LUIZA SOUZA RODRIGUES

**Estudo do gene do receptor sensor de cálcio (*CASR*) em
pacientes com distúrbios no metabolismo do cálcio**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Dra. Regina Matsunaga Martin

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rodrigues, Luiza Souza

Estudo do gene do sensor receptor de cálcio (*CASR*) em pacientes com distúrbios no metabolismo do cálcio / Luiza Souza Rodrigues. -- São Paulo, 2012.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Regina Matsunaga Martin.

Descritores: 1.Receptores de detecção de cálcio 2.Mutação 3.Distúrbios do metabolismo do cálcio 4.Hipercalcemia hipocalciúrica familiar 5.Hipocalcemia autossômica dominante

USP/FM/DBD-176/12

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rodrigues, Luiza Souza

Estudo do gene do sensor receptor de cálcio (*CASR*) em pacientes com distúrbios no metabolismo do cálcio / Luiza Souza Rodrigues. -- São Paulo, 2012.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Regina Matsunaga Martin.

Descritores: 1.Receptores de detecção de cálcio 2.Mutação 3.Distúrbios do metabolismo do cálcio 4.Hipercalcemia hipocalciúrica familiar 5.Hipocalcemia autossômica dominante

USP/FM/DBD-176/12

A minha família

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar até a concretização deste desejo profissional, fazendo-Se presente em todas as etapas deste processo.

Aos meus pais, meus irmãos e cunhadas por todo carinho, auxílio e incentivo.

Ao Fred, pela compreensão às minhas ausências, apoio e companheirismo.

À Dra. Regina Matsunaga Martin, pela orientação, amizade, incentivo e dedicação.

À Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça pela oportunidade, gentileza e exemplo de profissionalismo.

À Helena Panteliou Lima Valassi, pela sugestão, incentivo e amizade.

À Dra. Mirian Nishi e a Mariana Funari, pelo conhecimento transmitido em relação à metodologia de MLPA, carinho e paciência.

A todos os funcionários do LIM/42 que de alguma maneira contribuíram para a concretização deste trabalho.

À Nilda, Cida, Rosana e Rosangele pela ajuda oferecida em todas as questões burocráticas da pós-graduação.

À Mariana Tenorio Antunes Reis, Marcela Paula Ferraz e ao Guido de Paula Colares Neto, pelo companheirismo e troca de experiências.

Aos colegas do LIM 42, pela agradável convivência durante o período de realização deste trabalho.

À Dra. Lilia D' Souza-Li e aos colegas do Laboratório de Endocrinologia Pediátrica da UNICAMP (FCM4), em especial Simone e Paula, pelo conhecimento transmitido, auxílio técnico e carinho.

À Tatiane Vilaça pelos seus esforços em realizar os estudos funcionais das mutações identificadas neste estudo e pelo cuidado que teve comigo durante a minha visita em Montreal.

Ao Dr. Geoffrey N. Hendy e aos colegas do *Calcium Research Laboratory* do *Royal Victoria Hospital, Faculty of Medicine of McGill University*, Montreal, pela oportunidade de conhecê-los e vivenciar um pouco do trabalho realizado por vocês.

À Dra. Flávia Rossi pela flexibilidade, compreensão e apoio.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas HC-FMUSP pela compreensão e apoio.

À Célia Maria Gomes, Ana Maria Thomas e Lucilia Milagre (Grupo Fleury), pela flexibilidade e incentivo.

A todos os colegas do Grupo Fleury que me apoiaram durante este período.

Às minhas companheiras Liliane Alves Ribeiro e Leila M. Carvalho (plantonistas no Hospital Alemão Oswaldo Cruz) pelos ajustes nas escalas de plantão.

À Adriana Ramos de Oliveira, minha grande amiga em todas as ocasiões.

À Renata S. B. R. Woloszynek, Liliane Alves Ribeiro, Cintia Tusset, Vanessa Garrido e Janice Mendes, minhas companheiras de jornada em São Paulo. Obrigada pela convivência, carinho e apoio; com certeza vocês tornaram esta trajetória mais suave e divertida.

E, finalmente, a todos da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) pela acolhida.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	1
1.1 Homeostase do Cálcio	1
1.2. Receptores Acoplados a Proteína G (GPCRs)	4
1.3. O Receptor Sensor do Cálcio (CASR)	7
1.4. Mutações no <i>CASR</i> e Doenças Relacionadas	11
1.4.1. Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar (HHF).....	12
1.4.2. Hiperparatireoidismo Neonatal Grave (HPTNG)	13
1.4.3. Hipocalcemia Autossômica Dominante (HAD).....	14
1.4.4. Síndrome de Bartter Tipo V	16
2. Objetivos	19
3. Casuística	20
3.1. Pacientes	20
3.1.1. Critérios de Inclusão para os Pacientes com Exames Laboratoriais Compatíveis com HHF ou HPTNG:	20
3.1.2. Critérios de Inclusão para os Pacientes com Exames Laboratoriais Compatíveis com HAD:.....	21
3.1.3. Critérios de Exclusão:	22
4. Metodologia	25
4.1. Avaliação das Regiões Promotoras e Codificadora do <i>CASR</i>	25
4.2. Rastreamento de Variantes Alélicas não Descritas na Literatura	32
4.2.1. RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).....	32
4.2.2. Genotipagem por PCR em Tempo Real	34
4.3. Avaliação de Deleções ou Duplicações no <i>CASR</i> pela Reação de MLPA (<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>)	39

4.4. Predição de Efeito Funcional para as Mutações Encontradas no <i>CASR</i>	44
5. Resultados	45
5.1. Avaliação de Mutações Inativadoras na Região Codificadora do <i>CASR</i>	45
5.1.1. Predição de Efeito Funcional	54
5.2. Avaliação de Mutações Ativadoras na Região Codificadora do <i>CASR</i> .	55
5.3. Avaliação de Mutações nas Regiões Promotoras P1 E P2 do <i>CASR</i> ...	56
5.4. Avaliação de Deleções ou Duplicações no Gene <i>CASR</i>	57
6. Discussão	58
7. Conclusões	73
8. Anexos	75
9. Referências Bibliográficas	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Homeostase do cálcio extracelular.	2
Figura 2 - Relação entre a secreção de PTH e a concentração do extracelular de cálcio iônico.	3
Figura 3 - Ciclo da proteína G.	6
Figura 4 - Vias de sinalização intracelular do CASR.	8
Figura 5 - Representação esquemática do CASR.	10
Figura 6 - Vias de transporte iônico na região ascendente da alça de Henle e as diferentes etiologias da Síndrome de Bartter.	17
Figura 7 - Sequência nucleotídica de parte da 5'UTR do CASR com destaque para os elementos de resposta presentes nas regiões promotoras P1 e P2.	31
Figura 8 - Princípio da detecção de SNPs por PCR em tempo real com emprego de sondas <i>TaqMan</i> [®]	36
Figura 9 - Representação gráfica da discriminação alélica de amostras por PCR em tempo real utilizando sondas <i>TaqMan</i> [®]	37
Figura 10 - Representação esquemática da reação de MLPA.	40
Figura 11 - Padrão de eletroforese obtido pelo MLPA P177-B1 CASR.	41
Figura 12 - Fórmulas utilizadas para a análise do número de cópias de um determinado gene.	44
Figura 13 - Eletroferogramas com destaque para as mutações pontuais identificadas no CASR (seta vermelha) dos casos-índices da casuística de HHF e HPTNG.	47
Figura 14 - Alinhamento de CASR entre diferentes espécies de vertebrados: homem (hCaR), camundongo (mCaR), cação (SCaR) e fugu (FCaR).	48
Figura 15 - Triagem das mutações p.R25X, p.R69H e p.R544X no CASR por RFLP em familiares dos casos índices.	49
Figura 16 - Pesquisa da mutação p.E519X no CASR nos pais do caso índice 5 (família D) por PCR e sequenciamento automatizado.	50
Figura 17 - Triagem da mutação p.T627I no CASR por PCR em tempo real em familiares do paciente 4 (família C).	51

Figura 18 - Magnitude do sinal gerado pelas sondas TaqMan® durante a PCR em tempo real na pesquisa da mutação p.T627I no <i>CASR</i>	52
Figura 19 - Heredogramas das famílias com HHF e HPTNG.....	53
Figura 20 - Eletroferograma com destaque para a mutação p.E767K no <i>CASR</i> encontrada na paciente 10.....	56
Figura 21 - Eletroforese do ensaio MLPA P177-B1 <i>CASR</i>	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação laboratorial dos pacientes selecionados com HHF.	23
Tabela 2 - Avaliação laboratorial dos pacientes selecionados com HPTNG.	23
Tabela 3 - Avaliação laboratorial dos pacientes selecionados com perfil bioquímico compatível com HAD.	24
Tabela 4 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados na avaliação das regiões promotoras e codificadora do gene <i>CASR</i> e o tamanho esperado dos <i>amplicons</i> obtidos por PCR.	29
Tabela 5 - Enzimas de restrição, variantes alélicas do <i>CASR</i> pesquisadas e possíveis padrões de RFLP.	34
Tabela 6 - Características e localização das mutações identificadas no <i>CASR</i> de pacientes com HHF e HPTNG.	45
Tabela 7 - Avaliação laboratorial dos familiares com HHF revelados pelos estudos de segregação das mutações no <i>CASR</i>	54

Rodrigues LS. Estudo do gene do receptor sensor do cálcio (*CASR*) em pacientes com distúrbios no metabolismo do cálcio [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

O receptor sensor do cálcio (*CASR*) desempenha um importante papel na manutenção da concentração plasmática do cálcio. Desde a sua descrição, mais de 200 mutações foram descritas podendo levar à perda ou ao ganho de função, resultando em situações de hiper ou hipocalcemia, respectivamente. Mutações inativadoras estão associadas à hipercalcemia hipocalciúrica familiar (HHF) e ao hiperparatireoidismo neonatal grave (HPTNG), enquanto que mutações ativadoras estão associadas à hipocalcemia autossômica dominante (HAD) e à Síndrome de Bartter tipo V.

O objetivo deste estudo foi realizar o diagnóstico molecular, por meio da análise do gene *CASR*, em pacientes com HPTNG, HHF, hipocalcemia com PTH inapropriadamente normal ou baixo e hipoparatiroidismo idiopático com hipercalcúria na vigência de tratamento.

Para cada criança (n = 2) com diagnóstico clínico e laboratorial de HPTNG, uma mutação “nonsense” em homozigose foi identificada na região codificadora do *CASR* (p.E519X e p.R544X). O estudo molecular dos pais das crianças mostrou tratar-se de casos herdados caracterizando-os como indivíduos com HHF e possibilitou o aconselhamento genético para estas famílias.

Mutações pontuais em heterozigose na região codificadora do *CASR* (p.R25X, p.R69H, p.T627I) foram detectadas em três dos quatro pacientes selecionados com diagnóstico inicial de hiperparatireoidismo primário e bioquímica compatível com hipercalcemia hipocalciúrica. Estes achados constituem a base molecular da HHF e permitiram o rastreamento de outros casos de HHF nas respectivas famílias com impacto na abordagem terapêutica dos mesmos.

Na paciente em que não foi detectada nenhuma mutação na região codificadora do *CASR*, o estudo prosseguiu com a pesquisa de alterações no número de cópias gênicas e de mutações nas regiões promotoras P1 e P2 como possíveis causas do fenótipo em questão. O resultado destas abordagens foi normal.

Dos quatro pacientes selecionados com quadro de hipoparatiroidismo idiopático e hipercalcúria na vigência de tratamento, em apenas uma, a causa molecular foi definida por mutação “missense” em heterozigose na região codificadora do *CASR* (p.E767K) repercutindo positivamente no seu tratamento. Nos demais casos (n = 3), a pesquisa de alterações no número de cópias gênicas e de mutações nas regiões promotoras P1 e P2 também resultou normal.

Descritores: Receptores de detecção de cálcio, mutação, distúrbios do metabolismo do cálcio, hipercalcemia hipocalciúrica familiar, hipocalcemia autossômica dominante.

Rodrigues LS. Study of the calcium-sensing receptor gene (*CASR*) in patients with calcium metabolism disorders [dissertation]. Sao Paulo: Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2012.

The calcium sensing receptor (*CASR*) plays an important role in maintaining the plasma concentration of calcium. From its first description, more than 200 mutations have been described leading to loss or gain of function, resulting in conditions of either hyper or hypocalcemia, respectively. Inactivating mutations are associated with familial hypocalciuric hypercalcemia (FHH) and neonatal severe hyperparathyroidism (NSHPT), whereas activating mutations are associated with autosomal dominant hypocalcemia (ADH) and type V Bartter's syndrome.

The aim of this study was to perform the molecular diagnosis, by analyzing the *CASR* gene, in patients with NSHPT, FHH, hypocalcemia with inappropriately normal or low PTH and idiopathic hypoparathyroidism with hypercalciuria during treatment.

In every child ($n = 2$) with clinical and laboratory diagnosis of NSHPT, a nonsense mutation in homozygosity was identified in the coding region of the *CASR* (p.E519X and p.R544X). The molecular analysis of the child's parents showed that they were inherited cases qualifying them as individuals with FHH and it enabled a genetic counseling for these families.

Point mutations in heterozygosity in the coding region of the *CASR* (p.R25X, p.R69H, p.T627I) have been detected in three out of the four selected patients with an initial diagnosis of primary hyperparathyroidism and biochemistry compatible with hypocalciuric hypercalcemia. These findings are the molecular basis of FHH and allowed the screening of other FHH cases in these families impacting on their therapeutic approach. In patients where no mutation in the coding region of the *CASR* was detected, the study went on researching for changes in the number of gene copies and mutations in P1 and P2 promoter regions as possible causes to the phenotype in question. The result of these approaches has been normal.

The molecular cause has been defined as missense mutation in heterozygosity in the coding region of the *CASR* (p.E767K) in only one out of the four selected patients with idiopathic hypoparathyroidism and hypercalciuria during treatment, with a positive impact on her treatment. In the other cases ($n = 3$), the search for changes in the number of gene copies and mutations in the P1 and P2 promoter regions was normal.

Descriptors: Calcium-sensing receptor, mutation, calcium metabolism disorders, familial hypocalciuric hypercalcemia, autosomal dominant hypocalcemia.

1. INTRODUÇÃO

1.1 HOMEOSTASE DO CÁLCIO

O íon cálcio apresenta um papel de destaque na fisiologia celular humana. É o mineral mais abundante no organismo, sendo que aproximadamente 98% dele encontram-se no esqueleto e, o restante se divide entre o fluido extracelular e o meio intracelular, onde desempenha funções vitais. O cálcio intracelular, que é mantido em concentrações 10.000 vezes mais baixas que o cálcio extracelular, funciona como segundo mensageiro dentro da célula regulando processos diversos, tais como, motilidade, diferenciação, proliferação, morte celular programada, contração muscular e secreção hormonal; enquanto que o cálcio plasmático age na coagulação sanguínea, adesão celular, manutenção da integridade do esqueleto e na regulação da excitabilidade celular (1).

O cálcio sérico total é a soma da sua fração livre ou ionizada (50%), biologicamente ativa, com a sua fração ligada (50%), que por sua vez, pode estar ligada a compostos não proteicos, como: fosfato, citrato, sulfato e bicarbonato (5%), ou a proteínas plasmáticas (45%), principalmente a albumina.

A concentração extracelular de cálcio é mantida dentro de valores estreitos, sob regulação de um sistema homeostático eficiente composto pelas glândulas paratireoides, ossos, rins e o intestino - **Figura 1**.

Figura 1- Homeostase do cálcio extracelular.

