



KARINA DA COSTA SILVEIRA

**ESTUDO DAS MUTAÇÕES NO GENE *COL2A1* EM UMA COORTE  
DE PACIENTES COM DISPLASIAS ESQUELÉTICAS DO GRUPO  
COLAGENOPATIA TIPO II SEGUNDO CRITÉRIOS CLÍNICO-  
RADIOLÓGICOS**

Campinas

2014





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

KARINA DA COSTA SILVEIRA

**ESTUDO DAS MUTAÇÕES NO GENE *COL2A1* EM UMA COORTE  
DE PACIENTES COM DISPLASIAS ESQUELÉTICAS DO GRUPO  
COLAGENOPATIA TIPO II SEGUNDO CRITÉRIOS CLÍNICO-  
RADIOLÓGICOS**

**Orientadora:** Profa. Dra. Denise Pontes Cavalcanti  
**Co-Orientadora:** Dra. Luciana Cardoso Bonadia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA KARINA DA COSTA SILVEIRA E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. DENISE PONTES CAVALCANTI.

-----  
Assinatura do Orientador

Campinas

2014

iii

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si39e Silveira, Karina da Costa, 1989-  
Estudo de mutações no *COL2A1* em uma coorte de pacientes com displasias esqueléticas do grupo colagenopatia tipo 2 segundo critérios clínico-radiológicos / Karina da Costa Silveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Denise Pontes Cavalcanti.  
Coorientador: Luciana Cardoso Bonadia.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Osteocondrodismplasias. 2. Colágeno tipo II. I. Cavalcanti, Denise Pontes, 1957-. II. Bonadia, Luciana Cardoso, 1977-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Study of mutations in the *COL2A1* gene in a cohort of patients with skeletal dysplasias of type 2 collagenopathy group according to clinical and radiological criteria

**Palavras-chave em inglês:**

Osteochondrodysplasias

Type II collagen

**Área de concentração:** Ciências Biomédicas

**Titulação:** Mestra em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Denise Pontes Cavalcanti [Orientador]

Juan Clinton Llerena Junior

Konradin Metze

**Data de defesa:** 28-02-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

## BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

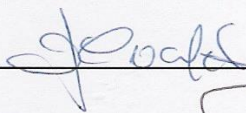
KARINA DA COSTA SILVEIRA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). DENISE PONTES CAVALCANTI

Co-orientador (a) PROF(A). DR(A). LUCIANA CARDOSO BONADIA

### MEMBROS:

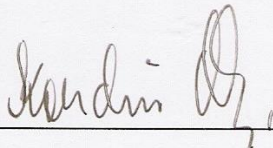
1. PROF(A). DR(A). DENISE PONTES CAVALCANTI



2. PROF(A). DR(A). JUAN CLINTON LLERENA JUNIOR



3. PROF(A). DR(A). KONRADIN METZE



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 28 de fevereiro de 2014



*Dedico este trabalho aos meus pais que tanto me incentivaram e apoiaram durante esses anos. Sem eles, nada disso se concretizaria.*

*Karina Silveira*





---

## AGRADECIMENTOS

---

Gostaria de agradecer a todos que, de alguma forma, participaram e tornaram esses meus dois anos de mestrado os anos mais agradáveis da minha vida:

Aos meus pais, **Maria Antonia e Carlos Alberto**, que tanto fizeram por mim e que sofreram com a minha ausência todos esses anos. Serei eternamente grata a vocês.

Ao meu irmão, **Thiago**, e à toda família linda que ele construiu, que muitas vezes foram a razão da minha ida para casa.

À **Denise Cavalcanti**, minha orientadora, que com toda calma e paciência me orientou de uma maneira impecável e incentivou meu crescimento nesses dois anos.

À **Luciana Bonadia**, minha coorientadora, que me ensinou os primeiros passos no laboratório de biologia molecular. Obrigada pelo apoio (profissional e emocional) e por me ensinar de uma maneira tão crítica como fez. Todos os dias aprendo algo novo com você.

Às meninas da Genética Perinatal, **Carolina Moreno e Elaine Mendes**. Obrigada por todas as explicações e esclarecimentos.

À **Cynthia Silveira**, que nos últimos segundos estava ali, sempre preparada a me ajudar. Você possui uma capacidade enorme. Boa sorte nessa sua nova etapa.

Às minhas amigas, **Marcella Baptista e Thatiane Kanazawa**, pelos cafés, as conversas e por todas as horas extras que fizemos nesses anos. Vocês foram peças fundamentais nesse trabalho.

Aos meus amigos **Alexandre Hilário, Renato Oliveira, Simoni Avansini, Fernando Marson, Fernanda Reis, Bruno (Bozena), Emília, Olga, Clayton, Luciana Rezende e Thiago Peluzzo**. De alguma maneira, vocês fizeram parte disso.

Um agradecimento especial, ao **Fábio Rossi** e à **Marina Gonsales** por todo o tempo e calma que tiveram para me ensinar.

À todos os grupos colaboradores da rede de Displasias Esqueléticas.

Ao meu namorado, **Bruno Marques**, por todas as noites que me incentivou a estudar/escrever. Obrigada pelo apoio e por todos os cafés que fez que mim.

À todos do **Laboratório de Genética Médica**. Um lugar maravilhoso para se trabalhar.

*Karina Silveira*

---

## SUMÁRIO

---

LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	XIII
LISTA DE TABELAS .....	XV
LISTA DE QUADROS .....	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	XIX
1 - <i>INTRODUÇÃO</i> .....	29
1.1. BREVE REVISÃO DE LITERATURA .....	31
1.1.1 COLÁGENO .....	31
1.1.2 COLÁGENO DO TIPO II .....	33
1.1.3 GENE <i>COL2A1</i> .....	34
1.1.4 DISPLASIAS ESQUELÉTICAS .....	37
1.1.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS COLAGENOPATIAS DO TIPO II .....	44
2 - <i>OBJETIVOS</i> .....	47
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	49
3 - <i>CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS</i> .....	51
3.1 CASUÍSTICA .....	53
3.2 MÉTODOS .....	54
3.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO .....	54
3.2.2 DESENHO DE <i>PRIMERS</i> .....	54
3.2.3 AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR .....	54
3.2.4 REAÇÃO DE EXO-STAR/ILLUSTRATM .....	57
3.2.5 SEQUENCIAMENTO POR ELETROFORESE EM CAPILAR (MÉTODO DE SANGER) .....	57
3.2.6 <i>QUANTITATIVE MULTIPLEX PCR OF SHORT FLUORESCENT FRAGMENTS (QMPSF)</i> .....	57
3.2.7 ESTUDO EM CONTROLES .....	58
3.2.8 ANÁLISES COMPUTACIONAIS .....	59
4 - <i>RESULTADOS</i> .....	61
4.1 ASPECTOS CLÍNICOS .....	63
4.2 ASPECTOS MOLECULARES .....	75
4.2.1 ACONDROGÊNESE DO TIPO II .....	78
4.2.2 DISPLASIA PLATISPONDILÍACA DO TIPO TORRANCE .....	79
4.2.3 HIPOCONDROGÊNESE .....	80
4.2.4 DISPLASIA ESPONDILOEPIFISÁRIA CONGÊNITA .....	80
4.2.5 DISPLASIA ESPONDILOMETAEPISÁRIA DO TIPO STRUDWICK .....	82
4.2.6 DISPLASIA DE KNIEST .....	82
4.2.7 OSTEOARTRITE FAMILIAL .....	82
4.2.8 SÍNDROME DE STICKLER .....	82
4.2.9 <i>COL2A1</i> .....	83
4.2.10 ESTUDO EM CONTROLES .....	84

4.2.11	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DAS MUTAÇÕES NOVAS.....	85
5	- <i>DISCUSSÃO</i> .....	87
5.1	AS MUTAÇÕES E OS VÁRIOS FENÓTIPOS .....	90
5.1.1	ACONDROGÊNESE DO TIPO II .....	90
5.1.2	DISPLASIA PLATISPONDILÍACA DO TIPO TORRANCE .....	91
5.1.3	HIPOCONDROGÊNESE.....	91
5.1.4	DISPLASIA ESPONDILOEPIFISÁRIA CONGÊNITA.....	92
5.1.5	DISPLASIA ESPONDILOMETAEPIFISÁRIA DO TIPO STRUDWICK.....	101
5.1.6	DISPLASIA DE KNIEST.....	101
5.1.7	OSTEOARTRITE FAMILIAL .....	102
5.1.8	SÍNDROME DE STICKLER.....	103
5.1.9	<i>COL2A1</i> .....	103
5.1.10	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104
6	- <i>CONCLUSÕES</i> .....	105
7	- <i>REFERÊNCIAS</i> .....	109
8	- <i>RECURSOS DA INTERNET</i> .....	121
9	- <i>ANEXOS</i> .....	125
10	- <i>APÊNDICES</i> .....	131

---

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

- Figura 1: Esquema representando domínio de tripla hélice flanqueado pelos domínios N- e C-propetídeo. [Adaptado de McAlinden & Majava *et al.*, 2008(5)]. ..... 32
- Figura 2: Síntese da molécula de colágeno desde o núcleo até a formação das fibras colágenas no tecido [Adaptado de (1)]. ..... 33
- Figura 3: Radiografias de pacientes com colagenopatias do tipo II, representando o padrão espondiloepifisário característico dessas colagenopatias. Radiografias do período neonatal dos pacientes 1, 3 e 10 com os fenótipos de acondrogênese do tipo II, hipocondrogênese e displasia espondiloepifisária congênita, respectivamente. .... 37
- Figura 4: Mutações no domínio C-propeptídeo descritas na literatura em pacientes com PLSD-T [Adaptado de Désir *et al.*, 2012 (20)]. ..... 40
- Figura 5: Representação esquemática da estrutura do colágeno do tipo II com a localização das regiões relacionadas a cada fenótipo [Modificado de Korkko *et al.*, 2003 (14)]. ..... 56
- Figura 6: Fluxograma da estratégia de pesquisa de mutações no gene *COL2A1*. ..... 56
- Figura 7: Condições para a realização da PCR com primers marcados. .... 58
- Figura 8: Apresentação simplificada da frequência dos tipos de mutações encontradas nos pacientes do estudo. .... 75
- Figura 9: Raio-x pós-óbito da paciente 2 na parte superior da figura. É possível observar um atraso de ossificação de coluna (cervical e sacral, encurtamento de ossos longos e ausência de púbis. Na parte inferior da figura, pode-se observar o sequenciamento do pai no eletroferograma A apresentando somente um pico de G e o sequenciamento do paciente no eletroferograma B apresentando a troca G>A em heterozigose. .... 78
- Figura 10: Esquema da alteração em sítio de splice, mostrando a formação do stop *códon* (em laranja) após 83 aminoácidos depois do éxon 36. A letra “a” em vermelho representa o nucleotídeo que foi trocado (G>A). .... 79
- Figura 11: À direita, foto e raio-X do paciente 5. Pode-se observar no raio-X um atraso de ossificação de coluna (cervical e sacral), encurtamento e discreto encurvamento de ossos longos, hipoplasia de púbis e comprometimento metafisário. .... 79
- Figura 12: À direita, foto e raio-X do paciente 6. Pode-se observar no raio-X um atraso de ossificação de coluna (cervical), platispondilia, encurtamento de ossos longos, atraso de ossificação de joelho e bacia em caracol. À esquerda, eletroferogramas do sequenciamento do paciente 6: A e B representam o sequenciamento dos dois alelos obtidos após a clonagem do éxon 54 do paciente 6 (A: alelo normal/ B: alelo com o códon ATT deletado). ..... 80

