

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LORENA SCHNEIDER ALMEIDA

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *CRTAP* ATRAVÉS
DA TÉCNICA DE PCR-SSCP-SEQUENCIAMENTO EM
PACIENTES COM OSTEOGÊNESE IMPERFEITA DO
ESPÍRITO SANTO**

VITÓRIA

2013

LORENA SCHNEIDER ALMEIDA

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *CRTAP* ATRAVÉS
DA TÉCNICA DE PCR-SSCP-SEQUENCIAMENTO EM
PACIENTES COM OSTEOGÊNESE IMPERFEITA DO
ESPÍRITO SANTO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Flavia de Paula

VITÓRIA

2013

LORENA SCHNEIDER ALMEIDA

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *CRTAP* ATRAVÉS
DA TÉCNICA DE PCR-SSCP-SEQUENCIAMENTO EM
PACIENTES COM OSTEOGÊNESE IMPERFEITA DO
ESPÍRITO SANTO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada no dia 28 de fevereiro de 2013

Prof^a. Dr^a. Flavia de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Flavia Imbroisi Valle Errera
Escola Superior de Ciências da Santa Casa
de Misericórdia de Vitória (Membro Interno)

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba
Universidade Federal de Juiz de Fora
(Membro Externo)

VITÓRIA

2013

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar na importância e na colocação, agradeço a Deus pelo dom da Vida, pelos momentos impagáveis que vivi e pelos problemas que tive que transpor para enfim chegar até aqui.

A minha Mãe e meu Pai pelo apoio incondicional, amparo nas horas mais difíceis e pelo amor maravilhoso que tem por mim. Amo vocês.

Ao Arthur meu irmão pelo carinho reconfortante.

Agradeço a toda minha família que infelizmente é inumerável em apenas uma folha de papel. Sem exceção todos são importantes na minha vida.

Ao Namorado Bruno, mesmo nos momentos de loucura completa não desistiu de mim.

A minha amiga Beatriz (Bia), sempre com a certeza de que tudo dará certo no final.

A Tássia, pela sensação boa de poder sempre contar e confiar nela.

As companheiras, Dani, Clara, Tháisa, Maíra, Lígia e Ingrid, sempre presente nos melhores e piores dias de experimentos, a rotina com vocês ficou mais leve e divertida.

A todos os colegas de Laboratório e Mestrado que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho.

A professora Flávia de Paula, minha orientadora, pela acolhida e ensinamentos.

Às agências financiadoras: FAPES, FACITEC, MCTI/CNPQ/MEC/Capes.

RESUMO

A Osteogênese Imperfeita (OI) é uma doença genética caracterizada por defeitos estruturais da proteína do colágeno tipo I ou por redução da sua biossíntese causando diminuição da massa óssea e a predisposição a fraturas e deformidades ósseas. Aproximadamente 90% dos indivíduos com OI apresentam herança autossômica dominante causada por mutações nos genes *COL1A1* ou *COL1A2*. Contudo, é crescente o número de genes ligados à herança autossômica recessiva da OI descritos na literatura. O gene *CRTAP* foi o segundo gene identificado causando OI com herança recessiva. Este gene possui 6.622 pb, 7 exons e codifica uma proteína de 46,5 KDa. O gene *CRTAP* codifica a proteína da cartilagem associada (CRTAP) que faz parte do complexo prolil 3-hidroxilação, responsável por modificações pós-traducionais fundamentais durante a biossíntese da molécula de colágeno. Mutações no gene *CRTAP* estão relacionadas à forma grave ou letal da doença. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar as porções codificantes do gene *CRTAP* e suas regiões adjacentes em pacientes com OI do estado do Espírito Santo por meio da técnica de triagem de mutações de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP) e sequenciamento. Foram estudados 24 pacientes com diagnóstico clínico de OI do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória de Vitória, Brasil. As idades dos pacientes variaram de 2 a 16 anos (mediana: 14,5 anos) sendo 15 indivíduos do sexo masculino e 9 do sexo feminino, 11 pacientes apresentam a forma leve da doença, 5 a forma moderada e 9 a forma grave da doença. Os casos letais de OI não foram obtidos por dificuldades metodológicas. Foi encontrado o polimorfismo c.534C>T no exon 2 do gene *CRTAP*, previamente relatado na literatura, em pacientes da amostra. Não foram identificadas mutações patogênicas neste estudo. Os resultados desse trabalho sugerem que mutações no gene *CRTAP* são raras na população com OI do ES, corroborando dados da literatura. Esses dados poderão auxiliar na elaboração de estratégias metodológicas mais eficientes para o diagnóstico molecular de OI.

Palavras-chave: Osteogênese Imperfeita autossômica recessiva, *CRTAP*, SSCP, Espírito Santo.

ABSTRACT

The Osteogenesis Imperfecta (OI) is a genetic disease characterized by structural defects of type I collagen protein or by reducing its biosynthesis causing decreased bone mass and predisposition to fractures and bone deformities. Approximately 90% of individuals with OI exhibit autosomal dominant inheritance caused by mutations in the genes *COL1A1* and *COL1A2*. However, the number of genes linked to autosomal recessive forms of OI is increasing in the literature. The *CRTAP* gene was the second identified causing recessive inheritance OI. This gene has 6622 bp, seven exons and encodes a protein of 46.5 kDa. The *CRTAP* encoding the protein cartilage associated (CRTAP) which is part of the collagen 3-hydroxylation complex, responsible for post-translational modifications during the biosynthesis of collagen molecule. *CRTAP* mutations are related to severe and lethal form of the disease. The target of this research was evaluating the exons of *CRTAP* and its adjacent regions in OI patients from Espírito Santo through the *Single-Stranded Conformation Polymorphism* (SSCP) screening of mutations and sequencing. We studied 24 patients with clinical diagnosis of OI from Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória de Vitória, Brazil. The patients' ages ranged from 2 to 16 years (median: 14.5). The sex proportion of the patients was 15 males and 9 females. Eleven patients have mild clinical symptoms of the disease, 5 show moderate symptoms and 9 were severe cases. The lethal OI cases were not obtained by methodological difficulties. We found the polymorphisms c.534C> T previously reported in exon 2 of the *CRTAP* gene in patients from sample. No pathogenic mutations were found in this study. The results of this study suggest that mutations in *CRTAP* are rare in ES population. These data may assist in developing more efficient methodological strategies for molecular diagnosis of OI.

Key words: Autosomal recessive Osteogenesis Imperfecta; *CRTAP*, SSCP, Espírito Santo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da Molécula de colágeno tipo I	15
Figura 2 - Esquema representativo do complexo da prolil 3-hidroxição.....	17
Figura 3 - Radiografia mostrando o uso de hastas intramedulares.....	22
Figura 4 – Heredrograma dos casos familiares de OI.....	29
Figura 5 - Resultados de SSCP em gel de MDE do exon 1 evidenciando padrões de bandas constantes.....	35
Figura 6 - Resultado de SSCP do exon 2 evidenciando padrões de bandas distintos.....	36
Figura 7 - Sequenciamento de amostras do exon 2.....	36
Figura 8 - Resultado de SSCP dos exons 3, 4 e 5 evidenciando padrões de bandas constantes.....	37
Figura 9 - Resultado de SSCP do exon 6 evidenciando padrões de bandas distintos.....	38
Figura 10 -. Resultado de SSCP do exon 7.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da OI.....	21
Tabela 2 - Caracterização clínica dos pacientes com OI.....	28
Tabela 3 - Sequência dos primers utilizados na PCR dos fragmentos do gene <i>CRTAP</i>	31
Tabela 4 - Concentrações dos reagentes utilizados na PCR dos fragmentos do gene <i>CRTAP</i>	31
Tabela 5 - Condições de temperatura e tempo da PCR dos fragmentos do gene <i>CRTAP</i>	32
Tabela 6 - Condições de corrida eletroforética em gel de SSCP.....	33

LISTA DE SIGLAS

A	Adenina
aC	Antes de Cristo
AD	Autossômica Dominante
AR	Autossômica Recessiva
C	Citosina
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CRTAP	Proteína da Cartilagem Associada (do inglês <i>Cartilage-Associated Protein</i>)
<i>CRTAP</i>	Gene da proteína da Cartilagem Associada (do inglês <i>Cartilage-Associated Protein</i>)
DMO	Densidade Mineral Óssea
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido dextrorribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ES	Espírito Santo
<i>FKBP10</i>	Gene que codifica a proteína FK506 (do inglês <i>Binding protein 10</i>)
G	Guanina
HINSG	Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória
HSP47	Proteína codificada pelo gene <i>SERPINF1</i> (do inglês <i>Heat shock protein 47</i>)

<i>LEPRE1</i>	Gene que codifica a proteína prolil 3-hidroxilase 1 (do inglês <i>leucine proline-enriched proteoglycan – leprecan - 1</i>)
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês <i>Messenger Ribonucleic acid</i>)
OI	Osteogênese Imperfeita
P3H	Prolil 3-hidroxilação
P3H1	Prolil 3-hidroxilase 1
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
PEDF	do inglês <i>Protein Pigment Epithelium-Derived Factor</i>
<i>PLOD2</i>	Gene que codifica a proteína lisil hidroxilase 2
PPIB	Peptidil isomerase cis-trans prolil
RER	Retículo endoplasmático rugoso
<i>SERPINH1</i>	Gene que codifica a <i>serpin peptidase inhibitor</i>
SNP	do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<i>SP7</i>	Gene que codifica a proteína Osterix
SSCP	Polimorfismo de conformação de fita simples (do inglês <i>Single-Stranded Conformation Polymorphism</i>)
T	Timina
TBE	tampão tris/borato/EDTA
TMED	Tetrametiletilenediamine
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	O COLÁGENO E SUA ESTRUTURA	14
2.2	O COMPLEXO DA PROLIL 3 – HIDROXILAÇÃO	15
2.3	OS GENES CAUSADORES DA OSTEOGÊNESE IMPERFEITA	17
2.4	CLASSIFICAÇÃO DA OSTEOGÊNESE IMPERFEITA	19
2.5	TRATAMENTO	21
2.6	DIAGNÓSTICOS DA OSTEOGÊNESE IMPERFEITA	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	METODOLOGIA	26
4.1	APROVAÇÃO DO ESTUDO	26
4.2	AMOSTRAS	26
4.3	MÉTODOS	30
4.3.1	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	30
4.3.2	AMPLIFICAÇÃO DO DNA	30
4.3.3	TRIAGEM DE MUTAÇÕES	32
4.3.4	SEQUENCIAMENTO	34
5	RESULTADOS	35
5.1	EXON 1	35
5.2	EXON 2	35
5.3	EXON 3, 4 E 5	37
5.4	EXON 6	38
5.5	EXON 7	38
6	DISCUSSÕES	40
6.1	EXONS SEM ALTERAÇÃO	40
6.2	EXONS COM ALTERAÇÕES POLIMÓFICAS	41
6.3	TECNICA DE SSCP NA TRIAGEM DE MUTAÇÕES NO GENE <i>CRTAP</i>	43
7	CONCLUSÕES	45
8	REFERENCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A Osteogênese Imperfeita (OI) é uma doença genética caracterizada por defeitos estruturais da proteína do colágeno tipo I ou por redução da sua biossíntese causando diminuição da massa óssea e aumento de fraturas (FOLKESTAD *et al.*, 2012). A principal característica clínica dos pacientes afetados é a fragilidade e/ou deformidade óssea. Em alguns casos também são observados outros sintomas, como esclera azulada, deformidade dentária, problemas auditivos ou cardíacos.

