

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Deteção de mutações no gene *CYP21A2* em crianças com suspeita de Hiperplasia
Adrenal Congênita no Estado do Rio Grande do Sul**

Dissertação de Mestrado

Mayara Jorgens Prado

Porto Alegre, setembro de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Detecção de mutações no gene *CYP21A2* em crianças com suspeita de Hiperplasia
Adrenal Congênita no Estado do Rio Grande do Sul**

Mayara Jorgens Prado

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Maria Lúcia Rosa Rossetti

Comissão de acompanhamento: Dra. Cláudia Maria Dornelles da Silva
Dra. Fernanda Stanisquaski

Porto Alegre, setembro de 2016

Este trabalho foi realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul em parceria com o Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Hospital Materno Infantil Presidente Vargas. O financiamento foi realizado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Secretaria Estadual da Saúde (SES/RS).

Agradecimentos

À minha orientadora Professora Lúcia Rossetti pela oportunidade a mim dada, pela confiança e pelos ensinamentos.

À Dra. Cláudia Dornelles paciência, ensinamentos e confiança na realização dos experimentos.

À Dra. Cristiane Kopacek e Dra. Simone de Castro pela amizade e ótima parceria na tentativa de aprimorar o diagnóstico e os dados de HAC no estado.

À Professora Sidia Jacques por ter sido muito atenciosa e paciente, me auxiliando imensamente nas análises estatísticas.

À Professora Maricilda de Mello por me receber em seu laboratório, pelos valiosos conhecimentos, pela paciência e amizade. Ademais, a sua maravilhosa equipe de genética humana que me auxiliou grandemente no aprendizado de técnicas moleculares, especialmente à Taís, Pâmela e Débora.

À Rúbia Medeiros e Jacqueline Valverde pelos ensinamentos da técnica de multiplex minisequenciamento, pelos valiosos conselhos, pela paciência e pela amizade.

À Dra. Tarciana Grandi pela amizade, disposição e ótimos conselhos.

À Thaiane Rispoli pela linda amizade, pelo grande incentivo, pela troca de conhecimento e disposição em ajudar.

À toda equipe do CDCT/FEPPS, especialmente a Laura, Cíntia, Karen, Gabriel, Gabriela, Regina, Lila, Carolina, Leonardo, Sabrina, Elis, Vinicius, Ane, Martinha e Rosângela pela alegria diária e apoio.

Ao Professor Arnaldo Zaha pelos grandes aprendizados durante toda a minha vida acadêmica e por aceitar ser o revisor desta dissertação.

Aos professores Maricilda de Mello, Poli Mara Spritzer e Arnaldo Zaha por aceitarem compor a banca da minha dissertação, avaliando e enriquecendo este trabalho.

À Dra. Fernanda Stanisçuaski e a Dra. Cláudia Dornelles pelos auxílios e por aceitarem fazer parte da minha comissão de acompanhamento.

À Silvia Centeno e ao Luciano Saucedo por estarem sempre dispostos a ajudar, tirar dúvidas e auxiliar.

As minhas amigas de graduação, mestrado e vida, Amanda, Cristine, Luiza e Thaianne pela amizade e pelos inúmeros momentos de alegrias, conselhos e apoio. Amo vocês!

À minha família, em especial ao meu pai João, mãe Gladis, irmã Márcia, vó Tota, tia Otília e tia Marina pelo amor, ensinamentos e apoio incondicional durante toda a minha vida. Amo muito vocês!

Ao Mauro, meu grande amigo, companheiro e namorado por me acalmar, compreender e ajudar, aprendendo até biologia molecular e genética para me auxiliar na escrita desta dissertação.

Muito obrigada a todos!!!!

Resumo

A Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC) compreende um grupo de doenças autossômicas recessivas causadas por um defeito em uma das enzimas envolvidas na biossíntese do cortisol. Em 90% dos casos, a HAC é devido a deficiência na enzima 21-hidroxilase. Programas de triagem de recém-nascidos detectam a HAC através do teste bioquímico do hormônio 17-hidroxiprogesterona (17OHP), substrato da 21-HIDROXILASE, realizado em uma amostra de sangue seco em papel filtro. Entretanto, os valores do 17OHP podem variar devido a diferentes fatores, causando resultado falso positivos ou falso negativos. Com o intuito de elucidar esses casos, ensaios de biologia molecular têm sido empregados. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo empregar metodologias moleculares para a análise de crianças com suspeita de HAC no Estado do Rio Grande do Sul. Três testes moleculares, minisequenciamento multiplex, sequenciamento e *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) foram padronizados e/ou validados. Essas metodologias foram aplicadas para determinar o genótipo de 166 crianças com suspeita de HAC. A técnica de minisequenciamento multiplex foi utilizada para detectar doze mutações (p.Gln318Ter, p.Arg356Trp, p.Leu306PhefsX6, p.Val237Glu, IVS2-13A/C>G, p.Ile172Ans, p.Pro30Leu, p.Pro453Ser, p.Val281Leu, p.Gly110ValfsX21 e p.His62Leu) e o sequenciamento foi empregado quando necessária a análise de outras mutações pontuais. A identificação de grandes deleções, rearranjos e conversões foi realizada através do kit de MLPA. Como resultado, foi possível identificar 84 alelos patogênicos em 48 pacientes, sendo que as mutações mais frequentes encontradas foram p.Val281Leu (27,1%) e IVS2-13A/C>G (20,8%). Portanto, as metodologias empregadas neste trabalho foram eficientes para detectar as mutações mais frequentes descritas no Brasil e podem ser utilizadas em programas de triagem de recém-nascidos para ajudar a distinguir entre doentes e casos falsos positivos.

Abstract

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is a group of autosomal recessive disorders caused by a defect in one of the enzymes involved in cortisol biosynthesis. In 90% of cases, CAH is due to steroid 21-hydroxylase deficiency. Newborn screening program detect CAH through 17-hydroxyprogesterone (17OHP) biochemistry test done in dried blood spotted on filter paper, which is the 21-hydroxylase substrate. However, the levels of 17OHP can vary due to different factors, causing false positives or false negatives results. To clarify and assist these cases, molecular biology assays have been used. Therefore, this work aimed to employ molecular assays to detect mutations in *CYP21A2* gene of children suspected of CAH from Rio Grande do Sul state. Three molecular tests, multiplex minisequencing, direct sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) were standardized and/or validated. These assays were used to determine the genotype of 166 children suspected CAH. Multiplex minisequencing technique was performed to detect twelve point mutations (p.Gln318Ter, p.Arg356Trp, p.Leu306PhefsX6, p.Val237Glu, IVS2-13A/C>G, p.Ile172Ans, p.Pro30Leu, p.Pro453Ser, p.Val281Leu, p.Gly110ValfsX21 and p.His62Leu) and the direct sequencing was used when other point mutations needed to be analyzed. Large deletions, rearrangements and conversions was investigated by MLPA assay. As a result, it we were able to identify 84 pathogenic alleles in 48 patients, being p.Val281Leu (27.1%) and IVS2-13A/C>G (20.8%) the most frequent mutations. In conclusion, the methods used in this work were efficient to detect the most frequently mutations described in Brazil and can be used in newborn screening program to help distinguishing between affected and false positive cases.

Lista de figuras

Figura 1: Representação simplificada da biossíntese de esteroides no córtex da suprarrenal a partir do colesterol.	14
Figura 2: Representação esquemática do feedback negativo do ACTH.....	15
Figura 3: Primeiro caso de HAC reportado.	16
Figura 4: Mutações pontuais no gene <i>CYP21A2</i> provenientes do pseudogene <i>CYP21A1P</i> através de eventos de microconversão.	21
Figura 5: Representação da estrutura RCCX bimodular.....	22
Figura 6: Deleção de 30 Kb no módulo RCCX.	23
Figura 7: Reações catalisadas pela enzima 21-hidroxilase..	24
Figura 8: Relação entre os grupos de mutações do gene <i>CYP21A2</i> e as formas de HAC.....	26
Figura 9: Representação da reação de minisequenciamento.....	34
Figura 10: Representação esquemática da técnica do MLPA.....	36

Lista de abreviaturas

Ala	Aminoácido alanina
Arg	Aminoácido arginina
Ans	Aminoácido asparagina
Ans	Aminoácido ácido aspártico
Glu	Aminoácido ácido glutâmico
Cis	Aminoácido cisteína
Gli	Aminoácido glicina
Gln	Aminoácido glutamina
His	Aminoácido histidina
Ile	Aminoácido isoleucina
Leu	Aminoácido leucina
Lis	Aminoácido Lisina
Met	Aminoácido metionina
Pro	Aminoácido prolina
Ser	Aminoácido serina
Tir	Aminoácido tirosina
Tre	Aminoácido tronina
Trp	Aminoácido triptofano
Val	Aminoácido valina
pb	pares de base
Kb	quilo base
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
rs	<i>reference sequence</i> (sequência de referência)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
WT	<i>Wild Type</i> (Tipo Selvagem)
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
SNaPshot	<i>Single Nucleotide Primer Extension</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>

DHEA	desidroepiandrosterona
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
PS	Forma clássica perdedora de sal
VS	Forma clássica virilizante simples
NC	Forma não clássica
<i>CYP21A2</i>	Gene que codifica a enzima 21-hidroxilase
RCCX	Módulo composto por quatro genes <i>RP1/RP2-C4A/C4B-CYP21A1P/CYP21A2-TNXA/TNXB</i>

Índice

Agradecimentos	IV
Resumo	VI
Abstract.....	VII
Lista de figuras.....	VIII
Lista de abreviaturas	IX
Índice.....	XI
1. Introdução	13
1.1 Curiosidade histórica dos primeiros relatos de HAC.....	15
1.2 Formas de HAC e suas incidências.....	17
1.2.1 Forma clássica - virilizante simples.....	17
1.2.2 Forma clássica – perdedora de sal	18
1.2.3 Forma não clássica.....	19
1.3 Estrutura do gene <i>CYP21A2</i>	19
1.3.1 Módulo RCCX e seus outros genes	21
1.4 Enzima 21-hidroxilase	23
1.5 Classes de mutações e a relação com o fenótipo	25
1.5.1 Grupo nulo.....	26
1.5.2 Grupo A	28
1.5.3 Grupo B.....	29
1.5.4 Grupo C.....	30
1.6 Diagnostico de deficiência na 21-hidroxilase	31
1.6.1 Triagem neonatal	32
1.6.2 Testes moleculares.....	33
2. Objetivo.....	38
2.1 Objetivo geral.....	38
2.1 Objetivos específicos	38
3. Manuscrito	39
4. Discussão	69
5. Conclusão.....	74

6. Perspectivas.....	75
7. Referências bibliográficas.....	76
Anexo 1.....	87
Anexo 2.....	91
Anexo 3.....	95
9. Curriculum vitae resumido	98

1. Introdução

A hiperplasia adrenal congênita (HAC) compreende um grupo de doenças autossômicas recessivas associadas a distúrbios da rota de biossíntese de esteroides no córtex da suprarrenal^{1,2}. Os defeitos estão ligados à deficiência nas atividades de uma das cinco enzimas envolvida diretamente na biossíntese do cortisol, são elas: 11 β -hidroxilase (11 β -OH), 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (3 β -HDSB2), 17 α -hidroxilase (17 α -OH) e 21-hidroxilase (CYP450c21), sendo que esta última representa em torno de 90% dos casos de HAC³.

A enzima 21-hidroxilase é responsável pela conversão de 17 α -hidroxiprogesterona (17OHP) em 11-desoxicortisol e de progesterona em desoxicorticosterona, precursores do cortisol e da aldosterona, respectivamente (Figura 1). A progesterona também pode ser convertida pela adição da 17 α -OH. 21-hidroxilase

Quando a atividade da 21-hidroxilase está comprometida, metabolitos que, em parte iriam para a via de biossíntese do cortisol, acabam sendo totalmente direcionados para a via de síntese de andrógenos adrenais. Isso ocorre, pois há maior disponibilidade de 17OHP para a enzima 17,20-desmolase converter em androstenediona. Além disso, o 17 α -hidroxipregnelona também fica acumulada aumentando a alta taxa de conversão em desidroepiandrosterona (DHEA), precursor da androstenediona. O aumento de androstenediona gera, conseqüentemente, o acúmulo de andrógenos adrenais no organismo e, assim, o alto índice de testosterona circulantes no feto. Em meninas, esse elevado nível no sangue provoca a formação de genitália ambígua e, em meninos, o aumento do pênis^{3,4,5}.

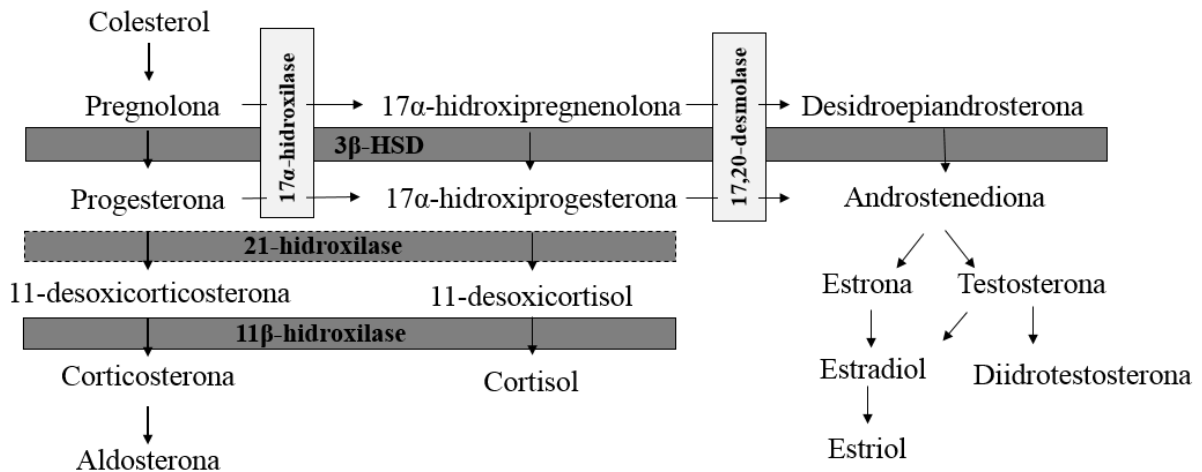


Figura 1: Representação simplificada da biossíntese de esteroides no córtex da suprarrenal a partir do colesterol. Destaque para a enzima 21-hidroxilase que, quando deficiente, compromete a produção de cortisol e aldosterona e, conseqüentemente, há uma maior produção de androstenediona, precursora de andrógenos. As outras enzimas envolvidas diretamente na biossíntese do cortisol (11β-hidroxilase, 3β-hidroxisteroide desidrogenase tipo 2 e 17α-hidroxilase) estão relacionadas com formas mais raras de HAC.

O ativador da biossíntese do córtex adrenal é o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que, por sua vez, tem como principal via de controle de sua síntese o *feedback* negativo do cortisol (Figura 2). A baixa concentração de cortisol estimula a síntese do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no hipotálamo que, por sua vez, induz a produção de ACTH na hipófise. Assim sendo, a deficiência na biossíntese do cortisol provocada por defeito na 21-hidroxilase gera uma superestimulação da síntese de andrógenos adrenais devido a esse aumento de ACTH. Quando a atividade da 21-hidroxilase está totalmente comprometida, além da ausência da síntese de cortisol, há também déficit de aldosterona^{8,9}.

Outros meios de ativar a produção de ACTH pelo hipotálamo são o sistema nervoso central e os sinalizadores de estresse que podem ser emocionais, físicos ou metabólicos. Além disso, peptídeos pancreáticos podem contribuir para a modulação dos hormônios sintetizados no hipotálamo e hipófise^{4,6,7}.

O cortisol, principal glicocorticoide, possui várias ações fisiológicas, atuando no efeito anti-inflamatório do organismo, na manutenção da homeostase da glicose e na metabolização de lipídeos, proteínas e carboidratos¹⁰. Já a aldosterona, principal mineralocorticoide do organismo, atua na reabsorção do sódio e na excreção do potássio no rim, apresentando uma taxa de secreção de 100 a 1000 vezes menor que a do cortisol. Além disso, a aldosterona é essencial para a manutenção dos níveis de eletrólitos e da homeostase de água. O ACTH tem um papel permissivo na biossíntese de aldosterona, no entanto, outros fatores também atuam em sua regulação como a angiotensina II e íon potássio^{3,10,11}.

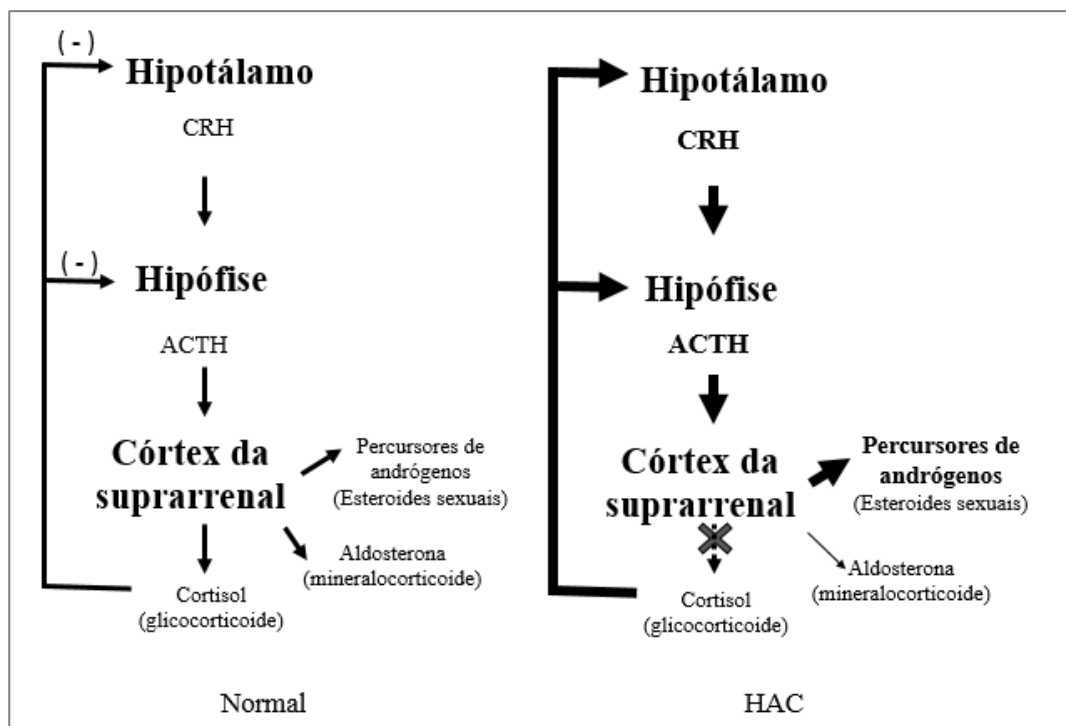


Figura 2: Representação esquemática do *feedback* negativo do ACTH. (A) Biossíntese normal. O cortisol realiza o *feedback* negativo no hipotálamo. (B) A baixa concentração de cortisol ou ausência provocada por um defeito na enzima 21-hidroxilase superestimula a síntese de CRH no hipotálamo e, conseqüentemente, há uma maior produção de ACTH e uma superativação da biossíntese de esteroides no córtex da suprarrenal. Assim, devido ao fato da via de síntese do cortisol estar totalmente ou parcialmente bloqueada, os substratos acabam sendo direcionados apenas para a via de síntese de andrógenos.

1.1 Curiosidade histórica dos primeiros relatos de HAC

Acredita-se que o primeiro caso reportado indiretamente de HAC ocorreu por volta de 800 d.C., quando o *Pope Joan*, durante uma procissão, deu à luz a um bebê (figura 3). Esse

evento ou lenda foi relatado anos após o ocorrido, em 1250, pelo frade Jean de Mailly e, posteriormente, foi descrito no livro de D'Onofrio intitulado “*La Papessa Giovanna (Pope Joan)*”⁷³.



Figura 3: Primeiro caso de HAC reportado. *Pope Joan* dando à luz ao seu filho durante uma procissão. Fonte: Vatican History. Disponível em: <http://www.vaticanhistory.de/pm/html/johannes_-gp-.html>. Acessado em junho de 2016.

Já o primeiro relato científico da doença foi publicado na revista *Morgagni*, em 1865, através da descrição de achados após autópsia realizada em um homem chamado Giuseppe Marzo de quarenta anos e que morrera repentinamente. Esse procedimento foi realizado pelo professor de anatomia Luigi De Crecchio, em Napoli, o qual encontrou útero e trompas de falópio no indivíduo analisado, além das glândulas supra-renais aumentadas⁷⁴. O pênis desse homem apresentava 6 cm de comprimento e não haviam testículos. Ao investigar o passado de Giuseppe Marzo, o professor descobriu que, ao nascer, Giuseppe havia sido considerado uma menina, chamada Giuseppina. Entretanto, aos três meses de idade sua mãe notou algo estranho em sua genitália, mas somente aos quatro anos foi constatada a presença de uma genitália ambígua, tendo assim seu nome alterado. Na época, não foi possível atestar corretamente a

causa do óbito, mas atualmente acredita-se ter tratado de uma crise de perda de sal, principalmente devido à grande ênfase no relato do tamanho da adrenal⁷³.

1.2 Formas de HAC e suas incidências

A HAC é dividida em dois grupos ou formas, de acordo com as características clínicas da doença. As formas clássicas são as mais graves e apresentam características bem típicas da ausência de uma determinada enzima. Por outro lado, na forma não clássica, o indivíduo nasce assintomático e só vai apresentar manifestações clínicas no final da infância ou na puberdade.

No caso da deficiência da 21-hidroxilase, a forma clássica é subdividida em perdedora de sal (PS) e virilizante simples (VS). Estima-se que mundialmente essas formas clássicas de HAC acometam cerca de 1:15.000 nascidos vivos, sendo considerado o erro inato do metabolismo mais comum^{3,6,12}. Estudos mostram uma alta incidência em esquimós Yupik com índice em torno de 1:490 nascidos vivos¹³. As menores incidências são observadas em americanos afrodescendentes (1:42.309)¹⁴. No Brasil, os dados variam entre 1:10.000 em Goiás e 1:20.000 em Minas Gerais^{3,16}.

Por outro lado, são poucos os estudos que conseguem determinar a incidência da forma não clássica, pois muitos afetados acabam não sendo diagnosticados. Acredita-se que, em eurodescendentes, existam mais casos do que as formas clássicas, ficando em torno de 1:500 a 1:1.000 nascidos vivos^{6,17}.