- Figura 13: Raio-x dos pacientes 7, 8 e 9 que apresentaram a mutação recorrente p.R989C. é possível observar nos raios-x de quadril dos paciente 7 e 9 uma *coxa vara*. No raio-X da paciente 8, ainda não é possível observar tão achado em razão da idade. Os pacientes também apresentam um envolvimento metafisário, encurtamento de ossos longos e acetábulo atípico. .... 81
- Figura 14: Fotos e raios-x dos pacientes 10 e 11 no período perinatal. Pode-se observar nos raios-x dos dois pacientes atraso de ossificação e coluna (sacral e cervical), encurtamento de ossos longos e hipoplasia de púbis. .... 81
- Figura 15: Esquema da alteração em sítio de splice do paciente 22, mostrando a formação do stop códon (em laranja) após 20 aminoácidos depois do éxon 31. A letra “a” em vermelho representa o nucleotídeo que foi trocado (G>A). .... 83
- Figura 16: Fotos e raio-X da paciente 13. Pode-se observar no raio-X à direita o quadril típico de colagenopatia do tipo II. .... 83
- Figura 17: Fotos clínicas e raio-X de coluna e quadril da paciente 27. É possível observar no raio-X o quadril típico de colagenopatia do tipo II. .... 84

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1: Tipos de mutações no gene <i>COL2A1</i> , de acordo com o banco de dados do HGMD.....	35
Tabela 2: Frequência das diferentes mutações de acordo com o banco de dados do HGMD. Em negrito as mutações que levam a troca do aminoácido glicina. ....	35
Tabela 3: Distribuição dos pacientes estudados, segundo o diagnóstico inicial. ....	53





---

## LISTA DE QUADROS

---

Quadro 1: Algoritmos utilizados para a análise <i>in silico</i> das mutações do tipo <i>missense</i> ....	60
Quadro 2: Características clínicas gerais dos pacientes com collagenopatias do tipo II estudados no presente trabalho. ....	64
Quadro 3: Alterações esqueléticas dos pacientes estudados no período neonatal.....	67
Quadro 4: Alterações esqueléticas dos pacientes do estudo na idade da última consulta. ...	70
Quadro 5: Características clínicas dos pacientes do estudo na idade da última consulta....	72
Quadro 6: Resultado do sequenciamento de todos os pacientes, ordenados de acordo com o diagnóstico final de cada um deles. ....	76
Quadro 7: Relação dos pacientes que apresentaram mutações inéditas e o número de cromossomos analisados em cada caso .....	85
Quadro 8: Relação das mutações que levam a troca do aminoácido glicina pelo o ácido aspártico com seus respectivos fenótipos e referência. ....	90



---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

ACGII	Acondrogênese do tipo II
Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Aspartato ou ácido aspártico
<i>COL2A1</i>	<i>Collagen, type II, alpha 1</i>
<i>COL11A1</i>	<i>Collagen, type XI, alpha 1</i>
<i>COL11A2</i>	<i>Collagen, type XI, alpha 2</i>
Cys (C)	Cisteína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DSC	Disespondiloencondromatose
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
FGFR3	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Glutamato
Gly (G)	Glicina
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
His (H)	Histidina
HPCG	Hipocondrogênese
Hyp	Hidroxi prolina
Ile (I)	Isoleucina
KND	Displasia de Kniest
LB	Luria-Bertani
Leu (L)	Leucina
Lys (L)	Lisina
Met (M)	Metionina
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
OCD	Osteocondrodisplasias
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Phe (P)	Fenilalanina
PLSD	Displasia esquelética platispondilíaca letal
PLSD-L	Displasia esquelética platispondilíaca letal do tipo Luton
PLSD-SD	Displasia esquelética platispondilíaca letal do tipo San Diego
Pro (P)	Prolina
PSD-T	Displasia platispondilíaca do tipo Torrance
QMPSF	<i>Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments</i>
R	Arginina

RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SED	Displasia espondiloepifisária
SEDC	Displasia espondiloepifisária congênita
SEDC-G	Displasia espondiloepifisária congênita grave
SEMD	Displasia espondiloepimetafisária
Ser (S)	Serina
SMD-A	Displasia espondilometafisária do tipo Algerian
SPD	Displasia espondiloperiférica
STL1	Síndrome de Stickler do tipo 1
STL2	Síndrome de Stickler do tipo 2
STL3	Síndrome de Stickler do tipo 3
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TD	Displasia tanatofórica
TD1	Displasia tanatofórica do tipo 1
TD2	Displasia tanatofórica do tipo 2
Thr (T)	Treonina
Trp (W)	Triptofano
Tyr (Y)	Tirosina
Val (V)	Valina



***RESUMO***



As displasias esqueléticas ou osteocondrodisplasias são doenças genéticas que afetam o crescimento e o desenvolvimento do tecido ósseo e cartilaginoso produzindo, em geral, baixa estatura. Mutações em heterozigose no gene *COL2A1* são responsáveis por uma série de displasias esqueléticas conhecidas como colagenopatias do tipo II que geralmente apresentam um padrão espondiloepifisário típico. Apesar das mutações no *COL2A1* serem, em geral, “privadas”, o estudo molecular desse gene em pacientes com fenótipos sugestivos de colagenopatia do tipo II pode contribuir seja para um melhor entendimento das colagenopatias do tipo II seja para refinar, quando possível, a correlação genótipo-fenótipo. O objetivo desse estudo foi investigar o gene *COL2A1* numa coorte de pacientes com fenótipo de colagenopatia do tipo II de modo a melhorar o conhecimento sobre essas colagenopatias. Foram estudados 33 pacientes com fenótipo de colagenopatia do tipo II. A análise molecular foi feita por sequenciamento automático bidirecional direto do gene *COL2A1*, começando pelos domínios relacionados a cada fenótipo seguido de sequenciamento completo das regiões codificantes do gene quando as primeiras foram negativas. Foram identificadas alterações potencialmente deletérias em heterozigose em 23 dos 33 pacientes (69,7%): 18 alterações do tipo *missense* (11 inéditas, 7 descritas), 4 alterações que alteram sítio de *splice* (2 inéditas, 2 descritas) e uma deleção inédita. Das mutações do tipo *missense* encontradas, duas foram recorrentes em 5 pacientes: p.G594E e p.R989C. Ambas as mutações recorrentes foram associadas a fenótipos graves: a p.R989C foi observada em displasia espondiloepifisária congênita (SEDC) grave enquanto que a p.G594E foi associada a 2 recém-nascidos com fenótipo de SEDC-letal. Para todas as mutações novas, a análise *in silico*, estudo em controles e/ou dos pais confirmaram a patogenicidade de todas elas. Concluindo, os resultados deste estudo permitiram a identificação de 14 mutações novas no gene *COL2A1* e um melhor refinamento da correlação genótipo-fenótipo.







***ABSTRACT***



Skeletal dysplasias are genetic disorders that affect the growth and development of the bone and cartilage tissues producing, in general, short stature. Heterozygous mutations in the *COL2A1* gene are responsible for a number of skeletal dysplasias that usually exhibit a pattern spondyloepiphyseal and are called type II collagenopathies. Although the mutations in *COL2A1* are usually private, molecular studies of this gene in patients with suggestive phenotypes can contribute to a better understanding of the type II collagenopathies. The aim of this study was to sequence the *COL2A1* in a cohort of patients with type II collagenopathy phenotypes in order to refine the knowledge regarding the genotype-phenotype correlation. Thus, 33 patients with suggestive phenotype were studied. The molecular analysis was performed by automated Sanger bidirectional sequencing of the *COL2A1* gene, starting with the domains related to each phenotype followed by whole sequencing of the gene coding regions when the first ones were negative. Potentially deleterious changes in heterozygosity were identified in 23 of 33 patients (69.7 %): 18 missense changes (11 undescribed), 4 changes that modify the splice site (2 undescribed) and a new deletion. The pathogenicity of the undescribed changes were confirmed by in silico analysis, study of control individuals and/or of the respective parents. Among the found missense mutations, two were recurrent and associated with severe phenotypes. These mutations, p.G594E and p.R989C, were found in five patients. The R989C change was observed in three children presenting a phenotype of spondyloepiphyseal dysplasia congenita (SEDC), which follow up showed a pattern of severe SEDC featured by severe disproportioned short stature with coxa vara and kyphoscoliosis. The G594E change was associated with two newborns presenting also a SEDC phenotype, however with lethal evolution. In conclusion, the results of this study allowed the identification of 14 new mutations in *COL2A1* gene and a better refinement of the genotype-phenotype correlation.



# 1 - *INTRODUÇÃO*



As displasias esqueléticas ou osteocondrodisplasias (OCD) são doenças genéticas que afetam o crescimento e o desenvolvimento do tecido ósseo e cartilaginoso produzindo, em geral, alterações do crescimento e contribuindo para a morbi-mortalidade infantil. Essas condições são classificadas em grupos ou famílias de acordo com suas semelhanças fenotípicas (clínicas e radiológicas) e bases moleculares.

