



FLÁVIA LEME DE CALAIS

**“EFEITOS DE VARIAÇÕES INTRÔNICAS EM GENES DE
ENZIMAS ESTEROIDOGÊNICAS SOBRE O PROCESSO
DE *SPLICING*”**

**CAMPINAS
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

FLÁVIA LEME DE CALAIS

**“EFEITOS DE VARIAÇÕES INTRÔNICAS EM GENES DE
ENZIMAS ESTEROIDOGÊNICAS SOBRE O PROCESSO
DE *SPLICING*”**

Este exemplar constitui a versão final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>FLAVIA LEME DE CALAIS</u> <u>Maricilda Palandi de Mello</u> e aprovada pela Comissão de Orientadores.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutorado em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Animal e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra Maricilda Palandi de Mello

Co-orientadora: Dra Fernanda Caroline Soardi

CAMPINAS
2014

C125e Calais, Flávia Leme, 1983-
Efeitos de variações intrônicas em genes de enzimas esteroidogênicas sobre o processo de *splicing* / Flávia Leme de Calais. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maricilda Palandi de Mello.

Coorientador: Fernanda Caroline Soardi.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Processamento alternativo. 2. Mutação. 3. Distúrbios de diferenciação sexual. I. Mello, Maricilda Palandi de. II. Soardi, Fernanda Caroline. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of intronic variants in genes of steroidogenic enzymes at the splicing process

Palavras-chave em inglês:

Alternative splicing

Mutation

Sex differentiation disorders

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Maricilda Palandi de Mello [Orientador]

Angela Maria Spinola Castro

Lúcio Fabio Caldas Ferraz

Mônica Barbosa de Mello

Katlin B. Massirer

Data de defesa: 27-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 27 de agosto de 2014

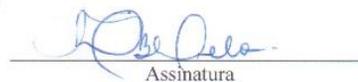
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra (orientadora) Maricilda Palandi de Mello



Assinatura

Profa. Dra Mônica Barbosa de Mello



Assinatura

Profa. Dra Katlin B. Massirer



Assinatura

Prof. Dr Lúcio Fabio Caldas Ferraz



Assinatura

Profa. Dra Angela Maria Spinola-Castro



Assinatura

The relation between RNA splicing and occurrence of disease in humans has been an important issue in the field of medical research. Nucleotide changes that affect the splicing mechanism can be the direct cause of disease or modulate the phenotypic severity, and also they can be linked to an increase of disease susceptibility. Splicing mutations have been identified in the vast majority of genes responsible for disorders of sex development in humans. The presence of sequence variations in some of these genes may compromise the correct biosynthesis of proteins involved in the normal development of gonads and external genitalia. Using minigene technique, mutations identified in *intronic* regions of three essential genes for human sexual differentiation have been studied: *SRD5A2*, *HSD17B3* and *CYP21A2*. The purpose was to verify whether such mutations would abolish the normal mechanism of splicing or would create alternative splice sites. For *SRD5A2* gene, two nucleotide changes have been evaluated: c.548-44T>G, located near the acceptor splice site of *intron 3*; and c.278delG change within *intron 1* donor splice site consensus sequence. Both control and mutant minigenes produced transcripts corresponding to a normal splicing and an alternative splicing showing a transcript with the deletion of 112 nucleotides and a transcript with the *exon 4* skipping. However, they differed in the amount of each transcript, suggesting that this nucleotide substitution may result in an imbalance of transcripts normally produced. The c.278delG mutation, in turn, favored the spliceosome to recognize a 5' site for an alternative splicing within *exon 1* of the *SRD5A2* gene yielding a transcript with the deletion of 38 nucleotides. This transcript has a premature stop codon at position 121. The c.277+2T>G nucleotide change in *HSD17B3* gene is located at the splicing donor site of *intron 3*. In this case the only transcript seen as a result of mutant minigene showed the skipping of *exon 3* of the *HSD17B3* gene. For the *CYP21A2* gene, two nucleotide changes were analyzed: the first is the c.939+5 G>A, located in the donor splice site of *intron 7*, and the second is the c.289+127T>G, which is located in *intron 2*. Similarly to the observed for c.548-44T>G in *SRD5A2* gene, both control and mutant *CYP21A2* minigenes showed transcripts that differed only in the amount produced in each construction. The results described here indicate that the chosen minigene system was adequate for the study, although the results have been more conclusive for changes

localized in the consensus splicing sequences, i.e. for c.278delG in *SRD5A2* gene and c.277+2T>G in *HSD17B3* gene. Results for the other changes suggest that gene transcription usually involve the production of different transcripts. Upon changes in the nucleotide sequence the ratio between each transcript may alter affecting the gene function in critical stages of the development. These findings contributed to understand the phenotype of patients bearing the mutations described here, in addition provided a better understanding of the biological effects on gene transcription caused by *intronic* mutations. Therefore, the study of nucleotide changes in splicing sites by analyzing minigenes is fundamental both to clarify the clinical diagnosis and also for a better comprehension of the effects of mutations on the molecular mechanisms of splicing, extending our understanding of the endocrine regulation in sexual differentiation.

O estudo da relação entre erros no processo de *splicing* e a ocorrência de doenças se tornou uma questão importante no campo da pesquisa médica. As alterações que afetam o mecanismo de *splicing* podem ser a causa direta de doença, podem também modificar a gravidade fenotípica, assim como podem estar ligadas a uma maior susceptibilidade de desenvolver doenças. As mutações de *splicing*, que em muitos casos originam transcritos não funcionais, têm sido identificadas na grande maioria dos genes envolvidos nos distúrbios da diferenciação do sexo em humanos. A presença de alterações ou mutações em alguns destes genes, pode comprometer a biossíntese correta de proteínas essenciais para o desenvolvimento adequado das gônadas ou dos genitais externos. Através da técnica de minigene, foram estudadas mutações presentes em regiões intrônicas, em três genes essenciais para a correta diferenciação sexual humana: *SRD5A2*, *HSD17B3* e *CYP21A2*. O objetivo era verificar se alteravam o mecanismo de *splicing* normal ou criariam sítios alternativos de *splicing*. Para o gene *SRD5A2*, foram estudadas duas alterações: c.548-44T>G, próxima à região aceptora de *splicing* do *intron 3*; e, a alteração c.278delG, dentro da região doadora de *splicing* do *intron 1*. Os minigenes mutante e controle produziram transcritos com *splicing* normal, *splicing* alternativo produzindo um transcrito com 112 nucleotídeos deletados e um transcrito com o *skipping* do *exon 4*, porém em quantidades diferentes, o que sugere que esta alteração pode causar um desbalanceamento entre os transcritos normalmente produzidos. A mutação c.278delG, por sua vez, fez com que o spliceossomo reconhecesse um sítio 5' de *splicing* alternativo dentro do *exon 1* do gene *SRD5A2*, produzindo um transcrito com a deleção de 38 nucleotídeos. Este transcrito apresenta um códon de parada de síntese proteica prematuro na posição 121. No gene *HSD17B3* foi estudada a alteração c.277+2T>G, que se localiza na região doadora de *splicing* no *intron 3*. Neste caso o único transcrito observado como resultado do minigene mutante apresentava o *skipping* do *exon 3* do gene *HSD17B3*. No gene *CYP21A2* foram analisadas duas alterações: a primeira alteração é a c.939+5G>A, localizada na região doadora de *splicing* do *intron 7*, e a segunda é a c.289+127T>G, no *intron 2*. De forma semelhante à observada para a alteração c.548-44T>G do gene *SRD5A2*, tanto os minigenes controles quanto os mutantes produziram os mesmos transcritos, mas em proporções

quantitativamente diferentes. Estes resultados indicam que o sistema de minigene foi adequado para o estudo, embora os resultados tenham sido mais conclusivos para as alterações localizadas nas sequências consenso de *splicing*, isto é para as c.278delG no gene *SRD5A2* e c.277+2T>G no gene *HSD17B3*. Os resultados das demais alterações sugerem que a transcrição dos genes em questão produzam normalmente diferentes transcritos, mas mediante as trocas nucleotídicas, as proporções entre eles se alteram, podendo assim, afetar a função gênica correta em alguma fase crucial do desenvolvimento. Estes achados colaboraram para o esclarecimento e compreensão do fenótipo dos pacientes portadores das mutações aqui descritas, além de propiciar um melhor entendimento dos efeitos biológicos na transcrição de genes quando na presença das mutações intrônicas. Portanto, o estudo de alterações em sítios de *splicing* através da análise de minigenes torna-se fundamental tanto para o esclarecimento do diagnóstico clínico, como também para uma melhor compreensão dos efeitos das mutações sobre os mecanismos moleculares de *splicing*.

DEDICATÓRIA.....	xiii
AGRADECIMENTOS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
INTRODUÇÃO	1
1. O PROCESSO DE SPLICING.....	3
1.1. <i>Splicing alternativo</i>	<i>7</i>
1.2. <i>Reconhecimento de regiões de splice</i>	<i>8</i>
1.3. <i>Elementos cis-acting e trans-acting envolvidos na regulação do splicing</i>	<i>11</i>
2. MUTAÇÕES E SPLICING ABERRANTE	13
3. DIFERENCIAÇÃO SEXUAL NORMAL.....	15
3.1. <i>Gene HSD17B3 e a deficiência da enzima hidroxisteroides desidrogenase tipo 3 ()</i>	<i>21</i>
3.2. <i>Gene SRD5A2 e a deficiência da enzima 5α-redutase tipo 2</i>	<i>23</i>
3.3. <i>Gene CYP21A2 e a deficiência da enzima 21-hidroxilase</i>	<i>26</i>
4. DISTÚRBIOS NA DIFERENCIAÇÃO DO SEXO E MUTAÇÕES DE SPLICING	28
OBJETIVOS	33
METODOLOGIA.....	37
1. CONSTRUÇÃO DE MINIGENES	40
1.1. <i>Amplificação dos fragmentos</i>	<i>43</i>
1.2. <i>Purificação dos produtos de PCR</i>	<i>45</i>
1.3. <i>Sub-clonagem em pGEM-Teasy: digestão e ligação.....</i>	<i>45</i>
1.4. <i>Identificação do inserto em pGEM-Teasy por digestão</i>	<i>46</i>
1.5. <i>Reação de sequenciamento.....</i>	<i>46</i>
1.6. <i>Clonagem em pcDNA3+: digestão e ligação</i>	<i>47</i>
1.7. <i>Preparação de células competentes para transformação por choque térmico</i>	<i>48</i>
1.8. <i>Identificação do inserto por digestão</i>	<i>49</i>
1.9. <i>Mutação sítio-dirigida.....</i>	<i>49</i>
2. DESCONGELAMENTO E CULTURA DAS CÉLULAS HEK-293.....	50

2.1.	<i>Manutenção e preparo das células HEK-293</i>	51
2.2.	<i>Preparação das células HEK-293 para transfecção</i>	52
2.3.	<i>Transfecção com as construções de minigenes</i>	52
2.4.	<i>Extração do RNA total</i>	52
2.5.	<i>Síntese do cDNA</i>	54
2.6.	<i>Amplificação dos fragmentos de cDNA</i>	54
3.	ESTUDO <i>IN SILICO</i>	55
RESULTADOS E DISCUSSÃO		57
1.	ALTERAÇÃO C.278DELG GENE <i>SRD5A2</i>	60
1.1.	<i>Resultados</i>	60
1.2.	<i>Discussão: Alteração c.278delG gene <i>SRD5A2</i></i>	67
2.	ALTERAÇÃO C.548-44T>G GENE <i>SRD5A2</i>	71
2.1.	<i>Resultados</i>	71
2.2.	<i>Discussão: c.548-44T>G gene <i>SRD5A2</i></i>	78
3.	CONSIDERAÇÕES SOBRE O GENE <i>SRD5A2</i>	81
4.	ALTERAÇÃO C.277+2T>G GENE <i>HSD17B3</i>	82
4.1.	<i>Resultados</i>	82
4.2.	<i>Discussão: Alteração c.277+2T>G gene <i>HSD17B3</i></i>	89
5.	CONSIDERAÇÕES SOBRE O GENE <i>HSD17B3</i>	92
6.	ALTERAÇÃO C.939+5G>A GENE <i>CYP21A2</i>	93
6.1.	<i>Resultados</i>	93
6.2.	<i>Discussão: Alteração c.939+5G>A gene <i>CYP21A2</i></i>	100
7.	ALTERAÇÃO C.289+127T>G GENE <i>CYP21A2</i>	103
7.1.	<i>Resultados</i>	103
7.2.	<i>Discussão c.289+127T>G gene <i>CYP21A2</i></i>	110
8.	CONSIDERAÇÕES SOBRE O GENE <i>CYP21A2</i>	112
9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
CONCLUSÕES		117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		121
ANEXOS		135

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Luis e Celeste,
Irmãos Fernanda e Fábio,
e ao meu amor Tullus.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Agradeço aos meus pais amados: Celeste e Luis pelo apoio em todos os momentos, todo amor e carinho. Aos meus irmãos queridos Fernanda e Fabinho pelo amor, amizade e pelos bons momentos. Muito obrigada!

Ao meu amor, eterno namorado e melhor amigo, Tullus, que sempre esteve ao meu lado, sempre com muito carinho e paciência.

A minha avó Dalcy, *in memoriam*, pelo carinho e cuidado.

Professora Dra. Maricilda Palandi de Mello pela oportunidade de desenvolver meu trabalho e acreditar em meu trabalho. Agradeço também pelo apoio e por ser um exemplo de dedicação, competência e seriedade profissional.

A Profa Dra. Diana Baralle, da Universidade de Southampton, pela grande oportunidade de colaboração e por todos os ensinamentos.

As Pós-Docs, Dra. Michela Raponi e Dra. Lindsay Smith, as quais foram fundamentais para meu crescimento e aprendizado sobre técnicas desenvolvidas durante meu estágio na Inglaterra.

Às minhas amigas de longa data: Larissa, Camila, Fabiana (Bica), Cristiane (prima), Caroline, Fabiana, Marcela, Cecília, Beatriz, Maíra e Tatiana pela amizade e pelo apoio em todos os momentos!

A todos os amigos do laboratório: Mara, Reginaldo, Fer2, Luli, Adriana, Sueli, Vanessa, Bruna, Rose, Débora, Helena, Zélo, Emerson, Paulo, Fábio, Nathe, Taciane, Pamela, Carol

Lincoln, Rogério, Carol PR, Priscila Jacob, Priscila, Cristiane, Nadia, Luana, Marcela e Alessandra. Muito obrigada pelo companheirismo, amizade e bons momentos!

Em especial aos meus amigos muito queridos Mara e Reginaldo, pelos momentos divertidíssimos que passamos durante esses anos, pela amizade e companheirismo.

A Dra. Fernanda Soardi (Fer2) por tudo que me ensinou e pela amizade.

A Dra. Edi por estar sempre disposta a ajudar e pela amizade.

Ao Dr. Gil, Dra. Andrea, Dra. Toninha e todos que participam do grupo GIEDDS, pelos esclarecimentos.

Aos professores Dr. Lúcio, Dra. Angela, Dra. Katlin e Dra Mônica, que gentilmente aceitaram participar da minha banca de doutorado e pelas sugestões pertinentes.

As professoras Dra. Cláudia e Dra. Mônica pelos comentários construtivos na minha pré-banca.

Aos professores, alunos e funcionários do CBMEG. Gostaria de agradecer em especial a Tânia, Sandra e Gabriela pela amizade e grande auxílio em todos os momentos.

A CNPq, FAPESP e Capes pelo apoio financeiro.

Aos pacientes e seus familiares, muito obrigada por contribuírem com este trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AG – ambiguidade genital
- c. – posição do nucleotídeo no cDNA
- CBMEG – Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
- cDNA – DNA complementar
- CYP21A2 – 21-hidroxilase
- DDS – Distúrbios da Diferenciação do Sexo
- DEPC – dietilpirocarbonato
- DHT – diidrotestosterona
- DMEM – meio *Eagle* modificado por Dulbecco
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- dNTP – desoxidinucléotídeos trifostatados
- DTT – ditiotreitól
- E. coli* – *Escherichia coli*
- EDTA – ácido etilendiaminotetracético
- GIEDDS – Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo
- HAC – hiperplasia congênita da adrenal
- HAM – hormônio anti-mülleriano
- hCG – gonadotrofina coriônica humana
- HEK 293 – Células embrionárias de rim humano (do inglês) Human Embryonic Kidney 293 cells
- HSD17B3 – 17β-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 3
- Kb – Kilo bases
- K_m – constante de Michaelis-Menten
- M – molar
- mL – mililitro
- mM – milimolar
- mRNA – RNA maduro
- NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
- NC – forma não clássica

°C – graus Celsius
OD₆₀₀ – densidade optica
p. – posição do aminoácido na proteína
pb – pares de base
PCR – reação em cadeia da polimerase
PEG – polietilenoglicol
pH – potencial hidrogeniônico
PS – forma perdedora de Sal
RA – receptor de andrógenos
RNA – ácido ribonucleico
rpm – rotações por minuto
SNP – polimorfismo de único nucleotídeo
SRD5A2 – 5 α -redutase tipo 2
SRY – do ingles *Sex-determining region on the Y chromosome*
SV40 – *Simian vírus 40*
T - testosterona
Taq – Termus aquaticus
TBE – Tris-Borato-EDTA
TE – Tris-EDTA
Unicamp – Universidade Estadual de Campinas
UV – ultra violeta
V – virilizante simples
 μ g – micrograma
 μ L – microlitro

1. O PROCESSO DE SPLICING

Uma vez que a molécula de DNA coordena todas as atividades celulares, o estudo da estrutura e função dos genes é fundamental para a compreensão da biologia molecular das células (COOPER & HAUSMAN, 2009).

A primeira etapa na transferência de informação do gene para proteína é produzir um filamento de RNA, cuja sequência de bases é complementar à sequência de bases de um segmento de DNA. Embora o DNA e o RNA sejam ácidos nucleicos, o RNA difere do DNA, pois geralmente é unifilamentar, seus nucleotídeos contêm o açúcar ribose em vez de desoxirribose, e possui a base pirimidínica uracil ao invés de timina. Assim, o RNA é produzido por um processo que copia a sequência de nucleotídeos do DNA (GRIFFITHS, 2011).

O processo de expressão dos genes eucarióticos é complexo e apresenta várias etapas, entre elas, a transcrição do gene, o processo de *splicing*, a poliadenilação do transcrito primário, o transporte do RNA mensageiro (mRNA) para o citoplasma, e posterior tradução do mRNA em proteína (SINGER & GREEN, 1997).

O *splicing* do pré-RNA mensageiro (pré-mRNA) foi descoberto em 1977 por PHILLIP SHARP E RICHARD ROBERTS, quando foi demonstrado que os genes eucarióticos continham determinadas sequências denominadas *exons*, que codificavam as proteínas, e *introns*, que não se encontravam presentes nos mRNAs maduros (CHOW *et al.*, 1977).

Em estudos posteriores, foi observado que o mecanismo denominado *splicing* é o responsável por promover a retirada dos *introns* do transcrito primário, o que resulta na junção dos *exons*, formando assim o mRNA maduro (ROCA *et al.*, 2005; BROW *et al.*, 2002), mecanismo que se demonstrou ser uma etapa crucial para a expressão dos genes (BURATTI *et al.*, 2006; TOSI *et al.*, 2010).

Assim, a remoção dos *introns* é realizada por uma ágil maquinaria conhecida como spliceossomo (BERGET, MOORE e SHARP, 1977; MATERA e WANG, 2014), o qual utiliza uma grande quantidade de ATP para realizar suas funções, e que sofre diferentes mudanças conformacionais durante o processo de *splicing* (MATERA e WANG, 2014;

WILL e LÜHRMANN, 2011). Os elementos principais do spliceossomo são cinco subunidades diferentes de ribonucleoproteínas (RNP), as U1, U2, U4, U5 e U6 sendo que cada uma funciona como um complexo RNA-proteína denominado *small nuclear ribonucleoprotein* (snRNP) as quais se associam a um grande número de outras proteínas para promover o *splicing* (MATERA e WANG, 2014; MATLIN *et al.*, 2005). Para garantir a excisão precisa dos *introns*, a maquinaria do *spliceossomo* atua através de interações específicas RNA-RNA, RNA-proteína e proteína-proteína (BARALLE e BARALLE, 2005; MADHANI e GUTHRIE, 1994).

O processo de formação do pré-mRNA ocorre em duas etapas as quais envolvem duas reações de transesterificação. Para que ocorra a reação de transesterificação, é necessária a identificação precisa de sequências essenciais presentes nas junções *intron/exon* do DNA, que são altamente conservadas entre os mamíferos, definidas como sequências consensos (BLACK, 2003).

A primeira sequência consenso é chamada de região de *splice* 5' (ou região doadora de *splicing*), a qual é relativamente curta nos mamíferos com aproximadamente 8 nucleotídeos, sendo as duas primeiras bases bastante conservadas - GU. A segunda sequência consenso é definida por três elementos, normalmente contidos dentro de 40 nucleotídeos a partir da junção 3'*intron/exon*: o ponto de ramificação - A (adenina), a sequência degenerada rica em pirimidinas (Y), e a região de *splice* 3' - AG (ou também conhecido como região aceptora de *splicing*) (AEBI *et al.*, 1987; BARALLE e BARALLE, 2005; CARTEGNI *et al.* 2002; HERTEL, 2008; RAPPSILBER *et al.*, 2002; REED, 1996) (**Figura 1**).

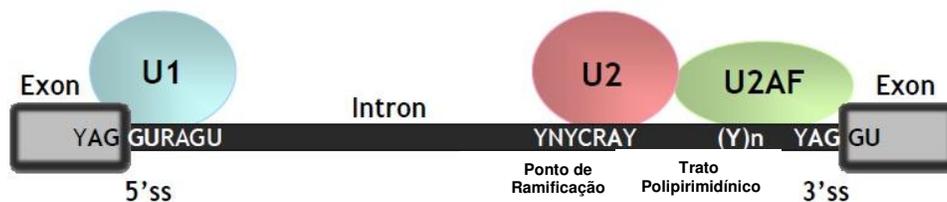


Figura 1: Representação de regiões intrônicas essenciais para que ocorra o processamento eficiente de qualquer pré-mRNA. Na região 3'ss ou região aceptora de *splicing*, há os nucleotídeos AG extremamente conservados (YAGU, onde Y = C ou U) e a região rica em pirimidinas (Y)n onde se liga a subunidade U2AF; o sítio de ramificação representado por uma adenina (YNYCRAY, onde N = A, G, C ou U e R = A ou G) onde há a ligação da

unidade U2; e, a região 5' ss ou região doadora de *splicing*, que contém os nucleotídeos GU conservados (YAGGURAGU) onde se liga a unidade U1 (Adaptado de (HOUSE e LYNCH, 2008)).

O evento-chave durante as primeiras etapas de montagem da maquinaria do spliceossomo é a ligação da subunidade U1 snRNA e na região de splice 5' (REED, 2000), uma vez que esta subunidade possui uma sequência complementar à sequência terminal 5', ocorrendo, assim, o emparelhamento dos pares de base entre a região 5' e U1 snRNA (Figura 2) (BURATTI, BARALLE e BARALLE, 2006; ZHUANG e WEINER, 1986).

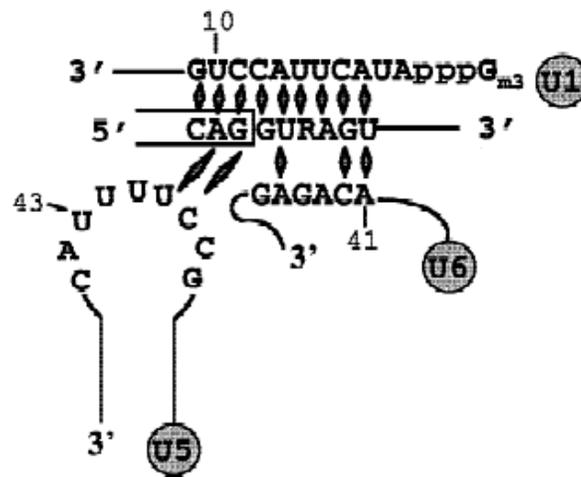


Figura 2: Representação do emparelhamento da sequência de *splice* 5' com a subunidade U1 do spliceossomo. Após o reconhecimento da região 5' pela subunidade U1, ocorre o recrutamento das subunidades U5 e U6, as quais também se ligam a região 5', e assim, inicia-se a montagem da maquinaria do spliceossomo (LUND e KJEMS, 2002).

Paralelamente, o fator auxiliar heterodimérico U2AF65/35 (U2AF) reconhece a sequência degenerada rica em pirimidinas (Y), e a região de *splice* 3'–AG. Neste momento ocorre a primeira reação de transesterificação com o ataque nucleofílico da adenina (A) do sítio de ramificação à guanina (G) no sítio de *splice* 5', e como consequência da ligação fosfodiéster, é formada uma estrutura em forma de alça (*intron*). A interação entre as subunidades snRNP U1 e U2 promove a aproximação entre as regiões de *splice* 5' e 3'. Posteriormente, um complexo formado pelas subunidades U4, U5 e U6 se associa às subunidades snRNP já presentes (U1 e U2). O recrutamento deste complexo resulta em

uma série de rearranjos estruturais, incluindo a perda dos snRNPs U4 e U1 e conduz à formação de um novo emparelhamento de pares de bases entre U2 e U6. Por fim, a segunda reação de transesterificação se dá na etapa final do processo de *splicing* pela ligação de um *exon* com o outro, liberando assim a alça contendo a sequência intrônica, que será degradada e reciclada na célula (**Figura 3**) (CARTEGNI *et al.*, 2002; MATERA e WANG, 2014; SUN e MANLEY, 1995).

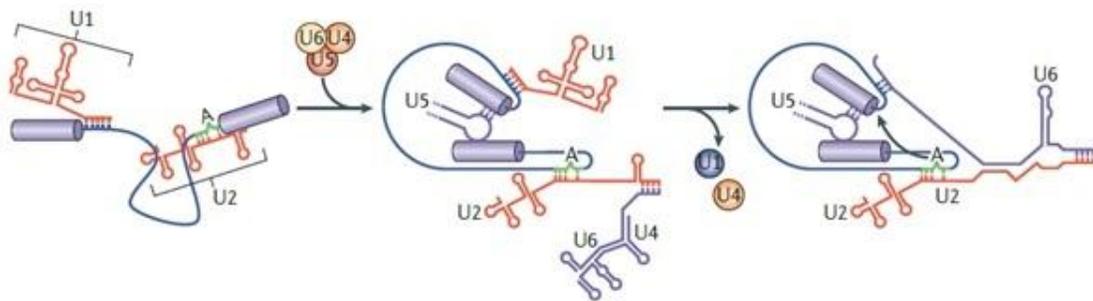


Figura 3: Interações que ocorrem durante a primeira etapa catalítica do processo de *splicing*. Na primeira fase, as interações RNA-RNA são organizadas de forma gradual para criar um centro catalítico para o spliceossomo. Inicialmente, as subunidades de snRNA U1 e U2 pareiam-se com a região de *splice* 5' e com ponto de ramificação (Adenina), respectivamente. Em seguida, as subunidades de snRNP U4, U5 e U6 associam-se a este complexo já formado, e se aproximam da região 5' de *splice*. Logo após, a subunidade de snRNA U4 se dissocia da subunidade U6, e a subunidade U1 se desliga da região de *splice* 5'. Ao final, uma extensa rede de interações entre pares de bases se forma entre as subunidades U6 e U2, para promover a união da extremidade 5' com o ponto de ramificação (MATERA e WANG, 2014).

O reconhecimento impreciso dos limites das junções *exon/intron*, ou a falha durante o processo de remoção dos *introns*, promove a formação de um mRNA anormal e instável o que deve causar a formação de proteínas defeituosas ou deletérias (CARTEGNI *et al.*, 2002).

1.1. Splicing alternativo

Sabe-se que aproximadamente 95% dos genes presentes nos eucariontes superiores sofrem processos conhecidos como *splicing* alternativos (GAZZARA *et al.*, 2014; PAN *et al.*, 2008), os quais produzem vários transcritos ou mesmo múltiplas isoformas proteicas que participam de atividades de regulação ou exercem funções específicas em diferentes tecidos, fato que confere a diversidade funcional do genoma, onde um único gene é capaz de transcrever diversos transcritos e traduzir dezenas a centenas de diferentes proteínas (CARTEGNI *et al.*, 2002; MATERA e WANG, 2014).

As proporções dos diferentes transcritos e proteínas produzidos através dos processos alternativos podem variar de acordo com o tipo celular, o estado de desenvolvimento, processos fisiológicos, diferenciação sexual, apoptose e como resposta a fatores de estresse (PAJARES *et al.*, 2007).

O *splicing* alternativo é um acontecimento muito comum em células de mamíferos, o que torna a difícil tarefa de identificar e definir corretamente as regiões de *splice* ainda mais complexa (HOOPER, 2014; MATLIN, CLARK e SMITH, 2005).

Até o momento, foram descritos basicamente quatro tipos comuns de *splicing* alternativos (**Figura 4**) (XING *et al.*, 2005): 1) *Exon skipping* – leva à formação de transcritos mais curtos pela exclusão de *exons*; 2) *Splice alternativo nas regiões 5' ou 3'* – onde pode ocorrer o reconhecimento de um sítio doador ou acceptor dentro do *exon* ou do *intron* levando à perda ou ganho de nucleotídeos provenientes do *exon* ou do *intron*, respectivamente, resultando num alongamento ou encurtamento do *exon*; 3) *Exons mutuamente exclusivos*: envolve a seleção de apenas um *exon* a partir de duas ou mais variantes exônicas existentes; 4) *Retenção do intron*: o *intron* é mantido no transcrito final, podendo permanecer no mRNA maduro (CARTEGNI *et al.*, 2002).

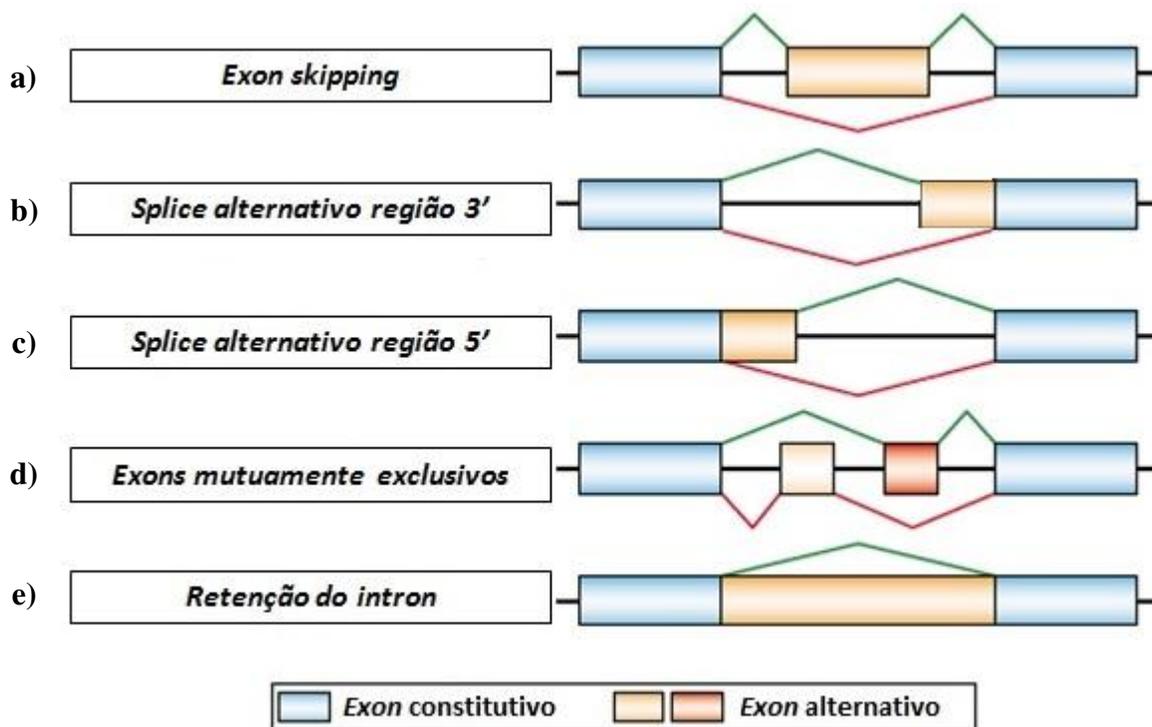


Figura 4: Esquema dos tipos de *splicings* alternativos. Em cada caso, uma forma de *splicing* alternativo é indicada em verde, e a outra em vermelho. Em a) *exon skipping*: remoção de *exons* inteiros; b) e c) sítio de *splice* alternativo doador ou aceptor: onde regiões do *exon* podem ser excisadas, juntamente com os *introns*; d) *exons mutuamente exclusivos*: preferência por *exon*, a partir de duas ou mais variantes; e) retenção de *intron* ou uso alternativo do *intron*: regiões intrônicas são mantidas no transcrito final (CARTEGNI *et al.*, 2002).

Tanto o controle do *splicing* constitutivo quanto do *splicing* alternativo é basicamente realizado pelo *splicessomo*, e a regulação de sua montagem é um ponto-chave no controle destes processos (MATERA e WANG, 2014; SUN e CHASIN, 2000).

1.2. Reconhecimento de regiões de *splice*

Na sua forma mais básica, um *exon* pode ser identificado pela presença de alguns elementos *cis-acting*, parecendo, portanto um processo de definição simples. Entretanto, as sequências presentes nas regiões de *splice* 5' e 3' apresentam grande diversidade, e muitas

sequências candidatas podem ser encontradas em um único transcrito típico de mamífero (BARALLE e BARALLE, 2005; SUN e CHASIN, 2000).

Como já mencionado anteriormente, um passo essencial no *splicing* do pré-mRNA é o reconhecimento das regiões 3' e 5' de *splice*. O reconhecimento inicial das junções *exon/intron* é baseado nas interações diretas entre U1 snRNP com a região 5', entre o fator auxiliar U2AF com o trato polipirimidínico e entre a subunidade U2 snRNP com o ponto de ramificação (HERTEL, 2008).

Além disso, a arquitetura da região *exon/intron* tem demonstrado influenciar diretamente o reconhecimento do sítio de *splicing* (BERGET, 1995), como por exemplo, o aumento da sequência *exônica* em mamíferos pode resultar em *exon skipping*. Por outro lado, quando um *intron* contendo uma sequência curta é adicionado a este mesmo *exon* longo, este permanece no transcrito final. Portanto, o reconhecimento do sítio de *splicing* torna-se mais eficiente quando as sequências dos *introns* ou *exons* são curtas (STERNER *et al.*, 1996).

Estas observações sugerem que os sítios de *splice* são reconhecidos através do comprimento de uma sequência nucleotídica ideal, e que o comprimento do *intron* influencia significativamente na eficiência da formação do pré-mRNA e na escolha de sítios para a ocorrência de *splicing* alternativos (HERTEL, 2008).

Estes achados são muito importantes devido à distribuição divergente dos comprimentos dos *introns* no genoma humano e, assim se sugere a hipótese de que o spliceossomo utiliza dois modelos de reconhecimento para definir as regiões onde deve ocorrer o *splicing*. Um desses modelos é designado “definição de *intron*” que estabelece que as regiões de *splice* 5' e 3' dos *introns* são diretamente identificadas como uma única unidade pela maquinaria do spliceossomo. Alternativamente, um modelo denominado “definição de *exon*” define que os sítios de *splice* que flanqueiam o *exon* são inicialmente reconhecidos e posteriormente, emparelhados com auxílio dos elementos do spliceossomo (**Figura 5**) (BERGET, 1995; HERTEL, 2008).

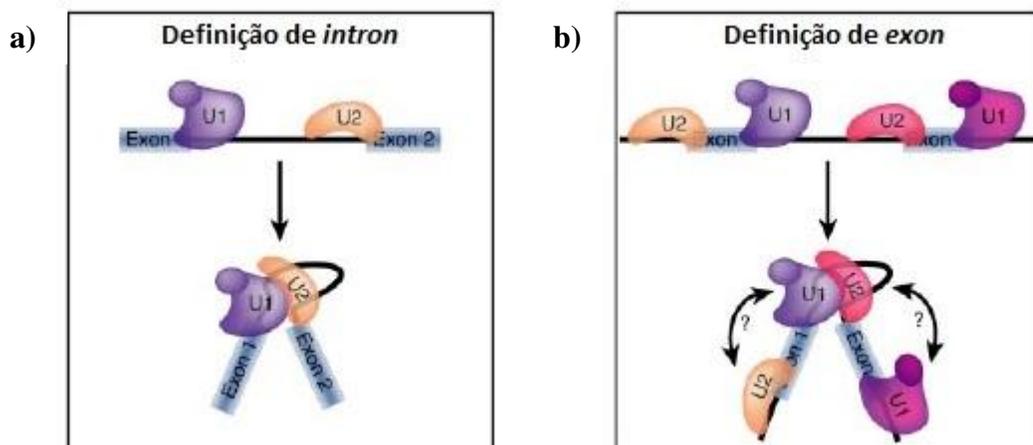


Figura 5: Modelos para reconhecimento do *splicing*. **a)** Modelo designado “definição de *intron*”, onde os sítios de *splicing* são reconhecidos em todos *introns*. Neste modelo, os componentes do spliceossomo se ligam ao longo da sequência do *intron*, o qual será posteriormente retirado; **b)** Modelo designado “definição de *exon*”, mais adequado para *introns* que possuem sequências longas, nos quais os componentes do spliceossomo ligados em *exons* adjacentes combinam-se para se emparelharem com os sítios de *splicing* e assim a sequência intrônica é excisada (Adaptada de HERTEL, 2008).

Apesar destes dois modelos ainda não se encontrarem comprovados, algumas análises recentes da co-evolução dos sítios de *splicing* 5’ e 3’ têm registrado a predominância de interações do tipo “definição de *exon*” na maioria dos mamíferos, como em humanos e roedores, sendo as interações do tipo “definição de *intron*” encontradas principalmente em invertebrados, plantas e fungos (XIAO *et al.*, 2007).

Em um estudo realizado por Fox-Walsh *et al.* (2005) ficou demonstrado que a seleção do spliceossomo pelo modelo “definição de *intron*” era significativamente mais eficiente do que quando selecionado o modelo “definição de *exon*”, no qual se verifica uma elevada inclusão de *exons* com sítios de *splice* mais “fracos”, favorecendo a ocorrência de *splicing* alternativos.

Estas observações sugerem que a arquitetura das regiões *exon/intron* define tanto os mecanismos de reconhecimento dos *sítios de splicing*, como a frequência com que o *splicing* alternativo do pré-mRNA ocorre.

1.3. Elementos *cis-acting* e *trans-acting* envolvidos na regulação do *splicing*

Para propiciar maior fidelidade ao processo de *splicing*, sequências adicionais reguladoras estão presentes nos *exons* e *introns*, conhecidas como elementos *cis-acting*. Essas atuam aumentando ou diminuindo a capacidade de reconhecimento da maquinaria do spliceossomo e são definidas como intensificadoras de *splicing* exônicas (ESE, do inglês *exonic splicing enhancers*) e intrônicas (ISE, do inglês *intronic splicing enhancers*) ou silenciadoras de *splicing* exônicas (ESS, do inglês *exonic splicing silencers*) e intrônicas (ISS, do inglês *intronic splicing silencers*) (BARALLE e BARALLE, 2005; PAGANI *et al.*, 2003).

De um modo geral, estes elementos reguladores têm como função recrutar fatores *trans-acting* que, por vários mecanismos, ativam ou reprimem o reconhecimento de regiões de *splicing* ou a montagem da maquinaria do spliceossomo (CARTEGNI *et al.*, 2002; MATLIN *et al.*, 2005; WANG e BURGE, 2008). Devido à importância da conservação das sequências *cis-acting*, vem sendo demonstrado que mutações presentes nestas regiões podem acarretar em patologias em humanos (**Figura 6**) (PAGANI *et al.*, 2005; PAGANI *et al.*, 2003).

