

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

MÁRCIO GERMELLO DE ALMEIDA

MUTAÇÕES NA REGIÃO AMINOTERMINAL DO GENE
COL1A2 E A MANIFESTAÇÃO DA OSTEOGÊNESE
IMPERFEITA

VITÓRIA

2011

MÁRCIO GERMELLO DE ALMEIDA

MUTAÇÕES NA REGIÃO AMINOTERMINAL DO GENE
COL1A2 E A MANIFESTAÇÃO DA OSTEOGÊNESE
IMPERFEITA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPG-Biotec) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Flavia de Paula

VITÓRIA

2011

MÁRCIO GERMELLO DE ALMEIDA

MUTAÇÕES NA REGIÃO AMINOTERMINAL DO GENE
COL1A2 E A MANIFESTAÇÃO DA OSTEOGÊNESE
IMPERFEITA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPG-Biotec) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em 29 de abril de 2011

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Flavia de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
Orientadora

Prof Dr. Iúri Drumond Louro
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
Co-orientador

Profa Dra. Maria do Carmo Pimentel Batitucci
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
Membro Interno

Profa Dra. Silvia Regina Sampaio Freitas
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)
Membro Interno

Profa Dra. Eliete Rabbi Bortolini
Faculdades Integradas São Pedro (AEV/FAESA)
Membro Externo

AGRADECIMENTOS

- ao “Ser/Energia” que dá a esse mundo o equilíbrio necessário;
- à minha “segunda casa”, a Universidade Federal do Espírito Santo, ao Núcleo de Genética Humana e Molecular e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia por permitirem o desenvolvimento do projeto;
- à acolhida e ao apoio da equipe do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, além da cooperação das famílias com Osteogênese Imperfeita;
- à Profa. Dra. Flavia de Paula, de quem tenho orgulho de dizer que é minha orientadora, desde a graduação;
- aos professores Dr. Iúri Drumond Louro, Dra. Maria do Carmo Pimentel Batitucci, Dra. Silvia Sampaio Freitas e Dra. Eliete Rabbi Bortolini, por todo o apoio e por fazerem parte da banca examinadora dessa dissertação;
- à minha mãe, Jussara Maria; meu pai, Joaquim Márcio; e minha irmã, Renata, “simplesmente” por TUDO...;
- à Jéssica, o meu amor; e também à Shirlei, Marco e Igor, por todo o carinho e apoio;
- a todos os companheiros da UFES, em especial à Clara, Victor, Eldamária, Bruno, Geise, Daniela e Leila, por todos esses anos de convivência e amizade;
- aos companheiros do Colégio Nacional, professores, coordenadores e alunos, pelo ótimo ambiente que proporcionamos uns aos outros;

“Os sonhos não determinam o lugar em que você vai estar, mas produzem a força necessária para tirá-lo do lugar em que está.”

Augusto Cury

“Seus sonhos são as letras do livro que sua vida está escrevendo.”

Paulo Coelho

RESUMO

A Osteogênese Imperfeita (OI) é uma doença genética associada a alterações na molécula do colágeno tipo I, sendo caracterizada clinicamente por fragilidade e deformidade ósseas. A maioria dos relatos de OI são alterações autossômicas dominantes nos genes *COL1A1* e *COL1A2*, codificadores da molécula do colágeno tipo I. Também há relatos de casos isolados e de manifestação autossômica recessiva da OI. A diversidade clínica e genética apresentada pelos pacientes com OI evidencia a necessidade de estudos moleculares dos genes associados à OI. Essa pesquisa teve como objetivo caracterizar o padrão de mutações da região inicial do gene *COL1A2* em pacientes com OI. Foram estudados os exons 1 a 26 em 33 pacientes não aparentados com OI de Vitória-ES por PCR-SSCP e sequenciamento automatizado. Uma alteração no padrão de bandas de DNA, localizada no fragmento do exon 16 do gene *COL1A2*, foi detectada na amostra de um paciente do sexo feminino com quadro clínico moderado de OI. O sequenciamento dessa amostra permitiu a identificação da transversão c.739 G>C (p.Gly247Arg) com descrição clínica distinta de um relato prévio na literatura portador da mesma alteração genética. Os resultados dessa pesquisa poderão contribuir com o entendimento clínico da doença, e, conseqüentemente, auxiliar no desenvolvimento de tratamentos mais adequados aos pacientes.

Palavras-chave: c.739 G>C, colágeno tipo I, p.Gly247Arg, SSCP.

ABSTRACT

Osteogenesis Imperfecta (OI) is a genetic disease associated with alterations in the type I collagen molecule. OI is clinically characterized by skeletal fragility and deformity. The majority of OI cases are caused by dominant autosomal mutations on *COL1A1* and *COL1A2* genes, responsible for the synthesis of the type I collagen molecule. However, there are isolated cases and new cases of recessive autosomal forms of OI. Thus OI is a clinically and genetically heterogeneous group, and it justifies the importance of molecular studies related to this disease. The objective of this research was to characterize the mutation pattern of the beginning region of the *COL1A2* gene of OI patients. We studied the exons 1 to 26 of the *COL1A2* gene on 33 non-related patients of Vitoria-ES with OI diagnosed using PCR-SSCP and sequencing techniques. We detected an alteration on the exon 16 of a female OI with moderate form of the disease, identified as c.739 G>C (p.Gly247Arg). The clinical report of our patient differs from another one already described on literature. These results may contribute to the understanding of the disease, leading to the development of more efficient treatment methods to patients with OI.

Keywords: c.739 G>C, p. Gly247Arg, type I collagen, SSCP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 – Estrutura da molécula de colágeno tipo I	21
Ilustração 2 – Mecanismo molecular da Osteogênese Imperfeita	24
Ilustração 3 – Descrição dos pacientes diagnosticados com OI tipo I	32
Ilustração 4 – Descrição dos pacientes diagnosticados com OI tipo III	33
Ilustração 5 – Descrição dos pacientes diagnosticados com OI tipo IV	34
Ilustração 6 – Descrição dos pares de primers adotados	35 e 36
Ilustração 7 – Condições de padronização da PCR para os exons 1 a 26 do gene <i>COL1A2</i>	38
Ilustração 8 – Gel de poliacrilamida 7%, para o fragmento de DNA correspondente ao exon 26	38
Ilustração 9 – Técnica de SSCP e sequenciamento para o exon 16	43
Ilustração 10 – Gel de poliacrilamida 7% para o exon 16 em teste com enzima de restrição PpuMI	44
Ilustração 11 – Técnica de SSCP para os exons 4 e 18	45
Ilustração 12 – Técnica de SSCP para os exons 19 e 22	46
Ilustração 13 – Técnica de SSCP para os exons sem alterações Detectadas	48
Ilustração 14 – Períodos de eletroforese para os exons sem alteração	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - adenina

a.C. – antes de Cristo

A.C. – audição comprometida

APS – Persulfato de amônio

Arg – arginina

BMD – *bone mineral density*

C – citosina

COL1A1 – gene da molécula do colágeno tipo I, alfa 1

COL1A2 – gene da molécula do colágeno tipo I, alfa 2

CRTAP – gene da *cartilage associated protein*

D.A. – deambulação anormal

DHPLC – *denaturing high-performance liquid chromatography*

D.I. – dentinogênese imperfeita

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfato

D.O. – deformidade óssea

E.A. – esclerótica azulada

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

FKBP10 – gene da *FK506 binding protein 10*

G - guanina

Gly – glicina

HINSG – Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória

Hyp – hidroxil-prolina

Kb – quilobase

LEPRE1 – gene da prolil-3 hidroxilase 1

min - minuto

mM - milimolar

NaCl – cloreto de sódio

NCBI – National Center of Biotechnology Information

ng - nanograma

NGHM – Núcleo de Genética Humana e Molecular

OI – Osteogênese Imperfeita

pb – par de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase

pmol - picomol

PPIB – gene da ciclofilina B

PpuMI – cepa de E.coli que porta o gene PpuMI de *Pseudomonas putida*

Pro – prolina

RNA – ácido ribonucléico

RNAi – ácido ribonucléico de interferência

rpm – rotações por minuto

s - segundo

SDS – dodecil sulfato de sódio

SERPINH1 – gene da *serpin peptidase inhibitor*

SP7 – gene do *sp7 transcription factor*

SSCP – *single strand conformation polymorphism*

T - Timina

TBE – tampão Tris/ácido bórico/EDTA

TEMED - tetrametiletilenodiamina

Trinca – sequência de três nucleotídeos na molécula do ácido desoxirribonucléico

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

V.C. – visão comprometida

°C – graus Celsius

µL – microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 CARACTERIZAÇÃO DA OSTEOGÊNESE IMPERFEITA	16
2.2 CLASSIFICAÇÃO DA OI	17
2.3 OS OSSOS E A MOLÉCULA DO COLÁGENO TIPO I	19
2.4 AS MUTAÇÕES DA OI E O COLÁGENO TIPO I	21
2.5 OS GENES HUMANOS ASSOCIADOS À OI	23
2.6 O GENE <i>COL1A2</i> E A OSTEOGÊNESE IMPERFEITA	24
2.7 O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA OI E A CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO	25
2.8 TRATAMENTO E PERSPECTIVAS FUTURAS DA OI	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4 METODOLOGIA	31
4.1 AMOSTRAS	31
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA	34
4.3 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES DE INTERESSE DO DNA E ANÁLISE DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.....	34
4.4 DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS	39
4.5 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES	39
4.6 DIGESTÃO ENZIMÁTICA	40
4.7 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO	40

5 RESULTADOS	42
5.1 MUTAÇÃO PATOGÊNICA	42
5.2 ALTERAÇÕES POLIMÓRFICAS	44
5.3 FRAGMENTOS SEM ALTERAÇÕES	47
6 DISCUSSÃO	51
6.1 TRIAGEM DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS	52
6.2 MUTAÇÃO PATOGÊNICA	55
7 CONCLUSÃO	59
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
9 APÊNDICES	69
9.1 APÊNDICE A – CARTA DE APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	69
9.2 APÊNDICE B – FICHA DE INCLUSÃO DE PACIENTES À PESQUISA.....	70

1

Introdução

A Osteogênese Imperfeita (OI) é uma doença genética, cujos principais sinais são a fragilidade e a deformidade ósseas (BODIAN et al., 2009; ALANAY et al., 2010; CHANG et al., 2010). Pode afetar também órgãos como a pele e olhos, sendo considerada um grupo clinicamente e geneticamente heterogêneo (HUBER, 2007; BODIAN et al., 2009). A incidência aproximada da doença é de 1 : 10.000 indivíduos (ROUGHLEY, RAUCH, GLORIEUX, 2003; LINDAHL et al., 2008).

A grande maioria dos relatos de OI está relacionada a alterações genéticas dominantes nos genes *COL1A1* e *COL1A2*, codificadores da molécula do colágeno tipo I, o principal constituinte orgânico da matriz óssea (FORLINO, MARINI, 2000; LINDAHL et al., 2008; GARNERO et al., 2009). O colágeno tipo I, uma proteína fibrilar, é formado pela associação de três cadeias α : duas $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$, codificadas respectivamente pelos genes *COL1A1* e *COL1A2* (DE VOS et al., 2000; GAJKO-GALICKA, 2002; ALANAY et al., 2010). Todavia, já foram relatados casos de recessividade, associadas, por exemplo, aos genes *LEPRE1* e *CRTAP* (DRÖGEMÜLLER et al., 2009; VRANKA, 2010).

A OI foi tradicionalmente classificada, com base em critérios clínicos, radiológicos e genéticos nos tipos I (leve), II (letal), III (grave) e IV (SILLENCE, SENN, DANKS, 1979; GAJKO-GALICKA, 2002; GLORIEUX, 2008). Mais recentemente, foram feitas revisões à classificação proposta, especialmente com base em dados clínicos, radiológicos e genéticos (GAJKO-GALICKA, 2002; GLORIEUX, 2008).

A Osteogênese Imperfeita não possui cura, na atualidade (PLOTKIN et al., 2000; HUBER, 2007; LINDAHL et al., 2008). Estratégias, como a administração de bifosfonatos, são essenciais para abrandar ao máximo o quadro clínico dos pacientes e reduzir o grau de deformidade óssea, aumentando a qualidade de vida dos pacientes (PLOTKIN et al., 2000; LINDAHL et al., 2008). Métodos como o transplante utilizando-se células tronco para pacientes com OI e o silenciamento gênico por meio de RNAi já estão sendo testados (LINDAHL et al., 2008; VANLEENE, 2011). Por meio da última estratégia, talvez seja possível inativar o alelo mutado responsável pela patogenicidade, impedindo a formação anormal da molécula do colágeno tipo I (LINDAHL et al., 2008).

Estão descritas, para o gene *COL1A2*, aproximadamente 400 mutações associadas à OI, com grande diversidade fenotípica entre os pacientes (<<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/>>). A heterogeneidade clínica e genética da OI, associada à dificuldade de classificação dos pacientes, evidencia a importância de estudos moleculares dos genes associados à manifestação da Osteogênese Imperfeita. Com base nessas informações, talvez seja possível associar mais claramente o genótipo do paciente ao quadro clínico apresentado, provavelmente, sendo possível interferir nas vias metabólicas, por exemplo pela técnica do RNAi, o que contribuiria com a melhora da qualidade de vida dos pacientes (LINDAHL et al, 2008).

2

Revisão

Bibliográfica

2.1 CARACTERIZAÇÃO DA OSTEOGÊNESE IMPERFEITA

A osteogênese imperfeita (OI) é uma desordem hereditária do tecido conjuntivo que possui heterogeneidade clínica e genética (HUBER, 2007; BODIAN et al., 2009; ALANAY et al., 2010; CHANG et al., 2010). Os principais sinais da OI são a fragilidade e a deformidade ósseas (SANTILI, 2005; CABRAL et al., 2007; HUBER, 2007; KATAOKA, 2007; MARINI et al., 2007; BODIAN et al., 2009). Também são observadas esclerótica azulada, baixa estatura, surdez e alterações dentárias (JOHNSON, 2002; LEE, 2006).