1.2.1 Forma clássica - virilizante simples

A forma VS representa 25% dos casos clássicos de HAC. Nesse grupo, a atividade da enzima 21-hidroxilase está em torno de 2 a 10%, permitindo apenas uma baixíssima produção de cortisol, a qual não é suficiente para o funcionamento normal do *feedback* negativo no

hipotálamo¹⁸. Tal fato gera, portanto, uma superestimulação da biossíntese de esteroides adrenais e, por conseguinte, a biossíntese de andrógenos fica elevada. A quantidade sintetizada desses andrógenos varia em cada caso, gerando assim diferentes graus de virilização da genitália externa³. Em meninas, a virilização é mais facilmente identificada, pois há a formação de genitália ambígua. No entanto, em meninos esse diagnóstico é mais difícil de ser realizado visualmente, pois há apenas um aumento do pênis, necessitando de exames bioquímicos para a identificação dos afetados. O tratamento, tanto em meninos, quanto em meninas VS, é realizado com o uso de glicocorticoide para suprimir a secreção do CRH e ACTH. Dessa forma, os níveis de esteroides sexuais no sangue e seus danos são minimizados³. Quando a virilização em meninas é muito grave, é necessária também uma intervenção cirúrgica para o restabelecimento da genitália normal³.

1.2.2 Forma clássica – perdedora de sal

A forma PS representa 75% dos casos clássicos, sendo a forma mais grave de HAC. Nesse grupo, a 21-hidroxilase pode estar totalmente inativo ou apresentando menos que 2% de sua atividade catalítica. Como na forma VS, não ocorre o *feedback* negativo devido à ausência da síntese de cortisol. Entretanto, diferentemente da VS, em que há produção mínima de aldosterona necessária para realizar o controle eletrolítico no organismo, na forma PS isso não ocorre. Como consequência, além dos problemas acarretados pela deficiência de cortisol, já citados na forma VS, há a soma de outros devido à deficiência na produção de aldosterona. Entre eles estão: baixo volume de plasma sangue (hipovolemia), baixa concentração de sódio no sangue (hiponatremia), alta concentração de potássio no sangue (hipercalemia), elevado nível de renina no sangue causando hipertensão (hiperreninemia), déficit de crescimento, convulsão e até a morte do recém-nascido entre o sétimo e o vigésimo primeiro dia de vida devido à perda de sal renal^{4,5,18,19}. O tratamento destes pacientes é feito com reposição de

mineralocorticoide e suplemento de cloreto de sódio, além do uso de glicocorticoide, como os VS³. Na maioria dos casos, é necessário realizar a cirurgia de correção da genitália feminina, pois o grau de virilização é normalmente mais acentuados do que nos VS³.

1.2.3 Forma não clássica

A atividade da enzima 21-hidroxilase na forma NC é em torno de 20 a 60%, o que permite uma taxa de biossíntese de cortisol suficiente para não acometer os graves danos descritos nas formas clássicas²⁰. No entanto, a quantidade sintetizada de cortisol não é satisfatória para o correto controle do feedback negativo, gerando, conseqüentemente, hiperandrogenia. Esse excesso de andrógenos, provoca manifestações clínicas tardias, como o aparecimento de puberdade precoce entre 7 e 8 anos de idade²¹. Outras manifestações da doença são: pubarca precoce, quadros graves de acne, infertilidade e crescimento acelerado a ponto de poder comprometer a altura final normal do indivíduo devido a fusão epifisária precoce. Em mulheres pode acarretar também hirsutismo e irregularidade menstrual^{22,23}. O tratamento destes pacientes é realizado apenas quando sintomáticos através da reposição de glicocorticoides³.

1.3 Estrutura do gene CYP21A2

O gene *CYP21A2* codifica a enzima 21-hidroxilase (polipeptídio 2 do grupo de citocromos P450 pertencentes à família 21, subfamília A). Esse gene está localizado no braço curto do cromossomo 6, mais especificamente na posição 6p.21.3, região do HLA de classe III, fazendo parte, portanto, do maior complexo de histocompatibilidade (MHC).

O *CYP21A2* possui 3.355 pares de bases (pb) distribuídos em 10 exons e 9 introns. Apenas 36% desse gene é constituído por introns, o que mostra tratar-se de um gene bem compacto²⁴. Até o momento, já foram identificadas 285 mutações no gene *CYP21A2*, sendo a grande maioria *missense* e *nonsense* (172), segundo o *The Human Gene Mutation Database*

(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>). Outros tipos de mutações encontradas são: 39 rearranjos complexos, 22 pequenas deleções, 18 sítio de *splicings*, 13 pequenas inserções, 13 grandes deleções, 3 grandes inserções, 3 pequenos *indels* e 2 em regiões regulatórias. No presente trabalho foi utilizada a nomenclatura convencionada pelo *Human Genome Variation Society* (<http://www.hgvs.org>).

A maioria das mutações presentes no gene são provenientes do seu pseudogene *CYP21A1P*, antigamente chamado de *CYP21A*. Esses dois genes, *CYP21A2* e *CYP21A1P*, apresentam grande homologia de sequência, sendo 98% entre os exons e 96% entre os introns²⁴. Além da alta semelhança, um outro importante fator contribui para a alta taxa de mutações, ambos se encontram em módulos vizinhos (RCCX) cuja similaridade da sequência é alta. Essa grande semelhança propicia, portanto, muitos dos eventos gênicos observados na deficiência na 21-hidroxilase²⁵.

O pseudogene *CYP21A1P* possui 3.274 pb que também estão dispostos em 10 exons e 9 íntrons. Até 1986, quando se deu sua descoberta, acreditava-se tratar-se de um segundo gene que codificava a 21-hidroxilase. No entanto, os pesquisadores White, New e Dupont identificaram quatro mutações no *CYP21A1P* que acarretavam o truncamento se sua proteína, sendo elas: uma deleção de 8 pb iniciada no códon 110 que altera a fase de leitura do DNA, um *stop* códon na posição 130, uma inserção de timina no códon 306 trocando a fase de leitura e uma mutação sem sentido no códon 318²⁴.

As mutações pontuais presentes no pseudogene são transferidas ao gene funcional *CYP21A2* através de eventos de microconversão, durante o *crossing over* meiótico. As mutações mais frequentemente são p.Pro30Leu, IVS2-13A/C>G (c.655A/C>G; I2 *splice*), p.Gly110ValfsX21 (Del 8 pb E3), p.Ile172Ans, *Cluster* E6 (p.Ile236Ans p.Val237Glu

p.Met239Lys), p.Val281Leu, p.Leu306PhefsX6 (F306+T), p.Gln318Ter, p.Arg356Trp e p.Pro453Ser (figura 4)²⁶.

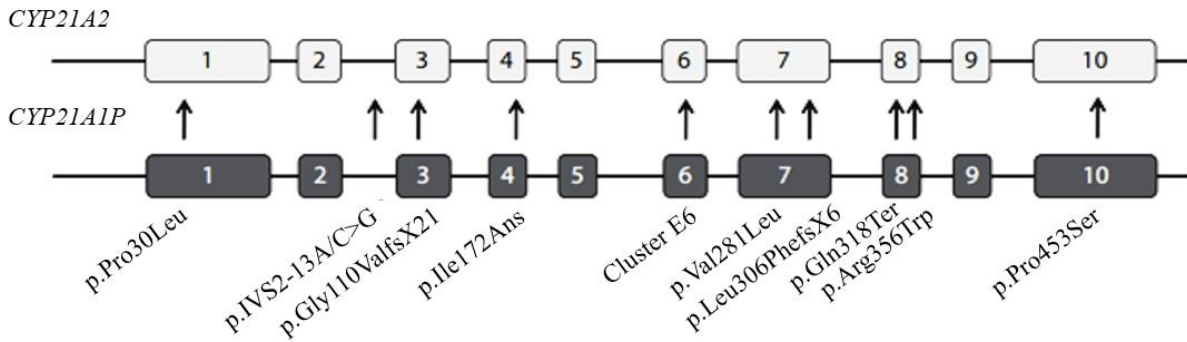


Figura 4: Mutações pontuais no gene *CYP21A2* provenientes do pseudogene *CYP21A1P* através de eventos de microconversão. Ambos apresentam 10 exons e 9 introns e uma grande homologia entre as sequências, sendo esta 98% nos exons e 96% nos introns (Figura de Wedell, 2011²⁶).

1.3.1 Módulo RCCX e seus outros genes

O módulo RCCX pode ser monomodular, bimodular ou trimodular. Em caucasianos, o bimodular é o mais frequente representando 75% dos alelos, seguido do monomodular com 15% e do trimodular 10%^{27,28}. O RCCX bimodular apresenta, em repetição em *tandem*, o chamado módulo grande e módulo pequeno que são constituídos pelos genes RP, C4, CYP21 e TNX (figura 5). O módulo grande é formado pelos genes RP2-C4B-CYP21A2-TNXB e o pequeno pelos RP1-C4A-CYP21A1P-TNXA. Ademais, o sentido de transcrição entre esses dois módulos é inverso, enquanto os genes RP, C4 e CYP21 são transcritos no sentido centrômero-telômero, os TNX são transcritos ao contrário destes, telômero-centrômero.

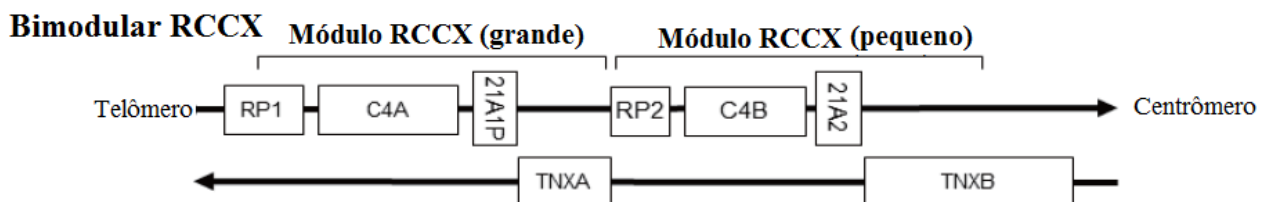


Figura 5: Representação da estrutura RCCX bimodular. Módulo grande composto pelos genes *RP1-C4A-CYP21A1P-TNXA* e módulo pequeno composto pelos genes *RP2-C4B-CYP21A2-TNXB*. (Figura adaptada de Choi *et al.*,2016)

O gene *RP1* codifica a proteína Retinitis pigmentosa I, uma proteína nuclear putativa que se liga aos microtubulos dos fotorreceptores da retina para regular a polimerização destes. Mutações nesse gene estão associados a doença autossômica dominante Retinite pigmentosa que provoca a degeneração dos neurônios fotorreceptores^{25,30} Já o *RP2* é um gene não funcional que codifica uma proteína truncada²⁵.

Os genes *C4A* e *C4B* codificam duas formas do fator do complemento 4, com as propriedades químicas ácida e básica, respectivamente. Suas duas proteínas são traduzidas separadamente e clivadas em trímero (alfa, beta e gama). As proteínas do fator do complemento 4 são consideradas, após a imunoglobulina, as proteínas mais variáveis do plasma sanguíneo, visto que, são altamente polimórficas e apresentam mais de 34 alótipos já descritos²⁵. Mutações nesses gene estão associadas a lúpus eritematoso sistêmico e diabetes mellitus tipo I^{31,32}.

O gene *TNXB* apresenta uma disposição incomum, pois sua extremidade 5` é sobreposta ao gene *CREBL1* e a extremidade 3` ao gene *CYP21A2*³³. O *TNXB* codifica a proteína Tenascin X, uma glicoproteína da matriz extracelular altamente expressa em tecidos de conexão. Sua função é impedir a aderência celular durante a maturação da matriz da célula em processos de cicatrização de feridas. Mutações nesse gene estão associadas com a Síndrome de *Ehlers-Danlos*, que se trata de uma deficiência na aderência de tecidos. O gene *TNXA* codifica uma proteína truncada, sendo, portanto, não funcional^{25,34}.

A estrutura em *tandem* entre genes funcionais (*RP1*, *C4A*, *C4B*, *CYP21A2* e *TNXB*) e suas cópias não funcionais (*RP1*, *CYP21A1P* e *TNXA*) predispõe essa região a deleções, inserções, conversões e rearranjos. Uma grande variabilidade genética pode ser gerada, durante o *crossing over* desigual meiótico, a partir de eventos de microconversões aonde há aquisição

de pequenas sequências do pseudogene para o gene; conversão gênica não recíproca na qual uma região do pseudogene é transferida para o gene; e macro-conversões cujo fusionamento do gene *CYP21A2* com o seu pseudogene é ocasionado^{26,35}.

Um exemplo desse último caso é apresentado na figura 6 através de uma representação esquemática da deleção de 30 Kb no módulo RCCX. O pareamento errado durante a meiose provoca a conexão do gene *CYP21A2* (sentido 5' → 3') com o seu pseudogene *CYP21A1P* (sentido 3' → 5'). Como consequência, durante a fase anáfase da meiose, ocorre a conversão desses genes, gerando dois genes híbridos não funcionais. Dessa forma, em um dos alelos há apenas 1 gene híbrido e no outro alelo há 1 gene híbrido, 1 cópia funcional do gene *CYP21A2* e 1 cópia do pseudogene.

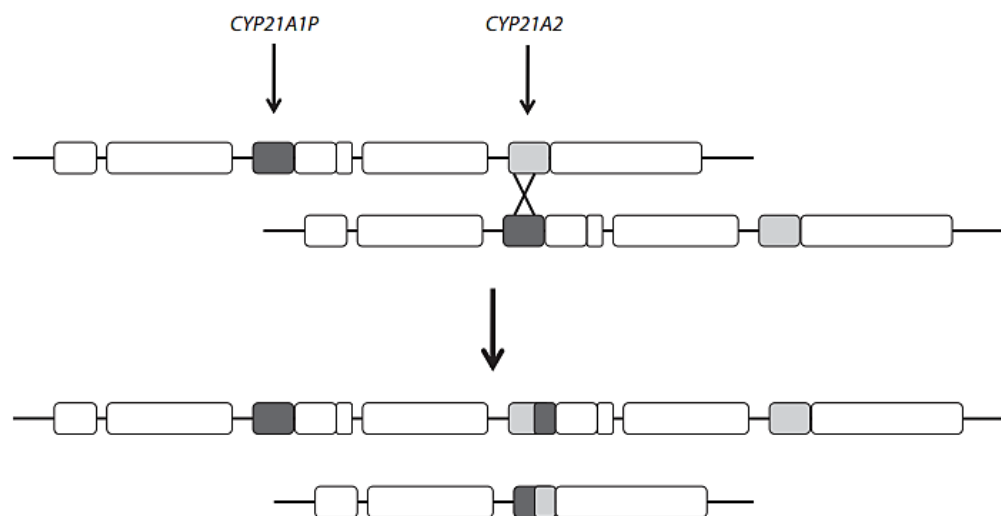


Figura 6: Deleção de 30 Kb no módulo RCCX. Esquema do mecanismo genético que leva a deleção da extremidade 3' do pseudogene *CYP21A1P* até a extremidade 5' do gene *CYP21A2* (Figura de Wedell, 2011).

1.4 Enzima 21-hidroxilase

A enzima 21-hidroxilase fica localizado no retículo endoplasmático da célula e apresenta 494 aminoácidos em uma estrutura com tamanho de 52 kDa. A sua variante, também normal,

tem uma leucina a mais no domínio N-terminal hidrofóbico, totalizando 495 aminoácidos^{36,37}. Esse esteroide é membro da superfamília de citocromos P450 que atua na catálise de várias reações metabólicas, além de diferentes sínteses, como a do colesterol, esteroides e outros lipídeos⁸.

Como já mencionado anteriormente, a principal função da 21-hidroxilase é catalisar a conversão de progesterona em deoxicorticosterona e 17OHP em 11-deoxicortisol²⁹ (figura 7). Essa ação é mediada pela enzima P450 oxidoredutase, conhecida como POR, que realiza a transferência de elétrons do NADPH para a 21-hidroxilase^{36,38}.

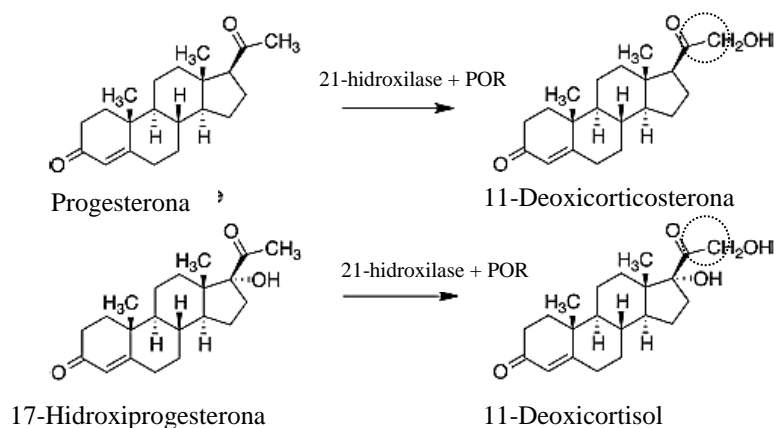


Figura 7: Reações catalisadas pela enzima 21-hidroxilase. A 21-hidroxilase ganha elétrons da P450 oxidoreductase (POR) para catalisar as duas reações (Figura adaptada de Pallan *et al.*, 2015).

A primeira caracterização da sequência codificadora da 21-hidroxilase foi realizada por White *et al* em 1984³⁹. Partindo de uma reação de transcriptase reversa para obtenção do cDNA e usando como molde o RNA mensageiro bovino, foi realizada a clonagem da sequência e sua expressão na bactéria *Escherichia coli*. Tendo em vista que as sequências de aminoácidos entre diferentes espécies apresentavam uma homologia de 90%, o estudo concluiu que aquela estrutura encontrada também seria altamente conservada entre diferentes espécies. Portanto, a

extrapolação para o uso nos estudos em humanos poderia ser utilizada. Assim, várias mutações encontradas na deficiência na 21-hidroxilase puderam ser elucidadas.

Somente em 2015, a estrutura da 21-hidroxilase de humana foi caracterizada, apresentando 79% de identidade com a bovina³⁶. Nas análises comparativas entre a estrutura da 21-hidroxilase bovina e humana foi possível concluir que ambas apresentam alta semelhança, sendo que 85% das mutações já estudadas na estrutura anterior ocasionam o mesmo defeito na 21-hidroxilase humana³⁶.

1.5 Classes de mutações e a relação com o fenótipo

As mutações no gene *CYP21A2* podem provocar diferentes tipos de danos a enzima 21-hidroxilase, podendo causar desde prejuízos que comprometem totalmente o seu funcionamento até efeitos menos drásticos que ainda possibilitam certo grau de atividade catalítica^{40,41}. A classificação dessas mutações está relacionada com os efeitos sobre a atividade enzimática, podendo ser zero (Grupo Nulo), menor que 2% (Grupo A), entre 2 e 10 % (Grupo B) e entre 20 e 60% (Grupo C). Estudos têm mostrado que apesar dessa relação ser mais variável para a forma VS, as formas PS e NC apresentam um alto grau de coerência entre genótipo e fenótipo^{12,42,43}. Os quatro grupos de mutações e seus efeitos nas estruturas das proteínas estão apresentados na figura 8.

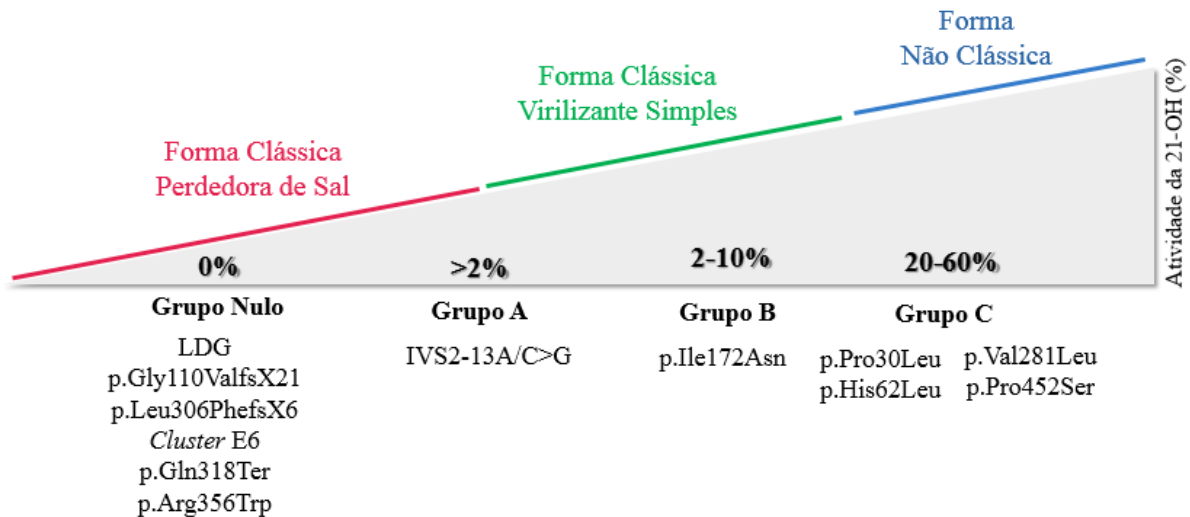


Figura 8: Relação entre os grupos de mutações do gene *CYP21A2* e as formas de HAC. A forma Perdedora de Sal é causada por mutações do grupo nulo e do grupo A e a forma Não Clássica por mutações do grupo C. Já a forma Virilizante Simples é ocasionada principalmente B, no entanto, em casos é devido a mutações dos grupos A e C.

1.5.1 Grupo Nulo

Fazem parte deste grupo as mutações mais graves que provocam a inativação total da 21-hidroxilase, estando associadas à forma PS (figura 8). Este grupo é composto por deleções, inserções, conversões e rearranjos gerados por conversão gênica não recíproca, macroconversões e microconversões (explicados no item 1.3.1) que provocam o truncamento da proteína.

Além dessas, também pertencem a esse grupo as mutações pontuais nas quais a troca de um único aminoácido gera o comprometimento de estruturas essenciais da 21-hidroxilase. Os principais domínios afetados são:

- **Ancoramento na membrana do retículo endoplasmático:** o ancoramento é realizado na hélice da 21-hidroxilase constituída pelos primeiros 25 resíduos. Portanto, mutações que alterem a composição e estabilidade da hélice estão relacionadas com ausência da atividade enzimática.