Entre as famílias de OCD, o grupo do colágeno II inclui 11 fenótipos diferentes que formam um espectro de gravidade variando de casos letais como a acondrogênese tipo II e a hipocondrogênese até casos mais leves como a displasia de Stickler.

Mutações em heterozigose no gene *COL2A1*, portanto, são responsáveis por esse conjunto de distintos fenótipos. Essas alterações são desencadeadas por um mecanismo negativo dominante através da presença do colágeno tipo II estruturalmente anormal na matriz extracelular e em sua maioria ocorrem no domínio de tripla hélice do colágeno II.

Até o momento já foram descritas 400 mutações relacionadas às colagenopatias do tipo II. Entretanto, a correlação genótipo-fenótipo observada até agora não é específica, apesar de já existirem determinadas regiões do gene *COL2A1* preferencialmente associadas com fenótipos específicos. Do ponto de vista clínico-radiológico, embora a maioria das colagenopatias do tipo II possa ser reconhecida ao nascimento, ou suspeitada durante o pré-natal por exames de imagem, nem sempre o diagnóstico definitivo pode ser alcançado no período neonatal ou na primeira infância, fazendo-se necessário o estudo molecular.

A finalidade desse projeto foi investigar uma coorte de pacientes com fenótipo de colagenopatia do tipo II por meio do sequenciamento direto do gene *COL2A1* de modo a contribuir para um melhor conhecimento da correlação genótipo-fenótipo dessa OCD.

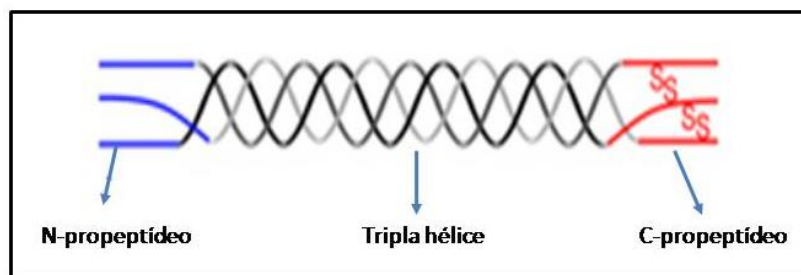
## **1.1. Breve revisão de literatura**

### **1.1.1 Colágeno**

O colágeno é uma proteína estrutural abundante em todos os animais e constitui uma família de proteínas com aproximadamente 28 tipos diferentes (1). Estas proteínas estão distribuídas por todo o corpo e são caracterizadas com base nas suas propriedades em tecidos específicos (2). Os diferentes tipos de colágenos podem ser classificados como: colágenos fibrilares, colágenos associados a fibrilas, colágenos de ancoragem, colágenos de membrana basal e colágenos com domínio transmembrana (1).

Uma característica marcante do colágeno é a sua estrutura formada por três cadeias polipeptídicas helicoidais [cadeias alfa ( $\alpha$ )], formando uma estrutura de tripla hélice em cujas cadeias predominam o aminoácido glicina (Gly) (3). Cada uma das três cadeias é formada por uma sequência repetitiva do tripleto Gly-X-Y, onde X e Y podem ser qualquer aminoácido. Os aminoácidos mais comuns nas posições X e Y são prolina (28%) e hidroxiprolina (38%), respectivamente. Assim, Gly-Pro-Hyp é o tripleto mais comum (10,5%) no colágeno (1). A repetição Gly-X-Y ocorre em todos os tipos de colágeno, embora seja interrompido em determinados locais dentro do domínio tripla hélice em colágeno não-fibrilares(1,3). A glicina, por ser o menor dos aminoácidos, é a única unidade compacta o suficiente para ocupar a posição axial da hélice, portanto, as mutações que substituem essas glicinas por outros aminoácidos são altamente desorganizadoras da estrutura helicoidal (4).

O domínio tripla hélice constitui a maior parte da proteína e é flanqueado por domínios não colagenosos N- e C- terminal. O domínio C-terminal, denominado C-propeptídeo (ou condrocalcina), é essencial para associação da cadeia e subsequente formação da tripla hélice (Figura 1) (2,5).



**Figura 1:** Esquema representando domínio de tripla hélice flanqueado pelos domínios N- e C-propeptídeo. [Adaptado de McAlinden & Majava *et al.*, 2008(5)].

Em animais, as triplas hélices individuais, conhecidas como tropocolágeno, adotam uma forma complexa que conduz finalmente às fibras e redes microscópicas observadas no tecido ósseo e nas membranas basais (1).

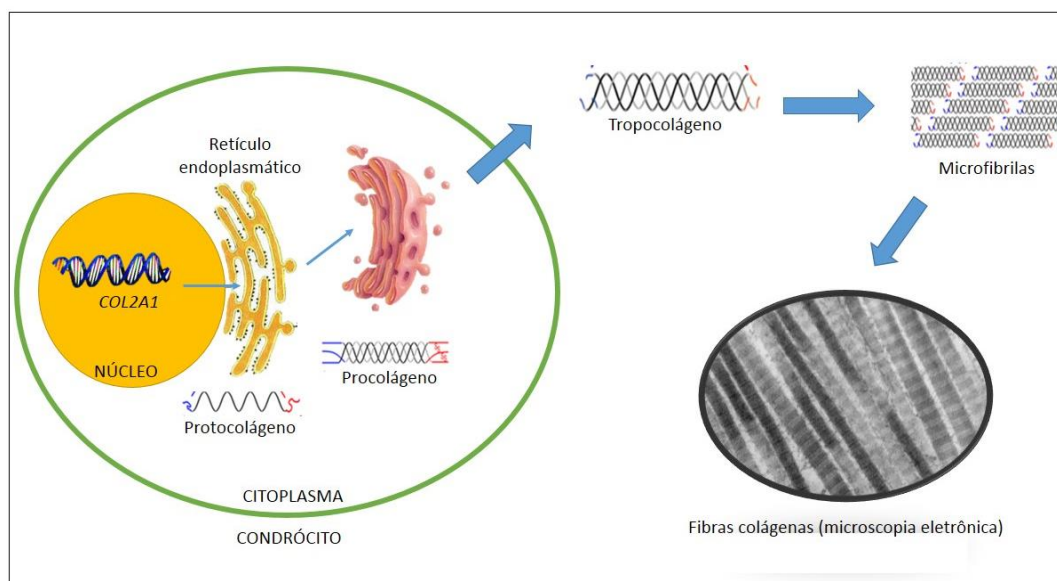
As moléculas de colágenos dos tipos II, IX e XI constituem os principais componentes da matriz extracelular da cartilagem hialina e do humor vítreo e estão estrutural e funcionalmente associadas (6,7).



### 1.1.2 Colágeno do tipo II

O colágeno do tipo II é o principal colágeno encontrado no humor vítreo adulto, cartilagem e núcleo pulposos do disco intervertebral de adultos e representa aproximadamente 70 a 90% de todos os colágenos nesses tecidos. (2).

O colágeno do tipo II, considerado um colágeno intersticial, é sintetizado inicialmente como uma molécula de protocólágeno (Figura 2), que se reúne em trímeros dentro da célula, onde é secretado e então processado extracelularmente, resultando na forma final da proteína. Cada cadeia  $\alpha$  é formada a partir de um peptídeo precursor na forma de um polipeptídeo pré-pró-colágeno. Essas moléculas precursoras contêm porções em cada extremidade chamadas peptídeos de registro e uma área adicional chamada de peptídeo sinal. O local da montagem do peptídeo sinal é removido resultando na molécula de polipeptídeo procolágeno. Três dessas moléculas estão interligadas como uma tripla hélice para formar o procolágeno. Por fim, o peptídeo registro é removido, resultando em uma molécula de colágeno intacta existente como uma hélice tripla com cada cadeia sendo composta por uma seqüência repetitiva (Gly-X-Y) (2).



**Figura 2:** Síntese da molécula de colágeno desde o núcleo até a formação das fibras colágenas no tecido [Adaptado de (1)].

Depois de secretado para o espaço extracelular, os domínios não colagenosos em ambos os terminais são clivados por proteinases específicas, resultando em moléculas maduras de colágeno II e formação da fibrila (2,5).

Na cartilagem, o colágeno do tipo II é sintetizado por condrócitos, principalmente, na zona hipertrófica da placa de crescimento (8,9). Nos olhos, o colágeno do tipo II é o maior componente das fibrilas vítreas, é sintetizado pela retina e fornece rigidez e força ao humor vítreo dos olhos (10).

As cadeias  $\alpha$  que formam o pro-colágeno do tipo II são codificadas pelo gene *COL2A1* (COL = *collagen*; 2 = Tipo II, A1 = peptídeo  $\alpha$ 1) (11,12).

### 1.1.3 Gene *COL2A1*

O *COL2A1* é um gene relativamente grande e complexo com 54 éxons que codifica uma proteína de 1487 aminoácidos (13,14). Esse gene está localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q13.11) e, apesar de possuir 9 transcritos, somente dois deles codificam uma proteína (Ensembl).

#### 1.1.3.1 Mutações no *COL2A1*

A primeira mutação no gene *COL2A1* foi descrita em 1989 em uma família de indivíduos portadores de SEDC (15). Hoje existem aproximadamente 400 mutações descritas, de acordo com o banco de dados HGMD®, em heterozigose (16).

As proteínas compostas por subunidades, como o colágeno do tipo II, são frequentemente sujeitas a mutações que impedem a associação dessas subunidades (4). A variação fenotípica nas doenças do *COL2A1* surgem a partir de uma variedade de mecanismos moleculares diferentes incluindo mutações dentro de éxons com diferentes efeitos de várias substituições de aminoácidos e também mutações em sítio de *splice* resultando em diferentes transcritos (Apêndice 1) (17).

De acordo com o banco de dados do HGMD®, mutações *missense e nonsense*, representam aproximadamente 56% de todas as mutações no gene *COL2A1* (Tabela 1).