Dentre os primeiros relatos da OI, existe um crânio parcialmente remontado a partir dos restos mortais de uma múmia egípcia, com diagnóstico de dentinogênese imperfeita, datado aproximadamente de 1.000 anos a.C. (LOWENSTEIN, 2009). Somente a partir do final do século XIX o nome atual foi adotado e a doença foi classificada em dois tipos: congênita e tardia (ROUGHLEY, RAUCH, GLORIEUX, 2003).

A grande maioria dos relatos de OI estão associados a mutações dominantes nos genes que codificam as cadeias da molécula do colágeno tipo I: genes *COL1A1* (17q21.3-q22.1) e *COL1A2* (7q22.1), mas mutações “de novo” são frequentes (KÖRKKO et al., 1998; FORLINO, MARINI, 2000; GAJKO-GALICKA, 2002; YONEYAMA et al., 2003; VENTURI et al., 2006; LIN et al., 2009; FANO et al., 2010; VRANKA et al., 2010). O mosaïcismo gonadal e relatos de heranças autossômicas recessivas (associadas aos genes *LEPRE1*, *CRTAP*, e *PPIB*, dentre outros) também são relatados como causadores da OI (BYERS et al., 1988; DRÖGEMÜLLER et al., 2009; MARINI, CABRAL, BARNES, 2010). Os genes citados compõem o complexo de prolil-3-hidroxilação, responsável por catalizar modificações pós-traducionais na molécula do colágeno tipo I (MARINI, CABRAL, BARNES, 2010).

2.2 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DA OI

A OI foi classificada em 4 tipos (I a IV), baseado em critérios clínicos, radiológicos e genéticos (Sillence, 1979). Essa classificação é amplamente aceita, apesar de não demonstrar a grande variedade fenotípica característica da doença (FORLINO, MARINI, 2000).

- O **tipo I da OI** é caracterizado por fragilidade óssea, esclerótica azulada, surdez precoce (ou mesmo histórico familiar de surdez precoce) e estatura normal, definida como a forma mais branda e comum da doença (GAJKO-GALICKA, 2002; GLORIEUX, 2008). As fraturas raramente são observadas ao nascimento, mas aparecem ao longo da vida. É herdada de modo autossômico dominante (GAJKO-GALICKA, 2002).

- O **tipo II da OI** é a forma letal no período perinatal e frequentemente está associada a ocorrência de mutações novas. São recorrentes fraturas intra-uterinas e hemorragia intracraniana decorrente do parto, o que geralmente leva o paciente a óbito (GAJKO-GALICKA, 2002).

- O **tipo III da OI** é caracterizado por progressivas deformações ósseas após o nascimento, baixa estatura, múltiplas fraturas até a vida adulta, face triangular e perda de audição. Trata-se de uma forma grave da OI e em geral os pacientes necessitam de auxílio para deambular (GAJKO-GALICKA, 2002; GLORIEUX, 2008).

- O **tipo IV da OI** é o menos comum, apresenta certas semelhanças com os tipos I e III da doença. A estatura é variável e são evidentes dentinogênese imperfeita, osteoporose e curvatura dos ossos longos (GAJKO-GALICKA, 2002). Clinicamente trata-se do tipo mais clinicamente mais diversificado da OI (GLORIEUX, 2008).

Estudos clínicos e histológicos e genéticos permitiram mais recentemente a inclusão dos tipos V, VI, VII e VIII à classificação da doença (GLORIEUX, 2008). Essas formas da OI não estão associadas aos genes *COL1A1* e *COL1A2* (VAN DIJK et al., 2009).

- O **tipo V da OI** está associado a quadros variados de deformidade óssea, ao desenvolvimento de calo hipertrófico no sítio de fratura e a calcificação das membranas interósseas (GLORIEUX, 2008).
- A **OI tipo VI** é caracterizada pela deformidade óssea, moderada a grave, aparência anormal das lamelas ósseas e a presença excessiva de osteóides na superfície de ossificação (GLORIEUX, 2008). Manifesta-se como herança autossômica recessiva (VAN DIJK et al., 2009).
- Os pacientes com **OI tipo VII** apresentam deformidade moderada a severa, encurtamento da porção proximal (rizomelia) do úmero e do fêmur. Manifesta-se como uma herança autossômica recessiva, associado ao gene *CRTAP*, cuja expressão é 90% reduzida em pacientes homozigotos para o alelo patogênico (GLORIEUX, 2008).
- A **OI tipo VIII** está associada a mutações em homozigose (recessiva) ocorridas no gene *LEPRE1*. Pode ser letal e é caracterizada por grave deficiência no crescimento, com baixíssima mineralização óssea e metáfise bulbosa (CABRAL, 2007).

Van Dijk e col., em 2009, propuseram uma nova classificação para a Osteogênese Imperfeita em apenas seis tipos. Correlacionou-se os tipos de OI com os genes respectivos. O tipo I continuou a ser associado com mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2*, mas os tipos II a IV passaram a ser relacionados com mutações nos genes *COL1A1*, *COL1A2*, *LEPRE-1*, *CRTAP* e *PPIB*. Os tipos V e VI não sofreram modificações e VII e VIII foram eliminados (VAN DIJK et al., 2009).

Existem controvérsias sobre a classificação dos tipos de OI diante dos avanços científicos obtidos recentemente (GLORIEUX, 2008; VAN DIJK et al., 2009). Na prática clínica rotineira são raros os casos em que existem informações de genética molecular dos pacientes, informação necessária para a classificação das formas novas da doença. Tendo-se em vista a praticidade da classificação proposta por Sillence e col. (1979) e o fato de ainda ser utilizada na descrição de alterações

genéticas responsáveis pela OI, o método de classificação foi utilizado nesse trabalho.

2.3 OS OSSOS E A MOLÉCULA DO COLÁGENO TIPO I

O tecido ósseo é afetado em pacientes com OI, haja vista a deformidade e a fragilidade ósseas (MARINI, 2007; BODIAN, 2009). A matriz óssea possui fases mineral e orgânica e a porcentagem das fases muda ao longo da vida (BURR, 2002; GARNERO et al., 2009). A primeira fase está associada à rigidez óssea, enquanto a segunda, basicamente constituída do colágeno tipo I (90% da matriz orgânica), proporciona tenacidade à matriz óssea (LINDAHL et al., 2008; GARNERO et al., 2009). Também é conhecido que, ao longo da vida, ocorre redução da quantidade de colágeno, inclusive com mudanças na morfologia dos cristais de cálcio (BURR, 2002). Esse fato, associado à excessiva mineralização óssea, contribui com a fraqueza óssea e com a ocorrência de fraturas (BURR, 2002).

Existem 28 tipos distintos de colágenos, sendo os fibrilares os mais abundantes, capazes de prover a estrutura para a matriz extra-celular de ossos, pele, tendões, ligamentos e vasos sanguíneos (GALICKA, WOLCZYNSKI, GINDZIENSKI, 2003; BRYAN, CHENG, BRODSKY, 2010).

O colágeno tipo I é um heterotrímero (ilustração 1), formado pela associação entre duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$, codificadas respectivamente pelos genes *COL1A1* e *COL1A2*. (DE VOS et al., 2000; ALANAY et al., 2010). A associação entre as cadeias é feita no lúmen do retículo endoplasmático, interagindo não covalentemente pelas extremidades carboxi-terminais (GALICKA, WOLCZYNSKI, GINDZIENSKI, 2003; ALANAY et al., 2010). Há uma sequência na extremidade C-terminal, (Gly-Pro-Hyp)₄-Gly-Pro-Pro, associada à estabilização do núcleo da tripla-hélice do colágeno tipo I (GALICKA, WOLCZYNSKI, GINDZIENSKI, 2003). A tripla-hélice então se propaga como um zíper da extremidade C-terminal para a N-terminal (GALICKA, WOLCZYNSKI, GINDZIENSKI, 2003; LINDAHL et al., 2008). Simultaneamente, resíduos de prolina e lisina presentes são hidroxilados por enzimas específicas, e os resíduos de hidroxilisina ainda são glicosilados, a partir de

glicosil-transferases. Assim as cadeias de pró-colágeno poderão compor as proteínas fibrilares em tripla-hélice (GALICKA, WOLCZYNSKI, GINDZIENSKI, 2003). Cada uma das cadeias α -hélice, que compõem a tripla-hélice do colágeno, contém 338 repetições de triplets dos aminoácidos Gly-X-Y, nos quais a letra X e a letra Y podem ser quaisquer aminoácidos (MARINI, CABRAL, BARNES, 2010). O triplet Gly-Pro-Hyp é o mais estabilizador da molécula do colágeno tipo I (GALICKA, WOLCZYNSKI, GINDZIENSKI, 2003; MARINI, 2010). O resíduo de glicina ocupa, invariavelmente, a terceira posição do triplet, o que lhe garante o espaço central e dá estabilidade à hélice da molécula (FORLINO, MARINI, 2000; MAKAREEVA et al., 2006; MARINI et al., 2007; MARINI, CABRAL, BARNES, 2010). Em se tratando do menor aminoácido, substituições de glicina por outros aminoácidos maiores, como arginina ou cisteína, prejudicam a formação e a estabilidade da tripla-hélice do colágeno, além de atrapalhar a secreção e a incorporação do colágeno maduro à matriz extracelular (GALICKA, WOLCZYNSKI, GINDZIENSKI, 2003).

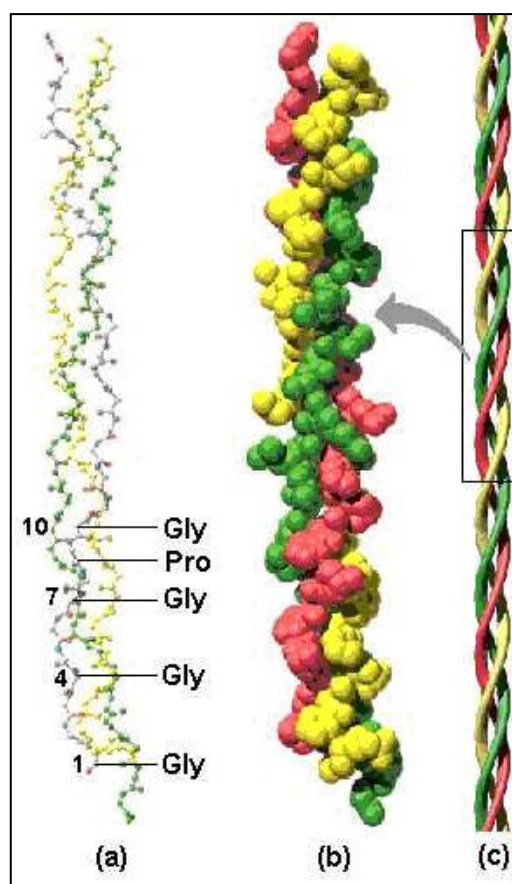


Ilustração 1 – Estrutura do colágeno tipo I: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla; Fonte: Disponível no site http://www.freedom.inf.br/artigos_tecnicos/21082007/biomateriais.asp

2.4 AS MUTAÇÕES DA OI E O COLÁGENO TIPO I

Estão descritas mais de 1.000 mutações associadas à Osteogênese Imperfeita, 80 a 90% associada aos genes *COL1A1* e *COL1A2* (<www.le.ac.uk/ge/collagen/>), classificadas em qualitativas e quantitativas (LEE, 2006; ROSCHGER et al., 2008).

- As mutações quantitativas provocam a redução na biossíntese da molécula do colágeno tipo I, devido à introdução de um códon de parada prematuro e à geração de um alelo nulo (MUNDLOS et al., 1996; ROSCHGER et al., 2008). Mutações quantitativas estão geralmente associadas a pacientes com a OI tipo I (MUNDLOS et al., 1996; DE VOS et al., 2000; GLORIEUX, 2008; ROSCHGER et al., 2008).

- As mutações qualitativas provocam a produção de cadeias anormais de pró-colágeno, através da alteração na conformação da tripla-hélice do colágeno (DE VOS et al., 2000). Tendo-se em vista que o paciente então apresenta uma mistura de moléculas normais e anormais de colágeno tipo I, o quadro clínico dos pacientes é bastante diverso (ROSCHGER et al., 2008).

As mutações descritas em pacientes com OI estão distribuídas ao longo do domínio estrutural dos genes *COL1A1* e *COL1A2*, resultando em maioria substituições de glicina (DE VOS, 2000; LEE, 2006; GLORIEUX, 2008; ROSCHGER et al., 2008). Também são observadas pequenas deleções, inserções, rearranjos cromossômicos e alterações no sítio de splicing (GAJKO-GALICKA, 2002).

Novos genes, *CRTAP*, *LEPRE1*, *PPIB*, *SERPINH1*, *FKBP10* e *SP7* foram associados à OI (DRÖGEMÜLLER et al., 2009; MARINI, CABRAL, BARNES, 2010). Os três primeiros genes compõem o complexo de prolil-3-hidroxilação, responsável por catalizar modificações pós-traducionais na molécula do colágeno tipo I (MARINI, CABRAL, BARNES, 2010). Os genes *SERPINH1* e *FKBP10* foram associados à biossíntese de chaperonas, importantes respectivamente na integridade da tripla-hélice do colágeno tipo I e nos dobramentos do procolágeno tipo I (ALANAY et al., 2010). Fatores de transcrição associados à diferenciação dos osteoblastos são codificados pelo gene *SP7* (GAO et al., 2004).

Não é perfeitamente compreendido como as alterações genéticas associadas à OI levam aos quadros clínicos observados, mas anormalidades modificam a fase mineral da matriz óssea, levando ao quadro clínico da doença (ROSCHGER et al., 2008).