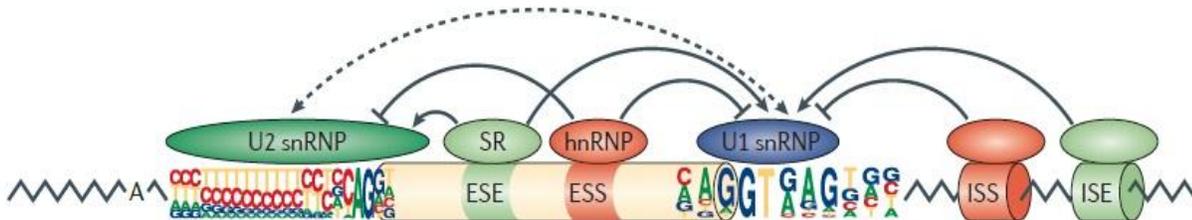


Figura 6: Representação dos vários elementos que regulam o processo de *splicing*. Além dos locais de *splicing* clássicos e de alguns elementos do spliceossomo, encontram-se representados os elementos *cis-acting* auxiliares (*Exonic splicing enhancers* e *silencers* – ESEs e ESSs; *Intronic splicing enhancers* e *silencers* – ISEs e ISSs), onde se ligam os fatores *trans-acting* - proteínas SR (proteínas ricas em serina e arginina) e hnRNP (ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas) que interagem respectivamente com os elementos *cis-acting enhancers* e *silencers*. Adaptado de BARALLE e BARALLE, 2005.

As ESEs são normalmente reconhecidas por fatores *trans-acting* pertencentes à família de proteínas SR, que contêm nas suas estruturas um domínio de ligação ao RNA, assim como um domínio carboxiterminal rico em arginina-serina (domínio RS) (BLACK, 2003; CARTEGNI *et al.*, 2002; LONG e CACERES, 2009).

As proteínas SR são responsáveis pelo recrutamento de componentes do spliceossomo, através de interações proteína-proteína, por meio de seus domínios ricos em serina-arginina (LIU *et al.*, 1998). Além das proteínas SR, os elementos *cis-acting* podem operar sob regulação de outros fatores *trans-acting* como a proteína YB-1 e a DEAD-box RNA helicase p72 (AUBOEUF *et al.*, 2002; STICKELER *et al.*, 2001).

As proteínas SR, além de promoverem a ligação da subunidade de snRNP U1 com a região de *splice* 5' (EPERON *et al.*, 1993; ZAHLER e ROTH, 1995), também participam da ligação entre U2AF65 com a região de *splice* 3'. Estas observações levaram à hipótese de que as proteínas SR interagem com as ESEs, e recrutam fatores de *splicing* para realizar a ligação de regiões de *splice* entre *introns* adjacentes (**Figura 7**) (LIU *et al.*, 1998; STAKNIS e REED, 1994; WU e MANIATIS, 1993).

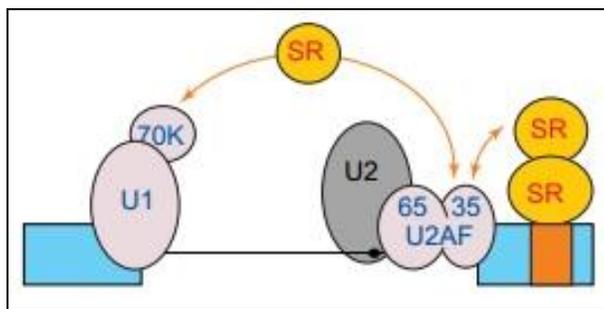


Figura 7: Esquema de ligação das proteínas SR. As proteínas SR que se ligam a regiões ESE estabilizam a ligação do fator de *splicing* U2AF65 com o trato polipirimidínico através de uma interação mediada por U2AF35. As proteínas SR também participam da interação entre a subunidade snRNP U1 e a U2AF35 (BLENCOWE, 2000).

No entanto, a regulação do pré-mRNA depende também de outros elementos já mencionados, as sequências ESSs, ISEs e ISSs. O mecanismo de ação dos elementos envolvidos no silenciamento não se encontra ainda totalmente esclarecido. Contudo, esses elementos parecem interagir com repressores pertencentes à família de proteínas conhecidas como ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNP, do inglês

heterogeneous nuclear ribonuclearprotein). De modo similar ao das proteínas SR, as proteínas hnRNP possuem na sua estrutura um domínio de ligação ao RNA, associado a um domínio auxiliar normalmente envolvido em interações proteína-proteína (CARTEGNI *et al.*, 2002; HERTEL, 2008).

Dessa maneira, a integridade tanto das sequências *cis-acting* quanto dos elementos *trans-acting* são de extrema importância para que a maquinaria do spliceossomo reconheça as sequências essenciais no segmento de DNA, as quais serão excisadas para a formação do pré-mRNA, e este último será processado para formação correta do mRNA maduro (ZHOU *et al.*, 2006).

2. MUTAÇÕES E SPLICING ABERRANTE

O estudo da relação entre erros no processo de *splicing* e a ocorrência de doenças se tornou uma questão central no campo da pesquisa médica (NISSIM-RAFINIA e KEREM, 2002; STOILOV *et al.*, 2002). Esta é uma consequência do número crescente de alterações patológicas que podem estar diretamente relacionadas com defeitos no processamento do pré-mRNA (ARS *et al.*, 2000; BURATTI *et al.*, 2006).

Além das doenças causadas por mutações exônicas, incluindo mutações *missense*, *nonsense* e *frame-shift* que originam proteínas aberrantes, e mutações em regiões não codificantes que afetam a eficiência de transcrição ou a estabilidade do mRNA, atualmente há a indicativa de que 15 a 30% das mutações causadoras de doenças alteram o padrão normal de *splicing* (GAZZARA *et al.*, 2014; WANG e COOPER, 2007).

Dentro desse contexto, as alterações que afetam o mecanismo de *splicing* podem estar relacionadas às mais diversas patologias sendo a causa direta de doença, podem também modificar a gravidade fenotípica de uma determinada doença e, podem, ainda, estar ligadas a uma maior susceptibilidade de desenvolver doenças (WANG e COOPER, 2007). Além de, muitas vezes, causarem características peculiares de expressividade incompleta em tecidos específicos (TOSI *et al.*, 2010).

As mutações de *splicing* geralmente afetam o correto processamento do mRNA, quando modificam diretamente as sequências exônicas ou intrônicas presentes nos sítios doadores ou aceptores de *splicing*. No entanto, podem afetar as sequências ESE, ESS, ISE ou ISS, ou, ainda, podem gerar uma estrutura secundária de mRNA modificada. No

entanto, os efeitos são menos evidentes sobre o processo de *splicing* quando as alterações se situam nas sequências de elementos regulatórios de *splicing* (BARALLE e BARALLE, 2005; TOSI *et al.*, 2010).

Assim, as alterações que provocam o desequilíbrio dos fatores *cis-acting* ou *trans-acting* possuem diferentes implicações no mecanismo de *splicing*. Defeitos que afetam os elementos *cis-acting* possuem um impacto direto na expressão de um único gene, por outro lado alterações nos fatores *trans-acting* afetam a expressão de múltiplos genes (WANG e COOPER, 2007).

As mutações presentes nos elementos *cis-acting* têm um efeito direto no mecanismo de *splicing* constitutivo ou no de *splicings* alternativos. Perturbações do *splicing* constitutivo, na maioria das vezes, resultam em perda de expressão do gene em questão, ou ainda, podem inativar (ou ativar) um dos locais de *splicing* alternativamente utilizados, o que promoverá a expressão de somente um dos *splicings* alternativos. Neste caso, embora, um mRNA normal seja produzido, a expressão de somente uma das variantes de *splicing* em um tecido ou em uma fase de desenvolvimento inapropriados, pode resultar em doença (FAUSTINO e COOPER, 2003a).

Contudo, mutações localizadas nos elementos *trans-acting* podem afetar a função da maquinaria de *splicing*, ou fatores que regulam o *splicing* alternativo. Alterações que afetam a maquinaria de *splicing* atuam diretamente no *splicing* de todos os pré-mRNA, enquanto que as mutações que afetam a regulação de *splicing* alternativo modificam apenas o subconjunto de pré-mRNAs que são alvos de elementos regulatórios (FAUSTINO e COOPER, 2003a).

Além disso, dois outros mecanismos possíveis de afetar o processo de *splicing* também devem ser considerados. O primeiro mecanismo é conhecido como *nonsense-mediated mRNA-decay* (NMD), o qual é ativado na presença de mutações que introduzem um *codon* de parada prematura, e promove a degradação dos transcritos mutados, fazendo com que o alelo alterado perca a sua função (COOPER *et al.*, 2009; PAGANI e BARALLE, 2004; WANG e COOPER, 2007). O segundo mecanismo é denominado *nonsense altered splicing* (NAS), e atua quando um *codon* de parada prematuro causado por uma mutação é, de alguma forma, ignorado, mantendo assim a integridade do quadro de leitura (BARALLE e BARALLE, 2005; MAQUAT, 2002).

Outra observação importante, é que a variação genética devido à presença de polimorfismos nucleotídicos localizados em regiões codificantes (*coding single-nucleotide polymorphisms* - cSNPs) é a principal causa das diferenças fenotípicas encontradas em cada indivíduo (CÁCERES e KORNBLIHTT, 2002; WANG e COOPER, 2007). Estudos revelam que a presença de cSNPs podem intervir na eficiência do processo de *splicing*, o que demonstra um importante papel como modificadores de fenótipos e na susceptibilidade de um indivíduo para uma determinada doença genética (COOPER *et al.*, 2009; PAGANI *et al.*, 2005).

3. DIFERENCIAÇÃO SEXUAL NORMAL

Os processos de determinação e diferenciação do sexo consistem na determinação do sexo gonadal (46,XX ou 46,XY), seguido de processos subsequentes à formação das gônadas, ou seja, ao surgimento de genitais internos e externos, respectivamente (JOST *et al.*, 1972, GUERRA-JUNIOR & MACIEL-GUERRA, 1997; HUGHES, 2002; MIGEON & WISNIEWSKI, 2003).

O evento pivô na diferenciação sexual ocorre quando os primórdios gonadais indiferenciados iniciam sua especialização em gônadas (testículos ou ovários), e os demais processos decorrem de efeitos secundários provocados pelos hormônios por elas produzidos (JOST, 1973).

Durante a diferenciação sexual, os hormônios gonadais agem sobre os órgãos genitais internos e externos resultando em diferenciação das estruturas reprodutivas (ONO e HARLEY, 2013). As etapas de diferenciação gonadal tanto masculina quanto feminina envolvem a expressão específica de uma cascata de genes mostrada na **Figura 8** (MIGEON & WISNIEWSKI, 2003; DE MELLO *et al.*, 2005).

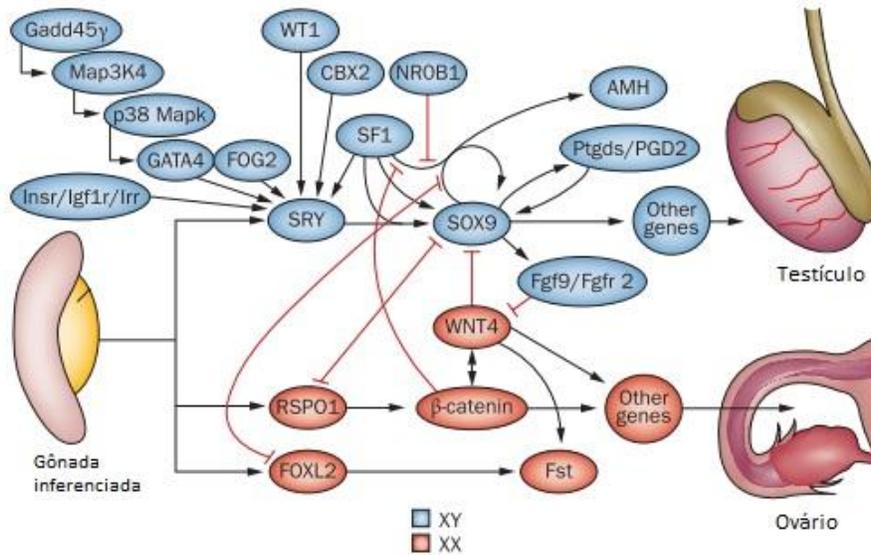


Figura 8: Genes envolvidos na regulação do desenvolvimento gonadal embrionário (ONO e HARLEY, 2013).

Embora com o sexo gamético já estabelecido, até cerca de sete semanas após a fertilização, o embrião humano apresenta gônadas indiferenciadas bipotentes, não sendo possível distinguir macro ou microscopicamente entre embriões com predestinação masculina ou feminina (GUERRA-JUNIOR & MACIEL-GUERRA, 1997; HUGHES, 2002). Nesta fase, as informações codificadas pelos cromossomos sexuais são responsáveis pelo estabelecimento do sexo gonadal, onde a gônada indiferente se desenvolve em ovário ou testículo (WILSON, 2001).

Em embriões de sexo genético masculino, devido à presença do cromossomo Y, mais especificamente do gene *SRY* e de vários outros genes envolvidos na diferenciação sexual masculina, as gônadas indiferenciadas se diferenciarão em testículos. O testículo é responsável por conduzir a regressão dos primórdios genitais femininos, e também pela diferenciação dos condutos internos (derivados de Wolff), e genitais externos masculinos. Nesta etapa, as células de Sertoli, presentes nos testículos, secretam o hormônio anti-mülleriano (HAM), e as células de Leydig, a partir do colesterol promovem a esteroidogênese testicular produzindo altas concentrações do hormônio testosterona (T) (**Figura 9**), o qual na presença da enzima 5 α -redutase tipo 2, é convertido em um hormônio

mais potente, a diidrotestosterona (DHT) (DAMIANI *et al.*, 2001; GUERRA-JUNIOR & MACIEL-GUERRA, 2002).

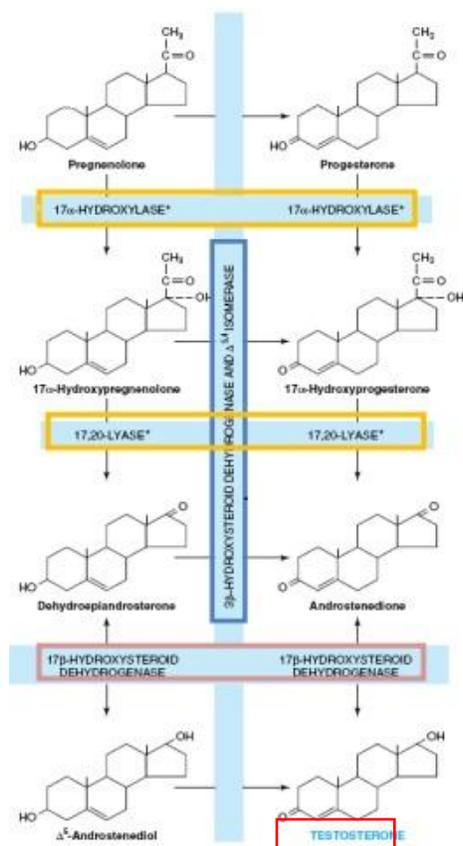


Figura 9: Esquema da esteroidogênese testicular (Adaptado de MURRAY *et al.*, 2008).

Dentre os genes importantes para a produção e ação androgênica corretas destacam-se *HSD17B3*, que codifica a enzima que transforma a androstenediona em testosterona, *SRD5A2*, que codifica a enzima 5 α -redutase tipo 2, e o do Receptor de Andrógenos (RA), que promove a ação androgênica propriamente dita. De uma forma simplificada, o mecanismo para esta ação segue os seguintes passos: a T circulante no sangue entra na célula por difusão e se combina diretamente com o RA ou é convertida em DHT pela enzima 5 α -redutase tipo 2, que então se combina com RA. A DHT, que medeia a ação androgênica em vários tecidos-alvo, é um andrógeno mais potente que a testosterona, pois se associa com maior afinidade ao receptor androgênico, promovendo a transformação do

complexo hormônio-receptor em uma forma que exhibe maior afinidade de ligação com o DNA (**Figura 10**) (BROWN *et al.*, 1993; BRINKMANN *et al.*, 1995).

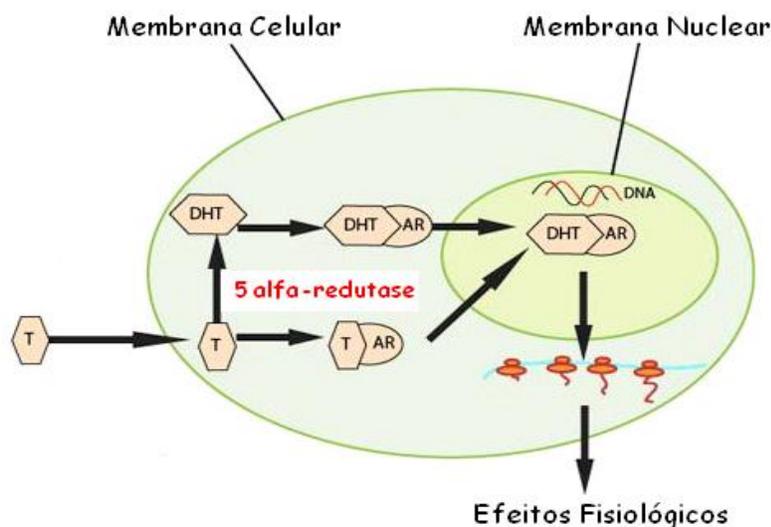


Figura 10: Esquema da ação dos andrógenos dentro das células. Adaptado de CHEN W. *et al* 1996.

Por outro lado, em embriões do sexo feminino, a ausência do cromossomo Y levará a uma “não sinalização” para o desenvolvimento testicular e expressão de uma série de genes que resultará na diferenciação das gônadas em ovários (**Figura 8**). A falta de HAM permite que os condutos internos (derivados de Müller), e genitais externos femininos se desenvolvam (fímbrias, trompas, útero e terço proximal de vagina). Na ausência dos hormônios T e DHT, os primórdios masculinos não se desenvolvem e sofrem atrofia, e assim a genitália externa seguirá o caminho do sexo feminino (DAMIANI *et al.*, 2001).

É importante ressaltar que a diferenciação da genitália externa se direcionará para a via masculina ou feminina dependendo da concentração de andrógenos (T e DHT) na circulação sanguínea. Altas concentrações destes andrógenos resultam em uma genitália externa masculina ou ambígua e baixas concentrações, ou mesmo a ausência destes

hormônios, resultam em genitália externa feminina (GUERRA-JUNIOR & MACIEL-GUERRA, 2002).

Os esteroides sexuais são também sintetizados no córtex adrenal, assim como os mineralocorticoides e os glicocorticoides, hormônios estes produzidos a partir do colesterol (**Figura 11**). Os andrógenos da adrenal, principalmente a androstenediona e a testosterona, são responsáveis pelo desenvolvimento sexual normal e caracteres sexuais secundários no homem e pêlos púbicos e axilares nas mulheres (REICHMAN *et al.*, 2014).

O cortisol é o principal glicocorticóide produzido pelo córtex adrenal, e atua no metabolismo proteico, lipídico e dos carboidratos. Já a aldosterona é o mineralocorticóide mais potente e tem como atividade principal a retenção de sal (NEW, 1998; AL-AGHA e OCHELTREE, 2012).

Na esteroidogênese adrenal, a enzima 21-hidroxilase (CYP21A2), quando na presença de NADPH, cataliza a hidroxilação da 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) em 11-desoxicortisol (11-DOC) e converte progesterona (P) em 11-deoxicorticosterona. Estes esteróides são convertidos posteriormente em cortisol e aldosterona, respectivamente (WEDELL, 2011).

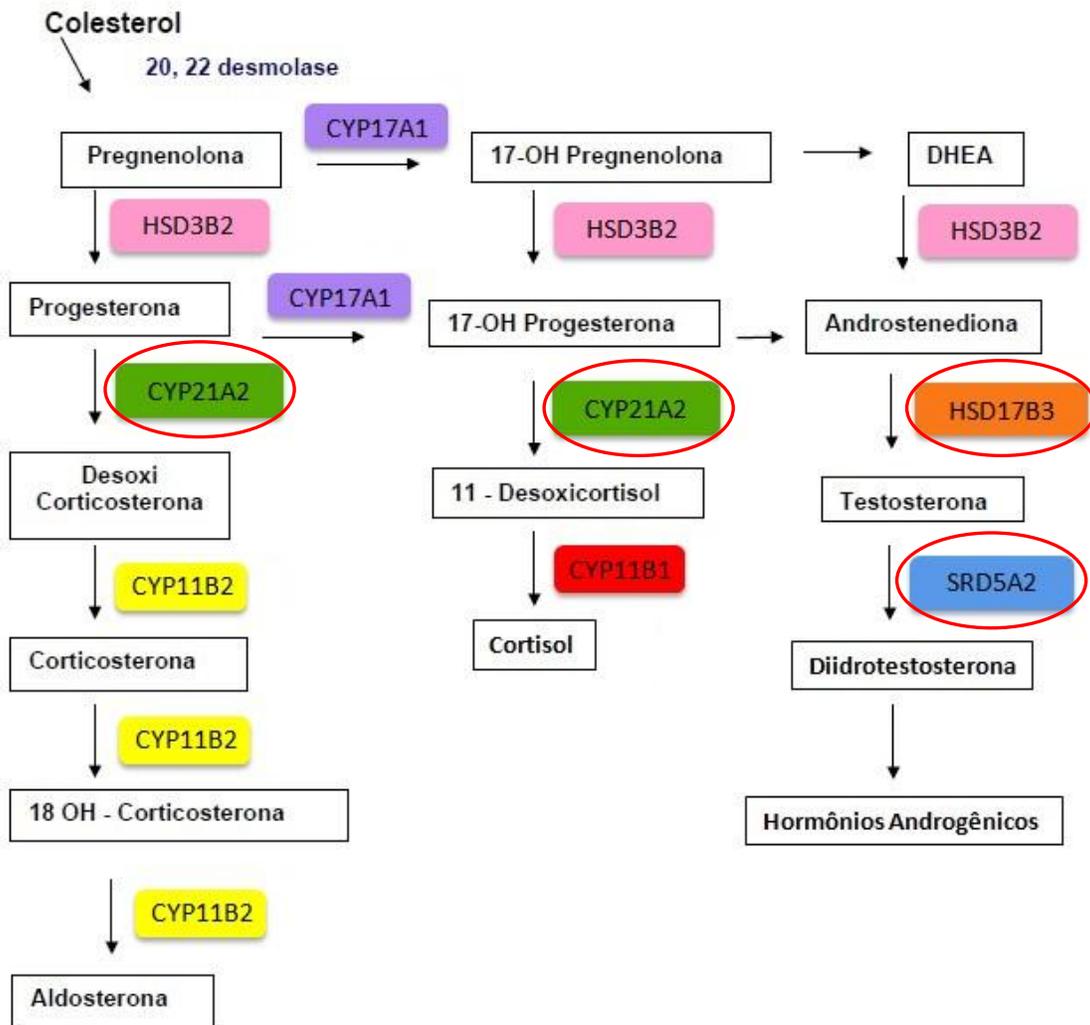


Figura 11: Cascata da esteroidogênese a partir do colesterol, enfatizando a enzima CYP21A2 a qual participa tanto da síntese da aldosterona quanto do cortisol, mas também ressaltando a SRD5A2 e HSD17B3 que participam da via dos hormônios androgênicos (Adaptado de WHITE *et al.*, 2009).

Uma vez que este trabalho envolve a investigação dos genes que codificam as enzimas HSD17B3, SRD5A2 e CYP21A2, suas características moleculares bem como de suas deficiências serão detalhadas a seguir.

3.1. Gene *HSD17B3* e a deficiência da enzima hidroxisteroide desidrogenase tipo 3

A enzima hidroxisteroide desidrogenase tipo 3 (*HSD17B3*) faz parte de uma família de 14 isoenzimas, as quais estão envolvidas na biossíntese da testosterona a partir do colesterol. As enzimas hidroxisteroide desidrogenases catalisam as reações entre DHEA e androstenediona, androstenediona e testosterona, e entre a estrona e estradiol sendo, portanto, fundamentais para a síntese de andrógenos e estrógenos ativos (NEOCLEOUS *et al.*, 2012; GEISLER, 1994).

A *HSD17B3* participa da última etapa da síntese da testosterona, sendo responsável por catalisar a redução da androstenediona para testosterona, e é de fundamental importância para a síntese de andrógenos e estrógenos ativos (ZHU *et al.*, 1998; LABRIE *et al.*, 1997; ROY *et al.*, 2014). Esta isoenzima é expressa somente nos testículos, e quando se apresenta deficiente, causa uma forma bastante rara de DDS 46,XY (ROY *et al.*, 2014; GEISLER, 1994). Essa condição decorrente da deficiência da enzima *HSD17B3* é de herança autossômica recessiva, e se caracteriza pelo desenvolvimento dos derivados de Wolf, provavelmente devido à substituição da testosterona pelas concentrações locais aumentadas de androstenediona (MACIEL-GUERRA E GUERRA-JÚNIOR, 2002; NEOCLEOUS *et al.*, 2012).

Sua expressão ocorre na fase intra-uterina, utiliza o NADPH como cofator e apresenta afinidade por substratos esteroides, como a androstenediona, sendo responsável pela biossíntese do hormônio testosterona durante o período crítico da diferenciação sexual (LIN *et al.*, 1998).

O gene *HSD17B3* contém onze *exons* e 10 *introns*, e possui um tamanho de aproximadamente 60 kb. Está localizado no braço longo do cromossomo 9 (9q22), e codifica uma proteína de 310 aminoácidos (RHOUMA *et al.*, 2013).

Mutações no gene *HSD17B3* são responsáveis pela deficiência da enzima. Vinte e nove mutações já foram descritas neste gene (www.hgmd.cf.ac.uk) (**Figura 12**). Estas mutações podem ocorrer em homozigose ou em heterozigose composta. A maioria das mutações é do tipo *missense*, que causam substituições de aminoácidos, no entanto pequenas deleções e trocas nucleotídicas na região de *splicing* são também encontradas. Tanto as deleções como as mutações na região codificante do DNA prejudicam a formação

de enzimas funcionais, embora as mutações *missenses* possam causar danos com diversos graus de gravidade para a ação protéica (WILSON, 2001).

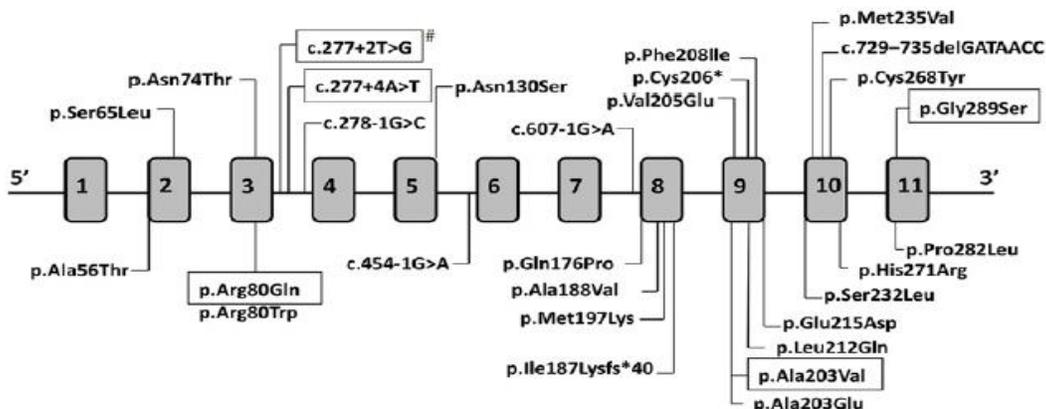


Figura 12: Mutações no gene *HSD17B3*. O gene é formado por 11 *exons* e 10 *introns* e as mutações descritas até o presente momento encontram-se mais concentradas na região dos *exons* 8 ao 11 (CASTRO *et al.*, 2012).

Defeitos genéticos que afetam qualquer uma das reações enzimáticas na biossíntese da testosterona podem prejudicar a sua produção, levando à masculinização incompleta da genitália em indivíduos 46,XY (GEISSLER *et al.*, 1994; RHOUMA *et al.*, 2013). Assim, a deficiência da HSD17B3 em indivíduos 46,XY faz com que ao nascimento, a genitália seja feminina com ou sem clitoromegalia, com gônadas palpáveis no canal inguinal; os afetados geralmente são criados como meninas, devido à masculinização incompleta da genitália (GEISSLER *et al.*, 1994; ZHU *et al.*, 1998a). Estes indivíduos procuram ajuda médica por apresentarem virilização na puberdade ou por não apresentarem menarca (WILSON, 2001; MASSANYI *et al.*, 2013).

A deficiência da enzima HSD17B3 é considerada bastante rara na população, porém até o momento, não se conhece a incidência na população brasileira, e nem mesmo na população mundial, com exceção de uma população isolada na Arábia que, devido a uma alta taxa de casamentos consanguíneos, apresenta uma prevalência em torno de 1:200-300 nascimentos (RÖSLER *et al.*, 1996; MASSANYI *et al.*, 2013). E em um estudo bastante antigo realizado nos países baixos da Europa por BOEHMER *et al.* (1999), registrou-se uma incidência de aproximadamente 1:147.000 nascimentos. Ainda nesse estudo, foi

observado que algumas mutações do gene *HSD17B3* são frequentemente recorrentes na população europeia, indicando talvez um possível efeito fundador.

O diagnóstico bioquímico mostra baixas concentrações de testosterona no plasma, porém as razões T/DHT são geralmente normais ao passo que as concentrações de androstenediona são elevadas. A deficiência na virilização e a anormalidade nas concentrações de testosterona, geralmente tornam-se menos acentuadas com o tempo, e muitos afetados eventualmente podem ter níveis normais de testosterona masculina no plasma (WILSON, 2001).

Isso ocorre devido a dois mecanismos alternativos para a produção de testosterona nos indivíduos afetados: algumas enzimas mutantes são capazes de sintetizar testosterona quando os níveis de hormônio luteinizante e androstenediona são elevados. O segundo mecanismo pode ocorrer, quando indivíduos que apresentam mutações mais graves sintetizam a testosterona pela reconversão da androstenediona em tecidos extraglandulares por uma ou mais das isoenzimas HSD17B não afetadas, provavelmente a isoenzima do tipo 5 (ANDERSSON *et al.*, 1996). Em consequência, as vias alternativas para a formação de testosterona pode virilizar indivíduos no período da puberdade (WILSON, 2001; MALTAIS *et al.*, 2002; ROY *et al.*, 2014).

3.2. Gene SRD5A2 e a deficiência da enzima 5 α -redutase tipo 2

A enzima 5 α -redutase tipo 2 promove a conversão do hormônio testosterona (T) em diidrotestosterona (DHT), que é um passo essencial para a correta diferenciação da genitália externa masculina durante a vida fetal. Uma das causas de DDS 46,XY é a deficiência desta enzima, na qual a conversão da T em DHT é nula ou defeituosa (IMPERATO-MCGINLEY *et al.*, 1974; WALSH *et al.*, 1974; HACKEL *et al.*, 2005).

O gene *SRD5A2* (*Steroid ReDuctase 5 Alpha type 2*) localiza-se em 2p22–23 e apresenta um arcabouço genético composto por 5 *exons* e 4 *introns*, cujas mutações pode levar à ambiguidade genital em fetos com cariótipo 46,XY (THIPGEN *et al.*, 1992; KANG *et al.*, 2014).

A enzima 5 α -redutase tipo 2 é uma proteína composta por 254 aminoácidos, é expressa principalmente nos tecidos genitais (próstata e rudimentos genitais externos, testículos, epidídimo, próstata e vesículas seminais), além de exibir alta afinidade por substratos

esteroides (WILSON, 1993; RUSSELL *et al.*, 1994, ZHU Y.S *et al.*, 2005). É uma proteína de membrana, o que pode ser confirmado pela distribuição de muitos aminoácidos hidrofóbicos (THIPGEN *et al.*, 1992).

Esta enzima utiliza como cofator o NADPH para a redução de duplas ligações com a adição de hidrogênio no carbono 5 do anel A (5α) de substratos esteróides. O NADPH é o primeiro co-fator a se ligar à 5α -redutase (antes da testosterona) e o NADP^+ é o último a deixar a enzima (LEVY *et al.*, 1995; CHAN *et al.*, 2013).

Mutações no gene *SRD5A2* já foram descritas em mais de cinquenta famílias distribuídas em 22 grupos étnicos. Sendo uma doença autossômica recessiva, grande parte dos casos pertence a famílias geográficas ou socialmente isoladas e endocruzadas como as da República Dominicana, da Turquia e da Nova Guiné (CAI *et al.*, 1996; MACIEL-GUERRA e GUERRA-JÚNIOR, 2002; HEY-JOO KANG *et al.*, 2014).

Como esperado em doenças com padrão de herança autossômica recessiva causadas por mutações relativamente raras, a taxa de consanguinidade é elevada e mais de dois terços dos pacientes são homocigotos para a mutação. Por outro lado, a frequência relativamente elevada de heterocigotos compostos (~32%) sugere que a frequência de portadores na população em geral seja maior do que se imaginava previamente (MACIEL-GUERRA e GUERRA-JÚNIOR, 2002).

Os afetados são indivíduos com cariótipo 46,XY que, ao nascimento, apresentam frequentemente ambiguidade genital. A variabilidade fenotípica é ampla, podendo haver desde uma genitália externa com estruturas quase femininas (hipospadia pseudovaginal períneo-escrotal) até um fenótipo masculino sem qualquer sinal clínico grave característico deste distúrbio (HACKEL *et al.*, 2005).

Foi demonstrado que a maioria dos indivíduos com deficiência da enzima 5α -redutase tipo 2 de diferentes regiões do mundo optam pela mudança de identidade de gênero de feminino para o masculino (IMPERATO-MCGINLEY e ZHU, 2002). Estes achados sugerem que a exposição do cérebro ao andrógeno testosterona no útero, no período pós-natal e na puberdade, parece ter um maior impacto na determinação da identidade de gênero masculina, quando comparada às influências socioculturais e ao sexo de criação desses indivíduos. Dessa forma, parece que a ação direta da testosterona sobre o desenvolvimento do cérebro em meninos, e a falta deste hormônio no cérebro em meninas,

são fatores cruciais para o desenvolvimento da identidade de gênero masculino ou feminino (EHRHARDT & MEYER-BAHLBURG, 1979; SWAAB, 2004).

A identificação de mutações (pontuais ou deleções) no gene *SRD5A2* nos indivíduos afetados relacionou definitivamente o DDS-XY por deficiência da 5 α -redutase tipo 2 que causa a diminuição da síntese de DHT, hormônio chave da virilização da genitália externa masculina (DAMIANI *et al.*, 2001; HACKEL *et al.*, 2005; BALDINOTTI *et al.*, 2008). Os vários tipos de mutações no gene *SRD5A2* justificam a heterogeneidade fenotípica que é própria da doença (SKORDIS *et al.*, 2005; BALDINOTTI *et al.*, 2008).

Até o momento foram mais de 60 mutações diferentes, que prejudicam a expressão e a tradução correta do gene (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) (**Figura 13**). Dentre essas mutações estão aquelas que levam à formação de enzimas não-funcionais, resultantes de deleções completas ou parciais do gene, da introdução de códons de parada prematuros, de alterações nos sítios de *splicing* ou de inserções e deleções que alteram o quadro de leitura (SKORDIS *et al.*, 2005; KANG *et al.*, 2014).

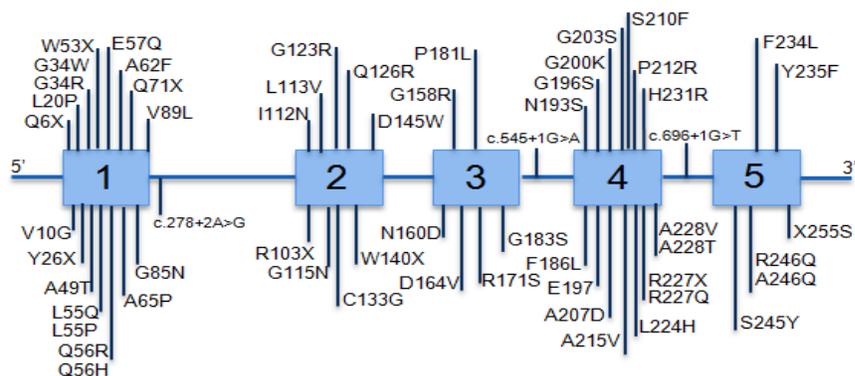


Figura 13: Mutações no gene *SRD5A2*. O gene é formado por 5 *exons* e 4 *introns* e as mutações descritas até o presente momento encontram-se mais concentradas na região dos *exons* 1 e 4 (Fonte HGMD; <http://www.hgmd.cf.ac.uk>).

A identificação da alteração molecular no gene específico contribui significativamente para o diagnóstico precoce da deficiência da 5 α -redutase tipo 2. As alterações hormonais encontradas, que servem como triagem, são o aumento da relação entre as dosagens basais de testosterona (T) e diidrotestosterona (DHT) ou pós-estímulo com gonadotrofina coriônica humana (hCG). Porém, este aumento nem sempre é observado. Além disso, a razão elevada de T/DHT não pode ser considerada como regra para diagnosticar a doença,

uma vez que alguns pacientes apresentam uma deficiência parcial da enzima 5 α -redutase tipo 2, indicando níveis normais de T para a faixa etária (WILSON *et al.*, 1993, BOEHMER *et al.*, 1999; CHAN *et al.*, 2013).

3.3. Gene *CYP21A2* e a deficiência da enzima 21-hidroxilase

Na esteroidogênese adrenal, a enzima CYP21A2 catalisa as conversões de 17-OHP e progesterona (P) em 11-desoxicortisol (11-DOC) e 11-deoxicorticosterona, respectivamente. Os bloqueios enzimáticos destas vias pela deficiência de CYP21A2 impedem a síntese de cortisol/aldosterona, causando o acúmulo de 17-OHP e de progesterona (**Figura 11**). Como consequência, ocorre um desvio da síntese no sentido da produção e secreção dos esteroides, principalmente a testosterona em concentrações muito acima do normal (MILLER & MOREL, 1989; NIMKARN *et al.*, 2011), condição que caracteriza a Hiperplasia Congênita da Adrenal (HAC), a qual é definida como uma patologia endócrina inata resultante da deficiência de uma das enzimas requeridas para a síntese do cortisol a partir do colesterol (CALLIARI, 1992, REICHMAN *et al.*, 2014).

A CYP21A2 é um membro da família do citocromo P450 composta por 494 ou 495 aminoácidos, variação esta devida à presença de quatro ou cinco codons CTG (leucina) no *exon* 1 do gene *CYP21A2*, sem que haja modificação da atividade enzimática, e possui peso molecular de 52 kD (WHITE & SPEISER, 2000).

O gene *CYP21A2* está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3), possui um tamanho total de aproximadamente 3,4 kb, sendo composto por 10 *exons* e 9 *introns*. Existem duas cópias deste gene, *CYP21A1P* e *CYP21A2*, e embora possuam 98% de homologia em seus *exons* e 96% de homologia em seus *introns*, apenas o *CYP21A2* é um gene ativo. O gene *CYP21A1P* é um pseudogene, isto é, não produz proteína funcional, porque apresenta várias mutações deletérias (LEE, 2013).

A deficiência da enzima 21-hidroxilase é a forma mais comum de HAC, sendo responsável por aproximadamente 90% dos casos, e ocorre em um amplo espectro de variantes clínicas que podem ser agrupadas em duas categorias: forma clássica, que apresenta duas divisões fenotípicas, perdedora de sal (PS) e virilizante simples (VS), e a forma não clássica (NC). Em geral, o quadro clínico da doença depende da intensidade e do nível do bloqueio enzimático (WITCHEL *et al.*, 2011; EYAL *et al.*, 2013).

A forma clássica da deficiência da enzima 21-hidroxilase está envolvida com o bloqueio completo ou quase completo da atividade enzimática e está clinicamente presente ao nascimento (STRACHAN, 1990; MILLER, 1991).

A forma perdedora de sal ocorre em cerca de 67% dos casos, sendo esta a forma mais grave da doença, onde a incapacidade de sintetizar aldosterona leva a crises de perda de sal, e em muitos casos é fatal. Os sinais desta forma de HAC geralmente não são detectáveis no neonato do sexo masculino, que em geral apresenta genitália externa normal. O neonato do sexo feminino apresenta ambiguidade genital em diversos graus, no entanto, não apresenta gônadas palpáveis (AL-AGHA *et al.*, 2012).