Como exemplo, **p.Met1** por I/V/L - códon de iniciação⁴¹; **p.Pro30** por Glu – alteração de resíduo com características diferentes (apolar para ácido) perto do carbono N-terminal ou da cadeia lateral p.Tyr376, provoca o dobramento errôneo da proteína^{41,44}.

- Ligação ao grupo heme: o grupo heme é cofator da 21-hidroxilase, assim, mutações que prejudicam essa ligação impedem a ligação do grupo heme e, portanto, a transferência de elétrons^{41,45}. Como exemplo, **p.Arg356** por Trp – localizado próximo ao sítio de ligação ao grupo heme, a p.Arg356 interage com o p.Gln389 através de ponte de hidrogênio, essa conexão mantém a estrutura terciária desse local. Quando há a troca de arginina por triptofano, a ligação é desfeita provocando confrontos estereoquímicos entre os resíduos “vizinhos”^{40,41}.
- Estabilidade da estrutura da proteína através de regiões com interações hidrofóbicas: o comprometimento de algumas interações hidrofóbicas acarreta em perda da estabilidade e desorganização da estrutura secundária proteica. Como exemplo, a troca do **p.Tyr59** por Asp – localizada no meio de uma região hidrofóbica composta por uma α -hélice e duas folhas β . Portanto, quando ocorre a mutação para asparagina, essa região perde sua característica hidrofóbica ao ponto de não ser formada e, por conseguinte, o funcionamento da proteína fica comprometido^{19,46}.
- Estabilidade da estrutura da proteína através da flexibilidade conformacional: trocas por aminoácidos maiores em regiões pequenas ou no esqueleto da estrutura da proteína comprometem as interações vizinhas. Como exemplo, **p.Gln318** e **p.Gln481** - resíduos na porção C-terminal (hélice J) ligados por pontes de hidrogênio ao esqueleto da estrutura por meio dos oxigênios da carbonila do p.Leu446 e p.Gln447 (hélice L). Mutações nessas posições atrapalham a formação helicoidal e, conseqüentemente, a estabilidade da estrutura secundária^{40,41}.

- Estabilidade da estrutura da proteína através de interações iônicas e ponte de hidrogênio: essas interações mantêm na estrutura os elementos terciários da 21-hidroxilase. Mutações nos resíduos que formam interações iônicas ou de hidrogênio desestabilizam a estrutura e inativam a atividade da enzima. Como exemplo, **p.Arg356** – interage através de pontes de hidrogênio com as cadeias laterais de dois resíduos, a p.Arg408 e a p.Glu351, e com os átomos do esqueleto dos resíduos p.Pro402 e p.Trp405. Quando o p.Arg356 sofre mutação, há a quebra dessa rede, desestabilizando a proteína. A troca da arginina na posição **408** por cisteína ou leucina também compromete essa rede, pois há uma grande perda de ligações de hidrogênio^{40,41}.

1.5.2 Grupo A

O grupo A é composto principalmente pela mutação pontual localizada em uma região de *splicing* no intron 2, **IVS2-13A/C>G** (também conhecida como c.655A/C>G ou I2 *splice*). A troca pela guanina nessa posição provoca a ausência de 19 nucleotídeos normais no RNAm maduro³ pode acionar um sítio de *splicing* alternativo que vai gerar transcrito alternativo, originando assim, uma proteína truncada e sem atividade enzimática. No entanto, quando o sítio catiônico do *splicing* não está alterado, a expressão do transcrito normal é mantida. Esses transcritos normais sintetizados são o suficientes para se observar uma pequena atividade enzimática no indivíduo portador dessa mutação, em torno de 2%^{3,19}.

Em homozigose ou heterozigose composta com o grupo nulo, esse grupo está associado a forma PS em 92% dos casos. No entanto, já foi visto na forma VS em 8% dos relatos, possivelmente devido a um evento raro em que o sítio catiônico do *splicing* não é alterado em um maior número de transcritos⁴².

1.5.3 Grupo B

O grupo B é composto por mutações que provocam alteração na região transmembranar e em pequenos trechos hidrofóbicos conservados, diferentemente dos grupos nulo e A que apresentam mutações em grandes regiões hidrofóbicas. As mutações deste grupo permitem uma atividade enzimática entre 2 a 10% (figura 8)¹⁹. Quando em homozigose ou em heterozigose composta com os grupos nulo e A, está associada a forma VS.

A mutação mais comum deste grupo é a **p.Ile172Ans** que está relacionada com o comprometimento da estabilidade da proteína através da quebra de ligações hidrofóbicas. A isoleucina da posição 173 forma ligação hidrofóbica com a p.Met186 e p.Met187 na hélice F. A troca da isoleucina pela asparagina provoca a perda dessa pequena região hidrofóbica^{41,47}. Esta mutação está relacionada com a forma VS, no entanto, pode gerar fenótipo PS por razões ainda não elucidadas⁴².

Outros domínios também podem ser afetados por este grupo como, por exemplo:

- Ancoramento da hélice na membrana do retículo endoplasmático: diferentemente das mutações nulas, as mutações deste grupo permitem a ancoragem da proteína na membrana, mas esta não é perfeita. Como exemplo, **p.Ala15** por Thr – localizado na hélice que fica em contato direto com a membrana do retículo endoplasmático, essa troca de aminoácido impede a ótima estabilidade do ancoramento, entretanto, não abole totalmente a atividade da 21-hidroxilase^{41,48}.
- Estabilidade da proteína através do tamanho e da carga dos resíduos: mutações que acarretam alterações de carga e/ou tamanho do aminoácido geram conflito estereoquímico e instabilidade conformacional. Como exemplo, **p.Arg408** por His – a arginina nessa posição interage através

de pontes de hidrogênio com p.Glu351 e p.Arg354. Quando a arginina é substituída por histidina, que não é protonada, essas duas ligações não são formadas^{41,47,48}.

1.5.4 Grupo C

O grupo C é constituído de mutações mais brandas e que permitem a atividade da 21-hidroxilase em torno de 20 a 60 %¹⁹ (figura 8). Mutações deste grupo em homozigose ou em heterozigose composta com os grupos anteriores estão associadas a forma NC de HAC.

A mutação mais frequente deste grupo é a **p.Val281Leu**. Essa variante está localizada em uma região pequena e restrita. A troca da valina pela leucina, maior que a primeira, gera desordem estereoquímica moderada e, conseqüentemente, diminuição da atividade da 21-hidroxilase^{25,49}. Outros danos desde grupo estão associados a:

- Mutações razoavelmente toleradas ou parcialmente compensadas: alguns resíduos quando alterados por outro com propriedades químicas semelhantes, não acarretam o comprometimento total da atividade enzimática. Um exemplo é a troca do aminoácido **p.Pro30** por Leu que diminui a atividade da 21-hidroxilase, visto que se trata de uma região crítica do ancoramento da proteína ao retículo endoplasmático. No entanto, essa troca de aminoácido apolar por outro com mesma propriedade, possibilita um certo efeito compensatório realizado pelos resíduos p.Pro31 e p.Pro43^{40,41}. Apesar dessa mutação estar bem descrita em NC, ela também pode provocar fenótipos clássicos⁴².

- Regiões hidrofóbicas: a alteração da polaridade local através da troca de resíduos hidrofóbicos, imersos em uma região hidrofóbica, por outro com polaridade diferente gera instabilidade local. Um exemplo é **p.Pro453** por Ser – a troca da prolina (apolar) pela serina (polar) em uma região composta apenas por resíduos hidrofóbicos, perturba a estabilidade

local. Esse tipo de mutação altera a conformidade da proteína, mas ainda possibilita certo grau de atividade enzimática^{41,43,47}.

- Interação oxireductase mediada por carga e hidrofobicidade: os resíduos **p.Lys121**, **p.Arg132**, **p.Arg339**, **p.Arg341** e **p.Arg369**, dotados de carga e hidrofobicidade, ficam localizados próximo a superfície da proteína com as cargas positivas alinhadas para fora. Basicamente, esses são os responsáveis pela interação com resíduos ácidos da enzima POR para, assim, a 21-hidroxilase poder receber elétrons e realizar sua atividade catalítica. Mutações em qualquer um desses 5 resíduos (p.Lys121Gln, p.Arg132Cys, p.Arg339His, p.Arg341Trp/Pro e p.Arg369Gln) acarretam mudanças no alinhamento das cargas positivas e a perda da interação entre esses resíduos. Como consequência, a interação com a enzima POR é afetada^{40,41,50}.

- Redes conectadas por pontes de hidrogênio e ligações iônicas: a estrutura terciária da 21-hidroxilase é estabilizada por várias pontes de hidrogênio e ligações iônicas. Mutações que interfiram essa rede causam diminuição da atividade da 21-hidroxilase. Como exemplo, **p.His62** por Leu – esse resíduo está ligado ao esqueleto da proteína através de ponte de hidrogênio com os resíduos p.Gly35 e p.Gly67. A troca por uma leucina provoca o desarranjo dessa rede, diminuindo a capacidade de catálise da 21-hidroxilase, mas não a comprometendo totalmente^{40,41,43,44}. Essa mutação apresenta uma característica especial, pois quando em heterozigose composta com p.Pro30Leu ou p.Pro453Ser o comprometimento da atividade enzimática é maior, provocando uma menor atividade da 21-hidroxilase, relacionando-se com a forma VS⁴⁷.

1.6 Diagnóstico de deficiência na 21-hidroxilase

O diagnóstico precoce de pacientes com deficiência na produção de cortisol é de suma importância para que se possa realizar uma intervenção rápida, evitando o aparecimento de

suas consequências. O rastreio através da triagem neonatal tem sido eficientemente empregado em vários países^{14,51-53} e, juntamente a ele, o diagnóstico molecular tem sido adicionado^{51,54-56}.

1.6.1 Triagem neonatal

Os programas de triagem para HAC têm como objetivo identificar recém-nascidos com as formas clássicas da doença, principalmente a PS, visando, assim, evitar o óbito a partir das crises adrenais. O primeiro local a aderir a triagem de HAC foi o estado do Alasca, em 1970, cuja incidência é de 1:490 nascidos vivos¹³. Desde lá, vários outros países já adicionaram a HAC aos seus programas, inclusive o Brasil, o qual iniciou esse processo em 2004 no estado de Santa Catarina⁵⁷.

A 17OHP é o principal marcador bioquímico para HAC, pois se encontra elevado na deficiência da 21-hidroxilase. Esse metabólito é dosado a partir de gotas de sangue em papel filtro, sendo inicialmente quantificado por radioimunensaio em 1977⁵⁸. Atualmente se dispõe da espectrometria de massas como a metodologia padrão ouro^{29,59}.

Apesar do valor do 17OHP ser a melhor indicação bioquímica da deficiência na 21-hidroxilase, ele pode sofrer variações por estresse do bebê, prematuridade (funções excretoras insuficientes devido à imaturidade renal) e outras doenças, gerando falso-positivos¹⁵. Por outro lado, falso-negativos também podem ser encontrados devido ao uso de corticoide pela mãe nas últimas semanas de gestação, diminuindo os valores basais do 17OHP⁶⁰. Estudos têm relatado que 100% dos PS são detectados nos programas de triagem neonatais. No entanto, em alguns casos, o VS pode se assemelhar, tanto a forma PS, por apresentar valores mais elevados, quanto ao NC, heterozigoto ou falso-positivo, devido a valores basais menores, prejudicando a identificação correta e o tipo de tratamento mais apropriado. O estudo de Voltava *et al.* (2005) mostrou que a não detecção do VS pode ser em torno de 40%. Para auxiliar na elucidação

desses casos duvidosos, tem sido associado a triagem de recém-nascidos o diagnóstico molecular para a detecção de mutações no gene *CYP21A2*^{15,54,61}.

1.6.2 Testes moleculares

O gene *CYP21A2* apresenta uma grande diversidade nos tipos de mutações encontradas, sendo desde mutações pontuais até grandes deleções, conversões e rearranjos. Essa grande variabilidade torna sua análise muito complexa, não sendo possível de ser analisado através do uso de apenas uma técnica. A associação entre, no mínimo, duas técnicas tem sido reportada como essencial para essas análises, aonde uma deve ser mais específica para a detecção da sequência nucleotídica e a outra para eventos deletérios maiores.

A escolha da técnica pode se tornar mais difícil quando o objetivo é associar a análise molecular do gene *CYP21A2* a um programa de triagem neonatal. Nesse caso, é necessário fazer o uso de metodologias simples, rápidas e com custo acessível. Ao mesmo tempo, também é necessário dispor de técnicas mais robustas para poder atender casos mais complexos e raros. As metodologias mais utilizadas são:

1.6.2.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) alelo específico

Oligonucleotídeos alelo específicos são projetados para que o nucleotídeo variante seja o último na extremidade 3'. Com isso, durante a reação de PCR, apenas fragmentos contendo um determinado alelo são amplificados. Essa técnica pode ser empregada para detectar mutações pontuais, as quais o nucleotídeo na posição 3' é o *SNP* de interesse. Assim, quando o nucleotídeo presente no DNA é o mesmo projetado na extremidade 3' do oligonucleotídeo, a enzima *Taq Polimerase* realiza a extensão da sequência, caso contrário, a amplificação não ocorre. É aconselhado projetar dois oligonucleotídeos para cada nucleotídeo alvo, um contendo o nucleotídeo selvagem e o outro com a variante, para que assim seja possível confirmar casos com heterozigoses e também para evitar erros nas reações. Essa técnica já foi descrita para a

amplificação do gene *CYP21A2* que apresenta alta homologia com o seu pseudogene *CYP21A1P*⁶².

1.6.2.2 Minisequenciamento Multiplex:

A técnica de minisequenciamento é baseada na extensão de apenas uma base para a análise de variações pontuais, nucleotídeos “alvos”. Nesta técnica, o oligonucleotídeo é projetado para anelar uma base a montante daquele de interesse na sequência de DNA, já amplificada e purificada (figura 9). A reação consiste na adição de apenas dideoxiribonucleotídeo (ddNTP) marcado quimicamente com quatro distintas fluorescências (uma para cada ddNTP), anelamento do oligonucleotídeo e extensão de apenas 1 nucleotídeos. Isso é possível, pois, após a extensão do primeiro ddNTP, a enzima *AmpliTaq Polimerase* não encontra a extremidade 3`-OH para prosseguir, finalizando o alongamento da cadeia⁶³.

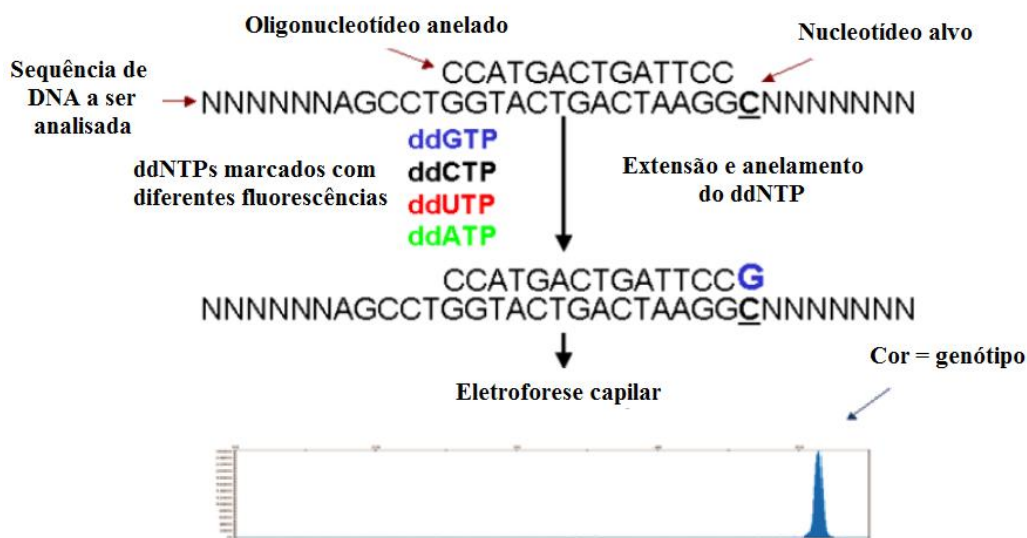


Figura 9: Representação da reação de minisequenciamento. O oligonucleotídeo projetado para anelar uma base a montante do alvo hibridiza ao DNA na reação de minisequenciamento. A enzima *AmpliTaq polimerase* faz então a adição de dddNTP marcados com fluorescência, gerando o truncamento da extensão logo após a adição do primeiro ddNTP. Durante a eletroforese capilar, os diferentes tamanhos de oligonucleotídeos (tamanho específico para cada alvo) são separados e, através da fluorescência, os nucleotídeos são identificados (Figura adaptada de Applied Biosystems).

Através da projeção de oligonucleotídeos com tamanhos diferentes para cada um dos alvos a serem analisados é possível, em uma mesma reação, analisar até 29 alvos⁶⁴. Os

diferentes tamanhos dos oligonucleotídeos são então separados através da eletroforese capilar, permitindo a identificação dos alvos e, através da fluorescência detectada, o nucleotídeo pode ser identificado. Na eletroforese capilar, junto a cada reação, é adicionado um marcador de pares de base para auxiliar na identificação dos diferentes tamanhos de oligonucleotídeos^{63,65}.

1.6.2.4 Sequenciamento por Sanger:

A técnica de sequenciamento é considerada padrão ouro para qualquer análise genética que envolva a sequência nucleotídica, sendo que o sequenciamento pela metodologia de Sanger ainda a mais utilizada nas análises do gene *CYP21A2*. O princípio desta técnica consiste no anelamento de apenas um oligonucleotídeo a um fragmento já amplificado por PCR, e sua extensão através da adição de dNTP e ddNTPs, este último é marcado com fluorescências diferente para cada um dos quatro nucleotídeos. Os dNTPs e ddNTPs estão na reação em uma proporção média de 1:100. Assim, as cadeias nucleotídicas são estendidas pela enzima *Taq polimerase* com a inserção de dNTP e, aleatoriamente, são terminadas quando se dá a adição do ddNTP. No final da reação, vários fragmentos com tamanhos diferentes são gerados de acordo com a incorporação dos ddNTPs. Esses fragmentos são então migrados em uma eletroforese capilar para a separação por tamanho e identificação da ordem de cada nucleotídeo da sequência^{66,67}.

1.6.2.3 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA):

O kit comercial MLPA (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda) foi desenvolvido para identificar mutações pontuais e deleções. Ela consiste de conjuntos de sondas (LPO e RPO) que se anelam em diferentes regiões do DNA relacionadas com uma determinada doença genética. A sonda LPO é constituída de uma região de hibridização ao DNA e de uma região rica em AT que servirá para a iniciação do PCR, comum para todas as sondas LPO de um kit. Já a sonda RPO, além dessas duas regiões, apresenta uma sequência extra “sequência *Stuffer*” que apresenta um determinado tamanho para cada uma das regiões analisadas em cada kit. O

oligonucleotídeo iniciador do RPO também é igual para todas as sondas RPO de um mesmo kit (figura 10A). Após a hibridização das sondas a região alvo, a sequência é amplificada a partir dos oligonucleotídeos iniciadores para posterior análise através de eletroforese capilar (figura 10B)^{68,69}. A detecção da ausência de um sinal devido a não hibridização de uma sonda indica a presença de uma mutação pontual, no entanto, quando isso ocorre com mais de uma sonda subsequente, significa a presença de deleção. Da mesma forma, quando o sinal detectado é o dobro do esperado, há presença de duplicação⁶⁸.

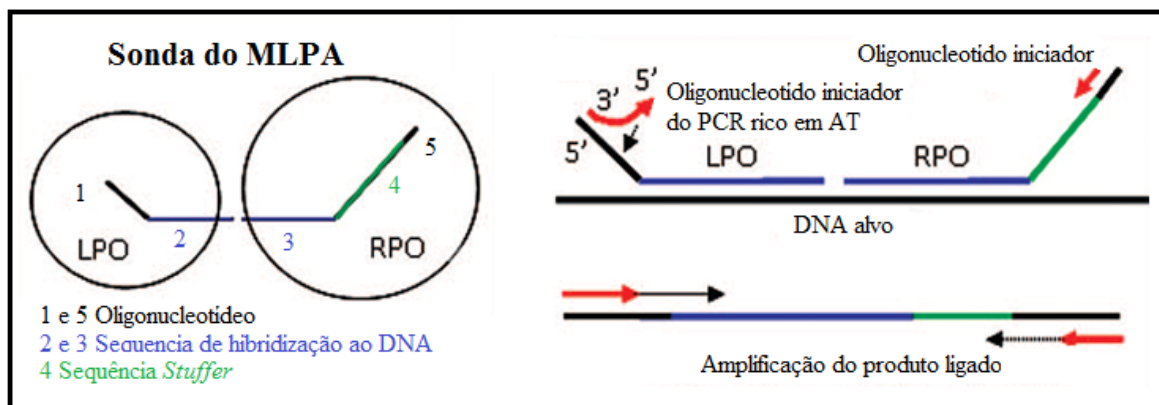


Figura 10: Representação esquemática da técnica do MLPA. (A) Composição de um conjunto de sondas de MLPA, LPO (*left probe oligo*) e RPO (*right probe oligo*). Ambas apresentam uma sequência de oligonucleotídeos utilizada para a iniciação da técnica de PCR (preto) e uma sequência para hibridizar a região alvo do DNA (azul). Apenas a RPO apresenta a sequência *Stuffer*. (B) Reação de MLPA. Após a hibridização das sondas à sequência alvo, uma etapa de ligação entre as duas sondas é realizada para que se proceda à amplificação do fragmento a partir dos oligonucleotídeos universais presentes nas extremidades das sondas.

No mercado, existem kits com sondas para o diagnóstico de várias doenças genéticas, sendo o *SALSA MLPA probemix P050-C1* para HAC. O conjunto P050-C1 permite a detecção de grandes deleções e duplicações no gene *CYP21A2* através da hibridização de 8 sondas. Além dessas, também constam no kit 11 sondas que hibridizam em regiões próximas (pseudogene *CYP21A1P*, gene *TNBX* e gene *ATF6B*) e servem para a identificação de variações no número de cópias e determinação da extensão de deleções e/ou duplicações. Por fim, outras 8 sondas

estão presentes no conjunto e são utilizadas como controle interno da reação, totalizando assim 27 sondas⁷⁰.

