

VARIANTES GENÉTICAS DO GENE CYP21A2 ASSOCIADAS À HIPERPLASIA ADRENAL CONGÊNITA POR SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL

Clebson Pantoja PIMENTEL

PIMENTEL, Clebson Pantoja. **Variantes genéticas do gene CYP21A2 associadas à hiperplasia adrenal congênita por simulação computacional.** Projeto de investigação científica do Curso de Biomedicina – Faculdade Integrada Brasil Amazônia (FIBRA), Belém, 2015.

A investigação teve como objetivos realizar diagnóstico molecular da hiperplasia adrenal congênita, determinar a frequência alélica e fenotípica das mutações no gene CYP21A2 e gerar modelos tridimensionais, utilizando modelagem por homologia molecular de sequências primárias da proteína 21-hidroxilase, além de simular os efeitos das mutações encontradas na estrutura proteica da enzima. A hiperplasia adrenal congênita (HAC) é uma das doenças metabólica autossômica recessiva mais comum, envolvendo diversas situações clínicas que têm em comum a deficiência total ou parcial de qualquer enzima envolvida na síntese de cortisol. A enzima 21-

hidroxilase (21OH) é codificada pelo gene CYP21A2, sendo responsável por cerca de 90 a 95% dos casos de HAC (BACHEGA, 2001). A doença possui uma forma severa (forma clássica) com virilização pré-natal da genitália externa de fetos femininos e virilização pós-natal em ambos os sexos, e uma forma leve (forma não clássica) em que os indivíduos permanecem assintomáticos ou desenvolvem sinais de virilização durante a infância, adolescência ou vida adulta. Diversos estudos têm demonstrado que o fenótipo clínico possui boa correlação com a mutação menos deletéria entre os dois alelos mutados do gene CYP21A2. Nessa patologia as mutações mais comuns são as de ponto, sugerindo que essas mutações de ponto resultam de conversão gênica (ARAÚJO, 2013). A investigação foi realizada em um total de 49 indivíduos do Estado do Pará. Para amplificação do DNA de interesse de cada participante, foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase. A confirmação da amplificação do DNA foi conduzida pela aplicação das amostras em eletroforese em gel de agarose. Para a detecção de mutações, utilizou-se o método de sequenciamento automático direto. A investigação de mutações que causam deficiência da

enzima 21OH foi realizada por meio de sequenciamento do gene *CYP21*, e revelou a presença de 27 mutações diferentes, a maioria das quais (89%), mutações de ponto. Também foram encontradas duas inserções de um par de bases (7,4%) e uma deleção de pequena extensão (3,7%). Todas as mutações foram identificadas em éxons, com exceção da IVS2 A/C→G, que se situa no segundo íntron. A mutação mais frequente foi a IVS2 A/C→G, encontrada em 20 indivíduos, 10 dos quais em homozigose, correspondendo a uma frequência alélica de 30,6% para essa mutação. A mutação Q318X foi a segunda mais comum (frequência alélica de 13,3%), tendo sido encontrada em 12 pacientes, 5 (cinco) dos quais heterozigotos simples e 7 (sete) heterozigotos compostos. Um paciente apresentou a mutação Q318X em homozigose simples. A mutação V281L foi encontrada em 7 (sete) pacientes (frequência alélica de 9,2%), sendo 2 (dois) homozigotos (um homozigoto simples e o outro com uma mutação adicional em heterozigose), e 5 (cinco) heterozigotos compostos. A mutação P30L foi identificada em 9 (nove) indivíduos (frequência alélica de 9,2%), todos em heterozigose, 6 (seis) dos quais com heterozigose composta. A inserção 1761T foi encontrada em 6 (seis)