2.5 OS GENES HUMANOS ASSOCIADOS À OI

- O gene *COL1A1*, pró-colágeno tipo I alfa 1, está localizado no cromossomo 17q.21.3-q22.1 (TROMP et al, 1988). Apresenta aproximadamente 18 kb de comprimento, distribuídos entre porções não-codificantes e 52 exons (KATAOKA, 2007). Codifica duas cadeias pro-colágeno alfa1, que compõem a tripla-hélice da molécula do colágeno tipo I (DE VOS, 2000; ALANAY, 2010).
- O gene *COL1A2*, pró-colágeno tipo I alfa 2, está localizado no cromossomo 7q22.1 (DE WET et al., 1987). Apresenta 52 exons e porções não-codificantes (38 kb de tamanho) (KATAOKA, 2007). Codifica a cadeia pro-colágeno alfa2, componente da molécula do colágeno tipo I (DE VOS, 2000; ALANAY, 2010).
- O gene *CRTAP*, *cartilage associated protein*, está localizado no cromossomo 3p22.3 e apresenta 6kb de comprimento (CASTAGNOLA, 1997). Atua em conjunto com os genes *LEPRE1* e *PPIB* nas modificações pós-traducionais na molécula do colágeno tipo I (MARINI, CABRAL, BARNES, 2010).
- O gene *LEPRE1*, *leucine proline-enriched proteoglycan 1*, localizado no cromossomo 1p34.1 (JARNUM et al, 2004). Codifica uma enzima da família das prolil-hidroxilases, do retículo endoplasmático, necessária nas corretas biossíntese e montagem da molécula do colágeno tipo I (MARINI, 2009).
- O gene *SERPINH1*, *serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)*, localizado no cromossomo 11q.13.5 (IKEGAWA et al., 1995).
- O gene *FKBP10*, *FK506 binding protein 10*, está localizado no cromossomo 17q21.2 e codifica uma proteína de 65 kDa (PATTERSON et al., 2000).
- O gene *PPIB*, *peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)*, está situado no cromossomo 15q21-q22 (PRICE et al, 1991). A proteína codificada se liga à

ciclosporina, estando localizada no retículo endoplasmático e atua nas vias secretoras celulares (PRICE et al., 1991).

- O gene *SP7*, *Sp7 transcription factor*, está localizado no cromossomo 12q13.13 (NAKASHIMA et al., 2002). Codifica um fator de transcrição, essencial na diferenciação dos osteoblastos e na formação óssea (GAO et al., 2004).

2.6 O GENE *COL1A2* E A OSTEOGÊNESE IMPERFEITA

O gene *COL1A2* contribui com uma das três cadeias da molécula do colágeno tipo I (DE VOS et al, 2000; GAJKO-GALICKA, 2002; ALANAY et al, 2010). Das 1000 mutações associadas com a OI descritas para os genes *COL1A1* e *COL1A2*, aproximadamente 400 mutações estão descritas para esse gene (<<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/>>). Mutações que afetam o gene *COL1A2* reduzem a biossíntese do colágeno tipo I (ilustração 2) (GAJKO-GALICKA, 2002). Entretanto, o quadro clínico dos pacientes é bastante diverso (<www.le.ac.uk/ge/collagen/>).

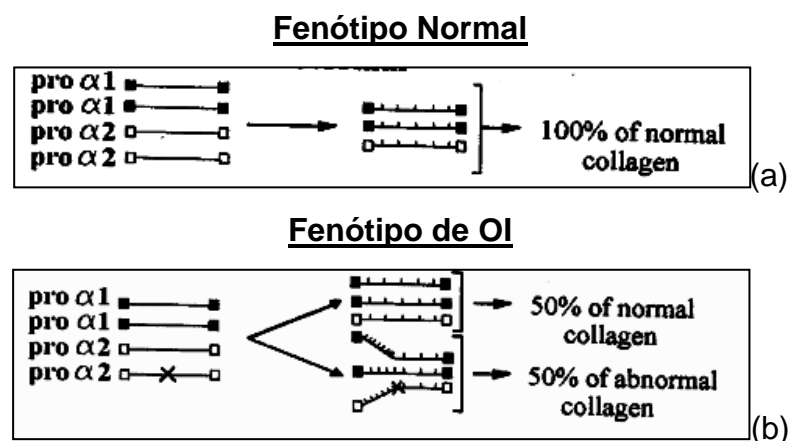


Ilustração 2 – Mecanismo molecular da OI. As linhas com quadrados rachurados e em branco representam cada uma das cadeias pro- α sintetizadas pelos genes *COL1A1* e *COL1A2*. (a) Formação e montagem da molécula de colágeno tipo I normal. (b) O símbolo “x” indica mutação em uma das cadeias pro- α 2, levando ao fenótipo da OI. As pequenas linhas verticais indicam modificações pós-traducionais, da extremidade inicial até o sítio da mutação.

Fonte: Gajko-Galicka, 2002

Como há grande variedade fenotípica no quadro da OI, mesmo quando o foco é o estudo do gene *COL1A2*, critérios como a localização da mutação no mesmo gene ou o tipo de mutação devem ser analisados (GAJKO-GALICKA, 2002). É proposto, por exemplo, que alterações mais próximas da porção final resultam em quadros clínicos mais graves de OI do que mutações mais próximas da porção inicial do gene (GAJKO-GALICKA, 2002). Por outro lado, isso depende do aminoácido substituído (GAJKO-GALICKA, 2002).

2.7 O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA OI E A CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

A diversidade clínica apresentada pelos pacientes com Osteogênese Imperfeita e a heterogeneidade genética da doença evidenciam a necessidade de estudos moleculares dos genes associados à OI (ASSIS et al., 2002; GLORIEUX, 2008). Análises moleculares podem ser realizadas por meio da coleta de sangue periférico ou biópsia de pele para análise, procedimento seguido de amplificação pela PCR e identificação da sequência nucleotídica alterada (LEE, 2006; KATAOKA, 2007; GLORIEUX, 2008; BODIAN et al., 2009).

A etapa de amplificação gera cópias de sequências específicas do DNA, com alta sensibilidade e detecta moléculas de ácido nucléico, mais termoestáveis do que as proteínas (GACHET et al., 2000). A amplificação é seguida pela técnica de detecção da mutação, a triagem genética por SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) (ORITA et al., 1989; LEE, 2006; KATAOKA, 2007).

A SSCP é uma técnica simples e versátil, baseada na relação entre a mobilidade eletroforética de um fragmento de DNA fita-simples e de sua conformação, os quais refletem a sequência nucleotídica (SPINARDI, MAZARS, THELLET, 1991). Trata-se de uma técnica eficaz na triagem de mutações de substituições, mesmo de única base nitrogenada (SPINARDI, MAZARS, THELLET, 1991). A amostra analisada em SSCP pode ser sequenciada (SPINARDI, MAZARS, THELLET, 1991; WILLING et

al., 1994; KATAOKA, 2007). Cabe salientar que a não-detecção de alterações pela técnica de SSCP não invalida o diagnóstico clínico da OI, pois as técnicas moleculares possuem aproximadamente 90% de eficácia na detecção das mutações associadas à OI (GLORIEUX, 2008).

As consequências fenotípicas das alterações genéticas na molécula do colágeno tipo I refletem o tipo de mutação, o gene no qual ocorreu a alteração genética e a localização da mutação (GAJKO-GALICKA, 2002). Mesmo assim, a variedade fenotípica dos pacientes com OI é elevada, o que torna mais complexa a correlação entre o genótipo e o quadro clínico do indivíduo (ROUGHLEY, RAUCH, GLORIEUX, 2003; LEE, 2006). A falta de conhecimento das consequências intracelulares das alterações genéticas também dificulta a correlação entre o genótipo-fenótipo (ROUGHLEY, RAUCH, GLORIEUX, 2003).

2.8 TRATAMENTO E PERSPECTIVAS FUTURAS DA OI

Não há, na atualidade, cura para a Osteogênese Imperfeita (PLOTKIN, 2000; HUBER, 2007; LINDAHL et al., 2008). Contudo, há métodos paliativos desenvolvidos para reduzir deformidades, promover as funções normais e melhorar a qualidade de vida do paciente (PLOTKIN et al., 2000; HUBER, 2007).

A terapia da OI com bifosfonatos é efetiva na redução do risco de fraturas e das dores ósseas em pacientes com a doença (PLOTKIN et al., 2000; HUBER, 2007). Trata-se de uma classe de drogas com potencial inibitório da reabsorção óssea, mas que não têm efeito negativo estatisticamente significativo sobre o crescimento normal dos indivíduos (PLOTKIN et al., 2000).

O pamidronato é um dos bifosfonatos mais utilizados no tratamento da OI, usado de forma intravenosa. Ciclos de 1 a 4 meses desse medicamento reduzem a dor óssea crônica, melhoram a mobilidade dos pacientes, além de levarem ao aumento da densidade mineral óssea (PLOTKIN et al., 2000; GLORIEUX, 2008). A

administração oral de bifosfonatos, como o alendronato e o olpadronato, também tem sido testada (GLORIEUX, 2008). Foi observada a redução da atuação dos osteoclastos, como na administração intravenosa, mas não surtiu efeito significativo sobre as dores ósseas e sobre a incidência de fraturas (GLORIEUX, 2008).

A idade de início do tratamento com bifosfonatos é outro critério pesquisado (GLORIEUX, 2008). Há relatos de pacientes com OI que receberam a medicação intravenosa nos primeiros anos de vida e apresentaram melhoras evidentes, ao longo do tempo, em seu quadro clínico (PLOTKIN et al., 2000; GLORIEUX, 2008).

O uso de células-tronco transplantadas em pacientes com OI tem sido analisado (GLORIEUX, 2008). O transplante intrauterino de células tronco fetais humanas em camundongos, com aspectos clínicos de OI similares aos humanos, reduziu em torno de 84% do número de fraturas (VANLEENE, 2011). Dessa maneira, o transplante de células-tronco pode ser uma solução viável para os pacientes humanos com OI.

O quadro clínico dos pacientes com OI pode ser melhorado também pela inativação do gene mutado (GLORIEUX, 2008). A inativação do gene via silenciamento aparentemente é uma possibilidade de terapia para a OI via RNAi, mas testes *in vitro* e *in vivo* ainda devem ser realizados para ratificar o uso dessa técnica (LINDAHL et al., 2008).

3

Objetivos

3.1 OBJETIVO GERAL

- Efetuar o estudo molecular da porção inicial do gene *COL1A2* em pacientes com Osteogênese Imperfeita atendidos no Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG), no município de Vitória-ES.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar, na região inicial do gene *COL1A2* (representada pelos exons 1 a 26), as alterações genéticas responsáveis pelo quadro clínico dos pacientes com OI;
- Estabelecer correlação entre a alteração genética detectada para o paciente com OI e o quadro clínico identificado para o mesmo;
- Ratificar o uso da técnica de SSCP na detecção de mutações patogênicas associadas à OI.

4

Metodologia

4.1 AMOSTRAS

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG) – registro 60/2009 (apêndice A), localizado em Vitória-ES. O grupo de pesquisa que estuda os aspectos genéticos da OI coletou amostras de pacientes entre os anos de 2006 a 2009.

Foram coletados 5 mL de sangue periférico dos pacientes com OI, em seguida armazenadas em geladeira a 4°C. Os pacientes foram registrados pela letra C, seguida de um representante numérico (Exemplo: C1). Os dados clínicos coletados para cada paciente seguem o modelo em anexo (apêndice B) . A amostra desta pesquisa é formada por 33 famílias não-consanguíneas, sendo 25 casos isolados e 8 de recorrência familiar. As informações clínicas dos pacientes quanto sexo, idade, número de fraturas, deformidades ósseas, dentinogenese imperfeita, comprometimento visual ou auditivo e características de deambulação e esclerótica estão descritos nas ilustrações 3, 4 e 5.

Foram coletadas amostras de 5 mL de sangue periférico de 100 indivíduos controles-normais (45 do sexo masculino e 55 do sexo feminino), com idade entre 18 e 30 anos), identificadas pela letra N, seguida de representante numérico (Exemplo: N1) e utilizadas na padronização dos experimentos e na pesquisa de polimorfismos

Código de registro	Sexo	Idade (em anos)	Nº de fraturas	D.O.	D.I.	V.C.	D.A.	E.A.	A.C.
C5	Masculino	12	4	Leve	+	+	-	-	-
C7	Masculino	9	11	Moderada	+	-	-	-	-
C9	Feminino	12	3	-	-	-	-	+	-
C10	Masculino	7	7	Leve	-	-	-	+	-
C25	Feminino	5	14	Leve	+	-	+	-	-
C27	Masculino	4	17	-	-	-	-	+	-
C29	Feminino	13	4	Leve	+	+	-	+	-
C31	Masculino	16	2	-	-	-	-	+	+
C37	Feminino	2	4	Leve	-	-	-	+	-
C42	Feminino	11	8	Leve	-	-	-	+	-
C46	Masculino	11	18	Leve	-	-	-	+	-
C58	Masculino	13	4	-	-	-	-	+	-
C59	Masculino	3	5	-	-	-	-	+	-
C61	Masculino	3	1	Leve	-	-	-	+	-
C72	Masculino	10	15	Leve	-	-	-	+	-
Total	Proporção sexual	Idade (média)	Média anual de fraturas	Deformidade óssea	D.I.	V.C.	D.A.	E.A.	A.C.
15	10M / 5F	8,7 ± 4,42 anos	1,229 ± 1,147	10/15	$\frac{4}{15}$	$\frac{2}{15}$	$\frac{1}{15}$	$\frac{12}{15}$	$\frac{1}{15}$

Ilustração 3 – Descrição dos pacientes diagnosticados com **OI tipo I**

“D.O.” = deformidade óssea; “D.I.” = Dentinogênese Imperfeita; “V.C.” = visão comprometida; “D.A.” = deambulação anormal, “E.A.” = esclerótica azulada e “A.C.” = audição comprometida. O sinal “+” indica presença de algum dos aspectos clínicos descritos, enquanto o “-” indica ausência dos mesmos.