O primeiro indivíduo conhecido com OI data de cerca do ano 1.000 aC. Esta conclusão foi obtida após estudo dos restos mumificados de uma criança egípcia (LOWENSTEIN, 2009). Sillence *et al.* (1979) foi um dos primeiros pesquisadores a estudar a Osteogênese Imperfeita e propôs que a doença fosse subdividida de acordo com sua gravidade, dados radiológicos e genéticos em quatro diferentes tipos: tipo I (leve), tipo II (letal), tipo III (grave) e tipo IV (moderada).

De acordo com a Associação Brasileira de Osteogênese Imperfeita (ABOI), a estimativa é de um caso para cada 20 a 50 mil nascimentos no Brasil, assim como em outros países. Apesar de alguns pesquisadores contestarem esse dado, pois o diagnóstico da OI ainda é difícil e muitas vezes estabelecido tardiamente (Disponível em: <<http://aboi.org.br/oque.html>> Acesso em: 12 janeiro 2013).

Aproximadamente 90% dos indivíduos com OI apresentam herança genética autossômica dominante causadas por mutações nos genes *COL1A1* ou *COL1A2* (SYKES *et al.*, 1990; KÖRKKÖ *et al.*, 1998) que codificam respectivamente as cadeias de pró-colágeno alfa-1 e pró-colágeno alfa-2. Já a forma autossômica recessiva da doença pode ser causada por oito genes diferentes, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *PLOD2*, *SP7*, *LEPRE1*, *CRTAP*, *PPIB*, responsáveis, geralmente, pelas formas mais graves da doença e que codificam proteínas envolvidas na biossíntese de colágeno tipo I, com exceção dos genes *SP7* e *SERPINF1* (CHRISTIANSEN *et al.*, 2010; BECKER *et al.*, 2011; ALANAY *et al.*, 2010; HYRY *et al.*, 2009; LAPUNZINA *et al.*, 2010; CABRAL *et al.*, 2007; BARNES *et al.*, 2006 e BARNES *et al.*, 2010).

Analisando os dados presentes no banco de dados *Osteogenesis Imperfecta Variant Database-UK* as mutações no gene *CRTAP* são a segunda causa mais frequente de OI com padrão herança recessiva, sendo que mutações no gene *LEPRE1* são a primeira (Disponível em: <<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/>> Acesso em: 20 janeiro 2013).

O Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória de Vitória-ES, um dos 14 Centros de Referência em Osteogênese Imperfeita do Brasil, reúne um grupo relativamente grande de pacientes com esta doença rara. Caracterizar o padrão de mutações no gene *CRTAP* em pacientes de Vitória-ES ajudará na elaboração de estratégias necessárias para o diagnóstico molecular da doença.

A identificação das mutações e padrão de herança que causam a doença possibilitará a realização do aconselhamento genético e a estimativa de risco de recorrência da OI para os indivíduos em questão. Assim, os resultados deste estudo além de contribuírem para aumentar nosso conhecimento sobre os aspectos moleculares da doença em pacientes do Brasil, também poderão auxiliar na prevenção de novos casos de OI na população.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O COLÁGENO E SUA ESTRUTURA

O colágeno é uma das maiores e mais abundantes proteínas do organismo. Existem diferentes tipos de colágenos identificados como os formadores de fibrilas, como os tipos I, II, III, V e XI (PROCKOP,1985). Estas proteínas compõem um importante grupo de polipeptídeos e são caracterizadas por apresentarem um domínio de tripla hélice contínuo que se estende por mais de 1.000 aminoácidos (MARINI et al. 2007).

Cada cadeia consiste de repetições ininterruptas de Glicina-X-Y. O aminoácido glicina ocupa a posição axial da hélice, pois é o único compacto o suficiente para tanto. Por isso, mutações que resultam na sua substituição por outros aminoácidos perturbam de forma substancial a estrutura helicoidal da proteína. Na maioria das vezes, os aminoácidos prolina e 4-hidroxiprolina, ocupam as posições X e Y da cadeia polipeptídica, respectivamente (PIHLAJANIEMI et al., 1984). Estes dois aminoácidos limitam a rotação das cadeias polipeptídicas. A tripla hélice é ainda estabilizada por ligações de hidrogênio, muitas das quais requerem a presença de 4-hidroxiprolina (PROCKOP e KIVIRIKKO, 1995).

O colágeno Tipo I é a proteína mais abundante e o principal constituinte da pele, tendões, ligamentos, ossos e muitos outros tecidos fibrosos. Esta proteína é composta de três subunidades, sendo duas delas cadeias de pró-colágeno alfa 1, codificada pelo gene *COL1A1* e uma cadeia de pró-colágeno alfa 2, codificada pelo gene *COL1A2*. Estas cadeias são unidas inicialmente na extremidade carboxi ou C terminal, de forma que a interação das 3 cadeias se propaga para a extremidade amino ou N terminal como um zíper, constituindo a hélice tripla, de acordo com a figura 1 (NUSSBAUM et al., 2001).

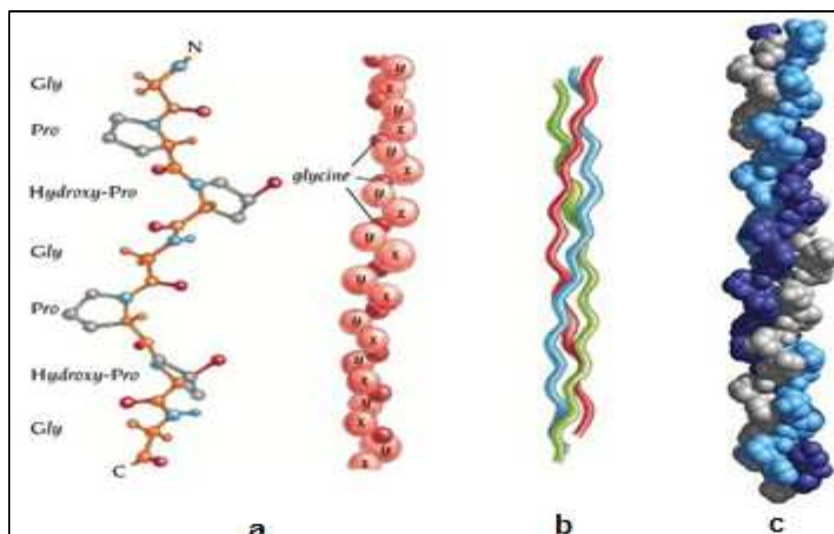


Figura 1: Estrutura da Molécula de colágeno tipo I. a) distribuição dos aminoácidos na molécula de pró-colágeno; b) tripla hélice; c) As três hélices se enrolam com uma torção orientada à direita
 Fonte: <http://bifi.es/~jsancho/estructuramacromoleculas/5Proteinasfibrosas/colagenol.JPG> (modificado).

2.2 O COMPLEXO DA PROLIL 3 – HIDROXILAÇÃO

A biossíntese da molécula de colágeno envolve uma série única de modificações pós-traducionais que são catalisadas por diversas enzimas específicas (MYLLYHARJU e KIVIRIKKO, 2004). No retículo endoplasmático rugoso (RER) das células as três cadeias de pró-colágeno alfa são modificadas e unidas em tripla hélice. Vários domínios desta proteína são extensivamente hidroxilados e glicosilados. A hidroxilação de múltiplos resíduos do aminoácido prolina em prolil 4-hidroxilase confere estabilidade térmica para a tripla hélice, enquanto que a hidroxilação de lisina em lisil-hidroxilase fornece pontos de ligação para as unidades de hidratos de carbono (que podem ser de galactose ou glucosil-galactose) e desempenha um papel crucial na formação dos pontos de ligações intra e intermolecular (MARINI et al., 2007).

O complexo prolil 3-hidroxilação (P3H) é responsável pela hidroxilação dos aminoácidos prolina nas posições 986 (Pro986) e 707 (Pro707) nas cadeias alfa1(1) e alfa2(1), respectivamente. Além disto, este complexo pode atuar como uma

chaperona molecular ajudando no reconhecimento de seu substrato (ISHIKAWA, 2009). Por outro lado, em outros colágenos, como nos tipos IV e V, a hidroxilação ocorre em vários dos resíduos de prolina que constituem a cadeia polipeptídica (BENTZ et al., 1983).

O complexo P3H é formado pela associação de três proteínas, na proporção de 1:1:1, multifuncionais que exercem papéis extracelulares independentes. São ela: prolil 3-hidroxilase 1 (P3H1), ciclofilina B ou peptidil isomerase cis-trans prolil (PPIB) e proteína da cartilagem associada (CRTAP) (VRANKA et al., 2004).

A enzima prolil 3-hidroxilase 1 (P3H1) é codificada pelo gene *LEPRE1*. Dentre as suas funções, foi observada como proteoglicana da matrix extracelular e como supressor de crescimento. Mutações no *LEPRE1* podem causar a redução da prolil 3-hidroxilação (MARINI et al., 2007; VRANKA et al., 2004).

A proteína ciclofilina B (CYPB) codificada pelo gene *PPIB* é responsável pela isomerização *cis/trans* das prolinas nas moléculas de pró-colágeno. Cerca de 20% dos aminoácidos na tripla hélice de colagénio são de resíduos prolil e as ligações peptídicas na molécula madura devem estar na configuração *trans* para permitir o dobramento adequado da tripla hélice. (PYOTT et al., 2011).

A proteína da cartilagem associada ou CRTAP tem 46,5 KDa e apresenta 401 aminoácidos, foi primeiramente encontrada em cultura de condrócitos e em cartilagem de embriões de galinhas e ratos (CASTAGNOLA et al., 1997). Para elucidar a função de CRTAP *in vivo*, Morello et al. (2006) utilizaram ratos *knock-out* para o gene *CRTAP*. Estes animais desenvolveram osteopenia grave, rizomelia (encurtamento relativo na região proximal do osso longo em comparação com o segmento distal) e cifose pronunciada aos 6 meses de idade.

A CRTAP é a proteína auxiliar (*helper protein*) do complexo e possui grande homologia com a extremidade amino da proteína P3H1 (CHANG et al., 2010). É expressa no sistema esquelético por condrócitos, osteoblastos e osteoclastos. Embora esteja predominantemente localizada no RER, também é encontrado na matriz extracelular (CASTAGNOLA et al., 1997; MORELLO et al., 2006).