1.6.2.5 Southern blot

A técnica de *Southern blot* é muito utilizada para análise de eventos genéticos envolvendo deleções⁷¹. Essa técnica consiste na migração do DNA amplificado ou digerido com enzimas de restrição, em um gel de agarose horizontal, para separação dos tamanhos dos fragmentos e, posterior, desnaturação da fita-dupla através de uma solução alcalina. Os fragmentos de DNA fita-simples são então neutralizados e transferidos para uma membrana de hibridização (exemplos, nitrocelulose, nylon) através do processo de capilaridade auxiliado por uma alta concentração salina. Para ligar o DNA a membrana irreversivelmente, a membrana é submetida ao calor ou a radiação ultravioleta (UV). Por fim, sondas com sequências conhecidas e marcadas com fluorescência ou radioativos são então depositadas sobre a membrana para a hibridização com suas sequências complementares. Na sequência, o excesso de sonda não hibridizada é então retirado através de uma lavagem para posterior exposição ao Raio-X em uma folha de radiografia. A análise final é realizada através da identificação das hibridizações realizadas⁷².

2. Objetivo

2.1 Objetivo Geral

Estabelecer metodologias moleculares para detecção de mutações no gene *CYP21A2* e analisar o DNA de crianças com suspeita de HAC no Estado do Rio Grande do Sul para verificar a frequência de mutações.

2.1 Objetivos específicos

- Padronizar a técnica de Minisequenciamento Multiplex para detectar as mutações p.Pro30Leu, p.His62Leu, IVS2-13A/C>G, p.Gly110ValfsX21, p.Ile172Ans, p.Val237Glu, p.Val281Leu, p.Leu306PhefsX6, p.Gln318Ter, p.Arg356Trp, p.Arg408Cys, p.Pro453Ser;
- Validar a técnica de MLPA para a detecção de eventos de deleção gênica no gene *CYP21A2*;
- Padronizar a técnica de sequenciamento para análise do gene *CYP21A2*;
- Realizar as análises genéticas em crianças do Rio Grande do Sul com suspeita de HAC utilizando as metodologias padronizadas;
- Analisar as frequências das mutações encontradas e comparar com dados de outros grupos.

3. Manuscrito

As metodologias e os resultados deste trabalho serão apresentados no formato de artigo científico a ser submetido à revista *Molecular Endocrinology*.

Mutation detection on *CYP21A2* gene in congenital adrenal hyperplasia patients from Southern Brazil

Mayara Jorgens Prado^{1,3}, Thaiane Rispoli Serrano^{1,3}, Simone Martins de Castro^{2,3}, Cristiane Kopacek², Maricilda Palandi de Mello⁴, Tarciana Grandi¹, Cláudia Maria Dornelles da Silva^{1†}, Maria Lucia Rosa Rossetti^{1†}.

¹Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Ipiranga avenue 5400, CEP 90610-000, Porto Alegre, Brazil;

²Centro de Referência em Triagem Neonatal, Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, Independência avenue 661, CEP 90035-074, Porto Alegre, Brazil;

³Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves avenue 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, Brazil;

⁴ Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Cândido Rondon avenue 400 CEP 13083-875, Campinas, Brazil.

†These two authors have contributed equally to the study

Abbreviated Title: Congenital Adrenal Deficiency in Southern Brazil

Key terms: Congenital Adrenal Hyperplasia, *CYP21A2* gene mutations, Southern Brazil

Word count: 2,916

Number of figures and tables: 8

Corresponding author and person to whom reprint requests should be addressed:

Cláudia Maria Dornelles da Silva

Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

26 Av. Ipiranga 5400, CEP 90610-000, Porto Alegre, Brazil

27 Phone/ Fax: +55-51-3288.4037

28 email: cmdornelles@gmail.com

29

30 **Disclosure Statement:** The authors have nothing to disclose

31

32 **Abstract**

33 Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is a group of autosomal recessive disorders caused by a
34 defect in one of the enzymes involved in cortisol biosynthesis. In 90% of cases, CAH is due to
35 steroid 21-hydroxylase deficiency. Newborn screening program detect CAH through 17-
36 hydroxyprogesterone (17OHP), with is the substrate of 21-hydroxylase, using a biochemical
37 test performed with dried blood spotted on filter paper. However, the levels of 17OHP may
38 vary due to different factors, causing false positives or false negatives results. To clarify and
39 assist such cases, assays on *CYP21A2* molecular biology have been used. Therefore, this work
40 aimed to perform molecular assays to detect mutations in *CYP21A2* gene in children suspected
41 of CAH from Southern Brazil. Three molecular tests were standardized and/or validated:
42 multiplex minisequencing, direct sequencing and multiplex ligation-dependent probe
43 amplification (MLPA). These assays were used to determine the genotype of 166 children
44 suspected of CAH. Multiplex minisequencing technique was developed to detect twelve point
45 mutations (p.Arg408Cys, p.Gln318Ter, p.Arg356Trp, p.Leu306PhefsX6, p.Val237Glu, IVS2-
46 13A/C>G, p.Ile172Asn, p.Pro30Leu, p.Pro453Ser, p.Val281Leu, p.Gly110ValfsX21 and
47 p.His62Leu) and the direct sequencing was used in cases that neither of them was determined.
48 Large deletions, rearrangements and conversions had been identified using MLPA kit. As a
49 result, we identified 84 pathogenic alleles in 48 patients, being p.Val281Leu (30.1%) and IVS2-
50 13A/C>G (23.8%) the most frequent mutations found. In conclusion, the methodologies used

51 in this work were efficient to detect the most frequent mutations described in Brazil and can be
52 used in newborn screening program to help distinguishing between affected and false positive
53 cases.

54 **Introduction**

55 Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH, OMIM 201910) is a group of autosomal recessive
56 disease caused by defects in one of the enzymes involved in the cortisol biosynthesis. More
57 than 90% of patients with CAH have 21-hydroxylase deficiency (1). This enzyme converts 17-
58 hydroxyprogesterone to 11-deoxycortisol and also progesterone to deoxycorticosterone, which
59 are then converted to cortisol and aldosterone respectively (2–4).

60 The enzyme 21-hydroxylase is encoded by *CYP21A2* gene (cytochrome P450 family 21
61 subfamily A member 2) which is located on RCCX module on chromosome 6p.21. The
62 *CYP21A2* gene expands over 3.35 kb and it is situated 30 kb from its highly homologous
63 *CYP21A1P* pseudogene (98% in exons and 96% in introns) (5). This high similarity may favor
64 many events of meiotic unequal crossover, causing microconversion, deletions, duplications,
65 insertions, rearrangements and large gene conversion (6,7). At this moment, there are 284
66 mutations identified and the majority is missense/nonsense (60.5%) followed complex
67 rearrangements (13.7%) and small deletions (7.7%) (8).

68 The clinical phenotype is classified into three forms: i) the classical salt wasting (SW) form
69 that presents with severe renal salt wasting and newborn virilization due to aldosterone and
70 cortisol deficiency; ii) the classical simple-virilizing (SV) form that present with signs of
71 newborn virilization by hypocortisolism, and iii) the nonclassical (NC) form that is
72 asymptomatic on born and not have cortisol deficiency but manifests later in childhood with
73 precocious pseudopuberty or hirsutism (female) (7,9,10,11). The most frequent form is NC
74 with 1:500-1.000 live births worldwide and the classical form is around 1:15.000 in
75 Eurodescendants (9,12–14).

76 *CYP21A2* mutations can be categorized in four groups according to residual 21-hydroxylase
77 activities that are associated to the three phenotypes. The “Null” group includes mutations that
78 fully impaired the enzyme activity. Mutations frequently found in this group are
79 p.Gly110ValfsX21, p.Leu306PhefsX6, Cluster E6 (p.Ile236Asn, p.Val237Glu and
80 p.Met239Lys), p.Gln318Ter, p.Arg356Trp, deletions and rearrangements. The “A” group have
81 a minimal residual of 21-hydroxylase activity (<2%) and the most prevalent mutation is IVS2-
82 13A/C>G (c.655A/C>G). Both groups (Null and A) in homozygosis or compound
83 heterozygosis are associated with SW form. The group “B” includes mutations that allow 2-
84 10% of 21-hydroxylase activity, permitting aldosterone biosynthesis. The most common
85 mutation of this group is p.Ile172Asn and when occurs in homozygosis or compound
86 heterozygosis with Null or A group, the phenotype is commonly associated with SV form.
87 Finally, the group “C” shows 20-60% of enzyme activity and the most frequently mutations
88 are p.Pro30Leu, p.His62Leu, p.Val281Leu and p.Pro453Ser. When one of them occurs in
89 homozygosis or in compound heterozygosis with Null, A or B groups, the phenotype is
90 associated with NC form (In neonatal screening programs, the SW form is efficiently detected
91 measuring 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) levels, which is a substrate of 21-hydroxylase,
92 on filter-paper blood spots. The detection of SV and NC forms, however, can be sometimes
93 difficult. False-negative results can be attributed to the use of corticoids during the pregnancy.
94 On the other hand, false-positive cases can be linked to the stress of the baby, prematurity or
95 health problems (15–17).

96 The aim of the present study was to detect mutations in *CYP21A2* gene in children suspected
97 of CAH from Southern Brazil.

98 **Materials and Methods**

99 *Subjects*

100 Between 2014 and 2016, blood samples from 166 patients and 48 parents were collected at
101 *Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas* located in Porto Alegre, Rio Grande do Sul,
102 Brazil for molecular studies of *CYP21A2* gene. All of them were suspect to have CAH based
103 on clinical manifestation and/or biochemical tests. The study was approved by Ethical
104 Committee of *Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde* (N^o 341.289/June 8,
105 2013) and all parents gave written informed consent.

106 *DNA extraction*

107 In CDCT/FEPPS, genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using
108 proteinase K with phenol-chloroform techniques (18). The samples were quantified on
109 spectrophotometer Eppendorf BioSpectrometer basic with Eppendorf μ Cuvette G1.0.

110 *CYP21A2 gene amplification*

111 Amplification of almost all *CYP21A2* gene (2,989-bp) was performed using an allele specific
112 PCR. Primers to distinguish the gene from the pseudogene were described by Krone et al
113 (2002). PCR reaction protocol was 2.5 U Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1 X of
114 PCR Buffer, 0.4 mM of dNTP, 2 mM MgCl₂, 3.5 ng of DNA and 0.4 μ M of each CYP21-F
115 (5`-CGGGTCGGTGGGAGGGTA-3`) and CYP21-R (5`-GCGATCTCGCAGCACTGTGT-
116 3`) primers. Thermal-cycling conditions for PCR were initial denaturation at 94 °C for 15 min,
117 36 cycles at 94 °C for 60 sec, 65 °C for 90 sec and 72 °C for 4 min, and a final extension at 72
118 °C for 15 min.

119 *Multiplex minisequencing*

120 Multiplex minisequencing assay was chosen to analyze point mutation in *CYP21A2* gene. This
121 assay is based on single nucleotide extension of primers that anneal one nucleotide upstream
122 to target nucleotide. Twelve mutations were selected, considering that 10 are worldwide
123 prevalent mutations and are derived from *CYP21A1P* (p.Arg408Cys, p.Gln318Ter,
124 p.Arg356Trp, p.Leu306PhefsX6, p.Val237Glu, IVS2-13A/C>G, p.Ile172Asn, p.Pro30Leu,

125 p.Pro453Ser, p.Val281Leu and p.Gly110ValfsX21). This point mutation represented 74% of
126 *CYP21A2* mutations obtained in the largest Brazilian CAH cohort study (20). The other two
127 selected mutations have been detected in Brazilian population (p.Arg408Cys -“Null” group
128 and p.His62Leu -“C” group). The p.Arg408Cys mutation is related to SW phenotype (21) and
129 the p.His62Leu when in compound heterozygosis with p.Pro30Leu or p.Pro453Ser, may confer
130 SV, instead of NC phenotype (22). The nomenclature used follows the conventions of the
131 Human Genome Variation Society (HGVS).

132 Primers were designed on Primer3 software v.0.2 (23,24) and specific sequences were
133 analyzed using BLAST software (U.S National Library of Medicine). The interaction of
134 multiple primer sequences was simulated using Multiple Primer Analyzer software (Thermo
135 Fischer Scientific, USA) and OligoAnalyzer v.3.1 software (Integrated DNA Technologies).

136 Sequentially, nested multiplex PCR reactions were carried out in a final volume of 25 μ L
137 containing 2.5 U Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1 X of PCR Buffer, 1.5 μ L of
138 gene PCR diluted 10 X, 2.5 mM of dNTP, 2 mM MgCl₂ and six primers pairs (see Table 1).
139 Thermal-cycling conditions were: initial denaturation at 94 °C for 5 min, 35 cycles at 94 °C for
140 30 sec, 62 °C for 30 sec and 72 °C for 30 sec, and a final extension at 72 °C for 10 min. PCR
141 products were purified with ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Invitrogen) according to the
142 manufacturer’s protocol.

143 Multiplex Minisequencing reaction was performed with 5 μ L SNaPshot Multiplex Ready
144 Reaction reagents (Applied biosystems), 1 μ L of primer mixture (see Table 2), 3 μ L ultrapure
145 water and 3.5 μ L multiplex nested PCR product purified. Thermal-cycling conditions were
146 carried out with initial denaturation at 95 °C for 5 min, 30 cycles at 95 °C for 10 sec, 50 °C for
147 5 sec and 60 °C for 30 sec, and final extension at 60 °C for 30 sec. The product was treated with
148 Shrimp Alkaline Phosphatase (Affymetrix, Inc., Santa Clara, California, USA). Fragment

149 analysis was performed on Genetic Analyzer ABI 3130xl (Applied Biosystems) and the result
150 was analyzed using GeneMapper Software v.4.0 (Applied Biosystems).

151 *Large deletions and gene conversions events analysis using Multiplex Ligation-dependent*
152 *Probe Amplification (MLPA)*

153 Large deletions and gene conversions events accounted 9% of *CYP21A2* gene obtained in the
154 Brazilian study previously mentioned (20). Those mutations were examined for those patients
155 with suspected SW or SV phenotypes by MLPA. SALSA MLPA probemix P050-C1 CAH kit
156 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) was used according to the manufacturer's
157 recommendations. This kit has 8 probes that hybridize in *CYP21A2* gene and 11 probes for
158 flanking regions (*CYP21A1P* gene, *TNXB* gene and *ATF6B* gene), helping to interpret copy
159 number changes and the extent of deletions and/or duplications. For reaction controls, other 8
160 probes are used, totalizing 27 MLPA probes. The results were analyzed firstly by
161 Coffalyser.NET software (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) and after as describe
162 by Coeli et al. (2010).

163 *Direct sequencing*

164 Direct sequencing of *CYP21A2* gene was used to characterize mutations neither present in
165 multiplex minisequencing panel nor MLPA probemix. This assay was also performed to
166 confirm all point mutations found by multiplex minisequencing.

167 Nested PCR reactions were done to obtain smaller amplicons that cover almost the entire
168 *CYP21A2* gene. Those reactions were carried out in a volume of 25 μ L containing 1 μ L of gene
169 PCR diluted 50 X, 2.5 U Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), 1 X of PCR Buffer, 0.5
170 mM of dNTP, 1 mM $MgCl_2$ and seven pair of primers (see Table 1). Thermal-cycling
171 conditions were equal to multiplex nested PCR. The PCR product was clean up with ExoSAP
172 (as described above). Sequencing reaction was carried out in forward and reverse directions
173 using Big Dye Terminator cycle Sequencing kit v.3.1 (Applied Biosystems) according to the

174 manufacturer's protocol, followed by ethanol/EDTA precipitation protocol recommended by
175 Applied Biosystems Chemistry Guide (26). The sequencing system used was the Genetic
176 Analyzer 3130xl (Applied Biosystems). Sequences obtained were aligned to *CYP21A2* gene
177 sequence (e.g., RefSeq NG_007941.2) and examined using SeqMan software v.7.0.0.0
178 (DNASTar, Madison, WI).

179 *Statistical analysis*

180 Chi-square test with exact p-value was performed to compare mutations frequencies found in
181 the present study and others works from South America, followed by residual analysis using
182 correction for multiple tests. Seven studies were used for comparison: one from Argentina (27),
183 two from Chile (28,29) and four from different regions of Brazil, North (30), Southeast and
184 Northeast (20), Central west (31) and South (this study). IBM SPSS Statistic software v.2.1
185 was used to statistical analysis and the statistical significance considered was $p < 0.001$.

186 **Results**

187 *Screening mutation*

188 Multiplex minisequencing was performed on 166 unrelated children (65 female and 101 male)
189 with suspicion of CAH from Rio Grande do Sul state. Additionally, 49 parents (26 mother and
190 22 father) were genotyped to confirm allele segregation. We did not find pathogenic alleles in
191 135 individuals using these methodologies.

192 Using the amplicon of the entire *CYP21A2* gene (Figure 1A), a nested multiplex PCR was
193 developed to minimize the competition between multiplex minisequencing probe. Six
194 fragments were amplified (270-pb, 366-pb, 375-pb, 419-pb, 476-pb and 615-pb) (Figure 1B).

195 Figure 2A shows the 12 wild-type nucleotide peaks generated at multiplex minisequencing.

196 This reaction can generate 12 or 13 peaks of wild-type nucleotide because a benign A/C
197 polymorphism in IVS2-13A/C>G. We identified all wild-type peaks and nine mutated peaks

198 to p.Gln318Ter, p.P.Arg356Trp, p.Pro453Ser, IVS2-13A/C>G, p.Leu306PhefsX6,

199 p.Val237Glu, p.Val281Leu, p.Ile172Asn and p.Pro30Leu (sample used only for peak test)
200 (Figure 2B).

201 The amplicons used in the sequencing reaction showed the size expected (Figure 1C) and all
202 mutations detected by multiplex minisequencing were confirmed with this methodology. The
203 other two point mutations present in Cluster E6 (p.Ile236Asn and p.Met239Lys), but not
204 analyzed on multiplex minisequencing, were confirmed too.

205 A new variant T in IVS2-13A/C>G was identified in two patients. The T allele was in
206 heterozygosity with benign C allele (Figure 3A). This variant was detected by multiplex
207 minisequencing assay that showed a red peak on electropherogram position 60 that correspond
208 to c.293-13C>A (NM_000500.7). Direct sequencing was performed to confirm this result
209 (Figure 3B).

210 Using the MLPA assay to 24 children with SW or SV forms, we found nine complete *CYP21A2*
211 gene deletions, 3 deletions 30-kb (5'-end *CYP21A1P* to exon 3 *CYP21A2*), 1 large conversion,
212 2 complete *CYP21A1P* gene deletions and 5 *CYP21A1P* gene duplications (Table 3). One
213 patient sample that was not amplified on allele specific PCR, was compound heterozygous for
214 gene deletion and large gene conversion *CYP21A2* gene deletion. This result was confirmed
215 with parent's genotyping, the mother had the deletion of the gene and the father had a large
216 gene conversion. All mutations found detected in patients were confirmed with their relative's
217 genotypes.

218 Direct sequencing was performed to children and their parents to confirm the genotypes found
219 by assays described above.

220 *Types of mutations found*

221 Table 3 shows the mutations types detected per patient, the largest group was Null/A (35.4%),
222 followed by C group (25.0%) and B group (4.2%). We identified 84 pathogenic alleles in 48
223 patients. Seventeen patients showed only one mutant allele (35.4%), 9 of Null group and 8 of

224 C group. The most frequent point mutations found were p.Val281Leu (27.1%) and IVS2-
225 13A/C>G (20.8%). The mutated alleles of p.Pro30Leu, p.Arg409Cys and p.His62Leu were not
226 detect.

227 *CYP21A2 gene mutations frequencies*

228 Table 4 shows the mutations frequency found in the present study with others from Europe and
229 America. The most frequent mutations were IVS2-13A/C>G (25.8% ± 9.1), large deletions or
230 large conversions (18.6% ± 10.4) and p.Val281Leu (15.6% ± 11.8). On the other hand, lower
231 frequencies were found for the mutations p.Pro453Ser (0.8% ± 0.8), p.Gly110ValfsX21 (1.4%
232 ± 0.9), Cluster E6 (1.5% ± 1.7) and p.Pro30Leu (2.2% ± 2.6).

233 The statistical analysis to the South American studies found two significant differences for
234 p.Pro30Leu and p.Val281Leu (Table 5). The p.Pro30Leu frequency found in North Brazil
235 (6.5%) is higher than in all other groups (0.0% to 0.7%). The p.Val281Leu mutation showed
236 differences in two groups, the frequencies found in studies reported in Southern Brazil (27.1%),
237 Southeast and Northeast of Brazil (26.6%) and Argentina (26.2%) were higher than the group
238 composed by Central west of Brazil (8.9%), North Brazil (12%) and Chile (2.4%). The
239 His62Leu mutation did not has sufficient dates to do the statistical analysis.

240

241 **Discussion**

242 The present study detected mutations in *CYP21A2* gene from Southern Brazilian children with
243 CAH suspicion. Multiplex minisequencing was implemented to analyze children from
244 newborn screening and had success to detect the proposed twelve point mutations described
245 above. The other methodology was MLPA that was able to identify large deletions and
246 conversions in *CYP21A2* gene.

247 The high rate of undetected mutations in both alleles (in a total of 81.3%, 10.2% were
248 heterozygous and 71.1% had no mutated alleles found) can be due to false positive results

249 caused by increase the 17OHP values from preterm, low birth weight newborns or in
250 association with other neonatal diseases (21,32,33). Furthermore, we cannot discard the
251 possibility that we did not find some mutation present in the *CYP21A2* gene, since we did not
252 analyzed all gene. Genes modulators as POR, CYP2C19, CYP3A4 and other enzymes that
253 exert clinically significant effect may have contributed for false positives cases too (34,35).

254 Similar to other studies and considering affected patients with CAH, we found the frequency
255 of homozygous genotypes higher than compound heterozygous, 17 homozygous individuals
256 and 14 compound heterozygous (36,37,38). This could suggest that there is still a low
257 miscegenation in our population that was not found elsewhere in Brazil (39). This apparent
258 homogenous genetic condition of our population can be attributed to the fact that Rio Grande
259 do Sul population has a dominant influence of German, Italian and Azorean colonization in
260 provincial towns yet.

261 In the present study, multiplex minisequencing proved to have a great sensibility to detect all
262 point mutations analyzed, including the insertion of one nucleotide (p.Leu306PhefsX6), being
263 a useful tool as a first method to search mutations for newborn screening. The use of MLPA
264 technique to identify rearrangements events was efficient as a complementary methodology. In
265 this case, it is very important the inclusion of the parents' DNA to confirm the segregation of
266 the alleles for their son (40). The direct sequencing is recommended as a complementary
267 technique in cases where no mutation was detected by the first both methods described.