São reconhecidos como portadoras da forma clássica VS de HAC os indivíduos do sexo feminino com genitália externa ambígua virilizada resultante do excesso de andrógenos, mas sem deficiência de mineralocorticoides. O principal sintoma capaz de identificar indivíduos do sexo masculino portadores da forma VS de HAC, são sinais de virilização precoce devido ao excesso de andrógenos. Cerca de 33% dos casos de VS são capazes de sintetizar aldosterona em quantidade suficiente (WHITE *et al.*, 2000; AL-AGHA *et al.*, 2012).

Pacientes com a variante não clássica (NC) da deficiência da 21-hidroxilase não apresentam anormalidade ao nascimento. Como nesta forma o bloqueio enzimático é menos intenso, as características clínicas devido ao excesso de andrógeno são muito variáveis, podendo manifestar-se em qualquer idade, mais comumente na puberdade e vida adulta (NWE *et al.*, 1989; REICHMAN *et al.*, 2014).

Mais de 181 mutações já foram descritas para o gene CYP21A2 (Fonte www.cypalleles.ki.se) As mutações de ponto no gene da enzima 21-hidroxilase são a causa mais frequente de HAC nas formas clássicas e não clássicas (HIGASHI *et al.*, 1991) e incluem pequenas deleções, inserções e substituições pontuais, também presentes no pseudogene, sendo consideradas microconversões. Mutações do tipo deleção, *frameshift*, *nonsense*, e em sítios de *splicing* estão, de forma geral, associadas a danos mais graves na atividade da enzima e com a forma clássica PS, enquanto que mutações *missense* resultam em variabilidade do fenótipo, dependendo da importância funcional do aminoácido alterado (**Figura 14**) (LEE, 2013).

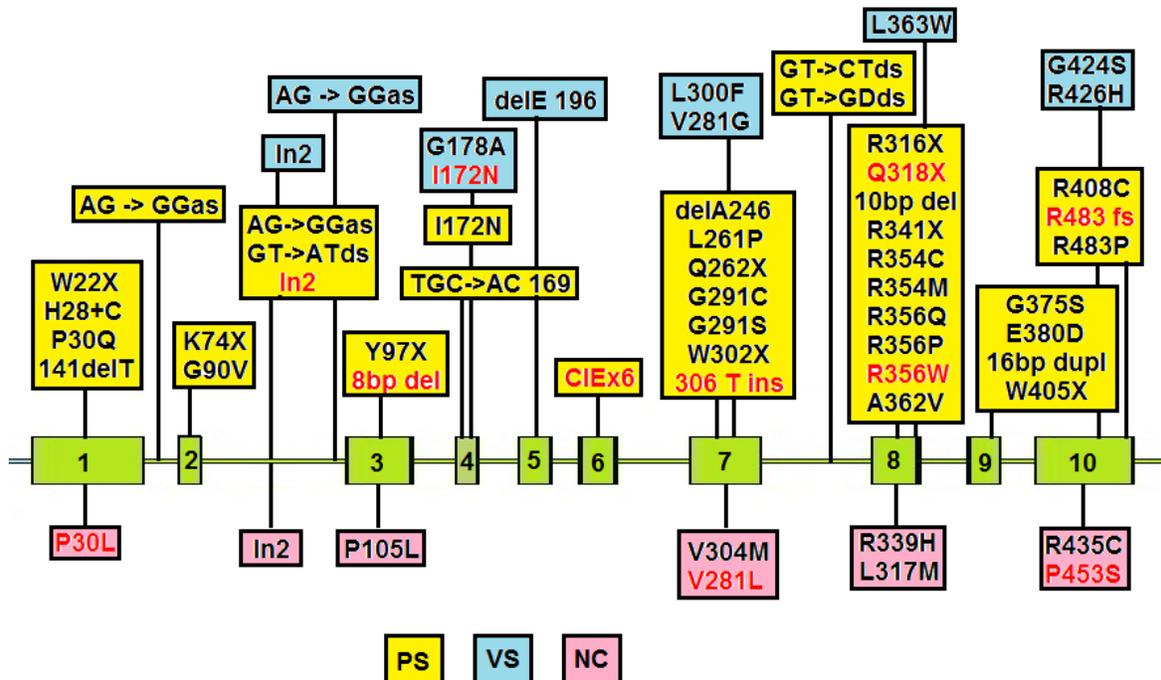


Figura 14: Figura ilustra a estrutura do gene *CYP21A2*, seus *exons* e *introns* e algumas das mutações descritas até o momento. Destaca-se em amarelo as mutações relacionadas com o fenótipo característico da forma perdedora de sal (PS); em azul a forma virilizante simples (VS) e em rosa, a forma não clássica (NC) da Hiperplasia Congênita da Adrenal (Fonte HGMD; <http://www.hgmd.cf.ac.uk>).

4. DISTÚRBIOS NA DIFERENCIAÇÃO DO SEXO E MUTAÇÕES EM REGIÕES DE SPLICING

Múltiplos eventos moleculares regulam as etapas de determinação e diferenciação do sexo, e a presença ou ausência de alguns genes é que definirá se as gônadas internas e a genitália externa a ser diferenciada será masculina ou feminina (BRENNAN 2004).

A presença de alterações ou mutações em algum dos genes envolvidos no processo da diferenciação do sexo em humanos pode comprometer a correta biossíntese de proteínas essenciais para o desenvolvimento adequado das gônadas ou da genitália externa, o que pode resultar em desordens conhecidas como Distúrbios da Diferenciação do Sexo (DDSs).

Assim, os Distúrbios da Diferenciação do Sexo são definidos como uma condição congênita na qual o desenvolvimento cromossômico, gonadal ou anatômico do sexo

apresenta-se atípico, e afeta aproximadamente 1:1.000 indivíduos na população (LEE *et al.*, 2006; ONO e HARLEY, 2013; OSTRER, 2014).

Algumas dessas desordens afetam primeiramente as gônadas, como é o caso de DDS Testicular 46,XX, e DDS 46,XY com disgenesia gonadal parcial ou completa. Essas condições podem ser identificadas em diferentes fases do desenvolvimento humano, desde a vida fetal, em recém-nascidos com ambiguidade genital, gônadas disgenéticas e ainda, quando a genitália interna não corresponde com o sexo cromossômico. Alternativamente, essas desordens podem ser diagnosticadas quando o indivíduo apresenta puberdade tardia, virilização antecipada ou ginecomastia, infertilidade, ou ainda tumores gonadais (OSTRER, 2014).

É importante ressaltar que a ambiguidade genital em recém-nascidos configura sempre uma situação de emergência, principalmente em algumas de suas etiologias, como a forma perdedora de sal da hiperplasia congênita da adrenal (gene *CYP21A2*) e algumas síndromes malformativas que podem levar potencialmente ao óbito. Em longo prazo, as falhas no processo de definição do sexo acarretam prejuízos irreparáveis ao paciente e à família (JOSHI *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2006).

Portanto, a detecção de alterações moleculares nos genes deve ser feita o mais breve possível, o que pode garantir, quando aliada ao diagnóstico clínico, uma conduta mais adequada valendo-se da identificação precoce da deficiência enzimática.

As mutações de *splicing*, que em alguns casos originam transcritos não funcionais, tem sido identificadas na grande maioria dos genes envolvidos na determinação e diferenciação do sexo em humanos (fonte HGMD; <http://www.hgmd.cf.ac.uk>) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Genes envolvidos na diferenciação do sexo e mutações localizadas na região de *splicing* descritas até o momento.

Gene	Proteína e possível função	Número de mutações de <i>splicing</i> descritas
WT1	Fator de transcrição	14
SF-1	Fator de transcrição, receptor nuclear	1
SOX9	Fator de transcrição high-mobility-group	2
DAX1	Regulador de transcrição, receptor nuclear	2
AMH	Proteína secretada que causa regressão dos dutos de Müller; inibidor de células de Leydig	2
AR	Receptor de andrógenos, fator de transcrição	17
HSD17B3	ligante-dependente, 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase	4
SRD5A2	5 α -redutase tipo 2	4
CYP21A2	21-hidroxilase	10
CYP11B1	11 β -hidroxilase	10
STAR	Proteína reguladora esteroidogênica aguda	4

Mutações presentes no sítio de *splicing* podem abolir o mecanismo normal ou podem criar sítios alternativos. Em ambos os casos, o RNA mensageiro maduro não é corretamente processado e a proteína traduzida pode estar truncada ou apresentar aminoácidos adicionais (WIGLEY *et al.*, 1994).

Alguns estudos funcionais, envolvendo mutações em regiões de *splicing* nos genes relacionados à DDSs, já foram realizados a fim de verificar o efeito biológico das mutações no processo de *splicing*, e a maioria desses estudos demonstraram que essas mutações acarretam a produção de pré-mRNAs anômalos, sendo estes incapazes de exercer suas funções corretamente.

A maneira ideal para estudar mutações em regiões de *splicing* é através da análise direta do mRNA contendo a alteração, por meio de biópsia ou extração do órgão onde a proteína é expressa (MICHAEL *et al.*, 2005). Porém, quando este procedimento não é possível deve-se recorrer à técnica de construção de minigenes.

A técnica de construção de minigenes é bastante utilizada para o estudo do processo de *splicing* em várias áreas da genética. Nos últimos anos, muitos estudos têm sido realizados utilizando esta técnica com o objetivo de obter uma melhor compressão das consequências provocadas por mutações em sítios de *splicing*, e também de contribuir para o aumento do conhecimento dos mecanismos que regulam o processo de *splicing* de um modo geral. Sendo assim, esta técnica promove uma forma direta de determinar se uma mutação causadora de doença, ou um polimorfismo de único nucleotídeo (SNP), afetam a eficiência do processo de *splicing* (SINGH e COOPER, 2006).

Através da técnica de minigene, foram estudadas neste trabalho mutações presentes nas junções *exon/intron* e em regiões intrônicas em três genes essenciais para a correta diferenciação sexual humana: *CYP21A2*, *SRD5A2* e *HSD17B3*.

No gene *HSD17B3* foi estudada a alteração c.277+2T>G, que se localiza na região doadora de *splicing* no *intron 3* (CASTRO *et al.*, 2013). Para o gene *SRD5A2*, foram estudadas duas alterações: c.548-44T>G encontrada em heterozigose, localizada na região acceptora de *splicing* do *intron 3*; e a segunda alteração é a c.278delG (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2012), localizada no último nucleotídeo do *exon 1*, também em heterozigose. No gene *CYP21A2* foram analisadas as alterações c.289+127T>G em heterozigose, a qual se localiza na região doadora de *splicing* do *intron 2*; e a alteração c.939+5G>A, localizada na região doadora de *splicing* do *intron 7*, em heterozigose.

OBJETIVOS

GERAL

Investigar os efeitos sobre o mecanismo de *splicing* normal resultantes de trocas nucleotídicas intrônicas raras identificadas nos genes *HSD17B3*, *SRD5A2* e *CYP21A2* de pacientes com Distúrbios da Diferenciação do Sexo.

ESPECÍFICOS

- Realizar estudos *in silico* para os genes *CYP21A2*, *HSD17B3* e *SRD5A2* quanto à perturbação do reconhecimento de regiões essenciais para o processo normal de *splicing* causada por alterações em *cis*, e quanto às alterações no padrão de ligação das proteínas envolvidas no mecanismo de *splicing*.
- Realizar estudos *in vitro* utilizando a técnica de construção e expressão de mini-genes para investigação do efeito das seguintes alterações sobre o mecanismo de *splicing*:
 - c.277+2T>G, localizada na região doadora de *splicing* no *intron 3* do gene *HSD17B3*;
 - c.548-44T>G e c.278delG, localizadas na região aceptora de *splicing* do *intron 3* e no último nucleotídeo do *exon 1*, respectivamente, no gene *SRD5A2*;
 - c.289+127T>G e c.939+5G>A, localizadas nos *introns 2* e *7*, respectivamente, no gene *CYP21A2*.

Em pacientes previamente analisados pelo nosso grupo de pesquisa, foram encontradas mutações localizadas em regiões intrônicas e exônicas. Pelo fato de não se encontrarem anotadas como variações nucleotídicas frequentes em nenhum banco de sequências e por terem sido identificadas em apenas um indivíduo, tornou-se importante testar o efeito de cada uma sobre o processamento dos *introns*. Três genes esteroideogênicos foram incluídos: *CYP21A2*, *SRD5A2* e *HSD17B3*. A **Tabela 2** detalha as mutações estudadas e suas respectivas localizações. Cada mutação foi encontrada em apenas um indivíduo.

Tabela 2: Alterações estudadas neste projeto.

Gene	Mutação estudada	Localização	Características
<i>SRD5A2</i>	c.548-44T>G	<i>Intron 3</i>	hipospadia; criptorquidia
	c.278delG	<i>Exon 1</i>	Genitália ambígua, micropênis, hipospadia;
<i>HSD17B3</i>	c.277+2T>G	<i>Intron 3</i>	hiperandrogenismo
<i>CYP21A2</i>	c.289+127T>G	<i>Intron 2</i>	clitoromegalia
	c.939+5G>A	<i>Intron 7</i>	pubarca precoce

Este trabalho foi conduzido sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp (Parecer CEP N° 434/2006) (**Anexo 1**), e também pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio/CBMEG N° 03/2003) (**Anexo 2**).

Os pacientes que apresentaram essas alterações foram encaminhados para investigação da deficiência das enzimas 5 α -redutase tipo 2, 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 3 e 21-hidroxilase. As características sugestivas para cada investigação encontram-se na **Tabela 2**.

Para a investigação das alterações aqui descritas, foram realizados ensaios utilizando a técnica de minigenes a fim de verificar o efeito causado por essas alterações no mecanismo de *splicing* e, conseqüentemente, na formação do mRNA.

Os ensaios de minigenes contendo as alterações citadas acima foram realizados na Faculdade de Medicina da Universidade de Southampton, Reino Unido, sob a supervisão da Prof^ª. Dr^ª Diana Baralle, onde o sistema de estudo do processo de *splicing* através da construção de minigene que será descrito a seguir foi desenvolvido e todos os protocolos já se encontravam padronizados.

Todas as etapas realizadas para as construções e análises dos minigenes serão descritas a seguir:

1. CONSTRUÇÃO DE MINIGENES

A escolha do sistema de estudo foi influenciada principalmente pelo tamanho dos *introns* para os quais se faria a investigação de *splicing*. Para o gene *SRD5A2*, o *intron 1*, por exemplo, que tem um tamanho aproximado de 47 kb, tornava inviável o estudo através da clonagem direta. Assim, optou-se pela construção de minigenes híbridos. O sistema escolhido envolve a inserção do fragmento a ser testado em um vetor de expressão (pcDNA3+, Invitrogen, Carlsbad, CA) que havia sido anteriormente modificado pela substituição do *polylinker* original pelo gene da alfa-globulina (*HBA1*) (BARALLE e BARALLE, 2005) (**Figura 15**). Este gene de cerca de 850 pb contém 3 *exons* e produz um transcrito de 577 pb. A escolha do gene *HBA1* foi devido ao fato de apresentar nos *exons* regiões flanqueadoras bastante “fortes” para reconhecimento da maquinaria do spliceossomo, de forma a fornecer resultados mais facilmente nos ensaios de *splicing* dos minigenes híbridos.

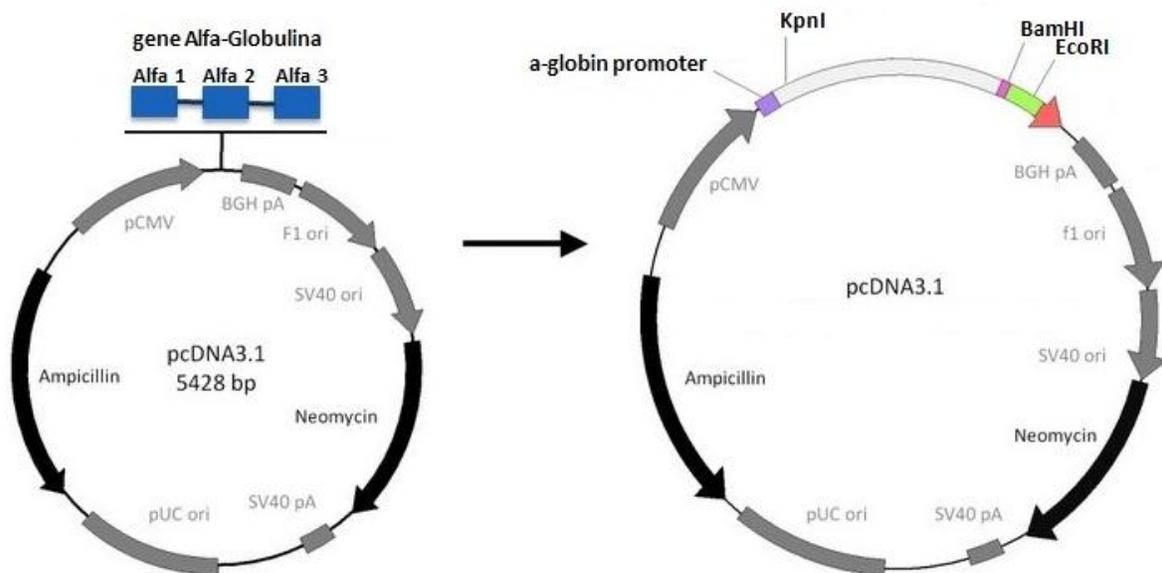


Figura 15: Vetor pcDNA3 modificado com a adição do gene da alfa-globulina (*HBA1*) (minigene híbrido).

Desta forma foram construídos os seguintes minigenes:

Para as alterações no gene *SRD5A2* foram construídos quatro minigenes para as formas nativas e mutantes das duas alterações em investigação. No caso da c.278delG, os *exons* 1 e 2 do gene *HBA1* foram substituídos por um fragmento contendo o *exon* 1 e parte do *intron* 1 do *SRD5A2* e, para a c.548-44T>G, um fragmento contendo o parte do *intron* 3, o *exon* 4 e parte do *intron* 4 do gene *SRD5A2* foi inserido entre os *exons* 2 e 3 do gene *HBA1* (**Figura 16**).

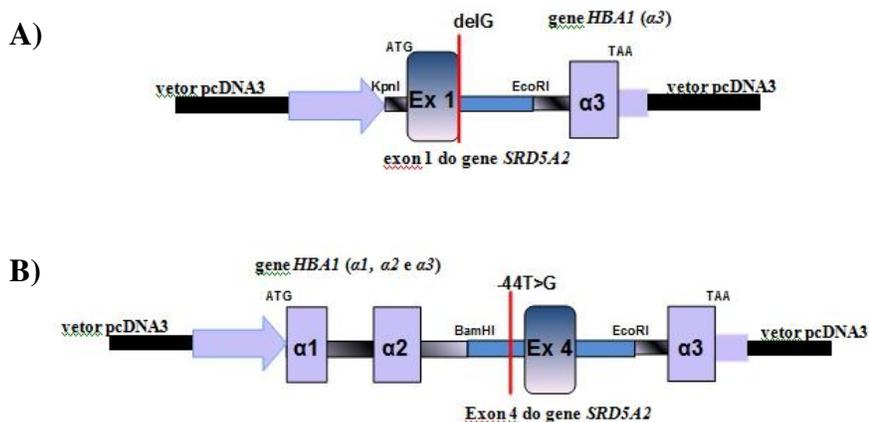


Figura 16: A) A figura mostra o esquema da construção de um minigene para estudo da mutação c.278delG. B) Esquema da construção de um minigene para estudo da alteração c.548-44T>G.

Para a alteração no gene *HSD17B3* foram construídos dois minigenes correspondentes às formas nativa e mutante. Um fragmento contendo parte do *intron 2*, o *exon 3* e parte do *intron 3* do gene *HSD17B3* foi inserido entre os *exons 2* e *3* do gene *HBA1* (Figura 17).

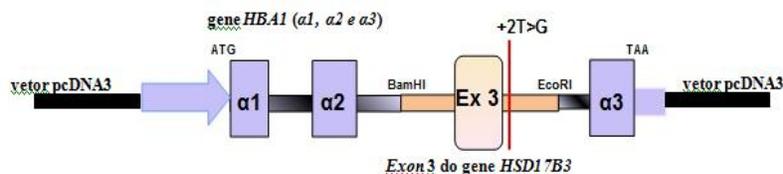


Figura 17: A figura mostra o esquema da construção de um minigene para estudo da mutação c.277+2T>G.

Para as alterações no gene *CYP21A2* foram construídos quatro minigenes para as formas nativas e mutantes das duas alterações em investigação. No caso da c.289+127T>G, um fragmento contendo parte do *intron 1*, o *exon 2*, o *intron 2*, o *exon 3* e parte do *intron 3* do gene *CYP21A2* foi inserido entre os *exons 2* e *3* do gene *HBA1*. Já para a c.939+5G>A, um fragmento contendo parte do *intron 6*, o *exon 7*, o *intron 7*, o *exon 8* e parte do *intron 8* do gene *CYP21A2* foram inseridos entre os *exons 2* e *3* do gene *HBA1* (Figura 18).

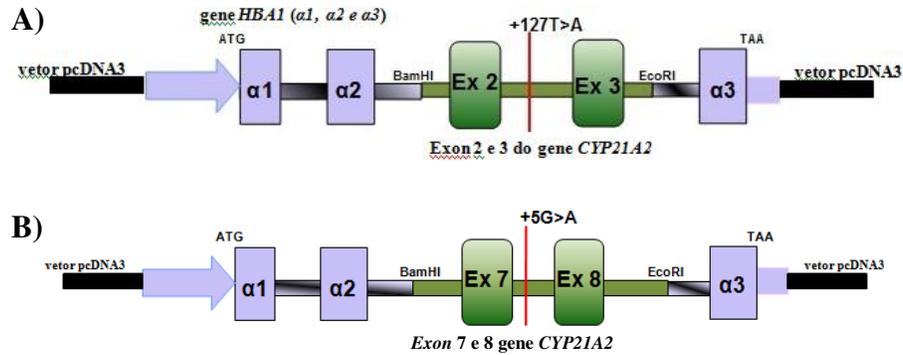


Figura 18: A) A figura mostra o esquema da construção de um minigene para estudo da mutação c.289+127T>G. B) Esquema da construção de um minigene para estudo da alteração c.939+5G>A.

1.1. Amplificação dos fragmentos

A partir do DNA genômico dos portadores e não portadores das mutações descritas acima, foi realizada a amplificação de cada fragmento pela técnica de PCR utilizando-se os *primers* descritos na **Tabela 3**. Esses *primers* foram desenhados com base nas sequências referências de cada gene (*CYP21A2*, ENSG00000231852; *SRD5A2*, ENSG00000049319; *HSD17B3*, ENSG00000130948), porém foram introduzidas sequências nucleotídicas (caudas) nos terminais 5' de cada *primer* para a criação de sítios de restrição para reconhecimento das enzimas específicas a ser utilizadas na clonagem de cada fragmento, de forma a se garantir a ligação direcionada ao vetor pcDNA3+.

Tabela 3: Sequências dos *primers* usados para a construção dos minigenes. Em itálico, a sequência nucleotídica dos sítios de restrição enzimático.

<i>Gene</i>	<i>Alteração</i>	<i>Sequencia 5' – 3'</i>	<i>Sentido</i>	<i>Frag. (pb)</i>
<i>HSD17B3</i>	c.277+2T>G	<i>Bam</i> HI – <i>GGATCC</i> GGGGTTGTGTTGTTCTAGCCC	<i>Forward</i>	509
		<i>Eco</i> RI – <i>CTTAAG</i> GGAACCCACCCAAAGGAGAGAG	<i>Reverse</i>	
<i>CYP21A2</i>	c.939+5G>A	<i>Bam</i> HI – <i>GGATCC</i> GTGGGGACTGTACGTGGACG	<i>Forward</i>	830
		<i>Eco</i> RI – <i>CTTAAG</i> AAGGGGGCTGGAGCTTAGAG	<i>Reverse</i>	
	c.289+127T>G	<i>Bam</i> HI – <i>GGATCC</i> TCACCATAGGAGGGGGCGGA	<i>Forward</i>	653
		G	<i>Eco</i> RI – <i>CTTAAG</i> GGCTACTGTGAGAGGCGAG	
<i>SRD5A2</i>	c.278delG	<i>Kpn</i> I – <i>GGTACC</i> ATGCAGGTTTCAGTGCCAGCAGAG	<i>Forward</i>	517
		<i>Eco</i> RI – <i>CTTAAG</i> GATGAGGTCCTGGGGGAGTGA	<i>Reverse</i>	
	c.548-44T>G	<i>Bam</i> HI – <i>GGATCC</i> GAGGCCACTCTTCGCAACTCCAG	<i>Forward</i>	635
		<i>Eco</i> RI – <i>GAATTC</i> GCCGTCACCTCAGTTGCCTCTGT	<i>Reverse</i>	

Para as reações de PCR foi utilizada a enzima *FastStart Taq DNA Polymerase* (Roche, Alemanha), por apresentar alta especificidade, maior sensibilidade, e por ser adequada para amplificar sequências de até 3 kb. Todos os *primers* utilizados para as amplificações dos fragmentos foram desenhados com base nas sequências de cada gene com o auxílio dos programas *Primer3* e *OligoCalc*.

No caso do gene *CYP21A2* foi necessária uma etapa preliminar de amplificação. Como há duas cópias desse gene no genoma haplóide humano, uma funcional (*CYP21A2*) e outra não funcional (pseudogene *CYP21A1P*), houve a necessidade de uma seleção prévia da cópia ativa, amplificando-se um fragmento que se estendia do terminal 5' até o *exon* 6, para o estudo da alteração c.289+127T>G e, outro fragmento se estendendo do *exon* 6 até o terminal 3' do gene, para o estudo da alteração c.939+5G>A. As condições de reação e os *primers* utilizados encontram-se nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4: Reação geral de PCR com enzima *Fast Start High Fidelity PCR System*.

Reagentes [] final	Ciclo geral
DNA genômico 1,0 – 2,0 µg	<p>95°C – 4 minutos</p> <p>30 ciclos de:</p> <p>95°C – 30 segundos</p> <p>T_{média} do par de primers – 30 segundos</p> <p>72°C – 1 minuto</p> <p>72°C – 10 minutos</p> <p>15 °C - ∞</p>
Tampão Roche (10x) 1x	
MgCl ₂ 25 mM (Roche) 1,5 mM	
dNTP 2 mM (Roche) 0,1 mM	
Primer direto 20 pmoles	
Primer reverso 20 pmoles	
Enzima <i>Fast Start High Fidelity</i>	
(5 U/µl, Roche) 2 U	
H₂O deionizada q.s.p.	
VF 50 µl	

Tabela 5: *Primers* para a seleção do gene *CYP21A2*.

Frag.	Primer Direto	Primer Reverso	T _m (°C)	Frag. (pb)
5' – exon 6	GAGTGAGTGCCCAAAAGC	TCAGCTGATCTCCACGATGTGA	63	2000
exon 6 – 3'	AGAGGGATCACATCGTGGAGAT	GAGGTTGGTTGAGTGCTGGG	61	1650

1.2. Purificação dos produtos de PCR

Os fragmentos do gene *CYP21A2* amplificados por PCR foram purificados utilizando-se o *GeneJET™ Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific, Estados Unidos). Após a purificação as amostras foram quantificadas usando-se o marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Promega, Estados Unidos). Esses fragmentos foram então utilizados como moldes para a posterior amplificação com os *primers* descritos na tabela 3.

1.3. Sub-clonagem em pGEM-T easy: digestão e ligação

A fim de obter uma melhor qualidade de clonagem no vetor pcDNA3(+) e maior concentração dos insertos, para o estudo de todas as alterações, foi realizada primeiramente a sub-clonagem no vetor pGEM-T easy®-T Easy Vector (Promega, Canadá), conforme protocolo sugerido pelo fabricante. Após realizar a ligação dos fragmentos no vetor pGEM-T easy, foi feita a transformação por choque térmico em *E. coli* DH5α devidamente preparadas para a transformação (protocolo descrito mais adiante). A ampicilina foi usada

para seleção das colônias recombinantes, uma vez que o vetor pcDNA3+ possui o gene de resistência a este antibiótico, sendo esta a única forma de seleção das colônias que obtiveram êxito na transformação. Os meios contendo as bactérias transformadas foram espalhados em meio LB sólido em placas de Petri que foram incubadas a 37°C durante a noite.

1.4. Identificação do inserto em pGEM-Teasy por digestão

Após o crescimento das colônias, foram selecionadas aleatoriamente 10 colônias recombinantes por placa que foram novamente inoculadas em 5 mL de meio LB, e mantidas sob agitação de 250 rpm, durante a noite a 37°C. Após a extração dos plasmídios utilizando-se o kit *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas, Canadá), as colônias foram triadas por digestão com as enzimas específicas para cada fragmento (**Tabela 3**), durante 1 hora 37°C conforme condições da **Tabela 6**.

Tabela 6: Digestão enzimática para selecionar as colônias recombinantes.

Produto da miniprep	5,0 µL
Tampão 10x (New England BioLabs)	1,0 µL
Enzima de restrição (20 U/µL)	0,4 µL
H ₂ O ultra pura (q.s.p)	10 µL

Confirmados os plasmídios com os insertos apresentando tamanhos correspondentes aos fragmentos esperados, os mesmos foram sequenciados com objetivo de se verificar a fidelidade das sequências, para posterior clonagem no vetor pcDNA3+.

1.5. Reação de sequenciamento

As amostras foram encaminhadas ao laboratório Source Bioscience Nottingham - United Kingdom para sequenciamento. As amostras dos plasmídios foram enviadas na concentração de 100 ng/µL e os *primers* a 3,2 pmol/µl. As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com as sequências referências dos genes *SRD5A2*, *HSD17B3* e *CYP21A2* citadas acima, com o auxílio dos programas *Chromas* e *GeneRunner* ou *CLC Sequence Viewer 6.3*, disponibilizados gratuitamente na web.

1.6. Clonagem em pcDNA3+: digestão e ligação

A quantificação do plasmídeo pcDNA3+ foi realizada utilizando um marcador de peso molecular quantitativo, o 100 pb *DNA Ladder* (Promega, Estados Unidos). A partir da quantificação do plasmídeo, foi possível calcular a quantidade de inserto a ser utilizada na reação de ligação, usando a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{ng vetor} \times \text{tamanho (kb) inserto} \times 3}{\text{tamanho (kb) vetor}} = \text{quantidade do inserto em ng}$$

Tanto o vetor pcDNA3+ quanto o inserto (produto da PCR) foram previamente digeridos com as enzimas de restrição específicas para cada fragmento a ser estudado, seguindo a reação descrita na **Tabela 7**.

Tabela 7: Protocolo da digestão enzimática usada para o inserto e para vetor pcDNA3.

Inserto (fragmento amplificado)	Plasmídeo pcDNA3+		
Produto de PCR	5,0 µL	pcDNA3	1,5 µL
Tampão 10x (New England BioLabs)	1,0 µL	Tampão (New England BioLabs)	1,0 µL
Enzima de restrição (20 U/µL)	0,4 µL	Enzima de restrição (20U/ µL)	0,4 µL
H ₂ O ultra pura (q.s.p.)	10 µL	H ₂ O ultra pura (q.s.p.)	10 µL

As reações foram incubadas a 37°C por 2 horas. Após as digestões, foram feitas as reações de ligação do plasmídeo pcDNA3+ aos insertos. As quantidades de vetor pcDNA3+ e de inserto que foram adicionadas às reações diferiram, de acordo com a concentração e tamanho de cada um. As reações de ligação foram realizadas utilizando os reagentes incluídos no kit *T4 DNA Ligase* (Promega, Estados Unidos), conforme especificado abaixo:

$$\left\{ \begin{array}{l} 2 \mu\text{L de tampão Ligase 10X} \\ 1 \mu\text{L de enzima } T4 \text{ DNA ligase } 3 \text{ U}/\mu\text{L} \\ 1 \mu\text{L de Vetor pcDNA3 (50 ng}/\mu\text{L)} \\ 3 \mu\text{L de inserto} \end{array} \right.$$

A ligação ocorreu durante 24 horas a 16°C.

Os produtos das ligações acima descritas foram introduzidos em células competentes *E. coli* DH5 α , por choque térmico cujo, protocolo será descrito abaixo. No caso do vetor pcDNA3+, a resistência à ampicilina foi a única forma de seleção das colônias recombinantes.

1.7. Preparação de células competentes para transformação por choque térmico

Para preparação de células competentes *E. coli* DH5 α utilizamos o seguinte protocolo:

- Uma única colônia de *E. coli* DH5 α foi inoculada em 5 mL de meio LB (sem antibiótico) *overnight* a 37°C e sob agitação de 250 rpm;
- Dois mL da cultura foram adicionados a 10 mL de meio LB (sem antibiótico) e mantidos sob agitação de 250 rpm a 37°C;
- A cultura ficou incubada a 37°C até atingir OD₆₀₀ de aproximadamente 0,5;
- Atingindo a densidade óptica desejada, a cultura foi centrifugada a 4.600 rpm, a 4°C, durante 5 minutos;
- O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 25 ml de CaCl₂ a 0,1 M gelado.
- Foi mantido em gelo por 30 minutos;
- Foi centrifugado a 4.600 rpm, a 4°C, durante 5 minutos;
- O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi ressuscitado em 4 mL de CaCl₂ a 0,1 M contendo 15% de glicerol gelado;
- Foram distribuídas alíquotas de 50 μ L da mistura de células em tubos de 1,5 mL os quais foram armazenados em *freezer* -70°C.

O processo de transformação ocorreu pelo método de choque térmico, segundo o protocolo de LEVY *et al.* (1991) que está resumidamente descrito abaixo:

- Foram adicionados 20 μ L do produto da ligação a 50 μ L de células competentes *E. coli* DH5 α , previamente descongeladas (mantidas em gelo);
- A mistura foi incubada por 15 minutos em gelo;
- Em seguida, foi colocada durante 35 segundos a 42°C, em banho-maria;

- Foram adicionados 200 μL de meio LB sem antibiótico, e incubado a 37°C sob agitação de 250 rpm, durante 1 hora;
- 200 μL de meio líquido com as bactérias transformadas foram espalhados em placas de LB Agar com ampicilina (50 mg/mL);
- As placas foram incubadas a 37°C durante 16 horas.

1.8. Identificação do inserto por digestão

Após a incubação, foram selecionadas aleatoriamente 20 colônias recombinantes por placa as quais foram inoculadas em 10 mL de meio LB, e mantidas sob agitação de 250 rpm, *overnight* a 37°C . Após a extração dos plasmídios através do kit *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas/United Kingdom), os plasmídeos foram triados por digestão com as enzimas específicas para cada fragmento, durante 1 hora 37°C conforme condições da **Tabela 8**.

Tabela 8: Digestão enzimática para separação do fragmento e identificação dos clones recombinantes.

Produto da miniprep	5,0 μL
Tampão 10x (New England BioLabs)	2,0 μL
Enzima de restrição (20U/ μL)	1,0 μL
H ₂ O ultra pura (q.s.p.)	10 μL

Confirmados os plasmídios com os insertos apresentando tamanhos correspondentes aos fragmentos esperados, os mesmos foram sequenciados para verificação das sequências.

1.9. Mutação sítio-dirigida

Para as duas alterações descritas na **Tabela 9** foi necessário introduzir a troca nucleotídica por mutagênese sítio-dirigida pois houve dificuldade em se identificar uma colônia contendo o alelo com a mutação a partir da amplificação e clonagem direta do DNA genômico. Assim, foram desenhados *primers* contendo as alterações a serem estudadas (**Tabela 9**).

Tabela 9: Mutação sítio-dirigida. *Primers* para estudo das alterações c.939+5G>A e c.548-44T>G.

<i>Gene</i>	<i>Alteração</i>	<i>Sequencia 5' – 3'</i>	<i>Sentido</i>
<i>CYP21A2</i>	c.939+5G>A	TGC <u>A</u> TCCTGG GGACAAGCAAAGGCTCCTT	<i>Forward</i>
		CCAGGA <u>T</u> GCACC TCAGGGTGGTGAAGCAAA	<i>Reverse</i>
<i>SRD5A2</i>	c.548-44T>G	CAAAAG <u>G</u> GATTCA GTTGCAATGATTGACCTTCCG	<i>Forward</i>
		TGAATC <u>C</u> TTTTG ACATTAAACCCATCTGTGTTG	<i>Reverse</i>

As condições utilizadas na mutagênese sítio-dirigida estão descritas na tabela abaixo (**Tabela 10**):

Tabela 10: Reação de PCR utilizada na mutagênese sítio-dirigida.

Reagentes [] final	Ciclo geral
DNA genômico 1,0 – 2,0 µg	<p>95°C – 5 minutos</p> <p>30 ciclos de:</p> <p>95°C – 40 segundos</p> <p>T_{média} do par de primers – 40 segundos</p> <p>72°C – 40 minutos</p> <p>72°C – 10 minutos</p> <p>10 °C - ∞</p>
Tampão Roche (10x) 1x	
MgCl ₂ 25 mM (Roche) 1,5 mM	
dNTP 2 mM (Roche) 0,1 mM	
<i>Primer</i> direto 20 pmoles	
<i>Primer</i> reverso 20 pmoles	
Enzima <i>Fast Start High Fidelity</i>	
(5 U/µl, Roche) 2 U	
H₂O deionizada q.s.p.	
VF 50 µl	

2. DESCONGELAMENTO E CULTURA DAS CÉLULAS HEK-293

Para a realização da transfecção foram utilizadas células HEK-293 (do inglês *Human Embryonic Kidney*), pois uma vez que expressa o antígeno T, quando transfectada com o vetor contendo uma origem de replicação normal para SV40, tem todos os outros genes virais necessários para gerar múltiplas cópias do vetor, proporcionando altos níveis de expressão (GLUZMAN *et al.*, 1981). As células foram descongeladas conforme protocolo estabelecido no laboratório da Faculdade de Medicina da Universidade de Southampton – Reino Unido:

- A assepsia na capela do fluxo laminar foi realizada com álcool 70% e antes do uso, a lâmpada de UV e o exaustor permaneceram ligados durante 20 minutos;
- O meio DMEM (Invitrogen Corporation, Estados Unidos) foi inicialmente suplementado com 10% de soro fetal bovino estéril, e neste foi acrescentada a solução de 100 µg/ml de estreptomicina;
- As células foram descongeladas em banho-maria a 37°C, evitando que a temperatura das mesmas atingisse 37°C, e evitando a presença de cristais;
- Sob a capela do fluxo laminar, 9 mL de meio DMEN foi passado para um tubo de 15 mL;
- Todo o conteúdo das células descongeladas (~1 mL) foi adicionado ao meio DMEN;
- Centrifugou-se a 1.000 rpm durante 5 minutos,
- O sobrenadante foi aspirado e o *pellet* foi ressuspenso em 10 mL de meio DMEN, homogeneizando com a pipeta;
- O volume foi dividido em 2 pequenos frascos e incubados a 37°C, em estufa sob 5% de CO₂.

Para se verificar a viabilidade das células, o número de células viáveis foi contado em câmara de *Neubauer*. A viabilidade celular foi sempre superior a 75.

2.1. Manutenção e preparo das células HEK-293

Após 24 horas de incubação, o meio DMEM suplementado foi retirado e substituído pelo mesmo volume do meio DMEM fresco. A primeira passagem foi realizada 48 horas após o descongelamento. O meio de cultura foi descartado e a camada de células aderidas foram lavadas gentilmente com 2 mL de PBS (Invitrogen Corporation, Estados Unidos) em temperatura ambiente. Após descartar o PBS, as células foram despregadas com 1 mL de tripsina e incubadas a 37°C, em estufa com 5% de CO₂, durante 2 minutos. Adicionou-se 8 mL de meio DMEN e toda a superfície do frasco foi lavada com o meio, para a remoção de todas as células. Todo o volume foi transferido para um tubo de 50 mL e centrifugado por 5 minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi aspirado, e ao *pellet* adicionou-se 10 mL de DMEN. Seguiu-se uma incubação de 48 horas a 37°C em estufa sob 5% de CO₂ até o primeiro repique, quando a metade das células foi descartada e a outra metade foi inoculada novamente em 10 mL de meio. Após 2 repiques as células foram tripsinizadas e todo

volume foi colocado em um outro frasco de 50 mL contendo 15 mL de meio DMEM. As células foram mantidas nesse frasco até o momento da preparação para a transfecção.