Na natureza, a vitamina D pode ser encontrada sob a forma de ergocalciferol (vitamina D₂) ou colecalciferol (vitamina D₃). O ergocalciferol é obtido pelo homem através da alimentação enquanto o colecalciferol pode ser obtido não só pela alimentação mas também, sintetizado através da conversão do 7-dihidrocolesterol em vitamina D₃ pela ação dos raios ultravioletas sobre a pele. Ambas as formas são hidroxiladas no fígado dando origem à 25OH vitamina D; subsequentemente, ocorre uma segunda hidroxilação nos rins originando sua forma biologicamente ativa, a 1,25(OH)₂ vitamina D ou calcitriol. Enquanto o calcitriol aumenta tanto a absorção intestinal do cálcio como sua reabsorção óssea, o paratormônio (PTH) produzido pelas paratireoides atua aumentando a reabsorção óssea e tubular de cálcio, além de estimular a hidroxilação renal gerando mais calcitriol.

O sucesso deste sistema homeostático se deve, principalmente, à capacidade que o receptor sensor de cálcio (CASR) possui de perceber pequenas, porém fisiologicamente significativas alterações nas concentrações plasmáticas do cálcio, possibilitando assim, uma resposta adequada que ajuste sua concentração para dentro dos limites de normalidade através da secreção de PTH (2) - **Figura 2**.

Figura 2 - Relação entre a secreção de PTH e a concentração do extracelular de cálcio iônico.

Dessa forma, na vigência de hipercalcemia, os receptores sensores de cálcio presentes nas células paratireoidianas reduzem a secreção de PTH, enquanto os receptores sensores de cálcio presentes nos túbulos renais reduzem a reabsorção de cálcio; concomitantemente, a redução dos níveis de PTH promoverá a redução da mobilização do cálcio a partir do osso e da síntese da vitamina D ativa $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ com consequente

redução da absorção do cálcio pelo intestino, resultando em normalização da calcemia (3). De maneira oposta, na vigência de hipocalcemia, os receptores sensores de cálcio paratireoidianos determinam aumento dos níveis de PTH enquanto os receptores sensores de cálcio renais aumentam a reabsorção de cálcio permitindo a correção da calcemia (3).

Nos anos 80, na Suécia, *Akeström et al.* apresentaram evidências da existência de um canal que regulasse os níveis de cálcio extracelular, no entanto, foi apenas em 1993 que *Brown et al.*, em Boston, conseguiram clonar o receptor sensor de cálcio a partir de células paratireoidianas bovinas o que permitiu que em 1995, no Japão, *Aida et al.* pudessem clonar o *CASR* humano a partir de células renais (4-6). Para a surpresa da comunidade científica, ao invés de um canal iônico, tratava-se de um receptor de membrana pertencente à família C dos receptores acoplados à proteína G (GPCR).

1.2. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G (GPCRs)

Os GPCRs são um grupo de receptores classificados em mais de 100 subfamílias de acordo com a homologia de sua sequência, estrutura dos ligantes e função do receptor (7). Estruturalmente, todos os GPCRs apresentam um domínio extracelular amino terminal, sete domínios transmembrana, e um domínio intracelular carboxi terminal. Apesar dessa similaridade, os domínios extra e intracelulares sofrem grande variação de

tamanho de acordo com o receptor, o que está associado a uma diversidade estrutural e funcional (8).

Os GPCRs podem ser ativados por ligantes como, por exemplo, hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento, íons, odorantes e fótons de luz (9). Uma vez ativada, a proteína G intermedeia o processo de sinalização que é iniciado com a ativação do GPCRs e termina com a resposta mediada pela ação de moléculas efetoras que incluem canais iônicos e enzimas que, por sua vez, geram segundos mensageiros. Diferentes classes de GPCRs ligam-se exclusivamente ou preferencialmente a uma proteína G específica. Diferenças na estrutura e na sequência desses receptores contribuem para o reconhecimento de um ligante e para o acoplamento específico a uma determinada proteína G (7).

As proteínas G são heterotriméricas constituídas pelas subunidades α , β e γ . A subunidade α se liga aos nucleotídeos guanina, enquanto as subunidades β e γ formam um dímero através de uma ligação não covalente, mas suficientemente forte para funcionar como uma unidade. Um aspecto funcional essencial no que diz respeito às proteínas Gs é o ciclo da GTPase – **Figura 3**.

Essas proteínas agem como interruptores, ou seja, na presença da conformação GDP + subunidades α , β e γ , o mecanismo de transdução do sinal está “desligado” e a interação com o efetor não se concretiza – **Figura 3 [1]**. Uma vez que o agonista se liga ao GPCR, este receptor age cataliticamente no sentido de liberar o GDP que estava fortemente ligado à subunidade $G\alpha$, permitindo a ligação do GTP a esta subunidade – **Figura 3**

[2,3]. Esta ligação faz com que a subunidade $G\alpha$ assuma uma conformação “ligada”, permitindo sua dissociação do complexo $\beta\gamma$ e a modulação da atividade do efetor – **Figura 3** [4]. As subunidades $\beta\gamma$ também podem modular a atividade de determinados efetores. Devido à atividade GTPásica intrínseca de todas as subunidades $G\alpha$, o complexo $G\alpha/GTP$ é hidrolisado a $G\alpha/GDP$ que, por sua vez, se liga com grande afinidade ao complexo $\beta\gamma$ livre e dessa forma, retornar ao seu estado “desligado” - **Figura 3** [5,1] (7, 10, 11).

Figura 3 - Ciclo da proteína G.

[1] Representação da proteína G na sua conformação inativada. [2] Ligação do GPCR ao seu agonista induzindo uma mudança conformacional no receptor permitindo que haja troca do GDP por GTP . [3] Substituição de GDP por GTP na sua subunidade α da proteína G. [4] Dissociação da subunidade α do dímero $G\beta\gamma$ e GPCR. [5] Hidrólise da molécula GTP pela subunidade $G\alpha$ (que possui atividade enzimática de quinase) tornando-se novamente GDP .

Mutações nos GPCRs foram observadas e relacionadas a um amplo espectro de doenças hereditárias e somáticas, tornando-os inativos ou fazendo com que se mantenham constitutivamente ativados. Além disso, estes defeitos podem resultar em alterações de sua expressão na superfície celular ou ainda interferir na ligação ao agonista (7).

1.3. O RECEPTOR SENSOR DO CÁLCIO (CASR)

O CASR pertence a subfamília 3/C dos GPCRs que compreende: receptores metabotrópicos do glutamato, receptores GABA_B, um subgrupo de receptores de ferormônios e receptores gustativos. Com exceção dos receptores GABA_B, todos eles possuem além dos sete domínios transmembrana característicos dos GPCRs, um extenso domínio extracelular (500-600 resíduos) que exhibe uma característica estrutural de *Venus flytrap* rico em cisteína (12, 13).

Embora o cálcio seja o principal ligante fisiológico do CASR, ele possui afinidade *in vitro* a uma variedade de cátions bi e trivalentes, e poliaminas, mas a relevância destas interações ainda não está totalmente esclarecida (3). Na presença do agonista, o CASR se homodimeriza através de seus domínios extracelulares por ligações dissulfetos envolvendo as cisteínas 129 e 131. O sensor ativado pode seguir duas vias: uma intermediada pela proteína Gq α e outra pela Gi α - **Figura 4**.

A proteína Gq α tem como efetores, as fosfolipases C, A2 e D capazes de gerar inositol trifosfato (IP3) e 1,2 diacilglicerol (DAG) com mobilização de

cálcio intracelular, produção de ácido araquidônico (AA) e ácido fosfatídico (PA). O aumento de cálcio intracelular implica na ativação da fosfoquinase C (PKC) que, por sua vez, ativa as JKN (quinases amino terminais Jun) e a via MAPK/ERK (quinases reguladoras de sinal extracelular) culminando na fosforilação dos ERKs 1 e 2 (12, 14, 15) - **Figura 4**.

Caso o sinal se propague através proteína $G_{i\alpha}$, ocorre inibição da adenilato ciclase (AC) com consequente redução da geração de AMP cíclico e ativação tanto de tirosino quinases da família *Src*, como da via MAPK/ERK (15, 16) - **Figura 4**.

Figura 4 - Vias de sinalização intracelular do CASR.

A ligação do CASR ao seu agonista ativa as proteínas G_i e G_q . Enquanto proteína G_i promove a inibição da adenilato ciclase (AC), a proteína G_q ativa a Fosfolipase C (PLC), a Fosfolipase A2 citosólica ($cPLA_2$), a Fosfatidilinositol 3 quinase (PI_3K), a Fosfatidilinositol 4 quinase (PI_4K) e a fosfolipase D (PLD). Esses efetores induzem o aumento da produção de: inositol trifosfato (IP_3) e 1,2 diacilglicerol (DAG); ácido araquidônico (AA) e bifosfato 4,5 fosfatidilinositol (PIP_2) que, por sua vez, estimulam a proteína quinase C (PKC), Akt e as quinases p38, JNK e ERK. Finalmente a ativação da fosfolipase D (PLD) leva à produção de ácido fosfatídico (PA). Adaptado de Ward, 2004.

O CASR é altamente glicosilado. Embora pareça não ser essencial para a sua atividade biológica, esta glicosilação é importante para a sua expressão na membrana celular (17, 18). Além de estar expresso nas

células paratireoidianas e nos túbulos renais, onde atua na regulação da homeostase do cálcio, este receptor também está expresso em outros tecidos, tais como ossos, intestino, mamas, pâncreas, diversas áreas do sistema nervoso central, queratinócitos, dentes e etc, onde desempenha funções outras, sendo já descrito o seu envolvimento na proliferação e diferenciação celulares (19).

O gene do *CASR* humano está localizado na região 3q13.3-21 e é composto por sete éxons; sua região codificadora estende-se por 3.234 pares de base (pb) que estão distribuídos do éxon 2 ao 7, visto que o primeiro não é transcrito. Sua proteína consiste de 1.078 aminoácidos (aa), dos quais 612 compõem o seu longo domínio extracelular; 250, seu domínio de sete alças transmembrana e 216, o seu domínio intracelular - Figura 5. Este gene é altamente conservado entre as espécies e seu produto chega a exibir 60-70% de homologia com a proteína correspondente produzida pelo salmão, que se encontra evolutivamente afastado do homem (17).

Foram caracterizadas duas regiões promotoras do *CASR* que passaram a ser denominadas como P1 e P2; elas apresentam respectivamente sequências TATA e CAAT *boxes* e uma região rica em GC e são responsáveis pela produção de pelo menos dois transcritos alternativos. A região 5' não traduzida (5' UTR) do *CASR*, relacionada à região P1, foi denominada de éxon 1A enquanto a 5' UTR relacionada à região P2 foi denominada de éxon 1B; no entanto, ambos os transcritos produzem a mesma proteína com 1078 aa (20).

Figura 5 - Representação esquemática do CASR.

Em destaque, encontram-se os aa nos quais foram descritas mutações ativadoras (★), duas mutações ativadoras (⊙), uma mutação inativadora (⊙), duas mutações inativadoras (⊙) e polimorfismos (●). Adaptado de D'Souza-Li, 2006.

Em 2002, *Canaff et al.* demonstraram que a vitamina D ativa [1,25(OH)₂D₃] era capaz de ativar ambas as regiões P1 e P2 do CASR através da presença de elementos de resposta a vitamina D (VDREs) (21). E em 2005, o mesmo grupo caracterizou a presença de elementos responsivos a citocinas pró-inflamatórias (elementos κB) nas regiões P1 e P2 do CASR (22).

1.4. MUTAÇÕES NO CASR E DOENÇAS RELACIONADAS

Desde a descrição do gene *CASR* humano, mais de 200 mutações foram descritas podendo resultar em perda ou ganho de função. A maioria das mutações é do tipo *missense*, mas também estão descritas mutações do tipo *nonsense*, alterações nos sítios de *splice*, inserções e deleções, sendo que não há regiões *hot spots* (3). Mutações com perda de função estão associadas à **hipercalcemia hipocalciúrica familiar** (heterozigose) e ao **hiperparatireoidismo neonatal grave** (heterozigose ou homozigose), enquanto que as mutações com ganho de função estão associadas à **hipocalcemia autossômica dominante** (HAD) e à **Síndrome de Bartter tipo V** (3, 15, 23, 24).

A identificação de alterações moleculares no gene do receptor sensor de cálcio além de possibilitar o diagnóstico do paciente, permite o rastreamento familiar e o aconselhamento genético. Porém, o interesse no estudo do funcionamento e da atividade deste receptor não se deve apenas à identificação e ao entendimento de todas estas patologias, mas também ao fato de que ele representa um alvo terapêutico em potencial para doenças do metabolismo ósseo e mineral. Isto permitiu o desenvolvimento de drogas calciomiméticas empregadas para o controle da hipercalcemia em doentes renais crônicos e tem permitido o desenvolvimento de calciolíticos com potencial emprego para pacientes com osteoporose trazendo novas esperanças e alternativas aos pacientes (3). A referência correta é a 3!

1.4.1. HIPERCALCEMIA HIPOCALCIÚRICA FAMILIAR (HHF)

A hipercalcemia hipocalciúrica familiar (HHF) é uma doença autossômica dominante caracterizada por uma modesta elevação na concentração plasmática do cálcio com relativa hipocalciúria e níveis de PTH inapropriadamente normais ou discretamente elevados (25, 26). Pacientes com HHF são geralmente assintomáticos ou podem apresentar sintomas inespecíficos tais como, fadiga, dores articulares, fraqueza e dores de cabeça; sendo assim, os pacientes costumam ser investigados após a detecção de hipercalcemia persistente em exame de rotina (3). Pacientes portadores deste distúrbio do metabolismo mineral costumam apresentar a razão do *clearance* renal de cálcio sobre o *clearance* de creatinina inferior a 0,01, enquanto que pacientes com outras causas de hiperparatireoidismo primário geralmente apresentam valores maiores que 0,01 (27).

Trata-se de uma condição benigna, que costuma ser confundida com as formas clássicas de hiperparatireoidismo primário (HPP), na qual a princípio não está indicado o tratamento cirúrgico, devendo o paciente ser orientado a evitar situações que possam agravar a sua hipercalcemia (26).

Embora o principal gene candidato para pacientes com HHF seja o *CASR*, em cerca de 1/3 dos casos não são encontradas mutações em sua região codificadora.

Particularmente em três famílias representativas, estudos de ligação apontam para a existência de outros dois *loci* relacionados à etiologia da HHF: as regiões 19p13.3 (28) e 19q13.3 (29, 30) também conhecida como

variante Oklahoma. Na primeira família foram estudados 22 indivíduos portadores de HHF pertencentes a três gerações; enquanto nas segunda e terceira famílias, 18 indivíduos portadores de HHF pertencentes a quatro gerações e 24 indivíduos portadores de HHF pertencentes a três gerações, respectivamente. Em outras palavras, outros genes, localizados no cromossomo 19, devem estar envolvidos na manutenção plasmática do cálcio. Atualmente admite-se que a hipercalcemia hipocalciúrica familiar seja uma doença heterogênea que consiste em três tipos definidos: HHF1, HHF2 e HHF3 os quais estão correlacionados com alterações nas regiões cromossômicas 3q13.3-21, 19p13.3 e 19q13.3, respectivamente (29, 30).

Outra hipótese ainda não testada é de que mutações na região promotora do *CASR* possam resultar em aumento ou redução da expressão desta proteína (31). No entanto, não há registro na literatura de mutações nas regiões promotoras do *CASR*, tampouco têm sido explorados mecanismos de deleção e amplificação gênica.

1.4.2. HIPERPARATIREOIDISMO NEONATAL GRAVE (HPTNG)

O hiperparatireoidismo neonatal grave (HPTNG) representa uma forma mais grave da hipercalcemia hipocalciúrica familiar cursando com níveis de cálcio e PTH bem mais elevados (32). Pacientes portadores de HPTNG apresentam hiperplasia de todas as paratireoides e sintomas que incluem: hipotonia, desnutrição, grave desmineralização óssea e distúrbios respiratórios associados a fraturas de costelas (33). O quadro pode ser

dramático, de evolução rápida, e até mesmo fatal caso a paratireoidectomia total não seja realizada nas primeiras semanas de vida; entretanto, é importante destacar que alguns relatos descrevem uma forma de HPTNG onde a hipercalcemia não era tão elevada e/ou transitória (34). Crianças com HPTNG apresentam mutações inativadoras no *CASR* em homozigose ou em heterozigose composta. Excepcionalmente já foram descritas mutações em heterozigose cujo fenótipo é atribuído ao fenômeno de efeito dominante negativo (35).