268 Statistical differences were found regarding the frequencies of two mutations, p.Pro30Leu and
269 p.Val281Leu when compared with other South American studies. The p.Pro30Leu frequency
270 was lower on the majority of studies (Table 4); on the other hand, this mutation was higher in
271 the North of Brazil, causing statistical difference. The frequency of p.Pro30Leu in the North of
272 Brazil is similar to that found in Mexico study, which can be corroborated with a large influence
273 of indigenous in both populations, besides the admixture with European (Portuguese and

274 Spanish, respectively) and African descendants (41,42). The p.Val281Leu mutation showed
275 two groups with different frequencies, the first is composed of Southeast and Northeast,
276 Southern Brazil regions and Argentina with high allelic frequencies that is similar to reports
277 from United States, Portugal, Italy and Spain countries (Table 5). The other one composed by
278 Central west, North Brazil regions and Chile with lower frequency of this mutation and similar
279 to Mexico, Germany, Denmark, Sweden and Middle European (Austria, the Czech Republic,
280 Hungary, Slovakia and Slovenia) (Table 5). This result may reveal a large admixture to
281 p.Val281Leu mutation between populations. At the same time, most of data presented showed
282 a high frequency on IVS-13A/C>G and p.Val281Leu mutations and low frequency on
283 p.Pro453Ser and p.Gly110ValfsX21. Besides that, almost all studies detected p.Gln318Ter,
284 p.Arg356Trp, IVS2-13A/C>G, p.Val281Leu, p.Ile172Ans and large deletions or gene
285 conversions events, thereby showing the high importance to include these mutations in all
286 panels of CAH screening programs. Many studies emphasize the importance p.Pro30Leu,
287 p.Gly110ValfsX21 and Cluster E6 to screening too (5,19,43). The mutations frequencies vary
288 between each population, so for the development of a molecular test to screen specific
289 mutations, it is important a previous screening.

290 In summary, this study implemented two molecular techniques to detected mutations in
291 *CYP21A2* gene to assist newborn screening in a routine laboratory. The use of multiplex
292 minisequencing and MLPA allowed us to obtain the first Southern Brazilian frequencies and
293 this dates were considerable similarity with other South American studies. Finally, it is worth
294 mentioning the importance to use different molecular techniques to screen *CYP21A2* gene that
295 is a complex gene with many type of mutation in order to elucidate the complicate phenotypes
296 of CAH, minimizing the stress of false positives cases (1,20-32, 40).

297 **Acknowledgments**

298 We would like to thank to *Serviço de Referência em Triagem Neonatal of Hospital Materno*
299 *Infantil Presidente Vargas* for samples collected. This research was supported by *Conselho*
300 *Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, *Fundação de Amparo à*
301 *Pesquisa do estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)* and *Fundação Estadual de Produção*
302 *e Pesquisa em Saúde*.

303 **References**

- 304 1. White PC, Speiser PW. Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase
305 Deficiency. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2000;30(1):245-291. doi:10.1016/S0889-
306 8529(08)70018-5.
- 307 2. Forest MG. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal
308 hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Reprod Update.* 2004;10(6):469-
309 485. doi:10.1093/humupd/dmh047.
- 310 3. Häggström M. Diagram of the pathways of human steroidogenesis. *Wikiversity J Med.*
311 2014;1(1):1-7. doi:10.15347/wjm/2014.005.
- 312 4. Witchel SF, Azziz R. Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Pediatr Adolesc Gynecol.*
313 2011;24(3):116-126. doi:10.1016/j.jpag.2010.10.001.
- 314 5. Keen-Kim D, Redman JB, Alanes RU, et al. Validation and clinical application of a
315 locus-specific polymerase chain reaction- and minisequencing-based assay for
316 congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *J Mol Diagn.*
317 2005;7(2):236-246. doi:10.1016/S1525-1578(10)60550-8.
- 318 6. Barbaro M, Soardi FC, Östberg LJ, et al. In vitro functional studies of rare 21-
319 hydroxylase mutations and establishment of an activity gradient for nonclassic
320 mutations improve phenotype predictions in congenital adrenal hyperplasia. *Clin*

- 321 *Endocrinol (Oxf)*. 2015;82(1):37-44. doi:10.1111/cen.12526.
- 322 7. Kirac D, Guney AI, Akcay T, et al. The Frequency and the Effects of 21-Hydroxylase
323 Gene Defects in Congenital Adrenal Hyperplasia Patients. *Ann Hum Genet*.
324 2014;78(6):399-409. doi:10.1111/ahg.12083.
- 325 8. Cooper DN, Ball EV, Stenson PD, et al. The Human Gene Mutation Database. Institute
326 of Medical Genetics in Cardiff. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. Published
327 2016. Accessed June 16, 2016.
- 328 9. Krone N, Arlt W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin*
329 *Endocrinol Metab*. 2009;23(2):181-192. doi:10.1016/j.beem.2008.10.014.
- 330 10. Dumic KK, Grubic Z, Yuen T, et al. Molecular genetic analysis in 93 patients and 193
331 family members with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase
332 deficiency in Croatia. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016.
333 doi:10.1016/j.jsbmb.2016.03.035.
- 334 11. Finkelstein GP, Kim MS, Sinaii N, et al. Clinical Characteristics of a Cohort of 244
335 Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*.
336 2012;97(May):4429-4438. doi:10.1210/jc.2012-2102.
- 337 12. Merke DP, Bornstein SR. Congenital Adrenal Hyperplasia. *Lancet*.
338 2005;365(9477):2125-2136. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66736-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66736-0).
- 339 13. Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New M. High frequency of
340 nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet*. 1985;37(4):650-667.
341 doi:10.1097/00006254-198604000-00017.
- 342 14. Livadas S, Dracopoulou M, Dastamani A, et al. The spectrum of clinical, hormonal and
343 molecular findings in 280 individuals with nonclassical congenital adrenal hyperplasia

- 344 caused by mutations of the CYP21A2 gene. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014;82(4):543-549.
345 doi:10.1111/cen.12543.
- 346 15. Sarafoglou K, Banks K, Kyllö J, Pittock S, Thomas W. *Cases of Congenital Adrenal*
347 *Hyperplasia Missed by Newborn Screening in Minnesota*. Vol 304.; 2012.
348 doi:10.1111/bjd.13548.
- 349 16. Varness TS, Allen DB, Hoffman GL. Newborn screening for congenital adrenal
350 hyperplasia has reduced sensitivity in girls. *J Pediatr*. 2005;147(4):493-498.
351 doi:10.1016/j.jpeds.2005.04.035.
- 352 17. Votava F, Török D, Kovács J, et al. Estimation of the false-negative rate in newborn
353 screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol*. 2005;152(6):869-874.
354 doi:10.1530/eje.1.01929.
- 355 18. Sambrook J, Green MR. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York:
356 Cold Spring Harbor Laboratory; 2014. <http://trove.nla.gov.au/work/13615226>.
- 357 19. Krone N, Braun A, Weinert S, et al. Multiplex minisequencing of the 21-hydroxylase
358 gene as a rapid strategy to confirm congenital adrenal hyperplasia. *Clin Chem*.
359 2002;48(6):818-825.
- 360 20. Carvalho DF, Miranda MC, Gomes LG, et al. Molecular CYP21A2 Diagnosis in 480
361 Brazilian Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia Before Newborn Screening
362 Introduction. *Eur J Endocrinol*. May 2016;1-21. doi:10.1530/EJE-16-0171.
- 363 21. Billerbeck AEC, Mendonca BB, Pinto EM, Madureira G, Arnhold IJP, Bacheega TASS.
364 Three novel mutations in CYP21 gene in brazilian patients with the classical form of 21-
365 hydroxylase deficiency due to a founder effect. *J Clin Endocrinol Metab*.
366 2002;87(9):4314-4317. doi:10.1210/jc.2001-011939.

- 367 22. Soardi FC, Barbaro M, Lau IF, et al. Inhibition of CYP21A2 enzyme activity caused by
368 novel missense mutations identified in brazilian and scandinavian patients. *J Clin*
369 *Endocrinol Metab.* 2008;93(6):2416-2420. doi:10.1210/jc.2007-2594.
- 370 23. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, et al. Primer3--new capabilities and
371 interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(15):e115. doi:10.1093/nar/gks596.
- 372 24. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program
373 Primer3. *Bioinformatics.* 2007;23(10):1289-1291. doi:10.1093/bioinformatics/btm091.
- 374 25. Coeli FB, Soardi FC, Bernardi RD, et al. Novel deletion alleles carrying CYP21A1P/A2
375 chimeric genes in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *BMC Med Genet.*
376 2010;11:104. doi:10.1186/1471-2350-11-104.
- 377 26. Applied Biosystems. *DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Applied Biosystems*
378 *Chemistry Guide.* 2nd ed.; 2009. doi:10.1016/S0165-022X(99)00041-X.
- 379 27. Marino R, Ramirez P, Galeano J, et al. Steroid 21-hydroxylase gene mutational spectrum
380 in 454 Argentinean patients: Genotype-phenotype correlation in a large cohort of
381 patients with congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011;75(4):427-
382 435. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04123.x.
- 383 28. Fardella CE, Poggi H, Soto J, et al. Mutations in the CYP21B gene in a Chilean
384 population with simple virilizing congenital adrenal hyperplasia. *J Endocrinol Invest.*
385 2000;23(6):412-416. doi:10.1007/BF03343746.
- 386 29. Fardella CE, Poggi H, Pineda P, et al. Salt-Wasting Congenital Adrenal Hyperplasia:
387 Detection of Mutations in CYP21B Gene in a Chilean Population*. *J Clin Endocrinol*
388 *Metab.* 1998;83(9):3357-3360.
- 389 30. de Carvalho TAA, de Souza ICN, Yoshioka FKN, et al. CYP21 gene mutations in

- 390 Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency from the Amazon region. *Genet Mol*
391 *Biol.* 2008;31(3):626-631.
- 392 31. Silveira E, dos Santos E, Bachega T, van der Linden Nader, I Gross J, Elnecave R. The
393 actual incidence of congenital adrenal hyperplasia in Brazil may not be as high as
394 inferred: an estimate based on a public neonatal screening program in the state of Goiás.
395 *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2008;21(5):455-460.
- 396 32. Silveira EL, Elnecave RH, dos Santos EP, et al. Molecular analysis of CYP21A2 can
397 optimize the follow-up of positive results in newborn screening for congenital adrenal
398 hyperplasia. *Clin Genet.* 2009;76(6):503-510. doi:10.1111/j.1399-0004.2009.01274.x.
- 399 33. Gidlöf S, Wedell A, Guthenberg C, von Döbeln U, Nordenström A. Nationwide neonatal
400 screening for congenital adrenal hyperplasia in sweden: a 26-year longitudinal
401 prospective population-based study. *JAMA Pediatr.* 2014;168(6):567-574.
402 doi:10.1001/jamapediatrics.2013.5321.
- 403 34. Gomes LG, Huang N, Agrawal V, Mendonça BB, Bachega TASS, Miller WL.
404 Extraadrenal 21-hydroxylation by CYP2C19 and CYP3A4: Effect on 21-hydroxylase
405 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(1):89-95. doi:10.1210/jc.2008-1174.
- 406 35. Reisch N, Idkowiak J, Hughes BA, et al. Prenatal diagnosis of congenital adrenal
407 hyperplasia caused by P450 oxidoreductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.*
408 2013;98(3):1-9. doi:10.1210/jc.2012-3449.
- 409 36. Stikkelbroeck NMML, Hoefsloot LH, Wijs IJDE, Otten BJ, Hermus ADRMM,
410 Sistermans EA. CYP21 Gene Mutation Analysis in 198 Patients with 21- Hydroxylase
411 Deficiency in The Netherlands : Six Novel Mutations and a Specific Cluster of Four
412 Mutations. 2016;88(July):3852-3859. doi:10.1210/jc.2002-021681.

- 413 37. Skordis N, Kyriakou A, Tardy V, et al. Molecular Defects of the CYP21A2 Gene in
414 Greek-Cypriot Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia. *Horm Res Paediatr.*
415 2011;75(3):180-186. doi:10.1159/000320040.
- 416 38. New MI, Abraham M, Gonzalez B, et al. Genotype-phenotype correlation in 1,507
417 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proc*
418 *Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(7):2611-2616. doi:10.1073/pnas.1300057110.
- 419 39. Carvalho DF, Miranda MC, Gomes LG, et al. Molecular CYP21A2 Diagnosis in 480
420 Brazilian Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia Before Newborn Screening
421 Introduction. *Eur J Endocrinol.* 2016;(May):1-21.
- 422 40. Fontes N, Pereira M, Nascimento M, Oliveira E, Espada F V., Fonseca M. Hiperplasia
423 congénita da suprarrenal por deficiência de 21-hidroxilase: correlação genótipo-
424 fenótipo. *Rev Port Endocrinol Diabetes e Metab.* 2012;7(2):8-12.
425 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.rpedm.2012.12.001.
- 426 41. SALZANO FM. Interethnic variability and admixture in Latin America - social
427 implications. *Biol Trop.* 2004:405-415.
428 [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442004000300003&lng=en)
429 [77442004000300003&lng=en.](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442004000300003&lng=en)
- 430 42. Homburger JR, Moreno-estrada A, Gignoux CR, et al. Genomic Insights into the
431 Ancestry and Demographic History of South America. *Plos Genet.* 2015:1-26.
432 doi:10.1371/journal.pgen.1005602 December.
- 433 43. Bachega TASS, Billerbeck AEC, Madureira G, et al. Molecular genotyping in Brazilian
434 patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin*
435 *Endocrinol Metab.* 1998;83(12):4416-4419.

- 436 44. Ordoñez-Sánchez ML, Ramírez-Jiménez S, López-Gutierrez AU, et al. Molecular
437 genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican
438 population: Identification of possible new mutations and high prevalence of apparent
439 germ-line mutations. *Hum Genet.* 1998;102(2):170-177. doi:10.1007/s004390050672.
- 440 45. Haider S, Islam B, D'Atri V, et al. Structure-phenotype correlations of human CYP21A2
441 mutations in congenital adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
442 2013;110(7):2605-2610. doi:10.1073/pnas.1221133110.
- 443 46. Friães A, Rêgo AT, Aragüés JM, et al. CYP21A2 mutations in Portuguese patients with
444 congenital adrenal hyperplasia: Identification of two novel mutations and
445 characterization of four different partial gene conversions. *Mol Genet Metab.*
446 2006;88(1):58-65. doi:10.1016/j.ymgme.2005.11.015.
- 447 47. Wilson RC, Nimkarn S, Dumic M, et al. Ethnic-specific distribution of mutations in 716
448 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Mol*
449 *Genet Metab.* 2007;90(4):414-421. doi:10.1016/j.ymgme.2006.12.005.
- 450 48. Ezquieta B, Cueva E, Oyarzábal M, Oliver A, Varela JM, Jariego C. Gene conversion
451 (655G splicing mutation) and the founder effect (Gln318Stop) contribute to the most
452 frequent severe point mutations in congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase
453 deficiency) in the Spanish population. *Clin Genet.* 2002;62(2):181-188.
454 doi:10.1034/j.1399-0004.2002.620213.x.
- 455 49. Krone N, Rose IT, Willis DS, et al. Genotype-phenotype correlation in 153 adult patients
456 with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: Analysis of the
457 United Kingdom congenital adrenal hyperplasia adult study executive (CaHASE)
458 cohort. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(2):346-354. doi:10.1210/jc.2012-3343.
- 459 50. Ohlsson G, Müller J, Skakkebak NE, Schwartz M. Steroid 21-hydroxylase deficiency:

- 460 Mutational spectrum in Denmark, three novel mutations, and in vitro expression
461 analysis. *Hum Mutat.* 1999;13(6):482-486. doi:10.1002/(SICI)1098-
462 1004(1999)13:6<482::AID-HUMU8>3.0.CO;2-0.
- 463 51. Wedell A, Thilen A, Ritzén EM, Stengler B, Luthman H. Mutation Spectrum of the
464 Steroid 21-Hydroxylase Gene in Sweden: Implications for Genetic Diagnosis and
465 Association with Disease Manifestation. *Endocrinol Metab.* 1994;78(4):1145-1152.
466 doi:10.1210.
- 467 52. Dolzán V, Sólyom J, Fekete G, et al. Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and
468 the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital
469 adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol.* 2005;153(1):99-106. doi:10.1530/eje.1.01944.
- 470

Table 1. Primers and reaction conditions used for Nested PCRs.

Primer name	Assay ^a	Forward primers (5' → 3' direction)	Concentrations ^b (M/S)	Reverse primers (5' → 3' direction)	Concentrations ^c (M/S)	Amplicon sizes (pb)
Exon 1	M/S	CTGGGGCTCTTGAGCTATAA	0.48/0.5 pM	GAGATCAGCCTCTCACCTTG	0.48/ 0.5 pM	270
Intron 2	M/S	CTTTCCAGAGCAGGGAGTAG	2.4/ 0.5 pM	CAGACCTGAGCCACTTACCT	2.4/ 0.5 pM	364
Exon 3/ 4	M/S	CATATCTGGTGGGGAGAAAAG	0.48/ 0.5 pM	AGGCACCTTGATCTTGTCTC	1.28/ 0.5 pM	476
Exon 5/ 7	M	GACGTGATTCCCTTTCTCAG ^d	1.28 pM	GAAGGAGCCTTTTGCTTGT ^e	0.8 pM	615
Exon 5/ 6	S	GACGTGATTCCCTTTCTCAG ^d	0.5 pM	AACTGGGGTATGCAAAAGAA	0.5 pM	318
Exon 7	S	TTCTTTGCATACCCAGTT	0.5 pM	GAAGGAGCCTTTTGCTTGT ^e	0.5 pM	327
Exon 8	M/S	CTCACTCAGCTCTGAGCACT	1.28/0.5 pM	ATGTCGTAGCCGGAGATG	1.28/ 0.5 pM	419
Exon 9/ 10	M/S	ACAGTCATCATTCCGAACCT	1.28/ 0.5 pM	TGCATCTTGAGGATGACACT	1.28/ 0.5 pM	375

^aPrimers set used (M) at Nested Multiplex PCR reaction; (S) Nested PCR for direct sequencing; ^b Forward primer concentration[?]; ^c Reverse primer concentration;

^dEqual sequence; ^eEqual sequence.

Table 2. Primer sequences and reaction conditions used for multiplex minisequencing reaction.

Mutation (SNP ID number)	Concentration per sample	Sequence (5' → 3' direction)	Primer length ^a	Sense/ Antisense	WT		MUT	
					nt	size peak	nt	size peak
p.Pro30Leu (rs9378251)	0.1 μM	AAGCTCCGGAGCCTCCACCTCC	22	Sense	C	25.7	T	26.79
p.Gln318Ter (rs7755898)	0.1 μM	GATCATTCCCCAGATTGAGCAGCGACTG	28	Sense	C	27.6	T	33.24
p.Arg408Cys (rs72552757)	0.3 μM	TTTTTTTTTTTTTCTGTCCACCCGCCCGCAGAT	34	Sense	C	37.41	T	39.38
p.Arg356Trp (rs7769409)	0.1 μM	GCCCTTGCTCAATGCCACCATCGCCGAGGTGCTGCGCCTG	40	Sense	C	42.53	T	44.62
p.Pro453Ser (rs6445)	0.3 μM	GCTCTTCGTGGTGCTGACCCGACTGCTGCAGGCCTTACGCT GCTG	46	Sense	C	50.13	T	51.65
p.Gly110ValfsX21 (rs387906510)	0.3 μM	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGCTTCCAGA GCAGGGA	52	Antisense	G	55.44	C	54.32
IVS2-13A/C>G (rs6467)	0.1 μM	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGCCAC CCTCCAGCCCCA	58	Antisense	A/ C	59.25/ 59.02	G	58.47
p.Leu306PhefsX6 (ci920933)	0.3 μM	TGGACCTCCTGATCGGTGGCACTGAGACCACAGCAAACACC CTCTCCTGGGCCGTGGTTTTTTT	64	Sense	G	66.82	T	67.83
p.His62Leu (rs9378252)	0.1 μM	TTGCTGCAGCCCGACCTCCCAATCTATCTGCTTGGCCTGACT CAGAAATTCGGGCCATCTACAGGCTCC	70	Sense	A	71.52	T	73.35
p.Val237Glu (rs12530380)	0.5 μM	TTT TTTTTTTTTTTTTTTTTGTGCTGCCTCAGCTGCATCTCC	83	Antisense	T	85.5	A	86.12
p.Val281Leu(rs6471)	0.5 μM	TGGCAGGCCAGTGGAGGGACATGATGGACTACATGCTCCAA GGGGTGGCGCAGCCGAGCATGGAAGAGGGCTCTGGACAGCT CCTGGAAGGGCAC	95	Sense	G	95.29	T	96.0
p.Ile172Asn (rs6445)	0.1 μM	TTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTCACCT GCAGCATCA	101	Sense	T	102.82	A	101.75

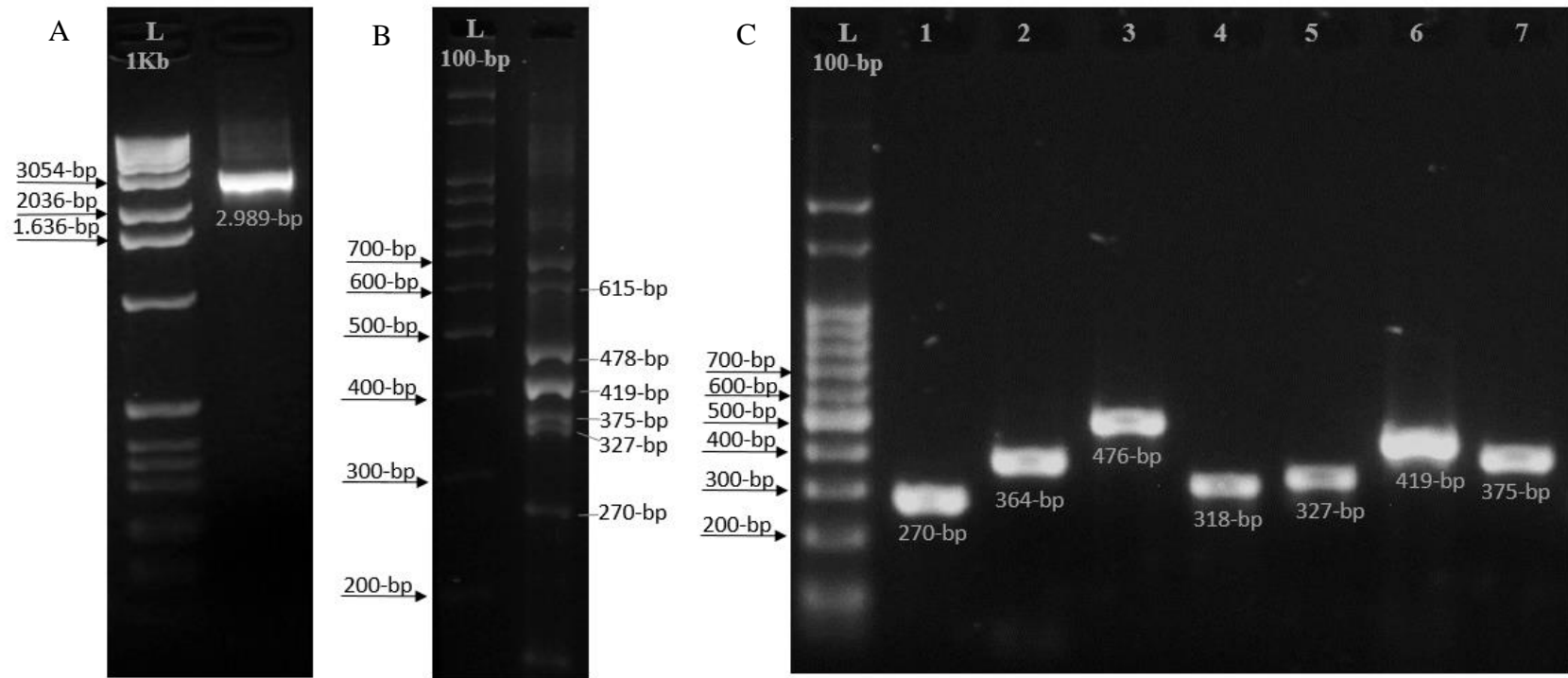


Figure 1. Electrophoresis of DNA fragments. (A) Allele-specific PCR of *CYP21A2* gene (1% agarose gel); (B) Nested multiplex PCR amplicons (3% agarose gel); (C) Nested PCR amplicons for direct sequencing assay (1.6% agarose gel. L 1 Kb: 1 Kb DNA ladder (Thermo Fisher scientific); L 100-bp: 100-bp DNA ladder (Ludwig Biotec, Alvorada, Brazil).

