy V, Dib A, et al. Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86: 207–13.
31. Rumsby G, Avey CJ, Conway GS, Honour JW. Genotype-phenotype analysis in late onset 21-hydroxylase deficiency in comparison to the classical forms. *Clinical Endocrinology* 1998; 48: 707–11.
32. Krone N, Braun A, Roscher AA. Predicting Phenotype in Steroid 21-Hydroxylase Deficiency? Comprehensive Genotyping in 155 Unrelated, Well Defined Patients from Southern Germany. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000; 85(3).
33. Wedell A, Thilgn A, Ritzfin M, et al. Mutational Spectrum of the Steroid 21-Hydroxylase Gene in Sweden: Implications for Genetic Diagnosis and Association with Disease manifestation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994; 78(5).
34. Torres N, Mello MP, Germano CMR, et al. Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the CYP21A1P to the CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2003; 3: 1311-8.
35. Bachega T, Billerbeck AE, Madureira G, et al. Molecular Genotyping in Brazilian Patients with the Classical and Nonclassical Forms of 21-Hydroxylase Deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83 (12): 4416-9.
36. Felix-Lopez X, Riba L, Ordonez-Sanchez ML, et al. Steroid 21-hydroxylase (P450c21) naturally occurring mutants I172N, V281L and I236N/V237E/M239K exert a dominant negative effect on enzymatic activity when co-expressed with wildtype protein. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2003; 16: 1017–24.

37. Admoni O, Israels S, Lavi I, et al. Hyperandrogenism in carriers of CYP21 mutations: the role of genotype. *Clinical Endocrinology* 2006; 64: 645–51.
38. Araújo RS, Mendonça BB, Barbosa AS, et al. Microconversion between CYP21A2 and CYP21A1P Promoter Regions Causes the Nonclassical Form of 21-Hydroxylase Deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007; 92 (10): 4028–34.
39. Araujo RS, Billerbeck AE, Madureira G, et al. Substitutions in the CYP21A2 promoter explain the simple-virilizing form of 21-hydroxylase deficiency in patients harboring P30L mutation. *Clinical Endocrinology* 2005; 65:132-6.
40. Bobba A, Marra E, Lattanzio P, et al. Characterization of the CYP21 Gene 5' Flanking Region in Patients Affected by 21-OH Deficiency. *Human Mutation* 2000; 15 (5): 481.
41. Chin KK, Chang SF. The –104G nucleotide of the human CYP21 gene is important for CYP21 transcription activity and protein interaction. *Nucleic Acids Research* 1998; 26 (8): 1959-64.
42. Goodarzi MO, Azziz R. Diagnosis, epidemiology, and genetics of the polycystic ovary syndrome. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006; 20 (2): 193-205.
43. Giwercman YL, Nordenskjö A, Ritze EM, et al. An Androgen Receptor Gene Mutation (E653K) in a Family with Congenital Adrenal Hyperplasia due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency as well as in Partial Androgen Insensitivity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002; 87 (6): 2623–8.
44. Levo A, Partanen J. Novel mutations in the human CYP21 gene. *Prenatal Diagnosis* 2001; 21 (10): 885-9.
45. Lau IF, Soardi FC, Lemos-Marini S, et al. H28\_C Insertion in the CYP21 Gene: A Novel Frameshift Mutation in a Brazilian Patient with the Classical Form of 21-Hydroxylase Deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001; 86 (12): 5877–80.

46. Baradaran-Heravi A, Vakili R, Robins T, et al. Three novel CYP21A2 mutations and their protein modelling in patients with classical 21-hydroxylase deficiency from northeastern Iran. *Clinical Endocrinology* 2007; 67 (1): 335–41.

47. Concolino P, Vendittelli F, Mello E, et al. Two Novel CYP21A2 Missense Mutations in Italian Patients with 21-Hydroxylase Deficiency: Identification and Functional Characterisation. *Life* 2009; 61 (3): 229–35.

48. Stenson PD, Ball EV, Mort M, et al. *Human Gene Mutation Database* 2003; 21: 577–81.