Neste caso a utilização de testes moleculares além de confirmar o diagnóstico do caso índice possibilita a avaliação do genótipo de seus familiares, sendo fundamental para a realização do aconselhamento genético e rastreamento familiar.

1.4.3. HIPOCALCEMIA AUTOSSÔMICA DOMINANTE (HAD)

A hipocalcemia autossômica dominante (HAD) é uma doença rara decorrente de mutações ativadoras no *CASR*. Nesta condição, concentrações extracelulares de cálcio abaixo do normal (hipocalcemia) são capazes de ativar grande parte dos *CASR* localizados nas paratireoides e rins resultando, respectivamente, em níveis baixos ou inapropriadamente normais de PTH e aumento da calciúria (36). Assim, de acordo com o grau de ativação promovido pelas mutações, variados níveis de hipocalcemia são encontrados nestes pacientes. Como os sintomas clínicos da doença são, em grande parte, decorrentes da hipocalcemia, suas manifestações iniciais

podem surgir precocemente já no período neonatal ou mais tardiamente na vida adulta (36).

Pacientes com hipocalcemia hipercalcêmica por mutação ativadora no *CASR* ao receberem o tratamento convencional para o hipoparatiroidismo, com o emprego de suplementos à base de cálcio e vitamina D, costumam evoluir com hipercalcemia predispondo ao desenvolvimento indesejado de nefrocalcinose e nefrolitíase. Por isso, recomenda-se a utilização de tiazídicos por aumentarem a reabsorção tubular de cálcio e, que o tratamento tenha por objetivo a eliminação dos sintomas de hipocalcemia e não necessariamente na sua normalização (37, 38).

Diferentemente da HHF, não há valores de corte em relação aos resultados do *clearance* de cálcio/creatinina para sugerir o diagnóstico de hipocalcemia hipercalcêmica. No entanto, *Yamamoto et al.* observaram que estes pacientes, ao diagnóstico, apresentam *clearance* de cálcio/creatinina inapropriadamente normal para a respectiva calcemia (38).

1.4.4. SÍNDROME DE BARTTER TIPO V

A Síndrome de Bartter é um transtorno bastante heterogêneo caracterizado por: alcalose metabólica, diminuição na reabsorção renal de sódio e cloreto, hipocalemia, e concentrações elevadas de renina e aldosterona acompanhadas por pressão arterial normal.

Sua etiologia compreende mutações inativadoras em genes que codificam proteínas responsáveis pelo transporte iônico na região ascendente da alça de Henle e no túbulo contornado distal. Os tipos I, II e III da doença correspondem, respectivamente, a defeitos nos canais iônicos NKCC2, ROMK e CLC-Kb. O tipo IV tem como base molecular, a produção de bartina defeituosa que é a subunidade β do canal CLC-Kb (39). Finalmente, o tipo V refere-se a mutações ativadoras no *CASR* (p.K29E, p.L125P, p.C131W e p.A843E) que ocorrem em heterozigose (40-42) -

Figura 6.

Figura 6 - Vias de transporte iônico na região ascendente da alça de Henle e as diferentes etiologias da Síndrome de Bartter.

A reabsorção de cloreto, através da membrana luminal, ocorre via co-transportador de Na^+ - K^+ - 2Cl^- (NKCC2). Este co-transportador é controlado pelas concentrações intracelulares de sódio e cloreto que, por sua vez, dependem das atividades da Na^+ - K^+ -ATPase e do ClC-Kb, respectivamente. Os canais de potássio ROMK, ao bombear o potássio para o lúmen, contribuem para o funcionamento do NKCC2. O potencial eletro positivo do lúmen, gerado pela entrada do cloreto na célula e saída do potássio, direciona o transporte paracelular do cálcio e do magnésio do lúmen para o sangue. Adaptado de *Zelikovic, 2003*.

Nesta condição, o CASR mutado, quando expresso na membrana basolateral da porção ascendente da alça de Henle, parece inibir a atividade dos canais de potássio ROMK levando à diminuição da voltagem transepitelial, com consequente redução da reabsorção de cloreto de sódio, cálcio e magnésio resultando em perda salina (40, 41) - **Figura 6**.

Na Síndrome de Bartter tipo V, os pacientes apresentam uma associação entre os sintomas da hipocalcemia autossômica dominante e da síndrome de Bartter, isto é, diminuição da secreção de PTH, hipocalcemia, nefrocalcinose, hipomagnesemia, prejuízo na reabsorção de cloreto, hiperaldosteronemia e hipocalemia. A apresentação clínica pode ocorrer no período neonatal levando ao parto prematuro, ou nos primeiros anos de vida com poliúria, polidipsia, isostenúria ou hipostenúria, além de episódios frequentes de desidratação. No momento, a base do tratamento inclui reposição de líquidos e eletrólitos, a utilização de medicamentos na tentativa de amenizar a hipocalemia crônica e frequentemente é necessária a reposição de magnésio (3, 41).

2. OBJETIVOS

- ✓ Identificar mutações inativadoras na região codificadora do *CASR* em pacientes que apresentem exames laboratoriais compatíveis com HHF ou HPTNG.
- ✓ Identificar mutações ativadoras na região codificadora do *CASR* em pacientes com hipoparatiroidismo idiopático que apresentaram hipercalciúria na vigência de tratamento com cálcio e vitamina D e em pacientes com hipocalcemia e PTH inapropriadamente normal ou baixo.
- ✓ Avaliar as regiões promotoras P1 e P2 do *CASR* nos casos em que não foram detectadas mutações na região codificadora.
- ✓ Avaliar a ocorrência de deleções ou duplicações no gene *CASR* nos casos em que não foram detectadas mutações nas regiões codificadora e promotoras.

3. CASUÍSTICA

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolo número 0022/10 (registro *online* número 5372).

Todos os pacientes, seus familiares e voluntários pertencentes ao grupo controle, envolvidos neste estudo, concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido – **Anexo 1**.

Todas as dosagens bioquímicas e hormonais foram realizadas respectivamente nos Laboratório Central e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 do HC-FMUSP.

3.1. PACIENTES

3.1.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO PARA OS PACIENTES COM EXAMES LABORATORIAIS COMPATÍVEIS COM HHF OU HPTNG:

- ✓ Cálcio total sérico > 10,2 mg/dL (VR: 8,6 a 10,2 mg/dL) e/ou cálcio iônico sérico > 5,3 mg/dL (VR: 4,6 a 5,3 mg/dL). Para pacientes com suspeita de HHF, preconizamos a realização de, pelo menos, duas medidas de cálcio total e cálcio iônico;

- ✓ PTH inapropriadamente normal ou elevado (PTH > 30 pg/mL para VR: 11 a 62 pg/mL e PTH > 40 pg/mL para VR: 16 a 87 pg/mL) (25, 26);
- ✓ *Clearance* de cálcio/creatinina < 0,01 com base em amostra de urina de 24 horas ou amostra isolada de urina;

3.1.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO PARA OS PACIENTES COM EXAMES LABORATORIAIS COMPATÍVEIS COM HAD:

- ✓ Pelo menos duas dosagens de cálcio total sérico < 8,6 mg/dL (VR: 8,6 a 10,2 mg/dL) e/ou cálcio iônico sérico < 4,6 (VR: 4,6 a 5,3 mg/dL) ao diagnóstico com PTH inapropriadamente baixo (PTH < 30 pg/mL para VR: 11 a 62 pg/mL e PTH < 40 pg/mL para VR: 16 a 87 pg/mL) (25, 26);
- ✓ Pacientes com diagnóstico de hipoparatiroidismo idiopático que apresentem hipercalcúria (Ca u > 4 mg/kg/dia) na vigência de tratamento com cálcio e vitamina D;

3.1.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

- ✓ Pacientes com ritmo de filtração glomerular (RFG) de creatinina < 30 mL/min/1,73 m²; calculado pelo MDRD (<http://mdrd.com/>) (43);
- ✓ Pacientes em uso de diuréticos de alças, tiazídicos ou lítio, no caso de seleção de indivíduos com HHF ou HPTNG;

Com base nos critérios descritos acima, foram estudados dez pacientes dos quais, quatro apresentavam quadro clínico e laboratorial compatível com HHF, dois com HPTNG e quatro tinham diagnóstico de hipoparatiroidismo idiopático e apresentavam hipercalcúria na vigência de tratamento com cálcio e vitamina D - **Tabelas 1,2 e 3.**

Tabela 1 - Avaliação laboratorial dos pacientes selecionados com HHF.

Casos isolados			Idade (anos)	Sexo	Ca (mg/dL)	Ca i (mg/dL)	Cr (mg/dL)	Ca u (mg/24 h)	Cr u (mg/24 h)	Cl Ca/Cr	PTH (pg/mL)	P (mg/dL)	25 OHD (ng/mL)
Paciente 1			85	F	9,5-11,4	5,3-5,8	0,7-0,9	10	710	0,001	46-84	3,3-3,6	21-28
Casos familiares			Idade (anos)	Sexo	Ca (mg/dL)	Ca i (mg/dL)	Cr (mg/dL)	Ca u (mg/vol)	Cr u (mg/vol)	Cl Ca/Cr	PTH (pg/mL)	P (mg/dL)	25 OHD (ng/mL)
Paciente	Família	CI											
2	A	II.1	31	F	9,8-10,3	5,4-6,0	0,7-0,9	201	1390	0,011	42-73	2,3-3,7	11-38
3	B	II.7	55	F	10,2-11,8	5,6-6,1	0,9-1,2	85	900	0,009	68-199	2,7-3,6	16-28
4	C	II.1	32	M	10,3-11,4	5,4-6,5	0,8-0,9	50	1080	0,004	53-105	2,1-3,2	16-32
Valores de Referência					8,6-10,2	4,6-5,3	0,5-0,9 (F) 0,7-1,2 (M)	-	-	-	16-87	2,3-4,6	> 30

CI: caso índice; Ca: cálcio sérico total; Ca i: cálcio sérico iônico; Cr: creatinina sérica; Ca u: calciúria; Cr u: creatinúria; Cl Ca/Cr: Clearance de cálcio/creatinina; P: fósforo sérico; 25OHD: 25 hidroxí-vitamina D. F: sexo feminino; M: sexo masculino.

Tabela 2 - Avaliação laboratorial dos pacientes selecionados com HPTNG.

Casos familiares			Idade (meses)	Sexo	Ca (mg/dL)	Ca i (mg/dL)	Cr (mg/dL)	Ca u (mg)	Cr u (mg)	Cl Ca/Cr	PTH (pg/mL)	P (mg/dL)	25 OHD (ng/mL)
Paciente	Família	CI											
5	D	II.2	1	F	18,1	10,6	0,3	-	-	-	1036 ^a	4,1	-
6	E	II.1	5	F	21,8	13,3	0,1	1,7 (i)	0,8 (i)	0,0001	495 ^b	1,5	18
Valores de Referência					9,0-11,0	4,8-5,5	0,2-0,4	-	-	-	11-62 ^a 16-87 ^b	5,0-10,8	> 30

CI: caso índice; Ca: cálcio sérico total; Ca i: cálcio sérico iônico; Cr: creatinina sérica; Ca u: calciúria; Cr u: creatinúria; Cl Ca/Cr: Clearance de cálcio/creatinina; P: fósforo sérico; 25OHD: 25 hidroxí-vitamina D; (i): amostra de urina isolada. F: sexo feminino

Tabela 3 - Avaliação laboratorial dos pacientes selecionados com perfil bioquímico compatível com HAD.

Casos isolados (ao diagnóstico)	Idade (anos)	Sexo	Ca (mg/dL)	Ca i (mg/dL)	Cr (mg/dL)	Ca u (mg/kg/24 h)	PTH (pg/mL)	P (mg/dL)
7	28	F	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	33	M	7,2	3,1	0,9	2,2	53 ^a	6,8
9	32	M	5,0-5,4	2,7-2,9	1,1-1,2	ND	<11 ^a	6,0-7,8
10	76	F	6,7-7,8	3,6-4,4	0,9-1,0	ND	13-28 ^b	5,7-8,1
Casos isolados (em tratamento*)	Idade (anos)	Sexo	Ca (mg/dL)	Ca i (mg/dL)	Cr (mg/dL)	Ca u (mg/kg/24 h)	PTH (pg/mL)	P (mg/dL)
7	35	F	6,9-8,9	3,9-4,6	0,5-0,7	0,5-2,7	<16 ^b	4,3-5,8
8	39	M	7,7-8,5	4,1-4,7	0,7-0,8	3,1-6,0	<16 ^b	4,9-5,6
9	36	M	8,9-9,9	4,5-4,9	1,2-1,3	3,2-5,5	<16 ^b	4,8-5,7
10	77	F	7,0-7,9	3,8-3,9	0,7-0,8	ND	9-21 ^b	3,1-5,6
Valores de Referência			8,6-10,2	4,6-5,3	0,5-0,9 (F) 0,7-1,2 (M)	1,5-4,0	11-62^a 16-87^b	2,3-4,6

Ca: cálcio sérico total; **Ca i:** cálcio sérico iônico; **Cr:** creatinina sérica; **Ca u:** calciúria; **P:** fósforo sérico. **F:** sexo feminino; **M:** sexo masculino.

*HCTZ+CaCO₃+calcitriol; **ND:** não disponível.

4. METODOLOGIA

4.1. AVALIAÇÃO DAS REGIÕES PROMOTORAS E CODIFICADORA DO *CASR*

Foram coletados 10 mL de sangue de cada paciente, em dois tubos contendo anticoagulante EDTA 25 mmol/L (capacidade de 5 mL), a partir dos quais se extraiu o DNA genômico. Alternativamente, o DNA foi obtido a partir de células provenientes de raspado de mucosa oral.

A extração de DNA foi realizada de acordo com o procedimento padronizado pelo Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM 42, baseado na técnica *salting out* adaptada por *Miller et al.* (44), conforme descrito a seguir.

Inicialmente, todo o volume de sangue foi transferido para um tubo cônico e acrescentou-se 45 mL de tampão de lise de hemácias (NH_4Cl 114 mmol/L; NH_4HCO_3 1 mmol/L). Após homogeneização, esta solução foi colocada em banho de gelo por 30 minutos, centrifugada por 15 minutos a 5.000 g a 4°C com posterior descarte do sobrenadante. Esta etapa foi realizada duas vezes para que, em seguida, fosse realizada a etapa de lise de leucócitos utilizando 5 mL de um novo tampão de lise (NaCl 150 mmol/L; Tris HCl 10 mmol/L pH 8,0; EDTA 10 mmol/L pH 8,0), SDS 10% e proteinase K (160 mg/mL). Depois de homogeneizar vigorosamente e centrifugar por 15

minutos a 5.000 g em temperatura ambiente, todo o sobrenadante foi utilizado para posterior precipitação do DNA. A precipitação do DNA foi realizada com etanol absoluto gelado (o dobro do volume), seguida de lavagem com etanol 70%. O *pellet* formado foi diluído em cerca de 1500 µL de TE 10:0,1 (10 mmol/L Tris HCl pH 8,0; 0,1 mmol/L EDTA pH 8,0). As amostras foram armazenadas a 4°C até sua utilização.

Para a extração de DNA proveniente de mucosa oral, o material foi coletado em *swab* oral próprio para esta finalidade (*Medical Packaging Corporation, Camarillo, CA, EUA*). Acrescentou-se 200 µL de TES (Tris HCl 10 mmol/L pH 7,6; EDTA 1 mmol/L e SDS 0,6%) e 5 µL de proteinase K (100 µg/mL) em cada *swab* coletado. Após homogeneização em agitador de tubos tipo *vortex*, o material foi incubado por 2 horas a 42°C. Depois disso, o *swab* foi removido e acrescentou-se 42 µL NaCl saturado. Após agitação vigorosa, o material foi centrifugado por 1 minuto a 15.000 g em temperatura ambiente; todo o sobrenadante foi transferido para outro tubo para posterior precipitação do DNA. A precipitação do DNA foi realizada com etanol absoluto gelado, seguida de lavagem com etanol 70%. O *pellet* formado foi diluído em 60 µL de TE 10:0,1 (10 mmol/L Tris HCl pH 8,0; 0,1 mmol/L EDTA pH 8,0). As amostras foram armazenadas a 4°C até sua utilização.