Valli et al. (2011) identificaram uma mutação no exon 1 do gene *CRTAP*, em um menino egípcio com OI. Este paciente apresentou redução de, aproximadamente 10%, dos níveis normais da proteína CRTAP e ausência total de expressão desse gene em cultura de fibroblastos. A molécula de colágeno tipo I deste paciente apresentou uma redução no rendimento da 3-hidroxilação da Pro986 de 95% em relação ao controle normal.

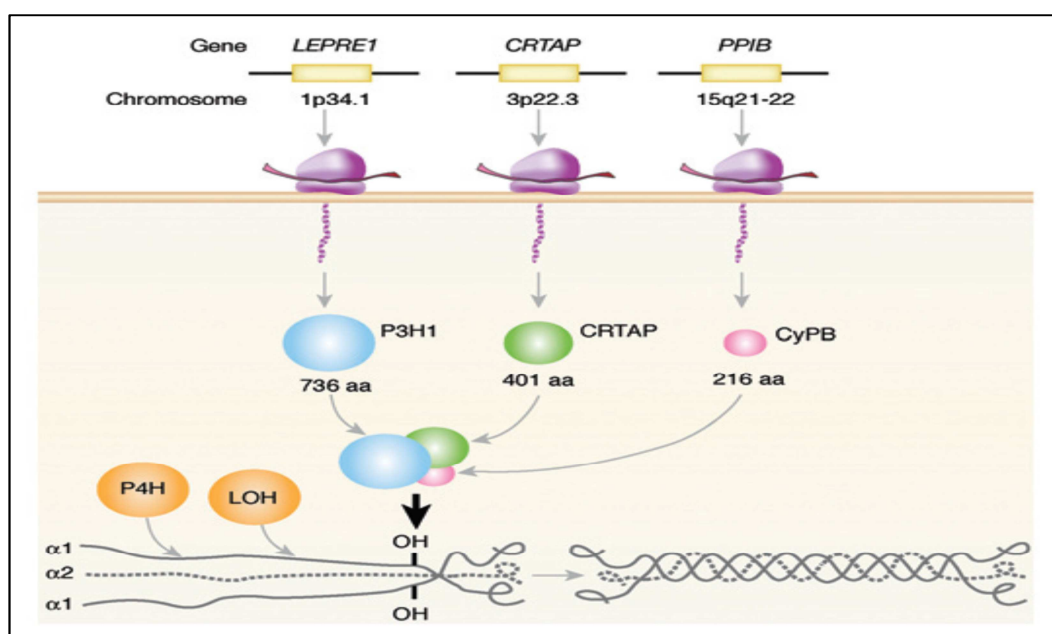


Figura 2: Esquema representativo do complexo da prolil 3-hidroxilação. FONTE: MARINI et al., 2007.

2.3 OS GENES CAUSADORES DA OSTEOGÊNESE IMPERFEITA

Mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2*, localizados respectivamente em 17q21.33 e 7q21.3, geram as formas autossômicas dominantes da OI e codificam as moléculas de pró-colágeno alfa1 e pró-colágeno alfa2, respectivamente (PIHLAJANIEMI et al., 1984). As mutações nestes genes podem resultar em deficiência quantitativa ou alterações na sequência de aminoácidos que levam a

defeitos estruturais da tripla hélice, secreção alterada e/ou formação de fibrilas anormais (BYERS E COLE, 2002).

Semler et al. (2012) e Cho et al. (2012) identificaram simultaneamente uma mutação heterozigótica na região 5'-UTR do gene *IFITM5*, localizado em 11p15.5, em pacientes com a forma autossômica dominante de OI. A expressão deste gene é restrita ao tecido esquelético e produz uma proteína transmembranar que é induzida por interferon 5 (IFITM5). A função de IFITM5 ainda não é bem compreendida, mas acredita-se que esteja envolvida no processo de formação dos ossos.

Os genes que quando mutados levam as formas autossômicas recessivas da OI foram recentemente identificados e são: *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *PLOD2*, *SP7*, *LEPRE1*, *CRTAP*, *PPIB* (VAN DIJK et al., 2011; HOMAN et al., 2011; LAPUNZINA et al., 2010; WILLAERT et al., 2009).

A chaperona HSP47, codificada pelo gene *SERPINH1*, atua direcionando a tripla hélice de pró-colágeno tipo I ao complexo de Golgi e monitorando sua integridade (VAN DIJK et al., 2011). Este gene se encontra em 11q13.5.

O gene *SERPINF1* está localizado em 17p13.3 e codifica a proteína PEDF (*Protein Pigment Epithelium-Derived Factor*) conhecida principalmente por seu papel de inibidor da angiogênese e como fator da diferenciação celular. No entanto, análises de expressão no tecido ósseo a partir de ratos de tipo selvagem e em experiências *in vitro* com células de murinos indicam que a PEDF participa da formação do osso e da sua remodelação (BECKER et al., 2011).

O gene *FKBP10* está localizado em 17q21.2. Codifica a proteína de ligação FK506 (anteriormente conhecido como FKBP65) membro da família das FKBP's que têm sido implicadas em processos celulares, tais como a isomerização peptidil-prolil *cis-trans* e funções de chaperonas. Em estudos *in vitro* desta proteína têm demonstrado capacidade para interagir com a tripla hélice de colágeno (ISHIKAWA et al., 2009).

O gene *PLOD2*, localizado em 3q24, produz uma enzima óssea específica, a lisil hidroxilase 2. Alterações nessa enzima resultam em ligações cruzadas aberrantes

da molécula de colágeno devido à hidroxilação insuficiente de resíduos de lisina e telopeptídeos das moléculas de pró-colágeno (HYRY et al., 2009).

SP7 codifica a proteína Osterix, um fator de transcrição específico de osteoblastos que tem sido demonstrado ser essencial para a formação de osso em ratos (SUN et al., 2010; ZHOU et al., 2010). Está localizado em 12q13.3.

O gene *LEPRE1* possui 15 exons e está localizado em 1p34.1. Este gene codifica a proteína prolil 3 hidroxilase-1 (P3H1). Este é um dos genes com maior taxa de mutação das formas autossômicas recessivas de OI estudadas (CABRAL, 2007).

E o gene *PPIB* possui 5 exons e está localizado em 15q21-q22. Este gene codifica a proteína de ligação ciclosporina, que juntamente com as proteínas P3H1 e CRTAP formam o complexo da prolil 3 – hidroxilação que atua promovendo modificações pós traducionais na molécula de colágeno I (ISHIKAWA, 2009).

O gene *CRTAP* está localizado em 3p22.3, é composto por 7 exons e apresenta 6.622 pb. Esse gene codifica a proteína da cartilagem associada (CRTAP) de 46,5 kDa e possui 401 aminoácidos (MARINI et al., 2007). Esse foi o primeiro gene de herança autossômica recessiva relacionado com a forma letal de OI (BARNES et al., 2006). Até o momento 21 mutações distintas foram descritas para esse gene causando OI (Disponível em: <<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/>> Acesso em: 20 janeiro 2013).

2.4 CLASSIFICAÇÃO DA OSTEOGÊNESE IMPERFEITA

Em 1979, Silience et al. propuseram uma classificação da OI com base em achados clínicos e genéticos dos pacientes, de acordo com os seguintes parâmetros:

Tipo I: consiste na forma mais leve da doença. Os pacientes apresentam pouca deformidade óssea, estatura bem próxima do normal, baixo número de fraturas,

esclera azulada e alguns pacientes desenvolvem perda de audição. O tipo I é subdividido em A se o paciente apresentar dentes normais ou em B se apresentar deformidades dentárias específicas – dentinogênese imperfeita.

Tipo II: forma mais letal da doença, com mortalidade no período perinatal ou nos primeiros dias de vida. Os principais sintomas são presença de ossos longos curvados e curtos, com marcas oriundas de fraturas intrauterinas, insuficiência respiratória e malformações no sistema nervoso.

Tipo III: forma não letal mais grave da doença. É caracterizada por baixa estatura, alto número de fraturas, face triangular, dentinogênese imperfeita e perda de audição.

Tipo IV: forma de grande heterogeneidade clínica da doença, com sintomas variando de moderados a graves. Os pacientes apresentam perda de audição, osteoporose, fraturas vertebrais e deformidade nos ossos longos. Este tipo de OI possui uma subclassificação em (A) se o paciente apresentar dentes normais ou em (B) se apresentar dentinogênese imperfeita.

Após a identificação de mutações em genes associados com as formas AR de OI Forlino et al. (2011) propuseram modificações da classificação de Silence et al. (1979). Esta nova classificação leva em consideração, além de aspectos clínicos, a causa genética molecular da doença em cada paciente (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação da OI. Modificado de FORLINO et al. (2011).

TIPO DE OI	HERANÇA	FENÓTIPO	GENE
I	AD	Leve	<i>COL1A1</i>
II	AD	Letal	<i>COL1A1/COL1A2</i>
III	AD	Grave/ Deformação progressiva	<i>COL1A1/COL1A2</i>
IV	AD	Moderado	<i>COL1A1/COL1A2</i>
V	AD	Histologia distinta	<i>Desconhecido</i>
VI	AR	Defeitos na mineralização	<i>SERPINF1</i>
VII	AR	Grave a Letal	<i>CRTAP</i>
VIII	AR	Grave a Letal	<i>LEPRE1</i>
IX	AR	Moderado a Grave	<i>PPIB</i>
X	AR	Grave a Letal	<i>SERPINH1</i>
XI	AR	Deformação progressiva	<i>FKBP10</i>
Síndrome de Bruck	AR	Contraturas das juntas	<i>PLOD2</i>

2.5 TRATAMENTO

Quando o diagnóstico para OI é estabelecido, o indivíduo afetado deve ser avaliado por uma equipe multidisciplinar composta de geneticistas, ortopedistas, fisiatras, endocrinologistas, fisioterapeutas, pediatras e dentistas. O tratamento engloba: farmacologia, tratamento ortopédico, reabilitação física, tratamento dentário, tratamento para perda auditiva e orientações quanto ao aconselhamento genético (STEINER et al., 1993).

No tratamento farmacológico são administrados bisfosfonatos, fármacos sintéticos análogos ao pirofosfato, um produto normal do metabolismo humano. O mecanismo de ação dessas drogas envolve a inibição da reabsorção óssea por indução da apoptose dos osteoclastos (MARINI, 2010). A terapia com bisfosfonatos em pacientes com OI se baseia em vários ensaios clínicos como de Philippi et al. (2009), que observaram uma melhora significativa na densidade mineral óssea em indivíduos afetados com OI e tratados com bisfosfonatos orais ou intravenosos.

O uso de hormônio de crescimento para contornar a baixa estatura nos tipos III e IV de OI ainda está sob ativa investigação (MARINI et al., 2003).