pacientes (frequência alélica de 6,12%), todos em heterozigose, dos quais 5 (cinco) em heterozigose composta. A distribuição de frequências de mutações no gene da enzima é variável do ponto de vista geográfico e do ponto de vista étnico. A mutação IVS2 A/C → G tem sido a mais comumente encontrada nas populações europeias, asiáticas e norte-americanas já investigadas. Em pacientes do Chile e da Argentina é encontrada com frequências baixas (WITCHEL *et al.*, 2000, BACHEGA *et al.*, 2000). As frequências mais elevadas dessa mutação foram encontradas na África (35,3%) e Índia (22,7%), onde constitui a causa mais comum de deficiência de 21OH (KHARRAT *et al.*, 2004). A mutação Q318X tem sido encontrada em pacientes do sudeste do Brasil (frequência média igual a 11,6%) e em outros países da América do Sul (Chile e Argentina, frequência média de 10,8%) com frequências similares à observada nos pacientes de Belém do Pará (PAULINO *et al.*, 1999; BACHEGA *et al.*, 2000; WITCHEL *et al.*, 2000; FARDELLA *et al.*, 1998, 2000; DARDIS *et al.*, 1997; DAIN *et al.*, 2002), as quais são ligeiramente mais elevadas do que as observadas na maioria dos estudos realizados em pacientes da Europa e Ásia, ainda que, nesses

continentes, as frequências da mutação exibam considerável variação (CARRERA *et al.*, 1993; WEDELL *et al.*, 1994). A frequência observada da mutação V281L na amostra analisada (9,2%) é semelhante à média descrita em pacientes do sudeste brasileiro e em chilenos: 10,4% e 10,5%, respectivamente, porém é mais baixa do que a descrita para pacientes argentinos (24,7%) (BACHEGA *et al.*, 2000; WITCHEL *et al.*, 2000; FARDELLA *et al.*, 1998, 2000; DARDIS *et al.*, 1997; DAIN *et al.*, 2002). Em países asiáticos e nos Estados Unidos, as frequências médias dessa mutação são mais baixas: 3,4% e 4,6%, respectivamente, enquanto, na Europa, a frequência da mutação apresenta variação considerável (2,2% a 46%, com média igual a 13,6%). Na Inglaterra e na Espanha, essa mutação no gene *CYP21* é a mais comum, com frequências de 46% e 33,9%, respectivamente (RUMSBY *et al.*, 1998). Na Tunísia, a mutação V281L não foi detectada (KHARRAT *et al.*, 2004). A frequência observada da mutação P30L em pacientes do Estado do Pará (9,16%) foi superior às médias encontradas em pacientes do Chile e da Argentina (2,9%), da América do Norte - EUA (1,3%), e da Ásia (3,5%). A frequência dessa mutação é baixa na

maioria das populações europeias, mas na Eslovênia e na Romênia foi descrita como a segunda mutação mais importante, com frequências de 12,2% e 15,4%, respectivamente. Na Ásia, América latina e América no Norte as frequências da P30L são menores que as descritas na Europa, enquanto na Tunísia não foram encontrados pacientes com a mutação (KHARRAT *et al.*, 2004). A inserção de uma base timina na posição nucleotídica 1760 do gene *CYP21* foi encontrada com frequência relativamente elevada entre os pacientes com deficiência de 21OH do Estado do Pará (6,1%). Em pacientes do sudeste do Brasil, Paulino *et al.* (1999) encontraram essa mutação com frequência similar à observada no presente estudo (5,5%), mas WITCHEL *et al.* (2000) descreveram uma frequência de apenas 0,8% em outra amostra de pacientes. Essa inserção tem sido encontrada com frequência reduzida em pacientes da América do Norte, América Latina e na Ásia, enquanto, na Europa, apesar da mutação também ser rara, frequências mais elevadas foram encontradas na Hungria (5,1%), por FERENCZI *et al.* (1999). Pesquisa realizada no norte da África não detectou a inserção (KHARRAT *et al.*, 2004). A mutação I172N encontrada com frequência de apenas

3,1% nos pacientes com deficiência de 21OH do Estado do Pará tem sido descrita como a segunda mutação mais frequente em países da Ásia, América Latina e América do Norte. No Brasil, Bachegaet *et al.* (2000) relataram frequências elevadas da I172N em pacientes do Sudeste: 18,9% e 14%, respectivamente. A I172N é a terceira mutação mais frequente na Tunísia, com frequência de 10,8% (KHARRAT *et al.*, 2004). A metodologia de sequenciamento direto do gene *CYP21* possibilitou a detecção de mutações na maioria dos pacientes (98%). Contudo, em 8% dos indivíduos não se pôde determinar seguramente genótipo compatível com o diagnóstico clínico. A mutação com maior frequência encontrada foi a IVS2 A/C → G, descrita em 40,8% dos pacientes e 30,6% dos cromossomos. Essa mutação também é a mais frequente na maioria dos trabalhos com pacientes afetados por deficiência de 21OH publicados em diferentes países. A presença de uma mutação em heterozigose simples em combinação com um polimorfismo foi determinada em 63% dos pacientes com genótipo heterozigoto, indicando que possa haver uma relação entre a presença de um polimorfismo e manifestação clínica da HAC nestes pacientes. As