Código de registro	Sexo	Idade* (em anos)	Nº de fraturas*	D.O.	D.I.	V.C.	D.A.	E.A.	A.C.
C1	Masculino	10	50	Grave	+	-	+	+	-
C2	Masculino	14	19	Moderada	-	-	+	+	-
C12	Masculino	8	Inúmeras	Moderada	+	-	+	+	-
C20	Masculino	13	Inúmeras	Moderada	+	+	+	+	
C21	Feminino	16	Inúmeras	Grave	-	+	+	+	-
C24	Masculino	2	10	Moderada	-	-	+	-	-
C26	Masculino	4	50	Grave	+	-	+	+	-
C33	Feminino	4	26	Leve	+	-	+	+	-
C45	Feminino	7	20	Grave	+	-	+	+	-
C57	Masculino	3	Inúmeras	Grave	+	-	+	+	-
Total	Proporção sexual	Idade (média)	Média anual de fraturas	Deformidade óssea	D.I.	V.C.	D.A.	E.A.	A.C.
10	7M / 3 F	8,1 ± 4,98 anos	Não se aplica	Não se aplica	$\frac{7}{10}$	$\frac{2}{10}$	$\frac{10}{10}$	$\frac{9}{10}$	$\frac{0}{10}$

Ilustração 4 – Descrição dos pacientes diagnosticados com **OI tipo III**

“D.O.” = deformidade óssea; “D.I.” = Dentinogênese Imperfeita; “V.C.” = visão comprometida; “D.A.” = deambulação anormal, “E.A.” = esclerótica azulada e “A.C.” = audição comprometida. O sinal “+” indica presença de algum dos aspectos clínicos descritos, enquanto o “-” indica ausência dos mesmos.

Código de registro	Sexo	Idade* (em anos)	Nº de fraturas*	D.O.	D.I.	V.C.	D.A.	E.A.	A.C.
C8	Masculino	9	74	Leve	+	-	+	-	-
C11	Masculino	9	3	Leve	+	-	+	+	-
C23	Feminino	8	5	Moderada	+	-	-	-	-
C30	Feminino	4	21	Moderada	-	-	-	-	-
C36	Feminino	1	4	Leve	-	-	-	+	-
C41	Feminino	6	2	Leve	+	-	+	-	-
C43	Feminino	2	2	Moderada	+	-	-	+	-
C44	Feminino	6	10	Leve			+	+	
Total	Proporção sexual	Idade (média)	Média anual de fraturas	Deformidade óssea	D.I.	V.C.	D.A.	E.A.	A.C.
8	2M / 6 F	5,6 ± 3,1 anos	2,68 ± 2,78	Não se aplica	$\frac{5}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{4}{8}$	$\frac{4}{8}$	$\frac{0}{8}$

Ilustração 5 – Descrição dos pacientes diagnosticados com **OI tipo IV**

“D.O.” = deformidade óssea; “D.I.” = Dentinogênese Imperfeita; “V.C.” = visão comprometida; “D.A.” = deambulação anormal, “E.A.” = esclerótica azulada e “A.C.” = audição comprometida. O sinal “+” indica presença de algum dos aspectos clínicos descritos, enquanto o “-” indica ausência dos mesmos.

4.2 - EXTRAÇÃO DE DNA

A extração das moléculas de DNA seguiu a metodologia descrita por Miller, Dykes e Polesky, em 1988.

4.3 - AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES DE INTERESSE DO DNA E ANÁLISE DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Foram amplificadas as regiões correspondentes aos exons 1 a 26, mais regiões intrônicas flanqueadoras, do gene *COL1A2* (região inicial) utilizando-se o

termociclador Verity 96 Well Thermal Cyclor (AB, CA, USA). As porções intrônicas flaqueadoras foram amplificadas com 50 nucleotídeos *downstream* e *upstream* à região exônica de interesse, possibilitando a detecção de polimorfismos intrônicos próximos à região codificante. O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados variou de 125 pb a 400 pb (ilustração 6).

Utilizou-se a versão 0.4.0 do programa Primer 3 Input (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) para desenhar os pares de primers adotados no estudo. Também foi utilizada a ferramenta “Primer Blast”, no sítio do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome), para verificar o alinhamento correto dos primers à região de interesse do genoma a ser amplificada. Alguns exons estão proximamente localizados no gene *COL1A2*, sendo possível o uso de apenas um par de primers (Forward e Reverse) para as duas regiões. Dessa maneira, foram desenhados 24 pares de primers, como descrito na ilustração 6.

Exon	Fragmento (pb)	Tamanho do exon (pb)	Primer	Sequência do primer (5´-3´)
1	228	70	Forward	TCTGCGACACAAGGAGTCTG
			Reverse	TGAGAGTCTGCCCTCCAAGT
2	125	11	Forward	TGATCCATGAAGTGATACTAATAATTG
			Reverse	CACTGTAGCCAAGGGAATCAA
3	249	15	Forward	ACACCAAATGGAAGCTGTTT
			Reverse	AAACATCAAAGCTACTTTATTTTATGC
4	389	36	Forward	TCCAATCCTCCAGCTGAAAA
			Reverse	TCTTCTGCAGTGCATTACCTG
5	385	93	Forward	AATTTCCACCCTACTTGCACA
			Reverse	AGGGCTCACAAAGAGAATGG
6	250	54	Forward	GCCCTCTTTTAAATAACAACAGAA
			Reverse	AATGGCGTGGTAAAATGTGA
7/8	398	45 (exon 7)	Forward	CAAACCACAACAATGGCACT
		50 (exon 8)	Reverse	CACCTGCAGGACCCTAAGAA
9	275	50	Forward	CCTGGTGAACCTGGTCAAAC
			Reverse	TCAGGCATATTCAGCTTTTGG
10	396	54	Forward	CCAAAAGCTGAATATGCCTGA
			Reverse	TGCCTTCGATTCATGTTATGAG

4 Metodologia

11	332	54	Forward	GCAAGTTAATTTGTCACTCTGTGC
			Reverse	TTCTTCCCTTTGGCAAATC
12	299	54	Forward	GACAAGACTTACCCAAGAGAGATT
			Reverse	GGGATTTGAAGTACAGGAAAGAAA
13	300	45	Forward	TCTGGCATAATTGAAAAACAATC
			Reverse	AAGAATACAATGCTGAAGGATACA
14/15	297	54(exon 14)	Forward	GCAAATGATGCCTGTGACTTT
		45 (exon 15)	Reverse	TCCTTTCAAATCCTCCAGTG
16	322	54	Forward	CAACAGACTGGTTGTGAGTTTTT
			Reverse	TTGAAGGGAAGGAATAATTAAGG
17	315	99	Forward	TTGCAATTTTGAAGTTTTATGAAGA
			Reverse	TGGAATATTTTCGGTTCTTCTTTG
18	249	45	Forward	CAAAGGTGGAGTATGGGGAAG
			Reverse	AATGCAGTGTGGTCCATTAGG
19	317	99	Forward	GCGTAGCTAAAATGTGCTGCT
			Reverse	TGCTAAGGAAGAGAAAAATAGGAA
20	294	54	Forward	TTGAGCTTCTCTTTACCTTGACC
			Reverse	CCAGCAGAGCCCTGTTTAAT
21	377	108	Forward	GTAACAAGGGTGAGCCCGTA
			Reverse	AGGCAGATGGAAAGCAGATG
22	296	54	Forward	TTTGGCTTGGTTTGTGTCTG
			Reverse	AGGAGGGCCCTATTCAAAAA
23	237	99	Forward	CTAGAAAGGGGCTTGCTGCT
			Reverse	AGGAAGTAATGCCAGGTGTG
24	400	54	Forward	TTCAGAACTCTTTTCACTTCC
			Reverse	CAGTCCTGTATTCATTTGACTC
25	281	99	Forward	ATCCGTGGCAGCATCATAA
			Reverse	GGAAACTCCCTGAGACTGGAC
26	238	54	Forward	AATCACCGTGGTTAATTTGACA
			Reverse	GGGGATGCCATCTTGAAAAG

Ilustração 6 – Descrição dos pares de primers adotados para o estudo

Dez microlitos de cada amostra amplificada pela PCR (6µL de produto de PCR e 4 µL de corante Azul de Bromofenol) foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 7% [9,0 mL de poliacrilamida 40%; 5,0 mL de TBE 10X; 350µL de APS 10% (Persulfato de amônio); 35µL de TEMED (Tetrametiletileno-diamina), completando o volume a 50 mL com água destilada]. A voltagem padrão utilizada para eletroforese foi de 240V.

A técnica de coloração do gel seguiu o protocolo descrito por Sanguinetti e col, em 1994. A confirmação da amplificação foi a visualização de apenas uma banda após a coloração do gel (ilustração 8).

As condições de amplificação seguiram as recomendações do fabricante da enzima Taq Polimerase recombinante BR (Invitrogen, USA): 1x PCR Buffer 10X, 0,2mM dNTP 10mM, 0,5mM de cada primer (*Forward* e *Reverse*), 1U de Taq DNA polimerase. Utilizou-se 40ng de DNA na amplificação. As condições relativas ao Cloreto de Magnésio e as variações de tempo e temperatura da padronização estão descritas na ilustração 7.

Exon	Denaturação inicial	Denaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	MgCl ₂	Nº de ciclos
1		95°C / 30 s	64°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	35
2		95°C / 30 s	66°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	30
3		95°C / 30 s	65°C / 30 s	72°C/ 30 s		2,5mM	30
4		95°C / 30 s	66°C / 30 s	72°C/ 30 s		2,5mM	25
5		95°C / 30 s	70°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	35
6		95°C / 30 s	68°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	28
7 e 8		95°C / 30 s	66°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	31
9		95°C / 30 s	68°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	31
10		95°C / 30 s	66°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	30
11		95°C / 30 s	68°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	33
12		95°C / 30 s	66°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	33
13		95°C / 30 s	66°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	30
14 e 15	95°C / 5 min	95°C / 30 s	64°C / 30 s	72°C/ 30 s	72°C/7min	3,5mM	25
16		95°C / 30 s	67°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	40
17		95°C / 30 s	66°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	30
18		95°C / 30 s	71°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	30
19		95°C / 30 s	63°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,0mM	30
20		95°C / 30 s	70°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	33
21		95°C / 30 s	65°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	40
22		95°C / 30 s	64°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	25
23		95°C / 40 s	69°C / 40 s	72°C/ 40 s		3,0mM	30
24		95°C / 30 s	67°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	40
25		95°C / 40 s	62°C / 40 s	72°C/ 40 s		3,5mM	30
26		95°C / 30 s	64°C / 30 s	72°C/ 30 s		3,5mM	30

Ilustração 7 – Condições de padronização da PCR para os exons 1 a 26 do gene COL1A2

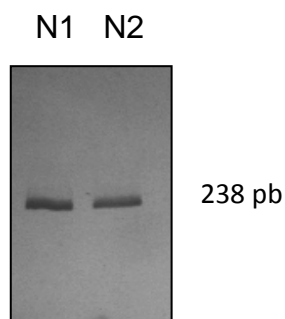


Ilustração 8 – Gel de poliacrilamida 7%, para o fragmento de DNA correspondente ao exon 26. N1 e N2 são amostras de indivíduos normais. (Figura esquemática)

4.4 DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS

A técnica de SSCP se trata de um procedimento simples e versátil, baseado na relação entre a mobilidade eletroforética de um fragmento de DNA fita-simples e de sua conformação, os quais refletem a sequência nucleotídica (ORITA et al.,1989; SPINARDI, MAZARS, THELLET, 1991). Essa técnica foi utilizada na tentativa de detectar alterações genéticas nas amostras de pacientes com OI.

Seis microlitros de cada amostra dos pacientes e de controles-normais [4 μ L de produto de PCR e 2 μ de SSCP-Loading Buffer (980mL/L de formamida; 10mM de EDTA; 0,25g/L de xileno ciano; 0,25g/L de azul de bromofenol)] foram aplicadas, pós denaturação por 10 minutos a 95°C, em géis de poliacrilamida 6% (9mL de poliacrilamida 40%, 6mL de TBE 1,0X, 5% de gliceraldeído, 600 μ L de Persulfato de Amônio 10% e 35 μ L de TEMED, sendo o volume completado a 60 mL de solução com água destilada) e 8% (12mL de poliacrilamida 40%, 6mL de TBE 1,0X, 5% de gliceraldeído, 600 μ L de Persulfato de Amônio 10% e 35 μ L de TEMED, completando o volume a 60 mL com água destilada). Foi utilizada a voltagem padrão de 600 Volts, durante um período entre 10 a 25 horas de corrida. A técnica de coloração empregada foi similar à descrita para a análise dos fragmentos amplificados.

4.5 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS

As amostras de pacientes com OI identificadas com padrões de bandas diferentes das amostras controles analisadas na técnica de SSCP foram enviadas para seqüenciamento no laboratório do Instituto de Química da Universidade Estadual de São Paulo. Identificadas as sequências nucleotídicas dos fragmentos alterados, foram analisadas no programa Bioedit e comparadas com a sequência de referência NG_007405.1, disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>.

4.6 DIGESTÃO ENZIMÁTICA

Foi utilizada a ferramenta “NebCutter V2.0” (<www.tools.neb.com/NEBcutter2/>) para verificar se o sítio da alteração genética detectada, ou um dos nucleotídeos vizinhos, coincidia com o sítio de clivagem de uma enzima de restrição, permitindo a clivagem diferencial entre fragmentos normais e alterados. Seguindo-se o protocolo da New England Biolabs (NEB), misturou-se 10 unidades de enzima 5000 U / mL, 1µg de produto de PCR e 1X de NEBuffer 10X, sendo a mistura incubada por 24h a 37°C e os resultados analisados em gel de poliacrilamida 7%.