**Tabela 1:** Tipos de mutações no gene *COL2A1*, de acordo com o banco de dados do HGMD.

<b>Tipo de mutação</b>	<b>Frequência (%)</b>
<i>Missense/Nonsense</i>	56,01
Pequenas deleções	18,51
Mutação em sítio de <i>splice</i>	15,74
Pequenas inserções	4,16
Grandes deleções	2,77
Pequenas <i>indels</i>	1,85
Grandes deleções/duplicações	0,46
Rearranjos complexos	0,46

O aminoácido cisteína normalmente não é encontrado no domínio tripla hélice dos genes que formam o colágeno fibrilar (18). A maioria das mutações (Tabela 2) no *COL2A1* são substituições que alteram o códon glicina nas repetições do triplete Gly-X-Y por outros códon, representando cerca de 67,50% das mutações. Apenas algumas mutações não-glicina no triplete Gly-X-Y têm sido descritas e entre elas a substituição de arginina para cisteína e arginina para um *stop* códon são as mais frequentes (18) e podem resultar em fenótipos específicos (12).

**Tabela 2:** Frequência das diferentes mutações de acordo com o banco de dados do HGMD. Em negrito as mutações que levam a troca do aminoácido glicina.

<b>Mutação</b>	<b>Frequência (%)</b>
<b>Gly-&gt;Ser</b>	18,33
<b>Gly-&gt;Asp</b>	13,33
<b>Gly-&gt;Arg</b>	12,50
<b>Gly-&gt;Val</b>	8,33
Arg->Term	8,33
Arg->Cys	5,00
<b>Gly-&gt;Glu</b>	5,00
<b>Gly-&gt;Ala</b>	4,17
<b>Gly-&gt;Cys</b>	4,17
Gln->Term	3,33
Cys->Term	2,50
Trp->Term	1,67
Met->Ile	0,83
Ser->Term	0,83
Cys->Tyr	0,83
<b>Gly-&gt;Term</b>	0,83
Leu->Phe	0,83
Glu->Term	0,83
Arg->Gly	0,83
<b>Gly-&gt; Gly</b>	0,83
Tyr->Asn	0,83
Thr->Asn	0,83
Tyr->Cys	0,83
Thr->Met	0,83
Thr->Pro	0,83
Ile->Thr	0,83
Asp->His	0,83
Cys->Gly	0,83

Mutações *missense* afetam a ossificação endocondral devido ao mecanismo dominante negativo que leva à montagem de cadeias  $\alpha$  anormais do colágeno na matriz extracelular causando fenótipos variados. Mutações de truncamento são conhecidas por causar haploinsuficiência através do decaimento de mRNA ou por geração de proteínas truncadas carentes do pró-peptídeo carboxi necessário para a associação e incorporação do homotrímero (18,19).

Existem duas isoformas do colágeno do tipo II: tipo IIA e tipo IIB. O tipo IIA representa a forma longa que inclui o éxon dois (54 éxons) e que é expresso, principalmente no humor vítreo e o tipo IIB representa a forma mais curta isenta do éxon 2 (53 éxons) que é predominantemente encontrado na cartilagem adulta (2). Estas duas formas ocorrem devido ao *splicing* alternativo do gene *COL2A1*, um mecanismo celular através do qual nem todos os éxons do gene são processados para a formação de uma proteína final. Este processo produz um conjunto de RNAm que codifica uma família de proteínas relacionadas que são muitas vezes tecido específico. O *splicing* alternativo parece ter um papel importante na integridade do condrocito. O éxon 2 codifica um domínio rico em cisteína no domínio N-terminal pro-colágeno II e, estudos anteriores sugeriram que este domínio da proteína pode funcionar na regulação da atividade do fator de crescimento durante o desenvolvimento (2,5,7). Baseado na informação de que o éxon 2 não é expresso em cartilagem adulta e de que possuiu uma expressão transitória no embrião, os pacientes com mutação no éxon 2 normalmente apresentam manifestações clínico-radiológicas mais leves (2).

#### 1.1.3.2 Mosaicismo no *COL2A1*

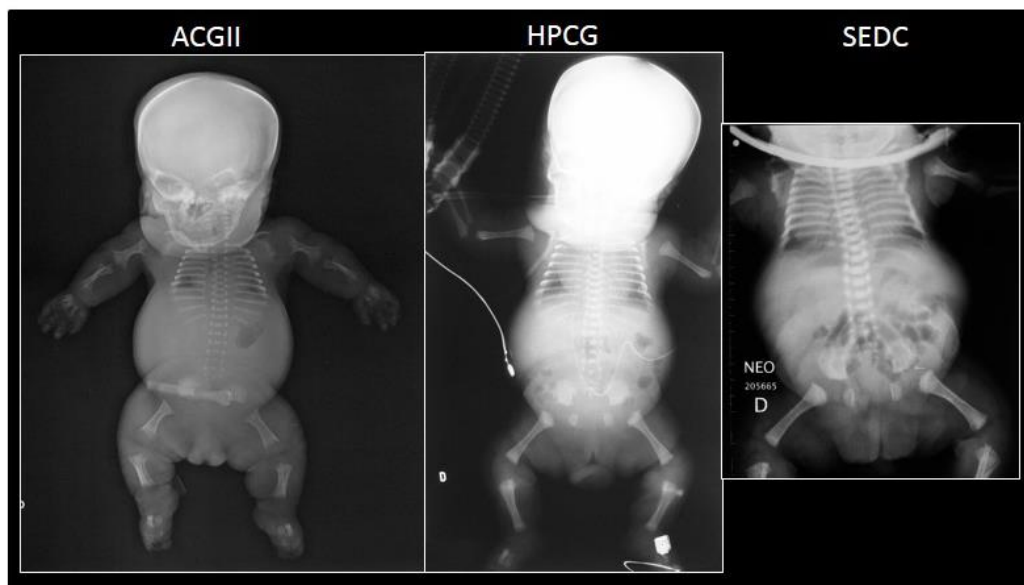
Mosaicismo no gene *COL2A1* é considerado raro, visto que existem poucos casos na literatura (17), seja o mosaicismo germinativo ou o mosaicismo somático. Pacientes com mosaicismo somático, normalmente, apresentam um fenótipo mais leve e a recorrência entre os filhos é aumentada (17,20,21). No mosaicismo germinativo, mais difícil de identificar do que o mosaicismo somático, o indivíduo com o fenótipo obviamente normal só é identificado quando há recorrência de colagenopatias do tipo II nos filhos (22). A importância da identificação do mosaicismo germinativo, portanto, é para a orientação familiar no aconselhamento genético.

### 1.1.4 Displasias esqueléticas

As displasias esqueléticas ou osteocondrodisplasias (OCD) correspondem a um grupo de doenças geneticamente determinadas que apresenta grande heterogeneidade clínica e etiológica e compromete sobretudo o crescimento e desenvolvimento esquelético (23). Na maioria das vezes, as OCD alteram o crescimento dos ossos longos devido à perturbação da ossificação endocondral na placa de crescimento (16). A maioria dessas doenças é rara, mas no seu conjunto são relativamente frequentes com uma prevalência ao nascimento avaliada em torno de 3,2/10.000 (23,24).

#### 1.1.4.1 Colagenopatias do tipo II

As colagenopatias do tipo II (OMIM#120140) são caracterizadas por alterações que comprometem o sistema esquelético, olhos, região orofacial e audição produzindo fenótipos dentro de um espectro amplamente variável. Devido à grande distribuição do colágeno do tipo II na cartilagem, o sistema esquelético é o mais comprometido, sendo uma das principais características destas doenças o envolvimento predominante de corpos vertebrais e epífises de ossos longos (padrão espondiloepifisário) (Figura 3) com relativa preservação das metáfises (25).



**Figura 3:** Radiografias de pacientes com colagenopatias do tipo II, representando o padrão espondiloepifisário característico dessas colagenopatias. Radiografias do período neonatal dos pacientes 1, 3 e 10 com os fenótipos de acondrogênese do tipo II, hipocondrogênese e displasia espondiloepifisária congênita, respectivamente.

De acordo com a última Nosologia e Classificação das Doenças Esqueléticas de origem genética (26), os fenótipos clínicos comuns destas doenças incluem: Acondrogênese do tipo 2 (ACG2; OMIM 200610); displasia platispondilíaca do tipo Torrance (OMIM 151210); hipocondrogênese (HPCG; OMIM 200610); displasia espondiloepifisária congênita (SEDC; OMIM 183900); displasia espondiloepimetáfisária do tipo Strudwick (SEMD tipo Strudwick; OMIM 184250); displasia de Kniest (OMIM 156550); displasia espondiloperiférica (OMIM 271700); SED leve com artrose de início precoce, SED com encurtamento dos metatarsos (Síndrome de Czech; OMIM 609162) e Síndrome de Stickler do tipo I (STL-1; OMIM 108300) (26).

O diagnóstico das colagenopatias do tipo II se baseia, essencialmente, em critérios clínicos e radiológicos. O diagnóstico clínico pode ser reforçado por demonstração de alterações histológicas típicas nas zonas de ossificação endocondral, nos casos letais (27).

#### 1.1.4.1.1 Acondrogênese do tipo II

Acondrogênese do tipo II (OMIM 200610) é uma displasia esquelética letal e é a mais grave do espectro das colagenopatias do tipo II (20). Ela é caracterizada por micromelia grave, cabeça relativamente grande, tórax pequeno, abdome protuberante e fenda palatina. Radiologicamente, pacientes com ACGII apresentam ossificação retardada de corpos vertebrais, principalmente em regiões cervical e sacral em associação com encurtamento de ossos longos e pélvis hipoplásica com púbis geralmente não ossificado (20,22).