Nos tipos III e IV, em que a frequência de fraturas e deformações ósseas é maior, são inseridas hastas intramedulares no canal da medula óssea, no centro dos ossos longos, para alinhar e minimizar o número de fraturas (MONTI et al., 2010) (Figura 4). Além disto, estes pacientes possuem maior chance de desenvolverem escoliose grave o que pode levar a insuficiência pulmonar. Nestes casos a cirurgia corretiva é frequentemente realizada para prevenir este sintoma, principalmente quando a curvatura da escoliose é superior a 60 graus (MARINI, 2010).

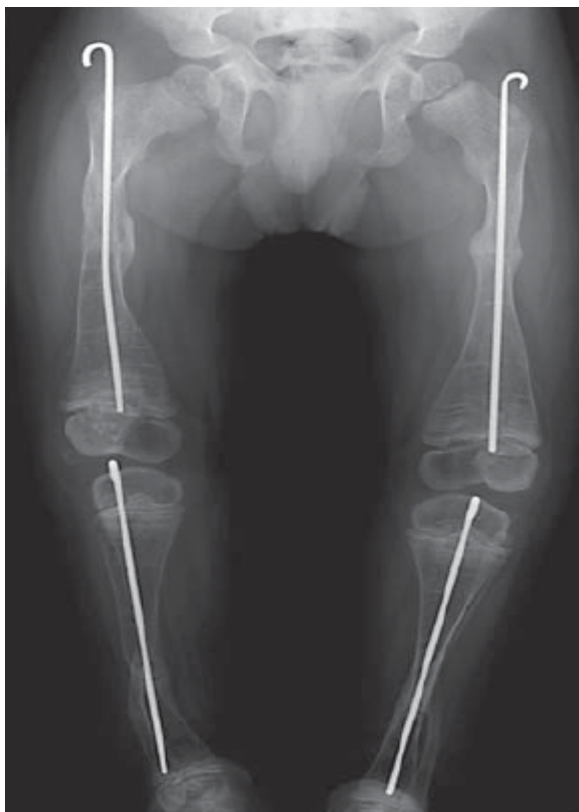


Figura 3: Radiografia de hastas intramedulares.

Fonte: VAN DIJK et al. 2011.

Os pacientes com dentinogênese imperfeita desenvolvem fraturas e desgaste excessivo dos dentes devido a fragilidade destas estruturas. O tratamento nestes casos pode ser realizado por nivelamento dos dentes com polímeros rígidos, a fim de evitar infecções e deformidades faciais (MONTI et al., 2010).

Alguns estudos já vêm utilizando células tronco como uma possibilidade de tratamento para OI. Vanleene et al. (2011) observou uma redução em 84% no número de fraturas em camundongos com OI tratados com células tronco fetais humanas quando comparados aos não tratados.

Deyle et al. (2012), isolaram células mesenquimais de pacientes com OI e inativaram os genes mutados do colágeno tipo I utilizando vírus adeno-associado (AAV) *in vitro*.

As células mesenquimais foram diferenciadas em células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). Em seguida estas células foram novamente expandidas e diferenciadas em células estaminais mesenquimais (iMSCs). Seus resultados sugerem que a combinação da terapia gênica e a indução de iPSC pode ser utilizada para produzir células potencialmente terapêuticas em pacientes com doenças genéticas.

2.6 DIAGNÓSTICO DA OSTEOGÊNESE IMPERFEITA

O diagnóstico clínico da OI se baseia, a princípio, em dados clínicos e radiológicos. Mas com a grande variabilidade genética que a doença apresenta torna-se necessário a investigação e definição do diagnóstico molecular. Este diagnóstico possibilita a realização do aconselhamento genético do paciente e seus familiares em risco e permite a escolha do tratamento mais adequado para os pacientes.

A melhor estratégia para a definição do diagnóstico molecular de OI, proposta por van Dijk et al. (2011), é, inicialmente, realizar o sequenciamento direto dos genes COL1A1 e COL1A2. Como 90% das mutações que causam OI estão localizadas nestes genes, esta estratégia permite o diagnóstico molecular da maioria dos casos. Quando não são encontradas mutações nestes genes sugere-se o sequenciamento direto dos genes que codificam as proteínas do complexo prolil 3 – hidroxilação (*LEPRE1*, *CRTAP* e *PPIB*). Nos casos em que a mutação não for identificada após realização das estratégias acima, deve ser realizado o sequenciamento direto dos outros genes relacionados a doença.

O uso desta estratégia metodológica pode resultar no sequenciamento de mais de 10 genes por pacientes. Fator que pode inviabilizar diversos estudos em função de seu alto custo. Assim, técnicas de triagem de mutação são escolhas metodológicas que viabilizam estudo dessa doença. Uma das metodologias mais empregadas na

triagem de mutações é a técnica de *Single-Stranded Conformation Polymorphism* (SSCP) descrito por Orita et al. (1989).

O SSCP baseia-se na tendência que as moléculas de DNA, sob a forma de fita simples, apresentam de se dobrar e assumir uma conformação tridimensional diretamente relacionada a sua sequência de nucleotídeos. Assim, quando submetidas a uma corrida eletroforética em gel não denaturante, a mobilidade dessas moléculas depende não só do tamanho, mas também da sua sequência (MIR et al., 2004).

O método SSCP possui eficiência que varia entre 60 a 95%, sendo mais eficiente em fragmentos de DNA menores do que 300 pares de base. Essa técnica possui vantagem de apresentar baixo custo, de ser de fácil utilização e de reduzir o número de amostras que deverão ser sequenciadas em comparação com as outras técnicas. (SUNNCKS et al., 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as porções codificantes do gene *CRTAP* em pacientes com Osteogênese Imperfeita atendidos no do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG), Vitória/ES, Brasil, para caracterizar o padrão de mutação deste gene.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a triagem de mutações pela técnica de PCR-SSCP nas porções codificantes do gene *CRTAP*;
- Analisar as porções codificantes do gene *CRTAP* em pacientes com Osteogênese Imperfeita do HINSG, Vitória/ES;
- Sequenciar e analisar as amostra que apresentaram fragmentos com migração anormal em gel de SSCP.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória registrado sob nº 12/2010. Os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre esclarecido.

4.2 AMOSTRAS

Foram selecionados 24 pacientes não consanguíneos com diagnóstico clínico de OI estabelecido pela equipe médica do HINSG composta por: Dra. Maria Regina Galveas Oliveira Rebouças, geneticista clínica, Dr. Valentim Sipolatti e Dra. Vanda Regina Rangel Nunes, pediatras e Akel Nicolal Akel Jr., ortopedista. Como esta doença é rara, apresentando uma incidência de 1: 15.000 indivíduos na população, o tamanho da amostra foi determinado pelo número de pacientes atendidos pelo HINSG no período do estudo a que ainda não tinham diagnóstico molecular definido.

Para fazer parte do grupo controle foram selecionados 100 indivíduos que não apresentavam sintomas de OI e que não tinham parentesco com pacientes com a doença. Esta amostra foi formada por 55 mulheres e 45 homens com idade superior a 18 anos.

Não foram observadas mutações no gene *COL1A1* nos pacientes dessa amostra (MORAES, 2011). Também não foram detectadas mutações na porção inicial do gene *COL1A2* nos pacientes (ALMEIDA, 2011). Dois pacientes portadores de mutações no gene *LEPRE1*, em heterozigose, (BARBIRATO, 2009) foram mantidos

nesta pesquisa, pois apesar de casos digênicos nunca terem sido descritos nessa doença o estudo da OI autossômica recessiva ainda é recente.

Os pacientes desta amostra apresentavam idades que variaram de 2 a 16 anos no momento da coleta (mediana: 14,5 anos). A proporção sexual foi de 15 indivíduos do sexo masculino e 9 do sexo feminino. Pacientes com a forma leve da doença estavam presentes em 46% da amostra (11/24), pacientes com a forma grave em 37% (9/24) e com a forma moderada em 21% da amostra (5/24) (Tabela 2). Para essa classificação a equipe médica utilizou a classificação tradicional proposta por Sillence et al. (1979). Os casos letais de OI não foram estudados devido a dificuldades metodológicas.

Os heredogramas das famílias com mais de uma criança afetada ou que apresentavam casamentos consanguíneos então descritos na figura 4. Estes dados sugerem que em quatro famílias o padrão de herança da doença é autossômico recessivo e em outras quatro é autossômica dominante (Figura 4). Os demais pacientes são os únicos que apresentam OI na família (casos isolados).

Tabela 2. Caracterização clínica dos pacientes com OI. AR: Autossomica Recessiva; AD Autossomica Dominante

NÚMERO	REGISTRO	SEXO	IDADE (ANOS)	ASPÉCTO CLÍNICO	PADRÃO DE HERANÇA
1	C1	Masculino	10	Grave	AR
2	C5	Masculino	12	Leve	AD
3	C7	Masculino	9	Leve	Caso isolado
4	C8	Masculino	9	Moderado	Caso isolado
5	C10	Masculino	7	Leve	Caso isolado
6	C11	Masculino	9	Moderado	Caso isolado
7	C12	Masculino	8	Grave	Caso isolado
8	C21	Feminino	16	Grave	AR
9	C24	Masculino	2	Grave	Caso isolado
10	C26	Masculino	4	Grave	Caso isolado
11	C27	Masculino	4	Leve	AD
12	C29	Feminino	13	Leve	Caso isolado
13	C30	Feminino	4	Moderado	Caso isolado
14	C33	Feminino	4	Grave	Caso isolado
15	C36	Feminino	1	Moderado	Caso isolado
16	C41	Feminino	6	Moderado	Caso isolado
17	C42	Feminino	11	Leve	AR
18	C43	Feminino	2	Grave	AR
19	C45	Feminino	7	Grave	Caso isolado
20	C46	Masculino	11	Leve	Caso isolado
21	C58	Masculino	13	Leve	AD
22	C59	Masculino	3	Leve	Caso isolado
23	C61	Masculino	3	Leve	AD
24	C72	Masculino	10	Leve	Caso isolado
Total 24		15 M 9 F	Mediana 14,5	Leve: 11 Moderado: 5 Grave: 9	Caso isolado: 16 AD: 4 AR: 4