4.7 CORRELAÇÃO GENÓTIPO X FENÓTIPO

Sabendo-se a alteração genética causadora da OI em amostras do paciente, foi possível associar essa informação ao quadro clínico já observado no mesmo, realizando a correlação genótipo x fenótipo. A associação entre essas informações pode ampliar o entendimento da manifestação da Osteogênese Imperfeita.

5

Resultados

5.1 MUTAÇÃO PATOGÊNICA

A amostra correspondente ao paciente C23 apresentou padrão de bandas diferente das demais amostras aplicadas no gel pela técnica de SSCP, no estudo do exon 16 do gene *COL1A2* (ilustração 9a e 9b). O sequenciamento automatizado (ilustração 9c) possibilitou a identificação da alteração em heterozigose c.739 G>C (p.Gly247Arg) foi identificada, com base na sequência padrão NG_007405.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). Não há histórico familiar da doença na família, nem relatos inclusive de fraturas no indivíduos parentais. Essa alteração já está descrita na literatura (https://oi.gene.le.ac.uk/home.php?select_db=COL1A2) também como um caso isolado de OI, em paciente com OI tipo III residente no Reino Unido, atendido no departamento “Serviços de Genética Molecular” do Sheffield Children's NHS Foundation Trust (comunicação pessoal).

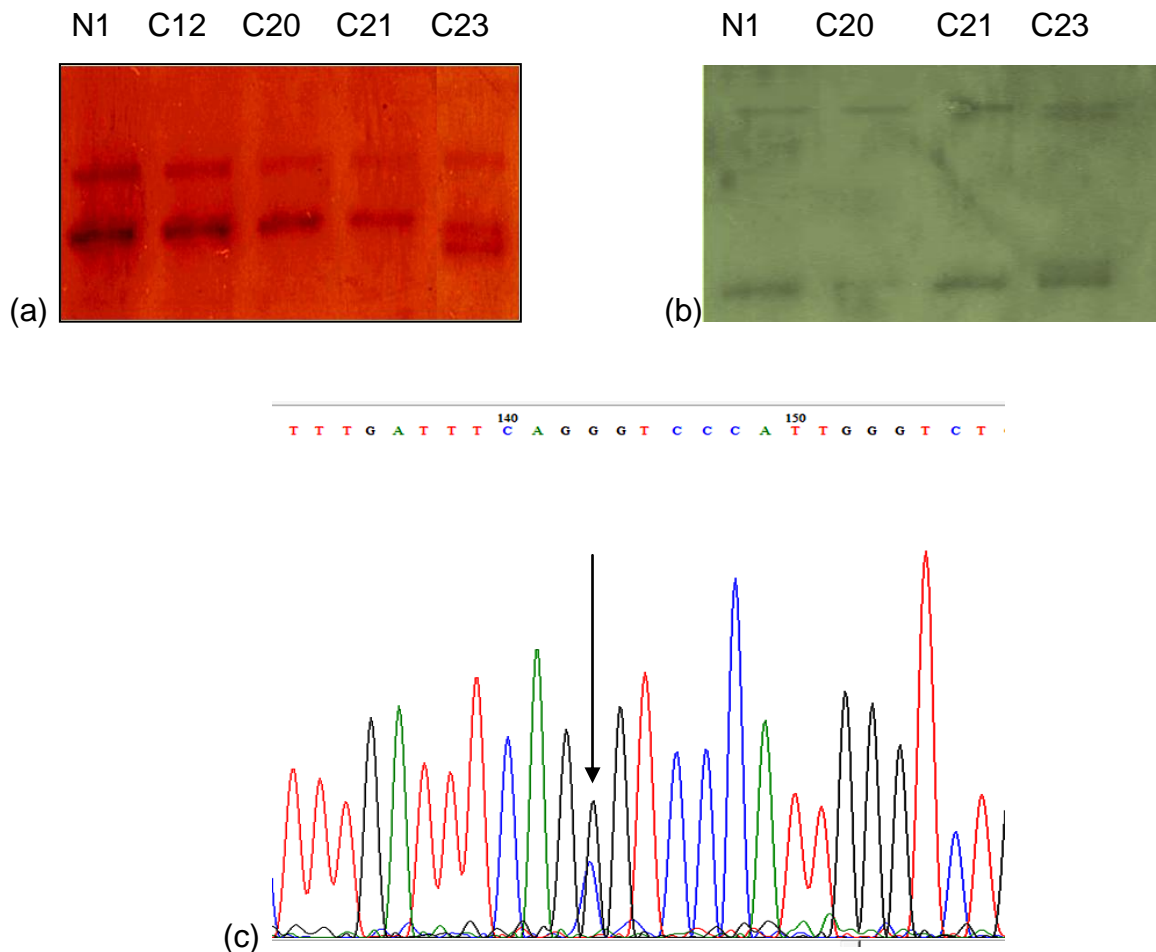


Ilustração 9 – Triagem de mutações em gel de poliacrilamida pela técnica de SSCP. (a) Gel de poliacrilamida 6%, com 12 horas de corrida. (b) Gel de poliacrilamida 8%, com 15 horas de corrida. (c) Sequenciamento da amostra do paciente C23, identificando a mutação c.739 G>C.

A alteração c.739 G>C no exon 16 do gene *COL1A2* (322pb) abole o sítio de reconhecimento da enzima de restrição PpuMI nesse fragmento. Em controles normais essa enzima promove uma quebra do fragmento em duas porções de 145 e 177pb. Como o paciente C23 é portador da alteração genética em heterozigose pode-se observar em gel de poliacrilamida bandas de 145 e 177pb, referentes ao alelo normal do paciente e uma banda de 322pb, referente ao alelo mutado (Ilustração 9c). Esse resultado ratifica os dados de SSCP e sequenciamento previamente realizados.

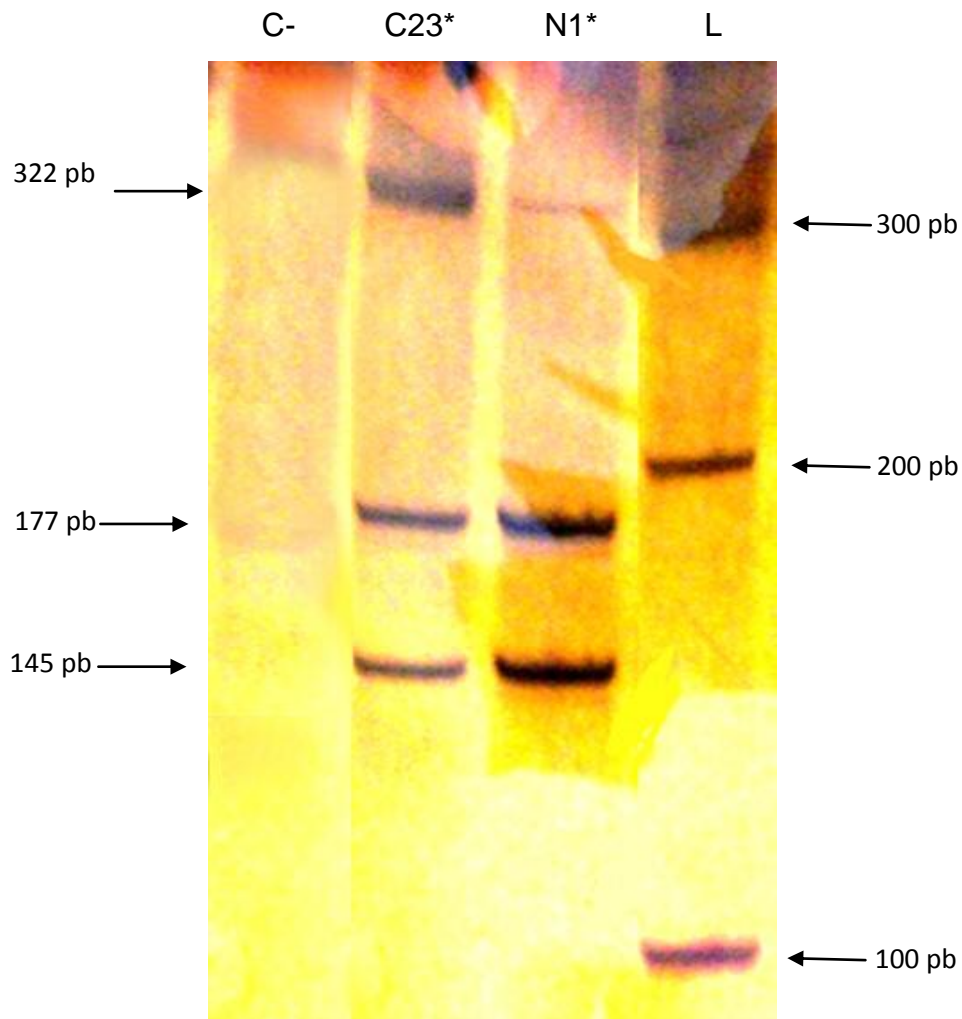


Ilustração 10 – Gel de poliacrilamida 7% em teste com enzima de restrição PpuMI.

C- = controle negativo. C23 = paciente com a mutação c.739 G>C. N1 = controle-normal. * amostras digeridas. L = marcador molecular de 100pb. E O CONTROLE NEGATIVO?!?!

5.2 ALTERAÇÕES POLIMÓRFICAS

A técnica de SSCP evidenciou a existência de mais de um padrão de bandas nos exons 4, 18, 19 e 22, padrões observados em pacientes e controles-normais (ilustrações 11 e 12). Dessa maneira, sugere-se que se tratam de alterações polimórficas não patogênicas e não foram enviadas para sequenciamento.

O gel de poliacrilamida 8% evidenciou a mudança no padrão de bandas para o fragmento correspondente ao exon 4, observado nos pacientes C1, C23, C30, C31,

C42, C57, C61 (ilustração 11.b) e em 18 amostras de controles-normais, indicando a existência de polimorfismo na região em estudo. Para o fragmento correspondente ao exon 18 do gene *COL1A2*, a triagem de alterações genéticas permitiu a identificação de três padrões de bandas distintos nas amostras analisadas para o exon 18 do gene *COL1A2* (ilustração 11, letras d e e), também presentes entre os indivíduos controles-normais.

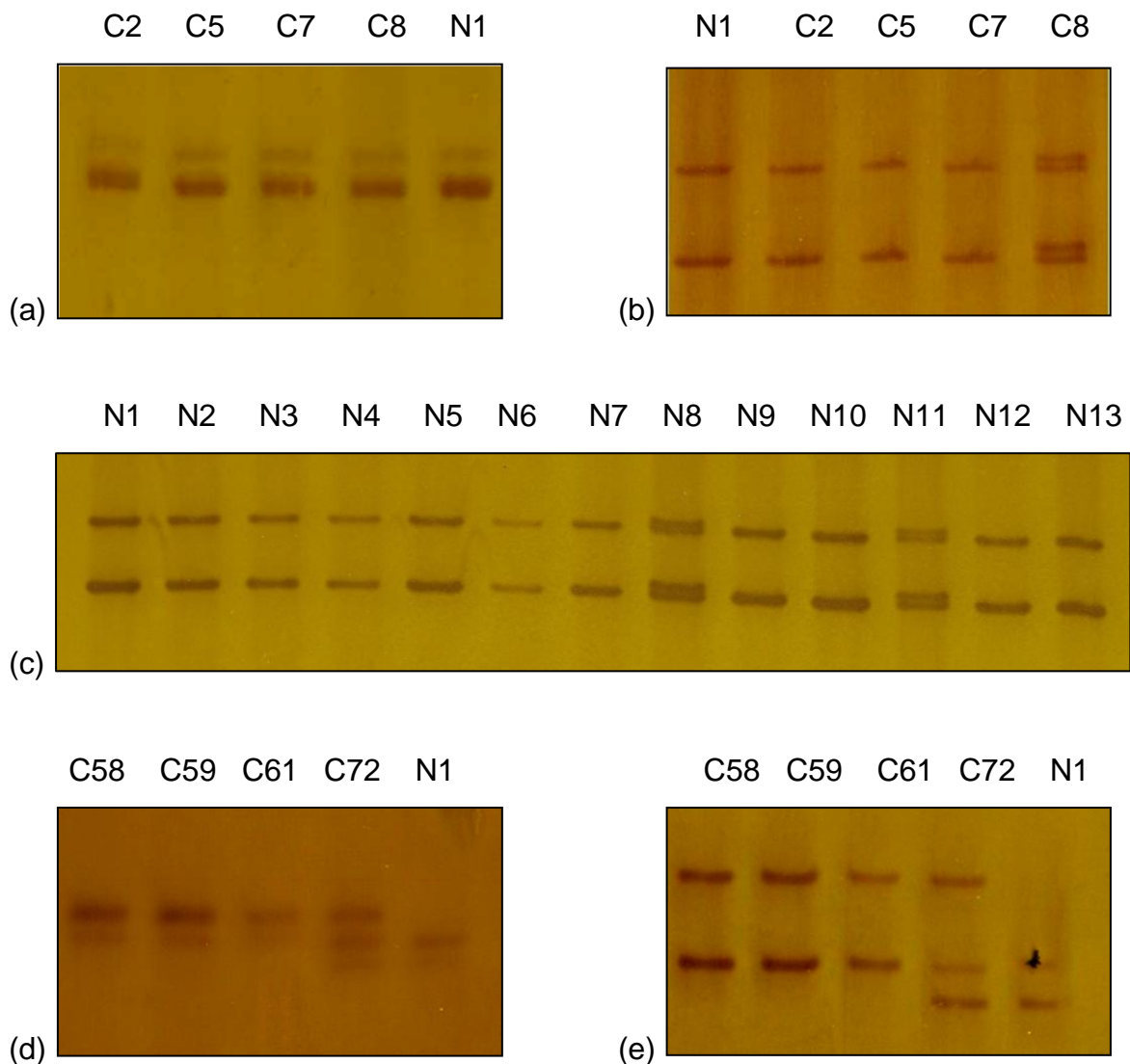


Ilustração 11 – Triagem de alterações genéticas em gel de poliacrilamida pela técnica de SSCP. As letras “a”, “b”, e “c” exemplificam a técnica de SSCP para o exon 4, enquanto as letras “d” e “e” o exon 18. (a) Gel de poliacrilamida 6%, com 19 horas de corrida. (b) Gel de poliacrilamida 8%, com 25 horas de corrida. (c) Gel de poliacrilamida 8%, aplicadas as amostras de controles-normais, com 25 horas de corrida. (d) Gel de poliacrilamida 6%, com 10 horas de corrida. (e) Gel de poliacrilamida 8%, com 15 horas de corrida e amostras de pacientes e controles-normais.