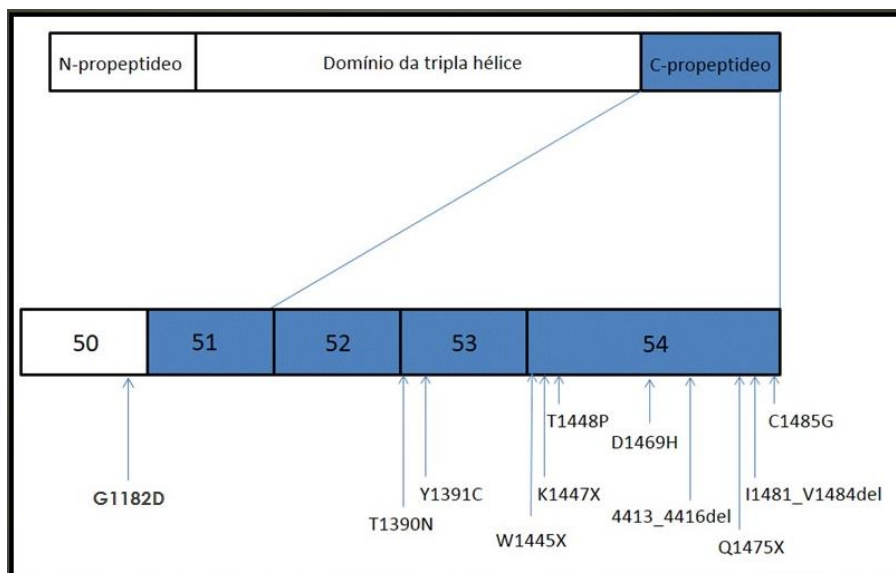
Sabe-se que a ACGII é causada, exclusivamente, por mutações no gene *COL2A1*. Até o momento foram descritas 21 mutações em pacientes com ACGII, 20 dessas mutações com a troca da glicina por um aminoácido mais volumoso e a maioria delas estão localizadas no domínio tripla hélice (20,22,28–33). De acordo com o banco de dados do HGMD, somente uma mutação não-glicina relacionada ao fenótipo de ACGII foi descrita: p.T1390N(30).

#### 1.1.4.1.2 Displasia platispondilíaca do tipo Torrance

PLSD-T é uma displasia esquelética rara descrita pela primeira vez por Horton *et al.* em 1979. Suas características radiológicas incluem platispondilia geralmente grave, tórax estreito, hipoplasia grave de ílio, ossos longos extremamente curtos com metáfises irregulares (34,35). A histologia condro-óssea é caracterizada por regiões de hiper celularidade com condrócitos ligeiramente grandes na zona de reserva da placa de crescimento e estrutura normal com incorporação de cartilagem em osso na junção condro-óssea. Esses achados radiológicos e histológicos são usados para discriminar de outras displasias esqueléticas letais ou semiletais (35).

Morte perinatal é frequente, normalmente devido à hipoplasia torácica (34). Entretanto, recentemente, fenótipos não letais dessa doença com melhor ossificação de corpos vertebrais têm sido descritos na literatura (35–39). Estas observações levantam a questão se a PLSD-T representa uma entidade única com um espectro clínico amplo ou um grupo heterogêneo de doenças com similaridades radiológicas superficiais (35). A montagem das cadeias individuais no trímero começa na porção C-terminal e a formação da tripla hélice progride em direção a região N-terminal. Mutações que alteram os aminoácidos na porção carboxiterminal da molécula são mais desorganizadoras porque interferem mais cedo na propagação da tripla hélice (4).

Um pequeno número de mutações (Figura 4) no domínio C-propeptídeo estão associadas com PLSD-T (12,19), no entanto, pelo menos uma mutação no domínio de tripla hélice já foi descrita relacionada a dois irmãos com PLSD-T (40).



**Figura 4:** Mutações no domínio C-propeptídeo descritas na literatura em pacientes com PLSD-T [Adaptado de Désir *et al*, 2012 (20)].

#### 1.1.4.1.3 Hipocondrogênese

A hipocondrogênese (OMIM 200610) é uma displasia esquelética letal cujo fenótipo é intermediário entre a ACGII e a SEDC. Normalmente, insuficiência cardiorrespiratória é a causa de morte prematura. Radiologicamente, ossos longos curtos com fíbula hipoplásica, tórax largo, corpos vertebrais ovoides às vezes com *cleft* coronal, atraso de ossificação nas regiões cervical e sacral, ílio e escápula pequenos e pouca ossificação de púbis (27).

Até o momento, foram descritas 20 mutações relacionadas à HPCG das quais todas são a troca da glicina (19,29,30,41–45) e 15 delas estão localizadas no domínio tripla hélice.

#### 1.1.4.1.4 Displasia espondiloepifisária congênita

A displasia espondiloepifisária congênita (SEDC - OMIM 183900) é uma bem reconhecida displasia esquelética cujo quadro clínico se caracteriza por tronco curto, cabeça normal, face plana e, embora os membros também sejam curtos, mãos e pés são normais. Outras características que podem ser observadas são: fenda palatina, micrognatia, perda auditiva sensorial, hérnia inguinal, pés tortos e planos e *genu valgum*. A miopia é observada em 50% dos casos podendo ocorrer, raramente, deslocamento de retina. Radiologicamente,



o envolvimento epifisário pode ser observado sobretudo em cabeça femoral, joelhos e punhos. Os corpos vertebrais apresentam platispondilia e desvios de coluna que costumam ser frequente nos pacientes mais velhos. No recém-nascido é possível observar uma bacia característica. A incidência da SEDC é de aproximadamente 1:100.000 (46,47).

Muitos pacientes com SEDC possuem a substituição da glicina nos tripletos Gly-X-Y, e mutações em sítios de *splicing* causando deleções *in-frame* são observadas com uma menor frequência (12). Até o momento, foram descritas 40 diferentes mutações do tipo *missense* relacionadas com SEDC em que 27 delas são substituições da glicina em tripla hélice (48).

#### 1.1.4.1.5 Displasia espondilometapifisária do tipo Strudwick

A displasia espondilometapifisária do tipo Strudwick (OMIM 184250) foi descrita pela primeira vez por Murdoch & Walker em 1969. Esse fenótipo é caracterizado por baixa estatura desproporcional com características semelhantes a SEDC diferenciado por envolvimento metafisário que aparece com a idade avançada, (49). Assim, o diagnóstico de Strudwick em um recém-nascido é “impossível”, já que nessa idade esse fenótipo é indistinguível de SEDC. Dessa maneira, o diagnóstico somente é possível após a infância, quando os sinais de envolvimento metafisário começam a aparecer (49).

Apenas 9 mutações do tipo *missense* no gene *COL2A1* têm sido relacionadas com o fenótipo de Strudwick (49–53). Todas resultam na troca do aminoácido glicina para um aminoácido mais volumoso e se localizam no domínio tripla hélice.

#### 1.1.4.1.6 Displasia de Kniest

A displasia de Kniest (OMIM 156550) também está relacionada a um fenótipo semelhante ao fenótipo de SEDC. No entanto, a aparência facial é menos típica e as anomalias oculares como miopia costumam ser de início precoce, degeneração de humor vítreo e deslocamento de retina que pode levar à cegueira se não for tratada (54). Esses pacientes também podem hipoplasia de face média, fenda palatina e perda auditiva (55). Achados radiológicos ao nascimento incluem tronco e membros curtos com metáfises alargadas, ausência de ossificação do púbis, platispondilia, *cleft* coronal nos corpos vertebrais e atraso de ossificação epifisária, especialmente de cabeça de fêmur. Com o

desenvolvimento, as epífises tornam-se irregulares, alargadas e achatadas, As epífises anormalmente largas podem causar dor, movimento limitado e, por fim, resultar em contraturas articulares. Os pacientes com Kniest também podem apresentar cifoescoliose, articulações proeminentes e osteoartrite prematura que restringe os movimentos (55,56).

Os indivíduos podem morrer de insuficiência respiratória logo após o nascimento ou podem levar uma vida relativamente normal com uma baixa estatura desproporcionada e cifoescoliose (55).

A KND resulta principalmente da deleção de éxons, no entanto, existem alguns casos de mutações do tipo *missense*, deleções *in-frame* e mutações em sítio de *splice* (12,57).

#### 1.1.4.1.7 Displasia espondiloperiférica

A displasia espondiloperiférica (SPD – OMIM#271700) foi descrita pela primeira vez em 1977 e é caracterizada por baixa estatura, pés tortos, hipoplasia de face média, miopia. Diferente das outras collagenopatias com mãos e pés de tamanho normal, nessa displasia são pequenos (braquidactilia). Variedade fenotípica considerável está presente nessa displasia. Já foram descritas diferentes mutações no gene *COL2A1* para a SPD como duplicações, mutações que geram proteínas truncadas e mutações do tipo *missense* no domínio C-propeptídeo (58).

#### 1.1.4.1.8 Síndrome de Czech

A displasia de Czech se caracteriza por pseudoartrite reumatóide de início precoce, perda auditiva aparecendo no início da idade adulta, platispondilia leve, estatura normal e encurtamento do terceiro e quarto dedos dos pés. Até agora, uma única mutação *missense* (R275C) localizada no domínio tripla hélice do gene *COL2A1* tem sido associada a essa condição (58,59).

#### 1.1.4.1.9 Síndrome de Stickler

A síndrome de Stickler é uma condição genética e clinicamente heterogênea que foi descrita pela primeira em 1965 por Gunnar Stickler como uma artro-oftalmopatia

hereditária e progressiva (17). Uma heterogeneidade de *locus* marcante tem sido associada a síndrome de Stickler (17). Os fenótipos da síndrome de Stickler têm sido subdivididos em: tipo I (STL1; OMIM# 108300), tipo II (STL2; OMIM# 604841) e tipo III (STL3; OMIM# 184840). A STL1 está associada a mutações no gene *COL2A1* enquanto STL2 é causado por mutações no gene *COL11A1* e o STL3 por mutações no gene *COL11A2* (5,7,60).

A síndrome de Stickler é caracterizada por hipoplasia marcante de face média, fenda palatina, alto grau de miopia podendo evoluir para deslocamento de retina e cegueira, hipermobilidade articular, displasia espondiloepifisária leve, artrite degenerativa de início precoce e perda de audição. Radiologicamente, sinais leves de displasia espondiloepifisária podem ser observados. As manifestações fenotípicas são altamente variáveis tanto inter- como intrafamiliar (17,60). Entretanto, fenótipos vítreos têm sido usados como diferencial entre pacientes com mutações em qualquer um dos genes *COL2A1* ou *COL11A1* (Síndrome de Marshall) (17) já que pacientes com mutação no *COL2A1* normalmente apresentam uma perda auditiva menos significativa que a encontrada em outros tipos de síndrome de Stickler (61).

A incidência da STL1 é estimada entre 1 em 7500 e 1 em 9000 nascimentos.