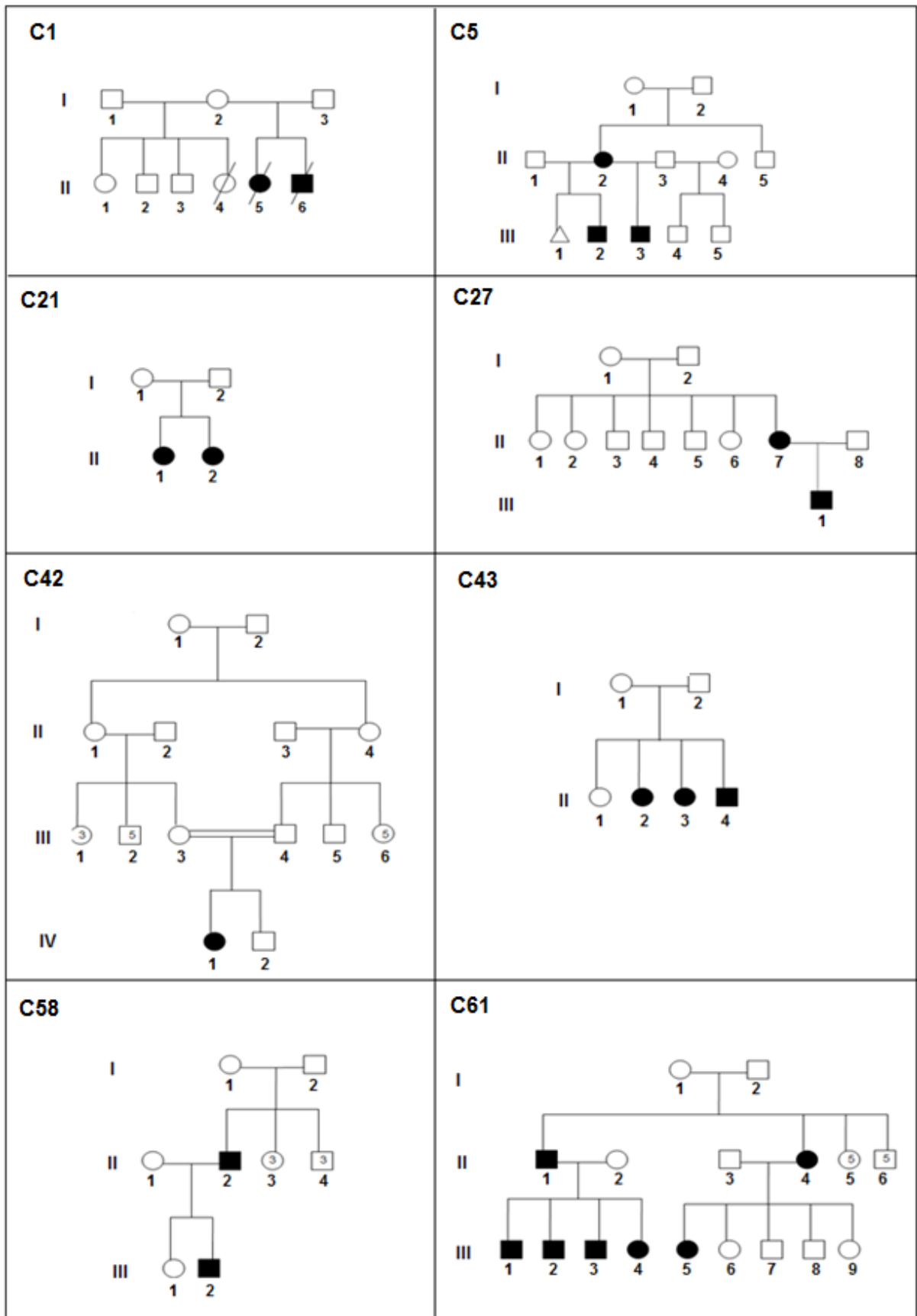


Figura 4: Heredogramas dos casos familiares de OI com padrões sugestivos de herança autossômica recessiva: C1, C21, C42 e C43 e autossômica dominante: C5, C27, C58 e C61.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Foram coletados 5 mL de sangue periférico dos pacientes em tubos contendo EDTA 5%, de seus familiares e controles normais. As amostras biológicas foram armazenadas a uma temperatura de - 4°C. O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo de MILLER et al. (1988). O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro, Thermo Scientific NanoDrop™ 1000® e diluído para concentração de 20ng/μL.

4.3.2 AMPLIFICAÇÃO DO DNA

As porções codificantes do gene *CRTAP* foram amplificados pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram elaborados *primers* para os 7 exons do gene *CRTAP*, pela equipe do NGHM, utilizando o programa Primer 3 Input versão 0.4.0 (Tabela 3). O exon 1 foi dividido em duas porções gerando dois pares de primers, 1A e 1B. Utilizaram-se os modelos de termocicladores *GeneAmp®PCR System 9700* e *Veriti™* da empresa *Applied Biosyste* nas reações. As condições de PCR para cada exon estão listadas nas tabelas 4 e 5.

Tabela 5. Condições de temperatura e tempo da PCR padronizadas para os fragmentos do gene *CRTAP*.

EXON	ETAPAS					
	DENATURAÇÃO INICIAL	DENATURAÇÃO	ANELAMENTO	EXTENSÃO	EXTENSÃO FINAL	Nº CICLOS
1a	94°C por 5'	94°C por 30''	66°C por 30''	72°C por 30''	72°C por 7'	25
1b	94°C por 5'	94°C por 30''	66°C por 30''	72°C por 30''	72°C por 7'	25
2	94°C por 5'	94°C por 30''	58°C por 30''	72°C por 30''	72°C por 7'	27
3	94°C por 5'	94°C por 30''	61°C por 30''	72°C por 30''	72°C por 7'	27
4	94°C por 5'	94°C por 30''	60°C por 30''	72°C por 30''	72°C por 7'	30
5	94°C por 5'	94°C por 30''	59°C por 30''	72°C por 30''	72°C por 7'	27
6	94°C por 5'	94°C por 30''	59°C por 30''	72°C por 30''	72°C por 7'	27
7	94°C por 5'	94°C por 30''	59°C por 30''	72°C por 30''	72°C por 7'	27

Para confirmar a amplificação da porção esperada no DNA o produto de PCR foi submetido a corridas eletroforéticas à 240 volts com duração de uma hora e trinta minutos em gel de poliacrilamida 6%, acrescido de TBE 1X (325µl de APS 10%; 35µl de TEMED, volume final de solução de 50ml).

O gel foi corado em solução de Nitrato de Prata segundo o protocolo de BASSAM et al. (1991). Visualizou-se uma única banda em gel com tamanho esperado em pares de bases de acordo com o marcador de peso molecular aplicado como referência.

4.3.3 TRIAGEM DE MUTAÇÕES

A triagem de mutações foi realizada pelo método comparativo de SSCP. Na confecção dos géis utilizou-se poliacrilamida 6% acrescida de TBE 1X, 1% de glicerol (1,250mL de APS 10%; 31,5µL de TEMED, volume final 60mL) e a fórmula

comercial de gel de eletroforese 2XMDE[®] *Gel Solution a 0,5%* (Cambrex Bio Science Rockland, Inc.) acrescido de TBE 0,6X e 0,25% de glicerol (220µL de APS 10% e 22µL de TEMED, volume final 55mL). De acordo com o fabricante, o gel de MDE possui uma maior sensibilidade o que permite uma melhor observação do padrão de bandas em SSCP.

Foram acrescentados 3mL do corante SSCP-*loading buffer* (980 mL/L formanida; 10 mmol/L EDTA; 0,25 g/L xileno cianol FF; 0,25 g/L bromofenol *blue*) nos produtos de PCR. Estas amostras foram aquecidas por 5 minutos a 95 °C em termociclador para denaturação da dupla fita de DNA, transferidas para o gelo e em seguida aplicadas no gel de SSCP. Os géis foram submetidos à eletroforese a 600 V, 200mA e 20W. As variações quanto ao tempo de corrida de cada fragmento de SSCP estão citadas na tabela 6.

Após a corrida os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com a seguinte metodologia: o gel foi colocado em solução fixadora de ácido acético glacial 0,5% e etanol 10% em volume suficiente para cobri-lo, por 15 minutos; em seguida o gel foi transferido para uma solução de nitrato de prata 0,1%, por 30 minutos e finalmente lavado em água destilada para ser transferido para uma solução reveladora de formaldeído 0,1% e hidróxido de sódio 1,5% tempo suficiente para a visualização das bandas.

Tabela 6. Condições de corrida eletroforética em gel de SSCP dos fragmentos do gene *CRTAP*.

EXON	FRAGMENTO (pb)	POLIACRILAMIDA 6%	MDE [®]
1A	399	13 horas	15 horas
1B	391	12 horas	15 horas
2	362	10 horas	13 horas
3	333	9 horas	12 horas
4	310	9 horas	12 horas
5	294	9 horas	12 horas
6	240	9 horas	12 horas
7	238	8 horas	10 horas

4.3.4 SEQUENCIAMENTO

Os fragmentos sequenciados foram previamente purificados por meio das endonucleases de restrição EXO/SAP (5mL de produto de PCR acrescido de 1mL da enzima diluída na proporção de 1:3) por 37°C por 30' seguido por 80°C por 15'. As amostras purificadas foram sequenciadas no Serviço de Sequenciamento de DNA do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (SSDNA-IQUSP). Para o seqüenciamento foi utilizado *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). O protocolo da reação foi conduzido conforme as especificações do fabricante.

Utilizou-se a sequencia ENSG00000170275 como referência para a análise das seqüências obtidas na pesquisa, disponível no *site Ensembl Genome Browser* (Disponível em: <<http://www.ensembl.org/index.html>> Acesso em: 10 de dezembro de 2012). As alterações identificadas foram comparadas com aquelas previamente descritas no banco de dados de mutações do colágeno tipo I, *The Human Type I Collagen Mutation Database*, disponível online (Disponível em: <<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/>> Acesso em: 10 dezembro 2012).

5 RESULTADOS

5.2 EXON 1

As amostras dos fragmentos 1A e 1B do gene *CRTAP* foram analisadas em gel de MDE. Não foi possível visualizar as bandas em gel de poliacrilamida 6% para os fragmentos citados. Não se observou alterações no padrão de bandas nas amostras dos fragmentos 1A e 1B (Figura 5). Estes resultados sugerem que nenhum paciente apresenta alteração genética no exon 1 do gene *CRTAP*.

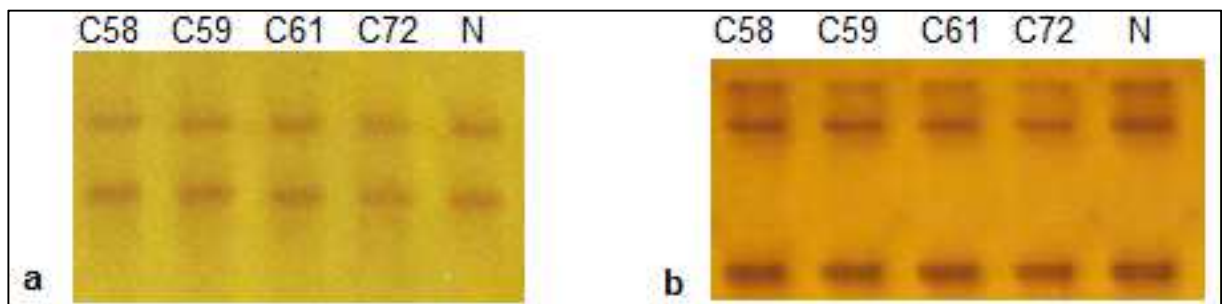


Figura 5: Resultados de SSCP em gel de MDE do exon 1 evidenciando padrões de bandas constantes. a) Fragmento 1A; b) Fragmento 1B. C=pacientes; N=Controle.