A partir do DNA genômico de cada paciente foram amplificadas as regiões codificadora e promotoras do gene *CASR* pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

De acordo com a sequência selvagem do gene *CASR* depositada no *Ensembl* (Gene ENSG00000036828), foram desenhados *primers* intrônicos específicos flanqueando os éxons 2 ao 7 (região codificadora) e *primers* específicos flanqueando as regiões promotoras P1 e P2. As sequências de todos os *primers* utilizados e o tamanho esperado dos *amplicons* obtidos pelas PCRs estão descritos na **Tabela 4**.

Todas as reações foram realizadas para um volume total de 25 µL, utilizando-se de 100 a 200 ng de DNA genômico, 200 µmol/L de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 10 pmol de cada *primer*, 1 unidade da enzima *Taq DNA* polimerase (5 U/µL) (*Promega Corporation, WI, EUA*), tampão 5x de reação *Green Go TaqTM* fornecido pelo fabricante da enzima e água ultrapura para completar o volume. Para a amplificação dos éxons 6 e dos fragmentos C e D do éxon 7, foram acrescentados 2 mmol/L de MgCl₂.

O protocolo de amplificação da região codificadora do *CASR* teve uma etapa inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 90°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, mais uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

O protocolo de amplificação das regiões P1 e P2 do *CASR* teve uma etapa inicial a 98°C durante 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 90°C por 30 segundos, 50°C (para P1) e 60°C (para P2) por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, mais uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Todas as reações foram realizadas em termociclador *Mastercycler* (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) ou em termociclador 9700 (*Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA*).

Tabela 4 - Sequência dos *primers* utilizados na avaliação das regiões promotoras e codificadora do gene *CASR* e o tamanho esperado dos *amplicons* obtidos por PCR.

Região alvo	Nome	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do <i>amplicon</i>
P1	<i>CASR P1F</i>	5' CTTACATTTATTCTATTAACCAG 3'	715 pb
	<i>CASR P1R</i>	5' GCTCTATAAAGAAACACCAAAAAT 3'	
P2	<i>CASR P2F</i>	5' AGCGCGCTGTGGAGTCGGGTAGAGTA 3'	753 pb
	<i>CASR P2R</i>	5' TCTTGGAGAGGCGCGTCTGGCT 3'	
Exon 2	<i>CASR 2F</i>	5' CTTCTGGGAGCCTCCAAACT 3'	315 pb
	<i>CASR 2R</i>	5' GCGTTTGGTGCAGCTTTTCT 3'	
Exon 3	<i>CASR 3F</i>	5' CCAGCTTTGCCAGGTCTTTA 3'	439 pb
	<i>CASR 3R</i>	5' AAGCCTGCTTCTTCTGATCC 3'	
Exon 4	<i>CASR 4AF</i>	5' AGAAAGCCACCTCCACAACA 3'	530 pb
	<i>CASR 4AR</i>	5' AAGTACTGAGGCATGGCGAT 3'	
	<i>CASR 4BF</i>	5' GATTGTCCGGCGCAATATCA 3'	588 pb
	<i>CASR 4BR</i>	5' TGCAGCCCAACTCTGCTTTA 3'	
Exon 5	<i>CASR 5F</i>	5' GGGCACAGCCTACCTAATTA 3'	364 pb
	<i>CASR 5R</i>	5' AAAGCCCAGCACAGTTTCCT 3'	
Exon 6	<i>CASR 6F</i>	5' CCAAACCTCCTCCCTCTTACA 3'	324 pb
	<i>CASR 6R</i>	5' CTGTGCAAAGCACCATCTCA 3'	
Exon 7	<i>CASR 7AF</i>	5' CACCACCACATGTACACTCA 3'	532 pb
	<i>CASR 7AR</i>	5' GAGGAAAACCAGCAGGAACT 3'	
	<i>CASR 7BF</i>	5' CATCTCATGCATCCTGGTGA 3'	525 pb
	<i>CASR 7BR</i>	5' CGGGATGGCTTGAAGAGAAT 3'	
	<i>CASR 7CF</i>	5' TCTCTGCCGTAGAGGTGATT 3'	524 pb
	<i>CASR 7CR</i>	5' CAGCGTATCGCTGCTTTTCT 3'	
	<i>CASR 7DF</i>	5' GCAGAAGGTCATCTTTGGCA 3'	444 pb
	<i>CASR 7DR</i>	5' CTTCTCAGAGGAAAGGAGT 3'	

O tamanho e a concentração dos *amplicons* foram determinados por comparação com os fragmentos que compõem o marcador de peso molecular 1 Kb (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*; *Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA*) de concentração conhecida, após eletroforese em gel de agarose a 1% (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*) contendo brometo de etídio (*Sigma, St Louis, MO, EUA*) na concentração de 0,5 µg/mL de gel em tampão TAE (Tris 0,004 mol/L; ácido acético glacial; EDTA 0,001 mol/L pH 8,0).

Após confirmação da amplificação, cerca de 30 ng dos produtos de PCR foram purificados com as enzimas do *kit* EXO-SAP (*Amersham Science, USB, Cleveland, OH, EUA*) e sequenciados com o *kit* ABI Prism™ Big Dye terminator (*Perkin-Elmer, Foster City, CA, EUA*) no equipamento ABI Prism Genetic Analyzer 3100 automatic DNA sequencer (*Perkin-Elmer, Foster City, CA, EUA*). As sequências obtidas foram comparadas com as fornecidas pelo *Ensembl* (Gene ENSG00000036828).

Inicialmente foi feita a análise da região codificadora do gene *CASR* para todos os casos. Caso fosse encontrada alguma uma mutação conhecida, esta era confirmada realizando-se uma nova reação de PCR e sequenciamento automático ou pela técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Na ausência de mutações na região codificadora do *CASR*, foram avaliadas as regiões promotoras P1 e P2 levando-se em consideração os elementos de resposta já descritos nestas localizações - **Figura 7**.

cttcacat ttatt cctatta accagat tt tgc cct tca ct ggt gctt tag cat tt tgc **tcagctctct**
cct accct gt att tg ag gga aa gga ag ccaa at ggg cag aa ct tgg cca ataat ggg atg tgt ttg cat
gct gga tt tg agt ct gt gtt cca tga ag aa aag aa at gga aa ctt tgt tg ag ta tcc at tct ata cag **gg**
gca ctt ttc ct tga ct at ttc at tta aca ct cca agg acc cct gag gt ag at gt t at cca cca ttt tgc ag
aga gaaa tct gca ttt tta ttt ga ag tt ct taa ac at ggt aa acg ac **ccaat** ttt tct gct ttt tct tta
ac agt att tt gca aa catta tta tca tgt t act tca t gtt ttt cta ttt ttt ttt ttt gctt **tataata**
aat a caca ct cct cct tat tcta aaa aga aat tt ga ag cact tct gtc ttt gat gt tta tca ttt tta
cgg ttg ta ta atg tcc att aag tca ccc ta att ta tta caa caaat ttc cta cgt ttg cag ttt tgg ctc
tgt ttgct ttt tgt tgg ttt taa aat ttt tct tga tca caa at gat ctc gta aaaa aaaa tct cgc ca
gaa at ttt at ttt gtc tct **ggaaat ttc** gca aggt gga at cta tgc at taa ag gga taa ta ttt tgg t
gtt tct tta tag agc

[illegible]

[A] Representa parte de P1 (em preto) e do éxon 1A (em preto, negrito e itálico). **[B]** Representa parte do éxon 1A (em preto, negrito e itálico), de P2 (em azul) e do éxon 1B (em azul, negrito e itálico). As sequências nucleotídicas sublinhadas referem-se aos *primers* utilizados nas PCRs. Em verde, estão realçadas as regiões CAT e TATA *box*; em azul, os elementos de resposta à vitamina D (VDRE) e em amarelo, os potenciais elementos de resposta para citocinas pró-inflamatórias.

Variantes alélicas do tipo *missense* não descritas na literatura foram rastreadas em um grupo controle composto por 100 a 150 voluntários saudáveis (200 a 300 alelos) oriundos da população brasileira para descartarmos a possibilidade de tratar-se de um SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) sem significado funcional. As técnicas de triagem utilizadas foram a RFLP e a genotipagem por PCR em tempo real. Além disso, elas foram pesquisadas no site <http://www.1000genomes.org/> onde estão registradas inúmeras variantes alélicas humanas.

4.2. RASTREAMENTO DE VARIANTES ALÉLICAS NÃO DESCRITAS NA LITERATURA

4.2.1. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Quando possível, a confirmação de mutações *missense* identificadas por PCR e sequenciamento automático, a segregação de mutações *missense* em familiares de pacientes afetados e o rastreamento de novas variantes alélicas em indivíduos normais foram realizadas por RFLP que tem como princípio a digestão enzimática.

Enzimas de restrição, também conhecidas como endonucleases, são enzimas capazes de clivar a molécula de DNA através do reconhecimento de sequências nucleotídicas específicas. A distinção de variantes alélicas por RFLP baseia-se no fato de que substituições nucleotídicas podem

provocar o ganho ou a perda de sítios de restrição por alguma dessas enzimas.

Após a amplificação do DNA de familiares ou de indivíduos controles, para os éxons onde foram encontradas novas variantes alélicas, os produtos de PCR foram submetidos à restrição por enzimas específicas (selecionadas com auxílio do *site* <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) – **Tabela 5.**

Todas as reações de digestão foram preparadas para um volume total de 20 µL (10 µL de produto de PCR, 1 a 3 unidades de enzima de restrição, 2 µL de tampão 10x recomendado pelo fabricante da enzima e água ultrapura para completar o volume). O protocolo de digestão incluiu uma etapa de incubação e uma etapa de inativação de acordo com a enzima utilizada. Posteriormente, 10 µL de cada reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*), corado com brometo de etídio, (*Sigma, St Louis, MO, EUA*) em tampão TAE. As bandas geradas por RFLP foram comparadas com os fragmentos do marcador de peso molecular 1 Kb (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*; *Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA*) com intuito de verificar os seus pesos moleculares. O padrão da digestão, por sua vez, foi comparado com aqueles obtidos a partir da digestão de produtos de PCR provenientes de DNAs de indivíduos normais e de indivíduos afetados. As enzimas utilizadas para cada variante alélica encontrada neste estudo, bem como o tamanho dos fragmentos esperados após a realização das digestões enzimáticas, estão descritos na **Tabela 5.**

Tabela 5 - Enzimas de restrição, variantes alélicas do CASR pesquisadas e possíveis padrões de RFLP.

Enzima de Restrição	Variante Alélica	Tamanho dos fragmentos gerados por RFLP	
		Padrão Selvagem	Padrão Mutante
<i>CaC8 I</i>	c.511C>T (p.R25X)	135, 180 pb	315 pb
<i>Bsr I</i>	c.644G>A (p.R69H)	330, 85 e 24 pb	227, 103, 85 e 24 pb
<i>Pvu II</i>	c.2069 C>T (p.R544X)	324 pb	208, 116 pb

4.2.2. GENOTIPAGEM POR PCR EM TEMPO REAL

A genotipagem por PCR em tempo real foi utilizada no rastreamento de uma variante alélica que não pode ser discriminada por RFLP (ausência de enzima de restrição capaz de diferenciar o padrão de digestão obtido pela variante alélica selvagem do padrão da variante alélica encontrada).

Para a realização deste ensaio, foi utilizado o *kit Custom TaqMan[®] SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)*, composto por: um *Genotyping Master Mix*, um par de *primers* específicos para a amplificação de um fragmento de DNA que inclui a substituição nucleotídica encontrada e duas sondas *TaqMan[®] 20x* específicas para a região alvo polimórfica, sendo uma delas complementar à sequência selvagem (sonda “selvagem”) e a outra, complementar à variante alélica encontrada (sonda “mutante”).

Cada sonda *TaqMan[®]* possui um fluoróforo *reporter* conjugado à sua extremidade 5' e um silenciador *quencher* na extremidade 3'; este último é responsável por inibir a fluorescência do *reporter* enquanto a sonda se

mantiver intacta. Caso o DNA apresente a substituição nucleotídica – **Figura 8 [1]**, ocorre hibridação entre a sonda “mutante” e o trecho de DNA contendo a variante alélica em estudo – **Figura 8 [2]**. A seguir é realizada a etapa de PCR cujo *primers* foram desenhados para delimitar a variante alélica incluindo a região complementar à sonda “mutante” – **Figura 8 [3]**. Durante a PCR, a clivagem da sonda “mutante” promove a emissão de uma fluorescência correspondente ao fluoróforo empregado na confecção da sonda – **Figura 8 [4]**. No caso da sonda “selvagem” não se ligar ao DNA, não haverá emissão de fluorescência correspondente a esta sonda.

Figura 8 - Princípio da detecção de SNPs por PCR em tempo real com emprego de sondas *TaqMan*[®].

[1] Representação de uma sonda “mutante” e uma amostra de DNA contendo um nucleotídeo que foi substituído (em azul). [2] A sonda “mutante” se hibrida com o DNA alvo. [3] PCR realizada com *primers* que delimitam o fragmento onde a substituição nucleotídica pode ser encontrada. [4] Durante a PCR, a clivagem da sonda “mutante” promove a emissão de fluorescência (asterisco vermelho)

A intensidade do sinal gerado reflete a quantidade de produto formado e este monitoramento é realizado em tempo real durante a reação de PCR (45). A genotipagem de cada amostra é realizada através da determinação da intensidade de fluorescência emitida. O aumento do sinal de fluorescência de apenas um dos fluoróforos indica homozigose para um

dos alelos, enquanto que o aumento do sinal de fluorescência emitido por dois fluoróforos será indicativo da presença de heterozigose. Portanto é necessário que as sondas sejam marcadas com fluoróforos diferentes -

Figura 9.

Figura 9 - Representação gráfica da discriminação alélica de amostras por PCR em tempo real utilizando sondas *TaqMan*®

[A] O gráfico mostra a curva de amplificação do DNA de um indivíduo homozigoto para a sequência selvagem, pois só há aumento do sinal de fluorescência para a sonda complementar ao alelo selvagem – fluoróforo VIC® (verde). **[B]** O gráfico exibe a curva de amplificação do DNA de um indivíduo heterozigoto para a mutação rastreada, visto que há aumento do sinal de ambas as fluorescências: fluoróforo FAM® para a identificação do alelo mutante (vermelho) e fluoróforo VIC®, para o alelo selvagem (verde).

As reações foram preparadas com aproximadamente 10 ng de DNA genômico extraído de sangue periférico dos indivíduos controles e/ou familiares do caso índice em estudo. As amostras foram diluídas em água ultrapura para um volume final de 11,25 µL. Acrescentou-se ao DNA diluído 12,5 µL do *Genotyping Master Mix* e 1,25 µL do Ensaio *TaqMan* 20x (contem as duas sondas e o par de *primers* para a etapa de PCR). As sequências dos *primers* e das sondas de interesse foram feitas sob encomenda (*Custom TaqMan SNP Genotyping Assay*).

A etapa de PCR foi realizada no aparelho *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) que teve o seu *software* configurado para a realização do processo de discriminação alélica. O protocolo básico de amplificação consistiu em uma temperatura inicial de 95°C durante 10 minutos, seguida por 50 ciclos de 95°C (15 segundos) e 62°C (1 minuto). O DNA do caso índice, que apresentava a variante alélica em heterozigose, foi utilizado como controle positivo enquanto o DNA de um indivíduo com a sequência selvagem, confirmada por sequenciamento, foi utilizado como controle negativo.

As amostras foram analisadas pelas curvas de amplificação e dos gráficos gerados pelo *software*. Quando o valor de fluorescência ultrapassou o limiar de detecção de amplificação (*threshold*), considerou-se que houve amplificação da amostra.