Foram detectados dois padrões de banda para os exons 19 e 22. Apenas no gel de poliacrilamida 6% (ilustração 12-d e 12-e) foi observada a alteração no padrão de bandas no exon 22. O padrão alterado foi observado nos pacientes C41, C59, C21, C23, C24, C26 e C27 e em controles normais.

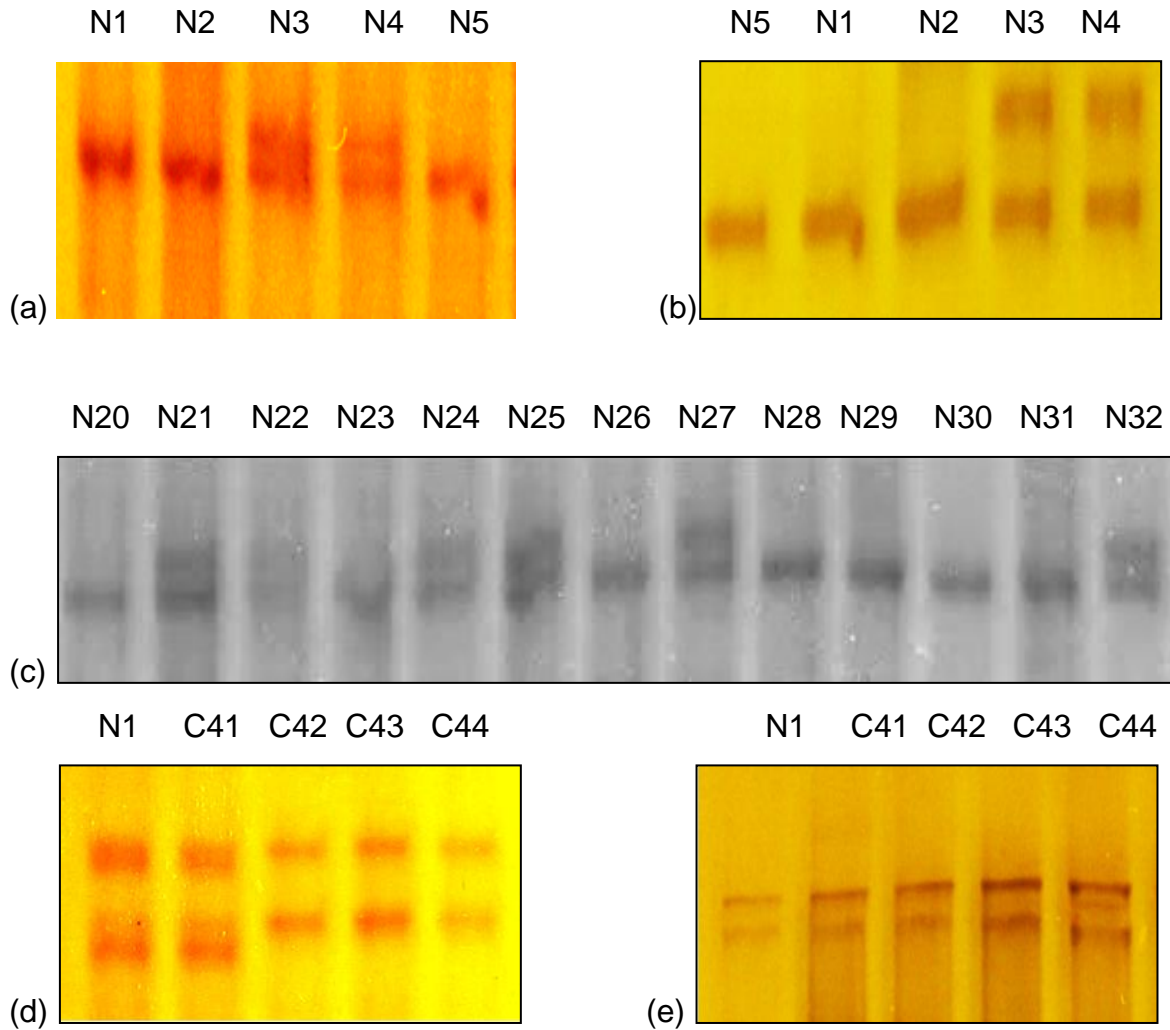


Ilustração 12 – Triagem de alterações genéticas em gel de poliacrilamida pela técnica de SSCP. As letras “a”, “b”, e “c” exemplificam a técnica de SSCP para o exon 19, enquanto as letras “d” e “e” o exon 22. (a) Gel de poliacrilamida 6%, com 10 horas de corrida. (b) Gel de poliacrilamida 8%, com 15 horas de corrida. (c) Gel de poliacrilamida 6% dos controles-normais, com 11 horas de corrida. (d) Gel de poliacrilamida 6%, com 12 horas de corrida. (e) Gel de poliacrilamida 8%, com 20 horas de corrida.

5.3 FRAGMENTOS SEM ALTERAÇÕES EM SSCP

Pela técnica de SSCP, pode-se observar para os exons 1, 2, 3, 5, 6, 7 e 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15, 17, 20, 21, 24, 25 e 26 a existência de apenas um padrão de bandas para as amostras de pacientes e controles-normais aplicadas no gel (ilustração 13). Dessa maneira, as amostras não foram enviadas para seqüenciamento. Os tempos de corrida utilizados para cada exon analisado estão descritos na ilustração 14.

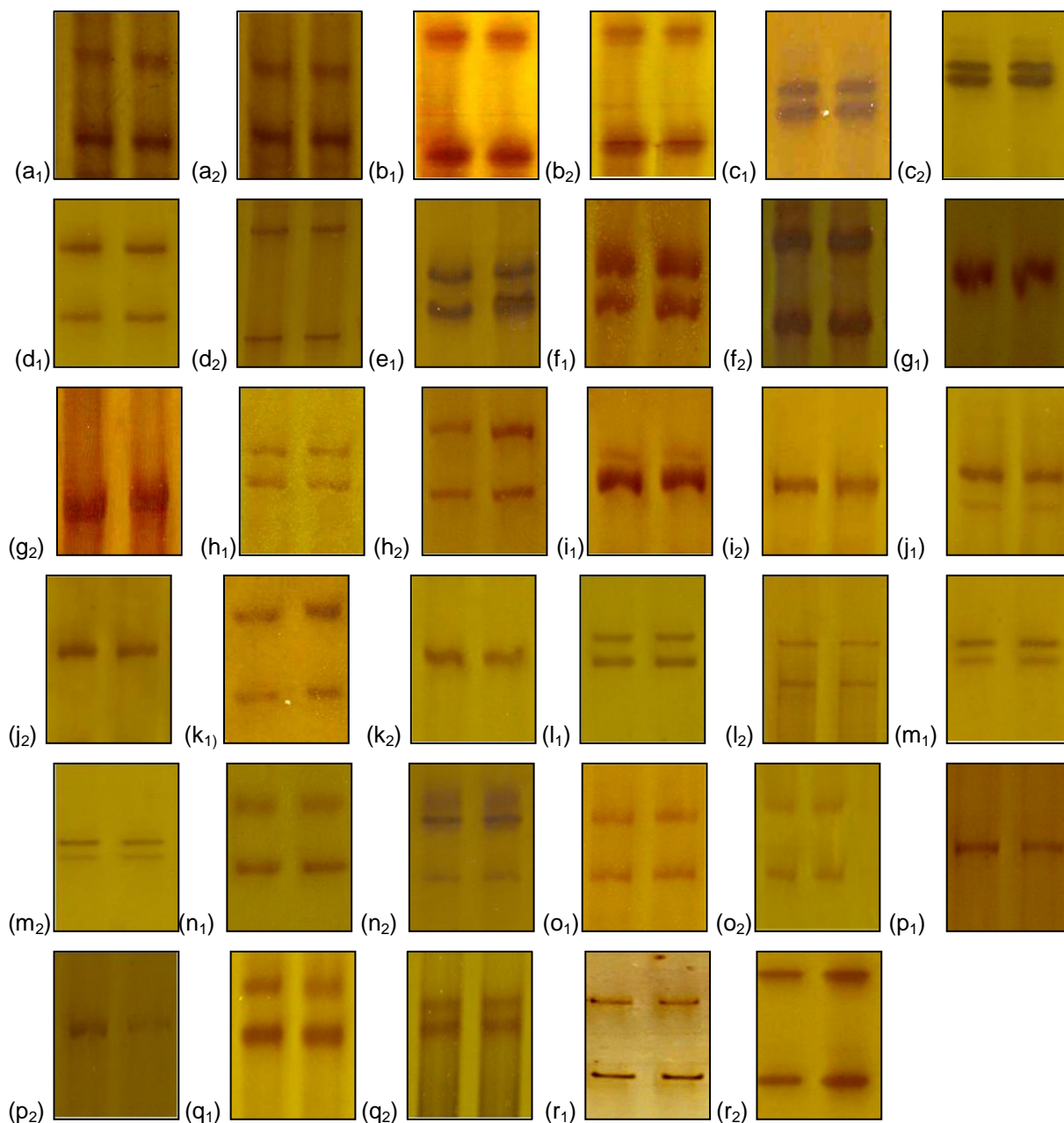


Ilustração 13 – Triagem de alterações genéticas em gel de poliacrilamida pela técnica de SSCP. As letras “a” a “r” representam, em ordem crescente, os 17 exons supracitados. O algarismo *subscript* 1 e 2 representam as concentrações 6% e 8% de poliacrilamida. As duas amostras aplicadas são, respectivamente, os pacientes C1 e C2.

Exon	6%	8%		Exon	6%	8%
1	10h	14h		12	12h	22h
2	9h	11h		13	14h	19h
3	9h	13h		14 e 15	10h	15h
5	19h	25h		17	12h	16h
6	20h	*		20	12h	17h
7 e 8	19h	20h		21	13h	22h
9	11h	20h		24	16h	21h
10	19h	20h		25	16h	21h
11	12h	22h		26	10h	17h

Ilustração 14 – Períodos de eletroforese utilizados na técnica de SSCP em função da concentração da solução de poliacrilamida. * Não foi possível analisar os resultados.

Não foi possível analisar, pela técnica de SSCP, as amostras de pacientes e controles-normais para o exon 23 do gene em estudo. Dessa maneira, nada há a inferir sobre a existência de alterações genéticas nessa região do gene *COL1A2*. Na condição 8% de poliacrilamida, a análise também não foi possível para o exon 6, mas a condição a 6% revelou o mesmo padrão de bandas entre pacientes e controles normais.

6

Discussão

Foi estudada a região inicial do gene *COL1A2* em 33 pacientes com OI não aparentados e atendidos no Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória. O critério utilizado para inserção na pesquisa foi o diagnóstico clínico realizado pela equipe médica responsável pelo setor da Ortopedia do HINSG, sendo os pacientes e suas famílias (ou responsável legal) convidados a participar do estudo, conforme orientações do CEP.

De acordo com a classificação proposta por Sillence e col., em 1979, a OI tipo II é a forma letal ainda no período perinatal, amostras que não foram coletadas nesse estudo (GAJKO-GALICKA, 2002; GLORIEUX, 2008). Dessa maneira, os estudos foram focados nos tipos I, III e IV da Osteogênese Imperfeita. Cabe salientar que foi verificado, entre pacientes classificados em um mesmo tipo da OI, grande variedade fenotípica (ver ilustrações 3,4 e 5). Essa ampla variedade fenotípica encontrada em pacientes com OI dificulta a realização do diagnóstico clínico em um dos tipos da OI (FANO et al., 2010).

A dificuldade na realização do diagnóstico clínico da OI também pode estar associada ao estilo de vida do paciente e ao tratamento com bifosfonatos (PLOTKIN et al., 2000; HUBER, 2007). Esses medicamentos possuem potencial inibitório da reabsorção óssea, provocando redução na dor óssea crônica; melhoram a mobilidade dos pacientes, além de levarem ao aumento da BMD (PLOTKIN, 2000; GLORIEUX, 2008). Consequentemente dificultam o entendimento da manifestação da OI, por meio da modificação do quadro clínico dos pacientes.

Testes com bifosfonatos de administração intravenosa tem demonstrado resultados promissores em pacientes nos primeiros anos de vida, quanto mais precoce o início do tratamento (PLOTKIN, 2000; GLORIEUX, 2008).

Foram desenhados primers correspondentes às regiões dos exons 1 a 26, além de parte de suas regiões intrônicas flangeadoras, utilizando-se a versão 0.4.0 do programa Primer 3 Input (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Algumas alterações descritas na literatura associadas à OI estão situadas em regiões intrônicas (<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/>), evidenciando a necessidade de estudá-la na detecção de alterações genéticas associadas à OI (<www.le.ac.uk/ge/collagen/>).

Após o desenho dos primers, a ferramenta “Primer Blast”, (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) foi utilizada para verificar o alinhamento correto dos primers apenas à região de interesse do genoma a ser amplificada.