5.3 EXON 2

Foi observado um padrão de banda alterado nas amostras de pacientes do exon 2 do gene *CRTAP* em gel de SSCP de poliacrilamida 6% e MDE (Figura 6). Esta mesma variação foi observada em amostras de controles estudadas em gel de poliacrilamida 6%. Oito pacientes e 22 controles apresentaram esta alteração.

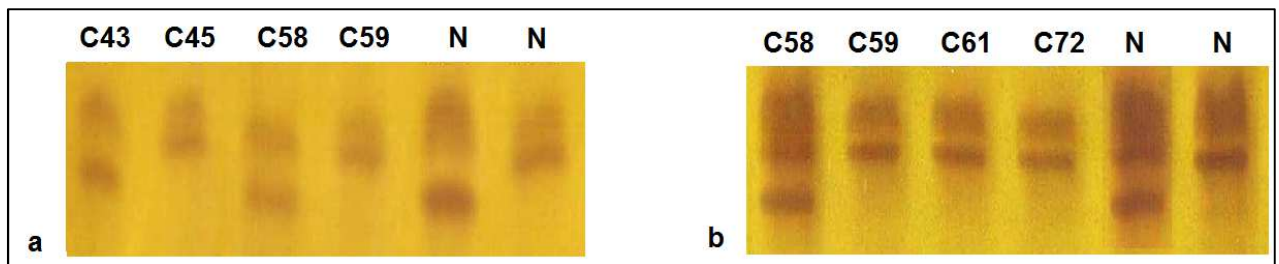


Figura 6: Resultado de SSCP do exon 2 evidenciando padrões de bandas distintos. a) Gel de SSCP; b) Gel de MDE. C=pacientes; N=Controle.

O sequenciamento de uma das amostras alteradas permitiu a identificação de uma variação genética de substituição de nucleotídeos citosina para timina na posição 534 do exon 2 do gene *CRTAP*, c.534C>T. Essa substituição não altera a proteína codificada, pois ambos os códons (GAC/GAT) levam ao aminoácido aspartato. O gel de MDE permitiu inclusive a distinção entre amostras em homozigotas e heterozigotas para esta variação genética (figura 7).

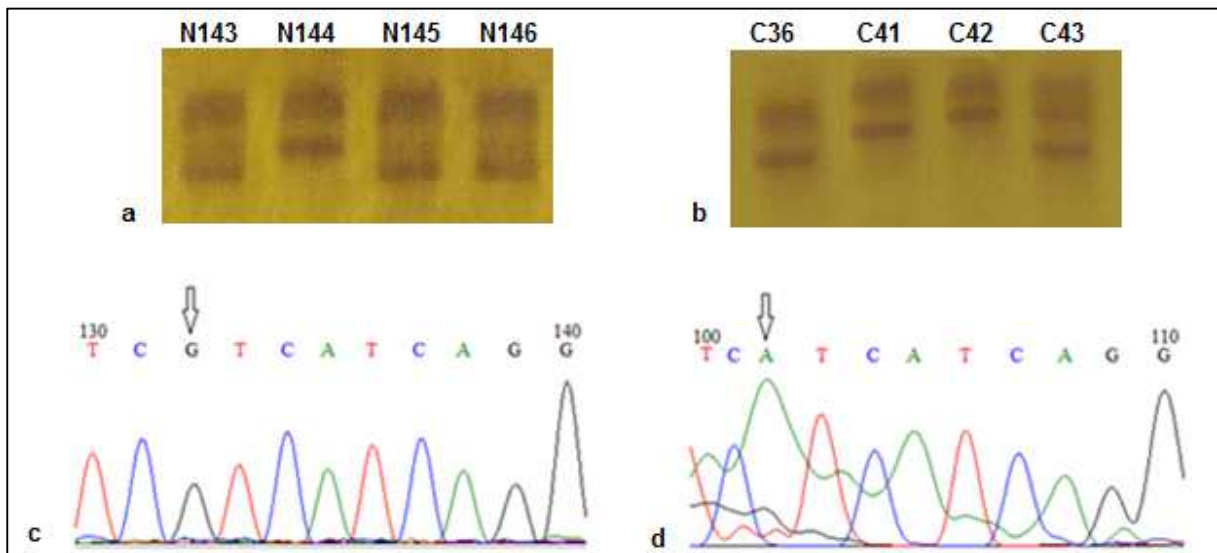


Figura 7: Sequenciamento de amostras do exon 2. a) Gel de poliacrilamida 6% com amostras controles; b) gel de MDE com amostras de pacientes; c) Sequenciamento da amostra controle N144 sem alteração; d) Sequenciamento da amostra C36 detectando a alteração c.534C>T. C=pacientes; N=Controle. **Obs.** Os sequenciamentos foram da fita *Reverse*.

5.4 EXONS 3, 4 E 5

Não foram encontradas alterações nos padrões de bandas das amostras dos exons 3, 4 e 5 do gene *CRTAP* (Figura 10). Foi possível a análise tanto em gel de poli-acrilamida 6% quanto no de MDE, contudo, os resultados foram melhor visualizados em gel de MDE.

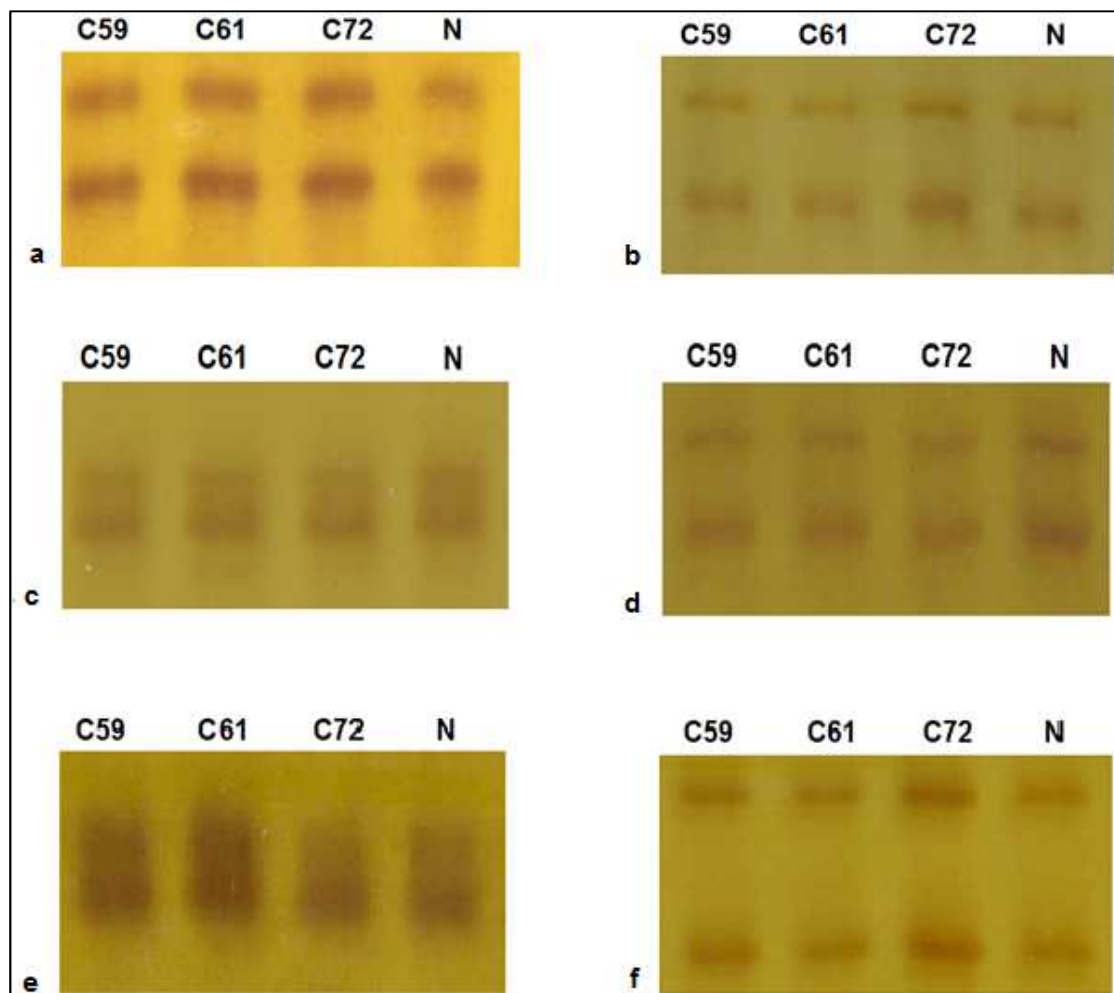


Figura 8: Resultado de SSCP dos exons 3, 4 e 5 evidenciando padrões de bandas constantes. a) Exon 3 em gel de poli-acrilamida 6%; b) Exon 3 em gel de MDE; c) Exon 4 em gel de poli-acrilamida 6%; d) Exon 4 em gel de MDE. e) Exon 5 em gel de poli-acrilamida 6%; f) Exon 5 em gel de MDE. C=pacientes; N=Controle.

5.5 EXON 6

Foram detectadas alterações no padrão de bandas do exon 6 do gene *CRTAP* em SSCP no gel de poliacrilamida 6% e gel de MDE (Figura 11). Esta alteração foi identificada tanto em amostras de 7 pacientes e em 16 controles. O gel de MDE apresentou a melhor definição das bandas na técnica de SSCP.

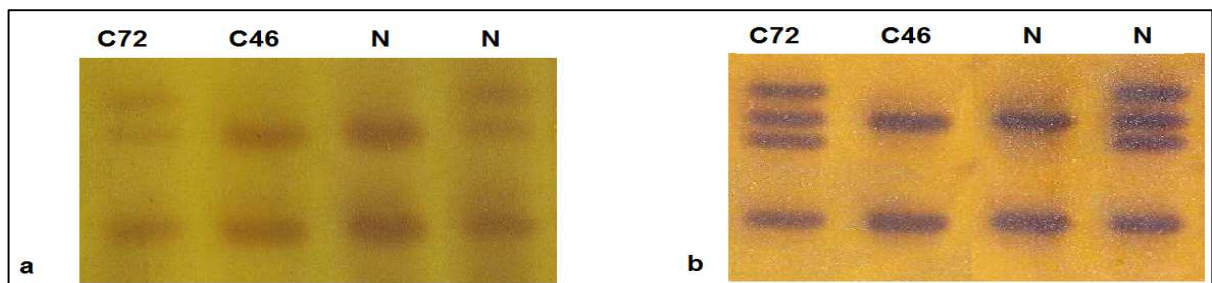


Figura 9: Resultado de SSCP do exon 6 evidenciando padrões de bandas distintos. **a)** Gel de poliacrilamida 6%; **b)** Gel de MDE. C=pacientes; N=Controle.