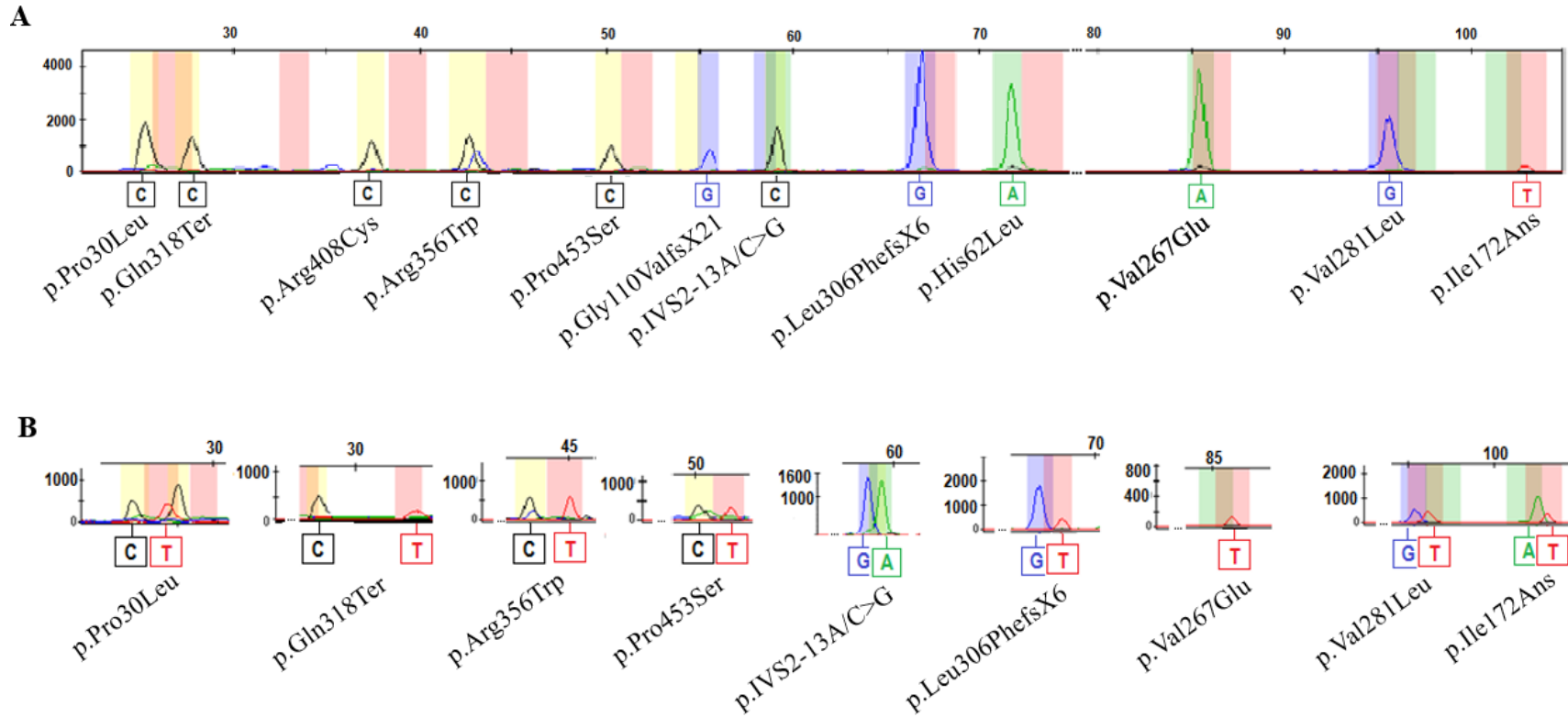


Figure 2. Electropherograms of CAH multiplex minisequencing. (A) Electropherograms of 12 wild-type alleles (alleles of homozygous state). The blue peak on p.Arg356Trp is a reaction noise. (B) Electropherograms of 8 mutant alleles (heterozygous or homozygous state).

Table 3. *CYP21A2* genotypes grouped according to residual 21-hydroxylase enzymatic activities.

Mutations groups	Genotypes	Number of Cases
Null and A groups (17)	Del <i>CYP21A2</i> / Large gene conversion	1
	Del <i>CYP21A2</i> / Cluster E6	1
	Del 30-Kb / Cluster E6	1
	p.Gln318Ter / p.Gln318Ter	2
	Del <i>CYP21A2</i> / p.Arg356Trp	1
	Del <i>CYP21A2</i> / IVS2-13A/C>G	1
	p.Gly110ValfsX21; IVS2-13A/C>G / IVS2-13A/C>G	1
	IVS2-13A/C>G / IVS2-13A/C>G	6
	Del 30Kb / IVS2-13A/C>G	2
	p.Leu306PhefsX6; IVS2-13A/C>G / IVS2-13A/C>G	1
B group (2)	p.Ile172Ans /p.Ile172Ans	1
	Del <i>CYP21A2</i> / p.Ile172Ans	1
C group (12)	IVS2-13A/C>G / p.Val281Leu	1
	p.Pro453Ser / p.Pro453Ser	1
	p.Gln318Ter; p.Arg356Trp; p.Leu306PhefsX6 / p.Val281Leu	1
	p.Gln318Ter / p.Val281Leu	1
	p.Arg356Trp / p.Val281Leu	1
	p.Val281Leu / p.Val281Leu	7
WT group (135)	p.Gln318Ter / WT	5
	p.Arg356Trp / WT	4
	p.Val281Leu / WT	8
	WT / WT	118
Total		166

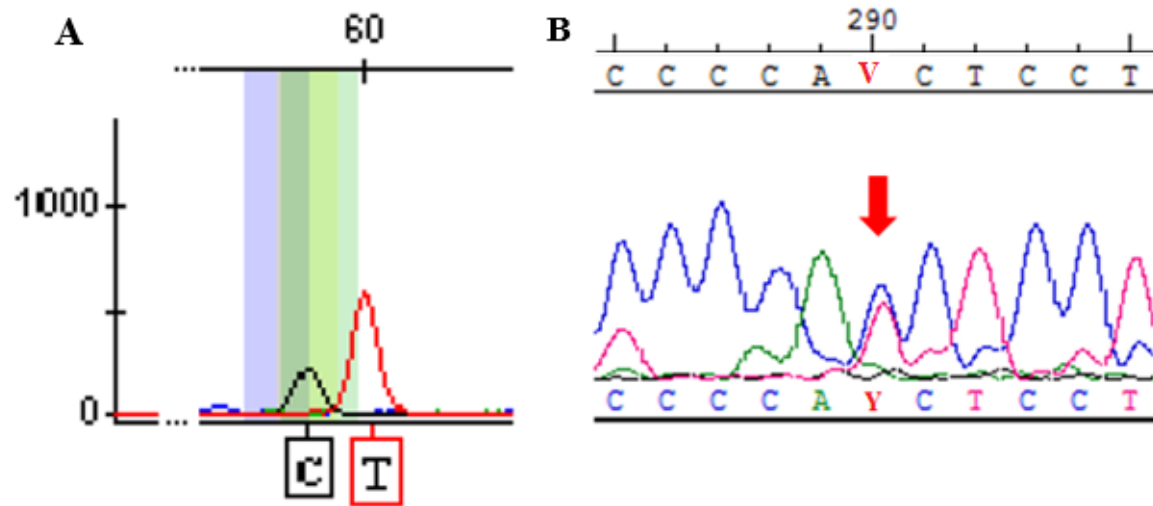


Figure 3. New variant T detected on intron 2 of *CYP21A2* G gene (rs6467; IVS2-13A/C>G). (A) Electropherogram of multiplex minisequencing: benign allele C (peak black) and new variant T (peak red). (B) Direct sequencing: heterozygosity pattern (red arrow), C allele (blue) and T allele (pink). The first sequence is the standard sequence (e.g., RefSeq NG_007941.2). V: C, G or A; Y: C or T. The second is the sequence obtained from DNA analyzed.

Table 4. Comparison of the most common mutations found in *CYP21A2* gene in different populations worldwide.

Country (State or region)	N° of alleles	Number of mutant alleles (frequency %)										<i>CYP21A2</i> (LD, LGC)
		p.Pro30Leu	p.Gln318Ter	p.Arg356Trp	p.Pro453Ser	p.Gly110ValfsX21	IVS2-13A/C>G	p.Leu306PhefsX6	Cluster E6	p.Val281Leu	p.Ile172Ans	
Brazil (RS) present study	96	0	11(11.5)	7(7.3)	2 (2.1)	1 (1.0)	20 (20.8)	2 (2.1)	3 (3.1)	26 (27.1)	3 (3.1)	9 (9.4)
Brazil (SP+NE) (20)	856	5 (0.6)	52 (6.1)	46 (5.4)	12 (1.4)	15 (1.8)	181 (21.1)	19 (2.2)	10 (1.2)	228 (26.6)	64 (7.5)	77 (9.0)
Brazil (GO) (32)	56	0	9 (16.1)	7 (12.5)	0	0	16 (28.6)	2 (3.6)	0	5 (8.9)	6 (10.7)	9 (16.1)
Brazil (AR) (30)	92	6 (6.5)	11 (12.0)	1 (1.1)	●	1 (1.1)	33 (35.9)	8 (8.7)	6 (6.5)	11 (12.0)	2 (2.2)	●
Argentina (27)	866	6 (0.7)	58 (6.7)	36 (4.2)	12 (1.4)	7 (0.8)	178 (20.6)	●	17 (2.0)	227 (26.2)	71 (8.2)	97 (11.2)
Chile (27, 28)	164	0	15 (9.1)	16 (9.8)	●	●	26 (15.9)	1 (0.6)	3 (1.8)	4 (2.4)	21 (12.8)	32 (19.5)
Mexico (44)	94	8 (8.5)	4 (4.2)	7 (7.4)	2 (2.1)	2 (2.1)	45 (47.9)	1 (1.1)	0	8 (8.5)	11 (11.7)	1 (1.0)
United States (45)	3005	78 (2.6)	105 (3.5)	108 (3.6)	0	63 (2.1)	688 (22.9)	0	63 (2.1)	718 (23.9)	246 (8.2)	601 (20.0)
Portugal (46)	112	2 (1.8)	7 (6.3)	2 (1.8)	2 (1.6)	3 (2.7)	11 (9.8)	5 (4.4)	0	29 (25.9)	11 (9.8)	29 (25.9)
Italy (47)	106	0	5 (4.7)	6 (5.7)	0	1 (0.9)	23 (21.7)	●	●	34 (32.1)	14 (13.2)	3 (2.8)
Spain (48)	354	●	33 (9.3)	0	0	12 (3.3)	62 (17.5)	5 (1.4)	●	120 (33.9)	13 (3.7)	68 (19.2)
Germany (49)	310	8 (2.6)	15 (4.8)	14 (4.5)	1 (0.3)	5 (1.6)	94 (30.3)	1 (0.3)	3 (1.0)	9 (2.9)	61 (19.7)	85 (27.4)
Denmark (50)	136	3 (2.2)	12 (8.8)	3 (2.2)	0	0	46 (33.8)	1 (0.7)	2 (1.5)	6 (4.4)	14 (10.3)	49 (36.0)
Sweden (51)	186	3 (1.6)	6 (3.2)	8 (4.3)	1 (0.5)	2 (1.2)	56 (30.1)	1 (0.5)	2 (1.1)	13 (7.0)	38 (20.4)	55 (29.6)
Middle European (52)	864	32 (3.7)	22 (2.5)	21 (2.4)	6 (0.7)	9 (1.0)	270 (31.2)	14 (1.6)	3 (0.3)	29 (3.3)	125 (14.5)	264 (30.5)
Average		2.2	7.5	5.0	0.8	1.4	25.8	2.3	1.5	15.6	10.9	18.6
SD		2.6	3.8	3.4	0.8	0.9	9.1	2.4	1.7	11.8	5.6	10.4

RS: Rio Grande do Sul state (Southern Brazil region); SP+NE: São Paulo (southeast Brazil region) and Northeast Brazil region; GO: Goiás (central west Brazil region); AR: Amazon region (north Brazil region); LD: large *CYP21A2* gene deletion; LGC: large gene conversion; SD: standard deviation. ● not studied.

Table 5. Comparison of allele's frequencies of *CYP21A2* gene mutations in different populations of South America.

Country (State)	N° of alleles	<i>CYP21A2</i>											
		p.Pro30Leu	p.Gln318Ter	p.Arg356Trp	p.Pro453Ser	p.Gly110ValfsX21	IVS2-13A/C>G	p.Leu306PhefsX6	Cluster E6	p.Val281Leu	p.Ile172Asn	p.Arg408Cys	(LD, LGC)
Brazil (RS) present study	96	0.0%	11.5%	7.3%	2.1%	1.0%	20.8%	2.1%	3.1%	27.1%	3.1%	0.0%	9.4%
Brazil (SP+NE)(21)	856	0.6%	6.1%	5.4%	1.4%	1.8%	21.1%	2.2%	1.2%	26.6%	7.5%	0.5%	9.0%
Brazil (GO)(32)	56	0.0%	16.1%	12.5%	0.0%	0.0%	28.6%	3.6%	0.0%	8.9%	10.7%	1.8%	16.1%
Brazil (AR) (30)	92	6.5%	12.0%	1.1%	●	1.1%	35.9%	8.7%	6.5%	12.0%	2.2%	0.0%	●
Argentina (27)	866	0.7%	6.7%	4.2%	1.4%	0.8%	20.6%	●	2.0%	26.2%	8.2%	0.1%	11.2%
Chile (27, 28)	164	0.0%	9.1%	9.8%	●	●	15.9%	0.6%	1.8%	2.4%	12.8%	●	19.5%
% within Row		0.8%	7.3%	5.3%	1.4%	1.2%	21.3%	2.5%	1.8%	23.5%	7.8%	0.3%	11.0%
Pearson chi-square ^a		<0.001	0.012	0.004	0.805	0.380	0.005	0.004	0.015	<0.001	0.020	0.171	0.002

RS: Rio Grande do Sul state (southern Brazil region); SP+NE: São Paulo (southeast Brazil region) and Northeast Brazil region; GO: Goiás (central west Brazil region); AR: Amazon region (north Brazil region); LD: large *CYP21A2* gene deletion; LGC: large gene conversion; SD: standard deviation; Cluster E6: p.Ile237Asn, p.Val237Glu and p.Met239Lys.

● not studied; ^aChi-square test with exact p-value.

4. Discussão

No presente estudo, foram selecionadas três técnicas moleculares para auxiliar a detecção de mutações no gene *CYP21A2* em programas de triagem neonatal. A primeira técnica foi o minisequenciamento multiplex, implantada para a análise de doze mutações pontuais: p.Pro30Leu, p.His62Leu, IVS2-13A/C>G, p.Gly110ValfsX21, p.Ile172Ans, p.Val237Glu (segunda mutação do *Cluster E6*), p.Val281Leu, p.Leu307PhefsX6, p.Gln318Ter, p.Arg356Trp, p.Arg408Cys, p.Pro453Ser. Tais mutações pontuais são as mais frequentes encontradas na população brasileira, representando em torno de 74% do total dos casos de deficiência da 21-hidroxilase, segundo dados obtidos no maior estudo brasileiro até o momento⁷⁵. Essa técnica exigiu um trabalho detalhado de bioinformática para os ajustes de concentração, sequencias alvos e tamanhos de fragmentos. Depois de padronizada, a técnica se mostrou rápida, tendo sido utilizada para todos os pacientes com suspeita de HAC analisados neste estudo^{76,62,71}.

Em relação à eficiência, o minisequenciamento multiplex mostrou boa sensibilidade para detectar todas as mutações propostas, inclusive a inserção de um nucleotídeo (p.Leu306PhefsX6). Tais dados mostram, portanto, que essa metodologia é adequada para a detecção de mutações pontuais, podendo ser utilizada como primeira escolha em uma triagem molecular de recém-nascidos com suspeita de HAC. A mutação mais frequente foi a p.Val281Leu, 27.1% dos alelos, o que era de se esperar por se tratar da mutação mais comum encontrada nos NC, forma mais incidente de HAC⁴². Além disso, pode-se concluir que os pontos de cortes utilizados nas análises bioquímicas do 17OHP no teste do pezinho do Rio Grande do Sul associado ao teste molecular estão possibilitando a identificação de indivíduos frequentemente subdiagnosticados, permitindo a estes um acompanhamento mais adequado durante a pré-puberdade⁷⁷. A segunda mutação mais frequente foi a IVS2-

13A/C>G, 20.8% dos alelos, que, por sua vez, está associada principalmente a forma PS, mas também a VS⁴². Esse dado também condiz com a alta incidência relatada em outros trabalhos já descritos na literatura, outrossim, essa é a mutação mais incidente nos PS, forma identificada efetivamente na grande maioria das triagens de recém-nascidos^{50,60,76-78}.

O MLPA, com o conjunto de sondas P050-C1 para HAC, foi a segunda técnica empregada. Esse kit comercial foi utilizado para complementar a técnica de minisequenciamento nos casos cujos resultados não condiziam com os dados clínicos. Esta metodologia é mais robusta, pois permite a identificação de grandes deleções, duplicações, rearranjos e conversões. Esses eventos representam cerca de 9% das mutações no gene *CYP21A2* na população brasileira⁵¹.

O uso do MLPA para identificar grandes deleções também foi eficiente como metodologia complementar. Importante salientar que a eficiência dessa técnica está diretamente relacionada com uma extração de DNA de alta qualidade e baixo número quebras genômicas de forma que as moléculas de DNA sejam as mais íntegras possíveis. Essa exigência se faz necessária devido ao fato das sondas presentes no kit hibridizam em uma região que abrange cerca de 10 kb e qualquer quebra do DNA pode comprometer a interpretação correta de eventos de deleção ou duplicação. Entre as três metodologias testadas para a extração de DNA (*Salting out*, Proteinase K com fenol/clorofórmio e *QIAamp DNA Mini Kit* da Qiagen), a que se mostrou mais eficiente foi o uso de Proteinase K em conjunto com a solução de fenol/clorofórmio, sem o uso de agitações mecânicas vigorosas (vide anexo II).

A análise conjunta dos pais dos pacientes estudados, além de ser utilizada para a análise de segregação alélica, também foi de suma importância para a confirmação e elucidação dos casos complexos ou com eventos deletérios⁸¹.

O sequenciamento por *Sanger* do gene *CYP21A2* foi empregado quando os dados das duas técnicas anteriores não estavam de acordo com os dados clínicos, afim de buscar, portanto, mutações não presentes no painel do minisequenciamento multiplex e nem no conjunto sondas do kit de MLPA. Entretanto, não foram encontradas mutações novas ou com caráter patogênico.

A alta taxa de casos não confirmados como HAC podem estar associados a resultados falso positivo que são esperados na triagem neonatal, uma vez que, a triagem é realizada através da dosagem do 17OHP que pode variar devido a prematuridade, baixo peso do recém-nascido ou outra doença neonatal. Além disso, não é possível descartar a existência de alguma mutação que não tenha sido detectada, visto que, o gene *CYP21A2* não foi totalmente sequenciado. Genes moduladores, como *POR*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, além de outras enzimas já descritas e que exercem influência clínica na HAC também podem ter contribuído nos casos de falso positivos^{18,59,82,83,77}.

Em relação às mutações encontradas, a taxa de homozigose foi superior à de heterozigose, sendo encontrados 17 indivíduos homozigotos e 14 heterozigotos compostos. Esse dado corrobora com outros estudos, sendo o de New *et al.* (2013), um dos mais significativos por apresentar o maior tamanho amostral (1.507 indivíduos)^{42,85,56}. Nesse trabalho de 2013, sugeriu-se que populações com maior incidência de homozigotos são aquelas que apresentam alta taxa de consanguinidade que podem, por sua vez, estar relacionadas com fatores culturais ou religiosos. Portanto, os dados obtidos no presente

estudo sugerem a existência de uma população com características genéticas mais homogêneas e com baixa taxa de miscigenação. Esse fato pode ser corroborado pelo fato do Rio Grande do Sul possuir colônias, principalmente em cidades do interior, que preservam as culturas trazidas por imigrantes alemães, italianos e açorianas. Diferentemente do RS, em regiões onde há grande miscigenação, como sudeste e nordeste, Bacheга *et al.* (2016) encontraram apenas 30% de mutações em homozigose.