2.2. Preparação das células HEK-293 para transfecção

Ao atingir 85% de confluência celular, o meio DMEM foi descartado e às células foram adicionados gentilmente 5 mL de PBS. Após descarte do sobrenadante foram adicionados 2 mL de tripsina, seguido de incubação por cerca de 2 minutos. Durante o período de incubação as placas, contendo 6 poços cada, foram preparadas com 500 µL de meio DMEM. Então, foram adicionados 8 mL de meio DMEN, e a superfície do frasco foi lavada para remoção de todas as células. Todo o volume foi transferido para um tubo de 15 mL, e centrifugado por 5 minutos a 1.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado e ao *pellet* foram adicionados 10 mL de meio DMEN. Foram transferidos para um tubo de 50 mL apenas 5 mL do homogeneizado de células, e a este volume foram adicionados 35 mL de meio DMEN. Para cada poço, 500 µL da mistura contendo 35 mL de DMEN + células foram adicionados. Após incubação de 24 horas a 37°C em estufa sob 5% de CO₂, a confluência observada foi de 60-70%, sendo ideal para prosseguir com o procedimento da transfecção.

2.3. Transfecção com as construções de minigenes

Para cada construção de minigene foram utilizados 3 poços por placa, assim foram realizadas 3 transfecções independentes para cada alteração e controle. A transfecção das células HEK-293 foi realizada utilizando o reagente *FuGene HD* (Roche, Estados Unidos). Em um tubo de 1,5 mL foram adicionados 100 µL de meio DMEN (sem antibiótico) e 3 µL *Fugene* (diluído numa razão 3:1) para cada transfecção. O volume foi homogeneizado e incubado à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Logo em seguida, foi adicionado 1 µg do minigene, e incubado durante 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, gotejou-se a mistura contendo *Fugene* + minigene nos poços contendo as células. As placas foram incubadas durante 48 horas a 37°C em estufa sob 5% de CO₂.

2.4. Extração do RNA total

Esta etapa foi realizada seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante para extração de RNA de cultura de células animais do kit *RNeasy® Plus Mini Kit* (Qiagen, Alemanha). Após 48 horas da transfecção, o meio foi descartado e foi feita uma lavagem

com 1 mL de PBS em cada poço. Descartou-se o PBS e 350 µL do tampão RLT (kit *RNeasy*®, Qiagen) contendo 1% de β-mercaptoetanol foram adicionados diretamente sobre as células. A placa contendo os poços foi agitada manualmente de forma a cobrir toda a superfície com o tampão. Com o auxílio de uma espátula para cultura (*rubber policeman*), as células foram coletadas da placa, em tubos de 1,5 mL. As células foram homogeneizadas com auxílio de uma seringa de 1 mL e agulha de 21G, o tubo permaneceu em gelo seco até posterior armazenamento a -80°C. A extração do RNA total prosseguiu de acordo com o seguinte protocolo:

- O volume total de células contidas no tampão de lise RLT (kit *RNeasy*®, Qiagen) foi transferido para uma coluna de separação com filtro à qual foi acoplado um tubo de 2 mL e o sistema foi centrifugado por 2 minutos a 13.000 rpm;
- Ao filtrado adicionou-se 350 µL de etanol 70% gelado, homogeneizando com o auxílio de pipeta;
- O homogeneizado anterior foi transferido para uma segunda coluna com filtro à qual foi também acoplado um tubo de 2 mL, o sistema foi centrifugado por 1 minuto a 10.000 rpm;
- Descartou-se o filtrado, e à coluna foram adicionados 700 µL de tampão RW1. O sistema foi submetido à centrifugação por 1 minuto a 10.000 rpm;
- A coluna foi transferida para um novo tubo de 2 mL, e foram adicionados 500 µL de tampão RPE, seguido de centrifugação por 1 minuto a 10.000 rpm;
- Descartou-se o eluato e a etapa anterior foi repetida;
- Centrifugou-se por mais 1 minuto a 10.000 rpm, para retirar o excesso de etanol da coluna;
- A coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml onde se adicionou 30 µL de água livre de RNase, tratada com DEPC;
- Centrifugou-se por 1 minutos a 10.000 rpm e assim a coluna foi descartada e o tubo foi armazenado a -80°C.

Quando observada contaminação do RNA total com DNA, o mesmo foi tratado com DNase livre de RNase (Invitrogen Corporation, Estados Unidos) conforme o protocolo do fabricante, para digerir qualquer DNA presente.

2.5. Síntese do cDNA

A concentração do RNA extraído foi medida por leitura de absorvância óptica a 260 nm em espectrofotômetro *Nanodrop 8000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific). Água tratada com DEPC foi utilizada como amostra referência (branco) para calibrar o aparelho, 2 µL da amostra de RNA foram utilizados para leitura. A síntese do cDNA foi então realizada utilizando o *First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Amersham, Biosciences, GE HealthHACre, Reino Unido). Em um tubo de 1,5 mL foi colocado 1 µg de RNA total, e o volume foi completado para 12 µL com H₂O livre de RNase tratada com DEPC. Essa solução foi aquecida a 65°C por 10 minutos e, em seguida mantida em gelo. Durante a incubação do RNA foram colocados em outros tubos de 1,5 mL, 7 µL da mistura de reação, 1 µL de solução de DTT e 1 µL do *primer* randômico *Not I*-d(T)₁₈. Ao tubo contendo esta mistura, foi adicionado o RNA desnaturado homogeneizando a reação com o auxílio de uma pipeta. Incubou-se a reação por 1 hora a 37°C. Após a incubação o cDNA sintetizado foi utilizado para a amplificação por PCR.

2.6. Amplificação dos fragmentos de cDNA

A amplificação dos fragmentos de cDNA foi realizada por PCR com *primers* que anelam em *exons* do gene da alfa globulina (**Tabela 11**):

Tabela 11: Sequências dos *primers* específicos para amplificação do cDNA.

<i>Sequência do primer (5' – 3')</i>	<i>Sentido</i>
cDNAs* – TAATACGACTCACTATAGGG	<i>Forward</i>
cDNAs – GGACCCGGTCAACTTCAA	<i>Foward</i>
cDNAas – AGCTCTAGCATTTAGGTGACTAT	<i>Reverse</i>

*Este *primer (forward)*, foi utilizado somente para estudo do cDNA contendo a mutação c.278DelG do gene *SRD5A2*.

Os fragmentos de cDNAs foram amplificados por PCR, em seguida foram testados em gel de agarose 1%, e posteriormente foram purificados utilizando-se o *GeneJET™ Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific, Estados Unidos). Após a purificação das bandas, as amostras foram quantificadas usando-se o marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Promega, Estados Unidos). Em seguida, os fragmentos purificados foram encaminhados

para sequenciamento ao laboratório Source Bioscience Nottingham - United Kingdom, para verificar a acuidade das sequências amplificadas.

3. ESTUDO IN SILICO

Para melhor compreensão dos efeitos causados pelas alterações aqui apresentadas, análises *in silico* foram utilizadas a fim de obter indicações do prejuízo causado às regiões de *splicing* dos genes *CYP21A2*, *HSD17B3* e *SRD5A2* na presença das alterações.

Para tais análises, utilizaram-se os seguintes programas:

Fruitfly- Berkeley Drosophila Genome Project: Este programa de livre acesso analisa a estrutura de regiões doadora e aceptora de *splicing*, além de avaliar se a presença de determinada mutação altera ou não determinado sítio de *splicing* (www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

ESE Finder 3.0: Esta ferramenta permite analisar de forma rápida sequências exônicas ativadoras de *splicing* (ESEs), e também a identificação de proteínas da família SR que se ligam às ESEs, além de prever se mutações exônicas interrompem tais elementos (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese finder.cgi>).

Human Splicing Finder version 2.4.1: A fim de melhor compreender as mutações intrônicos e exônicas que levam a defeitos do processo de *splicing*, o site *Human Splicing Finder* é destinado a realizar o cálculo dos valores de locais em potencial para *splicing*, além de procurar regiões de ponto de ramificação em sequências gênicas. Também fornece indicações sobre as proteínas pertencentes a família SR (proteínas ativadoras de *splicing*), envolvidas no processo de *splicing*. Os histogramas gerados mostram cores e colunas, onde as cores correspondem as diferentes proteínas SR, e a altura das colunas indica o grau de afinidade de ligação entre as proteínas e a sequência em questão (<http://www.umd.be/HSF/>).

SpliceAid : Realiza previsões sobre mais de 60 proteínas envolvidas no processo de *splicing* que se ligam as sequências de RNAs humanos. O programa *SpliceAid* possui um banco de dados que engloba tanto as proteínas da família SR (proteínas ativadoras de *splicing*),

quanto as proteínas da família hnRNP (proteínas repressoras de *splicing*). Através do histograma gerado por esta ferramenta é possível observar barras acima da sequência em estudo, as quais correspondem às proteínas que reconhecem sequências ativadoras de *splicing*. Já as barras que aparecem abaixo da sequência de interesse, correspondem as sequências envolvidas com a repressão do processo de *splicing*. A altura das colunas indica o grau de afinidade de ligação entre as proteínas e a sequência em questão (<http://www.introni.it/splicing.html>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As trocas nucleotídicas c.278delG e c.548-44T>G (gene *SRD5A2*), c.277+2T>G (gene *HSD17B3*), c.939+5G>A e c.289+127T>G (gene *CYP21A2*), foram previamente identificadas pelo nosso grupo de pesquisa e não constam anotadas em banco de dados. Cada uma das alterações no gene *SRD5A2* foi identificada em um único indivíduo de uma casuística composta por mais de 100 indivíduos. Para as trocas nucleotídicas do gene *CYP21A2*, a casuística estudada já atinge mais de 200 famílias dentro da qual cada uma das alterações aqui incluídas foi identificada em apenas uma família. Já no caso do gene *HSD17B3*, poucos indivíduos haviam sido estudados, dada a raridade da deficiência de *HSD17B3*. Uma vez inéditas e localizadas em *introns*, o estudo de uma possível ação no processo de *splicing* foi conduzido.

A presença de alterações em regiões de *splicing* em genes envolvidos em deficiências raras, como por exemplo das enzimas *HSD17B3* e *SRD5A2*, estimulam a busca pela compreensão dos efeitos que alterações intrônicas possam ter no mecanismo de *splicing* dos respectivos genes.

Para que se pudesse desenhar uma estratégia de estudo um obstáculo inicial havia que ser ultrapassado. Este obstáculo era a clonagem dos fragmentos contendo os *exons* e *introns* dos genes *SRD5A2* e *HSD17B3* que deveriam ser clonados para a obtenção dos minigenes que seriam os modelos de estudo, uma vez que alguns *introns* em questão apresentavam tamanhos próximos a 50 Kb, o que seria impossível de se clonar em vetores normais de expressão gênica. Foram, então, realizadas algumas tentativas de redução dos *introns*, através de amplificação seletiva de partes conservadas dos *introns* para posterior junção através de digestão com enzimas de restrição e reação de ligação com DNA ligase. Porém, não se obteve sucesso nas clonagens dos fragmentos gerados através dessa estratégia, e assim houve a necessidade de buscar outra metodologia. Na busca de referências de construção de minigenes, encontramos o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Diana Baralle, da Universidade de Southampton – Reino Unido, que utilizava minigenes híbridos e suas implicações em doenças genéticas para seus estudos (BARALLE e BARALLE, 2005). Assim, foi feito o contato com esse grupo de pesquisa onde protocolos para construção e análises de minigenes híbridos estavam muito bem estabelecidos. Os

ensaios de minigenes conforme já mencionados no item Metodologia foram, então, realizados em colaboração com esse grupo.

Além da escolha da estratégia para a montagem dos minigenes, antes de se iniciar os estudos funcionais propriamente ditos, as alterações foram previamente avaliadas por programas de predição *in silico* de livre acesso (Fruitfly, ESE Finder, Human *Splicing* Finder e SpliceAid), com o propósito de termos uma indicação de possíveis efeitos no processo de *splicing* normal dos genes *SRD5A2*, *HSD17B3* e *CYP21A2*.

A seguir, as mutações estudadas serão descritas e discutidas, individualmente (**Anexo 3**).

1. ALTERAÇÃO *c.278DELG* GENE *SRD5A2*

1.1. Resultados

A deleção *c.278delG* foi encontrada em heterozigose no *exon 1* pelo nosso grupo de pesquisa (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2012). O nucleotídeo deletado está localizado na última posição do *exon 1*. Na verdade, a deleção pode ser um dos dois Gs correspondentes ao último nucleotídeo do *exon 1* ou ao primeiro nucleotídeo do *intron 1*.

A figura abaixo mostra parte do eletroferograma do clone contendo o vetor pGEM-Teasy e a sequência normal e também a sequência mutante da alteração *c.278delG* (**Figura 19**).

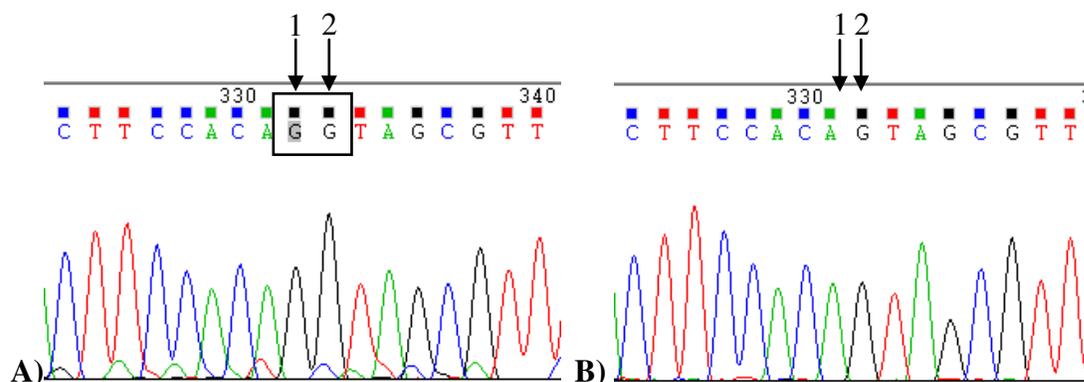


Figura 19: Parte do eletroferograma obtido no sequenciamento do clone inserido no vetor pGEM-T easy, contendo o *exon 1* e parte do *intron 1* do gene *SRD5A2*. **A)** Sequência GG normal, ressaltada pelo quadrado de linha preta. **B)** Sequência *_G* ou *G_* mutante, indicadas pelas setas nas posições 1 e 2, respectivamente.

Devido às características da mutação, teoricamente pode-se considerar duas possibilidades: a) o *splicing* poderia ocorrer normalmente e o transcrito apresentaria a deleção no códon 94, ocorreria o deslocamento do quadro de leitura com o surgimento de um códon de parada de síntese proteica na posição 130; b) a deleção de um dos dois Gs poderia afetar a atividade de *splicing* do sítio doador do *intron* 1. Para testar a segunda hipótese, foram realizados testes *in silico* com ferramentas disponibilizadas para acesso livre para se avaliar a probabilidade desta deleção alterar o *splicing*.

O estudo de predição *in silico* pelo programa *FruitFly* mostra que na sequência normal a probabilidade do sítio ser reconhecido é de 89%, no entanto para o alelo mutante verificou-se que o sítio de *splicing* normal é totalmente suprimido; ou seja, o sítio denotado como 275-289 na **Figura 20** correspondente à sequência normal foi abolido na mutante.

Normal	<p>Donor site predictions for SRD5A2 :</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Start</th> <th style="text-align: left;">End</th> <th style="text-align: left;">Score</th> <th style="text-align: left;">Exon</th> <th style="text-align: left;">Intron</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>237</td> <td>251</td> <td>0.41</td> <td>tgggacg</td> <td>gtacttct</td> </tr> <tr style="border: 2px solid red;"> <td>275</td> <td>289</td> <td>0.89</td> <td>tccacag</td> <td>gtagcgtt</td> </tr> </tbody> </table>	Start	End	Score	Exon	Intron	237	251	0.41	tgggacg	gtacttct	275	289	0.89	tccacag	gtagcgtt
Start	End	Score	Exon	Intron												
237	251	0.41	tgggacg	gtacttct												
275	289	0.89	tccacag	gtagcgtt												
Mutante	<p>Donor site predictions for mut :</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Start</th> <th style="text-align: left;">End</th> <th style="text-align: left;">Score</th> <th style="text-align: left;">Exon</th> <th style="text-align: left;">Intron</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>237</td> <td>251</td> <td>0.41</td> <td>tgggacg</td> <td>gtacttct</td> </tr> <tr style="border: 2px solid red;"> <td colspan="5" style="height: 20px;"> </td> </tr> </tbody> </table>	Start	End	Score	Exon	Intron	237	251	0.41	tgggacg	gtacttct					
Start	End	Score	Exon	Intron												
237	251	0.41	tgggacg	gtacttct												

Figura 20: Análise da alteração na função de *splicing* provocadas pela alteração c.278delG através do programa *FruitFly Splice Site Prediction FruitFly* (www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html). O sítio 275-289 abolido está denotado no retângulo vermelho.

A análise *in silico* da alteração c.278delG através do programa *Human Splicing Finder* mostrou que na sequência normal a probabilidade do sítio ser reconhecido é de 77,71%, mas na presença da deleção c.278delG existe uma redução de 53,2% do sítio ser reconhecido pelo spliceossomo (**Figura 21**).

Sequence Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	Variation (%)
279	Donor	caggtagcg	CAGtagcgt	77.71	36.37	Site broken -53.2

Figura 21: Análise das alterações na função de *splicing* da alteração c.278delG através do programa de predição *Human Splicing Finder* (<http://www.umd.be/HSF/>).

Já a previsão *in silico* pelo programa *ESE Finder 3.0* mostrou que o sítio denotado como 493, referente a sequência normal, apresenta *score* de 6,9% para que ocorra um *splicing* correto. Porém, quando a guanina é deletada da sequência, esse sítio foi completamente abolido, como mostra a **Figura 22**.

Normal	3SS_U2_human threshold: 6.632		
	Position*/Site/Score		
	357 (-484)	CTACCCGCCTGCCAGCCCGCGCCGCTGGT	6.92430
	380 (-461)	GCCTGGTTCCTGCAGGAGCTGCCTTCCTTC	9.02380
	493 (-348)	ACATTACTCCACAGGTAGCGTTTTCCCT	6.93490
Mutante	3SS_U2_human threshold: 6.632		
	Position*/Site/Score		
	357 (-483)	CTACCCGCCTGCCAGCCCGCGCCGCTGGT	6.92430
	380 (-460)	GCCTGGTTCCTGCAGGAGCTGCCTTCCTTC	9.02380

Figura 22: Análise efetuada pelo programa *ESE Finder 3.0* na presença da alteração c.278delG no gene *SRD5A2* (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3>). O sítio 493 abolido está denotado no retângulo vermelho.

Utilizando-se ainda as ferramentas do programa *ESE Finder 3.0*, foi possível avaliar se há diferença entre os tipos de proteínas da família SR, que se ligam tanto na sequência normal quanto mutante. A análise de predição mostrou que ocorreu um aumento no número de proteínas do tipo SRSF5 e uma diminuição da proteína SRSF1 quando na presença da mutação c.278delG, em relação à sequência normal (**Figura 23**).

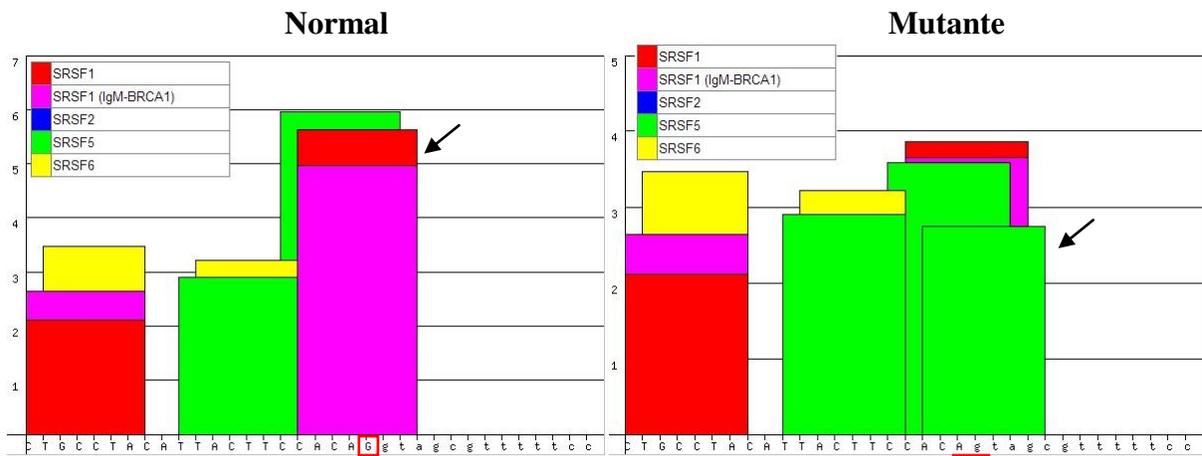


Figura 23: Previsão realizada pelo programa *ESE finder* 3.0 para as proteínas SR, na presença da sequência normal e mutante do gene *SRD5A2* considerando a mutação c.278delG (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>).

Pelo programa *SpliceAid* é possível avaliar as diferentes proteínas envolvidas no processo de *splicing*. Assim, foi possível verificar que as proteínas ZRANB2 e SRp40 se ligam na sequência normal do gene *SRD5A2*, contudo na presença da mutação c.278delG apenas a proteína SC35 passa a ligar na sequência (**Figura 24**).

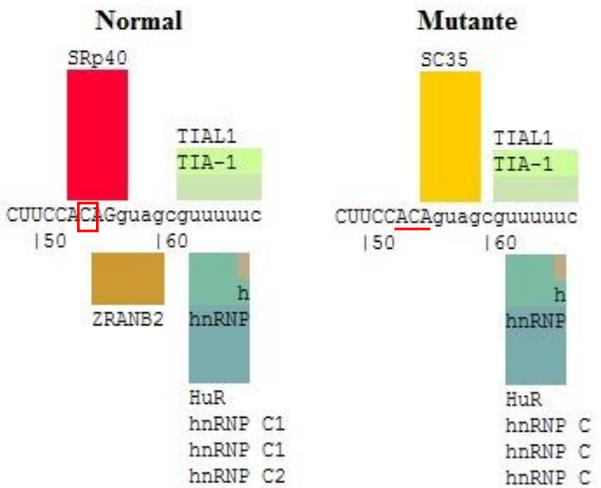


Figura 24: Análise do programa *SpliceAid* (<http://www.introni.it/splicing.html>), mostra as diferentes proteínas que se ligam tanto na sequência normal quanto na sequência mutante do gene *SRD5A2*.

A partir dos resultados dos estudos *in silico*, os quais indicaram que a alteração c.278delG poderia alterar o mecanismo de *splicing* no gene *SRD5A2*, foi realizada uma estratégia de estudo baseada na construção de um minigene abrangendo um fragmento composto pelo *exon 1* e *intron 1* do gene *SRD5A2* (**Figura 25**).

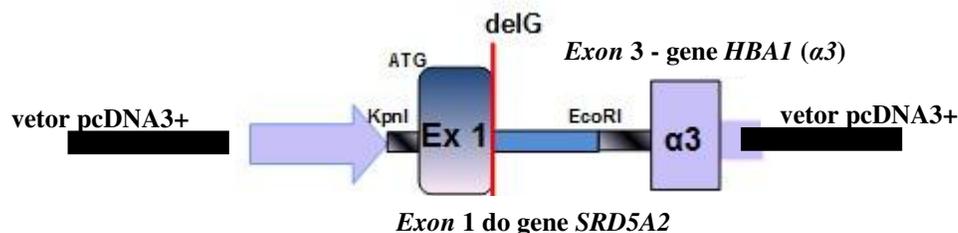


Figura 25: A figura mostra o esquema da construção de um minigene para estudo da mutação c.278delG.

Após a transcrição do minigene contendo a sequência normal ou a sequência portadora da alteração, em células HEK-293, os transcritos extraídos das células foram sintetizados em cDNAs e sequenciados.

Através da visualização da corrida de gel de agarose contendo a PCR dos transcritos produzidos por RT-PCR, foi possível verificar a ausência de 38 nucleotídeos na região 3' do *exon 1* do gene *SRD5A2* (479 pb), demonstrando o que o spliceossomo reconheceu um sítio de *splice 5'* crítico (variante de *splicing*) diante da mutação c.278delG (**Figura 26 e 27**)

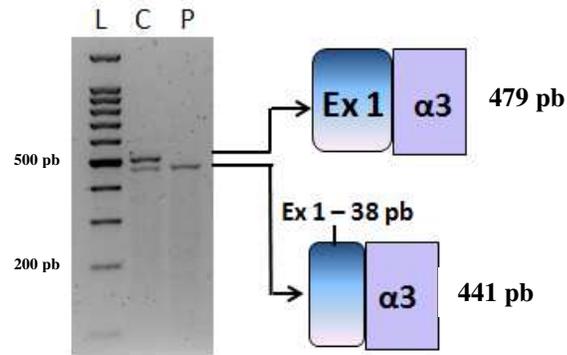


Figura 26: Resultado da eletroforese em gel de agarose onde L é o marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Promega, Estados Unidos), C é o minigene controle, e P é o minigene contendo a mutação c.278delG no gene *SRD5A2*. Ao lado faz-se a representação esquemática dos minigenes finais tanto para o controle, quanto para o mutante.

Assim, o produto do sequenciamento do minigene contendo a alteração c.278delG evidenciou a ativação de um sítio 5' de *splicing* crítico, o qual gerou um produto com 38 nucleotídeos a menos na região 3' do *exon* 1 do gene *SRD5A2* (**Figura 27**). Portanto, a deleção fez com que não houvesse o reconhecimento do GT consenso do sítio doador de *splicing* que permaneceu intacto, mas ativou um GT a 38 pb *upstream* onde ocorreu o reconhecimento pelo spliceossomo, ocasionando a produção de um transcrito anômalo.

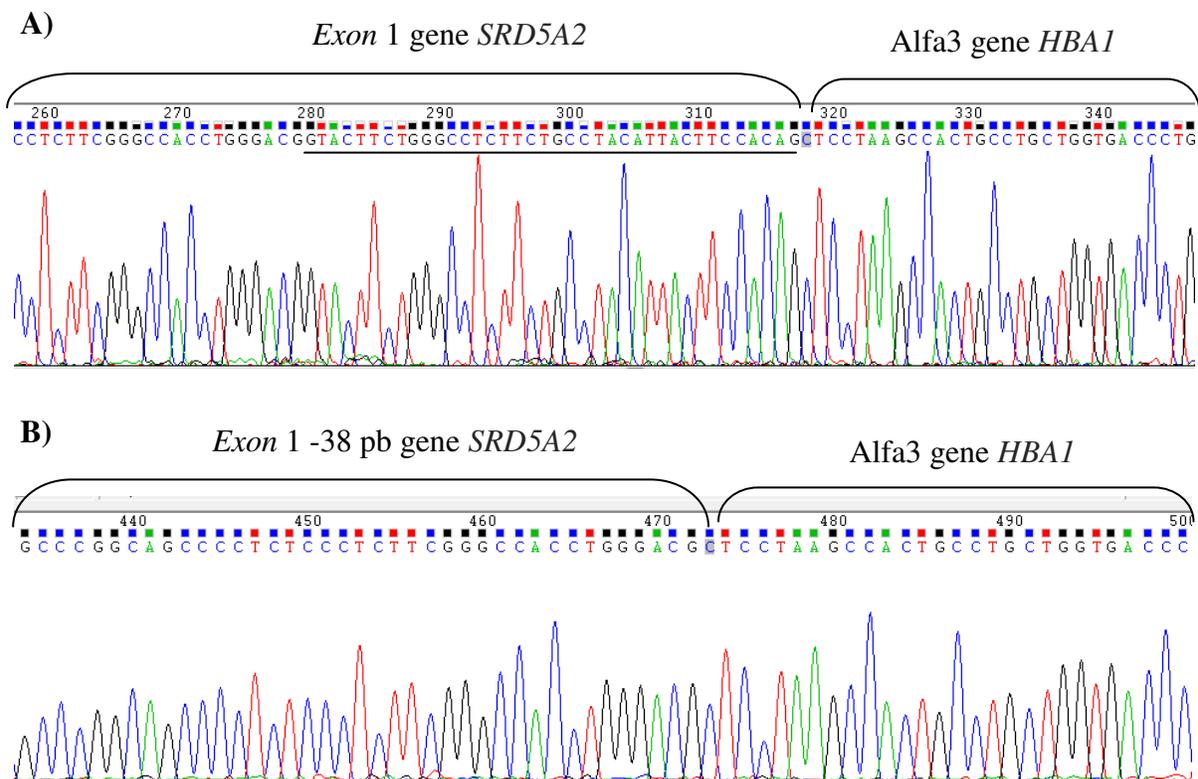


Figura 27: Partes dos eletroferogramas obtidos nos sequenciamentos dos cDNAs dos minigenes construídos para c.278delG. **A)** Sequenciamento do transcrito contendo o *exon 1* do gene *SRD5A2* ao *exon 3* do gene da alfa globulina (*HBA1*), evidenciando a junção *exon-exon*. Do lado esquerdo está *exon 1* normal do gene *SRD5A2* e, do direito o *exon 3* do gene da alfa globulina. **B)** Sequenciamento do transcrito mutante evidenciando a exclusão de 38 pb da região 3' do *exon 1* (lado esquerdo da figura) e o *exon 3* do gene da alfa globulina (*HBA1*) (lado direito da figura).

Com esses resultados pode-se dizer que a deleção interferirá no mecanismo de *splicing* produzindo um transcrito com 38 pb a menos, o que produzirá um *frameshift* a partir do códon 81 e a formação de um *stop* códon prematuro na posição 121 (**Figura 28**).

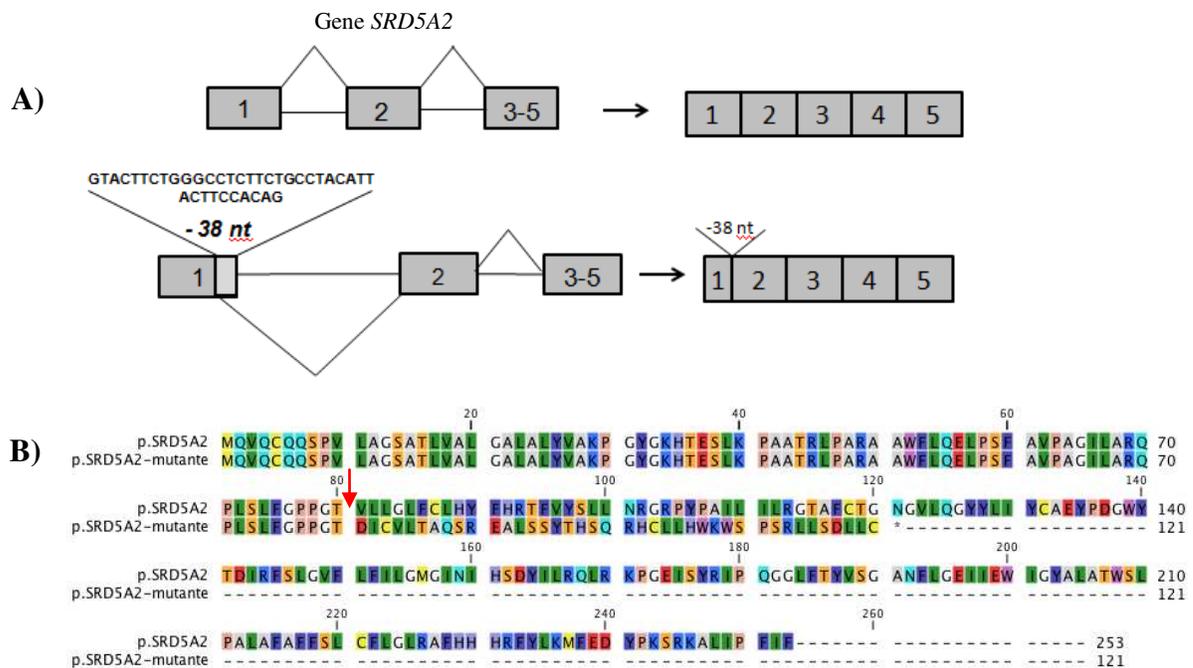


Figura 28: Em **A)** o esquema mostra o gene *SRD5A2* normal assim como o *splicing* correto deste gene. Também mostra o *splicing* alternativo da região 5', onde ocorre a excisão de 38 nucleotídeos do *exon 1*. **B)** Sequência de aminoácidos normal e mutante do gene *SRD5A2*. A seta vermelha indica o códon (posição da deleção). É possível observar na figura a formação de um *stop* códon prematuro na posição 121.

1.2. Discussão: Alteração c.278delG gene *SRD5A2*

Diante dos resultados gerados pelas análises de predição *in silico* e dos resultados obtidos através da técnica de minigene, podemos concluir que a alteração c.278delG causa um desequilíbrio no processo de *splicing* do gene *SRD5A2*.

Foi previsto através da análise do software *SpliceAid* que a sequência normal do *exon 1* do gene *SRD5A2* apresentava sequências de ligação das proteínas SRp40 e ZRANB2, ambas pertencentes a família das proteínas ricas em serinas e argininas (SR). Já na sequência contendo a mutação c.278delG, essas ligações se perderam criando uma nova ligação com a proteína SC35. Em paralelo, na presença da deleção de G (c.278delG) o programa *ESE Finder* mostrou a criação de um local de ligação para um maior número de proteínas SRSF5 e uma diminuição das proteínas SRSF1 (ASF/SF2), quando comparado a sequência normal.

Com base no que foi observado nos ensaios de minigenes, pode-se sugerir que as mudanças no padrão de ligação das diferentes proteínas segundo a predição dos *softwares*, resulta em um enfraquecimento da região 5' de *splicing* do *exon 1* do gene *SRD5A2*, o que levou o spliceossomo a reconhecer um sítio 5' de *splicing* crítico, produzindo desta forma um transcrito alternativo (variante de *splicing*).

Para uma melhor compreensão, através dos programas *SliceAid* e *ESE Finder* foi realizada a predição focando o sítio de *splicing* crítico ativado pela mutação c.278delG. Observa-se que há a ligação para proteínas SRSF1 (ASF/SF2) (*ESE Finder*) e ZRANB2 (*SpliceAid*) no sítio reconhecido pelo spliceossomo (**Figura 29**).

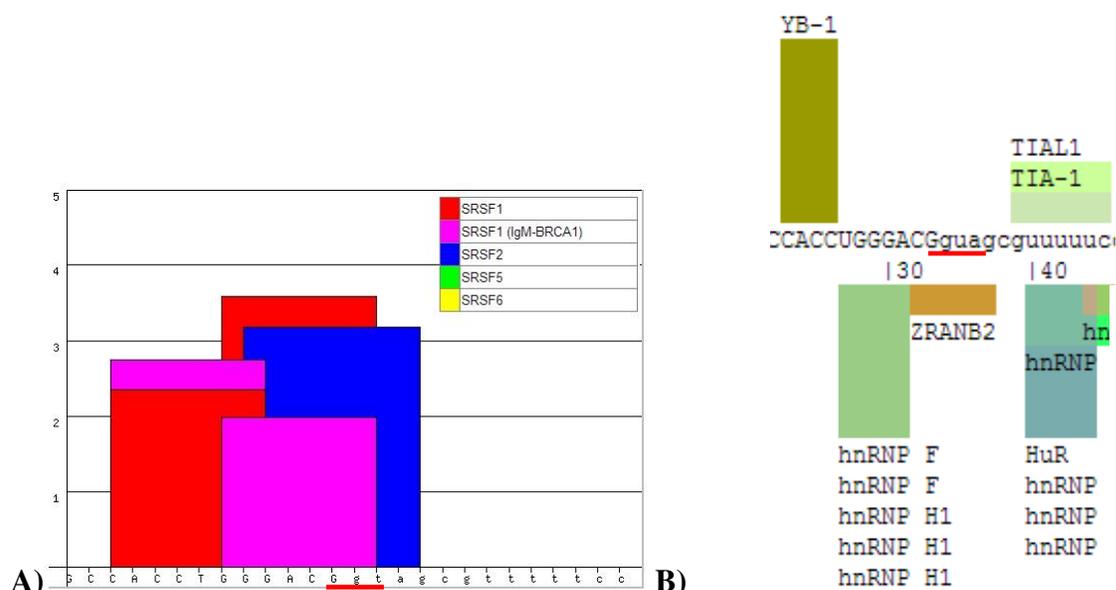


Figura 29: Previsão realizada pelo programa ESE finder 3.0 e SpliceAid, com a sequência contendo a mutação c.278delG do gene *SRD5A2*.

A proteína ASF/SF2 pertence à família “clássica” das proteínas SR que compreende um grupo de proteínas conservadas filogeneticamente e relacionadas estruturalmente que possuem uma ou duas cópias de um *RNA recognition motif* (RRM) e um domínio característico rico em resíduos arginina/serina, conhecido como domínio RS. Estas proteínas exercem ainda funções em algumas atividades que ocorrem após o processo de *splicing*, como a exportação nuclear do mRNA, o mecanismo de NMD e a própria tradução

do mRNA (CÁCERES e KORNBLIHTT, 2002; LONG e CACERES, 2009; MANLEY e TACKE, 1996).

As proteínas ZRANB2 reconhecem sequências de RNA fita simples, com alta afinidade e especificidade, sugerindo que essas proteínas participam da regulação do *splicing* alternativo através da interação direta com sítios 5' de *splice* (LOUGHLIN *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2013).

Diante dessa previsão, é possível propor que a ligação das proteínas (ASF/SF2) e ZRANB2 podem potencializar o reconhecimento do local crítico de *splicing* pelo spliceossomo no *exon* 1.

Através do resultado da eletroforese em gel de agarose das amostras de PCR do cDNA, foi possível observar que o minigene controle, isto é, aquele sem a mutação, apresentou a banda relativa ao fragmento selvagem com maior intensidade, mas também houve a produção de outro fragmento com o tamanho correspondente à variante observada na construção mutante, e por isso foi realizada uma análise para quantificar a intensidade das bandas obtidas utilizando o software de livre acesso *ImageJ* (<http://ImageJ.nih.gov/ij/>) (**Figura 30**).

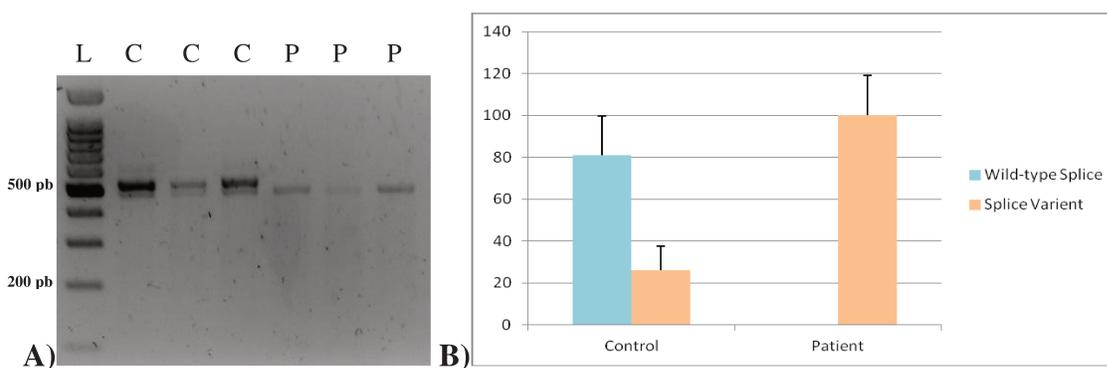


Figura 30: **A)** Gel de agarose mostrando o resultado da PCR do cDNA controle e mutante, onde L – marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Promega); C – cDNA do minigene controle em triplicata, sendo 3 transfecções independentes; e P – cDNA do minigene mutante em triplicata, sendo 3 transfecções independentes. **B)** Gráfico mostrando a intensidade das bandas, tanto do controle quanto no mutante na presença da mutação c.278delG no *exon* 1 do gene *SRD5A2*.

Como já mencionado anteriormente, a presença de bandas referentes à variante de *splicing* no controle podem indicar que a células produzam uma menor quantidade da variante de *splicing*, além do transcrito selvagem. No entanto, somente a produção do transcrito mutante deve certamente ter como consequência um alelo deficiente na produção da enzima SRD5A2 (FAUSTINO e COOPER, 2003b).