6.1 TRIAGEM DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS

A busca por alterações genéticas nas amostras de pacientes com OI e controles-normais analisadas para os exons 1 a 26 do gene *COL1A2* foi realizada com base na técnica de SSCP. Essa técnica permite realizar comparações entre o padrão de bandas de uma amostra de DNA “normal” e outra contendo alteração genética (ORITA et al., 1989; SPINARDI, MAZARS, THELLET, 1991). Trata-se de uma técnica de baixo custo, na medida em que permite a aplicação de várias amostras simultaneamente em um mesmo gel, além de ser uma alternativa para o sequenciamento direto de amostras (ORITA et al, 1989; LEE, 2006; KATAOKA, 2007). Outra vantagem da SSCP é a pequena quantidade de produto de PCR necessária para a realização do procedimento, menor do que a utilizada em outras técnicas que envolvem a etapa de amplificação (HAYASHI, 1991).

A eletroforese em gel de poliacrilamida, aplicada a técnica de SSCP, é capaz de identificar até mesmo substituições de uma única base nitrogenada em um fragmento composto de centenas de nucleotídeos (HAYASHI, 1991; SPINARDI, MAZARS, THELLET, 1991). O potencial para detectar esse tipo de alteração se dá na mudança conformacional que a molécula de ácido nucléico, possivelmente contendo uma alteração genética, apresenta quando sujeita à diferença de potencial elétrico (HAYASHI, 1991; FUJITA, SILVER, 1994).

Trabalhos descritos na literatura descrevem que a eficácia da SSCP na detecção de alterações pode variar de 70 a 95% (FUJITA, SILVER, 1994). Essa observação se baseia na sensibilidade que a técnica apresenta quanto aos seguintes fatores: temperatura, concentrações iônicas e solventes (HAYASHI, 1991). Alterações na

temperatura do gel de poliacrilamida de 4°C a 37°C durante a corrida auxiliam na detecção de alterações (FUJITA, SILVER, 1994).

No preparo da solução de poliacrilamida, dois fatores importantes que atuam sobre a sensibilidade da técnica de SSCP são a concentração de poliacrilamida e de glicerol (FUJITA, SILVER, 1994). É recomendável o uso de 4% a 12% de poliacrilamida e 5 a 10% de glicerol (FUJITA, SILVER, 1994). O glicerol abre parcialmente a estrutura dos ácidos nucleicos, expondo a superfície da molécula, o que eleva as chances de detecção de alterações genéticas (HAYASHI, 1991). O uso de 5% de glicerol permite maior eficácia na detecção de alterações genéticas (HAYASHI, 1991). No presente trabalho, foram testadas as condições 6% e 8% de poliacrilamida e 5% de glicerol para cada fragmento de DNA estudado (correspondente aos exons 1 a 26 do gene *COL1A2*). Quanto mais condições testadas, maiores são as chances de se identificar alterações no padrão de bandas no gel (FUJITA, SILVER, 1994).

Em alguns dos exons estudados, foram observadas diferenças nos resultados dos géis com 6% e 8% de poliacrilamida. Em determinadas condições, não é observado o padrão de bandas dos fragmentos após a coloração ou o resultado não fica tão claro quanto em outras condições, mesmo confirmada a amplificação do fragmento pela PCR pela coloração em gel de poliacrilamida. No exon 4, por exemplo, apenas a condição a 8% de poliacrilamida permitiu a visualização e análise dos resultados. No exon 22, foi possível a identificação do padrão de bandas alterado apenas no gel 6%. Justifica-se, então, o teste de mais de uma condição na técnica de SSCP na triagem de alterações genéticas.

A região do gene *COL1A2* correspondente ao exon 23 não foi analisada na técnica de SSCP, pois o padrão de bandas não ficou evidente em nenhum dos géis aplicados (6 e 8% de poliacrilamida), mesmo após repetições da PCR e da técnica de SSCP.

Nos exons 1, 2, 3, 5, 6, 7 e 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15, 17, 20, 21, 24, 25 e 26 do gene *COL1A2* não foram detectadas, pela técnica de SSCP, alterações no padrão de bandas em gel de poliacrilamida. As alterações genéticas causadoras da OI

devem estar localizadas em outras porções do gene ou em outros genes associados à manifestação da doença.

Nos exons 4, 16, 18, 19 e 22 foram encontradas mudanças no padrão de bandas pela técnica de SSCP. No caso dos exons 4, 18, 19 e 22, as alterações foram detectadas tanto em amostras de pacientes quanto de controles-normais, tratando-se provavelmente de polimorfismos. Como essas alterações, teoricamente, não são patogênicas, foi dado enfoque à mutação detectada para o exon 16 do gene em estudo, presente em um único paciente com OI e ausente em controles-normais.

A técnica de SSCP apresenta maior eficácia na detecção de alterações genéticas quanto menor for o fragmento aplicado no gel de poliacrilamida, preferencialmente de tamanho menor que 300 pb (HAYASHI,1991). Alguns dos fragmentos analisados possuem mais do que 300pb, como por exemplo os correspondentes às regiões dos exons 4, 10 e 11 do gene *COL1A2*. Nos fragmentos de 396 pb e 332 pb, das quais fazem parte respectivamente os exons 10 e 11, não foram verificadas mudanças no padrão de bandas em gel de poliacrilamida, o que pode ser justificado pelo tamanho do fragmento analisado. Todavia, no fragmento de 389 pb correspondente ao exon 4 foi verificada alteração no padrão de bandas em gel de poliacrilamida. Dessa maneira, apesar de suas limitações, a técnica demonstra ser capaz de detectar alterações no padrão de bandas em gel de poliacrilamida mesmo analisando-se fragmentos maiores que 300 pb.

A contribuição do gene *COL1A2* para a montagem da tripla-hélice da molécula do colágeno tipo I também é uma possível explicação para o número baixo de alterações genéticas descritas nesta pesquisa. O gene *COL1A2* codifica uma das 3 cadeias constituintes da molécula do colágeno, e as demais codificadas pelo gene *COL1A1* (DE VOS et al., 2000; GAJKO-GALICKA, 2002; ALANAY et al, 2010). Estão descritas (<<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/>>) praticamente 200 mutações a mais para o gene *COL1A1*, como esperado. Contando-se apenas o número de alterações descritas na mesma database para a região inicial, dos exons 1 a 26, dos genes *COL1A1* e *COL1A2*, estão relatadas, respectivamente, 301 e 184 mutações nessa região, ratificando o argumento supracitado.

6.2 MUTAÇÃO PATOGÊNICA

Foi detectada, pela técnica de SSCP, uma alteração no padrão de bandas na amostra do paciente C23 no fragmento de DNA correspondente ao exon 16 do gene *COL1A2*. O paciente em questão foi diagnosticado pela equipe médica responsável pelo setor da Ortopedia do HINSG como OI tipo IV. Sequenciada a amostra, foi identificada uma alteração genética em heterozigose do tipo substituição de guanina por citosina, c.739 G>C. Essa mutação, ausente nos demais pacientes e em indivíduos controles-normais, promove a substituição do aminoácido glicina por arginina (p.Gly247Arg) e está descrita como uma alteração causadora da Osteogênese Imperfeita no site “Human Collagen Mutation Database” (https://oi.gene.le.ac.uk/home.php?select_db=COL1A2).

Após a detecção da alteração através da técnica de SSCP e da identificação da mutação, a partir do sequenciamento, foi analisada a região da mutação no fragmento correspondente ao exon 16 (mais regiões intrônicas flangeadoras) em busca de um sítio para clivagem enzimática e da ratificação do resultado obtido. A enzima *PpuMI* permitiu distinguir, por meio de clivagem diferencial entre o fragmento normal e o alterado, a amostra do fragmento contendo a mutação das amostras de indivíduos não portadores da mesma alteração genética, confirmando os resultados de sequenciamento da amostra (ilustração 10).

As mutações mais comuns (75 a 80%) associadas à manifestação da Osteogênese Imperfeita afetam o aminoácido glicina, constituinte essencial da tripla-hélice da molécula do colágeno tipo I (GLORIEUX, 2008; ROSCHGER et al., 2008; MARINI, CABRAL, BARNES, 2010). Para o gene *COL1A2*, aproximadamente 60% das mutações envolvem a substituição da glicina e são identificadas ao longo de todo o gene, proporcionando quadros clínicos distintos (BODIAN et al., 2009). A análise da posição da alteração de glicina no gene *COL1A2* é essencial para o entendimento do quadro clínico a ser apresentado pelo paciente (KATAOKA, 2007; GAJKO-GALICKA, 2002). É proposto, por exemplo, que alterações mais próximas da extremidade carboxi-terminal tendem a ser provocar quadros clínicos mais graves de OI do que mutações mais próximas da extremidade amino-terminal (KATAOKA,

2007; GAJKO-GALICKA, 2002). Tendo-se em vista que o gene *COL1A2* apresenta 52 exons em sua constituição, pode-se afirmar que a alteração detectada neste trabalho para o paciente C23 se encontra mais próximo da extremidade inicial, dando mais embasamento ao quadro clínico da OI tipo IV diagnosticado para o paciente em questão. Entretanto, duas mutações distintas e proximamente localizadas associadas a OI, c.811G>C e c.802G>C, ambas do tipo substituição de glicina por arginina e próximas da região inicial do gene *COL1A2*, condicionam respectivamente os quadros clínicos distintos de OI tipo I e OI tipo III ([https://oi.gene.le.ac.uk/variants.php?action=search_unique&select_db = COL1A2](https://oi.gene.le.ac.uk/variants.php?action=search_unique&select_db=COL1A2)). Pode-se perceber, então, que a variedade fenotípica dos pacientes com OI é elevada, o que dificulta a correlação entre o genótipo identificado e o quadro clínico do mesmo (LEE, 2006; ROUGHLEY, RAUCH, GLORIEUX, 2003).

Conhecendo-se os dados clínicos do paciente em questão, e tendo sido realizado o diagnóstico molecular, tornou-se possível associar o genótipo identificado ao fenótipo do mesmo. O paciente C23 apresenta deformidade óssea moderada, restrita ao fêmur direito, e dentinogênese imperfeita (ilustração 5).

O paciente foi internado no HINSG em maio de 2004, com 1 ano e 10 meses de idade, com 4 fraturas. Os fêmures já se encontravam encurvados, sendo as primeiras fraturas em cada um deles. No terceiro mês, ocorreu a segunda fratura no fêmur, e as demais (outras duas fraturas) ocorreram nos meses seguintes de vida, também no fêmur. Ainda em 2004 foi iniciado o tratamento intravenoso com pamidronato. Após esse período, há relato de apenas uma fratura no úmero, com 4 anos e 7 meses. Em 2008, foi verificado resultado normal no exame de densitometria óssea, sendo então a administração do pamidronato suspensa temporariamente.

No ano de 2009, novos exames de densitometria óssea confirmaram o resultado de normalidade, sendo o paciente então aconselhado a retornar anualmente ao HINSG para repetição dos exames. No prontuário do paciente constava, inclusive, que o mesmo estava frequentando regularmente a escola.

Aparentemente, trata-se de um caso isolado de Osteogênese Imperfeita, pois não há relatos dos principais sinais da doença, como as fraturas e deformidade ósseas ou mesmo de esclerótica azulada nos pais. Não foi possível coletar amostras de sangue dos pais para análise de DNA. Contudo, os relatos obtidos de prontuários médicos do paciente indicam que nem os pais nem outros parentes possuem sintomas da doença.

A mutação identificada para o paciente C23 já está descrita na literatura. Entretanto, foi associada a um relato de OI tipo III. Esse paciente reside no Reino Unido, foi atendido no Sheffield Children's NHS Foundation Trust e o estudo molecular foi realizado no departamento de Genética Molecular da mesma fundação. Cabe salientar que a fundação situada em Sheffield, no Reino Unido, não publicou em artigos e não detalhou os resultados obtidos do estudo molecular realizado com os pacientes com OI da sua amostra. Dessa maneira, através de comunicação pessoal, apenas nos foi informado o diagnóstico da OI e que se tratava de um caso isolado de OI na família. A ausência de informações mais precisas a respeito do quadro clínico do mesmo dificulta a realização de correlações com o paciente descrito em nosso estudo.

Uma possível inferência a respeito da diferença entre os quadros clínicos pode estar associada ao modo de vida do paciente. Não se pode afirmar que todos os pacientes seguem à risca as recomendações médicas prevenindo a ocorrência de fraturas e deformidades ósseas.

O período de início do tratamento com bifosfonatos também pode ter interferido também na diferença entre os quadros clínicos para os dois pacientes. O paciente C23 iniciou seu tratamento intravenoso com pamidronato com 1 ano de 10 meses de vida, período constatado por vários pesquisadores como os de maior melhora na qualidade de vida dos pacientes.

7

Conclusão

A diversidade clínica apresentada pelos pacientes com Osteogênese Imperfeita e a heterogeneidade genética da doença evidenciam a necessidade de estudos moleculares dos genes associados à OI (ASSIS et al., 2002; GLORIEUX, 2008).

O presente trabalho realizou uma triagem de alterações genéticas, pela técnica de SSCP, na região inicial (exons 1 a 26) do gene *COL1A2*, com exceção ao exon 23. Esse gene é responsável pela biossíntese da molécula do colágeno tipo I, estando, portanto, associado à manifestação da OI (DE VOS, 2000; ALANAY, 2010). Das regiões do gene *COL1A2* estudadas, apenas nos fragmentos de DNA correspondentes aos exons 4, 16, 18, 19 e 22 foi possível identificar alterações nas amostras analisadas de pacientes e controles-normais.

A alteração c.739 G>C, mutação presente no fragmento correspondente ao exon 16 do gene *COL1A2*, está associada a um paciente com OI tipo IV, mas um relato da mesma mutação na literatura a associa a um caso de paciente com OI tipo III. Mesmo com a aparente diferença na classificação, ambos apresentam deformidade óssea evidente, tendendo a um quadro moderado-grave da doença. Uma mesma alteração genética pode, então, permitir a expressão da doença de modos distintos, resultado de possíveis diferenças genômicas e/ou clínicas entre os pacientes.