4.3. AVALIAÇÃO DE DELEÇÕES OU DUPLICAÇÕES NO CASR PELA REAÇÃO DE MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

Caso não fossem encontradas mutações nas regiões codificadora e promotoras do *CASR*, era realizada a pesquisa de deleção ou duplicação, em heterozigose no gene *CASR*, através da reação de MLPA, para os casos de hipercalcemia hipocalciúrica e hipocalcemia hipercalcúrica, respectivamente.

A reação de MLPA foi descrita em 2002, por *Schouten et al.*, e é capaz de detectar variações no número de cópias de um ou mais éxons, genes inteiros ou regiões cromossômicas importantes (46).

Cada sonda é composta por dois oligonucleotídeos específicos, que após a hibridação com a sequência alvo, são unidos por uma ligase. Os fragmentos ligados são amplificados por PCR, com um par de *primers* universal, e os produtos de PCR são submetidos a uma eletroforese capilar. A diferença de tamanho entre os fragmentos é definida por uma sequência específica, denominada *stuffer*, também presente nas sondas – **Figura 10**.

Figura 10 - Representação esquemática da reação de MLPA.

[1] O oligonucleotídeo à esquerda é composto pelas sequências Y e de hibridação e o oligonucleotídeo à direita, pelas sequências X, *stuffer* e de hibridação. As sequências X e Y são complementares aos *primers* universais. [2] As sequências de hibridação ligam-se ao DNA alvo. [3] Os oligonucleotídeos são unidos por uma ligase. [4] Os fragmentos resultantes são amplificados por PCR e submetidos a uma eletroforese capilar que separa os diversos fragmentos gerados. As sequências *stuffer* definem o tamanho dos fragmentos amplificados. Adaptado do site <http://www.mrc-holland.com>.

A análise dos resultados é feita por programas específicos que comparam os picos correspondentes às sondas do gene de interesse e às sondas controles do paciente com aqueles gerados pelos indivíduos normais.

Este estudo foi executado com a utilização do *kit MLPA P177-B1 CASR* (MCR Holland, Amsterdam, Holanda) que é composto por 23 sondas, sendo 14 referentes às sequências exônicas do gene *CASR* (1 par de sondas para cada éxon) cobrindo uma extensão de cerca de 103 kb de DNA genômico na região cromossômica 3q13 e, as demais 9 sondas, localizadas nas regiões cromossômicas: 1q22, 2p13, 5q31, 7q21, 10p15, 11q23, 15q21, 19p13, 22q11. A **Figura 11** representa o padrão normal de eletroforese do MLPA P177-B1 *CASR*.

Figura 11 - Padrão de eletroforese obtido pelo MLPA P177-B1 *CASR*.
Os fragmentos Q e D relacionam-se à qualidade da amostra e os fragmentos X e Y aos cromossomos sexuais.

Aproximadamente 200 ng de DNA genômico extraído de sangue periférico dos pacientes foram diluídos em água ultrapura em um volume final de 5 µL. As amostras foram desnaturadas após incubação a 98°C por 5 minutos em um termociclador 9700 (*Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA*). Posteriormente, a temperatura foi reduzida para 25°C e, para cada amostra, foram acrescentados 1,5 µL de SALSA *probe mix* e 1,5 µL de tampão MLPA. A solução resultante (8 µL) foi incubada a 95°C por um minuto e mantida a 60°C por 16 horas possibilitando que as sondas hibridassem com seus respectivos alvos.

Após a hibridação das sondas, as amostras foram mantidas a 54°C para o acréscimo de 32 µL da mistura de Ligase-65 (3 µL do tampão ligase-65 A + 3 µL do tampão ligase-65 B + 1 µL de Ligase-65 + 25 µL de água ultrapura) em cada tubo e incubadas por 15 minutos na mesma temperatura para promover a ligação das sondas previamente hibridadas. Em seguida, os tubos foram mantidos a 98°C por 5 minutos, para inativação de ligase residual.

Dez µL do produto de ligação foram transferidos para um novo tubo contendo 30 µL do *mix* para a PCR (4 µL de tampão SALSA PCR + 26 µL de água ultrapura). Os novos tubos foram mantidos a 60°C enquanto eram adicionados 10 µL do *mix* polimerase (2 µL de SALSA PCR *primers* + 2 µL de tampão SALSA *enzyme dilution* + 0,5 µL de SALSA polimerase e 5,5 µL de água ultrapura). Para a amplificação das sondas ligadas, o protocolo de PCR consistiu em 35 ciclos a 95°C (30 segundos), 60°C (30 segundos) e 72°C (1 minuto), e uma extensão final a 72°C por 20 minutos.

Os produtos resultantes foram detectados e quantificados por eletroforese capilar no sequenciador automático *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* (PE Applied Biosystems, The Perkin-Elmer Corporation, CA, EUA), e analisados pelo programa de análise de fragmentos *GeneScan* (PE Applied Biosystems, The Perkin-Elmer Corporation, CA, EUA) que determina o tamanho de cada fragmento, bem como a altura e área dos seus picos revelados pelo eletroferograma.

O conjunto de dados de altura dos picos de cada amostra foi transferido para uma planilha *Excel*. Em cada ensaio, foram utilizados no mínimo dois controles. Primeiro, foram determinadas a média da altura dos picos de cada sonda para as amostras dos controles. Depois, foi calculada a média das proporções P_n de cada sonda para as amostras de cada paciente. A média das proporções estimou o número de cópias de cada sonda -

Figura 12.

Uma determinada região analisada foi considerada normal quando a média das proporções esteve entre 0,7 e 1,3. Valor inferior a 0,7 indicou diminuição no número de cópias e valor superior a 1,3 foi compatível com aumento no número de cópias (47).

O ensaio foi considerado válido somente quando os controles eram diplóides para as sondas analisadas e quando as amostras também apresentavam duas cópias na maioria das sondas controles.

$$P_n = \frac{(\text{Altura da sonda analisada} / \text{Altura da sonda controle})_{n, \text{amostra}}}{(\text{Altura da sonda analisada} / \text{Altura da sonda controle})_{n, \text{média dos controles}}}$$

$$\text{Média das proporções} = \frac{P_1 + P_2 + P_3 + \dots + P_n}{n}$$

n = número de sondas controles

Figura 12 - Fórmulas utilizadas para a análise do número de cópias de um determinado gene.

Todas as reações em que foram detectadas alterações no número de cópias dos genes em estudo foram repetidas para fins de confirmação.

4.4. PREDIÇÃO DE EFEITO FUNCIONAL PARA AS MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO CASR

A predição de efeito funcional, para substituições *missense* no *CASR* ainda não descritas na literatura médica, foi efetuada por intermédio de ferramentas disponíveis nos *sites*: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/> que utiliza o programa *Polyphen* (*Polymorphism Phenotyping*) e o <http://www.mutationtaster.org/>.

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES INATIVADORAS NA REGIÃO CODIFICADORA DO CASR

O estudo da região codificadora do *CASR* elucidou 5 dos 6 casos de hipercalcemia hipocalciúrica incluídos neste estudo e estabeleceu a base molecular de 3 casos de HHF e 2 casos de HPTNG - **Tabela 6**.

Tabela 6 - Características e localização das mutações identificadas no CASR de pacientes com HHF e HPTNG.

Diagnóstico	Paciente	Tipo de Mutação	Substituição nucleotídica	Nome Trivial	Domínio da proteína	Referência
HHF	2	<i>Nonsense</i>	c.512C>T	p.R25X	DEC	(48)
HHF	3	<i>Missense</i>	c.644G>A	p.R69H	DEC	Nova
HHF	4	<i>Missense</i>	c.2318C>T	p.T627I	DTM	Nova
HPTNG	5	<i>Nonsense</i>	c.1994G>T	p.E519X	DEC	Nova (33)
HPTNG	6	<i>Nonsense</i>	c.2069C>T	p.R544X	DEC	Nova

DEC: domínio extracelular; **DTM:** domínio transmembrana

Na paciente 2, foi identificada a troca de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 512 (c.512C>T), localizado no éxon 2 do *CASR*, levando à substituição de uma arginina por um códon de parada prematuro (p.R25X) - **Figura 13**.

A paciente 3, apresentou a substituição de uma guanina por uma adenina na posição 644 (c.644G>A), no éxon 3, com consequente troca de uma arginina por uma histidina no aa 69 (p.R69H) - **Figura 13**.

Enquanto que, no paciente 4, encontramos a troca de uma citosina por uma timina na posição 2318 (c.2318C>T) do éxon 7, resultando na troca de uma tirosina por uma isoleucina no resíduo 627 (p.T627I) - **Figura 13**.

A paciente 3 exibiu a substituição de uma guanina por uma adenina na posição 644 (c.644G>A) no éxon 3 com consequente troca de uma arginina por uma histidina no aa 69 (p.R69H) - **Figura 13**.

O paciente 4 apresentou a troca de uma citosina por uma timina na posição 2318 (c.2318C>T) do éxon 7 resultando na troca de uma tirosina por uma isoleucina no resíduo 627 (p.T627I) - **Figura 13**.

Figura 13 - Eletroferogramas com destaque para as mutações pontuais identificadas no *CASR* (seta vermelha) dos casos-índice da casuística de HHF e HPTNG.

As duas pacientes com perfil laboratorial compatível com HPTNG tiveram a confirmação molecular através da identificação de duas mutações *nonsense* em homozigose no *CASR*. A paciente 5 apresentou a troca de uma guanina por uma timina no nucleotídeo 1994 do éxon 5 do gene (c.1994G>T ou p.E519X), enquanto a paciente 6 apresentou a substituição de uma citosina por uma timina na posição 2069 do éxon 6 (c.2069C>T ou p.R544X) - **Figura 13**.

Das cinco mutações identificadas, apenas a p.R25X havia sido anteriormente descrita (48), sendo as demais (p.R69H, p.E519X, p.R544X e p.T627I) inéditas.

Todos os resíduos que sofreram substituição são conservados entre diferentes espécies de vertebrados - **Figura 14**.

Figura 14 - Alinhamento de CASR entre diferentes espécies de vertebrados: homem (hCaR), camundongo (mCaR), cão (SCaR) e fugu (fCaR).

Em amarelo, estão destacados os resíduos R25, R69, E519, R544 e T627. Adaptado de *Chang et al., 2004*.

A segregação das mutações p.R25X (família A), p.R69H (família B) e p.R544X (família E) em familiares foi realizada através da técnica de RFLP - **Figura 15**. A mutação p.R69H foi também triada em 200 alelos controles.

Figura 15 - Triagem das mutações p.R25X, p.R69H e p.R544X no CASR por RFLP em familiares dos casos índices.

(A) Em normais, a enzima *CaC8* reconhece um SR no éxon 2 (315 pb) do *CASR* dividindo-o em fragmentos de 135 e 180 pb. Indivíduos com a mutação p.R25X perdem este SR. (B) A enzima *Bsr* reconhece dois SRs nos indivíduos com a mutação p.R69H dividindo o éxon 3 (429 pb) em três fragmentos (330, 85 e 24 pb) enquanto que em normais, a enzima reconhece três SRs gerando fragmentos de 227, 103, 85 e 24 pb. A banda de 227 pb foi utilizada na discriminação do alelo mutante. (C) Em normais, a enzima *Pvu II* não reconhece SR no éxon 6 (324 pb) do *CASR*, porém nos indivíduos com a mutação p.R544X é criado um SR que cliva este éxon em dois fragmentos (208 e 116 pb). SR: sítio de restrição.

ØX e 1 Kb: marcadores de peso molecular; ND: amostra não digerida; CN: controle normal; Ht: heterozigose; Hm: homozigose.

Como a triagem de mutação p.E519X nos familiares da paciente 5 contou apenas com a participação de seus pais (família D), a segregação da mesma foi realizada através de PCR e sequenciamento automatizado do éxon em questão - **Figura 16**.

Figura 16 - Pesquisa da mutação p.E519X no CASR nos pais do caso índice 5 (família D) por PCR e sequenciamento automatizado. As setas indicam o nucleotídeo 1993 e as caixas evidenciam o códon 519. **[A]** Controle normal. **[B]** Paciente 5: troca G → T em homozigose. **[C]** Pai da paciente 5: troca G → T em heterozigose. **[D]** Mãe da paciente 5: troca G → T em heterozigose.

Para a segregação da mutação p.T627I nos familiares do paciente 4 (família C), utilizou-se a técnica de genotipagem por PCR em Tempo Real, possibilitando a identificação de mais dois casos afetados. A fim de verificar se a variante alélica encontrada tratava-se de um polimorfismo, optamos por triá-la em 300 alelos controles, nos quais não foi identificada – **Figuras 17 e 18**.

Curva de amplificação

Figura 17 - Triagem da mutação p.T627I no CASR por PCR em tempo real em familiares do paciente 4 (família C).

[A] Paciente 4 – o gráfico identifica a amplificação de ambos os alelos: aumento da fluorescência devido à clivagem da sonda “mutante” (marcada com FAM) e da sonda “selvagem” (marcada com VIC). **[B]** Controle – o gráfico exibe somente a amplificação do alelo selvagem.

Magnitude do sinal (ΔRn) x Ciclo

Figura 18 - Magnitude do sinal gerado pelas sondas TaqMan® durante a PCR em tempo real na pesquisa da mutação p.T627I no CASR.

[A] Paciente 4 - os sinais de fluorescência emitidos pelas duas sondas utilizadas na reação ultrapassaram o limite de detecção (*threshold*) do ensaio. **[B]** Controle – apenas o sinal de fluorescência emitido pela sonda “selvagem” (VIC) ultrapassou o limite de detecção (*threshold*) do ensaio.

A triagem dos familiares de todos os casos índices possibilitou a identificação de nove indivíduos com mutações em heterozigose no *CASR* e, portanto, portadores de HHF. Todos esses indivíduos apresentaram bioquímica compatível com hipercalcemia hipocalciúrica – **Figura 19 e Tabela 7.**

Figura 19 - Heredogramas das famílias com HHF e HPTNG.

Tabela 7 - Avaliação laboratorial dos familiares com HHF revelados pelos estudos de segregação das mutações no *CASR*.

Família	Indivíduo	Ca (mg/dL)	Ca i (mg/dL)	PTH (pg/mL)	Cr (mg/dL)	Cl Ca/Cr	25OHD (ng/mL)
A	I.1	10,3	5,5	-	1,0	-	-
	I.1	10,8	5,9	120 ^a	1,0	-	9
B	II.2	10,0	5,7	74 ^a	0,9	0,003	24
	III.2	10,2	5,8	67 ^a	0,7	0,006	40
C	I.1	9,4	5,5	88 ^b	0,6	0,010	21
	II.3	9,6	5,5	79 ^b	0,6	0,007	20
D	I.1	9,4	-	83,7 ^b	0,6	0,020	-
	I.2	9,9	-	53,1 ^b	0,8	0,014	-
E	I.1	10,5	5,1	60 ^b	0,5	0,040	-
Valores de Referência		8,6-10,2	4,7-5,3	11-62 ^a 16-87 ^b	0,5-0,9 (F) 0,7-1,2 (M)	-	> 30

Ca: cálcio sérico total; **Ca i:** cálcio sérico iônico; **Cr:** creatinina sérica; **Cl Ca/Cr:** Clearance de cálcio/creatinina; **25OHD:** 25 hidroxí-vitamina D. **F:** para o sexo feminino; **M:** para o sexo masculino.

5.1.1. PREDIÇÃO DE EFEITO FUNCIONAL

De acordo com o site <http://www.1000genomes.org/>, as substituições p.R69H e p.T627I no *CASR* não foram identificadas como variantes alélicas conhecidas. Além do mais, por haver co-segregação genótipo-fenótipo entre os familiares dos casos índice e os exames laboratoriais (**Figura 19 e Tabela 7**) e ausência dessas substituições, após triagem, em 200 e 300

alelos controle respectivamente, estas variantes alélicas foram consideradas como mutações.

Sendo assim, o próximo passo foi avaliar o efeito funcional dessas mutações, por meio dos sites <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/> e <http://www.mutationtaster.org/> e de suas respectivas ferramentas: *Polyphen* e *Mutationtaster*.