Na avaliação do caso clínico do paciente aqui estudado, foi observado um fenótipo sugestivo da deficiência da enzima 5 α -redutase tipo 2, como a presença de genitália ambígua, micropênis e hipospádia (VEIGA-JUNIOR *et al.*, 2012). Além da alteração c.278DelG, foi encontrada também neste paciente a alteração p.G196S em heterozigose (THIGPEN *et al.*, 1992) (**Figura 31**), a qual demonstrou através de ensaios *in vitro*, onde a mutação foi inserida por mutagênese sítio-dirigida no cDNA previamente clonado, uma diminuição da afinidade da enzima pelo NADPH, e uma redução enzimática para 8% do normal (normal 69,2%), quando transfectada em células 293.

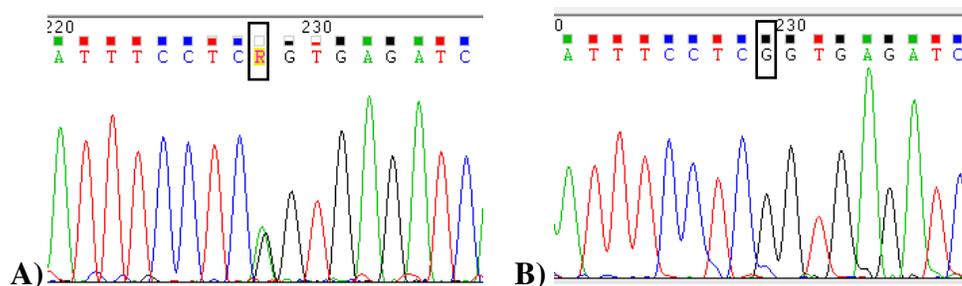


Figura 31: Partes dos eletroferogramas obtidos nos sequenciamentos do gene *SRD5A2*: **A)** sequência do *exon 4*, mostrando a alteração G>A (p.G196S), em heterozigose; **B)** sequência do *exon 4*, mostrando o nucleotídeo G normal.

Foi demonstrado por Russell e colaboradores (1994), que as substituições de aminoácidos que afetam o domínio de ligação ao hormônio testosterona estão localizadas nas extremidades da proteína 5 α -redutase tipo 2, entre os resíduos 21 e 34. A partir desta informação podemos sugerir que a diminuição de 38 nucleotídeos no *exon 1* (extremidade do gene *SRD5A2*) causada pela mutação c.278delG, certamente resulta na formação de um mRNA anormal com um códon de parada prematuro e, conseqüentemente de uma proteína aberrante, que apresentará dificuldades de se ligar a testosterona, impedindo a proteína 5 α -redutase tipo 2 de exercer sua função corretamente.

Portanto, o efeito causado pela mutação c.278DelG na proteína SRD5A2 é relativamente grave, contribuindo para a ambiguidade genital deste paciente.

2. ALTERAÇÃO c.548-44T>G GENE SRD5A2

2.1. Resultados

A troca nucleotídica c.548-44T>G foi previamente identificada pelo nosso grupo de pesquisa e localiza-se no *intron 3*, próxima à região doadora de *splicing*.

A figura abaixo mostra parte do eletroferograma dos clones inseridos no vetor pGEM-Teasy contendo a sequência normal (c.548-44T), e também a sequência mutante (c.548-44G) (**Figura 32**).

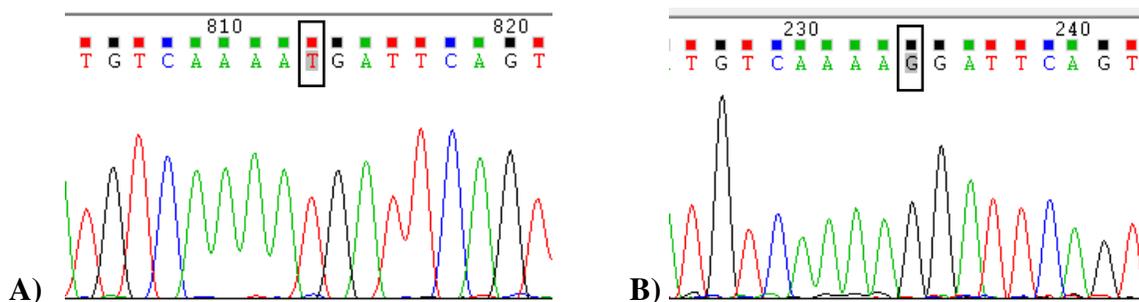


Figura 32: Partes dos eletroferogramas obtidos nos sequenciamentos dos clones inseridos no vetor pGEM-Teasy contendo o fragmento do gene *SRD5A2* correspondente à parte do *intron 3*: **A)** nucleotídeo T normal; **B)** nucleotídeo G mutante (c.548-44T>G).

Em seguida foram realizados testes *in silico* com ferramentas disponíveis para acesso livre, a fim de se avaliar os efeitos causados pela alteração c.548-44T>G no pré-RNA do gene *SRD5A2*.

Através do programa *FruitFly* foi observado que não houve mudança no reconhecimento da região nem como sítio de reconhecimento de *splicing* alternativo, nem com alteração nos *scores* entre as sequências normal e mutante (**Figura 33**), uma vez que a troca T>G se encontra relativamente distante da junção *exon/intron* (posição -44).

Normal	Acceptor site predictions for SRD5A2 :					
	Start	End	Score	Intron	Exon	
	15	55	0.72	caactccagaatgttctcc	gcaacaggctgtt	gttgcct
	55	95	0.43	ttgtttccocttctcccca	gaggattccaccaa	actccta
205	245	0.65	ttccgattctctgcaagc	ggtggctgttt	acgtatgtt	
Mutante	Acceptor site predictions for mut :					
	Start	End	Score	Intron	Exon	
	15	55	0.72	caactccagaatgttctcc	gcaacaggctgtt	gttgcct
	55	95	0.43	ttgtttccocttctcccca	gaggattccaccaa	actccta
205	245	0.65	ttccgattctctgcaagc	ggtggctgttt	acgtatgtt	

Figura 33: Análise dos sítios de *splicing* na região da alteração c.548-44T>G através do programa de predição *FruitFly Splice Site Prediction* (www.fruitfly.org/seq_tools). Não se observa diferenças entre normal e mutante.

A análise *in silico* da alteração c.548-44T>G através do programa *Human Splicing Finder* identificou dois possíveis sítios aceptores de *splicing* alternativos na região 3' do *intron* 3. No sítio denotado 171 na sequência normal a probabilidade de ser reconhecido como local de *splicing* era de 46,7%. No entanto, na sequência mutante essa probabilidade passou para 75,6% mostrando um aumento significativo mediante à qual o programa considerou que se criou um sítio alternativo de *splicing*. Já no sítio denominado 178, na sequência normal c.548-44T mostrava uma probabilidade de 74,7% de ser reconhecida, e na presença da alteração c.548-44G se reduziu para 72,7% (**Figura 34**).

Sequence Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	Variation (%)
171	Acceptor	taatgtcaaaatga	taatgtcaaaagGA	46.71	75.66	New site +61.97
178	Acceptor	aaaatgattcagtt	aaaaggattcagTT	74.72	72.79	-2.58

Figura 34: Análise das alterações na função de *splicing* da alteração c.548-44T>G através do programa de predição *Human Splicing Finder* (<http://www.umd.be/HSF/>).

Já a previsão *in silico* pelo programa *ESE Finder* 3.0 evidenciou que a alteração c.548-44T>G pode suprimir o reconhecimento de uma região próxima ao sítio de ramificação (A), como mostra a **Figura 35**.

Normal	Branch Site threshold: 0		
	Position*/Site/Score		
	179 (-457)	aaatgat	0.12600
	183 (-453)	gattcag	0.97520
	190 (-446)	ttgcaat	0.51260
Mutante	Branch Site threshold: 0		
	Position*/Site/Score		
	183 (-453)	gattcag	0.97520
	190 (-446)	ttgcaat	0.51260

Figura 35: Análise efetuada pelo programa *ESE Finder* 3.0 na ausência e na presença da mutação c.548-44T>G no gene *SRD5A2*. O retângulo vermelho denota o sítio perdido com a troca T>G (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese finder.cgi>).

Utilizando ainda as ferramentas do programa *ESE Finder* 3.0, foi possível avaliar se há diferença entre os tipos de proteínas da família SR, que se ligam tanto na sequência normal quanto mutante. Dessa forma, a análise de predição mostrou que na posição c.548-44T (sequência normal) não ocorre o reconhecimento de nenhuma da proteína da família SR, já na sequência alterada c.548+44G passa a ocorrer o reconhecimento pelas proteínas SRSF2 e SRSF5 (**Figura 36**).

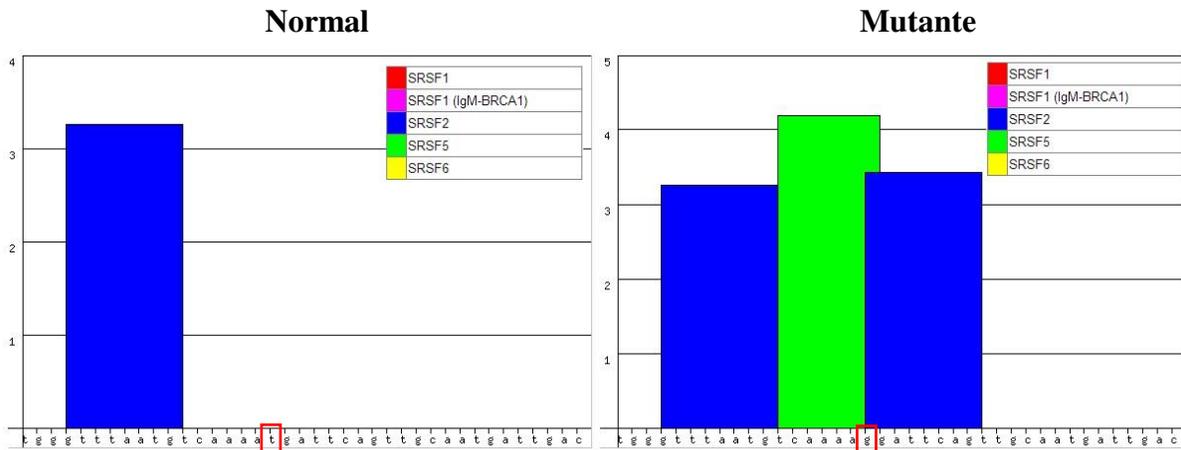


Figura 36: Previsão realizada pelo programa *ESE finder* 3.0 para as proteínas da família, na presença da sequência normal e mutante do gene *SRD5A2* - c.548-44T>G (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>).

O programa *SpliceAid* é utilizado para avaliar as proteínas envolvidas no processo de *splicing*. Assim foi possível verificar que na sequência normal apenas a proteína Sam68 se liga. Entretanto, quando ocorre a troca de T>G passam a se ligar as proteínas SF2, SRp40, SR30C e hnRNPC2 (**Figura 37**).

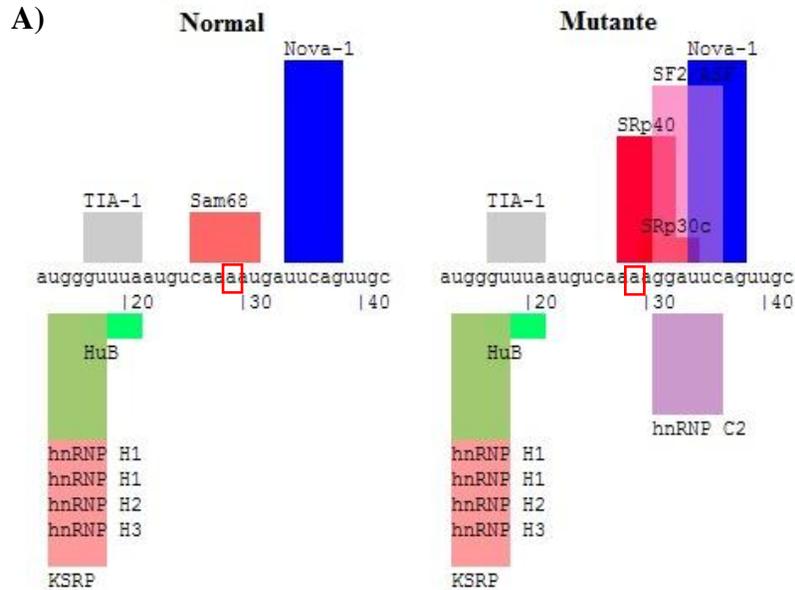


Figura 37: Análise do programa *SpliceAid* v. 2.0 (<http://www.introni.it/splicing.html>). A FIGURA mostra as diferentes proteínas que se ligam tanto na sequência normal quanto na mutante do gene *SRD5A2*.

A partir dos resultados dos estudos *in silico*, onde a maioria deles indicou que a alteração c.548-44T>G poderia alterar o mecanismo de *splicing* no gene *SRD5A2*, foi realizada uma estratégia de estudo baseada na construção de um minigene abrangendo um fragmento composto por parte do *intron 3*, o *exon 4* e parte do *intron 4* do gene *SRD5A2*. Este minigene foi inserido no vetor pcDNA3 modificado, entre o *exon 2* e 3 ($\alpha 2$ e $\alpha 3$) do gene *HBA1*, como mostra a **Figura 38**.

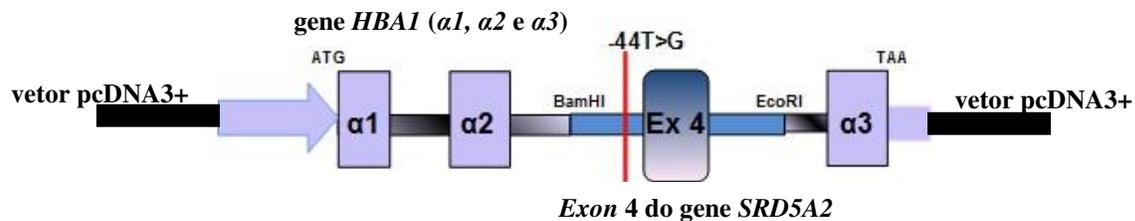


Figura 38: A figura mostra a estrutura do minigene construído para o estudo da mutação c.548-44T>G.

Após a transcrição em células HEK-293 dos minigenes contendo a sequência normal ou a sequência portadora da alteração, os transcritos foram extraídos e submetidos a técnica de RT-PCR para a síntese dos cDNAs. Foram posteriormente amplificados e sequenciados com *primers* específicos.

Através da visualização da corrida de gel de agarose dos produtos de amplificação dos cDNAs, tanto do minigene contendo o fragmento controle quanto mutante, foi possível observar a presença de três transcritos diferentes. A banda maior corresponde ao tamanho total do transcrito (369 pb), a banda do meio corresponde a um transcrito com 112 pb a menos no *exon 4* do gene *SRD5A2*, totalizando um transcrito de 257 pb, e também foi possível observar uma banda de tamanho menor correspondente ao tamanho de 217 pb, a qual mostrou o *skipping* do *exon 4* inteiro do gene *SRD5A2* (**Figura 39 e 40**).

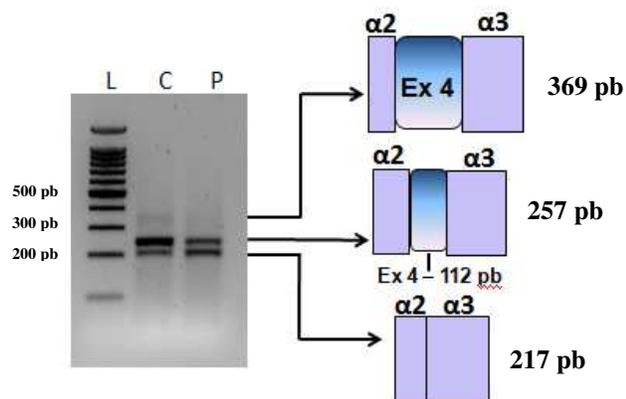


Figura 39: Mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose onde L é o marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Promega), C é o minigene controle, e P é o minigene contendo a mutação c.548-44T>G no gene *SRD5A2*. Ao lado, as representações esquemáticas dos transcritos finais tanto para o controle, quanto para os mutantes.

Assim, o produto do sequenciamento do minigene contendo a alteração c.548-44T>G evidenciou a sequência das três variantes de *splicing* produzidas: a sequência selvagem, a sequência onde o *exon 4* do gene *SRD5A2* possui 112 nucleotídeos a menos, e a terceira variante de *splicing* que mostrou a exclusão do *exon 4* inteiro (*exon skipping*) (**Figura 40**).

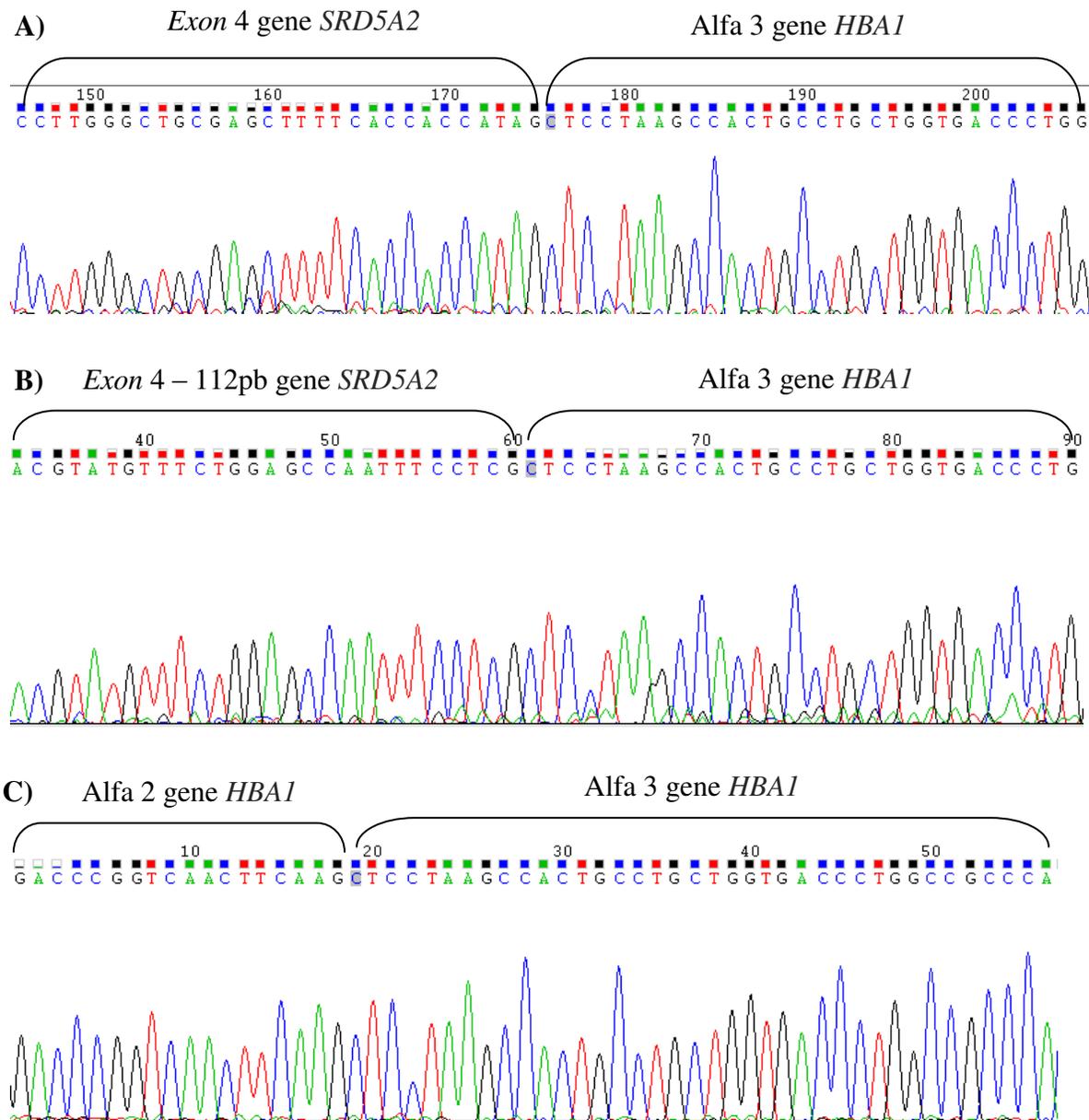


Figura 40: Parte do eletroferograma obtido no sequenciamento do cDNA do minigene contendo a sequência normal e mutante. **A)** Sequenciamento dos fragmentos *exon 4* do gene *SRD5A2* e *exon 3* do gene da alfa globulina (*HBA1*), evidenciando a junção *exon-exon*. Do lado esquerdo está *exon 4* do gene *SRD5A2* e do direito o *exon 3* do gene da alfa globulina. **B)** O sequenciamento mostra do lado esquerdo a exclusão de 112 nucleotídeos do *exon 4* do gene *SRD5A2* (*splicing* alternativo 5'), juntamente com o *exon 3* do gene da alfa globulina (*HBA1*), do lado direito da figura. **C)** Parte do sequenciamento dos *exons 2* e *3* do gene da alfa globulina (*HBA1*), onde é possível observar a junção *exon-exon*. Do lado

esquerdo está o *exon 2* do gene da alfa globulina (*HBA1*) e do direito o *exon 3* do gene da alfa globulina (*HBA1*).

Esses resultados sugerem que talvez o mesmo mecanismo possa ocorrer no gene *SRD5A2*, quando na presença da mutação c.548-44T>G como mostra a **Figura 41**.

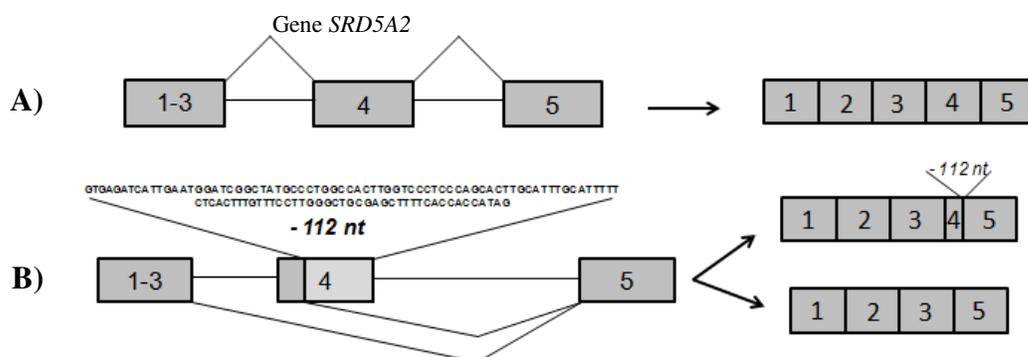


Figura 41: Em **A)** o esquema mostra o gene *SRD5A2* normal assim como o *splicing* correto deste gene. **B)** o esquema representa o *splicing* alternativo da região 5', onde ocorre a excisão de 112 nucleotídeos do *exon 4* do gene *SRD5A2*, e o *skipping* do *exon 4* inteiro no gene *SRD5A2*.

2.2. Discussão: c.548-44T>G gene *SRD5A2*

As resultados obtidos através dos *softwares* levaram-nos a propor algumas hipóteses sobre a regulação do *splicing* na região do *exon 4* do gene *SRD5A2*, e de como este é alterado na presença da mutação c.548-44T>G.

O resultado obtido através do programa *ESE Finder* mostrou que na posição -44 do *intron 3* do gene *SRD5A2* normal, não ocorre a ligação de nenhuma proteína. Entretanto quando na presença da mutação c.548-44T>G o programa prevê um local de ligação para as proteínas SRSF5 e SRSF6. Por outro lado, o software *SpliceAid* mostrou que na sequência normal somente a proteína Sam68 se liga, a qual está envolvida na sinalização celular, regulação da transcrição e no processo de *splicing* de pré-mRNA (GALARNEAU & RICHARD, 2009; ELLIOTT e RAJAN, 2010). Quando ocorre a troca da T para uma G na posição -44, o programa *SpliceAid* prevê a ligação das proteínas hnRNPC2, SRp30C, SRp40 e ASF/SF2.

Estes achados sugerem que na sequência normal este sítio não é utilizado por proteínas ativadoras ou repressoras de *splicing*. No entanto, a mutação c.548-44T>G parece propiciar um local para ligação de proteínas ativadoras de *splicing*, como por exemplo ASF/SF2, SRp40, SRSF5 e SRSF6 (BUSCH e HERTEL, 2012; ERKELENZ *et al.*, 2013).

As análises obtidas através da eletroforese em gel de agarose, contendo amostras da PCR do cDNA do minigene normal e mutante para a mutação c.548-44T>G, mostraram que ocorreu a produção de três transcritos tanto na sequência normal quanto mutante. E por meio do sequenciamento automático, foi possível verificar a presença do transcrito selvagem, um segundo transcrito que apresentou 112 nucleotídeos a menos na região 3' do *exon 4* e ainda, um terceiro transcrito mostrando o *skipping* completo do *exon 4*.

Embora o controle e o minigene mutante tenham demonstrado similaridade em relação aos transcritos produzidos, a intensidade das bandas no gel de agarose é visivelmente diferente. Diante disso, foi realizada uma análise utilizando o software de livre acesso *ImageJ* (<http://ImageJ.nih.gov/ij/>), para quantificar a intensidade das bandas obtidas através da PCR do cDNA em triplicata (**Figura 42**).

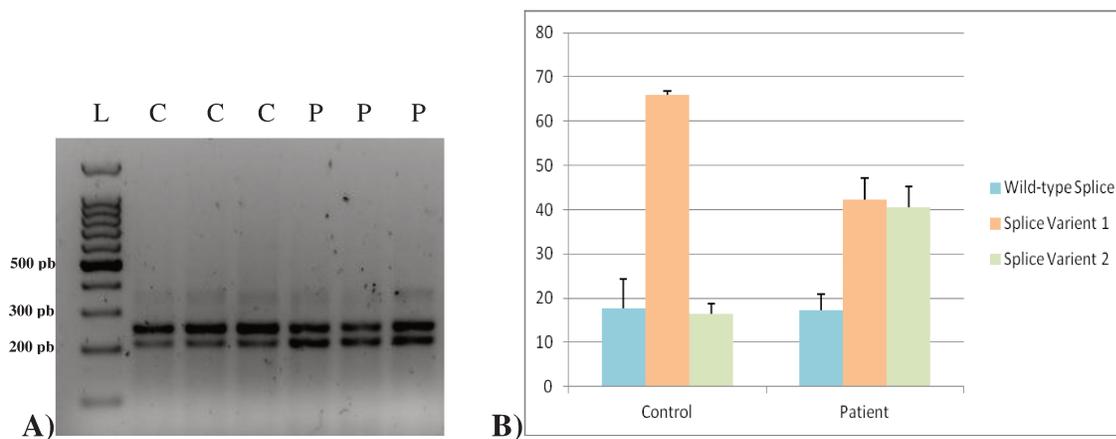


Figura 42: A) Gel de agarose mostrando os resultados das PCRs usando os cDNAs controle e mutante como moldes, onde L – marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Promega, Estados Unidos); C – cDNA do minigene controle em triplicata, sendo 3 transfecções independentes; e P – cDNA do minigene mutante em triplicata, sendo 3 transfecções independentes. B) Gráfico mostra a intensidade das bandas, tanto do controle quanto no mutante na presença da mutação c.548-44T>G no *intron 3* do gene *SRD5A2* obtida pela análise com o *software ImageJ*.

Embora os resultados aqui revelados tenham demonstrado que tanto o minigene controle quanto mutante produziram os mesmos transcritos, através da quantificação da intensidade das bandas mostradas no gráfico gerado pelo programa *ImageJ*, vê-se que estes transcritos estão sendo produzidos em quantidades diferentes no normal e mutante.

É importante lembrar que para que ocorra um correto mecanismo de *splicing*, é necessária a expressão de todos os padrões de *splicing* alternativo, assim como à quantidade em que estes são produzidos. Mutações que perturbam o balanço apropriado dos transcritos produzidos em estágios específicos de desenvolvimento celular podem ser a causa direta de doença (FAUSTINO e COOPER, 2003b; LEWANDOWSKA, 2013).

Na avaliação clínica do paciente portador da alteração c.548-44T>G encontrada em heterozigose no gene *SRD5A2* (CALAIS, 2010), foi observada a presença de gônadas bilaterais palpáveis e genitália masculinizada. É importante ressaltar que o padrão de herança para esta deficiência é autossômico recessivo, e nenhuma outra mutação foi identificada neste paciente.

Sendo assim, mesmo que esta alteração tenha sido encontrada em heterozigose, o efeito causado na proteína possivelmente simule um efeito dominante, e conseqüentemente, um efeito de dose talvez esteja contribuindo para a ambiguidade genital deste paciente. Além disso, não se deve descartar a ideia de que este paciente possa ser portador de alterações em outros genes que participam do processo de masculinização, exercendo um efeito sinérgico na ação androgênica (HACKEL *et al.*, 2005).

Esse achado corrobora o estudo realizado por Hackel e colaboradores (2004), onde foi demonstrado três pacientes com quadro clínico hormonal da deficiência da enzima 5 α -redutase tipo 2, que apresentaram somente um alelo mutante para este gene. Este fato permite supor a existência de mutações em sequências intrônicas ou em região promotora não identificadas, ou ainda que fenômenos epigenéticos (tais como metilação da região promotora) podem bloquear a transcrição do alelo normal também devem ser considerados para estes casos (HACKEL *et al.*, 2005).

Portanto, uma vez que os ensaios de minigene aqui apresentados evidenciaram apenas uma diferença na quantidade da produção dos três transcritos gerados pela célula, podemos propor que a alteração c.548-44T>G talvez esteja contribuindo para o fenótipo

não tão expressivo dentro do quadro característico da deficiência da enzima 5 α -redutase tipo 2.

3. CONSIDERAÇÕES SOBRE O GENE SRD5A2

A deficiência da enzima 5 α -redutase tipo 2 é uma doença bastante rara, na qual os portadores podem ser homozigotos ou heterozigotos composto para mutações (THIPGEN *et al.*, 1992).

Mais de 60 mutações no gene *SRD5A2* já foram descritas, distribuídas em mais de 25 grupos étnicos. Em sua maioria compreendem mutações de ponto do tipo *missense* ou *nonsense* e, mais raramente, mutações *frameshift* (que alteram a fase de leitura), sendo poucas as mutações que afetam o mecanismo de *splicing*, porém nenhuma com experimentos comprobatórios de seus efeitos na formação de transcritos (FERNANDEZ-CANCIO *et al.*, 2004; CHAN, 2013; NIE *et al.*, 2011).

Até o momento, somente três mutações em região de *splicing* foram descritas para este gene: c.699+1G>T encontrada no *intron* 4 (THIPGEN *et al.*, 1992), c.278+2A>G (OCAL *et al.*, 2002) e c.547+1G>A, no *intron* 3 (HACKEL *et al.*, 2005). Esses achados contribuíram com a hipótese de que o processamento do mRNA pode ser alterado, o que levaria à produção de uma proteína anômala, devido a uma provável retenção do *intron*, ou por ocorrer *splicing* alternativo.

Sendo uma doença autossômica recessiva, grande parte dos casos pertence a famílias geográficas ou socialmente isoladas e endocruzadas como as da República Dominicana, da Turquia e da Nova Guiné (CAI *et al.*, 1996; MACIEL-GUERRA e GUERRA-JÚNIOR, 2002).

A frequência elevada de heterozigotos compostos em estudos realizados na população brasileira sugere que a frequência de portadores na população em geral pode ser alta, o que explicaria a recorrência de determinadas mutações em afetados não consanguíneos. Por outro lado, a recorrência de mutações idênticas em diferentes grupos étnicos e de regiões geográficas distintas no Brasil tem sugerido a existência de regiões *hot spots* no gene; em outros casos, mutações similares dentro do mesmo grupo étnico seriam derivadas de mutações presentes em ancestrais comuns (THIPGEN *et al.*, 1992; MAZEN *et al.*, 2003).

Considerando-se a história da colonização do Brasil, constata-se um forte componente negróide na sua população, fruto do período da escravidão. Esses dados permitem supor que algumas alterações descritas no gene *SRD5A2* surgiram em um grupo étnico ancestral (negros africanos, por exemplo) e distribuiu-se nas Américas às custas dos movimentos migratórios (HACKEL *et al.*, 2005).

No entanto, ainda devido à variabilidade fenotípica e hormonal exibida pelos pacientes com deficiência de 5 α -redutase tipo 2, os resultados encontrados salientam a importância da investigação molecular para o diagnóstico dessa doença (CHAN *et al.*, 2013; HACKEL *et al.*, 2005).

A identificação de mutações no gene *SRD5A2* tem contribuído não somente para confirmação dessas deficiências, mas também para auxiliar no aconselhamento genético dos familiares dos afetados e também, para um melhor entendimento das bases moleculares.

4. ALTERAÇÃO c.277+2T>G GENE *HSD17B3*

4.1. Resultados

A troca nucleotídica c.277+2T>G no gene *HSD17B3* foi previamente identificada pelo nosso grupo de pesquisa (CASTRO *et al.*, 2012). A mutação c.277+2T>G localiza-se no *intron* 3, na região doadora de *splicing* deste gene.

A **Figura 43** abaixo mostra parte dos eletroferogramas dos clones com o vetor pGEM-Teasy contendo as sequências normal (c.277+2T) e mutante (c.277+2G).

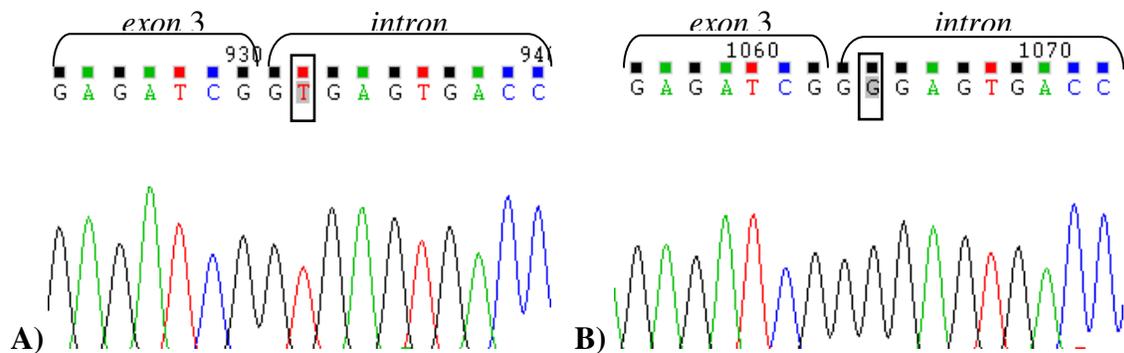


Figura 43: Partes dos eletroferogramas obtidos nos sequenciamentos dos com o vetor pGEM-Teasy contendo o minigene para o estudo da mutação c.277+2T>G no gene *HSD17B3*. **A)** sequência da junção do *exon 3* – *intron 3*, mostrando o nucleotídeo T normal; **B)** sequência do da junção do *exon 3* – *intron 3*, mostrando o nucleotídeo G mutante.

Em seguida foram realizados testes *in silico* com ferramentas disponíveis para acesso livre, a fim de se avaliar os efeitos causados pela alteração c.277+2T>G no pré-RNA do gene *HSD17B3*.

A análise de predição *in silico* pelo programa *FruitFly* mostrou que na sequência normal a probabilidade do sítio 247-261 ser reconhecido como sítio doador de *splicing* é de 99%, como mostrado na **Figura 44**, já para o alelo mutante verificou-se que este sítio é totalmente suprimido.

Normal	<p>Donor site predictions for HSD17B3 :</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Start</th> <th>End</th> <th>Score</th> <th>Exon</th> <th>Intron</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>52</td> <td>66</td> <td>0.82</td> <td>a</td> <td>aaccaggtgaagca</td> </tr> <tr> <td>77</td> <td>91</td> <td>0.53</td> <td>c</td> <td>cctgccagtatgtgc</td> </tr> <tr style="border: 2px solid red;"> <td>247</td> <td>261</td> <td>0.99</td> <td>g</td> <td>gagatcggtagtga</td> </tr> </tbody> </table>	Start	End	Score	Exon	Intron	52	66	0.82	a	aaccaggtgaagca	77	91	0.53	c	cctgccagtatgtgc	247	261	0.99	g	gagatcggtagtga
Start	End	Score	Exon	Intron																	
52	66	0.82	a	aaccaggtgaagca																	
77	91	0.53	c	cctgccagtatgtgc																	
247	261	0.99	g	gagatcggtagtga																	
Mutante	<p>Donor site predictions for mut :</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Start</th> <th>End</th> <th>Score</th> <th>Exon</th> <th>Intron</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>52</td> <td>66</td> <td>0.82</td> <td>a</td> <td>aaccaggtgaagca</td> </tr> <tr> <td>77</td> <td>91</td> <td>0.53</td> <td>c</td> <td>cctgccagtatgtgc</td> </tr> <tr style="border: 2px solid red;"> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Start	End	Score	Exon	Intron	52	66	0.82	a	aaccaggtgaagca	77	91	0.53	c	cctgccagtatgtgc					
Start	End	Score	Exon	Intron																	
52	66	0.82	a	aaccaggtgaagca																	
77	91	0.53	c	cctgccagtatgtgc																	

Figura 44: Análise da alteração na função de *splicing* provocadas pela alteração c.277+2T>G através do programa de predição de sítio de *FruitFly Splice Site Prediction* (www.fruitfly.org/seq_tools) O sítio 247-261 abolido está denotado no retângulo vermelho.

A análise *in silico* da alteração c.277+2T>G através do programa *Human Splicing Finder* mostrou que na sequência normal c.277+2T a probabilidade do sítio ser reconhecido é de 92,11%, mas na presença da alteração c.277+2G existe uma redução para 65,2% (**Figura 45**).

Sequence Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	Variation (%)
251	Donor	tcggtgagt	TCGgggagt	92.11	65.27	-29.13

Figura 45: Análise das alterações na função de *splicing* da alteração c.277+2T>G através do programa de predição *Human Splicing Finder* (<http://www.umd.be/HSF/>).

Já a previsão *in silico* pelo programa *ESE Finder 3.0* mostrou que o sítio denotado como 239, referente à sequência normal, apresentou um *score* de 9,6% de funcionar como doador de *splicing*, valores estes relativamente elevados tendo em vista que o *score* de referência ideal deste programa é 6,67. Porém, quando se faz a simulação com a sequência mutada esse sítio é completamente abolido, como mostra a **Figura 46**.

Normal	5SS_U2_human threshold: 6.67	
	Position*/Site/Score	
	44 (-466)	cacacttaaaccaggtgaagcaaccatgt 8.35330
	239 (-271)	TTGCCACAGAGATCGgtgagtgaacccccca 9.68640
Mutante	5SS_U2_human threshold: 6.67	
	Position*/Site/Score	
	44 (-466)	cacacttaaaccaggtgaagcaaccatgt 8.35330

Figura 46: Análise efetuada pelo programa *ESE Finder 3.0* na presença da mutação c.277+2T>G no gene *HSD17B3*. O retângulo vermelho denota o sítio perdido com a troca T>G (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/>).

Utilizando as ferramentas adicionais do programa *ESE Finder 3.0*, foi possível comparar os tipos de proteínas da família SR que se ligam tanto na sequência normal quanto na mutante. Dessa maneira, a análise de predição mostrou que a substituição nucleotídica c.277+2T>G elimina um local putativo de ligação com a proteína SRSF2 (**Figura 47**).