A maioria das mutações identificadas no gene *COL2A1* em pacientes com STL1 resultam em decaimento do mRNA mediado por mutação *nonsense* (61). Até 2009, 82 mutações no gene *COL2A1* haviam sido descritas em pacientes com STL1. Estas mutações estão espalhadas ao longo do gene e quase sempre resultam em haploinsuficiência (60). Em cerca de 5% dos casos de STL1, não se encontra mutação no gene *COL2A1*. Suspeita-se que uma grande proporção destes 5% possam se de fato mutações intrônicas distantes que não são facilmente detectadas pelo sequenciamento habitual que avalia éxons e suas regiões intrônicas flanqueadoras (62).

#### 1.1.4.2 Outros fenótipos

Atualmente tem sido descritos outros fenótipos com mutações no gene *COL2A1* que ainda não foram incluídos no grupo de colagenopatias do tipo II pela Nosologia e Classificação das Doenças Esqueléticas de origem genética (26). Dentre esses fenótipos

destacam-se a dispondiloencondromatose (DSC) e a displasia espondilometafisária do tipo Algerian (SMD-A) (51,63).

A DSC é uma displasia esquelética rara que está classificada dentro do grupo das displasias espondilometafisárias. Todos os casos descritos até o momento são esporádicos. Os indivíduos afetados com DSC costumam apresentar anisoespondilia e lesões tipo encondroma nas porções metafisária e diafisária dos ossos tubulares longos, além de cifoescoliose e encurtamento assimétrico de membros em uma idade precoce. Nakane e colaboradores (2011)(51), relataram um paciente com DSC em que foi encontrada uma mutação nova no gene *COL2A1* (p.G753D) e sugeriram que DSC também pertence ao espectro das colagenopatias do tipo II (51).

A SMD-A (OMIM 184253) é uma displasia rara que pertence ao grupo das displasias espondilometafisárias com grave *genu valgum* (26). A SMD-A é uma distúrbio autossômica dominante e os indivíduos afetados apresentam tronco curto e grave *genu valgum* podendo também apresentar miopia. Radiologicamente, esses pacientes apresentam platispondilia, íliaco curto e displasia metafisária generalizada de ossos longos. Matsubayashi e colaboradores (2012) encontraram a mutação p.G861V no gene *COL2A1* em um paciente de origem japonesa com SMD-A (63).

### **1.1.5 Diagnóstico molecular das colagenopatias do tipo II**

Dada sua crescente disponibilidade, os exames moleculares são utilizados cada vez mais como adjuvantes para confirmação do diagnóstico clínico inicial, quando possível, e também com finalidade acadêmica favorecendo como, por exemplo, correlação genótipo-fenótipo de alguns fenótipos com genes específicos (64).

O mecanismo molecular que fundamenta a diversidade fenotípica das colagenopatias do tipo II não é totalmente entendido (13). O esclarecimento da correlação genótipo-fenótipo nas colagenopatias do tipo II é dificultado em razão da variação fenotípica e das transições fenotípicas idade-dependente (19).

Apesar de várias das colagenopatias tipo II apresentarem alterações radiológicas características, nem sempre o diagnóstico do tipo específico é fácil, sobretudo nos primeiros anos de vida, fazendo-se necessário o seguimento clínico-radiológico e/ou o estudo molecular para identificar a mutação no *COL2A1*. Além disso, como as mutações

observadas não são tipo específico e o número de casos estudados molecularmente ainda é limitado, estender a investigação dessas collagenopatias a um número maior de casos de uma casuística local pode trazer novos conhecimentos para o entendimento das bases moleculares dessas condições (14).





## ***2 - OBJETIVOS***





O presente projeto teve como objetivo geral avaliar as bases moleculares de uma série de pacientes com diagnóstico estabelecido ou duvidoso de colagenopatia tipo II.

## **2.1 Objetivos específicos**

- pesquisar as mutações no gene *COL2A1* numa série de pacientes com diagnóstico de colagenopatia II a partir de estratégia específica;
- comparar as mutações observadas com os diagnósticos clínicos tentando contribuir para uma melhor definição da correlação genótipo-fenótipo.





### ***3 - CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS***



O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas de acordo com o parecer em anexo (ANEXO 1) e todos os indivíduos e responsáveis foram orientados quanto à investigação proposta, tendo assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2).

### 3.1 Casuística

Os pacientes incluídos nesse estudo foram selecionados a partir de:

- Programa de Genética Perinatal do Departamento de Genética Médica - CAISM / UNICAMP;
- Ambulatório de Displasias Esqueléticas do Hospital das Clínicas (UNICAMP).
- Pacientes derivados de outros centros e encaminhados a partir da colaboração com dois projetos: “Malformações esqueléticas congênitas e osteocondrodisplasias no Brasil (CoSMO-B): uma estratégia colaborativa para o manejo clínico e pesquisa básica” [CNPq - 590148/2011-7] e “Uma proposta para melhorar o diagnóstico das osteocondrodisplasias (OCD) no período neonatal e incentivar um registro dessas condições” [CNPq - 402008/2010-] (SUS).

Foram incluídos no estudo uma coorte de 33 pacientes com diagnóstico estabelecido ou duvidoso de colagenopatia do tipo II. A distribuição desses casos, conforme o diagnóstico, está referida na Tabela 3.

**Tabela 3:** Distribuição dos pacientes estudados, segundo o diagnóstico inicial.

<b>Diagnóstico inicial</b>	<b>Número de Pacientes</b>
ACGII	2
HPCG	3
Torrance	2
SEDC	9
Strudwick	2
Kniest	3
Czech	1
Stickler	5
<i>COL2A1*</i>	6

*COL2A1\**: Pacientes com diagnóstico de colagenopatia do tipo II não específica.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Extração de DNA genômico

Na maioria dos casos utilizou-se DNA de sangue periférico extraído através do protocolo de fenol e clorofórmio adaptado de Sambrook & Russel (65) que propicia a obtenção de grande quantidade de DNA. Para alguns casos o DNA foi obtido de fibroblastos provenientes do cultivo de pele ou cartilagem.

### 3.2.2 Desenho de *primers*

Para a amplificação dos éxons do gene *COL2A1* foram construídos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que flanqueiam essas regiões. Os *primers* foram desenhados com o auxílio do software Primer3® e suas estruturas secundárias analisadas pelo programa *GeneRunner*®. Foram levadas em conta algumas regras como tamanho dos *primers* de 18 a 25 nucleotídeos, ausência de complementariedade entre os *primers*, porcentagem semelhante do conteúdo de citosina e guanina dos dois *primers*, temperaturas próximas de anelamento entre os pares de *primers* e tamanho do fragmento a ser amplificado de até 750 pares de bases.

No total, foram utilizados 41 pares de *primers* para a amplificação dos 54 éxons do gene *COL2A1*. Cada par de *primer* amplifica a região codificante do gene (éxon) e suas junções íntron/éxon formando os chamados *amplicons*. Os *primers* foram submetidos a gradientes de temperatura para encontrar a temperatura de anelamento ideal para cada par. O Apêndice 2 apresenta as sequências nucleotídicas dos *primers* e suas respectivas temperaturas de anelamento.

### 3.2.3 Amplificação de DNA por PCR

Os fragmentos de DNA genômico foram amplificados pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando-se os *primers* específicos para cada éxon do gene *COL2A1*.

As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 10 $\mu$ L, contendo 50ng de DNA genômico; 10 picomoles de cada *primer*; 15U de Taq e concentrações finais

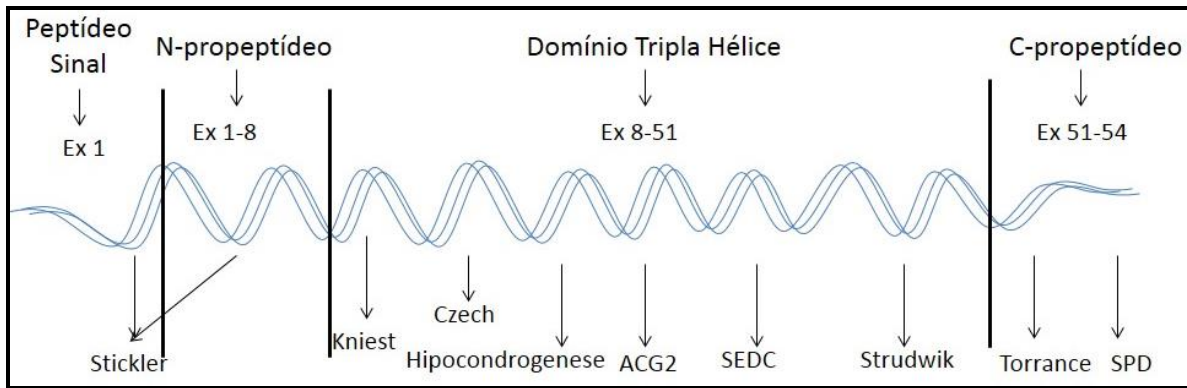
de 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 80μM de cada desoxirribonucleotídeo, tampão 1X com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [20mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 75mM de Tris-HCl pH8,4; 0,01% (v/v) de Tween 20]. Para alguns pares de *primers*, utilizou-se de DMSO (5%) para a otimização da reação.

As condições para a realização da PCR foram: desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos à temperatura de anelamento específica dos pares de *primers* e 1 minuto à 72°C; e, depois dos ciclos, extensão final à 72°C por 10 minutos.

Para otimizar o processo de amplificação dos *amplicons* e minimizar o surgimento de bandas inespecíficas, foi utilizada a técnica de *Touchdown PCR* para todos os pares de *primers* (66). A temperatura de anelamento no primeiro ciclo foi programada para 10°C acima da temperatura de anelamento específica do par de *primers*. Em cada ciclo, a temperatura diminui 0,5°C e, após 20 ciclos, atinge a temperatura de anelamento ideal. Os ciclos seguintes seguem a temperatura específica dos *primers*.