Na análise comparativa com outros países da América do Sul, foi identificada diferença estatística em duas mutações p.Pro30Leu e p.Val281Leu. A prevalência da p.Pro30Leu foi baixa na maioria das populações analisadas, no entanto, a região Amazônica apresentou a maior incidência. Esse dado do norte do Brasil, responsável pela diferença estatística dessa variante, se assemelham ao encontrado no México. Interessante notar que, tanto a região amazônica quanto o México, apresentam uma grande influência indígena, além da africana e europeia (portuguesa e espanhola, respectivamente)^{86,87}.

A mutação p.Val281Leu apresentou dois grupos com distintas frequências, o primeiro é constituído pelos estudos da Argentina, sul do Brasil e sudeste + nordeste, assemelhando-se ao encontrado em estudos realizados em populações de Portugal, Itália e Espanha. Já o Chile e o centro-oeste e norte do Brasil fazem parte do grupo com menor incidência da p.Val281Leu, aproximando-se dos estudos do México, Alemanha, Dinamarca, Suécia e Europa central (Áustria, República Checa, Hungria, Eslováquia e Eslovênia). Esses dados podem revelar uma maior heterogeneidade dessa mutação entre diferentes populações.

Por outro lado, a maioria das variantes analisadas apresentaram uma distribuição semelhante entre os estudos analisados da América do Sul. As mutações IVS-13A/C>G e p.Val281Leu se mostraram mais frequentes, enquanto a p.Pro453Ser e a p.Gly110ValfsX21

foram as mais raras. Além disso, quase todos os estudos detectaram P.Gln318Ter, p.P.Arg356Trp, IVS2-13A/C>G, p.Val281Leu, p.Ile172Ans e eventos deletérios no gene *CYP21A2*, mostrando a importância de analisar essas mutações em todos os painéis moleculares associados a programas de triagem de HAC. Muitos estudos destacam a importância de incluir também a detecção do p.Pro30Leu, p.Gly110ValfsX21 e *Cluster E6* a triagem molecular^{76, 62, 88}. No entanto, ressalta-se que as frequências das mutações variam em cada população, sendo muito importante a análise populacional antes de qualquer implantação de teste molecular.

Por fim, é importante mencionar a relevância do uso de técnicas moleculares para elucidar quadros clínicos duvidosos ou complexos, visando a rápida adesão ao melhor tratamento médico, além de amenizar o estresse familiar nos casos falsos positivos^{3,15,51,81}.

5. Conclusão

A padronização e a aplicação das três metodologias moleculares escolhidas para realizar a triagem de mutações no gene *CYP21A2* em recém-nascidos se mostraram eficientes para o objetivo proposto, visto que, todas as mutações propostas foram identificadas (grandes eventos deletérios, p.Gln318Ter, p.Arg356Trp, p.Leu306PhefsX6, p.Val237Glu, IVS2-13A/C>G, p.Ile172Ans, p.Pro30Leu, p.Pro453Ser, p.Val281Leu, p.Gly110ValfsX21, p.Arg408Cys e p.His62Leu). Além disso, os dados epidemiológicos obtidos na população do Rio Grande do Sul corroboraram com outros estudos brasileiros e sul americanos.

6. Perspectivas

- Analisar *in silico* a nova variante T encontrada na posição c.293-13C>A (NM_000500.7);
- Estabelecer e padronizar técnicas para a detecção de outros genes relacionados com HAC: 11 β -hidroxilase, 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (3 β -HDSB2), 17 α -hidroxilase (17 α -OH), P450 oxidoreductase (POR) e regulador agudo da esteroidogênese (StAR);
- Expandir o serviço de detecção molecular para outros programas de triagem do Brasil.

7. Referências Bibliográficas

1. **Arlt W, Krone N.** Adult consequences of congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res.* 2007;68 Suppl 5(suppl 5):158-164.
2. **Marumudi E, Khadgawat R, Surana V, Shabir I, Joseph A, Ammini AC.** Diagnosis and management of classical congenital adrenal hyperplasia. *Steroids.* 2013;78(8):741-746.
3. **White PC, Speiser PW.** Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2000;30(1):245-291.
4. **New MI.** Steroid 21-Hydroxylase Deficiency (Congenital Adrenal Hyperplasia). *Am J Med.* 1995;98:2-8.
5. **Parsa AA, New MI.** Steroid 21-Hydroxylase Deficiency in Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;16.
6. **Kamoun M, Feki MM, Sfar MH, Abid M.** Congenital adrenal hyperplasia: Treatment and outcomes. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013;17(Suppl 1):S14-S17.
7. **Bento LR, Ramos, Clarissa Cerchi A. Gonçalves, Ezequiel Moreira de-Mello, Maricilda Palandi Baptista MTM, Lemos-Marini, Sofia Helena V. Guerra-Júnior G.** Hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase , forma clássica : estudo da frequência em famílias de indivíduos afetados. *Rev Paul Pediatr.* 2007;25(3):202-206.
8. **Clark AJL, Chan LF, Chung TT, Metherell LA.** The genetics of familial glucocorticoid deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23(2):159-165.
9. **Dolzán V, Sólyom J, Fekete G, Kovács, J, Rakosnikova, V, Votava, F, Lebl, J, Pribilincova, Z, Baumgartnet-Parzer, SM, Riedl, S, Waldhauser, F, Frisch, H, Stopar-Obreza, M, Krzysnik, C, Battelino, T.** Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol.* 2005;153(1):99-106.
10. **Pang S, Clark A, Neto EC, Giugliani, R, Dean, H, Winter, J, Dhondt, JL,**

- Farriaux,JP, Graters, A, Cacciari, E, Balsamo, A, Piazzzi, S, Suwa, S, Kuroda, Y, Wada, Y, Naruse, H, Kizaki, T, Ichihara, N, Arai, O, Harada, S, Fujieda, K, Matsuura, N, Suwa, S, Kusuda, S, Fukushi, M, Mizushima, Y, Kikuti, Y, Yoyoura, T, Saisho, S, Shimozawa, K, Matsumoto, M, Webster, D, Vilarinho, L, Wallace, AM, Eguileor, I, Marzana, I, Iñiguez, ED, Fernandez Sanchez, A, Gonzalez Gallego, C, Hagenfeldt, L, Guthenberg, C, von Dobeln, U, Thilen, A, Larsson, A, Torresani, T, LeBlond, C, Papadea, C, Rumph, F, Craft, W, Kling, S, Tsalikian, E, Cook, J, Getchell, J, Susanin, J, Mitchell, M, Hofman, L, Naylor, E, Therrell, B, Brown, L, Prentice, L, Glass, M, Neier, S.** Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: Newborn screening and its relationship to the diagnosis and treatment of the disorder. *Screening*. 1993;2(2-3):105-139.
11. **Vinson GP.** Functional Zonation of the Adult Mammalian Adrenal Cortex. 2016;10(June):1-23.
 12. **Al-Agha AE, Ocheltree AH, Al-Tamimi MD.** Association between genotype, clinical presentation, and severity of congenital adrenal hyperplasia: A review. *Turk J Pediatr*. 2012;54(4):323-332.
 13. **Pang S, Spence DA, New MI.** Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia with Special Reference to Screening in Alaska. *Ann N Y Acad Sci*. 1985;(6):90-102.
 14. **Therrell BJ, Berenbaum S, Manter-Kapanke V, Simmank, J, Korman, K, Prentice, L, Gonzalez, J, Gunn, S.** Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics*. 1998;101(4):583-590.
 15. **Silveira EL, Elnecape RH, dos Santos EP, Moura, V, Pinto, EM, van der Linden Nader, I, Mendonca, BB, Bachega, TASS.** Molecular analysis of *CYP21A2* can optimize the follow-up of positive results in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Clin Genet*. 2009;76(6):503-510.
 16. **Barra CB, Silva IN, Pezzuti IL, Januário JN.** Triagem neonatal para hiperplasia adrenal congênita. *Rev Assoc Med Bras*. 2012;58(4):459-464.
 17. **Speiser PW, Dupont B, Rubp.Leu306PhefsX6ein P, Piazza A, Kastelan A, New**

- M.** High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1985;37(4):650-667.
18. **Krone N, Hanley NA, Arlt W.** Age-specific changes in sex steroid biosynthesis and sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007;21(3):393-401.
 19. **Krone N, Dhir V, Ivison HE, Arlt W.** Congenital adrenal hyperplasia and P450 oxidoreductase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;66(2):162-172..
 20. **Tusie-Luna M-T, Traktman P, White PC.** Determination of Functional Effects of Mutations in the Steroid Gene (CYP21) Using Recombinant Vaccinia Virus. *J Biol Chem.* 1990;265(34):20916-20923.
 21. **Temeck JW, Pang S, Nelson C, New MI.** Genetic Defects of Steroidogenesis in Premature. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64(3):609-617.
 22. **Knowles RL, Khalid JM, Oerton JM, Hindmarsh PC, Kelnar CJ, Dezateux C.** Late clinical presentation of congenital adrenal hyperplasia in older children : findings from national paediatric surveillance. *Arch Dis Child.* 2014;99:30-34.
 23. **Ostlere LS, Rumsby G, Holownia P, Jacobs HS, Rustin MHA, Honour JW.** Carrier status for steroid 21-hydroxylase deficiency is only one factor in the variable phenotype of acne. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1998;48(2):209-215.
 24. **Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y.** Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(9):2841-2845.
 25. **Yang Z, Mendoza AR, Welch TR, Zipf WB, Yung Yu C.** Modular variations of the human major histocompatibility complex class III genes for serine/threonine kinase RP, complement component C4, steroid 21-hydroxylase CYP21, and tenascin TNX (the RCCX module): A mechanism for gene deletions and disease associat. *J Biol Chem.* 1999;274(17):12147-12156.
 26. **Wedell A.** Molecular genetics of 21- hydroxylase deficiency. *Endocr Dev.* 2011;20:80-87.

27. **Blanchong CA, Zhou B, Rupert KL, Chung, EK, Jones, KN, Sotos, JF, Zipf, WB, Rennebohm, RM, Yung Yu, C.** Deficiencies of human complement component C4A and C4B and heterozygosity in length variants of RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules in caucasians. The load of RCCX genetic diversity on major histocompatibility complex-associated disease. *J Exp Med.* 2000;191(12):2183-2196.
28. **Vatay Á, Yang Y, Chung EK, Zhou, B, Blanchong, CA, Kovács, M, Karádi, I, Fust, G, Romics, L, Varga, L, Yu, CY, Szalai, C.** Relationship between complement components C4A and C4B diversities and two TNFA promoter polymorphisms in two healthy Caucasian populations. *Hum Immunol.* 2003;64(5):543-552.
29. **Choi J-H, Kim G-H, Yoo H-W.** Recent advances in biochemical and molecular analysis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2016;21(1):1-6.
30. **Bu W, Su L-K.** Characterization of functional domains of human EB1 family proteins. *J Biol Chem.* 2003;278(50):49721-49731.
31. **Pereira KMC, Faria AG., Liphaut BL, Jesus, A, Silva, C, Carneiro-Sampaio, M, Andrade, LEC.** Low C4 , C4A and C4B gene copy numbers are stronger risk factors for juvenile-onset than for adult-onset systemic lupus erythematosus. *Rheumatology.* 2016:kev436.
32. **Yih Chen J, Ling Wu Y, Yin Mok M, Jan Wu, Y-J, Lintner, KE, Wang, C-M, Chung, EK, Yang, Y, Zhou, B, Wang, H, Yu, DJHC, Alhomosh, A, Jones, K, Spencer, CH, Nagaraja, HN, Lung Lau, Y, Lau, C-S, Yung Yu, C.** Effects of Complement C4 Gene Copy Number Variations, Size Dichotomy, and C4A Deficiency on Genetic Risk and Clinical Presentation of Systemic Lupus Erythematosus in East Asian Populations. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(6):1442-1453.
33. **Barcellos LF, May SL, Ramsay PP, Quach, HL, Lane, JA, Nititham, J, Noble, JA, Taylor, KE, Quach, DL, Chung, SA, Kelly, JA, Moser, Kathy, L, Behrens, TW, Seldin, MF, Thomson, G, Harley, JB, Gaffney, PM. Criswell, LA.** High-density SNP screening of the major histocompatibility complex in systemic lupus erythematosus demonstrates strong evidence for independent susceptibility regions.

- PLoS Genet.* 2009;5(10):1-11.
34. **Merke DP, Chen W, Morissette R, Xu, Z, Van Ryzin, C, Sachdev, V, Hannoush, H, Shanbhag, SM, Acevedo, AT, Nishitani, M, Arai, AE, McDonnell, NB.** Tenascin-X haploinsufficiency associated with Ehlers-Danlos syndrome in patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(2):E379-E387.
 35. **Chang S-F, Lee H-H.** Analysis of the *CYP21A2* gene with intergenic recombination and multiple gene deletions in the RCCX module. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2011;15(1-2):35-42.
 36. **Pallan PS, Wang C, Lei L, Yoshimoto FK, Auchus RJ, Waterman MR, Guengerich FP, Egli M.** Human cytochrome P450 21A2, the major steroid 21-hydroxylase. *J Biol Chem.* 2015;290(21):13128-13143. doi:10.1074/jbc.M115.646307.
 37. **Rodrigues NR, Dunham I, Yu CY, Carroll MC, Porter RR, Campbell RD.** Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. *EMBO J.* 1987;6(6):1653-1661.
 38. **Krone N, Arlt W.** Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23(2):181-192.
 39. **White PC, New MI, Dupont B.** Cloning and expression of cDNA encoding a bovine adrenal cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984;81(April 1984):1986-1990.
 40. **Zhao B, Lei L, Kagawa N, Sundaramoorthy M, Banerjee S, Nagy LD, Guengerich FP, Waterman MR.** Three-dimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. *J Biol Chem.* 2012;287(13):10613-10622.
 41. **Haider S, Islam B, D'Atri V, Sgobba M, Poojari C, Sun L, Yuen T, Zaidi M, New MI.** Structure-phenotype correlations of human *CYP21A2* mutations in congenital adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(7):2605-2610.
 42. **New MI, Abraham M, Gonzalez B, Domic M, Razzaghy-Azar M, Chitayat D,**

- Sun L, Zaidi M, Wilson RC, Yuen T.** Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(7):2611-2616.
43. **Menassa R, Tardy V, Despert F, Bouvattier-Morel C, Brossier JP, Cartigny M, Morel Y.** p.H62L, a rare mutation of the CYP21 gene identified in two forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(5):1901-1908.
44. **Kemper B.** Structural basis for the role in protein folding of conserved proline-rich regions in cytochromes P450. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;199(3):305-315.
45. **Xu J, Voth GA.** Redox-coupled proton pumping in cytochrome c oxidase: Further insights from computer simulation. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2008;1777(2):196-201.
46. **Riepe FG, Hiort O, Grötzinger J, Sippell WG, Krone N, Holterhus PM.** Functional and structural consequences of a novel point mutation in the *CYP21A2* gene causing congenital adrenal hyperplasia: Potential relevance of helix C for P450 oxidoreductase-21-hydroxylase interaction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(7):2891-2895.
47. **Soardi FC, Barbaro M, Lau IF, Lemos-Marini SHV, Baptista MTM, Guerra G, Wedell A, Lajic S, De Mello MP.** Inhibition of *CYP21A2* enzyme activity caused by novel missense mutations identified in brazilian and scandinavian patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(6):2416-2420.
48. **Tardy V, Menassa R, Sulmont V, Lienhardt-Roussie A, Lecointre C, Brauner R, David M, Morel Y.** Phenotype-genotype correlations of 13 rare *CYP21A2* mutations detected in 46 patients affected with 21-hydroxylase deficiency and in one carrier. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(3):1288-1300.
49. **Minutolo C, Nadra AD, Fernández C, Taboas M, Buzzalino N, Casali B, Belli S, Charreau EH, Alba L, Dain L.** Structure-based analysis of five novel disease-causing mutations in 21-hydroxylase-deficient patients. *PLoS One.* 2011;6(1):1-9.
50. **Kenaan C, Zhang H, Shea E V., Hollenberg PF.** Uncovering the role of hydrophobic residues in cytochrome p450-cytochrome p450 reductase interactions.

Biochem J. 2011;50(19):3957-3967.

51. **Carvalho DF, Miranda MC, Gomes LG, Madureira G, Marcondes JAM, Billierbeck AEC, Rodrigues AS, Presti PF, Kuperman H, Damiani D, Mendonça BB, Bachega TAAS.** Molecular *CYP21A2* Diagnosis in 480 Brazilian Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia Before Newborn Screening Introduction. *Eur J Endocrinol.* May 2016:1-21.
52. **Gidlöf S, Wedell A, Guthenberg C, von Döbeln U, Nordenström A.** Nationwide neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in sweden: a 26-year longitudinal prospective population-based study. *JAMA Pediatr.* 2014;168(6):567-574.
53. **Nascimento ML, Cristiano ANB, Campos T, Ohira M, Cechinel E, Simoni G, van de Sande Lee J, Linhares RMM, Da-Silva PCA.** Ten-year evaluation of a Neonatal. *Arq Bras End Met.* 2014; 58(7):765-771.
54. **Dumic KK, Grubic Z, Yuen T, Wilson RC, Kusec V, Barisic I, Stingl K, Sansovic I, Skrabic V, Dumic M, New MI.** Molecular genetic analysis in 93 patients and 193 family members with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Croatia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016.
55. **Kolahdouz M, Mohammadi Z, Kolahdouz P, Tajamolian M, Khanahmad H.** Pitfalls in molecular diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *Adv Biomed Res.* 2015;4:189.
56. **Skordis N, Kyriakou A, Tardy V, Ioannou YS, Varvaresou A, Dracopoulou-Vabouli M, Patsalis PC, Shamma C, Neocleous V, Phylactou LA.** Molecular Defects of the *CYP21A2* Gene in Greek-Cypriot Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia. *Horm Res Paediatr.* 2011;75(3):180-186.
57. **Nunes AKC, Wachholz RG, Rover MRM, Souza LC.** Prevalência de patologias detectadas pela triagem neonatal em Santa Catarina. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2013;57(5):360-367.
58. **Pang S, Hotchkiss J, Drash A, Levine L, New M.** Microfilter Paper Method for 17 α -Hydroxyprogesterone Radioimmunoassay: Its Application for Rapid Screening for

- Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977;45(5):1003-1008.
59. **Reisch N, Idkowiak J, Hughes BA, Ivison HE, Abdul-Rahman OA, Hendon LG, Olney AH, Nielsen S, Harrison R, Blair EM, Dhir V, Krone N, Shackleton CHL, Arlt W.** Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia caused by P450 oxidoreductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3):528-536.
60. **Votava F, Török D, Kovács J, Möslinger D, Baumgartner-Parzer SM, Sólyom J, Pribilincová Z, Battelino T, Lebl J, Frisch H, Waldhauser F.** Estimation of the false-negative rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol.* 2005;152(6):869-874.
61. **Speiser P, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, Lesser M, New MI, White PC.** Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest.* 1992;90(2):584-595.
62. **Krone N, Braun A, Weinert S, Peter M, Roscher AA, Partsch CJ, Sippell WG.** Multiplex minisequencing of the 21-hydroxylase gene as a rapid strategy to confirm congenital adrenal hyperplasia. *Clin Chem.* 2002;48(6):818-825.
63. **Fiorentino F, Magli MC, Podini D, Ferraretti P, Nuccitelli A, Vitale N, Baldi M, Gianaroli L.** The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol Hum Reprod.* 2003;9(7):399-410.
64. **Wang Q, Fu L, Zhang X, Dai X, Bai M, Fu G, Cong B, Li S.** Expansion of a SNaPshot assay to a 55-SNP multiplex: Assay enhancements, validation, and power in forensic science. *Electrophoresis.* 2016:1310-1317.
65. **Paneto GG, Careta F de P.** Designing Primers for SNaPshot Technique. In: *PCR Primer Design, Methods in Molecular Biology.* Vol 1275. ; 2015:165-172.
66. **ThermoFisherScientific.** Sanger Sequencing Method. Thermo Fisher scientific. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger_sequencing_method.html>. Acessado em Junho de 2016.
67. **Sanger F, Coulson AR.** A rapid method for determining sequences in DNA by

- primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94(3):441-448.
68. **MRC-Holland.** MLPA General Protocol. 2013;3:1-13.
69. **Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G.** Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12):e57.
70. **MRC-Holland.** SALSA MLPA probemix P050-C1 CAH. 2014:1-9.
71. **Xu Z, Chen W, Merke DP, McDonnell NB.** Comprehensive mutation analysis of the *CYP21A2* gene: An efficient multistep approach to the molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *J Mol Diagnostics.* 2013;15(6):745-753.
72. **Sabelli PA.** Southern Blot Analysis. In: Rapley R, Walker JM, eds. *Molecular Biomethods Handbook.* ; 1998:77-87.
73. **New MI.** Ancient History of Congenital Adrenal Hyperplasia. *Pediatr Adrenal Dis Endocr Dev Basel, Karger.* 2011;20:202-211.
74. **Bongiovanni AM, Root AW.** The androgenital syndrome. *N Engl J Med.* 1963;268(25):1391-1399.
75. **Carvalho DF, Miranda MC, Gomes LG, Madureira G, Marcondes JAM, Billierbeck AEC, Rodrigues AS, Presti PF, Kuperman H, Damiani D, Mendonça BB, Bachega TASS.** Molecular *CYP21A2* Diagnosis in 480 Brazilian Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia Before Newborn Screening Introduction. *Eur J Endocrinol.* 2016;(May):1-21.
76. **Keen-Kim D, Redman JB, Alanes RU, Eachus MM, Wilson RC, New MI, Nakamoto JM, Fenwick RG.** Validation and clinical application of a locus-specific polymerase chain reaction- and minisequencing-based assay for congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *J Mol Diagn.* 2005;7(2):236-246.
77. **Cuhaci N, Aydin C, Yesilyurt A, Pinarli FA, Ersoy R, Cakir B.** Nonclassical Congenital Adrenal Hyperplasia and Pregnancy. *Case Rep Endocrinol.* 2015;2015:296924.
78. **Marino R, Ramirez P, Galeano J, Garrido NP, Rocco C, Ciaccio M, Warman**

- DM, Guercio G, Chaler E, MacEiras M, Bergadá I, Gryngarten M, Balbi V, Pardes E, Rivarola MA, Belgorosky A.** Steroid 21-hydroxylase gene mutational spectrum in 454 Argentinean patients: Genotype-phenotype correlation in a large cohort of patients with congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;75(4):427-435.
79. **Carrera P, Bordone L, Azzani T, Brunelli V, Garancini MP, Chiumello G, Ferrari M.** Point mutations in Italian patients with classic, non-classic, and cryptic forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet*. 1996;98(6):662-665.
80. **Ohlsson G, Müller J, Skakkebaek NE, Schwartz M.** Steroid 21-hydroxylase deficiency: Mutational spectrum in Denmark, three novel mutations, and in vitro expression analysis. *Hum Mutat*. 1999;13(6):482-486.
81. **Fontes N, Pereira M, Nascimento M, Oliveira E, Espada F V., Fonseca M.** Hiperplasia congénita da suprarrenal por deficiência de 21-hidroxilase: correlação genótipo-fenótipo. *Rev Port Endocrinol Diabetes e Metab*. 2012;7(2):8-12.
82. **Gomes LG, Huang N, Agrawal V, Mendonça BB, Bachega TASS, Miller WL.** Extraadrenal 21-hydroxylation by CYP2C19 and CYP3A4: Effect on 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(1):89-95.
83. **Saito R, Terasaki N, Yamazaki M, Masutomi N, Tsutsui N, Okamoto M.** Estimation of the Mechanism of Adrenal Action of Endocrine-Disrupting Compounds Using a Computational Model of Adrenal Steroidogenesis in NCI-H295R Cells. *J Toxicol*. 2016;2016.
84. **Reisch N, Idkowiak J, Hughes BA, Ivison HE, Abdul-Rahman OA, Hendon LG, Olney AH, Nielsen S, Harrison R, Blair EM, Dhir V, Krone N, Shackleton CHL, Arlt W.** Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia caused by P450 oxidoreductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(3):1-9.
85. **Stikkelbroeck NMML, Hoefsloot LH, Wijs IJDE, Otten BJ, Hermus ADRMM, Sistermans EA.** CYP21 Gene Mutation Analysis in 198 Patients with 21-Hydroxylase Deficiency in The Netherlands : Six Novel Mutations and a Specific Cluster of Four Mutations. 2016;88(July):3852-3859.