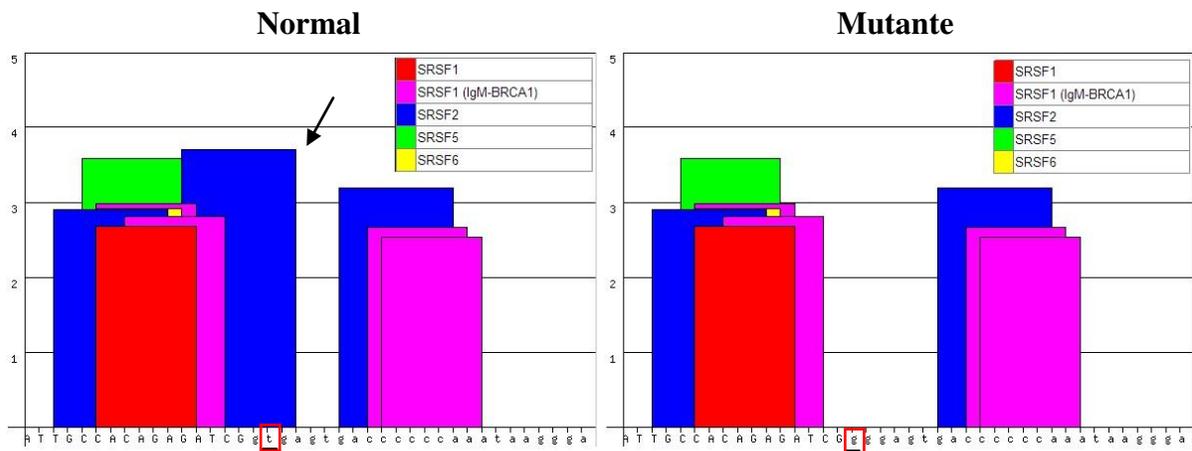


Figura 47: Simulação realizada pelo programa *ESE finder 3.0* para as proteínas da família SR, na presença da sequência normal e mutante do gene *HSD17B3* - c.277+2T>G (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>).

O programa *SpliceAid* também foi utilizado para avaliar as proteínas envolvidas no processo de *splicing*, tanto na sequência normal quanto mutante. Segundo o programa foi possível verificar que as proteínas SRp30C, H1, H2 e hnRNP se ligaram na sequência normal da junção *exon2-intron2* do gene *HSD17B3*. Contudo, na presença da mutação c.277+2T>G, diferentes tipos de proteínas passam a se ligar - SRp40, hnRNPF1, hnRNPH2 e hnRNPH3 (**Figura 48**).

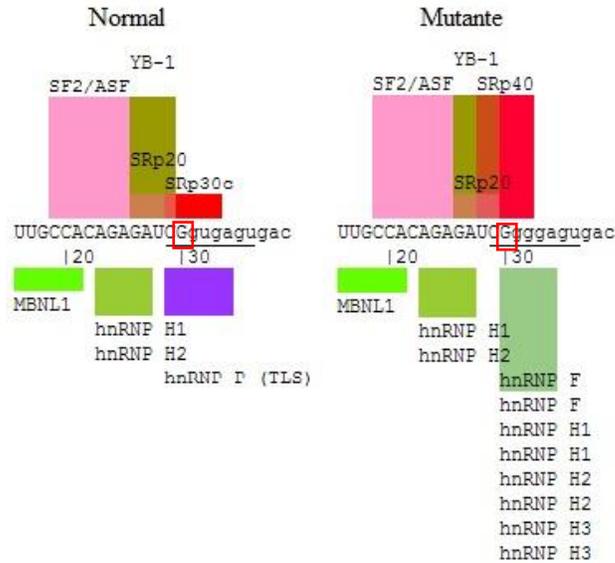


Figura 48: Análise do programa *SlipAid* (<http://www.introni.it/splicing.html>); A) mostra a diferentes proteínas que se ligam tanto na sequência normal quanto na sequência mutante do gene *HSD17B3*.

A partir dos resultados dos estudos *in silico*, os quais indicaram que a alteração c.277+2T>G poderia alterar o mecanismo de *splicing* no gene *HSD17B3*, foi realizada uma estratégia de estudo para a construção de um minigene abrangendo um fragmento composto por parte do *intron 2*, o *exon 3* e parte do *intron 3* do gene *HSD17B3*. Este minigene foi inserido entre os *exons 2* e *3* ($\alpha 2$ e $\alpha 3$) do gene *HBA1* no vetor pcDNA3+ modificado, como mostra a **Figura 49**.

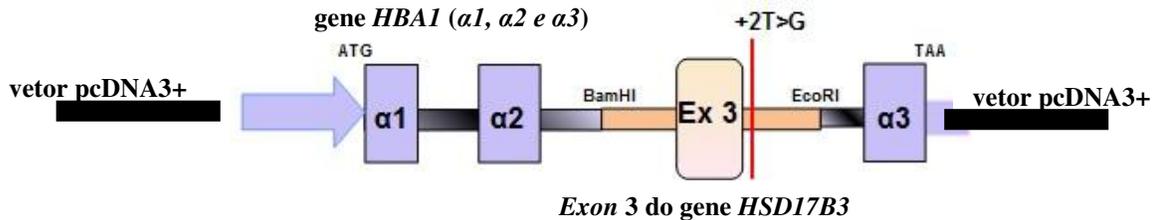


Figura 49: A figura mostra o esquema da construção de um minigene para estudo da mutação c.277+2T>G.

Após a transformação em células HEK-293 e transcrição dos minigenes contendo a sequência normal ou a sequência portadora da alteração, os transcritos extraídos das células

foram sintetizados em cDNA através da técnica de RT-PCR e, posteriormente, sequenciados com *primers* específicos.

Através da visualização da corrida de gel de agarose contendo os transcritos produzidos por RT-PCR, foi possível observar que o minigene contendo o fragmento mutante (c.277+2T>G) produziu um transcrito com 217 pb, tamanho que se refere a exclusão do *exon 3* inteiro do gene *HSD17B3* (variante de *splicing*). Já o minigene controle (banda maior) mostrou um tamanho de banda esperado para o controle, a qual corresponde ao tamanho de 293 pb (**Figura 50 e 51**).

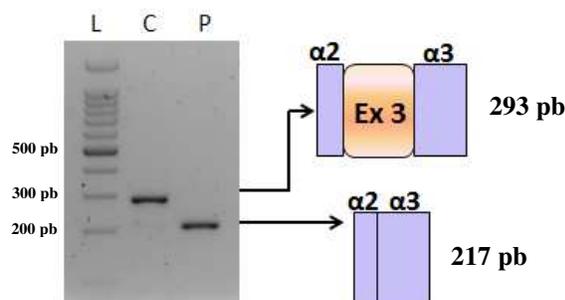


Figura 50: Mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose onde L é o marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Promega), C é o minigene controle, e P é o minigene contendo a mutação c.277+2T>G no gene *HSD17B3*, e também a representação esquemática do minigene final tanto para o controle, quanto para o mutante.

Assim, o produto do sequenciamento do minigene contendo a alteração c.277+2T>G evidenciou a exclusão do *exon 3* inteiro (*exon skipping*) durante o processamento do pré-mRNA (**Figura 51**). Portanto, devido à troca de T para G, na posição +2 do *intron 3* do sítio doador de *splicing*, não ocorreu o reconhecimento da região pelo spliceossomo, e conseqüentemente a produção de um transcrito anômalo ou nulo.

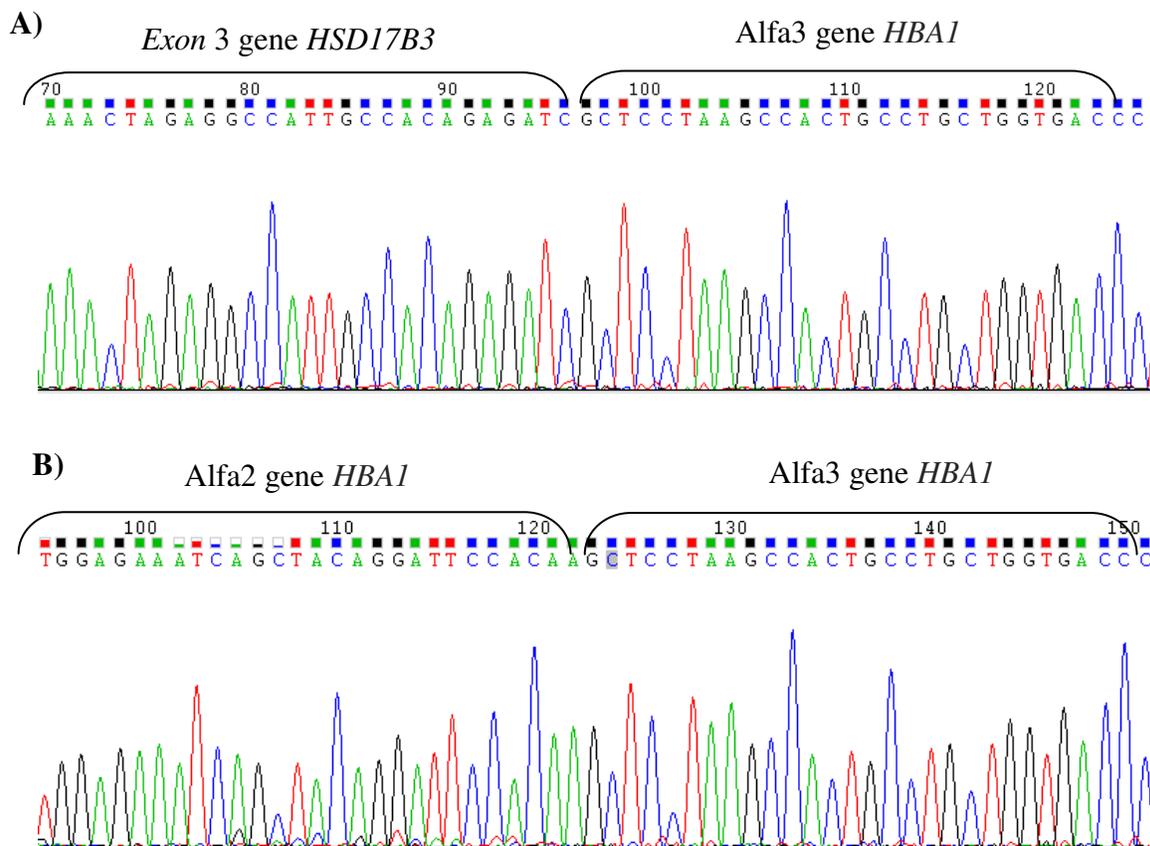


Figura 51: Parte do eletroferograma obtido no sequenciamento do cDNA do minigene contendo a sequência normal e mutante. **A)** Sequenciamento dos fragmentos *exon 3* do gene *HSD17B3* e *exon 3* do gene da alfa globulina (*HBA1*), evidenciando a junção *exon-exon*. Do lado esquerdo está *exon 3* do gene *HSD17B3* e, do direito o *exon 3* do gene da alfa globulina. **B)** Sequenciamento dos fragmentos *exon 2* do gene da alfa globulina (*HBA1*) e *exon 3* do gene da alfa globulina (*HBA1*), onde é possível observar o *skipping* do *exon 3* do gene *HSD17B3*. Do lado esquerdo está o *exon 2* do gene da alfa globulina (*HBA1*) e do direito o *exon 3* do gene da alfa globulina (*HBA1*).

Esses resultados sugerem que talvez o mesmo mecanismo possa ocorrer no gene *HSD17B*, quando na presença da mutação c.277+2T>G como mostra a **Figura 52**.

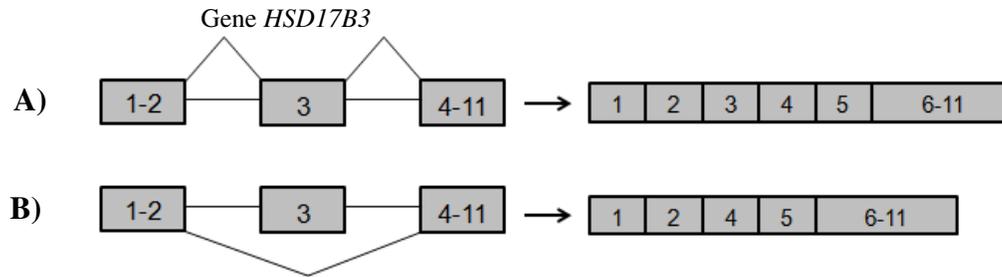


Figura 52: Em A) o esquema mostra o gene *HSD17B3* normal assim como o *splicing* correto deste gene. B) o esquema representa o *skipping* do *exon 3* do gene *HSD17B3*.

4.2. Discussão: Alteração c.277+2T>G gene *HSD17B3*

Os resultados obtidos através dos *softwares* levaram-nos a propor algumas hipóteses explicativas sobre a regulação do *splicing* na região do *exon 3* do gene *HSD17B3*, e de como este é alterado na presença da mutação c.277+2T>G.

Os três programas que se baseiam em comparação de sequências conservadas indicaram que o sítio doador normal de *splicing* do *intron 3* seria abolido (*FruitFly Splice Site Prediction*, *Human Splicing Finder*, *ESE Finder*). Além disso, o resultado obtido pelo *Human Splicing Finder* sugere que possivelmente um sítio localizado cinco nucleotídeos adiante pudesse ser usado como sítio doador alternativo. As análises dos programas *ESE Finder* e *SpliceAid* mostraram que as proteínas pertencentes a família SR se ligam na sequência normal, já quando na presença do nucleotídeo alterado (T>G), ocorre a eliminação do local de ligação para tais proteínas. O programa *SpliceAid* ainda indicou a criação de um local de ligação para várias proteínas hnRNPs na sequência com a mutação.

Esses achados sugerem que haja realmente um impedimento para o processo ocorrer neste local uma vez que as proteínas SR estão envolvidas na ativação do local de *splicing*, e que as proteínas hnRNPs implicam na repressão de sítios de *splicing*.

A utilização de sítios normais de *splicing* parece depender da interação de várias proteínas (quer ativadoras, quer silenciadoras), da sua ligação a determinadas sequências de pré-mRNA e também da sua interação com os elementos da maquinaria do spliceossomo (HULL e DLAMINI, 2014; KLERK et al., 2014).

As proteínas SR desempenham um papel importante tanto no processo de *splicing* constitutivo do pré-mRNA, como na regulação do *splicing* alternativo, através do

reconhecimento de elementos *cis-acting*, influenciando a escolha dos locais de *splicing*, através da interação com as subunidades U2AF e U1 snRNP, e por isso estão envolvidas na ativação das primeiras etapas do reconhecimento de sequências exônicas pelo spliceossomo (BUSCH e HERTEL, 2012; HULL e DLAMINI, 2014; MANLEY e TACKE, 1996).

Quando as proteínas SR não são capazes de reconhecer um local de ligação específico nos casos onde este se encontra modificado, alterações no *splicing* podem vir a ocorrer (STICKELER *et al.*, 2001). Portanto, é provável que a presença da mutação c.277+2T>G, crie um sítio favorável para ligação de proteínas silenciadoras de *splicing*, forçando a maquinaria do spliceossomo a reconhecer outro sítio doador de *splicing*.

Uma análise realizada com cerca de 50 substituições nucleotídicas associadas ao fenômeno “*exon skipping*” em genes humanos revelou que mais de 50% destas mutações anulava pelo menos um sítio alvo para as proteínas da família SR. Logo, qualquer alteração que modifique uma das funções das proteínas SR poderá estar associada ao aparecimento de doença (CARTEGNI, CHEW e KRAINER, 2002).

No caso da mutação c.277+2T>G observamos que o *exon 3* do gene *HSD17B3* inserido no minigene híbrido foi eliminado do transcrito mediante a mutação e que o provável sítio alternativo indicado na análise *in silico* não foi reconhecido pelo spliceossomo para a formação do transcrito maduro.

Em relação aos resultados obtidos através da PCR do cDNA, foi observado que a amostra contendo o minigene mutante não exibiu o tamanho da banda referente ao minigene selvagem (controle), foi observada somente a banda que se refere à variante com o *skipping* do *exon 3* do gene *HSD17B3*. Entretanto, observa-se que o minigene controle apresenta uma banda de menor intensidade do tamanho correspondente a do *exon skipping* além da pertinente ao tipo selvagem. Diante disso, foi realizada uma análise utilizando o software de livre acesso *ImageJ* (<http://ImageJ.nih.gov/ij/>), para quantificar a intensidade das bandas obtidas através da RT-PCR em triplicata (**Figura 53**).

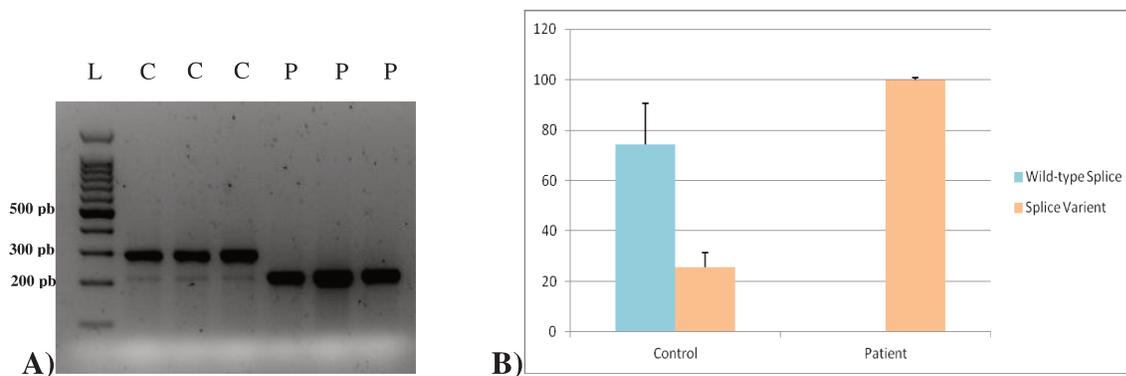


Figura 53: A) O gel de agarose mostra o resultado da PCR do cDNA, onde L – marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Promega); C - minigene controle em triplicata, sendo 3 transfecções independentes e P - minigene mutante em triplicata, sendo 3 transfecções independentes B) Gráfico mostra a intensidade das bandas no gel, tanto no minigene controle quanto no mutante contendo a mutação c.277+2T>G do gene *HSD17B3*.

Uma das hipóteses que podem ser consideradas é que a presença de uma variante de *splicing* no controle indica que esta pode ser expressa naturalmente na célula, e que talvez possa influenciar na regulação do transcrito selvagem. De qualquer forma, caso esta hipótese seja verdadeira, a presença da mutação c.277+2T>G causa uma alteração no equilíbrio natural do *splicing*, produzindo desta forma somente um dos padrões de *splicing*, o que certamente resultará em doença (FAUSTINO e COOPER, 2003b).

A segunda hipótese está relacionada com a escolha do modelo de construção de minigene. Como explanado no item Metodologia, foi utilizado para este experimento o vetor pcDNA3+ contendo o gene *HBA1*, o qual possui sítios de *splicing* 5' e 3' considerados bastante “fortes”, se mostrando muito eficiente para o reconhecimento da maquinaria do spliceossomo. Dessa maneira, o minigene controle pode produzir os dois transcritos por possuir em sua sequência um *exon* inserido cujo sítio doador de *splicing* não seja tão “forte” quanto os dos *exons* do gene *HBA1*, assim observa-se a produção de ambos transcritos.

A mutação c.277+2T>G foi identificada em heterozigose composta, juntamente com a mutação c.277+4A>T herdadas da mãe e do pai, respectivamente (Castro *et al.*, 2012). A mutação c.277+4A>T não foi incluída no presente estudo porque Boehmer e colaboradores

a descreveram em 1999 e a partir da extração do RNA de tecido testicular demonstraram que leva à perturbação do *splicing* neste gene, produzindo um transcrito não funcional.

Os resultados obtidos neste estudo para a mutação c.277+2T>G encontrada em heterozigose composta, juntamente com a alteração c.277+4A>T (BOEHMER *et al.*, 1999), comprovam a deficiência da enzima 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 3 como causa do fenótipo da paciente (CASTRO *et al.*, 2012), a qual na puberdade apresentava sinais de hiperandrogenismo, tais como engrossamento da voz, acne e hirsutismo.

5. CONSIDERAÇÕES SOBRE O GENE *HSD17B3*

Até o momento cerca de 30 mutações foram descritas para o gene *HSD17B3*, e entre estas apenas quatro foram descritas como causadoras de um *splicing* aberrante para este gene (NEOCLEOUS *et al.*, 2012; MASSANYI *et al.*, 2013; RHOUMA, BEN *et al.*, 2013; Fonte HGMD <http://www.hgmd.cf.ac.uk>).

As mutações que alteram o mecanismo de *splicing* do gene *HSD17B3* foram descritas pela primeira vez em 1994, por Geissler e colaboradores. A primeira mutação descrita foi a c.325-1G>C, localizada no sítio acceptor de *splicing* do *intron 3*, e leva a um *splicing* aberrante. A segunda mutação c.655-1G>A também descrita por Geissler e colaboradores (1994), localizada no *intron 8*, a qual altera o mecanismo de *splicing* na região 5'. Ambas mutações foram encontradas em pacientes que apresentavam baixa produção de testosterona e fenótipo característico da deficiência da enzima 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 3 (WAYNE M GEISLER *et al.*, 1994)

Outro estudo que identificou alterações na região de *splicing* do gene *HSD17B3* foi desenvolvido por Boehmer e colaboradores (1999), onde foram realizados estudos funcionais a partir da extração do RNA dos tecidos dos pacientes que apresentavam as mutações c.277+4A>T e c.655-1G>A. A primeira mutação c.277+4A>T demonstrou produzir transcritos não funcionais, devido ao *skipping* do *exon 3* inteiro do gene *HSD17B3*. Já o resultado da RT-PCR com a mutação c.655-1G>A, apresentou dois transcritos diferentes, um contendo a excisão do *exon 9*, e o um outro transcrito de tamanho menor que mostrou o *skipping* do *exon 9* e 10 deste gene, assim como a presença do transcrito selvagem em pequenas quantidades na amostra do paciente.

Os resultados obtidos neste estudo realizado por Boehmer e colaboradores (1999), sugerem que a presença do transcrito selvagem no RNA proveniente do tecido testicular do

paciente portador da mutação c.655-1G>A pode estar relacionado com a variação fenotípica da doença dependendo da quantidade do transcrito tipo selvagem que é produzida, o que leva a deduzir que nenhum fenótipo específico está associado com uma mutação específica (BOEHMER *et al.*, 1999).

Dessa forma, pode-se sugerir que a presença de andrógenos em tecidos periféricos ou até mesmo nos testículos pode ser proveniente da ação de outras isoenzimas pertencentes à família das enzimas 17BHSB, as quais podem atuar na conversão da testosterona, o que causa a variação fenotípica da deficiência da 17β-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 3 (BOEHMER *et al.*, 1999; CASTRO *et al.*, 2012; CHUANG *et al.*, 2013).

6. ALTERAÇÃO c.939+5G>A GENE CYP21A2

6.1. Resultados

A alteração c.939+5G>A, identificada pelo nosso grupo de pesquisa em heterozigose, é caracterizada pela troca de uma guanina por uma adenina na posição +5 do *intron 7* do gene *CYP21A2*.

A figura abaixo mostra parte dos eletroferogramas dos clones com o vetor pGEM-Teasy contendo a sequência normal (c.939+5G), e também a sequência mutante (c.939+5A) (Figura 54).

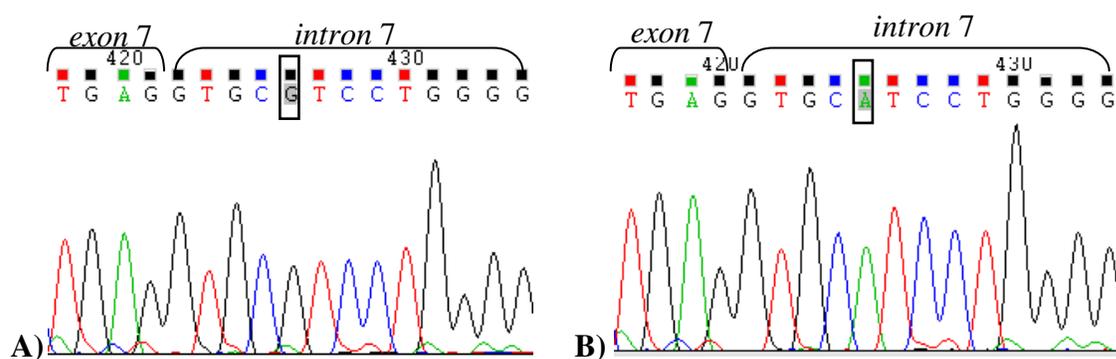


Figura 54: Partes dos eletroferogramas obtidos nos sequenciamentos do clone com o vetor pGEM-Teasy do gene *CYP21A2*: **A)** sequência da junção do *exon 7* – *intron 7*, mostrando o nucleotídeo G normal; **B)** sequência do da junção do *exon 7* – *intron 7*, mostrando o nucleotídeo A mutante.

Uma vez que esta mutação se localiza na região doadora de *splicing*, análises *in silico* foram realizadas a fim de ter uma indicação se a mutação c.939+5G>A pode prejudicar a transcrição do mRNA do gene *CYP21A2*.

Assim, foi observado que a probabilidade de reconhecimento do sítio normal é de 99%, porém quando se faz a troca de guanina para adenina na posição 939 do cDNA há uma redução considerável para uma probabilidade de 58% do sítio ser reconhecido (**Figura 55**). Esta indicação estimulou o início da investigação dos efeitos desta alteração no processamento do RNA.

Normal	Donor site predictions for CYP21A2 :				
	Start	End	Score	Exon	Intron
	364	378	0.99	ccctgagG	tgcgtcc
	743	757	0.85	ccagcagG	tgactcc
Mutante	Donor site predictions for mut :				
	Start	End	Score	Exon	Intron
	364	378	0.58	ccctgagG	tgcaccc
	743	757	0.85	ccagcagG	tgactcc

Figura 55: Análise das alterações na função de *splicing* da alteração c.939+5G>A através do programa de predição *FruitFly Splice site Prediction* (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

A predição *in silico* da alteração c.939+5G>A através do programa de livre acesso *Human Splicing Finder* mostrou que na sequência normal c.939+5G a probabilidade do sítio ser reconhecido é de 88,28%, porém na presença da alteração c.939+5A há uma redução para 76,11% do sítio ser reconhecido pelo spliceossomo (**Figura 56**).

Sequence Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	Variation (%)
368	Donor	gaggtgcgt	GAGgtgcat	88.28	76.11	-13.78

Figura 56: Análise das alterações na função de *splicing* da alteração c.939+5G>A através do programa de predição *Human Splicing Finder* (<http://www.umd.be/HSF>).

No entanto, a previsão *in silico* pelo programa *ESE Finder* 3.0 mostrou que o sítio denotado como 187, referente à sequência normal, apresenta um *score* de 9,4% de ocorrer um correto processo de *splicing*. Porém, quando a sequência é mutada (G>A), esse sítio é totalmente suprimido (**Figura 57**).

Normal		5SS_U2_human threshold: 6.67	
		Position*/Site/Score	
187 (-475)	CTTCACCACCCTGAGgtg	cgtcctggggac	9.44420
239 (-423)	aacctggccagggcggtgggcaccctcact		7.52320
504 (-158)	GCCACCATCGCCGAGGTGCTGCGCCTGCGG		6.77030
Mutante		5SS_U2_human threshold: 6.67	
		Position*/Site/Score	
239 (-423)	aacctggccagggcggtgggcaccctcact		7.52320
504 (-158)	GCCACCATCGCCGAGGTGCTGCGCCTGCGG		6.77030

Figura 57: Análise efetuada pelo programa *ESE Finder* 3.0 na ausência e na presença da mutação c.939+5G>A no gene *CYP21A2* (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3>).

Com o programa *ESE Finder* 3.0 também é possível fazer a predição em relação à diferença entre os tipos de proteínas da família SR. Esta análise mostrou que na posição c.939+5G, a proteína SRSF6 se liga nesta região, entretanto quando ocorre a mudança de uma guanina para uma adenina (G>A) na mesma posição, além da SRSF6 uma outra proteína da família SR também passa a se ligar nesta região, a SRSF2 (**Figura 58**).

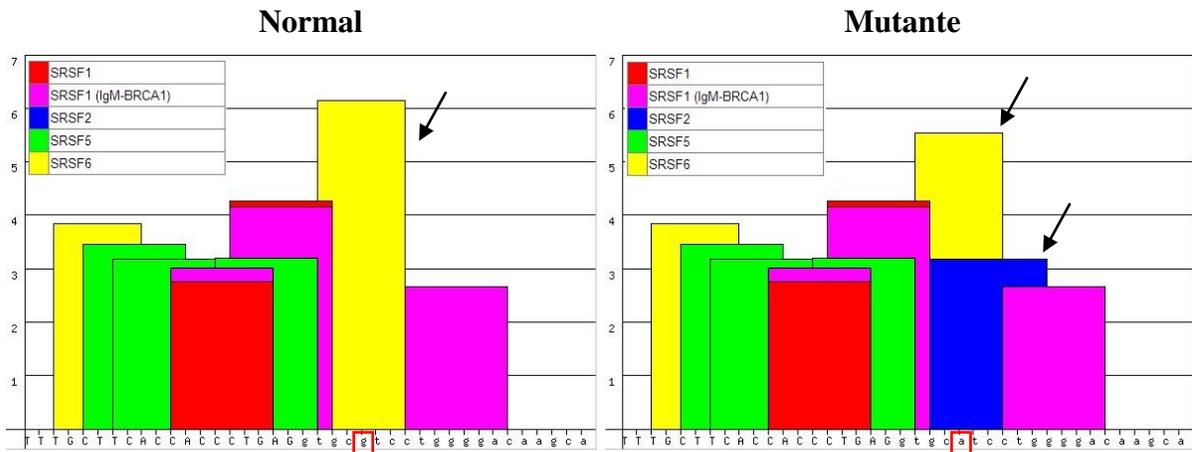


Figura 58: Simulação realizada pelo programa *ESE finder* 3.0 para as proteínas SR, na ausência e presença da sequência mutante do gene *CYP21A2* (c.939+5G>A) (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>).

O programa *SpliceAid* é outra ferramenta utilizada para avaliar as diferentes proteínas envolvidas no processo de *splicing*. Desta maneira, foi possível observar que apenas a proteína SRp55 se liga. Quando ocorre a troca da guanina por uma adenina ocorre uma alteração no número e também no tipo de proteínas, assim as proteínas YB-1 e SRp20 passam a se ligar nesta região (**Figura 59**).

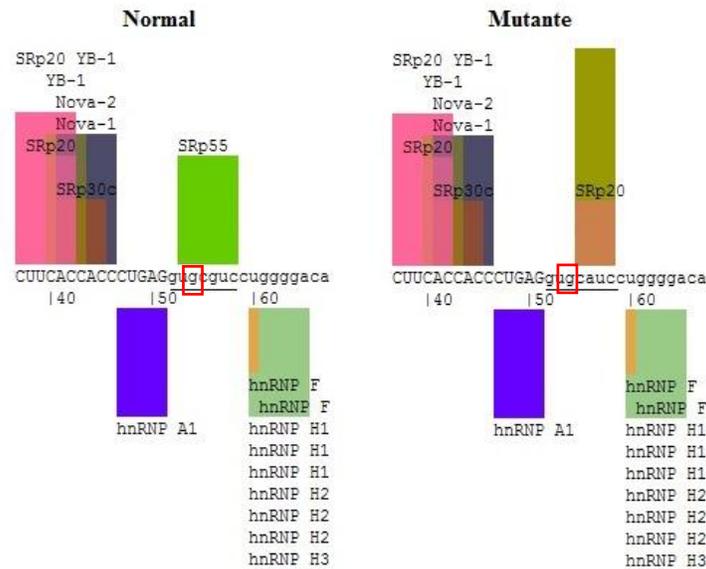


Figura 59: Análise do programa *SpliceAid* v. 2.0 (<http://www.introni.it/splicing.html>). A figura mostra a diferentes proteínas que se ligam tanto na sequência normal quanto na mutante do gene *CYP21A2*.

A partir dos resultados dos estudos *in silico*, os quais indicaram que a alteração c.939+5G>A poderia alterar o mecanismo de *splicing* no gene *CYP21A2*, foi realizada uma estratégia de estudo baseada na construção de um minigene abrangendo um fragmento composto pelo *intron* 6, o *exon* 7, o *intron* 7, *exon* 8 e *intron* 8 do gene *CYP21A2*. Este minigene foi inserido no vetor pcDNA3 modificado, entre o *exon* 2 e 3 ($\alpha 2$ e $\alpha 3$) do gene *HBA1* (Figura 60).

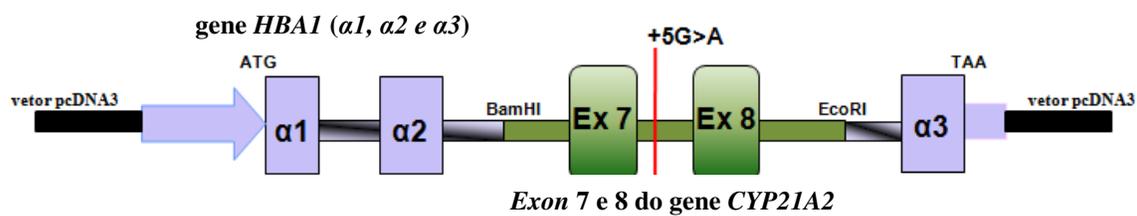


Figura 60: A figura mostra o esquema da construção de um minigene para estudo da mutação c.939+5G>A.

Depois da transcrição em células HEK-293 dos minigenes contendo a sequência normal ou a sequência com a alteração c.939+5G>A, foi realizada a técnica de RT-PCR com os transcritos extraídos das células que foram posteriormente sequenciados.

Assim, os produtos da PCRs dos cDNAs dos minigenes controle e mutante mostraram o mesmo padrão de bandejamento em gel de agarose indicando dois transcritos (variantes de *splicing*), porém com intensidades de bandas bastante diferentes. O transcrito de maior tamanho (banda maior, 418 pb) corresponde a presença do *exon* 2 do gene da alfa globulina, *exon* 7 do gene *CYP21A2* e *exon* 3 do gene alfa globulina. Já a banda de menor tamanho (217 pb) corresponde a presença do *exon* 2 e 3 da alfa globulina, mostrando a ausência do *exon* 7 do gene *CYP21A2* (*exon skipping*) (Figura 61 e 62).

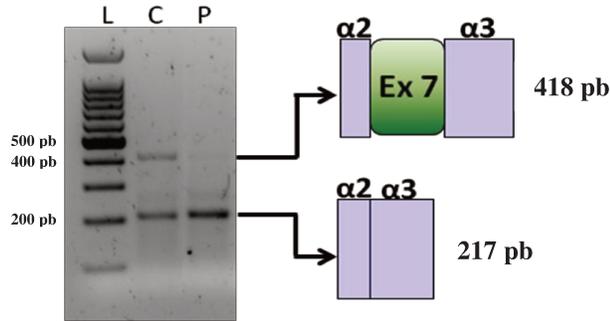


Figura 61: Mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose onde L é o marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Promega), C é o minigene controle, e P é o minigene contendo a mutação c.939+5G>A no gene *CYP21A2*, e também a representação esquemática do minigene final tanto para o controle, quanto para o mutante.

Também foi possível observar através do resultado da RT-PCR em gel de agarose, que o transcrito correspondente ao fragmento completo (selvagem) formado por: *exon 2* alfa globulina + *exons 7 e 8 CYP21A2* + *exon 3* alfa globulina, não está presente no minigene controle, e nem no mutante. Esses resultados sugerem que talvez a ausência do *exon 8* possa ser um artefato da técnica, ou ainda que devido a escolha da estratégia de minigene, ocorreu um *splicing* alternativo conhecido como *exons mutuamente exclusivo*, e dessa forma o *exon 8* do gene *CYP21A2* não foi incluído em nenhum dos transcritos obtidos.

A partir dos resultados dos sequenciamentos dos fragmentos mostrados no gel da figura 55, verificou-se que o fragmento de cerca de 418pb referente ao transcrito de maior tamanho contém o *exon 7* inteiro, porém o *exon 8* havia sido excluído. E o fragmento com cerca de 220 pb contém apenas os *exons* do gene *HBA1*, indicando o *skipping* do *exon 7 e 8* (**Figura 62**).

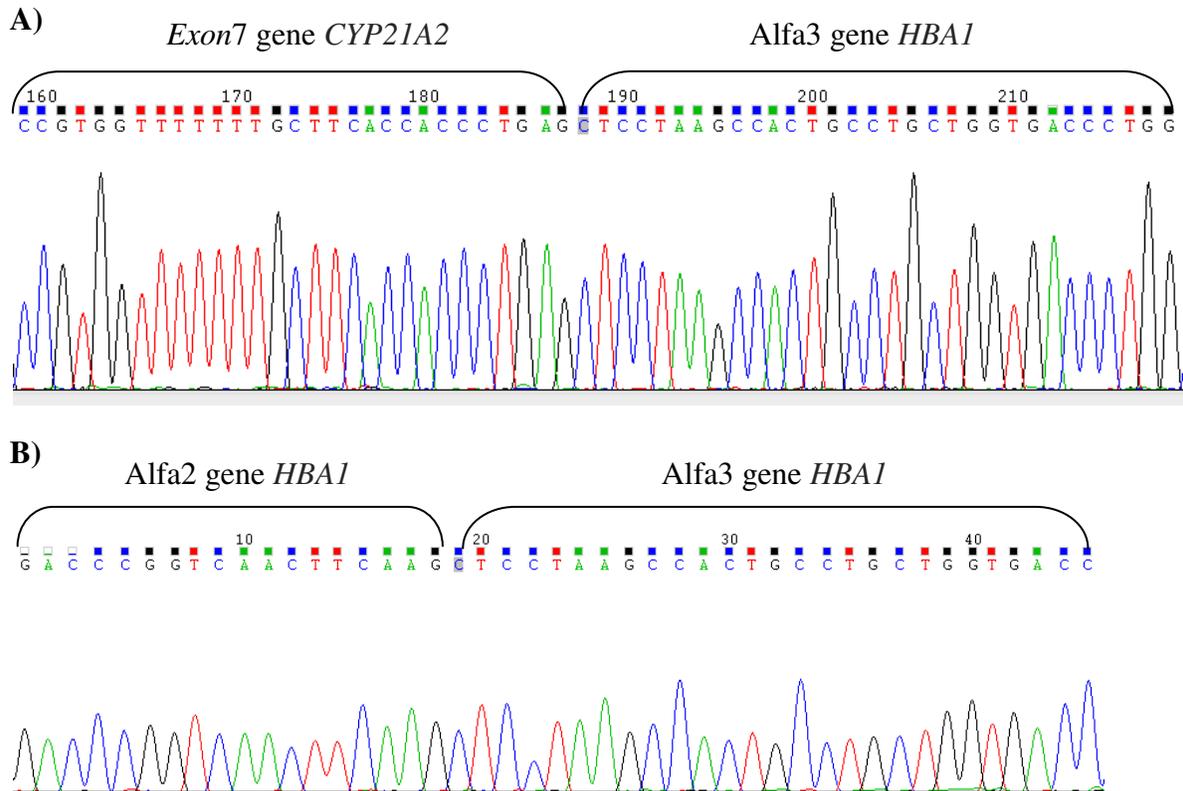


Figura 62: Partes dos eletroferogramas obtidos nos sequenciamentos dos cDNAs dos minigenes construídos para o estudo da alteração c.939+5G>A. **A)** Minigene normal mostrando a junção do *exon 7* do gene *CYP21A2* e do *exon 3* do gene *HBA1*; do lado esquerdo está o *exon 7* do gene *CYP21A2* e, do direito o *exon 3* do gene *HBA1*. **B)** Minigene mutante mostrando a junção do *exon 2* e *exon 3* do gene *HBA1*, indicando o *skipping* do *exon 7* do gene *CYP21A2*; do lado esquerdo está o *exon 2* e do direito o *exon 3* do gene *HBA1*.

Dessa maneira, pode-se sugerir que a presença da mutação c.939+5G>A no gene *CYP21A2* poderá acarretar em um desbalanceamento da quantidade dos transcritos produzidos, ou ainda, que talvez possa ocorrer o mecanismo do *skipping* do *exon 7* do gene *CYP21A2*, como mostra a **Figura 63**.

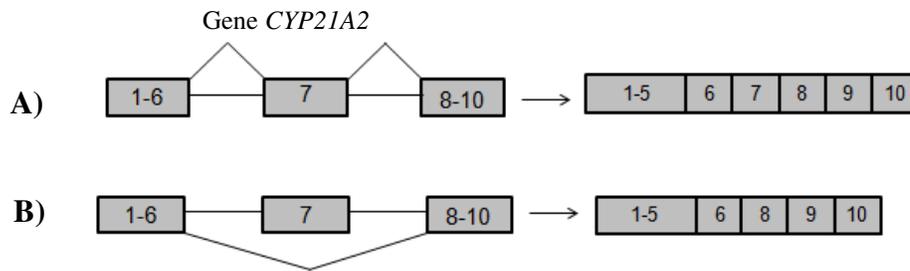


Figura 63: Em **A)** o esquema mostra o gene *CYP21A2* normal assim como o *splicing* correto deste gene. **B)** o esquema representa o *skipping* do *exon 7* do gene *CYP21A2*.