Segundo a análise realizada pelo ***Polyphen***, a mutação p.R69H foi classificada como benigna e a p.T627I como provavelmente prejudicial. Os dois aminoácidos onde ocorreram as substituições foram demonstrados como sendo conservados entre diferentes espécies e entre receptores pertencentes à mesma família do CASR.

De acordo com o ***Mutationtaster***, as duas mutações (p.R69H e p.T627I) foram classificadas como responsáveis pela doença, com um valor de *p* (probabilidade) igual a 0,99; valores próximos a 1 indicam “segurança” de alta previsão.

5.2. AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES ATIVADORAS NA REGIÃO CODIFICADORA DO CASR

O estudo da região codificadora do *CASR* elucidou apenas um dos quatro casos de hipocalcemia incluídos neste estudo, confirmando que a paciente 10 é portadora de HAD.

Na paciente 10 foi identificada a substituição de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 2738 (c.2738G>A), localizado no éxon 7 do *CASR*.

Esta substituição resultou na troca de um ácido glutâmico por uma lisina no códon 767 (p.E767K) que pertence ao domínio transmembrana da proteína e foi anteriormente descrita por *Uckun-Kitapci et al.* como causa de HAD (49) - **Figura 20.**

A detecção da mutação p.E767K possibilitou o seu rastreamento na filha da paciente que, por sua vez, foi negativo.

Figura 20 – Eletróferograma com destaque para a mutação p.E767K no CASR encontrada na paciente 10.

A seta indica o nucleotídeo 2738 onde houve a troca de G → A, em heterozigose, e a caixa destaca o códon 767.

5.3. AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NAS REGIÕES PROMOTORAS P1 E P2 DO CASR

A análise das regiões promotoras (P1 e P2) do *CASR* não possibilitou a identificação de mutações nas sequências TATA e CAAT boxes bem como nos elementos de resposta à vitamina D (VDREs) e às citocinas pró-inflamatórias (κ B) nos quatro pacientes remanescentes: paciente 1 (bioquímica compatível com HHF) e pacientes 7, 8 e 9 (perfil laboratorial compatível com HAD).

5.4. AVALIAÇÃO DE DELEÇÕES OU DUPLICAÇÕES NO GENE *CASR*

Com o uso da técnica de MLPA, também não foram identificadas deleções ou duplicações, em heterozigose, nos quatro pacientes remanescentes.

A **Figura 21**, que utiliza a paciente 1 como exemplo, demonstra a ausência de deleções ou duplicações no gene *CASR*, em heterozigose. Todas as amostras testadas (2 controles normais e os pacientes 1, 7, 8 e 9) apresentaram uma média das proporções de cada sonda entre 0,7 e 1,3.

Figura 21 - Eletroforese do ensaio MLPA P177-B1 *CASR*.

[A] Padrão (controle normal); **[B]** Paciente 1.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho consistiu na avaliação molecular do gene *CASR* em quatro indivíduos com bioquímica compatível com HHF, dois com HPTNG e quatro com HAD. No primeiro grupo, foram identificadas três mutações pontuais, uma do tipo *nonsense* (p.R25X) e duas do tipo *missense* (p.R69H e p.T627I), todas em heterozigose; no segundo, duas mutações pontuais do tipo *nonsense*, em homozigose (p.E519X e p.R544X) e, no último grupo, uma mutação pontual do tipo *missense*, em heterozigose (p.E767K); todas identificadas na **região codificadora** do *CASR*.

Nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura que registram mais de 200 mutações no *CASR* e, embora haja descrição de algumas deleções, inserções, mutações em *frameshift* e alterações de sítios de *splice*, a maioria delas são pontuais e dispersas ao longo de todo o gene (15).

Visto que a identificação das regiões *TATA box*, *CAAT box* e de sequências responsivas à vitamina D e às citocinas pró-inflamatórias permitiu não só a delimitação das **regiões promotoras** P1 e P2 do *CASR*, mas também possibilitou a demonstração de que diferentes estímulos podem modular a expressão do *CASR* levando a situações de hipo e hipercalcemia (20-22), consideramos que mutações nas regiões P1 e P2 poderiam explicar parte dos casos dos distúrbios do metabolismo do cálcio, hipótese esta ainda não testada.

Apesar de não termos encontrado alterações nestas regiões, como o número de pacientes analisados foi pequeno, ainda acreditamos que este mecanismo possa explicar casos de HHF, HPTNG e HAD cujas bases moleculares ainda não foram elucidadas.

Outro mecanismo genético capaz de explicar a base molecular dos casos de HHF e HAD restantes é a presença de **deleções** ou **duplicações** no *CASR*. Em 2010, *Nissen et al.* testaram esta hipótese em 245 pacientes com HHF e 12 com hipocalcemia idiopática e observaram que nenhum dos casos apresentava deleção ou duplicação no *CASR*. Os autores concluíram que este mecanismo deva ser raro e não recomendam a técnica de MLPA como primeira abordagem para a avaliação de casos de HHF ou HAD, mas sim para os pacientes que apresentem história familiar positiva e que forem negativos para mutações pontuais na região codificadora do gene (50).

No presente estudo, também não encontramos deleções ou duplicações do *CASR* e, apesar do baixo número de casos testados (4 pacientes), o resultado reforça a ideia de que este mecanismo deva ser infrequente como causa de HHF ou HAD.

Finalmente, outra possibilidade é de que mutações em **outros genes**, que não o *CASR*, sejam responsáveis pela base molecular dos casos de HHF ou HAD. Para os casos de HHF, isto fica claro após os estudos de ligação realizados em três famílias representativas nas quais houve disponibilidade do uso de material genético tanto de membros afetados como de indivíduos não afetados. Estes estudos revelaram a segregação de pacientes com HHF com outras duas regiões cromossômicas distintas do locus do *CASR*. A segregação

com a **região 19p13.3** foi descrita em uma família e, atualmente, os casos afetados que segregam com esta região passaram a ser denominados por **HHF tipo 2**; uma vez que os casos **HHF tipo 1** referem-se àqueles que segregam com a **região 3q13.3-21** (locus do *CASR*) (28).

No caso de segregação com a **região 19q13.3**, os casos afetados passaram a ser denominados por **HHF tipo 3** ou variante Oklahoma em homenagem à primeira família descrita com estas características (29). Mais recentemente, um estudo baseado em outra família com casos de HHF tipo 3 permitiu restringir ainda mais esta região cromossômica (30). Concomitantemente, o emprego de 24 marcadores polimórficos na região cromossômica 19q13.3, utilizando material genético de membros da família Oklahoma, possibilitou caracterizar melhor esta região e testar alguns genes candidatos (51). Mesmo assim, até o momento, ainda não foi identificado outro gene capaz de produzir uma proteína com papel semelhante ao *CASR* ou de mediar a homeostase do cálcio.

Na nossa casuística, não foi possível realizarmos estudos de segregação familiar através de marcadores polimórficos para saber qual é o tipo de HHF da paciente 1, pois trata-se de um caso de HHF diagnosticado aos 85 anos de idade ao qual tivemos acesso apenas a um familiar; sua filha que, por sua vez, apresentava perfil laboratorial com valores normais de cálcio e PTH.

Por se tratar de uma doença oligossintomática, cuja investigação tem início após a detecção de calcemia alterada em exames de rotina, é difícil saber qual a incidência da HHF na população geral. No final dos anos 90,

estudos epidemiológicos que utilizaram amostras provenientes da população geral da Austrália e da Escócia, estimaram que a frequência da HHF fosse da ordem de 1:30.000 e 1:15.000 indivíduos respectivamente (27). Ainda que esta condição possa ser responsável por uma pequena parcela dos casos de HPP (incidência em torno de 1:1.000), seu reconhecimento é importante porque seu tratamento não é cirúrgico (3). Deve-se ter em mente que atualmente a forma mais comum de HPP é sua apresentação oligo ou assintomática e, portanto, não seria surpreendente o aumento da incidência de casos de HHF.

Em 1981, quando ainda nem havia sido clonado o *CASR*, após a análise de 15 famílias com hipercalcemia hipocalciúrica, *Marx et al.* propuseram o cálculo do *clearance* de cálcio/creatinina (CI Ca/Cr) como índice para aumentar o poder de discriminação de casos de HHF dentro do universo dos casos de HPP. Enquanto cerca de 80% dos casos de HHF apresentavam **CI Ca/Cr < 0,01**, os demais casos de HPP apresentavam **CI Ca/Cr > 0,02** (52). Estudos posteriores confirmam que enquanto valores CI Ca/Cr < 0,01 apresentam uma sensibilidade de 81% para o diagnóstico de HHF e uma especificidade de 88% para excluir as outras etiologias de HPP e, se aumentarmos o valor de CI Ca/Cr para < 0,017, haverá um aumento da sensibilidade para o diagnóstico de HHF para 99%, em detrimento da especificidade para excluir as outras etiologias de HPP que cai para 63%. Por isso, a maior parte dos autores, assim como nós, utiliza o valor de **CI Ca/Cr é < 0,01** para selecionar os casos de HHF (27).

No entanto, na prática, a utilização deste índice apresenta várias limitações. Por envolver dosagens urinárias, este índice está sujeito a erros relacionados à coleta, mas que são minimizados por se tratar de uma razão

envolvendo as medidas de cálcio e creatinina onde a depuração da creatinina funcionaria como fator “normalizador”. Não raro, pacientes fazem uso de diuréticos tiazídicos ou de diuréticos de alça que respectivamente, aumentam ou reduzem a reabsorção tubular de cálcio interferindo diretamente no valor do CI Ca/Cr o qual perde seu valor como parâmetro para o diagnóstico da HHF. Nestas condições, recomenda-se a suspensão ou substituição destes medicamentos que nem sempre são possíveis (27).

Outra limitação do uso do valor de CI Ca/Cr para o diagnóstico da HHF é a presença de doenças renais com redução do RFG, uma vez que tanto as excreções de cálcio como a de creatinina estão alteradas (53). Ainda dentro deste contexto, outro fator que pode induzir a falsos diagnósticos de HHF é a presença de deficiência de vitamina D em pacientes com HPP clássico. Em estudo realizado com 118 pacientes com diagnóstico de hiperparatireoidismo primário assintomático, Jayasena *et al.* observaram que pacientes com valores de vitamina D abaixo de 10 ng/mL apresentaram carga filtrada de cálcio mais baixa e, conseqüentemente redução do CI Ca/Cr (54). Por sua vez, pacientes com HHF e deficiência de vitamina D tendem a apresentar valores mais elevados de PTH o que poderia fazer com que o diagnóstico de HHF não fosse considerado já que cerca de 4/5 dos casos apresentam PTH limítrofe (25, 55).

Por todas estas limitações e, considerando a dificuldade dos pacientes e de seus familiares compreenderem a importância da triagem bioquímica, provavelmente em função do caráter oligossintomático da doença, diferente de outros estudos nos quais os casos de HHF são caracterizados apenas após a

detecção laboratorial de casos familiares, nossa estratégia não exigiu este critério de inclusão.

Nos nossos pacientes, a seleção dos casos índice (pacientes 1 a 4; Tabela 1) foi feita entre pacientes com hipercalcemia PTH dependente e $Cl\ Ca/Cr$ é $< 0,01$ e o estudo molecular envolvendo o *CASR* confirmou o diagnóstico de HHF nos pacientes 2 a 4 (Tabela 6). Após a detecção de mutações no *CASR*, os pacientes foram informados e incentivamos a participação dos seus familiares para o rastreamento de outros casos de HHF.

Inicialmente, os familiares interessados em participar do estudo não precisaram comparecer ao hospital e apenas coletaram raspados de mucosa oral com *swabs* próprios para esta finalidade, a partir dos quais pode ser extraído o DNA genômico, matéria prima para os estudos genéticos. Diferente da coleta de sangue, os *swabs* orais podem ser enviados pelo correio, tanto antes como após a coleta do material, sem a necessidade de acondicionamento especial e dispensam a presença de uma pessoa para a realização da coleta aumentando as chances de colaboração dos familiares.

Dessa forma foi possível rastreamos 16 familiares (4 na família A, 8 na família B e 4 na família C) e detectarmos 6 novos casos de HHF (1 na família A, 3 na família B e 2 na família C). Os casos novos de HHF foram convocados para avaliação laboratorial e acompanhamento clínico. Todos os familiares convocados compareceram ao serviço e, em 100% dos casos, o resultado do perfil de cálcio co-segregou com o genótipo encontrado – **Tabela 7**.

Das cinco mutações inativadoras identificadas no *CASR*, três foram do tipo *nonsense*: **p.R25X**, **p.E519X** e **p.R544X** e, por estarem localizadas no seu domínio extracelular, resultam em proteínas truncadas com perda de toda a região transmembrana e intracelular do receptor, justificando assim, a gravidade do fenótipo quando ocorreram em homozigose (pacientes 5 e 6) e dispensando a execução de estudos funcionais que demonstrassem ser a causa da doença.

Ambos os casos de HPTNG foram detectados em famílias com casos de consanguinidade. Na verdade, este fato foi negado pela mãe da paciente 5 (família D), mas por pertencerem a uma comunidade indígena isolada e, como tanto a mãe como o pai da paciente 5 compartilham a mesma mutação (p.E591X), é bem provável a existência de um ancestral em comum. Apesar da inacessibilidade ao DNA do irmão da paciente 5, assumimos que o mesmo também deveria ter HPTNG pela descrição do quadro clínico e desfecho que culminou com a morte do mesmo - **Figura 19**.

No caso da paciente 6 (família E), mesmo sem acesso ao DNA paterno, a informação de que seus pais são primos em 1º grau, o fato dela apresentar a mutação em homozigose e, sua mãe, em heterozigose, nos faz crer que seu pai também seja portador da mutação p.R544X em heterozigose - **Figura 19**. Em posse dessas informações, foi possível realizar o aconselhamento genético em ambas as famílias.

Ainda em relação às mutações *nonsense* no *CASR*, vale destacar que as mutações p.E519X e p.R544X são inéditas e apenas a p.R25X havia sido anteriormente descrita. À semelhança das nossas pacientes, a mutação

p.R25X foi encontrada em heterozigose e o fenótipo exibido pelos pacientes era brando: HHF (48); porém a mesma mutação, quando relatada em homozigose, é responsável pelo HPTNG com perfil bioquímico compatível (15).

As outras duas mutações inativadoras identificadas no *CASR* foram do tipo *missense*: **p.R69H** e **p.T627I** e ainda não foram descritas na literatura médica; a primeira encontra-se localizada no domínio extracelular da proteína enquanto a segunda localiza-se em seu domínio transmembrana.

A fim de prever o impacto estrutural e funcional destas substituições no *CASR* sem a realização de estudos funcionais, as mesmas foram testadas pelos programas *Polyphen* e o *Mutationtaster*. Estas ferramentas levam em consideração não só as estruturas secundárias e terciárias da proteína em questão, como também informações filogenéticas.

Embora forneçam um forte indício do impacto funcional produzido por uma substituição, não são ferramentas incontestáveis, sendo importante a reunião de dados que reforcem seus resultados, tais como: (a) a triagem da variante alélica em DNA de indivíduos normais, (b) a presença de co-segregação genótipo-fenótipo em familiares do caso índice, e quando possível, (c) a realização de ensaios funcionais que demonstrem alteração na expressão ou atividade da proteína.

Enquanto o *Polyphen* classificou a mutação **p.R69H** como benigna, isto é, muito provavelmente sem efeito funcional; a mesma foi considerada como possivelmente causadora de doença pelo *Mutationtaster*. Esta discrepância nos resultados fornecidos pelos dois programas demonstrou a limitação deste

recurso. De qualquer forma, acreditamos que este achado seja responsável pelo fenótipo da paciente 3 e de suas familiares (I.1, II.2 e III.2; família B) - **Figuras 15 e 19 e Tabelas 1 e 7** - com base nas seguintes evidências: (a) o resíduo R69 é conservado entre diferentes espécies de vertebrados - **Figura 14**; (b) a variante p.R69H não foi encontrada na triagem em 200 alelos de indivíduos normais e (c) segregou em familiares da paciente 3 os quais apresentavam perfil laboratorial compatível com HHF.

