

ANÁLISE DO GENE P450-OXIDORREDUTASE EM PACIENTES COM HIPERPLASIA CONGÊNITA DA ADRENAL

Giacobelli, J.P.; Carvalho, R.R.; Coeli, F.B.; Marini, S.H.V.L.; de Mello, Maricilda P. (orientadora)

Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, Instituto de Biologia, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética CBMEG – Financiamento SAE/UNICAMP

Palavras-Chave: Ambiguidade genital – Gene POR – HCA

INTRODUÇÃO

No córtex da glândula adrenal, a partir do colesterol, são sintetizados três tipos de hormônios. A regulação da esteroidogênese é controlada pela circulação de cortisol no eixo hipotálamo-hipofisário que estimula ou inibe todas as vias da esteroidogênese. Em geral, o diagnóstico de hiperplasia congênita da adrenal (HCA) se estabelece frente à deficiência na atividade de uma das cinco enzimas envolvidas neste processo, o que causa a diminuição do cortisol circulante induzindo o super-estímulo da glândula

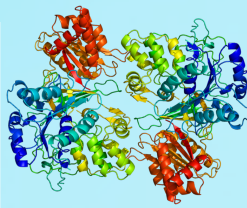


Fig1. Proteína POR, de 82 K-Da

A deficiência da enzima 21-hidroxilase (CYP21A2) é a causa mais freqüente de hiperplasia congênita da adrenal (HCA). Essa enzima é um citocromo P450 microsomal que apresenta atividade de 21-hidroxilase sobre 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) e progesterona, quando em presença de NADPH.

A deficiência de 17-hidroxilase é uma doença rara que se manifesta, na maioria dos casos, em famílias com consanguinidade declarada e a enzima possui duas atividades diferentes: 17,20-liase e 17-alfa-hidroxiylase.

POR é uma proteína que transporta elétrons de NADPH para uma enzima microsomal P450, ou seja, transporta elétrons para CYP21A2, CYP17A1 e CYP19.

Podem apresentar alterações no gene POR: a) indivíduos com quadro clínico característico de deficiência de 21-hidroxilase com mutações no gene CYP21A2 e graus elevados de virilização; b) casos de virilização sem alteração em CYP21A2; c) casos com virilização materna durante a gravidez.

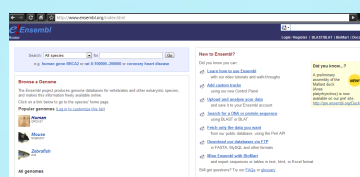


Figura 4. Página inicial do site Ensembl

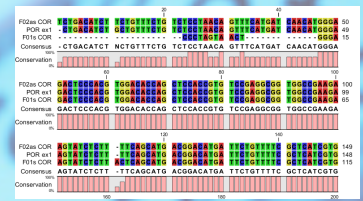


Figura 5. Aparência de seqüenciamento alinhado com a seqüência encontrada no Ensembl no programa CLC.

As bases são então comparadas, corrigidas com a auxílio da *Chromas* caso seja necessário, e com o alinhamento da seqüência obtido com a depositada no *Ensembl* as mutações são identificadas.

Caso alguma mutação seja encontrada, deve-se recorrer ao site *Ensembl* mais uma vez para se ter certeza de que é uma mutação e não um polimorfismo, além de verificar se ela já foi descrita ou não.

RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Foram estudados 12 éxons de seis pacientes e, dos éxons estudados, apenas o éxon 2 do paciente 31M apresentou a alteração T>G em relação à seqüência normal do Ensembl, em heterozigose. A alteração pode ser vista nas figuras 6 e 7.

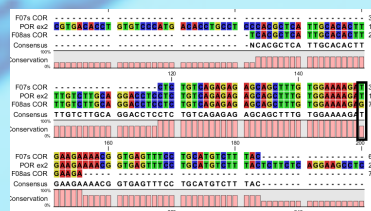


Figura 6. Alteração encontrada em heterozigose, visível no programa CLC.

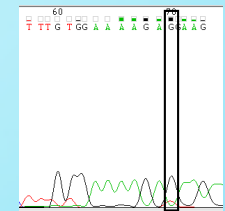


Figura 7. Fragmento da seqüência mostrando uma possível alteração.

Em análise da tradução do mRNA portador dessa alteração indica a troca de aminoácido levando à mutação p.M73R.

Essa alteração não se encontra descrita nem como mutação, nem como polimorfismo na seqüência depositada no banco no site Ensembl. A presença de um pico de T (vermelho), que pode ser observado no eletroferograma, e que confere com a seqüência original, indica a heterozigose, porém o seqüenciamento deverá ser repetido uma vez que na fita sense essa troca não foi observada.

Sendo assim, seria necessário um novo seqüenciamento desse éxon para que se possa ter certeza do resultado e então inferir se é efetivamente uma mutação em heterozigose ou apenas um erro de leitura.

Para a continuação do trabalho propõe-se um novo seqüenciamento desse éxon e a finalização dos restantes, para que se possa avaliar quais mutações estão presentes nos pacientes que sofrem com hiperplasia congênita da adrenal.

MATERIAL E MÉTODOS

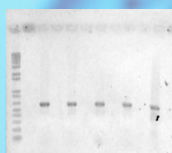


Fig2. Exemplo de Gel de eletroforese, com o ladder à esquerda marcando o peso molecular das bandas reveladas.

As amostras de DNA obtidas de sangue total periférico lisado com proteinase K são deixadas em refrigerador para a conservação. Para o seqüenciamento, é feita a amplificação do DNA utilizando-se a técnica de PCR. Após a amplificação, que dura cerca de duas horas, o PCR é testado em eletroforese com gel horizontal, onde se obtém um gel como o da figura 2.

Os fragmentos amplificados por PCR são purificados utilizando-se o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean UP Szyzytem* (Promega) e são quantificados para posterior seqüenciamento. Após o seqüenciamento, obtêm-se um eletroferograma como o ilustrado na figura 3

sequenciamento. Após o seqüenciamento, obtêm-se um eletroferograma como o ilustrado na figura 3

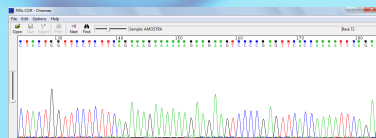


Figura 3. Eletroferograma no programa Chromas. Cada pico representa uma base nitrogenada na seqüência de DNA.

É necessário alinhar manualmente algumas bases porque o seqüenciamento eventualmente "lê" de forma errada, e o processo repete-se para cada éxon.

Após análise no programa *Chromas*, as seqüências são pareadas no programa *CLC Sequence Viewer*, com a seqüência do éxon correspondente obtido no site *Ensembl* (figuras 4 e 5)