Pode-se inferir que na amostra populacional com OI do Estado do Espírito Santo, a região inicial do gene *COL1A2* é conservada. Essa inferência pode ser ratificada, por exemplo, no menor número de alterações genéticas descritas na literatura para o gene *COL1A2*, quando comparado à quantidade de alterações descritas para o gene *COL1A1*. Não se pode excluir a possibilidade da técnica de SSCP não ter detectado uma ou mais alterações genéticas no gel. Entretanto, o uso de condições variadas em SSCP aumenta a chance de detecção de alterações genéticas em gel de poliacrilamida.

Portanto, faz-se necessária a realização de novos estudos moleculares, analisando-se as porções central e final do gene *COL1A2*, ou mesmo outros genes associados à manifestação da Osteogênese Imperfeita, a fim de que se possa compreender melhor essa doença e buscar soluções relacionadas à prevenção ou ao tratamento dos pacientes com OI.

8

Referências

Bibliográficas

ALANAY, Y. et al. **Mutations in the Gene Encoding the RER Protein FKBP65 Cause Autosomal-Recessive Osteogenesis Imperfecta.** The American Journal of Human Genetics, v.86, p.551-559, 2010.

ARIOZ, D.T., et al. **Isolated intrauterine femoral fracture in an otherwise normal fetus.** Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, v.34, n.1, 2008.

ASSIS, M.C. et al. **Osteogenesis Imperfecta: novos conceitos.** Revista Brasileira de Ortopedia, v.37, n.8, 2002.

BODIAN, D.L. et al. **Mutation and polymorphism spectrum in osteogenesis imperfecta type II: implications for genotype–phenotype relationships.** Human Molecular Genetics, v.18, n.3, p.463-471, 2009.

BRYAN, M.A.; CHENG, H.; BRODSKY, B. **Sequence Environment of Mutation Affects Stability and Folding in Collagen Model Peptides of Osteogenesis Imperfecta.** Wiley periodicals, 2010.

BURR, D.B. **Bone material properties and mineral matrix contributions to fracture risk or age in women and men.** Journal of Musculoskeleton Neuron Interaction, v.2, n.3, p. 201-204, 2002.

BYERS, P.H. et al. **Perinatal Lethal Osteogenesis Imperfecta (01 Type 11): A Biochemically Heterogeneous Disorder Usually Due to New Mutations in the Genes for Type I Collagen.** American Journal of Human Genetics, v.42, p.237-248, 1988.

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

CASTAGNOLA,P. et al. **Cartilage associated protein (CASP) is a novel developmentally regulated chick embryo protein.** Journal of Cell Science, 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, n.2, p.223-224, 2010.

CLARKE, E.P. et al. **A collagen-binding protein in the endoplasmic reticulum of myoblasts exhibits relationship with serine protease inhibitors.** Journal of Biological Chemistry, v.266, 1991.

CUBERT, R. **Osteogenesis Imperfecta: Mode of Delivery and Neonatal Outcome.** Obstetrics & Gynecology, v.97, n.1, p.66-69, 2001.

DE VOS, A. et al. **Two pregnancies after preimplantation genetic diagnosis for osteogenesis imperfecta type I and type IV.** Human genetics, v.106, p.605-613, 2000.

DE WET,W. et al. **Organization of the human pro-alpha-2(I) collagen gene.** Journal of Biological Chemistry, v.262,1987.

DRÖGEMÜLLER, C. et al. **A Missense Mutation in the *SERPINH1* Gene in Dachshunds with Osteogenesis Imperfecta.** Plos Genetics, v.5, n.7, p.1-9, 2009.

FANO,V. et al. **Osteogenesis imperfecta. Evaluación clínica, funcional y multidisciplinaria de 65 pacientes.** Anales de Pediatría, 2010.

FORLINO, A.; MARINI, J.C. **Osteogenesis Imperfecta: Prospects for Molecular Therapeutics.** Molecular Genetics and Metabolism, v.71, p.225-232, 2000.

FUJITA, K.; SILVER, J. **Single-strand Conformational Polymorphism.** Genome Research, v.4, p.137-140, 1994

GACHET,E. et al. **Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR : a brief review of methodologies available.** Trends in food science and technology, 2000.

GAJKO-GALICKA, A. **Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans.** Acta Biochimica Polonica, v.48, n.2, p.433-441, 2002.

GALICKA, A.; WOLCZYNSKI, S.; GINDZIENSKI, A. **Studies on type I collagen in skin fibroblasts cultured from twins with lethal osteogenesis imperfecta.** Acta Biochimica Polonica, v.50, n.2, p.481-488, 2003.

GAO et al. **Molecular cloning, structure, expression, and chromosomal localization of the human Osterix (SP7) gene.** Gene, v.341, p.101-110, 2004.

GARNERO, P. et al. **Bone turnover and type I collagen C-telopeptide isomerization in adult osteogenesis imperfecta: Associations with collagen gene mutations.** Bone, v.44, p. 461-466, 2009.

GLORIEUX, F.H. **Osteogenesis Imperfecta.** Best Practice & Research Clinical Rheumatology, v.22, n.1, p.85-100, 2008.

HAYASHI, K. **PCR-SSCP: A Simple and Sensitive Method for Detection of Mutations in the Genomic DNA.** Genome Research, v.1, p.34-38, 1991.

HUBER, M.A. **Osteogenesis Imperfecta.** Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology, v.103,n.3, p.314-320, 2007.

HUMAN MOLECULAR MUTATION DATABASE. Disponível em <<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/>>. Acesso em 03 de janeiro de 2011.

IKEGAWA,S. et al. **Isolation, characterization and chromosomal assignment of human colligin-2 gene (CBP2).** Cytogenetics and Cell Genetics, v.71, p.182-186, 1995.

JARNUM, S. et al. **LEPREL1, a novel ER and Golgi resident member of the Leprecan family.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v.317, p342-351, 2004.

JOHNSON, M.T. **A variant of osteogenesis imperfecta type IV with resolving kyphomelia is caused by a novel COL1A2 mutation.** Journal of Medical Genetics, v.39, p.128-132, 2002.

KATAOKA, K. **Mutations in type I collagen genes in Japanese osteogenesis imperfecta patients.** Pediatrics International, v.49, p.564-569, 2007.

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 Imperfecta Type I: Identification of Common Sequences of Null-Allele Mutations.** American Journal of Human Genetics, v.62, p.98-110, 1998.

LEE, K.S. **Mutational Spectrum of Type I Collagen Genes in Korean Patients With Osteogenesis Imperfecta.** Human Mutation, 2006.

LIN, Y. et al. **Clinical Features of Osteogenesis Imperfecta in Taiwan.** Journal of the Formosan Medical Association, v.108, n.7, p.570-576, 2009.

LINDAHL, K. et al. **Allele dependent silencing of COL1A2 using small interfering RNAs.** International Journal of Medical Sciences, v.5, p.361-365, 2008.

LOWENSTEIN, E.J. **Osteogenesis imperfecta in a 3,000-year-old mummy.** Childs Nervous System, v.25, p.515-516, 2009.

MAKAREEVA, E. et al. **Molecular Mechanism of $\alpha 1(I)$ -Osteogenesis Imperfecta/Ehlers-Danlos Syndrome.** The Journal of Biological Chemistry, v.281, n.10, p.6463-6470, 2006.

MARINI, J.C. et al. **Consortium for Osteogenesis Imperfecta Mutations in the Helical Domain of Type I Collagen: Regions Rich in Lethal Mutations Align With Collagen Binding Sites for Integrins and Proteoglycans.** Human Mutation, v.28, n.3, p.209-221, 2007.

MARINI, J.C.; CABRAL, W.A.; BARNES, A.M. **Null mutations in *LEPRE1* and *CRTAP* cause severe recessive osteogenesis imperfecta.** Cell and Tissue Research, v.339, p.59-70, 2010.

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.

MUNDLOS, S. et al. **Multiexon Deletions in the Type I Collagen *COL1A2* Gene in Osteogenesis Imperfecta Type IB.** The Journal of Biological Chemistry, v.271, n.35, p.21068-21074, 1996.

NAKASHIMA, K. et al. **The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation.** Cell, v.108, p.17-29, 2002.

NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 04 de janeiro de 2011.

NEW ENGLAND BIOLABS NEBCUTTER V2.0. Disponível em <<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>>. Acesso em setembro de 2010.

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

PATTERSON, C.E. et al. **Developmental regulation of FKBP65: an ER localized extracellular matrix-binding protein.** Molecular Biology of the Cell, v.11, p.3925-3935, 2000.

PLOTKIN, H. et al. **Pamidronate Treatment of Severe Osteogenesis Imperfecta in Children under 3 Years of Age.** The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v.85, n.5, p.1846-1850, 2000.

PRICE, E.R. et al. **Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence.** Proceedings of the national academy of sciences, v.88, p.1903-1907, 1991.

PRIMER3. Disponível em <<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>>. Acesso em 04 de abril de 2009.

ROSCHGER, P. et al. **Evidence that Abnormal High Bone Mineralization in Growing Children with Osteogenesis Imperfecta is not Associated with Specific Collagen Mutations.** Calcified Tissue International, v.82, p.263-270, 2008.

ROUGHLEY, P.J.; RAUCH, F.; GLORIEUX, F.H. **Osteogenesis Imperfecta. – Clinical and Molecular Diversity.** European Cells and materials, v.5, p.41-47, 2003.

SANGUINETTI, C.J.; NETO, E.D.; SIMPSON, A.J.G. **Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels.** Biotechniques, v.17, n.5, p.915-919, 1994.

SANTILI, C. **Avaliação clínica, radiográfica e laboratorial de pacientes com Osteogênese Imperfeita.** Revista da associação médica Brasileira, v.51, n.4, p.214-220, 2005.

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

SPINARDI, L.; MAZARS, R.; THELLET, C. **Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP.** Nucleic Acids Research, v.19, n.14, 1991.

TROMP, G. et al. **Structure of a full-length cDNA clone for the prepro-alpha-1(I) chain of human type I procollagen.** Biochemical Journal, v.253, p.919-922, 1988.

VAN DIJK, F.S. et al. **Classification of Osteogenesis Imperfecta.** European Journal of Medical Genetics, 2009.

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

VENTURI, G. et al. **Osteogenesis imperfecta: clinical, biochemical and molecular findings.** Clinical Genetics, v.70, p.131-139, 2006.

VRANKA, J.A. et al. **Prolyl 3-hydroxylase 1 null mice display abnormalities in fibrillar collagen-rich tissues such as tendons, skin and bones.** The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2010.

WILLING, M.C. et al. **Osteogenesis Imperfecta Type 1: Molecular Heterogeneity for COL1A1 Null Alleles of Type I Collagen.** American Journal of Human Genetics, v.55, p.638-647, 1994.

YONEYAMA, T. et al. **Collagen Type I α 2 (COL1A2) Is the Susceptible Gene for Intracranial Aneurysms.** Stroke, 2003.

9

Apêndices

APÊNDICE A
CARTA DE APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
HOSPITAL INFANTIL NOSSA SENHORA DA GLÓRIA
SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, 15 de dezembro de 2009.


Do : Prof. Dr. Valmin Ramos da Silva
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória

Para: Flavia de Paula
Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **“Estudo genético do Gene COL1 A2 em pacientes com osteogênese imperfeita do Estado do Espírito Santo”**.

Senhora pesquisadora

Informamos à Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Nossa da Glória, após analisar o Projeto de Pesquisa , nº de **Registro no CEP-60/2009**, intitulado: **“Estudo genético do Gene COL1 A2 em pacientes com osteogênese imperfeita do Estado do Espírito Santo”**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos da instituição onde o projeto será realizado, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 08292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido projeto, em Reunião ordinária realizada em 15 de dezembro de 2009.

Gostariamos de lembrar que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra “c”

Atenciosamente

Prof. Dr. Valmin Ramos da Silva
Coordenador do CEP-HINSG

APÊNDICE B
FICHA DE INCLUSÃO DE PACIENTES À PESQUISA

“Estudo Genético da região inicial do gene *COL1A2* em pacientes com Osteogênese Imperfeita da cidade de Vitória, Espírito Santo”

Data do atendimento: ____/____/____

1. REGISTRO:

Laboratório: _____ HINSG: _____

2. DADOS PESSOAIS DO PACIENTE:

Nome: _____
 Data de nascimento: ____/____/____ Idade atual: ____ Sexo: () Masculino () Feminino
 Nome da mãe: _____
 Data de nascimento: ____/____/____
 Nome do pai: _____
 Data de nascimento: ____/____/____
 Parto: _____

3. DADOS CLÍNICOS DO PACIENTE:

Peso: _____ Altura: _____ Percentil: _____ Circunferência da cabeça: _____
 Formato do crânio: _____
 Problemas cardíacos: _____

3.1 TRATAMENTO

Data de início do tratamento: ____/____/____ Idade de início do tratamento: _____

3.2 FRATURAS

Número total de fraturas: _____ Idade da 1ª fratura: _____
 Número de fraturas antes do início do tratamento: _____
 Número de fraturas depois do início do tratamento: _____

3.3 DEFORMIDADE DE OSSOS LONGOS:

() Normal () Leve () Moderada () Grave

Hipermobilidade das articulações: _____

Deformidade da espinha: _____

3.4 DENTIÇÃO () Normal () Dentinogênese imperfeita

3.5 VISÃO () Normal () Comprometida () Arco senil prematuro

3.6 ESCLERA () Normal () Azul ao nascer () Azul permanentemente

3.7 AUDIÇÃO () Normal () Comprometida () Surdez total

3.8 DEAMBULAÇÃO

() Normal () Só engatinha () Apoio – bengala () Cadeira de rodas

4. TIPO DE OI DIAGNOSTICADO:

*Comentários adicionais: _____