6.2. Discussão: Alteração c.939+5G>A gene *CYP21A2*

As análises dos programas *ESE Finder* e *SpliceAid* mostraram que a proteína SRSF6 se liga na sequência normal. Já na presença do nucleotídeo alterado (G>A) ocorre a ligação de outros tipos de proteínas SR (SRp20 e SRFS2), além da ligação da proteína YB-1, a qual segundo Raffetseder *et al.* (2003) interage diretamente com a proteína SRSF3 (também conhecida como SRp20), e juntas possuem relevância funcional para o processo de *splicing* alternativo.

Os achados dos programas de predição *in silico* sugerem que as proteínas SR podem estar envolvidas na utilização do local de *splicing* normal, e que na presença do nucleotídeo mutante A, pode ocorrer o reconhecimento de um sítio alternativo de *splicing*, resultando no *skipping* do *exon 7* do gene *CYP21A2*.

Portanto, é provável que a presença da mutação c.939+5G>A no gene *CYP21A2* crie um sítio favorável para ligação de proteínas envolvidas com o *splicing* alternativo, forçando a maquinaria do spliceossomo a reconhecer outro sítio doador de *splicing* não alterado, causando assim o *skipping* do *exon 7*.

Através do resultado obtido pela PCR do cDNAs dos minigenes foi possível observar que o minigene controle apresentava a banda relativa a variante de *splicing* de maior tamanho (418 pb), e também a banda de tamanho menor correspondente a variante de *splicing* (*exon skipping*), e por isso foi realizada uma análise para quantificar a intensidade das bandas obtidas através da RT-PCR utilizando o *software* de livre acesso *ImageJ* (<http://ImageJ.nih.gov/ij/>) (**Figura 64**).

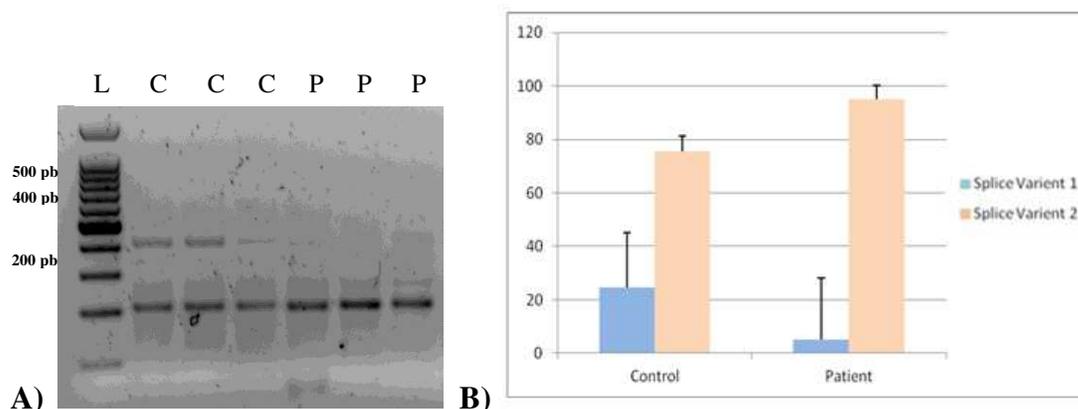


Figura 64: A) O gel de agarose mostra o resultado da PCR do cDNA, onde L – marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Promega); C - minigene controle em triplicata, sendo 3 transfecções independentes e P - minigene mutante em triplicata, sendo 3 transfecções independentes. B) Gráfico mostra a intensidade das bandas obtidas através da PCR do cDNA, tanto no controle quanto no mutante, na presença da mutação c.939+5G>A no gene *CYP21A2*.

Através da análise do gráfico gerado pelo programa *ImageJ*, a partir do gel contendo os minigenes controle e mutante em triplicata, foi possível observar que ambos produzem tanto a banda correspondente ao tamanho da variante de *splicing* contendo somente o *exon 7* do gene *CYP21A2*, quanto a banda correspondente a variante de *splicing* de menor tamanho (*skipping* do *exon 7*), porém com intensidades bastante diferentes.

Entretanto, a ausência do *exon 8* do gene *CYP21A2* no minigene controle e no mutante pode ser explicada das seguintes maneiras: devido a estratégia de minigene utilizada neste experimento, que uma vez que os *exons* e *introns* do gene da alfa globulina (*HBA1*) possuem regiões muito fortes para o reconhecimento do spliceossomo, estas podem sobressair sobre outros sítios no momento do reconhecimento pela maquinaria do spliceossomo. Dessa maneira, pode-se sugerir que devido a um artefato da técnica, talvez tenha ocorrido uma preferência pelo reconhecimento da região do *exon 3* da alfa globulina, ao invés do sítio de *splicing* do *exon 8* do gene *CYP21A2*, e como consequência o *exon 8* foi totalmente retirado tanto do minigene controle quanto do mutante.

Uma segunda explicação pode ser sugerida: talvez a célula tenha utilizado um mecanismo de *splicing* alternativo conhecida como “*exons mutuamente exclusivos*”

(Figura 65), o qual envolve a seleção de apenas um *exon* a partir de duas ou mais variantes exônicas existentes, onde um *exon* é mantido no transcrito final e outro é descartado (HULL e DLAMINI, 2014). Assim, no minigene controle, o *exon 7* do gene *CYP21A2* foi mantido, e o *exon 8* excluído. No entanto, a presença da mutação c.939+5G>A, causa o *skipping* do *exon 7*, gerando assim um fragmento com ausência dos *exons 7* e 8 no RNA maduro do gene *CYP21A2*.

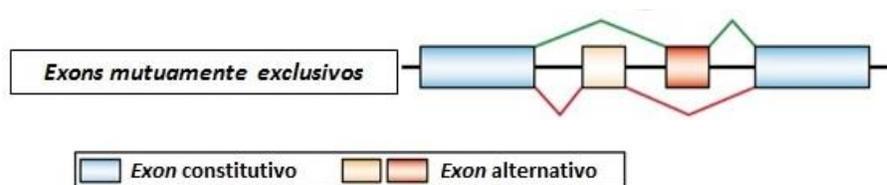


Figura 65: Figura ilustra o mecanismo de *splicing* alternativo conhecido como *exons mutuamente exclusivos*.

Este resultado pode sugerir que tanto o gene normal quanto o mutante produzam as variantes de *splicing*, porém a presença da mutação c.939+5G>A causa um desequilíbrio natural do *splicing*, devido a um desbalanceamento na produção dos transcritos, onde a variante de *splicing* mostrou ser produzida numa quantidade maior quando comparada ao transcrito contendo somente o *exon 7* do gene *CYP21A2* da sequência controle.

Sabe-se que para um correto mecanismo de *splicing* é necessária a expressão de todos os padrões (variantes) de *splicings* alternativos, bem como a produção da quantidade correta de cada transcrito, uma vez que suas proporções podem variar de acordo com o tipo celular, o estado de desenvolvimento, processos fisiológicos, diferenciação sexual, apoptose e como resposta a fatores de estresse (PAJARES *et al.*, 2007).

Como já dito anteriormente, a alteração c.939+5G>A foi identificada em heterozigose simples, em uma paciente que foi encaminhada para estudo por apresentar sinais clínicos de pubarca precoce. Além dessa variação nucleotídica, foram identificadas no genótipo da paciente as variações c.-296T>C, c.-295A>C, c.-284A>G, c.-282T>G, c.-196T>C no terminal 5' e, c.290-67C>A, c.290-48A>G, c.290-44G>T, c.290-39C>G e c.290-38A>G no *intron 2* do gene *CYP21A2*. Ao contrário da c.939+5G>A que foi identificada apenas nesta paciente e não se encontra anotada nem na sequência do gene nem na do pseudogene, todas as outras estão anotadas nas sequências do pseudogene e foram

identificadas em outros indivíduos da casuística estudada em nosso laboratório. Pela maior frequência, estas alterações têm sido consideradas neutras. Porém, não se pode descartar um efeito na expressão do gene, principalmente das alterações no terminal 5', pois sabe-se que o pseudogene é transcrito em uma taxa menor que o gene devido às diferenças presentes na região 5' reguladora (KYLLO *et al.*, 1995; ARAÚJO *et al.*, 2007).

Portanto, os resultados obtidos pelo estudo da mutação c.939+5G>A através da técnica de minigene, podem refletir um comprometimento no equilíbrio entre as variantes de *splicing*, o que pode contribuir para o fenótipo, juntamente com as outras variações.

7. ALTERAÇÃO c.289+127T>G GENE CYP21A2

7.1. Resultados

Foi identificada pelo nosso grupo de pesquisa a alteração c.289+127T>G, em heterozigose. Esta alteração caracteriza-se pela troca de uma timina por uma guanina na posição +127 do *intron 2* do gene *CYP21A2*.

A figura abaixo mostra parte do eletroferograma do clone com o vetor pGEM-Teasy contendo a sequência normal (c.289+127T), e também a sequência mutante (c.289+127G) (Figura 66).

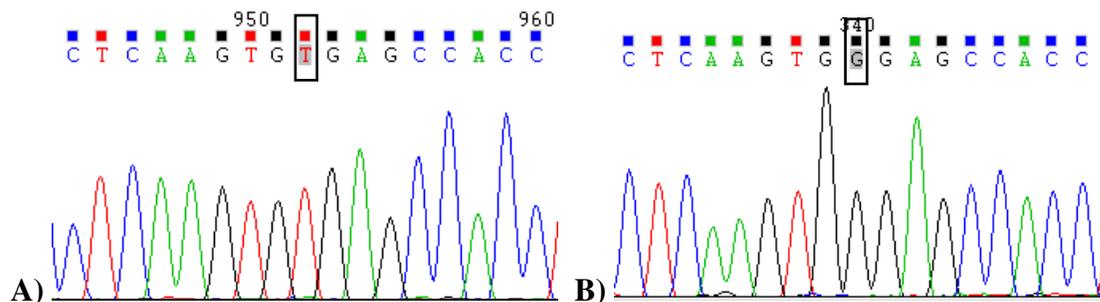


Figura 66: Partes dos eletroferogramas obtidos nos sequenciamentos dos clones com o vetor pGEM-Teasy contendo o *intron 2* do gene *CYP21A2*: **A)** sequência do *intron 2*, mostrando o nucleotídeo T normal; **B)** sequência do *intron 2*, mostrando a alteração T>G (c.289+127T>G).

Embora a troca T>G esteja distante da junção *exon/intron* (posição +127), o *intron* em questão é curto, com aproximadamente 280 pb. Este fato nos chamou a atenção e por isso foi dada continuidade primeiramente aos estudos *in silico*, a fim de avaliar se existia

alguma indicação de que esta alteração alteraria o processamento do pré-mRNA do gene *CYP21A2*.

Através do programa *FruitFly* foi observado que não houve o reconhecimento desta região como sítio de reconhecimento de *splicing*, e também não foi observada diferença entre a sequência normal e mutante (**Figura 67**).

Normal	<p>Donor site predictions for CYP21A2 :</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Start</th> <th>End</th> <th>Score</th> <th>Exon</th> <th>Intron</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>155</td> <td>169</td> <td>0.84</td> <td>cttacctG</td> <td>taagggc</td> </tr> <tr> <td>378</td> <td>392</td> <td>0.63</td> <td>gaagaagG</td> <td>tcaggcc</td> </tr> <tr> <td>592</td> <td>606</td> <td>1.00</td> <td>ctgtgagG</td> <td>taaggct</td> </tr> </tbody> </table> <hr/> <p>Acceptor site predictions for CYP21A2 :</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Start</th> <th>End</th> <th>Score</th> <th>Intron</th> <th>Exon</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>51</td> <td>91</td> <td>0.79</td> <td>gctgctttggctgtctcccA</td> <td>Gatgtgggtggctgaactcc</td> </tr> <tr> <td>390</td> <td>430</td> <td>0.48</td> <td>gccctcagctgccttcataA</td> <td>Gtccccaccctccagccccca</td> </tr> <tr> <td>423</td> <td>463</td> <td>0.92</td> <td>agcccccaacctcctcctgcA</td> <td>Jacaagctgggtgtctaggaac</td> </tr> </tbody> </table>	Start	End	Score	Exon	Intron	155	169	0.84	cttacctG	taagggc	378	392	0.63	gaagaagG	tcaggcc	592	606	1.00	ctgtgagG	taaggct	Start	End	Score	Intron	Exon	51	91	0.79	gctgctttggctgtctcccA	Gatgtgggtggctgaactcc	390	430	0.48	gccctcagctgccttcataA	Gtccccaccctccagccccca	423	463	0.92	agcccccaacctcctcctgcA	Jacaagctgggtgtctaggaac
Start	End	Score	Exon	Intron																																					
155	169	0.84	cttacctG	taagggc																																					
378	392	0.63	gaagaagG	tcaggcc																																					
592	606	1.00	ctgtgagG	taaggct																																					
Start	End	Score	Intron	Exon																																					
51	91	0.79	gctgctttggctgtctcccA	Gatgtgggtggctgaactcc																																					
390	430	0.48	gccctcagctgccttcataA	Gtccccaccctccagccccca																																					
423	463	0.92	agcccccaacctcctcctgcA	Jacaagctgggtgtctaggaac																																					
Mutante	<p>Donor site predictions for mut :</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Start</th> <th>End</th> <th>Score</th> <th>Exon</th> <th>Intron</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>155</td> <td>169</td> <td>0.84</td> <td>cttacctG</td> <td>taagggc</td> </tr> <tr> <td>378</td> <td>392</td> <td>0.63</td> <td>gaagaagG</td> <td>tcaggcc</td> </tr> <tr> <td>592</td> <td>606</td> <td>1.00</td> <td>ctgtgagG</td> <td>taaggct</td> </tr> </tbody> </table> <hr/> <p>Acceptor site predictions for mut :</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Start</th> <th>End</th> <th>Score</th> <th>Intron</th> <th>Exon</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>51</td> <td>91</td> <td>0.79</td> <td>gctgctttggctgtctcccA</td> <td>Gatgtgggtggctgaactcc</td> </tr> <tr> <td>390</td> <td>430</td> <td>0.48</td> <td>gccctcagctgccttcataA</td> <td>Gtccccaccctccagccccca</td> </tr> <tr> <td>423</td> <td>463</td> <td>0.92</td> <td>agcccccaacctcctcctgcA</td> <td>Jacaagctgggtgtctaggaac</td> </tr> </tbody> </table>	Start	End	Score	Exon	Intron	155	169	0.84	cttacctG	taagggc	378	392	0.63	gaagaagG	tcaggcc	592	606	1.00	ctgtgagG	taaggct	Start	End	Score	Intron	Exon	51	91	0.79	gctgctttggctgtctcccA	Gatgtgggtggctgaactcc	390	430	0.48	gccctcagctgccttcataA	Gtccccaccctccagccccca	423	463	0.92	agcccccaacctcctcctgcA	Jacaagctgggtgtctaggaac
Start	End	Score	Exon	Intron																																					
155	169	0.84	cttacctG	taagggc																																					
378	392	0.63	gaagaagG	tcaggcc																																					
592	606	1.00	ctgtgagG	taaggct																																					
Start	End	Score	Intron	Exon																																					
51	91	0.79	gctgctttggctgtctcccA	Gatgtgggtggctgaactcc																																					
390	430	0.48	gccctcagctgccttcataA	Gtccccaccctccagccccca																																					
423	463	0.92	agcccccaacctcctcctgcA	Jacaagctgggtgtctaggaac																																					

Figura 67: Análise das alterações na função de *splicing* da alteração c.289+127T>G através do programa de predição *FruitFly Splice Site Prediction*, (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

A predição do programa *Human Splicing Finder*, por sua vez, mostrou que a região onde a alteração c.289+127T>G se localiza pode ser considerada tanto como uma região doadora quanto receptora de *splicing*. Quando comparadas as sequências normal e mutante, os sítios denotados 280 e 282 mostraram um aumento de 0,05% e 0,6%, respectivamente, do sítio ser reconhecido quando na presença da mutação. Já no sítio denotado 284, o programa mostrou que ocorreu uma considerável diminuição de 79,99% (sequência normal) para 53,15% (sequência mutante) do sítio de *splicing* ser reconhecido (**Figura 68**).

Sequence Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	Variation (%)
280	Acceptor	ctcaagtgtgagcc	ctcaagtgggagCC	69.36	69.39	+0.05
282	Donor	caagtgtga	CAAgtggga	77.12	77.59	+0.6
284	Donor	agtgtgagc	AGTgggagc	79.99	53.15	Site broken -33.55

Figura 68: Análise das alterações na função de *splicing* da alteração c.289+127T>G através do programa de predição *Human Splicing Finder* (<http://www.umd.be/HSF/>).

A previsão *in silico* do programa *ESE Finder 3.0* também identificou a região onde a alteração c.289+127T>G se localiza, como uma região tanto doadora quanto receptora de *splicing*.

No entanto, na presença do nucleotídeo correspondente a sequência mutante G, houve um aumento sutil no *score* tanto para o reconhecimento da região doadora quanto receptora de *splicing* (**Figura 69**).

5SS_U2_human threshold: 6.67		3SS_U2_human threshold: 6.632	
Position*/Site/Score		Position*/Site/Score	
199 (-329)	ccacctcagcctcaagtgtgagccacctt 7.21610	193 (-335)	atcctcccacctcagcctcaagtgtgagcc 8.43480
5SS_U2_human threshold: 6.67		3SS_U2_human threshold: 6.632	
Position*/Site/Score		Position*/Site/Score	
199 (-329)	ccacctcagcctcaagtgggagccacctt 7.57710	193 (-335)	atcctcccacctcagcctcaagtgggagcc 9.21210

Figura 69: Análise efetuada pelo programa *ESE Finder 3.0* na presença da mutação c.289+127T>G no gene *CYP21A2* (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3>).

Ainda utilizando o programa *in silico ESE Finder 3.0*, a predição em relação a diferença entre os tipos de proteínas da família SR mostrou que tanto na presença de T quanto na de G, nenhuma proteína desta família se ligou, não havendo diferença entre a sequência normal e mutante (**Figura 70**).

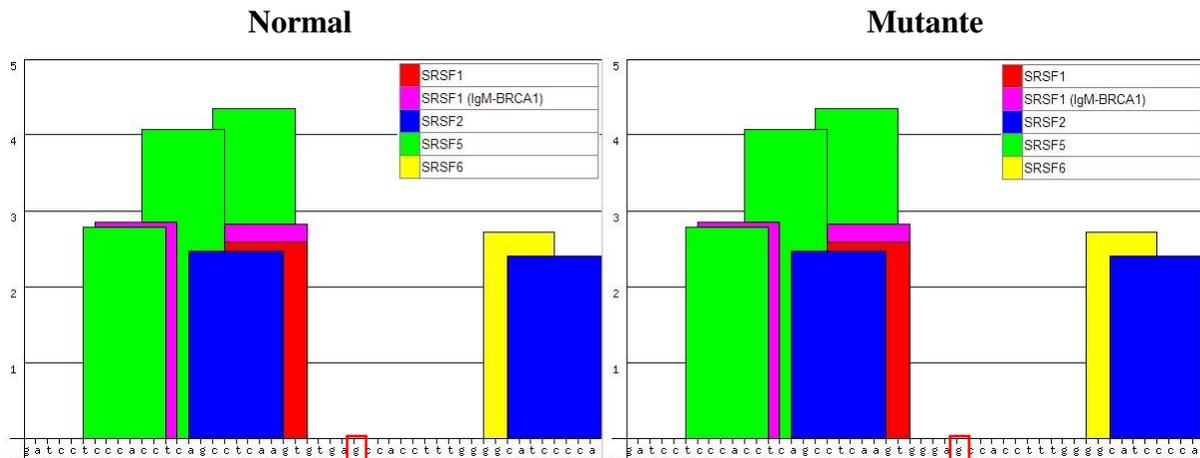


Figura 70: Previsão realizada pelo programa *ESE finder* 3.0 para as proteínas SR, na presença da sequência normal e mutante do gene *CYP21A2* (c.289+127T>G) <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>).

O programa *SpliceAid* mostrou que apenas a proteína ETR-3 se liga na sequência normal (c.289+127T). Porém, quando ocorre a troca da T para uma G, as proteínas SC35, hnRNP F, hnRNP H1, hnRNP H2 passam a se ligar na região (**Figura 71**).

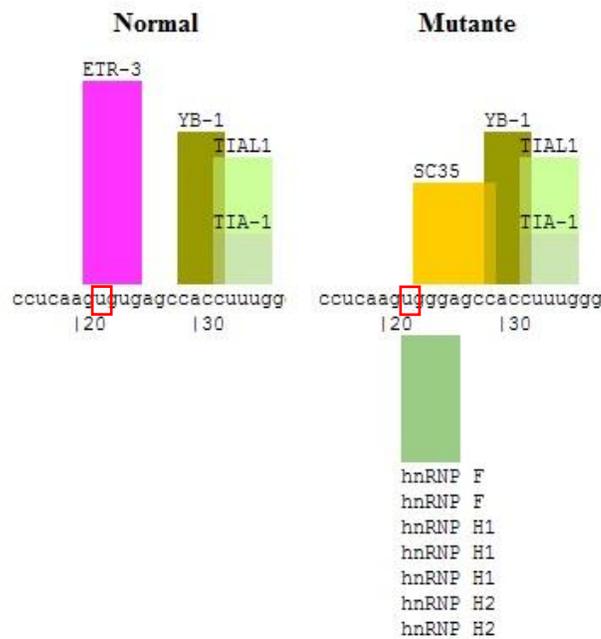


Figura 71: Análise do programa *SpliceAid* mostra a diferentes proteínas que se ligam tanto na sequência normal quanto na sequência mutante do gene *CYP21A2*.

Esta última predição realizada pelo programa *SpliceAid*, juntamente com a predição dos programas *Human Splicing Finder* e *ESE Finder 3.0*, estimularam o início da investigação dos efeitos da alteração c.289+127T>G no processamento do RNA.

Assim, a partir dos resultados dos estudos *in silico*, foi realizada uma estratégia de estudo baseada na construção de um minigene abrangendo um fragmento composto por parte do *intron 1*, *exon 2*, o *intron 2*, *exon 3* e parte do *intron 3* do gene *CYP21A2*, normal e mutante. Posteriormente, estes minigenes foram inseridos entre os *exons 2 e 3* ($\alpha 2$ e $\alpha 3$) do gene *HBA1*, no vetor pcDNA3+ modificado (**Figura 72**).

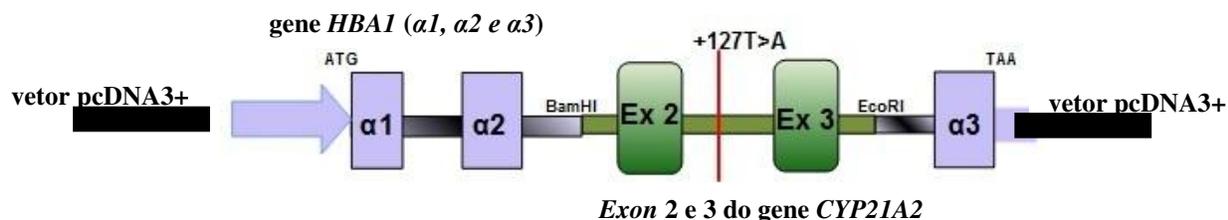


Figura 72: A figura mostra o esquema da construção dos minigenes para o estudo da mutação c.289+127T>G.

Depois da transcrição do minigene contendo a sequência normal e a sequência portadora da alteração, foi feita a técnica de RT-PCR com os transcritos extraídos das células HEK-293, e em seguida os RNAs foram sintetizados em cDNA.

Dessa maneira, os produtos da PCRs dos cDNAs dos minigenes controle e mutante mostraram o mesmo padrão de bandejamento em gel de agarose indicando a presença de duas variantes de *splicing*, porém com intensidades de bandas bastante diferentes. O transcrito de tamanho maior de 363 pb corresponde a presença do *exon 2* do gene da alfa globulina, *exon 3* do gene *CYP21A2* e *exon 3* do gene alfa globulina. Já a banda de menor tamanho (217 pb) corresponde a presença do *exon 2 e 3* da alfa globulina, tamanho equivalente a ausência do *exon 2 e 3* do gene *CYP21A2* (*exon skipping*) (**Figura 73 e 74**).

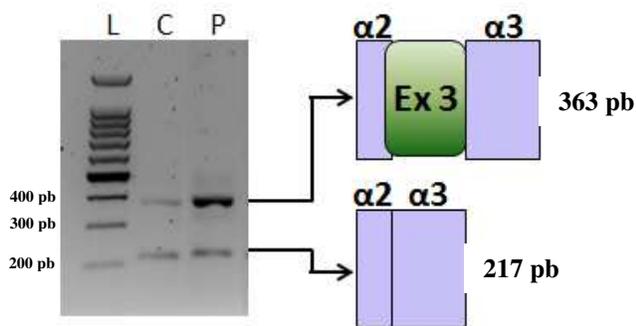


Figura 73: Mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose onde L é o marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Promega), C é o minigene controle, e P é o minigene contendo a mutação c.289+127T>G, e à direita encontra-se a representação esquemática dos minigenes relativos a cada fragmento.

Através do resultado da RT-PCR em gel de agarose também foi possível observar que o transcrito correspondente ao fragmento completo (selvagem) formado por: *exon 2* alfa globulina + *exons 2 e 3 CYP21A2* + *exon 3* alfa globulina, que totaliza um tamanho de 363 pb, é visível no gel de agarose com uma intensidade muito sutil. Assim, este fato indica que o minigene selvagem é produzido, porém não deve ser o transcrito predominante.

Dessa maneira, a partir do padrão de fragmentos mostrado na figura 66, foi possível verificar através do sequenciamento automático que tanto o minigene controle quanto o mutante geraram dois transcritos. O sequenciamento desses fragmentos no minigene mutante mostrou que o maior correspondia ao *skipping* do *exon 2* e o menor correspondia ao *skipping* dos *exons 2 e 3* do gene *CYP21A2* (variantes de *splicing*). Entretanto, para esta mutação não foi possível realizar o sequenciamento para os fragmentos referentes ao tipo selvagem, uma vez que não apresentaram quantidades suficientes para prosseguir com o sequenciamento (**Figura 74**).

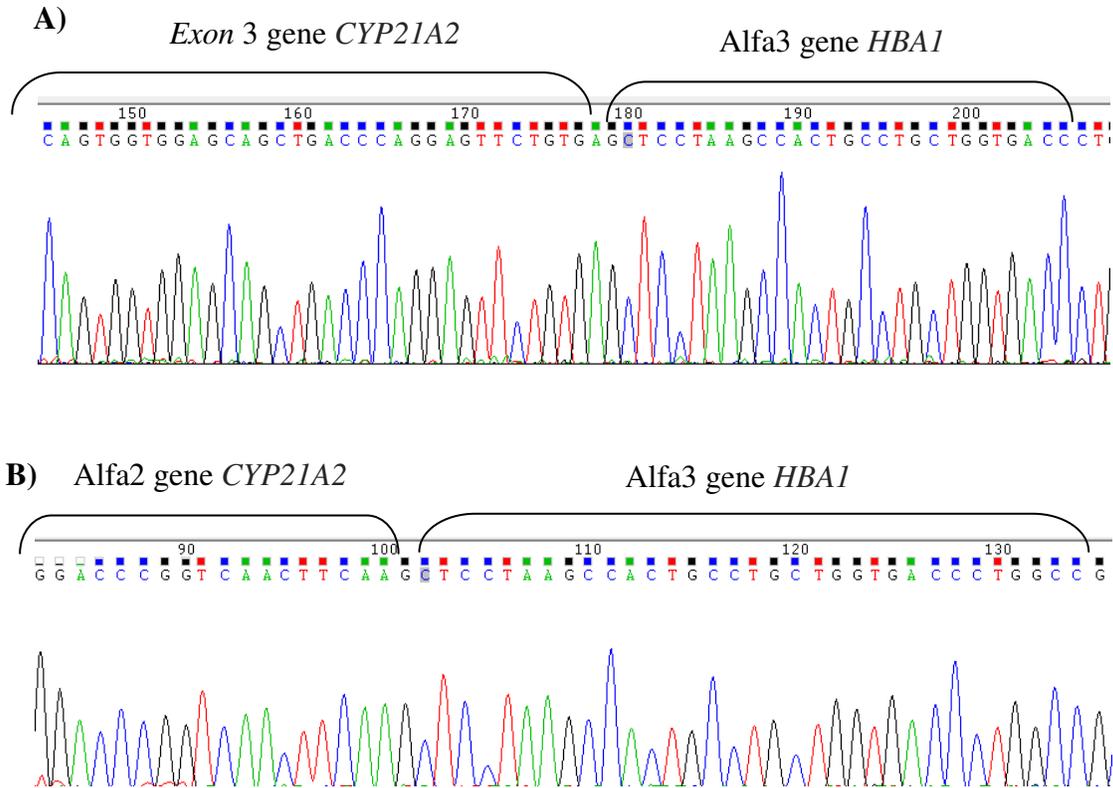


Figura 74: Partes dos eletroferogramas obtidos nos sequenciamentos dos fragmentos relativos aos minigenes. **A)** Fragmento de 373 pb contendo o final do *exon 2* do gene *HBA1*, o *exon 3* do gene *CYP21A2* e o *exon 3* do gene *HBA1*, evidenciando a junção *exon-exon*. Do lado esquerdo está o *exon 3* do gene *CYP21A2* e, do direito, o *exon 3* do gene *HBA1*. **B)** Fragmento de 218 pb correspondente ao final do *exon 2* e o *exon 3* do gene *HBA1*, onde é possível observar o *skipping* do *exon 3* do gene *CYP21A2*. Do lado esquerdo está o *exon 2* do gene da e do direito o *exon 3* do gene *HBA1*.

Esses resultados sugerem que talvez a presença da mutação c.289+127T>G no gene *CYP21A2*, poderá acarretar em um desbalanceamento da quantidade dos transcritos produzidos, ou possa ocorrer o *skipping* do *exon 3* quando na presença desta alteração (**Figura 75**).

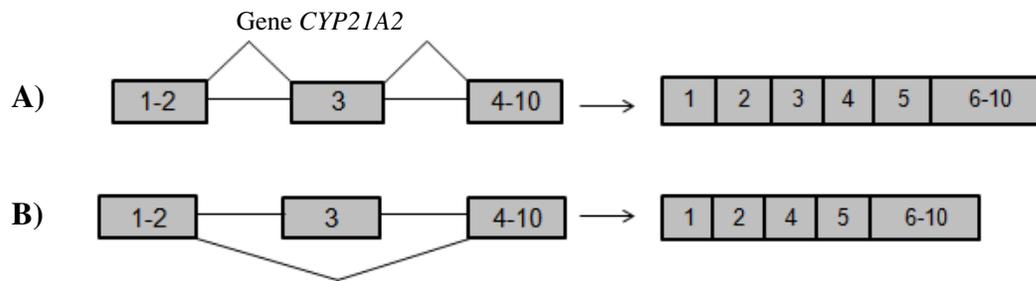


Figura 75: Em A) o esquema mostra o gene *CYP21A2* normal assim como o *splicing* correto deste gene. B) o esquema representa o *skipping* do *exon 3* do gene *CYP21A2*.

7.2. Discussão c.289+127T>G gene *CYP21A2*

A análise pelo programa de predição *in silico* *ESE Finder* mostrou que tanto na sequência normal quanto mutante não houve o reconhecimento por nenhuma proteína envolvida no processo de *splicing*. No entanto, o programa *SpliceAid* sugere que na presença do nucleotídeo normal T, a proteína ETR-3 se liga a esta sequência. Tem sido demonstrado que a proteína ETR-3 está envolvida na regulação do processo de *splicing*, na edição e tradução e, portanto, provavelmente desempenha um papel importante na geração de diversidade do proteoma (IAKOVA *et al.*, 2004; ANDRE e COOPER, 2005).

Na presença do nucleotídeo mutante G, o programa *SpliceAid* indicou a criação de um local de ligação para uma proteína pertencente à família SR, a SRSF2, além da ligação com muitas proteínas da família hnRNP, as quais atuam como repressores de *splicing*, e assim influenciam os eventos de *splicing* constitutivos e alternativos em todo o genoma (BUSCH e HERTEL, 2012; WANG e BURGE, 2008).

Estas análises sugerem que a alteração c.289+127T>G crie um sítio favorável para o recrutamento de muitas proteínas da família hnRNP, o que implicaria na repressão de sítios de *splicing* alternativos.

Através dos resultados obtidos pela técnica de PCR dos cDNAs dos minigenes controle e mutante, foi possível observar que ambos produziram o mesmo padrão de bandas, porém a intensidades das bandas correspondentes as variantes de *splicing* encontram-se bastante diferentes. Sendo assim, foi realizada uma análise para quantificar a intensidade das bandas obtidas através da RT-PCR utilizando o software de livre acesso *ImageJ* (<http://ImageJ.nih.gov/ij/>) (**Figura 76**).

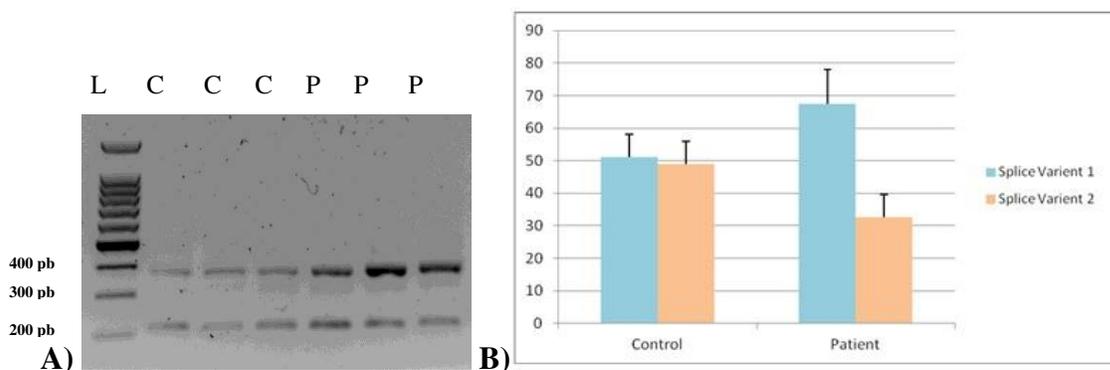


Figura 76: A) Gel de agarose mostrando o resultado da PCR do cDNA, onde L – marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (Promega); C - minigene controle em triplicata, sendo 3 transfecções independentes e P - minigene mutante em triplicata, sendo 3 transfecções independentes. B) Gráfico com as intensidades das bandas obtidas através da PCR do cDNA, tanto no controle quanto no mutante, na presença da mutação c.289+127T>G no gene *CYP21A2*.

É importante ressaltar que o gráfico não mostra a o padrão de bandejamento do tipo selvagem, mostra somente as variantes de *splicing* 1 e 2. Isso se deve ao fato que a banda que representa o transcrito selvagem, não pôde ser sequenciada uma vez que encontra-se muito fraca, portanto difícil de quantificar. Ou ainda, pode-se sugerir que de forma semelhante ao resultado da mutação c.939+5G>A do gene *CYP21A2*, também ocorra o *splicing* alternativo conhecido como “*exons mutuamente exclusivos*”. Assim, no minigene controle, o *exon 3* do gene *CYP21A2* foi mantido, e o *exon 2* excluído. No entanto, a presença da mutação c.289+127T>G, causa o *skipping* do *exon 3*, gerando assim um fragmento com ausência dos *exons 2 e 3* no transcrito final do gene *CYP21A*.

A análise deste gráfico mostra que as variantes de *splicing* produzidas tanto pelo minigene controle quanto pelo minigene mutante apresentam intensidades de bandas com diferenças significativas. Este fato sugere que a presença da alteração c.289+127T>G leva ao um desbalanceamento da produção dos transcritos, os quais são produzidos em quantidades bastante diferentes em relação ao minigene controle.

Dessa maneira, embora o minigene controle e mutante produzam as mesmas variantes de *splicing*, a proporção da quantidade produzida desses transcritos pode interferir

no correto desenvolvimento do indivíduo, levando a um fenótipo afetado (PAJARES *et al.*, 2007).

A alteração c.289+127T>G foi identificada em heterozigose, em uma criança que foi encaminhada para estudo de mutações no gene *CYP21A2* por apresentar clitoromegalia. Além dessa variação nucleotídica, foi identificada no genótipo a variação c.605A>G no *exon 5* do gene *CYP21A2* que leva à mutação p.Ser202Gli. Assim como a c.289+127T>G, a c.605A>G não se encontra anotada na sequência de referência para o gene *CYP21A2*. Desta forma seu efeito funcional também deverá ser investigado.

Portanto, apesar dos resultados obtidos pelo estudo da mutação c.289+127T>G não se mostrarem totalmente conclusivos, por não ter sido possível confirmar a sequência referente ao transcrito selvagem através do sequenciamento, podemos sugerir que esta alteração possa comprometer o balanceamento da produção das variantes de *splicing*. Assim, a presença da alteração c.289+127T>G pode contribuir para o fenótipo do paciente em questão, uma vez que a produção de todas as variantes de *splicing*, assim como a quantidade que estas variantes são produzidas durante fases específicas do desenvolvimento, são de extrema importância para que a expressão gênica e seu controle fiquem em equilíbrio.

8. CONSIDERAÇÕES SOBRE O GENE *CYP21A2*

A deficiência da enzima 21-hidroxilase é responsável por aproximadamente 90% dos casos de Hiperplasia Congênita da Adrenal. Sua incidência pode variar de 1:5000 ou 1:15000, dependendo da origem étnica racial (PANG e CLARK, 1993; WITCHEL e AZZIZ, 2011).

Em um estudo realizado com indivíduos Norte Americanos, a forma não clássica da Hiperplasia Congênita da Adrenal, mostrou uma frequência de aproximadamente 1 em cada 60 indivíduos, com prevalência menor entre os Afro descendentes em relação aos caucasianos. A forma não clássica também conhecida como forma tardia apresenta um fenótipo que pode variar desde hirsutismo, baixa estatura até a presença de genitália ambígua e virilização precoce (THERRELL *et al.* 1998). Um estudo realizado por Speiser e colaboradores (1985), mostrou uma maior frequência da forma tardia entre hispânicos, iugoslavos e judeus provenientes da Europa Central e Europa Oriental (Asquenazes) (TABOAS *et al.*, 2014).

Entre as mutações já descritas para o gene *CYP21A2*, apenas nove foram encontradas em regiões de *splicing* (Fonte HGMD <http://www.hgmd.cf.ac.uk>). Dentre essas alterações, somente as alterações c.1222-9C>A (KATSUMATA *et al.*, 2010), e c.290-13A/C>G (HIGASHI *et al.*, 1988), foram estudadas quanto ao seu efeito funcional. A mutação c.290-13A/C>G mostrou prejudicar o mecanismo de *splicing* normal, produzindo uma proteína nula ou ineficiente por acionar um sítio de *splicing* alternativo na posição c.290-19 (HIGASHI *et al.*, 1988). Segundo Katsumata e colaboradores (2010), a mutação c.1222-9C>A cria um sítio acceptor de *splicing* e inativa totalmente o local autêntico de *splicing* no *intron* 9 do gene *CYP21A2*, levando a perda total da atividade enzimática.

Com exceção da c.289+5G>A descrita por nosso grupo e também por outros (FRIÃES *et al.*, 2006), para a qual o estudo de minigenes indicou o *skipping* do *exon* 2 (SOARDI, 2008), todas as outras mutações localizadas em sítios de *splicing* do gene *CYP21A2* não tiveram o estudo funcional realizado: c.202-2A>G (LAJIC e WEDELL, 1996); c.290-1G>A (LEE *et al.*, 1998); c.290-2A>G (BILLERBECK *et al.*, 2014); c.939+1G>C (WEDELL *et al.*, 1993); c.939+2T>G (ORDOÑEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 1998); e c.1117+1G>A (ROTHBERG *et al.*, 2000).