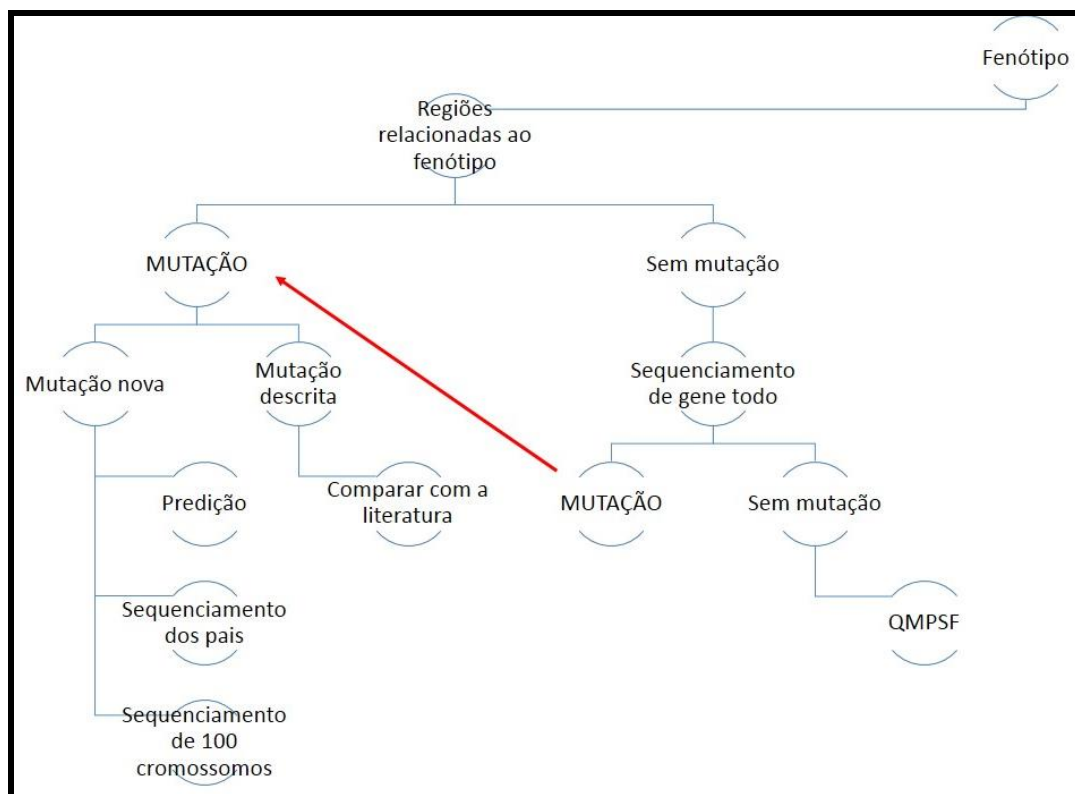
As reações foram realizadas em paralelo com um controle sem DNA (branco) com a finalidade de identificar possíveis contaminações. Após a amplificação, foi realizado eletroforese (40min-100V) em gel de agarose a 1,5% com a aplicação de 2ul da reação de PCR com 2ul de azul de bromofenol. O gel de agarose foi corado com o corante *SYBR® Safe* para a visualização da banda referente ao *amplicom* de cada par de *primers* a fim de avaliar a qualidade e especificidade da reação. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100 pares de base (Thermo SCIENTIFIC GeneRuler 100pb DNA Ladder).

Embora não exista *hot spots* no gene *COL2A1* e a maioria das mutações sejam “privadas” (26,52,67) são conhecidas algumas regiões do gene associadas mais frequentemente a alguns fenótipos (18), conforme mostra a Figura 5.



**Figura 5:** Representação esquemática da estrutura do colágeno do tipo II com a localização das regiões relacionadas a cada fenótipo [Modificado de Korkko *et al.*, 2003 (14)].

Baseado nessa informação, o sequenciamento dos pacientes estudados nesse projeto, inicialmente, se concentrou nas regiões mais associadas aos respectivos fenótipos e se estendeu para os demais éxons chegando ao sequenciamento completo do gene nos casos de ausência de mutações patogênicas nas regiões inicialmente sequenciadas. A Figura 6 mostra a estratégia utilizada para a pesquisa de mutações no gene *COL2A1*.



**Figura 6:** Fluxograma da estratégia de pesquisa de mutações no gene *COL2A1*.



### **3.2.4 Reação de Exo-Star/Illustra™**

Para preparação das amostras para o sequenciamento utilizou-se a purificação com Exo-Star/Illustra™ (exonuclease I e fosfatase alcalina) para remover o excesso de *primers*. Foram adicionados 0,4 µL de exonuclease e 0,4 µL de fosfatase alcalina a cada 2,0 µL de PCR a ser purificada. As amostras foram incubadas a 37°C por 15 minutos e depois aquecidas a 80°C por mais 15 minutos para a inativação das enzimas.

### **3.2.5 Sequenciamento por eletroforese em capilar (Método de Sanger)**

Os fragmentos obtidos na PCR foram submetidos a sequenciamento capilar pelo método de Sanger (68) com o Kit *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1* e os produtos foram submetidos à eletroforese em capilar no analisador ABI 3500xL (Applied Biosystems™ – by Life Technologies™).

A reação de sequenciamento foi feita para um volume final de 10µl, contendo 2µl de solução tampão, 1,0µl de BigDye®, 0,5µl de *primer sense ou antisense* (10pmol/µl), 1,0µl de PCR e 5,5µl de água. As condições para a realização do sequenciamento foram: 35 ciclos de 20 segundos à 95°C, 15 segundos à 50°C e 1 minuto à 60°C.

A purificação das amostras para o sequenciamento foi realizada com EDTA e etanol de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems™ – by Life Technologies™). Após a finalização do processo de purificação as amostras foram solubilizadas em 10 µL de formamida Hi-Di®.

No caso de inserções e deleções, difíceis de visualizar no eletroferograma, foi realizada clonagem em *Escherichia coli* (DH5α) utilizando o vetor pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) conforme as instruções do fabricante. Diferentes clones foram então sequenciados, a fim de se obter a sequência nucleotídica de cada alelo isolado.

### **3.2.6 Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments (QMPSF)**

Como o método de Sanger não é uma técnica indicada para confirmar grandes deleções ou inserções, para pacientes com diagnóstico típico de colagenopatia do tipo II em que foi suspeitada deleção/inserção de éxons ou deleção do gene, através dos resultados

obtidos pelo sequenciamento, foi realizada uma PCR pelo método de QMPSF (*Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments*) (69–73). Essa técnica permite identificar éxons deletados ou inseridos no gene a partir de uma PCR com *primers* marcados com fluorescência. As condições para a realização da PCR estão representadas na Figura 7.

95°C - 12'	
94°C - 30''	} 24 ciclos
55°C - 45''	
70°C - 1'30''	
60°C - 30'	
10°C - ∞	

**Figura 7:** Condições para a realização da PCR com primers marcados.

As reações de PCR para a QMPSF foram realizadas com um volume final de 25uL, contendo 2ng/ul de DNA genômico; 0,3pmol de cada *primer*; 0,09U de Taq polimerase e concentrações finais de 50mM de MgCl<sub>2</sub>, 10μM de desoxirribonucleotídeo, tampão 10X com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [20mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 75mM de Tris-HCl pH8,4; 0,01% (v/v) de Tween 20].

A reação também contém um *primer* para controle interno que amplifica uma sequência pequena (237pb) do gene DSCR1 (MIM 602917). Todos os *primers forward* de cada par foram marcado com o fluoróforo 6-FAM. O produto da reação de QMPSF (1,0 ul) foi misturado com 9 ul de formamida e 0,4 ul do marcador de peso molecular 600 LIZ (GeneScan 600 LIZ Size Standard, Applied Biosystems) e os fragmentos foram separados no ABI 3500xL (Applied Biosystems™ – by Life Technologies™). Os resultados foram analisados no *software* Genescan 3.7 (Applied Biosystems) e depois foi realizada a superposição dos picos do paciente e do controle com base no marcador de peso molecular. Os picos foram normalizados de acordo com a intensidade dos picos do DSCR1.

### 3.2.7 Estudo em controles

As alterações inéditas potencialmente deletérias identificadas nos pacientes estudados foram investigadas em 50 indivíduos controles (100 cromossomos), a fim de verificar a possibilidade de serem polimorfismos encontrados na população. As amostras incluídas no grupo de controle são do banco de DNA do Programa de Genética Perinatal –

DGM - CAISM / UNICAMP). Esse banco de DNA foi construído a partir de sangue de cordão de recém nascidos dos quais conhecia-se apenas 2 informações: gênero e estado de saúde saudável.

### 3.2.8 Análises computacionais

O resultado do sequenciamento foi obtido em arquivos com extensão .ab1 contendo o eletroferograma de cada reação sequenciada. Os arquivos foram abertos utilizando os *softwares* *CodonCodeAligner 4.0*<sup>®</sup> e *Chromas*<sup>®</sup>.

Os resultados obtidos no sequenciamento foram comparados com bancos de dados do *Ensembl*, *HGMD*<sup>®</sup>, *dbSNP* e *Exome Variant Server*. Aqueles que resultaram em troca de aminoácido na proteína codificada e que ainda não foram descritos na literatura foram submetidas à análise *in silico* em diferentes algoritmos (Quadro 5), a fim de estimar seu efeito na estrutura e função da proteína. Essas análises levam em consideração as diferenças físico-químicas entre o aminoácido original e o alterado, além de, no caso das análises de bioinformática, a posição da alteração e o nível de conservação entre sequências homólogas. Os *softwares* *MutPred*<sup>®</sup>, *Polyphen2*<sup>®</sup> e *SNPs&GO*<sup>®</sup> avaliam a substituição da base nitrogenada baseando-se numa combinação de parâmetros funcionais e estruturais das proteínas, enquanto o *SIFT*<sup>®</sup> e o *Panther*<sup>®</sup> consideram informações evolutivas para tal (74).

Foi utilizada também a escala Grantham para medir a diferença entre os resíduos de aminoácido selvagem e mutante com base em suas composições, polaridades e volumes moleculares (75). Com base nos valores obtidos nessa escala, as substituições foram classificadas em “conservadas” (<50), “moderadas” (51–100), “radicais” (101–150) e “muito radicais” (>151) (76).

Deleções e alterações em sítio de splice foram analisadas por seus algoritmos específicos e também estão apresentados no Quadro 1.