mutações de ponto apresentam maior importância na etiologia da deficiência de 21OH em comparação à deleção do gene *CYP21*, o que também é descrito por outras pesquisas de pacientes na América Latina, inclusive no Brasil. A combinação entre polimorfismos pode ser um fator determinante para uma redução significativa de atividade da enzima 21OH, pelo efeito sinérgico resultante da associação destes polimorfismos. Os pacientes que apresentaram apenas polimorfismos, bem como os indivíduos heterozigotos simples e o indivíduo que não apresentou nenhuma mutação ou polimorfismo podem apresentar mutações em genes de outras enzimas envolvidas na biossíntese de hormônios adrenais, como a 3 β -hidroxisteroide dihidrogenase, a 17 α -hidroxilase e a 11 β -hidroxilase, responsáveis por cerca de 5% dos casos de hiperplasia adrenal congênita, ou podem portar mutações em determinadas regiões não estudadas, como a região promotora do gene ou a região correspondente à inserção da calda poli – A. A relação entre a classificação clínica e o tipo de genótipo detectado nos pacientes apresentou resultados confirmatórios, sendo a gravidade do tipo de genótipo relacionada com a manifestação clínica nos

pacientes. O diagnóstico pré-natal de mutações no gene da enzima 21OH pode ser realizado por meio da metodologia deste trabalho, visando ao início do tratamento mais precoce e, assim, possibilitar que as sequelas relacionadas a HAC possam ser evitadas.

Palavras-chave: Hiperplasia Adrenal Congênita. Gene CYP21A2. Proteína 21-hidroxilase.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO M *et al.* (1996) Molecular analysis of *CYP21* and *C4* genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res* 29:1-13.

BACHEGA Tasset *al.* (2000) 21-Hydroxylase deficiency in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 33:1211-1216.

BACHEGA Tasset *al.* (2001) Tratamento da hiperplasia supra-renal congênita por Deficiência da 21-hidroxilase. *Arq Bras EndocrinolMetabol* 45:64-72.

CARRERA P. *et al.*(1993) Molecular characterization of 21-hydroxylase deficiency in 70 Italian patients. *Hum Hered* 43:190-196.

DAIN LB, *et al.* (2002) Classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency: a molecular study of Argentine patients. *ClinEndocrinol*56:239-245.

DARDIS A. *et al.* (1997). Mutations of the steroid 21-hydroxylase gene in an Argentinean population of 36 patients with classical congenital adrenal hyperplasia. *J PediatEndocrinol Met* 10:55-61.

FARDELLA CE. *et al.*(2000) Mutations in the *CYP21 B* gene in a Chilean population with simple virilizing congenital adrenal hyperplasia. *J Endocrinol Invest* 23:412-416.

FERENCZI A. *et al.* (1999) Screening for mutations of 21-hydroxylase gene in Hungarian patients with congenital adrenal hyperplasia. *J ClinEndocrinolMetab* 84:2369-2372.

KHARRAT M. *et al.* (2004) Molecular Genetic Analysis of Tunisian Patients with a Classic Form of 21- Hydroxylase Deficiency: Identification of Four Novel Mutations and High Prevalence of Q318X Mutation. *J ClinEndocrinolMetab* 89:368-374.

RUMSBY G. *et al.* (1998) Genotype-phenotype analysis in late onset 21-hydroxylase deficiency in comparison to the classical forms. *ClinEndocrinol* 48:707-711.

WEDELL A *et al.* (1993). Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. *Hum Mol Genet* 2:499-504.

WITCHEL SF. *et al.* (2000) The role of heterozygosity for *CYP21* in the polycystic ovary syndrome. *J PediatrEndocrinolMetab* 5:1315-1317.

WITCHEL SF *et al.* (2000) *CYP21* mutations in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet*106:414-419.