86. **Salzano FM.** Interethnic variability and admixture in Latin America - social implications. *Biol Trop.* 2004;405-415.
87. **Homburger JR, Moreno-estrada A, Gignoux CR, Nelson D, Sanchez E, Ortiz-tello P, Pons-estel BA, Acevedo-vasquez E, Miranda P, Langefeld CD, Gravel S.** Genomic Insights into the Ancestry and Demographic History of South America. *Plos Genet.* 2015:1-26.
88. **Bachega TASS, Billerbeck AEC, Madureira G, Marcondes JAM, Longui CA, Leite MV, Arnhold IJP, Mendonca BB.** Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(12):4416-4419.

Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Caracterização molecular de Hiperplasia Adrenal Congênita em um laboratório de saúde pública

Investigadores responsáveis: Cláudia Maria Dornelles da Silva, Simone Martins de Castro, Tarciana Grandi e Leticia Fillipon

Por que este estudo está sendo realizado?

A triagem neonatal, popularmente conhecida como "teste do pezinho", é uma ação preventiva de diagnóstico de diversas doenças no período neonatal, a tempo de se interferir no curso da doença, permitindo, a p.Leu306PhefsX6ituição do tratamento precoce e a diminuição ou eliminação das sequelas associada a cada uma das doenças investigadas. A Hiperplasia Adrenal Congênita é uma doença metabólica herdada e causada por defeitos no gene *CYP21A2*, cujos sintomas iniciam nas duas primeiras semanas de vida, levando a graves consequências clínicas e ao óbito se não tratada a tempo. O presente projeto de pesquisa tem como objetivo principal padronizar uma técnica de biologia molecular para a detecção de mutações no gene *CYP21A2* para, futuramente, ser implantada como técnica complementar aos testes já feitos pelo Teste do Pezinho, proporcionando uma melhoria no diagnóstico existente, bem como o auxílio no manejo clínico da doença.

Este projeto de pesquisa, para o qual estamos pedindo a sua participação e/ou do seu filho, servirá também para a realização de um levantamento de dados mais precisos e atuais sobre o número de pessoas que possuem Hiperplasia Adrenal Congênita no nosso Estado. Com as informações obtidas, poderemos planejar protocolos laboratoriais específicos, oferecendo uma melhor qualidade de atendimento, diagnóstico e orientação aos pacientes.

Procedimentos:

Será coletada uma amostra de sangue para a realização das técnicas de biologia molecular, onde será extraído seu DNA (Ácido Desoxiribonucléico) para determinação de mutações que possam estar associadas aos diferentes quadros clínicos da doença. O uso do sangue para quaisquer outras finalidades é vetado.

Quais são as vantagens em participar deste estudo?

1. Auxiliar na definição do grupo de mutações gênicas causadoras de Hiperplasia adrenal congênita, cuja informação poderá auxiliar o acompanhamento médico do paciente.
2. Os participantes deste trabalho estarão auxiliando para o avanço do conhecimento sobre as doenças genéticas no RS, e mais especificamente contribuindo para o desenvolvimento de políticas públicas.

Quais são as desvantagens em participar deste estudo?

Comparecer a um local para coleta de sangue;

Realizar uma coleta de sangue que pode causar dor temporária e/ou um hematoma.

Local do Estudo:

Os procedimentos de coleta de sangue e entrevista serão realizados no Laboratório de Referência em Triagem Neonatal/RS, localizado no Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, em Porto Alegre. As análises genéticas serão realizadas no CDCT (Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da FEPPS).

Desistência na participação do estudo:

A participação de cada indivíduo neste estudo é voluntária, ou seja, quem não quiser participar do estudo estará livre para fazê-lo. Se concordar em participar do estudo e mudar

de ideia no decorrer do mesmo, da mesma forma, não sofrerá perdas relacionadas ao atendimento a que tem direito para seus problemas de saúde.

Compensação financeira

Não haverá nenhum pagamento aos pacientes que concordarem em participar da pesquisa, bem como os participantes da pesquisa não terão nenhum custo adicional relacionado aos exames realizados.

Dados relativos à proteção do paciente:

A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes, sem a prévia autorização dos mesmos. Em situações de achados laboratoriais clinicamente relevantes, o paciente será contactado diretamente pelos pesquisadores ou médicos responsáveis.

B. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir não participar.

C. O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa e sua decisão não vai interferir no seu tratamento.

Compreensão e autorização:

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, assinale com um X apenas 1 das opções abaixo:

() Autorizo o uso do material coletado para esta pesquisa.

() Autorizo uso e estoque do material coletado para esta pesquisa e para a análise de outros fatores que possam vir a ser considerados relevantes dentro desta linha de pesquisa, desde que pelo mesmo grupo de pesquisa.

Nome do paciente: _____

Nome do responsável legal: _____

Assinatura do paciente ou do responsável legal: _____

Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Pesquisadores Responsáveis:

Cláudia Maria Dornelles da Silva (Laboratório Pesquisa CDCT/FEPPS) - telefone: (51)
33520336

Simone Martins de Castro (Laboratório Triagem Neonatal - HMIPV/PMPA) - telefone (51)
32893048

Obs.: O presente documento, baseado no item IV das diretrizes e normas regulamentadoras para pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do voluntário ou de seu responsável legal e outra com o pesquisador responsável.

Anexo 2 - Extração de DNA por Proteinase K e Fenol/Clorofórmio.

Protocolo adaptado do livro “Molecular Cloning: a laboratory manual”, 3ª ed., v.1.

Soluções necessárias:

- Solução de Lise A

	Por amostra
Sacarose	0,33 g
TrisHCl 2M	15 uL
MgCl ₂	15 uL
Triton x-100	15 uL
H ₂ Oq	qsp 3 mL

- Solução de Lise B

	Por amostra
SDS 20 %	32,5 uL
Proteinase K	20,0 uL
EDTA 0,5M	11,3 uL
NaCl 5M	1,1 uL
Tris HCL 2M	2.8 uL
H ₂ Oq	561 mL

- Mix FCA - fenol + clorofórmio + álcool isoamílico (deve estar preparados com no no mínimo um dia de antescendência para a separação das fases)

12,5 mL de fenol equilibrado – pegar a fase de baixo

12 mL de clorofórmio

0,5 mL de álcool isoamílico

- Mix CA - clorofórmio + álcool isoamílico
12mL de clorofórmio + 0,5 mL de álcool isoamílico

Primeira etapa:

Material Necessário

- 1 tubo de 2 mL por amostra
- Ponteira e pipeta P1000
- Centrifuga
- Banho seco a 37 °C
- Papel absorvente
- Solução A e Solução B

Procedimentos

1. Centrifugar os tubos de sangue por 15 min a 2.000 rpm
2. Adicionar 1 mL da solução A em cada tubo e 0,4 mL de *Buffy coat*
3. Inverter os tubos 10 X (delicadamente)
4. Incubar os tubos a temperatura ambiente por 10 min
5. Centrifugar 3.000 rpm por 10 min
6. Descartar o sobrenadante (cuidar para não perder o pellet) e secar a borda do tubo com papel absorvente
7. Colocar 1 mL da solução A e inverter o tubo 10 X (delicadamente) – se o pellet não se soltar do fundo do tubo, bater suavemente até soltar o pellet
8. Centrifugar novamente a 3.000 rpm por 10 min
9. Descartar o sobrenadante e secar a borda do tubo com papel
10. Colocar 1 mL da solução A e inverter o tubo 10 X (delicadamente)
11. Centrifugar novamente a 3.000 rpm por 10 min
12. Descartar o sobrenadante e secar a borda do tubo com papel
13. Adicionar 625 uL da solução B +C e inverter o tubo 10 X (delicadamente)
14. Colocar o tubo a 37 °C no termobloco overnight

Segunda etapa (continuação pós incubação):

Material Necessário

- 3 tubos de 2 mL por amostra
- Banho seco a 37 °C
- Ponteiras e pipetas P1000 e P200
- 4 pipetas de vidro
- 1 pera
- Centrífuga
- Plataforma vibratória
- Mix FCA e Mix CA
- TE 1X
- Etanol absoluto gelado e etanol 70 %
- Acetato de sódio 3M

Procedimentos – na capela química

15. Retirar os tubos do termobloco
16. Colocar 200 uL de TE 1X
17. Com a pipeta de vidro, adicionar 500 mL de fenol equilibrado em pH8.
18. Colocar os tubos na plataforma vibratória (nível 3) por 5
19. Centrifugar por 3.000 rpm por 10 min
20. Retirar a fase superior, que contém o DNA diluído e colocar em um novo tubo de 2 mL. Cuidar para não vir junto a fase de baixo
21. Com a pipeta de vidro, adicionar o mesmo volume que tem no tubo de MIX FCA (pegar a fase de baixo) (~600 uL)
22. Colocar os tubos na plataforma vibratória (nível 3) por 5
23. Centrifugar por 3.000 rpm por 10 min
24. Retirar a parte superior que contém o DNA e colocar em um novo tubo de 2 mL
25. Com a pipeta de vidro, adicionar o mesmo volume que tem no tubo de MIX CA (~550 uL)

26. Colocar os tubos na plataforma vibratória (nível 3) por 5 min – dentro da capela química
27. Centrifugar por 3.000 rpm por 10 min
28. Retirar a fase superior que contém o DNA e colocar em um novo tubo de 2 mL
29. Adicionar 2X o volume que tem no tubo de etanol absoluto gelado (com a pipeta de vidro) + 1/10 do volume do tubo de acetato de sódio 3M
30. Inverter o tubo até o DNA precipitar
31. Centrifugar a 5.000 rpm por 10 min. Descartar o sobrenadante com cuidado.
32. Adicionar 300 uL de etanol 70 %. Soltar o pellet delicadamente invertendo o tubo
33. Centrifugar 5.000 rpm 5 min. Descartar o sobrenadante com cuidado
34. “Dar” um spin para retirar o restante de etanol. Retirar esse excesso de etanol com a pipeta
35. Deixar o etanol secar no banho seco a 37-40 °C com a tampa do tubo aberta para secar bem o pellet
36. Colocar 50 uL de TE 1x
37. Deixar o tubo até o final da manhã/dia para reidratar o DNA a temperatura ambiente
38. Guardar os tubos com DNA na geladeira.
39. Qualquer líquido que seja descartado deve ser colocado na garrafa de resíduos químicos

Anexo 3 – Parecer consubstanciado do CEP da FEPPS

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE
PRODUÇÃO E PESQUISA EM
SAÚDE/ FEPPS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização molecular de Hiperplasia Adrenal Congênita e de Deficiência de Biotinidase em um laboratório de saúde pública

Pesquisador: CLAUDIA MARIA DORNELLES DA SILVA

Área Temática: Área 1. Genética Humana.
(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 1

CAAE: 18537713.5.0000.5320

Instituição Proponente: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

Patrocinador Principal: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 341.289

Data da Relatoria: 08/07/2013

Apresentação do Projeto:

Os autores apresentam um projeto que o objetivo será padronizar e implantar diagnósticos moleculares para Hiperplasia adrenal congênita e deficiência de biotinidase, doenças genéticas, investigadas no Teste do Pezinho.

Pezinho

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

- Padronizar e implantar diagnósticos moleculares para Hiperplasia Adrenal Congênita e Deficiência de Biotinidase.

Objetivos específicos

- Captar pacientes com Hiperplasia Adrenal Congênita e Deficiência de Biotinidase.

- Padronizar a técnica de biologia molecular SNaPshot para detecção das seguintes mutações mais frequentes presentes no gene CYP21A2: I172N (ATC₂AAC), V281L (GTG₂TTG/GGT/CTG), Q318X (CAG₂TAG), R356W (CGG₂TGG/CCG/CAG), P30L, Del 8 nt, ins T e I2 sp.

- Padronizar a técnica de sequenciamento de DNA para detecção de mutações no gene BTB,

Endereço: Avenida Ipiranga, 5.400

Bairro: Jardim Botânico

CEP: 90.610-000

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3288-4090

Fax: (51)3288-4069

E-mail: cep_fepps@fepps.rs.gov.br

Continuação do Parecer: 341.289

especialmente as mais frequentes: 1314T>A, 133G>A, 595G>A e 236G>A.

- Padronizar o seqüenciamento de DNA dos genes CYP21A2 para identificação de mutações novas ou raras não encontradas através da técnica de SNaPshot.
- Analisar as freqüências das mutações encontradas em cada um dos genes estudados e correlacioná-las com os fenótipos.
- Comparar os genótipos com dados clínicos.
- Implantar o serviço de diagnóstico molecular de ambas as doenças no CDCT e oferecê-lo ao Laboratório de Triagem Neonatal do HMIPV.
- Escrever artigos científicos decorrentes dos resultados obtidos na presente pesquisa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há desconfortos e riscos possíveis. Os Benefícios esperados são decorrente do avanço da pesquisa em que será possível detectar precocemente a hiperplasia congênita e deficiência de biotinidase.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa propõe uma melhoria na triagem neonatal de Hiperplasia Adrenal Congênita e Deficiência de Biotinidase, o que trará benefícios para a população do RS, tendo como foco a identificação de doenças que podem ter suas seqüelas minimizadas com a instituição de um tratamento adequado

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa propõe uma melhoria na triagem neonatal de Hiperplasia Adrenal Congênita e Deficiência de Biotinidase, o que trará benefícios para a população do RS, tendo como foco a identificação de doenças que podem ter suas seqüelas minimizadas com a instituição de um tratamento adequado

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Avenida Ipiranga, 5.400
Bairro: Jardim Botânico CEP: 90.610-000
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3288-4090 Fax: (51)3288-4069 E-mail: cep_fepps@fepps.rs.gov.br

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE
PRODUÇÃO E PESQUISA EM
SAÚDE/ FEPPS



Continuação do Parecer: 341.289

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 26 de Julho de 2013

Assinador por:

Ivete Terezinha Machado da Rocha
(Coordenador)

Endereço: Avenida Ipiranga, 5.400

Bairro: Jardim Botânico

CEP: 90.610-000

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3288-4090

Fax: (51)3288-4069

E-mail: cep_fepps@fepps.rs.gov.br

9. CURRICULUM VITAE Resumido

PRADO, M.J.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Mayara Jorgens Prado

Local e data de nascimento: Quaraí, Rio Grande do Sul, Brasil (01/02/1991)

Endereço profissional: Av. Ipiranga, 5400 - Jardim Botânico, Porto Alegre/RS.

Telefone profissional: 3288.4036

E-mail: mayara.jorgens@ufrgs.br

2. FORMAÇÃO: Biotecnologia com ênfase e biotecnologia molecular (UFRGS, 2010/1 a 2013/2); curso de pós-graduação *stricto sensu* (mestrado em andamento) no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (UFRGS, 2014/2 a 2016/1).

- Curso de Estatística intitulado “Construção e Análise de Bases de Dados” no período de 18 a 20 de março de 2015 (24 horas) realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde. O curso foi ministrado pelo Dr. Ronir Raggio Luiz.
- Curso de Sequenciamento de Nova Geração em Doenças Genéticas através da Análise de Painéis – segunda edição, realizado no período de 14 a 17 de março de 2016 (12 horas). O curso coordenado pela Professora Dra Ursula Matte.

3. ESTÁGIOS E CURSOS:

- Estágio voluntário de Iniciação Científica, no período de 2010/2, sob orientação da Prof. Dra. Célia Carline e coorientação da Dra. Fernanda Stanisçuaski no Laboratório de Proteínas Tóxicas (Laprottox). Durante esse estágio, acompanhei o projeto intitulado “*Identificação de genes de aquaporinas em feijão*”.

- Bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), no período de 2011/1 a 2012/2, sob orientação da Prof. Dra. Célia Carline e coorientação da Dra. Fernanda Stanisçuaski Laprotox. Durante o estágio desenvolvi o projeto intitulado “*Tolerância diferencial ao alumínio em soja: um estudo sobre o possível envolvimento de aquaporinas*”. Nesse mesmo período, pude acompanhar o projeto da doutoranda Angela Menegassi intitulado “*Análise de expressão e caracterização estrutural e funcional de aquaporinas de soja (Glycine max)*”. Em janeiro de 2013, recebi a bolsa de Iniciação Científica do CNPq com duração até o término de minha graduação para continuar executando o projeto já em andamento.

- O estágio curricular, que ocorreu no oitavo semestre da graduação (2013/2), foi realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), sob orientação da Prof. Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti e supervisão do Dr. Rodrigo Rodenbusch. Durante esse estágio, acompanhei o desenvolvimento da tese do doutorando Rodrigo Rodenbusch intitulada “Análise de SNPs em genes de pigmentação humana em indivíduos fenotipicamente distintos para este caráter”, a qual gerou um artigo que está submetido na revista *International Journal of Molecular Sciences* (fator de impacto 3.257).

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

- “Apresentadora destaque da sessão” no Salões de Iniciação Científica no ano de 2013.

5. EXPERIÊNCIA DIDÁTICA ANTERIOR

- Monitora de Curso prático de extensão para Professores e Estudantes do Ensino Médio. “Curso de Férias – Edição: A Célula no período de 2015/2 a 2016/1 (40 horas).

6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

- CASTRO, S.M., PRADO, M.J., BELTÃO, L.A., CHAPPER, M., VARGAS, P., DORNELLES, C., KOPACEK, C. First year after congenital adrenal hyperplasia neonatal screening in a public health program in south Brazil. (2015). X Congresso Latinoamericano de Erros Innatos del Metabolism y Pesquisa Neonatal.
- PRADO, M.J., SILVA, C.M.D., GRANDI, T., de-CASTRO, S.M., KOPACEK, C., ROSSETTI, M.L. Diagnóstico molecular para hiperplasia adrenal congênita na população do Rio Grande do Sul (2015). 11° Congresso Brasileiro Pediátrico de Endocrinologia e Matabologia (COBRAPEM).
- KOPACEK, C., PRADO, M.J., BELTÃO, L.A., CHAPPER, M., VARGAS, P., SPRITZER, P.M., CASTRO, S.M. Implantação da triagem neonatal para hiperplasia adrenal congênita (HAC) no Rio Grande do Sul (RS): resultados dos primeiros 6 meses. (2015). 11° Congresso Brasileiro Pediátrico de Endocrinologia e Matabologia (COBRAPEM).
- KOPACEK, C., PRADO, M.J., ZANDONÁ, I.J., CHAPPER, M., BELTÃO, L.A., VARGAS, P., CASTRO, S.M., ROSA, R.F.M. Síndrome de Antley-Bixler: Diagnóstico clínico através de alteração da 17OH progesterona da triagem neonatal. (2015). 11° Congresso Brasileiro Pediátrico de Endocrinologia e Matabologia (COBRAPEM).

- PRADO, M.J., MENEGASSI, A., CARLINI, C.R.R.S, STANISÇUASKI, F..
Diferencial tolerance to aluminum in soybean: a study on the possible involvement of aquaporins. (2013). IV Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas.
- MENEGASSI, A., PRADO, M.J., LIGABUE-BRAUN, R., ANDREIS, F.C., VERLI, H., CARLINI, C.R.R.S, STANISÇUASKI, F.. Expression analysis and structural and funcional characterization of soybean aquaporines (Glycine Max). (2013). IV Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas.
- PRADO, M. J.; MENEGASSI, A.; CARLINI, C. R.; STANISCUASKI, F.
Differential tolerance to aluminum in soybean: a study on the possible involvement of aquaporins. (2013). Salão de Iniciação Científica da UFRGS.
- PRADO, M. J.; MENEGASSI, A.; CARLINI, C. R.; STANISCUASKI, F.
Caracterização funcional de duas aquaporinas de soja. (2012). Salão de Iniciação Científica da UFRGS.
- PRADO, M. J.; MENEGASSI, A.; CARLINI, C. R; STANISCUASKI, F.
Tolerância diferencial ao alumínio em soja: um estudo sobre o possível envolvimento de aquaporinas. (2011). Salão de Iniciação Científica da UFRGS.