O sequenciamento de fragmentos alterados deste exon não permitiu a identificação exata do ponto da alteração, mesmo após repetições da reação de sequenciamento. Assim, não foi possível realizar a análise deste resultado por sequenciamento. Provavelmente a clonagem deste fragmento no futuro permitira sua análise.

5.6 EXON 7

Não foram detectadas alterações no padrão de bandas nas amostras do exon 7 em gel de poliacrilamida 6%. Contudo, a análise destes fragmentos em gel de MDE permitiu a visualização de dois padrões de bandas distintos (Figura13). Esta variação em gel foi observada em 10 pacientes e em controles normais, sugerindo alteração não patogênica.

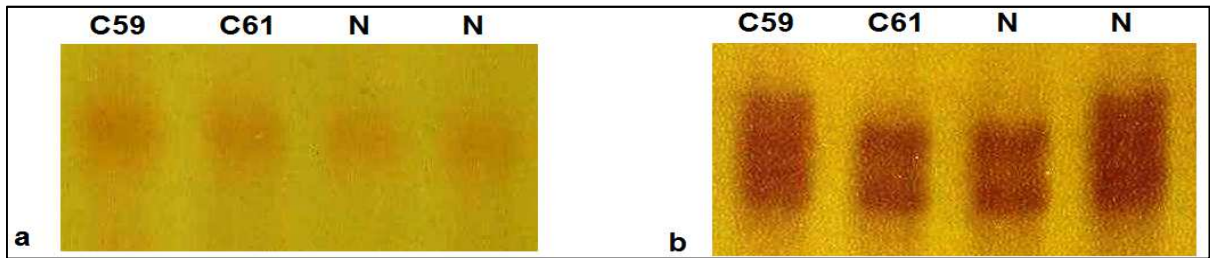


Figura 10: Resultado de SSCP do exon 7 **a)** Gel de poliacrilamida 6% **b)** Gel de MDE . C=pacientes; N=Controle.

O sequenciamento deste fragmento, assim como ocorreu no exon 6, foi de difícil análise, gerando regiões de análise não confiáveis. Assim, para a avaliação e definição específica do sequenciamento desta região é necessitando que, no futuro, este fragmento seja clonado e posteriormente sequenciado.

6 DISCUSSÕES

Nesse estudo foram analisados os 7 exons do gene *CRTAP*, além das porções flanqueadoras intron/exon, de 24 pacientes com diagnóstico clínico de osteogênese imperfeita. No nosso grupo de pesquisa a análise de 33 pacientes com a doença, incluindo os 24 pacientes estudados neste trabalho, permitiu a identificação de mutações nos genes *COL1A1*, *COL1A2* ou *LEPRE1* em 10 pacientes com a doença, utilizando a técnica PCR-SSCP (MORAES, 2011; ALMEIDA, 2011; BARBIRATO, 2009). No presente trabalho, não foram identificadas mutações patogênicas na amostra estudada para o gene *CRTAP*.

6.1 EXONS SEM ALTERAÇÃO

A triagem de mutações pela técnica de SSCP não detectou alteração nos fragmentos dos exons 1, 3, 4 e 5. Pacientes e controles apresentaram o mesmo padrão de bandas, por isso não houve necessidade de sequenciamento desses fragmentos.

Mutações nos exons 1, 2, 3 e 4 do gene *CRTAP* causando Osteogênese Imperfeita foram relatadas na literatura em pacientes que apresentavam graves sintomas da doença ou na forma letal de OI (VAN DIJK et al. 2009; SHAHEEN et al. 2012; CHANG et al. 2010; BALDRIDGE et al. 2008).

O exon 1, é o maior exon do gene *CRTAP*, com 471pb, apresenta o maior número de mutações descritas dentre as porções codificantes do gene causando OI (Disponível em: <https://oi.gene.le.ac.uk/home.php?select_db=CRTAP> Acesso em 10 janeiro 2013). Na amostra de pacientes desta pesquisa, não foram identificadas variações genéticas no exon 1 do gene, patogênicas ou polimórficas.

A mutação de maior recorrência deste fragmento, c.471+2C>A, ocorre em uma região de *splice*, presente no intron 1 do gene *CRTAP* e foi relatada em 7 pacientes com OI (BODIAN et al., 2009; VAN DIJK et al., 2009). Esta porção do intron 1 faz parte do fragmento 1B do gene *CRTAP* estudado nesta pesquisa, contudo nenhuma alteração foi detectada utilizando-se as técnicas de triagem citadas.

Foi descrita apenas uma mutação, c.634C>T, no exon 3 do gene *CRTAP* (CHANG et al., 2010). O exon 4, por outro lado, possui quatro diferentes mutações relatadas em sua região codificante (MORELLO et al., 2006; BARNES et al., 2006; BALDRIDGE et al., 2008; CHANG et al., 2010 e AMOR et al., 2001). Neste mesmo fragmento, que em geral envolve a análise do intron 4, foi descrita a mutação c.923-2A>G, presente no sitio de splicing desta junção exon/intron (VAN DIJK et al, 2009). Na nossa pesquisa esta região também foi incluída na análise, mas nenhuma alteração genética foi identificada.

Não há registro de mutação patogênica no exon 5 mas sim dois SNP's (Disponível em: <https://oi.gene.le.ac.uk/variants.php?action=search_unique&select_db=CRTA> Acesso em: 10 janeiro 2013). No presente estudo não foi detectada alteração no padrão de bandas desse exon permitindo inferir a ausência de qualquer tipo de variação nesta região na nossa amostra.

6.2 EXONS COM ALTERAÇÕES POLIMÓRFICAS

No exon 2 foi identificada a alteração c.534C>T nos pacientes e controles, sugerindo alteração não patogênica. Essa substituição silenciosa encontra-se descrita em banco de dados de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=rs4076086> Acesso em: 21 janeiro 2013).

Apesar da alteração genética c.543C>T provavelmente não ser responsável por causar OI em pacientes com a doença, este SNP pode estar relacionado com variações na capacidade de mineralização óssea entre indivíduos. Esta hipótese é

apoiada pelos estudos de Li et al. (2009) que observaram associação positiva entre o alelo C do SNP (c.534C>T - rs4076086) atuando como fator de proteção para osteoporose, relacionado ao aumento da densidade mineral óssea no fêmur de mulheres chinesa.

Pacientes com OI portadores de uma mesma mutação, podem apresentar variação clínica quanto a gravidade dos sintomas. Isso se deve, provavelmente, a diversidades quanto aos hábitos de vida do paciente, como alimentação, prática de atividades físicas, forma de tratamento da doença e variações genéticas relacionadas com a fisiologia do tecido ósseo. Assim, não podemos deixar de considerar a hipótese do SNP c.534C>T do gene *CRTAP* atuar como fator de modificação de fenótipo em pacientes com OI. A identificação futura das mutações que causam OI nos pacientes portadores do alelo T do SNP c.534C>T na amostra estudada permitirão a análise deste polimorfismo no contexto de modificação de fenótipo de pacientes com OI.

Apesar dos exons 6 e 7 do gene *CRTAP* não apresentarem variações genéticas relatadas na literatura, os resultados desse trabalho identificaram alterações no padrão de bandas, que não puderam ser esclarecidos com as técnicas propostas e utilizadas nesta pesquisa. Contudo, como estas alterações foram vistas tanto em pacientes como em controles, sugerindo que estas alterações sejam não patogênicas.

O gene *CRTAP* foi um dos primeiros genes relacionados com as formas recessivas de OI (MORELLO et al, 2006). Contudo, até o momento, foram descritos apenas 24 indivíduos portadores de variações genéticas neste gene em banco de dados mundial (Disponível em: <https://oi.gene.le.ac.uk/home.php?select_db=CRTAP> Acesso em: 10 janeiro de 2013).

No presente trabalho, os casos letais não foram selecionados para a pesquisa e os casos graves de OI correspondiam a cerca de 20% (7/24) dos pacientes, número amostral reduzido. Barnes et al. (2006) estimam que apenas 2% ou 3% dos casos de OI são causados por mutações no gene *CRTAP*. Além disto, mutações neste gene foram descritas apenas em casos graves ou letais de OI.

Assim, além da frequência de mutações do gene *CRTAP* ser baixa em pacientes com OI, a ausência de mutações identificadas deste gene em pacientes do ES pode ser justificada pelo número amostral pequeno de pacientes estudados potencialmente portadores de mutações neste gene.

6.3 TÉCNICA DE SSCP NA TRIAGEM DE MUTAÇÕES NO GENE *CRTAP*

A eficiência na triagem de mutações do gene *CRTAP* por SSCP utilizando gel de poliacrilamida 6% ou gel de MDE variou nesse trabalho. A visualização de bandas no gel e a eficiência da técnica foi melhor obtida como o uso do gel de MDE.

A técnica de SSCP tem como vantagem a possibilidade de analisar um número grande de produtos de PCR simultaneamente, reduzindo assim os custos da pesquisa. Além disto, esta técnica permite a seleção de amostras alteradas para o sequenciamento, fator que promove uma diminuição no número de amostras a serem sequenciadas (GLENN).

No entanto, variações na metodologia de SSCP interferem com sensibilidade da técnica. Fatores como aumento da temperatura durante a corrida, tamanho do fragmento a ser analisado e concentração de poliacrilamida utilizada no gel estão relacionados com as diferenças de eficiência da técnica (ORITA, 1989; HAYASHI, 1991).

Devido ao grande número de variáveis existente na metodologia em questão alguns fragmentos podem até mesmo não funcionar em condições específicas, como observado nesse trabalho.

Em nosso grupo de pesquisa, a técnica de triagem de mutações por PCR-SSCP tem se mostrado eficiente. Mutações patogênicas nos genes *COL1A1*, *COL1A2* e

LEPRE1 em pacientes com OI foram identificadas utilizando essa técnica. (ALMEIDA, 2011; BARBIRATO, 2010; MORAES, 2011).

Na presente pesquisa, apesar de mutações patogênicas não terem sido detectadas, a técnica de SSCP permitiu a identificação de polimorfismos no gene *CRTAP*, evidenciando sua capacidade de detecção de variações genéticas no gene.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo, não foram identificadas mutações patogênicas nas porções codificantes do gene *CRTAP* nos 24 pacientes com diagnóstico clínico de Osteogênese Imperfeita do Espírito Santo.

Foi identificado o polimorfismo c.534C>T no exon 2 do gene *CRTAP*, previamente descrito, em pacientes da amostra. A metodologia de melhor eficiência na obtenção dos resultados foi aquela que utilizou o gel de MDE na técnica de SSCP, corroborando estudos da literatura.

Os resultados desta pesquisa sugerem que mutações no gene *CRTAP* estão ausentes na população com OI do Espírito Santo. Contudo a importância do estudo residiu em gerar informações que auxiliem na elaboração de estratégias metodológicas mais eficientes para o diagnóstico molecular de OI no ES.