No que se refere à mutação **p.T627I**, também pensamos que este achado justifica o fenótipo do caso índice (paciente 4) e de seus familiares (I.1 e II.3; família C) - **Figuras 15 e 19 e Tabelas 1 e 7** pelos mesmo motivos citados anteriormente: (a) predição de efeito deletério pelos programas *Polyphen* e *Mutationtaster*; (b) constatação de que o aa T627 é conservado entre diferentes espécies de vertebrados - **Figura 14**; (c) a variante p.T627I não foi encontrada na triagem em 300 alelos de indivíduos normais e (d) segregou em familiares do paciente 4 os quais apresentavam perfil laboratorial compatível com HHF.

A identificação de casos de HHF ainda é um desafio. Independente das limitações comentadas para o uso do CI Ca/Cr na seleção destes pacientes, *Christensen et al* questionam o poder discriminativo deste índice uma vez que valores entre 0,01 e 0,02 abrigam uma ampla margem de pacientes com diagnóstico inconclusivo (56).

A partir de exames laboratoriais provenientes de 54 pacientes com HHF confirmados por mutações identificadas no *CASR* e 97 pacientes hipercalcêmicos com histologia comprovada para HPP e tratados

cirurgicamente com sucesso e, com base em análises estatísticas (curva ROC), eles concluíram que o valor melhor de corte para o diagnóstico da HHF seria **CI Ca/Cr < 0,0115** por apresentar uma especificidade de 88% e uma sensibilidade de 80%. O estudo também revelou que segundo a análise de superposição entre valores provenientes destes dois grupos, o valor de corte do **CI Ca/Cr < 0,02** incluiu 98% das amostras (53/54) de todos os pacientes com HHF e 35% (34/97) das amostras de pacientes com HPP clássico. Por isso, os autores propõem que o **CI Ca/Cr < 0,02** deva ser utilizado para triar os casos potenciais de HHF que seriam posteriormente confirmados ou excluídos após análise do gene *CASR* (56). Contudo, os autores alertam que esta abordagem também apresenta limitações uma vez que a análise molecular é falha em cerca de 1/3 dos casos, provavelmente em função da heterogeneidade de locus e pelo fato de não serem pesquisados mecanismos moleculares mais raros como possíveis rearranjos em heterozigose ou mutações em regiões regulatórias gênicas como propusemos.

Ainda que esta abordagem permita identificar mais casos de HHF, envolve aumento dos custos e só seria possível em centros que dispõem de recursos para avaliação genética. Por isso, alguns autores recomendam o uso racional do teste genético ampliando o emprego desta abordagem em casos com apresentações atípicas, casos de persistência de hiperparatireoidismo após o tratamento cirúrgico e para o rastreamento de famílias com casos de hiperparatireoidismo isolado (57-59).

Embora não haja consenso sobre a melhor forma de conduzir a investigação da HHF, nossos dados sugerem que a abordagem molecular é

uma importante ferramenta para o diagnóstico de certeza da doença e, quando positivo, possibilita o diagnóstico de casos familiares dispensando-os de uma triagem laboratorial.

Didaticamente podemos classificar as causas de hipoparatiroidismo por deficiência de PTH em adquiridas e congênitas. As causas congênitas costumam ser isoladas ou estar em associação com outros defeitos orgânicos. Os hipoparatiroidismos congênitos isolados podem ser transmitidos por herança autossômica dominante, recessiva ou ligada ao X. Até o momento, são conhecidas pelo menos três causas genéticas para as formas autossômicas: mutações inativadoras nos genes codificadores do PTH, GCMB ou do CASR das quais a última parece ser a mais comum.

Na prática, a maior parte dos casos de hipoparatiroidismo congênitos quando diagnosticados é esporádica e acabam sendo classificados como idiopáticos até que sua base molecular seja identificada (60).

Quando o primeiro caso de HAD foi descrito, imaginava-se que o fenótipo da doença fosse restrito a casos com hipocalcemia discreta e valores de PTH detectáveis, mas inapropriadamente baixos e, que os pacientes fossem oligo ou assintomáticos (61). Dois anos após a primeira publicação, foram reconhecidos casos graves com hipocalcemia sintomática desde o período neonatal e PTH indetectável ilustrando o amplo espectro fenotípico da doença (62, 63). Mais do que isso, um interesse especial no diagnóstico de certeza desta entidade surgiu a partir do momento em que se reconheceu que o uso da vitamina D, comum no tratamento do clássico do hipoparatiroidismo, deveria ser evitado sob o risco de surgimento ou agravamento de hipercalcúria e suas

complicações renais (nefrolitíase, nefrocalcinose e falência renal). Neste sentido, *Yamamoto et al.* tentaram, sem sucesso, encontrar um critério laboratorial capaz triar os casos de hipoparatiroidismo idiopático candidatos ao diagnóstico de HAD (38). Mesmo utilizando-se como critério o caráter autossômico dominante da doença, os autores comentam que a presença de casos familiares com este padrão de herança nem sempre é garantia de que se trata de um caso de HAD visto que mutações no gene do PTH e do GCMB também são causas de hipoparatiroidismo isolado congênito.

Considerando o amplo espectro fenotípico da doença, particularmente as formas oligo ou assintomáticas, estima-se que a prevalência da HAD na população seja de 1:70.000 (27); porém, com o propósito de determinar a prevalência de mutações no *CASR* como causa de hipoparatiroidismo idiopático, *Leinhardt et al.* identificaram 8 probandos não relacionados (42%) em 19 casos pesquisados (64).

Durante a seleção dos nossos casos (pacientes 7 a 10; Tabela 3) com hipocalcemia hipercalemiúrica/hipoparatiroidismo idiopático, apenas para a paciente 7 não foi possível ter acesso aos seus parâmetros bioquímicos no momento do diagnóstico uma vez que a mesma já estava em tratamento quando iniciou o seu acompanhamento e seu histórico de convulsões pregressas inviabilizava a suspensão dos medicamentos a fim de se avaliar seu *status* basal. Nesta paciente também não conseguimos caracterizar hipercalemiúria visto que a mesma já estava medicada com hidroclorotiazida. Possivelmente, na ausência desta medicação, ela devesse se encaixar nos critérios de seleção mencionados.

Não tivemos nenhum caso com diagnóstico na faixa etária pediátrica e nenhum dos nossos casos apresentava histórico familiar de hipoparatiroidismo. Com exceção da mãe do paciente 8 e filha da paciente 10, cujas calcemias dosadas eram normais, nenhum outro familiar de 1º grau se dispôs a ser submetido a uma triagem bioquímica para hipocalcemia hiperparatiroide. Portanto, não conseguimos atribuir caráter familiar da doença em nenhum dos casos.

Após análise da região codificadora do CASR, somente 1 em 4 casos selecionados foi elucidado com a descoberta da mutação **p.E767K**, em heterozigose. Esta mutação é do tipo *missense*, está localizada na segunda alça extracelular do domínio transmembrana do CASR e foi descrita previamente em uma família cujo caso índice apresentava convulsões relacionadas à hipocalcemia e hiperfosfatemia desde o nascimento (49). Nesta família, embora a criança e o seu pai tivessem o mesmo genótipo, o pai só apresentou sinais e sintomas de hipocalcemia a partir dos 21 anos de idade; além dele, a avó e bisavó paternas do bebê também relatavam sinais e sintomas brandos de hipocalcemia até então não relacionados a uma causa genética (49).

Apesar dos autores não terem realizado um estudo funcional para avaliar o efeito da mutação p.E767K, eles trouxeram à tona algumas inferências neste sentido: (a) como o resíduo 767 encontra-se no domínio transmembrana de uma GPCR, é possível que esta mutação não só altere o processo de sinalização induzido pelo ligante, mas também, a ativação da respectiva proteína G; (b) segundo *Hu et al.*, o mutante p.E767A aumentou a

sensibilidade do CASR ao cálcio extracelular indicando que o E767 deve ajudar na manutenção do CASR em seu estado inativo (65). Portanto, estas evidências somadas à co-segregação fenótipo-genótipo exibida pelo caso índice e seu pai foram suficientes para justificar que a mutação p.E767K era a causa da doença ao favorecer a manutenção do CASR em seu estado ativado (49).

Curiosamente, na nossa casuística, quem apresenta esta mutação é a paciente 10 que só foi diagnosticada aos 75 anos de idade após um episódio de meningite viral na vigência de convulsões. Neste caso, a constatação de calcificações nos gânglios da base indicava que o quadro de hipoparatiroidismo era de longa data ainda que a paciente fosse assintomática. Por outro lado, a presença de incontinência urinária e o uso de diuréticos de alça, devido a uma cardiopatia, impossibilitaram estimarmos sua calciúria. No entanto, as múltiplas dosagens de PTH, ora indosáveis, ora inapropriadamente baixas para as suas baixas concentrações de cálcio sérico, fizeram com que insistíssemos na pesquisa de uma mutação ativadora no CASR. A constatação da mutação p.E767K no CASR foi de suma importância para esta paciente porque possibilitou: (a) a substituição de um diurético de alça por um diurético tiazídico, sem prejuízo para o seu tratamento cardiológico e (b) a abolição do quadro de convulsões na medida em que foi realizada reposição de cálcio com mínima dose de vitamina D.

Adicionalmente e, em concordância com as informações da literatura e com os nossos dados, a mutação p.E767K foi analisada pelo *Polyphen* que a

considerou como possível causa de doença ao passo que o *Mutationtaster* foi mais enfático atribuindo à mutação, a causa da doença.

Mesmo que a frequência dos casos de HAD entre as causas de hipoparatiroidismo idiopático seja variável, nossos dados também indicam que a abordagem molecular é uma importante ferramenta para o diagnóstico de certeza da doença com impacto potencial para o tratamento da mesma.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A pesquisa de mutações inativadoras no *CASR* permitiu a confirmação molecular em três dos quatro casos de HHF e de todos os casos de HPTNG, possibilitou orientação terapêutica adequada e a identificação de casos familiares e aconselhamento genético. Das cinco mutações identificadas, quatro delas são inéditas: p.R69H, p.T627I, p.E519X e p.R544X.
- ✓ A pesquisa de mutações ativadoras no *CASR* permitiu a confirmação molecular em apenas um dos quatro casos de hipoparatiroidismo idiopático. A determinação etiológica de HAD possibilitou a otimização do tratamento clínico da hipocalcemia da paciente em questão e a pesquisa da mutação p.E767K em seus descendentes cujo resultado foi negativo.
- ✓ Embora, em teoria, a presença de mutações nas regiões promotoras P1 e P2 do *CASR* possam interferir na expressão deste gene e explicar casos de HHF ou HAD, não encontramos mutações nestas regiões. Atribuímos este resultado ao fato da casuística ser pequena e/ou por provavelmente ser um mecanismo raro.
- ✓ Na nossa casuística, não encontramos casos de deleções ou duplicações do *CASR* e, conforme descrito na literatura, sua ocorrência parece ser um mecanismo incomum na gênese de alterações (inativadoras ou ativadoras) neste gene.

- ✓ Embora, em teoria, a presença de mutações nas regiões promotoras P1 e P2 do *CASR* possam interferir na expressão deste gene e explicar casos de HHF ou HAD, não encontramos mutações nestas regiões. Atribuímos este resultado ao fato da casuística ser pequena e/ou por provavelmente ser um mecanismo raro.

- ✓ Na nossa casuística, não encontramos casos de deleções ou duplicações do *CASR* e, conforme descrito na literatura, sua ocorrência parece ser um mecanismo incomum na gênese de alterações (inativadoras ou ativadoras) neste gene.

8. ANEXOS

Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:..... Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP:..... TELEFONE:..... DDD:(.....).

2.RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):
.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:

CEP:.....TELEFONE:..... DDD(.....)

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo do gene do receptor sensor do cálcio (*CASR*) em pacientes com distúrbios no metabolismo do cálcio.

2. PESQUISADOR: Regina Matsunaga Martin

CARGO/FUNÇÃO: Médica assistente

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N° 78691

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Endocrinologia e Metabologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 3 anos

- Essas informações são fornecidas para a sua participação voluntária nesta pesquisa que tem como objetivo estudar **o gene do sensor do cálcio (*CASR*) a partir de amostra de sangue por punção periférica da veia do antebraço ou de raspado da mucosa oral (bochecha)** na tentativa de encontrar **mutações** (“erros”) que justifiquem as alterações encontradas nos seus exames laboratoriais. Com este estudo podemos identificar a causa da sua doença, se seus familiares também são portadores dela, e se poderão transmiti-las para os seus filhos.
- A partir de amostras de sangue ou de raspado da mucosa oral será extraído o DNA genômico. A partir do DNA, e utilizando-se as técnicas de PCR e sequenciamento, será realizada a análise molecular do gene do *CASR*.
- Serão coletados dois tubos, com capacidade de 5 mL, de **sangue por punção periférica da veia do antebraço** ou serão coletados dois **swabs de raspado da mucosa oral** para obtenção do DNA.

4. A coleta de sangue causa apenas um desconforto no local da introdução da agulha que em alguns casos pode gerar um hematoma (mancha roxa). Trata-se do mesmo procedimento realizado quando é coletado sangue para a realização dos exames laboratoriais solicitados durante as consultas médicas; podendo inclusive serem realizados ao mesmo tempo.
5. O resultado deste estudo pode identificar a causa da sua doença permitindo melhor orientação do tratamento e identificar familiares com o mesmo problema.
6. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Regina Matsunaga Martin que pode ser encontrada no endereço: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, Prédio dos Ambulatórios – 2º andar -Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM42) - tel: 3069-6330. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.
7. É garantida sua liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.
8. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Você tem direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas.
9. Este estudo não resultará em despesas pessoais para você, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
10. Os pesquisadores envolvidos neste estudo se comprometem em utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo:

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Eu discuti com o Dra. Regina Matsunaga Martin sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data / /

Assinatura da testemunha (para casos de pacientes menores
de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de Data / /
deficiência auditiva ou visual).

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e
Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sharan K, Siddiqui JA, Swarnkar G, Chattopadhyay N. Role of calcium-sensing receptor in bone biology. *Indian J Med Res.* 2008 Mar;127(3):274-86. PubMed PMID: 18497443. Epub 2008/05/24. eng.
2. Hauache OM. Extracellular calcium-sensing receptor: structural and functional features and association with diseases. *Braz J Med Biol Res.* 2001 May;34(5):577-84. PubMed PMID: 11323743. Epub 2001/04/27. eng.
3. D'Souza-Li L. The calcium-sensing receptor and related diseases. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006 Aug;50(4):628-39. PubMed PMID: 17117288. Epub 2006/11/23. eng.
4. Aida K, Koishi S, Tawata M, Onaya T. Molecular cloning of a putative Ca(2+)-sensing receptor cDNA from human kidney. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Sep 14;214(2):524-9. PubMed PMID: 7677761. Epub 1995/09/14. eng.
5. Brown EM, Pollak M, Chou YH, Seidman CE, Seidman JG, Hebert SC. Cloning and functional characterization of extracellular Ca(2+)-sensing receptors from parathyroid and kidney. *Bone.* 1995 Aug;17(2 Suppl):7S-11S. PubMed PMID: 8579901. Epub 1995/08/01. eng.
6. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature.* 1993 Dec 9;366(6455):575-80. PubMed PMID: 8255296.
7. Hauache OM. Receptores Acoplados a Proteína G: Implicações para a Fisiologia e Doenças Endócrinas. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2001:228-39.
8. Rodbell M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature.* 1980 Mar 6;284(5751):17-22. PubMed PMID: 6101906. Epub 1980/03/06. eng.