O estudo de mutações em pacientes que apresentam características clínicas sugestivas da deficiência de 21-hidroxilase é de extrema importância não só para os casos mais graves, como a forma perdedora de sal a qual leva a óbito em poucos dias, e virilizante simples que são geralmente diagnosticadas nos primeiros dias de vida, mas também nos casos tardios ou de manifestações menos evidentes para indicar uma conduta de tratamento adequada e aconselhamento para a família.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância do correto mecanismo de *splicing* é evidenciada pelo fato de aproximadamente 15-30% das mutações associadas a doenças serem alterações, quer nas sequências consenso dos sítios de *splicing*, quer nos elementos exônicos e intrônicos auxiliares (ativadores ou repressores) envolvidos na regulação do processo de *splicing* (BARALLE e BARALLE, 2005; GENTIEN *et al.*, 2014).

Devido à importância biológica do processo de *splicing*, nos últimos anos houve um aumento do número de estudos que visam a compreensão dos mecanismos que controlam

este processo, assim como as consequências biológicas da produção de diferentes transcritos alternativos. Estas análises têm permitido o desenvolvimento de diversas metodologias entre as quais se destaca o uso de sistemas de minigenes construídos para a análise dos elementos envolvidos neste processo e que permitem mimetizar *in vitro* a regulação observada *in vivo* (GARCIA-BLANCO, 2005).

A tecnologia do minigene foi descrita há 20 anos por Vibe-Pedersen *et al.* (1984). Desde então, esta técnica foi aperfeiçoada e hoje o uso de minigenes híbridos representa uma abordagem prática para a identificação de mutações que causam *splicings* aberrantes, facilitando o estudo de mecanismos de *splicings* adjacentes, além de possibilitar a inferência sobre a proporção relativa produzida por diferentes variantes de *splicing* (ANDRE e COOPER, 2005; BARALLE, 2003; BARALLE, LUCASSEN e BURATTI, 2009).

Assim sendo, este trabalho teve como objetivo principal a construção de minigenes híbridos para avaliar funcionalmente o efeito das mutações c.548-44T>G e c.278delG (gene *SRD5A2*); c.277+2T>G (gene *HSD17B3*); c.939+5G>A e c.289+127T>G (gene *CYP21A2*), no processo de *splicing* dos respectivos genes. Alterações estas que foram previamente descritas pelo nosso grupo de pesquisa, e que foram encontradas separadamente em diferentes indivíduos analisados, os quais fazem parte de casuísticas consideravelmente grandes (entre 100 a 200 indivíduos estudados), com exceção do gene *HSD17B3*.

Nos ensaios de minigene realizados neste trabalho foi utilizado o vetor pcDNA3+ modificado, a fim de contornar o problema da existência de *introns* grandes (~50 Kb) presentes nos genes *SRD5A2* e *HSD17B3*. Os ensaios de minigenes foram realizados durante um estágio de sete meses, na Faculdade de Medicina da Universidade de Southampton – Reino Unido, sob a supervisão da Dr^a. Diana Baralle. Este vetor pcDNA3+ modificado continha os *exons* e *introns* do gene da alfa-globulina (*HBA1*), uma vez que as regiões *exon/intron* deste gene contém sítios fortes para o reconhecimento do spliceossomo, sendo portanto um modelo bastante apropriado para construção de minigenes híbridos para o estudo de mutações em regiões de *splicing* ou que interfiram no processo de *splicing* acionando sítios alternativos (BARALLE & BARALLE, 2005).

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o sistema de minigene foi adequado para o estudo, embora os resultados tenham sido mais conclusivos para as

alterações localizadas nas sequências consenso de *splicing*, isto é para as c.278delG no gene *SRD5A2* e c.277+2T>G no gene *HSD17B3*. Os resultados das demais alterações sugerem que a transcrição dos genes em questão produzam normalmente diferentes transcritos, mas mediante as trocas nucleotídicas, as proporções entre eles se alteram, podendo assim, afetar a função gênica correta em alguma fase crucial do desenvolvimento.

As construções de minigenes são uma importante ferramenta para a identificação dos elementos reguladores *cis-acting* e dos fatores *trans-acting* que determinam a eficiência e regulam o processo de *splicing*. A expressão dos pré-mRNAs em minigenes permite efetuar uma análise rápida do ganho ou perda de função para os elementos *cis-acting* e os fatores *trans-acting* que afetam a regulação do *splicing* (WHILEY *et al.*, 2014).

Assim, os minigenes podem ser utilizados para: (1) determinar o papel desempenhado pelos sítios de *splicing* no reconhecimento exônico; (2) identificar os elementos exônicos e intrônicos que ativam ou reprimem o processo de *splicing*, (3) determinar se uma variante alélica tem ou não efeito na eficiência do *splicing*, (4) efetuar a análise funcional de supostos elementos reguladores do processo de *splicing*, previamente identificados por análise bioinformática, (5) identificar elementos necessários a uma regulação celular específica, (6) identificar elementos necessários na regulação do *splicing* por fatores *trans-acting* específicos, e (7) testar se uma mutação geneticamente ligada a uma doença afeta a eficiência do *splicing* ou causa ativação de um local crítico de *splicing* (ANDRE e COOPER, 2005; WANG e COOPER, 2007; WHILEY *et al.*, 2014).

Deste modo, as mutações em regiões de *splicing* relacionadas com doenças constituem uma base importante para a realização de estudos funcionais que permitam esclarecer tanto o seu efeito no *splicing*, como contribuir para o conhecimento dos mecanismos moleculares básicos envolvidos neste processo de um modo geral (WANG e COOPER, 2007).

Atualmente, alguns estudos têm sido realizados a fim de se obter não só o conhecimento dos mecanismos envolvidos no processo de *splicing*, mas também propiciar o desenvolvimento de métodos voltados à terapia de doenças relacionadas com *splicing* aberrante (BARALLE, LUCASSEN e BURATTI, 2009).

Porém, para isso é necessária uma maior compreensão da ciência básica dos mecanismos envolvidos no processo de *splicing*, assim como sua aplicação na investigação

diagnóstica e terapêutica. Embora ainda muito insipiente, várias estratégias já foram desenvolvidas para explorar abordagens terapêuticas. Como por exemplo, a tecnologia do oligonucleotídeo antissense (AARTSMA-RUS e OMMEN, VAN, 2007; WHILEY *et al.*, 2014), a qual já entrou na fase de ensaio clínico para o tratamento de doenças como a distrofia muscular de Duchenne ou ainda, o uso de siRNA (do inglês *small interfering RNA*), para o tratamento da neovascularização associada a degenerações maculares relacionadas com a idade (<http://www.clinicaltrials.gov>; BARALLE, LUCASSEN e BURATTI, 2009).

Dessa maneira, o estudo de mutações em regiões de *splicing* é de extrema importância para aprimorar o conhecimento sobre o funcionamento e organização dos mecanismos de *splicing* gênico, sobre os elementos regulatórios de *splicing*, assim como compreender o efeito biológico que estas mutações causam em regiões de *splicing*, as quais podem acarretar na produção de um transcrito anômalo ou nulo, ocasionando em doenças humanas.

É importante ressaltar também a relevância do estudo funcional de alterações intrônicas, pois muitas vezes passam despercebidas, porém demonstram ter grande influência no processo de expressão gênica, principalmente no processo de *splicing* que é imprescindível para organismos eucariotos.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pelo estudo dos minigenes, pode-se sugerir que:

- A mutação c.278delG causa a produção de um sítio doador de *splicing* alternativo 38 pb antes do final do *exon 1* do gene *SRD5A2*, quando comparado com o controle;
- Os minigenes controle e mutante para alteração c.548-44T>G, no gene *SRD5A2*, produziram três transcritos:
 - Selvagem
 - *Exon 4* com 112 pb a menos;
 - E *skipping* do *exon 4*;
- A mutação c.277+2T>G conduz ao *skipping* do *exon 3* no gene *HSD17B3*, produzindo um mRNA anômalo ou nulo;
- Embora os resultados não tenham sido esclarecedores em relação à mutação c.939+5G>A no gene *CYP21A2*, pois não foi possível verificar a presença do transcrito selvagem no minigene controle e mutante, pode-se sugerir que ocorra o *splicing* alternativo “*exons mutuamente exclusivos*”, ou ainda que possa ocorrer o *skipping* do *exon 7* deste gene.
- Apesar de resultados não conclusivos, os resultados dos minigenes controle e mutante para alteração c.289+127T>G sugerem que ambos produzam duas variantes de *splicing*, uma com *skipping* do *exon 3* e a outra com o *skipping* dos *exons 2 e 3*, do gene *CYP21A2*;
- A presença de uma variante de *splicing* no controle para todas as construções sugere:
 - que a variante pode ser expressa naturalmente na célula, e que talvez possa influenciar na regulação do transcrito selvagem;
 - que seja um artefato gerado pela escolha do modelo de construção de minigene com sítios “fortes” de *splicing*;

- A presença das alterações pode causar uma alteração no equilíbrio natural do *splicing*, produzindo desta forma somente um dos padrões de *splicing*, resultando em doença (Faustino & Cooper , 2003);
 - Para que ocorra o correto mecanismo de *splicing*: é necessária a expressão de todos os padrões de *splicings* alternativos, assim como a quantidade em que estes são produzidos (FAUSTINO & COOPER, 2003; LEWANDOWSKA, 2013);
 - Importância do estudo de alterações em regiões intrônicas, pois nem sempre são neutras e podem causar *splicings* aberrantes.
- Os resultados indicam que o sistema de minigene foi mais adequado para o estudo das alterações localizadas nas sequências consenso de *splicing*: c.278delG no gene *SRD5A2* e c.277+2T>G no gene *HSD17B3*.
 - Os resultados das demais alterações sugerem que o sistema de minigene utilizado não foi satisfatório, e assim não podemos afirmar os reais efeitos que estas alterações causam no processo de *splicing*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTSMA-RUS, A. e OMMEN, G.-J. B. VAN. Antisense-mediated *exon* skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA (New York, N.Y.)*, v. 13, n. 10, p. 1609–24, 2007.
- AEBI, M.; HORNIG, H. e WEISSMANN, C. 5' cleavage site in eukaryotic pre-mRNA splicing is determined by the overall 5' splice region, not by the conserved 5' GU. *Cell*, v. 50, n. 2, p. 237–46, 1987.
- AL-AGHA, A. E. e OCHELTRREE, A. H. Association between genotype , clinical presentation , and severity of congenital adrenal hyperplasia : a review. v. 54, p. 323–332, 2012.
- ANDERSSON S, GEISLER W, WU L, DAVIS DL, GRUMBACH M M, NEW M I, *et al.* Molecular genetics and pathophysiology of 17 β -hidroxysteroide dehydrogenase 3 deficiency. *Journal of Clinical Endocrinol and Metab*, v.81, v.130-136, 1996.
- ANDRE, N. e COOPER, T. A. Identification of Putative New Splicing Targets for ETR-3 Using Sequences Identified by Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment. v. 25, n. 3, p. 879–887, 2005.
- ANKE A. EHRHARDT, PH.D. AND HEINO F. L. MEYER-BAHLBURG, D. rer. nat. PRENATAL SEX HORMONES AND THE DEVELOPING BRAIN : effects on psychosexual differentiation and cognitive finction. *Ann. Rev. Med.*, v. 30, p. 417–30, 1979.
- ARAÚJO, R. S. *et al.* Microconversion between CYP21A2 and CYP21A1P promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 92, n. 10, p. 4028–34, 2007.
- ARS, E. *et al.* Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Human molecular genetics*, v. 9, n. 2, p. 237–47, 2000.
- AUBOEUF, D. *et al.* Regulation of Alternative Splicing by the ATP-Dependent DEAD-Box RNA Helicase p72 Arnd Ho. v. 22, n. 16, p. 5698–5707, 2002.
- BALDINOTTI F, MAJORE S, FOGLI A, MARROCCO G, GHIRRI P, VUERICH M, TUMINI S, BOSCHERINI B, VETRI M, SCOMMEGNA S, RINALDI R, SIMI P, GRAMMATICO P. Molecular characterization of 6 unrelated Italian patients with 5 α -reductase type 2 deficiency. *J Androl*, v. 29, p.20-28, 2008.
- BARALLE, D. e BARALLE, M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *Journal of medical genetics*, v. 42, n. 10, p. 737–48, 2005.

BARALLE, D.; LUCASSEN, A. e BURATTI, E. Missed threads. *EMBO reports*, v. 10, n. 8, 2009.

BARALLE, F. E. Identification of a mutation that perturbs. p. 220–223, 2003.

BERGET, S. M. *Exon Recognition in Vertebrate Splicing. Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 6, p. 2411–2414, 1995.

BERGET, S. M.; MOORE, C. e SHARP, P. a. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. 1977. *Reviews in medical virology*, v. 10, n. 6, p. 356–62; discussion 355–6, 1977.

BILLERBECK, A. N. A. E. C. *et al.* Three Novel Mutations in CYP21 Gene in Brazilian Patients with the Classical Form of 21-Hydroxylase Deficiency Due to a Founder Effect. v. 87, n. July, p. 4314–4317, 2014.

BLACK, D. L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual review of biochemistry*, v. 72, p. 291–336, 2003.

BLENCOWE, B. J. *Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. Trends in biochemical sciences*, v. 25, n. 3, p. 106–10, 2000.

BOEHMER *et al.* 17 -Hydroxysteroid Dehydrogenase-3 Deficiency: ? Diagnosis, Phenotypic Variability, Population Genetics, and Worldwide Distribution of Ancient and de Novo Mutations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 84, n. 12, 1999.

BRINKMANN AO, JENSTER G, RIS-STALPERS C, VAN DER CORPUT, JAGM, BRUGGENWIRH HT, BOEHMER A L M, TRAMPMAN, J. Androgen Receptor Mutations. *J Steroid Biochem Molec Biol*, v.53, p.443-448, 1995.

BURATTI, E.; BARALLE, M. e BARALLE, F. E. Defective splicing, disease and therapy: searching for master checkpoints in *exon* definition. *Nucleic acids research*, v. 34, n. 12, p. 3494–510, 2006.

BUSCH, A. e HERTEL, K. J. Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, v. 3, n. 1, p. 1–12, 2012.

CÁCERES, J. F. e KORNBLIHTT, A. R. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends in genetics : TIG*, v. 18, n. 4, p. 186–93, 2002.

CAI LQ, ZHU YS, KATZ MD, HERRERA C, BAÉZ J, DEFILLO-RICART M, SHACKLETON CHI, & IMPERATO-MCGIN-LEY J. 5 α -reductase-2 gene mutations in the Dominican Republic. *J Clin Endocrinol Metab*, v.81, p.1730-1735, 1996.

CALAIS F.L. Estudo dos genes *SRD5A2* e *HSD17B3* em casos de ambiguidade genital em pacientes com cariótipo 46,XY [tese de mestrado]. Campinas: Instituto de Biologia; Universidade Estadual de Campinas, 2010.

CALLIARI, L.E.P. Hiperplasia adrenal congênita, em *Endocrinologia para a pediatria*, editado por Monte, & Carlos, A. Ed. Rio de Janeiro 115-124, 1992.

CARTEGNI, L.; CHEW, S. L. e KRAINER, A. R. Listening to silence and understanding nonsense: *exonic* mutations that affect splicing. *Nature reviews. Genetics*, v. 3, n. 4, p. 285–98, 2002.

CASTRO, C. C. T. D. S. *et al.* Clinical and molecular spectrum of patients with 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (17- β -HSD3) deficiency. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, v. 56, n. 8, p. 533–9, 2012.

CHAN, A. O. K. *et al.* Diagnosis of 5 α -reductase 2 deficiency: is measurement of dihydrotestosterone essential? *Clinical chemistry*, v. 59, n. 5, p. 798–806, 2013.

CHAN, A. O. K. Performance of *in silico* analysis in predicting the effect of non-synonymous variants in inherited steroid metabolic diseases. *Steroids*, v. 78, n. 7, p. 726–30, 2013.

CHROMAS LITE FREEWARE. Disponível em:
http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html.

CHUANG, J. *et al.* Complexities of gender assignment in 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 deficiency : is there a role for early orchiectomy? *International Journal of Pediatric Endocrinology*, v. 2013, n. 1, p. 1, 2013.

COOPER, T. a.; WAN, L. e DREYFUSS, G. RNA and disease. *Cell*, v. 136, n. 4, p. 777–93, 2009.

DAMIANI D, OLIVEIRA LC, MACIEL-GUERRA, STUCHI-PEREZ EG, GUERRA-JUNIOR G. Genitália Ambígua: Diagnóstico Diferencial e Conduta. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 45, n.1, 2001.

DATABASE OF HUMAN GENE MUTATION DATA - HMGD. Disponível em:
www.hgmd.cf.ac.uk, site.

ELLIOTT, D. J. e RAJAN, P. The role of the RNA-binding protein Sam68 in mammary tumorigenesis. *The Journal of pathology*, v. 222, n. 3, p. 223–6, 2010.

EPERON, I. C. *et al.* Pathways for selection of 5' splice sites by U1 snRNPs and SF2/ASF. *The EMBO journal*, v. 12, n. 9, p. 3607–17, 1993.

ERKELENZ, S. *et al.* Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms. *RNA (New York, N.Y.)*, v. 19, n. 1, p. 96–102, 2013.

ESE FINDER 3.0. Disponível em: <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>

EYAL, O. *et al.* Adult height of subjects with nonclassical 21-hydroxylase deficiency. v. 102, p. 419–423, 2013.

FAUSTINO, N. A. e COOPER, T. a. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes & development*, v. 17, n. 4, p. 419–37, 2003a.

FAUSTINO, N. A. e COOPER, T. a. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes & development*, v. 17, n. 4, p. 419–37, 2003b.

FOX-WALSH KL, DOU Y, LAM BJ, HUNG SP, BALDI PF, HERTEL KJ. The architecture of premRNAs affects mechanisms of splice-site pairing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n.45, p.16176-16181. 2005.

FRIÃES, A. *et al.* CYP21A2 mutations in Portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia: identification of two novel mutations and characterization of four different partial gene conversions. *Molecular genetics and metabolism*, v. 88, n. 1, p. 58–65, 2006.

GARCIA-BLANCO, M. a. Methods for the study of alternative splicing. *Methods (San Diego, Calif.)*, v. 37, n. 4, p. 289–91, 2005.

GAZZARA, M. R. *et al.* In silico to in vivo splicing analysis using splicing code models. *Methods (San Diego, Calif.)*, v. 67, n. 1, p. 3–12, 2014.

GENE RUNNER FOR WINDOWS. Disponível em: <http://www.generunner.net/>

GENTIEN, D. *et al.* A common alternative splicing signature is associated with SF3B1 mutations in malignancies from different cell lineages. *Leukemia*, n. January, p. 1–10, 2014.

GLUZMAN Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, v. 23, p. 175-182, 1981.

GUERRA-JUNIOR G, MACIEL-GUERRA AT. A determinação e diferenciação sexual normais: atualização. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 41, p. 191-197, 1997.

GUERRA-JUNIOR G, MACIEL-GUERRA AT. The role of the pediatrician in the management of children with genital ambiguities. *J Pediatr*, v.83, p.184-191, 2002.

HACKEL, C.;; OLIVEIRA, L. E. C. De;; *et al.* Deficiência de 5 -Redutase Tipo 2: α Experiências de Campinas (SP) e Salvador (BA). *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 49, n. 1, p. 103–111, 2005.

HACKEL, C.;; OLIVEIRA, L. E. C.;; *et al.* New mutations, hotspots, and founder effects in Brazilian patients with steroid 5 α -reductase deficiency type 2. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, v. 83, n. 7, p. 569–76, 2005.

HERTEL, K. J. Combinatorial control of *exon* recognition. *The Journal of biological chemistry*, v. 283, n. 3, p. 1211–5, 2008.

HEY-JOO KANG, M.D.1, JULIANNE IMPERATO-MCGINLEY, M.D.2, YUAN-SHAN ZHU, M.B., PH.D.2, A. e ZEV ROSENWAKS, M. D. . NIH Public Access. *Fertil Steril.*, v. 101, n. 2, p. 310–316, 2014.

HIGASHI, Y. *et al.* Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P-450(C21)] deficiency in humans: possible gene conversion products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 85, n. 20, p. 7486–90, 1988.

HOOPER, J. E. A survey of software for genome-wide discovery of differential splicing in RNA-Seq data. *Human genomics*, v. 8, p. 3, 2014.

HOUSE, A. E. e LYNCH, K. W. Regulation of alternative splicing: more than just the ABCs. *The Journal of biological chemistry*, v. 283, n. 3, p. 1217–21, 2008.

HUGHES IA. Minireview: sex differentiation. *Endocrinology* 2001; 142: 3281-3287.

HULL, R. e DLAMINI, Z. The role played by alternative splicing in antigenic variability in human endo-parasites. *Parasites & vectors*, v. 7, n. 1, p. 53, 2014.

HUMAN SPLICING FINDER. Disponível em: <http://www.umd.be/HSF/>

SPLICEAID. Disponível em: <http://www.introni.it/splicing.html>

IAKOVA, P. *et al.* Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate. *The EMBO journal*, v. 23, n. 2, p. 406–17, 2004.

IMAGEJ. Disponível em: <http://imagej.nih.gov/ij/>

IMPERATO-MCGINLEY, J. e ZHU, Y.-S. Androgens and male physiology the syndrome of 5 α -reductase-2 deficiency. *Molecular and cellular endocrinology*, v. 198, n. 1-2, p. 51–9, 2002.

JOSHI RR, RAO S, DESAI M. Etiology and Clinical Profile of Ambiguous Genitalia – An Overview of 10 years Experience. *Indian Pediatrics* , v.43, p. 974-979, 2006.

- JOST A, VIGIER B, PREPIN J, PERCHELLET JP. Studies on sex differentiation in mammals. *Rec Progr Horm Res*, v. 29, p. 1-41, 1973.
- KATSUMATA, N. *et al.* Novel *intronic* CYP21A2 mutation in a Japanese patient with classic salt-wasting steroid 21-hydroxylase deficiency. *Metabolism: clinical and experimental*, v. 59, n. 11, p. 1628–32, 2010.
- KLERK, E. DE;; DUNNEN, J. T. DEN e 'T HOEN, P. a C. RNA sequencing: from tag-based profiling to resolving complete transcript structure. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, p. 16–20, 2014.
- LABRIE F, SUGIMOTO Y, LUU-THE V, SIMARD J, LANCHANCE Y, BACHVAROV D, LEBLANC G, DUROCHER F, PAQUET N. Structure of human type II 5 α -reductase gene. *Endocrinology* , v. 131, p. 1571-3, 1997.
- LAJIC, S. e WEDELL, a. An *intron 1* splice mutation and a nonsense mutation (W23X) in CYP21 causing severe congenital adrenal hyperplasia. *Human genetics*, v. 98, n. 2, p. 182–4, 1996.
- LEE, H. Clinica Chimica Acta Variants of the CYP21A2 and CYP21A1P genes in congenital adrenal hyperplasia. *Clinica Chimica Acta*, v. 418, p. 37–44, 2013.
- LEE, H. H. *et al.* Identification of four novel mutations in the CYP21 gene in congenital adrenal hyperplasia in the Chinese. *Human genetics*, v. 103, n. 3, p. 304–10, 1998.
- LEE, P. a *et al.* Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. *Pediatrics*, v. 118, n. 2, p. e488–500, 2006.
- LEVY M.A., BRANDT M., SHEEDY K.M., HOLT D.A., HEASLIP J.I., TRILL J.J., RYAN P.J., MORRIS R.A., GARRISON L.M., BERGSMAN D.J. Cloning, expression and functional characterization of type 2 steroid 5 α -reductases from Cynomolgus monkey: comparisons with human and rat isoenzymes. *J. Steroid Biochem Mol Biol*, v. 52, p. 307-19, 1995.
- LEWANDOWSKA, M. a. The missing puzzle piece: splicing mutations. *International journal of clinical and experimental pathology*, v. 6, n. 12, p. 2675–82, 2013.
- LIU, H. X.;; ZHANG, M. e KRAINER, a R. Identification of functional *exonic* splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes & development*, v. 12, n. 13, p. 1998–2012, 1998.
- LONG, J. C. e CACERES, J. F. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *The Biochemical journal*, v. 417, n. 1, p. 15–27, 2009.

LOUGHLIN, F. E. *et al.* The zinc fingers of the SR-like protein ZRANB2 are single-stranded RNA-binding domains that recognize 5' splice site-like sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 14, p. 5581–6, 2009.

LOUISE T CHOW, RICHARD E. GELINAS, THOMAS R., B. and R. J. R. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*, v. 12, p. 1–8, 1977.

LUND, M. e KJEMS, J. Defining a 5' splice site by functional selection in the presence and absence of U1 snRNA 5' end. *RNA (New York, N.Y.)*, v. 8, n. 2, p. 166–79, 2002.

MACIEL-GUERRA AT, GUERRA-JÚNIOR G. Menino ou menina? Os distúrbios da diferenciação do sexo. São Paulo: Manole Editora Ltda, p.128-135, 2002.

MADHANI, H. D. e GUTHRIE, C. Dynamic RNA-RNA interactions in the spliceosome. *Annual review of genetics*, v. 28, p. 1–26, 1994.

MIGEON CJ, WISNIEWSKI AB. Human sex differentiation and its abnormalities. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, v.17, p.1-18, 2003.

MALTAIS, R.;; LUU-THE, V. e POIRIER, D. Synthesis and optimization of a new family of type 3 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors by parallel liquid-phase chemistry. *Journal of medicinal chemistry*, v. 45, n. 3, p. 640–53, 2002.

MANLEY, J. L. e TACKE, R. SR proteins and splicing control. *Genes & Development*, v. 10, n. 13, p. 1569–1579, 1996.

MAQUAT, L. E. NASTy effects on fibrillin pre-mRNA splicing: another case of ESE does it, but proposals for translation-dependent splice site choice live on. *Genes & development*, v. 16, n. 14, p. 1743–53, 2002.

MASSANYI, E. Z. *et al.* Novel mutation among two sisters with 17 β hydroxysteroid dehydrogenase type 3 deficiency. *Urology*, v. 81, n. 5, p. 1069–71, 2013.

MATERA, a G. e WANG, Z. A day in the life of the spliceosome. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 15, n. 2, p. 108–21, 2014.

MATLIN, A. J.;; CLARK, F. e SMITH, C. W. J. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 6, n. 5, p. 386–98, 2005.

MAZEN, I. *et al.* Molecular analysis of 5alpha-reductase type 2 gene in eight unrelated egyptian children with suspected 5alpha-reductase deficiency: prevalence of the G34R mutation. *Clinical endocrinology*, v. 58, n. 5, p. 627–31, 2003.

MILLER, WL. Congenital Adrenal Hyperplasias. *Endocrinol. Metab. Clin. North America*, v.20, p. 721-740, 1991.

NEOCLEOUS, V. *et al.* Duplication of *exons* 3-10 of the HSD17B3 gene: a novel type of genetic defect underlying 17 β -HSD-3 deficiency. *Gene*, v. 499, n. 2, p. 250–5, 2012.

NEW MI. An update of congenital adrenal hyperplasia. *Ann NY Acad Sci*, v.1038, p. 14–43, 2004.

NIE, M. *et al.* Five novel mutations of SRD5A2 found in eight Chinese patients with 46,XY disorders of sex development. *Molecular human reproduction*, v. 17, n. 1, p. 57–62, 2011.

NISSIM-RAFINIA, M. e KEREM, B. Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends in genetics : TIG*, v. 18, n. 3, p. 123–7, 2002.

NIMKARN S, LIN-SU K, NEW MI. Steroid 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Clin North Am*, V.58, N.5, p.1281-300, 2011.

OICAL G, ADIYAMAN P, BERBEROGLU M, CETINKAYA E, AKAR N, UYSAL A, *et al.* Mutations of the 5 α -steroid reductase type 2 gene in six Turkish patients from unrelated families and a large pedigree of an isolated Turkish village. *J Pediatr Endocrinol Metab*, v.15, p.411-21, 2002.

OLIGO CALC. Disponível em: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoalc.html>

ONO, M. e HARLEY, V. R. Disorders of sex development: new genes, new concepts. *Nature reviews. Endocrinology*, v. 9, n. 2, p. 79–91, 2013.

ORDOÑEZ-SÁNCHEZ, M. L. *et al.* Molecular genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population: identification of possible new mutations and high prevalence of apparent germ-line mutations. *Human genetics*, v. 102, n. 2, p. 170–7, 1998.

OSTRER, H. Disorders of Sex Development (DSDs): An Update. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 99, n. 5, p. 1503–9, 2014.

PAGANI, F. *et al.* Missense, nonsense, and neutral mutations define juxtaposed regulatory elements of splicing in cystic fibrosis transmembrane regulator *exon* 9. *The Journal of biological chemistry*, v. 278, n. 29, p. 26580–8, 2003.

PAGANI, F. e BARALLE, F. E. identifying the splicing spoilers. v. 5, n. May, 2004.

PAGANI, F.; RAPONI, M. e BARALLE, F. E. Synonymous mutations in CFTR *exon* 12 affect splicing and are not neutral in evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 18, p. 6368–72, 2005.

PAJARES, M. J. *et al.* Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *The lancet oncology*, v. 8, n. 4, p. 349–57, 2007.

PAN, Q. *et al.* Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature genetics*, v. 40, n. 12, p. 1413–5, 2008.

PANG, S. e CLARK, A. Congenital adrenal hyperplasia due to 2 : 1 -hydroxylase deficiency : Newborn screening and its relationship to the diagnosis and treatment of the disorder. v. 2, p. 105–139, 1993.

PRIMER 3. Disponível em: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>

RAPPSILBER, J. *et al.* Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome research*, v. 12, n. 8, p. 1231–45, 2002.

REED, R. Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Current opinion in genetics & development*, v. 6, n. 2, p. 215–20, 1996.

REED, R. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Current opinion in cell biology*, v. 12, n. 3, p. 340–5, 2000.

REICHMAN, D. E. *et al.* Fertility in patients with congenital adrenal hyperplasia. *Fertility and Sterility*, v. 101, n. 2, p. 301–309, 2014.

RHOUMA, B. BEN *et al.* A novel nonsense mutation in HSD17B3 gene in a Tunisian patient with sexual ambiguity. *The journal of sexual medicine*, v. 10, n. 10, p. 2586–9, 2013.

ROCA, X., SACHIDANANDAM, R., KRAINER, A.R. Determinants of the inherent strength of human 5' splice sites. *RNA*, v.11, p.683–698, 2005.

ROY, J. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of a 3 β -androsterone derivative as inhibitor of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, v. 141, p. 44–51, 2014.

RUSSEL DW, BERMAN DM, BRYANT JT, CALA KM, DAVIS DL, LANDRUM CP, PRIHODA JS, SILVER RI, THIPGEN AE, WIGLEY WC. The molecular genetics of steroid 5 α -reductases. *Recent Prog Horm Res*, v.49, p.275-84, 1994.

RUSSELL DW, WILSON JD. Steroids 5 α -reductases: two genes/two enzymes. *Ann Rev Biochem*, v.63, p. 25-61, 1994.

SINGER, R. H. e GREEN, M. R. Compartmentalization of eukaryotic gene expression: causes and effects. *Cell*, v. 91, n. 3, p. 291–4, 1997.

SINGH G, COOPER T A. Minigene reporter for identification and analysis of cis elements and trans factors affecting pre-mRNA splicing. *Biotechniques*, v.41, p. 177 – 181, 2006.

SKORDIS N, PATSALIS PC, BAÇAPOULOU I, SISMANI C, SULATN C, LUMBROSO S. 5alpha- reductase 2 gene mutations in three unrelated patients of Greek Cypriot origin: identification of ancestral founder effect. *Pediatric Endocrinol Metab*, v.18, p. 241-246, 2005.

SOARDI, F. C. Mutações novas nos genes CYP21A2 e CYP11B1 e suas alterações na atividade enzimática [tese de doutorado]. Campinas: Instituto de Biologia; Universidade Estadual de Campinas, 2008.

SPLICE SITE PREDICTION BY NEURAL NETWORK HOMEPAGE. Disponível em: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

STAKNIS, D. e REED, R. SR proteins promote the first specific recognition of Pre-mRNA and are present together with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle in a general splicing enhancer complex. *Molecular and cellular biology*, v. 14, n. 11, p. 7670–82, 1994.

STERNER, D. a.; CARLO, T. e BERGET, S. M. Architectural limits on split genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 26, p. 15081–5, 1996.

STICKELER, E. *et al.* The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich *exon* enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative *exon* v4. *The EMBO journal*, v. 20, n. 14, p. 3821–30, 2001.

STOILOV, P. *et al.* Defects in pre-mRNA processing as causes of and predisposition to diseases. *DNA and cell biology*, v. 21, n. 11, p. 803–18, 2002.

STRACHAN T, WHITE PC. Molecular pathology of steroid 21-hydroxylase deficiency. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol*, v. 40, p. 537-543, 1991.

SUN, H. e CHASIN, L. a. Multiple splicing defects in an *intronic false exon*. *Molecular and cellular biology*, v. 20, n. 17, p. 6414–25, 2000.

SUN, J. S. e MANLEY, J. L. A novel U2-U6 snRNA structure is necessary for mammalian mRNA splicing. *Genes & Development*, v. 9, n. 7, p. 843–854, 1995.

SWAAB, D. Sexual differentiation of the human brain: relevance for gender identity, transsexualism and sexual orientation. *Gynecological Endocrinology*, v. 19, n. 6, p. 301–312, 2004.

TABOAS, M. *et al.* Functional studies of p.R132C, p.R149C, p.M283V, p.E431K, and a novel c.652-2A>G mutations of the CYP21A2 gene. *PloS one*, v. 9, n. 3, p. e92181, 2014.

THIGPEN, A. E. *et al.* Molecular Genetics of Steroid 5 α -Reductase 2 Deficiency. *J. Clin. Invest.*, v. 90, p. 799–809, 1992.

TOSI, M.; STAMM, S. e BARALLE, D. RNA splicing meets genetic testing: detection and interpretation of splicing defects in genetic diseases. *European journal of human genetics : EJHG*, v. 18, n. 6, p. 737–8, 2010.

VEIGA-JUNIOR, N. N. *et al.* Clinical and Laboratorial Features That May Differentiate 46,XY DSD due to Partial Androgen Insensitivity and 5 α -Reductase Type 2 Deficiency. *International journal of endocrinology*, v. 2012, n. 3, p. 964876, 2012.

XIAO X, WANG Z, JANG M, BURGE CB. Coevolutionary networks of splicing cis-regulatory elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.104, n.47, p.18583-18588, 2007.

XING Y, LEE C. Evidence of functional selection pressure for alternative splicing events that accelerate evolution of protein subsequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 102, p. 13526- 1531, 2005.

WALSH PC, MADDEN JD, HARROD MJ, GOLDSTEIN JL, MACDONALD PC AND WILSON JD. Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2. Decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias. *N Engl J Med*, v. 291, p. 944-949, 1974.

WANG, G.-S. e COOPER, T. a. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature reviews. Genetics*, v. 8, n. 10, p. 749–61, 2007.

WANG, Z. e BURGE, C. B. Splicing regulation : From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code Splicing regulation : From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. p. 802–813, 2008.

WAYNE M GEISSLER, *et al.* Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nature genetics*, v. 7, p. 34–39, 1994.

WEDELL A, THEILÉN A, RITZÉN EM, STENGLER B, LUTHAMAN H. Mutation spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, V. 78, P. 1145-1152, 1994.

WHITE PC, SPEISER PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr. Rev*, v. 21, p.245–91, 2000.

WIGLEY WC, PRIHODA JS, MOWSZOWICZ I, MENDONÇA BB, NEW MI, WILSON JD, RUSSEL DW. Natural mutagenesis study of the human steroid 5 α -reductase 2 isoenzyme. *Biochemistry*, v.33, p.1265-1270, 1994.

WILL, C. L. e LÜHRMANN, R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 3, n. 7, p. 1–23, 2011.

WILSON JD. Androgens, Androgen Receptor, and Male Gender Role Behavior. *Hormones and Behavior*, v. 40, p. 358-366, 2001(a).

WILSON JD. The role of 5 α -reduction in steroid hormone physiology. *Reprod Fertil*, v.13, p. 673-678, 2001(b).

WILSON JD, RUSSEL DW. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocr Rev*, v.14, p.577-93, 1993.

WHILEY, P. J. *et al.* Comparison of mRNA splicing assay protocols across multiple laboratories: recommendations for best practice in standardized clinical testing. *Clinical chemistry*, v. 60, n. 2, p. 341–52, 2014.

WITCHEL, S. F. e AZZIZ, R. Mini-Review Congenital Adrenal Hyperplasia. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, v. 24, n. 3, p. 116–126, 2011.

WU, J. Y. e MANIATIS, T. Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell*, v. 75, n. 6, p. 1061–70, 1993.

ZHU YS, SUN GH. 5 α -reductase isoenzymes in the prostate. *J Med Sci*, v. 25, p. 1-12. 2005.

ZHU YS, KATZ MD & IMPERATO-MCGINLEY J. Natural potent androgens: lessons from human genetic models. *Bailliere Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.12, p. 83-113, 1998.

YANG, Y. H. J. *et al.* ZRANB2 localizes to supraspliceosomes and influences the alternative splicing of multiple genes in the transcriptome. *Molecular biology reports*, v. 40, n. 9, p. 5381–95, 2013.

ZAHLER, a M. e ROTH, M. B. Distinct functions of SR proteins in recruitment of U1 small nuclear ribonucleoprotein to alternative 5' splice sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 92, n. 7, p. 2642–6, 1995.

ZHUANG, Y. e WEINER, a M. A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell*, v. 46, n. 6, p. 827–35, 1986.

ZHOU Z, LICKLIDER LJ, GYGI SP, REED R. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature*, v.419, p. 182-185, 2006.



Universidade Estadual de Campinas
Pró-Reitoria de Pesquisa
Comitê de Ética em Pesquisa



CEP, 26/08/14.
(PARECER CEP: N° 434/2006)

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO INTERDISCIPLINAR DOS DISTÚRBIOS DA DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO SEXO”.

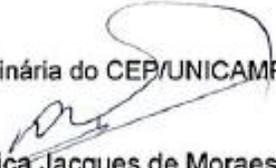
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gil Guerra Junior

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) aprovou o adendo que inclui o subprojeto “EFEITOS DE VARIAÇÕES INTRÔNICAS EM GENES DE ENZIMAS ESTEROIDOGÊNICAS SOBRE O PROCESSO DE *SPLICING*”, com finalidade de doutorado da aluna Flávia Leme de Calais, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/UNICAMP, em 26 de agosto de 2014.


Dra. Mônica Jacques de Moraes
VICE-COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP



Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
10 de julho de 2014.

CIBio – Declaração 07/2014

Identificação:

Doutorado: Flávia Leme de Calais

Projeto: Efeitos de variações intrônicas em genes de enzimas esteroidogênicas sobre o processo de *splicing*

Parecer:

Projeto aprovado pela CIBio/CBMEG sob número 03/2003.

Coordenador: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Edi Lúcia Sartorato", is written over a horizontal line.

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato
Presidente da CIBio/CBMEG - UNICAMP

Tabela: Resumo dos resultados obtidos para cada alteração estudada.

Gene	Mutação estudada	Localização	Fenótipo	Conclusões
SRD5A2	c.548-44T>G	<i>Intron 3</i>	Hipospádia, criptorquidia	Três transcritos: Selvagem ; Exon 4 com 112 pb a menos; E <i>skipping</i> do exon 4
	c.278delG (p.G196S)	<i>Exon 1</i>	Genitália ambígua micropênis, hipospádia	Produção sítio doador de <i>splicing</i> alternativo 38 pb antes do final do <i>exon 1</i>
HSD17B3	c.277+2T>G (c.277+4A>T)	<i>Intron 3</i>	Hiperandrogenismo	<i>Skipping</i> do <i>exon 3</i> , produzindo um mRNA anômalo ou nulo
CYP21A2	c.289+127T>G (p.S202G)	<i>Intron 2</i>	Clitoromegalia	Dois transcritos: Ausência do <i>exon 2</i> e <i>skipping</i> do <i>exon 3</i>
	C.939+5G>A (região 5' e intron 2)	<i>Intron 7</i>	Pubarca precoce	Selvagem não foi produzido: exons mutuamente exclusivos. Ausência do <i>exon 8</i> <i>skipping</i> do <i>exon 7</i>