,

8 REFERÊNCIAS

ALANAY, Y. et al. Mutations in the gene encoding the RER protein FKBP65 cause autosomal- recessive osteogenesis imperfecta. **Am J Hum Genet**, v. 86, p. 551–559, 2010.

ALMEIDA, M. G. **Mutações na região aminoterminal do gene COL1A2 e a manifestação da Osteogênese Imperfeita**. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 2011.

AMOR, I. M. et al. Severe osteogenesis imperfecta caused by a small in-frame deletion in *CRTAP*. **Am J Med Genet A.**, v. 155A(11), p. 2865-70, 2011

Associação Brasileira de Osteogênese Imperfeita (ABOI). Disponível em: <<http://aboi.org.br/oque.html>>. Acessado em 10 de janeiro de 2013.

BALDRIDGE, D. et al. *CRTAP* and *LEPRE1* mutations in recessive osteogenesis imperfect. **Hum Mutat.**, v. 29(12), p. 1435-42, 2008.

BARBIRATO, C. F. **Investigação de mutações no gene LEPRE1 causadoras da Osteogênese Imperfeita**. 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 2010.

BARNES, A. M. et al. Deficiency of cartilage-associated protein in recessive lethal osteogenesis imperfecta. **N Engl J Med**, v. 355, p. 2757–2764, 2006.

BARNES, A. M. et al. Lack of cyclophilin B in osteogenesis imperfecta with normal collagen folding. **N Engl J Med**, v. 362, p. 521–528, 2010.

BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and Sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**. v.196, p. 80-83, 1991.

BECKER, J. et al. Exome sequencing identifies truncating mutations in human *SERPINF1* in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. **Am J Hum Genet**, v. 88, p. 362–371, 2011.

BENTZ, H. et al. Isolation and partial characterization of a new human collagen with an extended triple-helical structural domain. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 80, p. 3168-72, 1983.

BODIAN, D. L. et al. Mutation and polymorphism spectrum in osteogenesis imperfecta type II: implications for genotype–phenotype relationships. **Human Molecular Genetics**, v. 18, 2009.

BYERS, P. H.; COLE, W. G. **Osteogenesis Imperfecta. In Connective Tissue and Heritable Disorders**. 2^a Edição, p. 285–430, 2002

CABRAL, W. A. et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. **Nat Genet**, v. 39, p. 359–365, 2007.

CASTAGNOLA, P. et al. Cartilage associated protein (CASP) is a novel developmentally regulated chick embryo protein. **J Cell Sci**, v. 110, p. 1351–1359, 1997.

CHANG, W. et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 and *CRTAP* are mutually stabilizing in the endoplasmic reticulum collagen prolyl 3-hydroxylation complex Human. **Molecular Genetics**, v. 19, p. 223–234, 2010.

CHO, T. et al. A Single Recurrent Mutation in the 5'-UTR of *IFITM5* Causes Osteogenesis Imperfecta Type V. **The American Journal of Human Genetics**, v. 91, p. 343–348, 2012.

CHRISTIANSEN, H. E. et al Homozygosity for a missense mutation in *SERPINH1* , which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta. **Am J Hum Genet**, v. 86, p. 389– 398, 2010.

DEYLE , D.R. et al. Normal Collagen and Bone Production by Gene-targeted Human Osteogenesis Imperfecta iPSCs. **Molecular Therapy**, vol. 20 no. 1, 204–213, 2012.

Ensembl Genome Browser. Disponível em <<http://www.ensembl.org/index.html>>. Acessado em 10 de janeiro de 2013. FOLKESTAD, L. et al. Bone geometry, density and microarchitecture in the distal radius and tibia in adults with osteogenesis imperfecta type-1 assessed by HR-pQCT. **Journal Bone Mineral Research**, 2012.

FORLINO, A., CABRAL, W. A., BARNES, A. M., MARINI, J.C. New perspectives on osteogenesis imperfecta. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, p. 540-557, 2011.

GLENN, L. Step by Step SSCP. Laboratory of Molecular Systematics, Smithsonian Institution, Washington, DC 20560.

HYRY, M.; LANTTO, J.; MYLLYHARJU, J. Missense mutations that cause Bruck syndrome affect enzymatic activity, folding, and oligomerization of lysyl hydroxylase 2. **J Biol Chem**, v. 284, p. 30917–30924, 2009.

ISHIKAWA, Y. et al. Biochemical characterization of the prolyl 3-hydroxylase 1, cartilage-associated protein, cyclophilin B complex. **J Biol Chem**, v.284, p.17641–17647, 2009.

KÖRKKÖ, J. et al. Analysis of the *COL1A1* and *COL1A2* genes by PCR amplification and scanning by conformation-sensitive gel electrophoresis identifies only *COL1A1* mutations in 15 patients with osteogenesis imperfect type I: identification of common sequences of null-allele mutations. **Am J Hum Genet**, v. 62, p. 98–110, 1998.

LAPUNZINA, P. et al. Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. **Am J Hum Genet**, v. 87, p. 110–114, 2010.

Li, G. H. Y.; Kung, A. W. C.; Huang, Q.Y. Common variants in *FLNB/CRTAP*, not *ARHGEF3* at 3p, are associated with osteoporosis in southern Chinese women. **Osteoporos Int**, 21:1009–1020, 2010.

LOWENSTEIN, E.J. Osteogenesis imperfecta in a 3,000-year-old mummy. **Childs Nerv Syst**, 25: 515–516, 2009.

MARINI, J. C. et al. Positive linear growth and bone responses to growth hormone treatment in children with types III and IV osteogenesis imperfecta: high predictive value of the carboxyterminal propeptide of type I procollagen. **J Bone Miner Res**, v. 18, p. 237-243, 2003.

MARINI, J. C. **Osteogenesis Imperfecta**. Endotext, 2010. Disponível em <<http://www.endotext.org/parathyroid/parathyroid17/parathyroidframe17.htm>>. Acessado em 10 de janeiro de 2013.

MARINI, J.C., et al.. Components of the collagen prolyl 3-hydroxylation complex are crucial for normal bone development. **Cell Cycle**, v. 6, p. 1675–1681, 2007.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MIR, L. (Org.). **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004.

MONTI, E. et al. Current and emerging treatments for the management of osteogenesis imperfecta. **Ther Clin Risk Manag**, v. 6, p. 367–381, 2010.

MORAES, M. V. D. **Triagem de mutações no gene COL1A1 em pacientes com Osteogênese Imperfeita**. 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 2011.

MORELLO, R. et al. *CRTAP* is required for prolyl 3- hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. **Cell**, v. 127, p. 291–304, 2006.

MYLLYHARJU, J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. **Trends Genet**, v. 20, p. 33–43, 2004.

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson and Thompson Genetics in Medicine**. Philadelphia: WB Saunders Company, 2001.

ORITA, M. et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-stranded conformation polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 86, p. 2766-2770, 1989.

PHILIPPI, C. A.; REMMINGTON, T.; STEINER, R. D. **Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta**. The Cochrane Collaboration, John Wiley & Sons Ltd., England, 2009.

PIHLAJANIEMI, T. et al. Osteogenesis imperfecta: cloning of a pro-alpha 2(I) collagen gene with a frameshift mutation. **J. Biol. Chem**, v. 259, p. 12941–12944, 1984.

PROCKOP, D. J. Mutations in Collagen Genes Consequences for Rare and Common Diseases, **J. Clin. Invest**, v. 75, p.783-787, 1985.

PROCKOP, D. J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy. **Annu. Rev. Biochem**, v. 64, p. 403-434, 1995.

PYOTT, S. M. et al. Mutations in PPIB (cyclophilin B) delay type I procollagen chain association and result in perinatal lethal to moderate osteogenesis imperfecta phenotypes. **Human Molecular Genetics Hum Mol Genet**. Apr 15;20(8), p. 1595-609, 2011.

SEMLER, O. et al. A Mutation in the 50-UTR of IFITM5 Creates an In-Frame Osteogenesis Imperfecta Type V with Hyperplastic Callus. **The American Journal of Human Genetics**, v. 91, p. 1–9, 2012.

SHAHEEN, R. et al. FKBP10 and Bruck syndrome: Phenotypic heterogeneity or call for reclassification? **Am J Hum Genet**, v. 87, p. 306– 307, 2010.

SHAHEEN, R. et al. Study of autosomal recessive osteogenesis imperfecta in Arabia reveals a novel locus defined by TMEM38B mutation. **J Med Genet.**, v.49, p. 630-5, 2012.

SILLENCE, D.O.; SENN, A.; DANKS, D. M. Genetic heterogeneity in Osteogenesis Imperfecta. **Journal of Medical Genetics**, v. 16, p. 101 - 116, 1979.

Single Nucleotide Polymorphism. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=rs4076086>. Acessado em 20 de janeiro de 2013.

STEINER, R.D.; PEPIN, M.G.; BYERS, P.H. Osteogenesis Imperfecta, in Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K (eds). **GeneReviews**, University of Washington, Seattle, 1993.

SUN, H. B. et al. Substance P stimulates differentiation of mice osteoblast through up-regulating Osterix expression. **Chin J Traumatol**, v. 13, p. 46–50, 2010.

SUNNUCKS, P. et al. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1699-1710, 2000.

SYKES, B. et al. Consistent linkage of dominantly inherited osteogenesis imperfecta to the type I collagen loci: *COL1A1* and *COL1A2*. **Am J Hum Genet**, v. 46, p. 293–307, 1990.

The Human Type I Collagen Mutation Database. Disponível em: <<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/>>. Acessado em 2 de janeiro de 2013.

VALLI, M. et al. Deficiency of *CRTAP* in non-lethal recessive osteogenesis imperfecta reduces collagen deposition into matrix. **Clinical Genetics**, 2011.

VAN DIJK, F. S. et al. *CRTAP* mutations in lethal and severe osteogenesis imperfecta: the importance of combining biochemical and molecular genetic analysis. **Eur J Hum Genet.**, v. 17(12), p. 1560-9, 2009.

VAN DIJK, F. S. et al. Osteogenesis Imperfecta: A Review with Clinical Examples. **Mol Syndromol**, v. 2, p.1–20, 2011.

VANLEENE, M. et al. Transplant of human fetal blood cells in the osteogenesis imperfecta mouse leads to improvement in multiscale tissue properties. **Blood Journal**, v. 117, p. 1053-1060, 2011.

VRANKA, J. A.; SAKAI, L. Y.; BACHINGER, H. P. Prolyl 3-hydroxylase 1, enzyme characterization and identification of a novel family of enzymes. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 23615–23621, 2004.

WILLAERT A, et al. Recessive osteogenesis imperfecta caused by LEPRE1 mutations: clinical documentation and identification of the splice form responsible for prolyl 3-hydroxylation. **J Med Genet**. v. 46, p. 233–241, 2009.

ZHOU, X. et al. Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, p. 12919–12924, 2010.