9. Hermans E. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 2003 Jul;99(1):25-44. PubMed PMID: 12804697. Epub 2003/06/14. eng.
10. Gether U, Kobilka BK. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem.* 1998 Jul 17;273(29):17979-82. PubMed PMID: 9660746. Epub 1998/07/11. eng.
11. Conklin BR, Bourne HR. Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors. *Cell.* 1993 May 21;73(4):631-41. PubMed PMID: 8388779. Epub 1993/05/21. eng.
12. Ward DT. Calcium receptor-mediated intracellular signalling. *Cell Calcium.* 2004 Mar;35(3):217-28. PubMed PMID: 15200145. Epub 2004/06/18. eng.
13. Hu J, Spiegel AM. Structure and function of the human calcium-sensing receptor: insights from natural and engineered mutations and allosteric modulators. *J Cell Mol Med.* 2007 Sep-Oct;11(5):908-22. PubMed PMID: 17979873. Epub 2007/11/06. eng.
14. Arthur JM, Lawrence MS, Payne CR, Rane MJ, McLeish KR. The calcium-sensing receptor stimulates JNK in MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Aug 28;275(2):538-41. PubMed PMID: 10964699. Epub 2000/08/31. eng.
15. Hendy GN, Guarnieri V, Canaff L. Calcium-sensing receptor and associated diseases. *Progress in molecular biology and translational science.* 2009;89:31-95. PubMed PMID: 20374733.
16. Kiselyov K, Shin DM, Muallem S. Signalling specificity in GPCR-dependent Ca²⁺ signalling. *Cell Signal.* 2003 Mar;15(3):243-53. PubMed PMID: 12531423. Epub 2003/01/18. eng.
17. Brown EM. Calcium-sensing receptor. In: Rosen CJ, Compston JE, Lian JB, editors. *Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorders of Mineral Metabolism.* 7th ed. Washington: ASBMR; 2008. p. 134-41.
18. Bai M. Structure-function relationship of the extracellular calcium-sensing receptor. *Cell Calcium.* 2004 Mar;35(3):197-207. PubMed PMID: 15200143.

19. Chang W, Shoback D. Extracellular Ca^{2+} -sensing receptors--an overview. *Cell Calcium*. 2004 Mar;35(3):183-96. PubMed PMID: 15200142.
20. Chikatsu N, Fukumoto S, Takeuchi Y, Suzawa M, Obara T, Matsumoto T, et al. Cloning and characterization of two promoters for the human calcium-sensing receptor (CaSR) and changes of CaSR expression in parathyroid adenomas. *J Biol Chem*. 2000 Mar 17;275(11):7553-7. PubMed PMID: 10713061. Epub 2000/03/14. eng.
21. Canaff L, Hendy GN. Human calcium-sensing receptor gene. Vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Biol Chem*. 2002 Aug 16;277(33):30337-50. PubMed PMID: 12036954. Epub 2002/05/31. eng.
22. Canaff L, Hendy GN. Calcium-sensing receptor gene transcription is up-regulated by the proinflammatory cytokine, interleukin-1 β . Role of the NF-kappaB PATHWAY and kappaB elements. *J Biol Chem*. 2005 Apr 8;280(14):14177-88. PubMed PMID: 15684428. Epub 2005/02/03. eng.
23. Thakker RV. Disorders of the calcium-sensing receptor. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Dec 10;1448(2):166-70. PubMed PMID: 9920407. Epub 1999/01/27. eng.
24. Pidasheva S, D'Souza-Li L, Canaff L, Cole DE, Hendy GN. CASRdb: calcium-sensing receptor locus-specific database for mutations causing familial (benign) hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Hum Mutat*. 2004 Aug;24(2):107-11. PubMed PMID: 15241791. Epub 2004/07/09. eng.
25. Zajickova K, Vrbikova J, Canaff L, Pawelek PD, Goltzman D, Hendy GN. Identification and functional characterization of a novel mutation in the calcium-sensing receptor gene in familial hypocalciuric hypercalcemia: modulation of clinical severity by vitamin D status. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jul;92(7):2616-23. PubMed PMID: 17473068.
26. Nissen PH, Christensen SE, Heickendorff L, Brixen K, Mosekilde L. Molecular genetic analysis of the calcium sensing receptor gene in patients clinically suspected to have familial hypocalciuric hypercalcemia: phenotypic variation and mutation spectrum in a Danish population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Nov;92(11):4373-9. PubMed PMID: 17698911. Epub 2007/08/19. eng.

27. Gunn IR, Gaffney D. Clinical and laboratory features of calcium-sensing receptor disorders: a systematic review. *Annals of clinical biochemistry*. 2004 Nov;41(Pt 6):441-58. PubMed PMID: 15588433. eng.
28. Heath H, 3rd, Jackson CE, Otterud B, Leppert MF. Genetic linkage analysis in familial benign (hypocalciuric) hypercalcemia: evidence for locus heterogeneity. *Am J Hum Genet*. 1993 Jul;53(1):193-200. PubMed PMID: 8317484. Pubmed Central PMCID: 1682230. Epub 1993/07/01. eng.
29. Lloyd SE, Pannett AA, Dixon PH, Whyte MP, Thakker RV. Localization of familial benign hypercalcemia, Oklahoma variant (FBHOk), to chromosome 19q13. *Am J Hum Genet*. 1999 Jan;64(1):189-95. PubMed PMID: 9915958. Pubmed Central PMCID: 1377717. Epub 1999/01/23. eng.
30. Nesbit MA, Hannan FM, Graham U, Whyte MP, Morrison PJ, Hunter SJ, et al. Identification of a second kindred with familial hypocalciuric hypercalcemia type 3 (FHH3) narrows localization to a <3.5 megabase pair region on chromosome 19q13.3. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Apr;95(4):1947-54. PubMed PMID: 20133464.
31. Eastell R, Arnold A, Brandi ML, Brown EM, D'Amour P, Hanley DA, et al. Diagnosis of asymptomatic primary hyperparathyroidism: proceedings of the third international workshop. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Feb;94(2):340-50. PubMed PMID: 19193909.
32. Waller S, Kurzawinski T, Spitz L, Thakker R, Cranston T, Pearce S, et al. Neonatal severe hyperparathyroidism: genotype/phenotype correlation and the use of pamidronate as rescue therapy. *Eur J Pediatr*. 2004 Oct;163(10):589-94. PubMed PMID: 15241688. Epub 2004/07/09. eng.
33. Rodrigues LS, Cau AC, Bussmann LZ, Bastida G, Brunetto OH, Correa PH, et al. New mutation in the CASR gene in a family with familial hypocalciuric hypercalcemia (FHH) and neonatal severe hyperparathyroidism (NSHPT). *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011 Feb;55(1):67-71. PubMed PMID: 21468522.
34. Miyashiro K, Kunii I, Manna TD, de Menezes Filho HC, Damiani D, Setian N, et al. Severe hypercalcemia in a 9-year-old Brazilian girl due to a novel inactivating mutation of the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Dec;89(12):5936-41. PubMed PMID: 15579740. Epub 2004/12/08. eng.

35. Bai M, Janicic N, Trivedi S, Quinn SJ, Cole DE, Brown EM, et al. Markedly reduced activity of mutant calcium-sensing receptor with an inserted Alu element from a kindred with familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *J Clin Invest.* 1997 Apr 15;99(8):1917-25. PubMed PMID: 9109436. Pubmed Central PMCID: 508016. Epub 1997/04/15. eng.
36. Iglesias P, Diez JJ. Neurological picture. Intracranial calcifications and activating mutation of the calcium-sensing receptor. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry.* 2006 Nov;77(11):1243. PubMed PMID: 17043292. Pubmed Central PMCID: 2077387.
37. Sato K, Hasegawa Y, Nakae J, Nanao K, Takahashi I, Tajima T, et al. Hydrochlorothiazide effectively reduces urinary calcium excretion in two Japanese patients with gain-of-function mutations of the calcium-sensing receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jul;87(7):3068-73. PubMed PMID: 12107202.
38. Yamamoto M, Akatsu T, Nagase T, Ogata E. Comparison of hypocalcemic hypercalciuria between patients with idiopathic hypoparathyroidism and those with gain-of-function mutations in the calcium-sensing receptor: is it possible to differentiate the two disorders? *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Dec;85(12):4583-91. PubMed PMID: 11134112. Epub 2001/01/03. eng.
39. Zelikovic I. Hypokalaemic salt-losing tubulopathies: an evolving story. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Sep;18(9):1696-700. PubMed PMID: 12937211.
40. Vargas-Poussou R, Huang C, Hulin P, Houillier P, Jeunemaitre X, Paillard M, et al. Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a Bartter-like syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Sep;13(9):2259-66. PubMed PMID: 12191970. Epub 2002/08/23. eng.
41. Watanabe S, Fukumoto S, Chang H, Takeuchi Y, Hasegawa Y, Okazaki R, et al. Association between activating mutations of calcium-sensing receptor and Bartter's syndrome. *Lancet.* 2002 Aug 31;360(9334):692-4. PubMed PMID: 12241879. Epub 2002/09/21. eng.

42. Vezzoli G, Arcidiacono T, Paloschi V, Terranegra A, Biasion R, Weber G, et al. Autosomal dominant hypocalcemia with mild type 5 Bartter syndrome. *J Nephrol*. 2006 Jul-Aug;19(4):525-8. PubMed PMID: 17048213. Epub 2006/10/19. eng.
43. Kopple JD, Levey AS, Greene T, Chumlea WC, Gassman JJ, Hollinger DL, et al. Effect of dietary protein restriction on nutritional status in the Modification of Diet in Renal Disease Study. *Kidney Int*. 1997 Sep;52(3):778-91. PubMed PMID: 9291200.
44. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11;16(3):1215. PubMed PMID: 3344216. Pubmed Central PMCID: 334765. Epub 1988/02/11. eng.
45. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*. 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125. PubMed PMID: 16460794.
46. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jun 15;30(12):e57. PubMed PMID: 12060695. Pubmed Central PMCID: 117299. Epub 2002/06/13. eng.
47. Alsum Z, Abu Safieh L, Nygren AO, Al-Hamed MA, Alkuraya FS. Methylation-specific multiplex-ligation-dependent probe amplification as a rapid molecular diagnostic tool for pseudohypoparathyroidism type 1b. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010 Feb;14(1):135-9. PubMed PMID: 19916794. Epub 2009/11/18. eng.
48. Ward BK, Magno AL, Blitvich BJ, Rea AJ, Stuckey BG, Walsh JP, et al. Novel mutations in the calcium-sensing receptor gene associated with biochemical and functional differences in familial hypocalciuric hypercalcaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 May;64(5):580-7. PubMed PMID: 16649980.
49. Uckun-Kitapci A, Underwood LE, Zhang J, Moats-Staats B. A novel mutation (E767K) in the second extracellular loop of the calcium sensing receptor in a family with autosomal dominant hypocalcemia. *Am J Med Genet A*. 2005 Jan 15;132A(2):125-9. PubMed PMID: 15551332. Epub 2004/11/20. eng.

50. Nissen PH, Christensen SE, Wallace A, Heickendorff L, Brixen K, Mosekilde L. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) screening for exon copy number variation in the calcium sensing receptor gene: no large rearrangements identified in patients with calcium metabolic disorders. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010 Jun;72(6):758-62. PubMed PMID: 19912241.
51. Hannan FM, Nesbit MA, Turner JJ, Stacey JM, Cianferotti L, Christie PT, et al. Comparison of human chromosome 19q13 and syntenic region on mouse chromosome 7 reveals absence, in man, of 11.6 Mb containing four mouse calcium-sensing receptor-related sequences: relevance to familial benign hypocalciuric hypercalcaemia type 3. *Eur J Hum Genet*. 2010 Apr;18(4):442-7. PubMed PMID: 19809483. Pubmed Central PMCID: 2842244.
52. Marx SJ, Attie MF, Levine MA, Spiegel AM, Downs RW, Jr., Lasker RD. The hypocalciuric or benign variant of familial hypercalcemia: clinical and biochemical features in fifteen kindreds. *Medicine*. 1981 Nov;60(6):397-412. PubMed PMID: 7311809.
53. Yamashita H, Noguchi S, Uchino S, Watanabe S, Murakami T, Ogawa T, et al. Influence of renal function on clinico-pathological features of primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol*. 2003 Jun;148(6):597-602. PubMed PMID: 12773130.
54. Jayasena CN, Mahmud M, Palazzo F, Donaldson M, Meeran K, Dhillon WS. Utility of the urine calcium-to-creatinine ratio to diagnose primary hyperparathyroidism in asymptomatic hypercalcaemic patients with vitamin D deficiency. *Annals of clinical biochemistry*. 2011 Mar;48(Pt 2):126-9. PubMed PMID: 21303875.
55. Mead PA, Wilkinson R, Pearce SH. The odyssey of a patient with hypocalciuric hypercalcaemia: pitfalls to consider. *Nephrol Dial Transplant*. 1998 May;13(5):1300-5. PubMed PMID: 9623578.
56. Christensen SE, Nissen PH, Vestergaard P, Heickendorff L, Brixen K, Mosekilde L. Discriminative power of three indices of renal calcium excretion for the distinction between familial hypocalciuric hypercalcaemia and primary hyperparathyroidism: a follow-up study on methods. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Nov;69(5):713-20. PubMed PMID: 18410554.

57. Fernandez Lopez I, Fernandez Pena I, Cozar Leon MV, Vilorio Penas MM, Martinez De Pinillos Gordillo G, Fernandez-Ladreda MT, et al. [Usefulness of genetic tests in familial hypocalciuric hypercalcemia with atypical clinical presentation]. *Endocrinología y nutrición : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinología y Nutrición*. 2011 Aug-Sep;58(7):325-30. PubMed PMID: 21697018. Utilidad del estudio genético en la hipercalcemia hipocalciúrica familiar en familias con presentaciones clínicas atípicas.
58. Simonds WF, James-Newton LA, Agarwal SK, Yang B, Skarulis MC, Hendy GN, et al. Familial isolated hyperparathyroidism: clinical and genetic characteristics of 36 kindreds. *Medicine*. 2002 Jan;81(1):1-26. PubMed PMID: 11807402.
59. Warner J, Epstein M, Sweet A, Singh D, Burgess J, Stranks S, et al. Genetic testing in familial isolated hyperparathyroidism: unexpected results and their implications. *Journal of medical genetics*. 2004 Mar;41(3):155-60. PubMed PMID: 14985373. Pubmed Central PMCID: 1735699.
60. Bilezikian JP, Khan A, Potts JT, Jr., Brandi ML, Clarke BL, Shoback D, et al. Hypoparathyroidism in the adult: epidemiology, diagnosis, pathophysiology, target-organ involvement, treatment, and challenges for future research. *J Bone Miner Res*. 2011 Oct;26(10):2317-37. PubMed PMID: 21812031. Pubmed Central PMCID: 3405491.
61. Pollak MR, Brown EM, Estep HL, McLaine PN, Kifor O, Park J, et al. Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca(2+)-sensing receptor gene mutation. *Nat Genet*. 1994 Nov;8(3):303-7. PubMed PMID: 7874174.
62. Baron J, Winer KK, Yanovski JA, Cunningham AW, Laue L, Zimmerman D, et al. Mutations in the Ca(2+)-sensing receptor gene cause autosomal dominant and sporadic hypoparathyroidism. *Hum Mol Genet*. 1996 May;5(5):601-6. PubMed PMID: 8733126.
63. Pearce SH, Williamson C, Kifor O, Bai M, Coulthard MG, Davies M, et al. A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutations in the calcium-sensing receptor. *N Engl J Med*. 1996 Oct 10;335(15):1115-22. PubMed PMID: 8813042.
64. Lienhardt A, Bai M, Lagarde JP, Rigaud M, Zhang Z, Jiang Y, et al. Activating mutations of the calcium-sensing receptor: management of hypocalcemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Nov;86(11):5313-23. PubMed PMID: 11701698.

65. Hu J, Reyes-Cruz G, Chen W, Jacobson KA, Spiegel AM. Identification of acidic residues in the extracellular loops of the seven-transmembrane domain of the human Ca^{2+} receptor critical for response to Ca^{2+} and a positive allosteric modulator. *J Biol Chem*. 2002 Nov 29;277(48):46622-31. PubMed PMID: 12297503. Pubmed Central PMCID: 3425642.