**Quadro 1:** Algoritmos utilizados para a análise *in silico* das mutações do tipo *missense*.

<b>Tipo de alteração</b>	<b>NOME DO ALGORITMO</b>	<b>ENDEREÇO ELETRÔNICO</b>
Mutações <i>missense</i>	SIFT® ( <i>Sorting Intolerant from Tolerant</i> )	<a href="http://sift.jcvi.org/">http://sift.jcvi.org/</a>
	Polyphen 2® ( <i>Polymorphism Phenotyping</i> )	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>
	Mutpred®	<a href="http://mutpred.mutdb.org/">http://mutpred.mutdb.org/</a>
	SNPs&GO®	<a href="http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/">http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/</a>
	Panther	<a href="http://www.pantherdb.org/">http://www.pantherdb.org/</a>
	SNAP	<a href="https://roslab.org/services/snap/">https://roslab.org/services/snap/</a>
Deleções	PHD-SNP ( <i>Predictor of human Deleterious Single Nucleotide Polymorphisms</i> )	<a href="http://snps.uib.es/phd-snp/phd-snp.html">http://snps.uib.es/phd-snp/phd-snp.html</a>
	<i>Mutation Taster</i>	<a href="http://www.mutationtaster.org/">http://www.mutationtaster.org/</a>
Sítio de splice	<i>Human Splicing Finder</i>	<a href="http://www.umd.be/HSF/">http://www.umd.be/HSF/</a>
	<i>Scroogle – Splicing Regulation Online Graphical Engine</i>	<a href="http://sroogle.tau.ac.il/">http://sroogle.tau.ac.il/</a>
	<i>Splice View</i>	<a href="http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview_ex.html">http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview_ex.html</a>

Os programas para estimar possíveis abolições de sítios constitutivos de *splicing*, que poderiam levar ao processamento aberrante do mRNA, realizam cálculos baseados em matrizes de peso posicional (PWM - *position weight matrices*) (77). Esse tipo de análise segue o princípio de que um sítio de *splicing* em potencial pode ser definido como uma sequência de bases nucleotídicas, para cada qual é dado um peso com base em sua frequência e na importância relativa de sua posição na sequência.



## ***4 - RESULTADOS***



#### 4.1 Aspectos clínicos

Participaram do estudo 33 pacientes com diagnóstico estabelecido ou duvidoso de colagenopatia do tipo II. Os pacientes estão distribuídos no Quadro 2 de acordo com a classificação das colagenopatias (26), da mais grave para a mais leve, segundo o diagnóstico final. Os pacientes com SEDC foram classificados em: SEDC-L, pacientes que apresentaram quadros mais leves do espectro espondiloepifisário; SEDC; e SEDC-LT, pacientes que morreram nos primeiros meses de vida.

O Quadro 2 apresenta dados clínicos gerais dos pacientes da casuística. A evolução apresenta a idade do paciente na última avaliação caso o paciente não tenha morrido.

Em relação à vitalidade, 9 de 33 pacientes morreram, sendo desses dois pacientes natimortos.

Em 13 dos 33 pacientes, não foi possível a coleta de dados clínicos gerais. Assim, considerando um N=20, as idades dos pacientes variaram de 5 meses a 14 anos e 8 meses e 60% eram do sexo masculino e 40% do sexo feminino. A média de idade gestacional em semanas foi de  $37,4 \pm 2,87$  (média  $\pm$  desvio padrão), a média de peso em gramas foi de  $2741,5 \pm 682,54$  e a média de comprimento (centímetros) foi de  $38,375 \pm 10,40$ . A idade materna e paterna são referentes a idade dos pais ao nascimento do paciente estudado e as médias de idade foram de  $27,05 \pm 4,94$  e  $34,15 \pm 7,81$ , respectivamente.

Os pacientes 2, 20, 23 e 30 apresentaram recorrência na familiar.

**Quadro 2:** Características clínicas gerais dos pacientes com collagenopatias do tipo II estudados no presente trabalho.

Paciente	Diag. Inicial	Diag. Final	Idade materna (anos)	Idade Paterna (anos)	Recorrência familiar	Sexo	Idade gestacional (Semanas)	Peso ao nascimento (gramas)	Comprimento ao nascimento (cm)	Vitalidade (NV/NM)	Evolução
1	ACGII	ACGII	22	29	NÃO	F	34	1655	30	NM	NC
2	ACGII	ACGII	22	47	SIM	F	35	2145	35	NV	Óbito (<1H)
5	D. Torrance	D. Torrance	25	28	NÃO	M	32	1795	27	NV	Óbito (40min)
6	D. Torrance	D. Torrance	32	33	NÃO	M	32*	1765	31	NM	NC
3	HPCG	HPCG	27	33	NÃO	M	37*	2850	39	NV	Óbito (25d)
4	HPCG	HPCG	21	24	NÃO	M	39	2590	38	NV	Óbito (11m)
10	SEDC	SEDC-LT	25	34	NÃO	M	39	3135	38,5	NV	Óbito (3m)
11	HPCG	SEDC-LT	-	-	NÃO	F	36	2480	38,5	NV	Óbito (3m)
12	SEDC	SEDC-LT	24	29	NÃO	M	38*	3610	36	NV	Óbito (7m)
7	Strudwick	SEDC-G	33	25	NÃO	M	37	3325	3	NV	8a1m
8	<i>COL2A1</i>	SEDC-G	28	36	NÃO	F	41*	3865	48	NV	3a8m
9	Strudwick	SEDC-G	20	32	NÃO	F	39*	1990	41	NV	9a4m
21	D. Kniest	SEDC-G	20	54	NÃO	M	a termo	2750	40	NV	10a
32	<i>COL2A1</i>	SEDC-G	35	39	NÃO	M	38	3070	41	NV	-
33	<i>COL2A1</i>	SEDC-G	37	37	NÃO	M	38	3200	42,5	NV	-
14	SEDC	SEDC	42	56	NÃO	F	38	2940	43	NV	-
15	SEDC	SEDC	28	30	NÃO	M	38	3000	41	NV	1a7m



16	SEDC	SEDC	-	-	NÃO	F	40	2510	32	NV	10m
17	SEDC	SEDC	-	-	NÃO	F	a termo	2900	42	NV	5m
29	<i>COL2A1</i>	SEDC-L	29	28	NÃO	M	-	3650	47	NV	9a
28	SEDC	SEDC-L	-	-	NÃO	F	a termo	3300	42	NV	5a9m
18	SEDC	Strudwick	29	30	NÃO	F	40	2555	40	NV	3a
19	D. Kniest	D. Kniest	27	25	NÃO	F	35	2250	40	NV	-
20	D. Kniest	D. Kniest	-	-	SIM	M	-	-	-	NV	-
31	<i>COL2A1</i>	D. Kniest	-	-	-	-	-	-	-	NV	-
30	Czech	Osteoartrite familiar	25	39	SIM	F	-	-	-	NV	22a
22	S. Stickler	S. Stickler	-	-	-	M	-	-	-	NV	14a8m
23	S. Stickler	S. Stickler	24	48	SIM	M	39	3380	49	NV	3a6m
24	S. Stickler	S. Stickler	35	31	NÃO	M	a termo	2640	46	NV	2a
25	S. Stickler/ Marshal	S. Stickler/ Marshal	-	-	NÃO	F	a termo	2375	-	NV	1a3m
26	S. Stickler	S. Stickler	29	39	NÃO	F	SI	2860	47	NV	3a11m
13	SEDC	<i>COL2A1</i>	37	38	NÃO	F	41	2250	45	NV	2a3m
27	<i>COL2A1</i>	<i>COL2A1</i>	31	35	NÃO	F	39+6*	3620	46	NV	15a

Legenda: F: Feminino / M: Masculino / -: sem informação clínica / NC: não se aplica / NV: Nativo / NM: Natimorto / \*: Nos casos em que a idade gestacional não foi mencionada foi utilizada a idade do método de Capurro / a: anos / m: meses / min: minutos / d: dias / H: hora / SEDC-LT: EDC letal / SEDC-G: SEDC grave

Foram avaliadas as radiografias do período neonatal de 13 pacientes. As características esqueléticas desses pacientes (pacientes 1-8, 10-12, 14 e 19) estão apresentadas no Quadro 3.

**Quadro 3:** Alterações esqueléticas dos pacientes estudados no período neonatal.

Paciente	Coluna				Ossos longos	Epífise				Bacia		Comprometimento metafisário	Outras alterações
	PLAT	AO		Outras alterações	Encurtamento	AO carpal	HP	AO de joelho	Outras alterações	Ausência / HP de púbis	Outras		
		CV	SC										
1	+	+	+	-	+	NC	NC	NC	NC	+	ilíaco típico	+	-
2	+	+	+	-	+	NC	NC	NC	NC	+	ilíaco típico	-	-
5	+++	+	+	-	+	NC	NC	NC	NC	+	-	+	Discreto encurvamento em ossos longos
6	+++	+	-	-	+	NC	NC	+	NC	+	Bacia em caracol	-	-
3	+	+	+	-	+	NC	NC	+	NC	+	-	-	-
4	+	+	+	-	+	NC	NC	si	NC	+	-	-	HP de falange média de 2° e 5° dedo
10	-	+	+	-	+	NC	NC	+	NC	+	-	-	-
11	+	+	+	-	+	NC	NC	+	NC	+	-	-	-
12	+	+	+	-	+	NC	NC	+	NC	+	-	-	-
7	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	discreto alargamento metafisário	-
8	-	-	-	corpos vertebrais ovoides	+	-	+	-	-	+	-	discreto alargamento metafisário	HP de falange distal de 1° dedo dos pés

14	+	-	-	<i>cleft</i> coronal (vértebra T9), vértebra T12 ovóide	si	-	si	si	-	si	-	si	-
19	+	+	-	<i>cleft</i> coronal	+	-	-	-	epífises alargadas	+	-	-	-

Legenda: CV: cervical / SC: sacral / AO: atraso de ossificação / HP: hipoplasia / PLAT: platispondilia / si: Sem informação do período neonatal / NC: característica não corresponde com a idade do paciente / +: presença / -: ausência.

Os quadros 4 e 5 apresentam características esqueléticas e clínicas, respectivamente, de acordo com a última avaliação de cada paciente (a idade de cada paciente está apresentada no quadro 4).

**Quadro 4:** Alterações esqueléticas dos pacientes do estudo na idade da última consulta.

Paciente	Idade	Coluna			Ossos longos	Epífise				HP de cabeça de fêmur	Bacia		Comprometimento metafisário	Outras alterações	
		PLAT	AO		Outras alterações	Encurtamento	AO carpal	HP	AO de joelho		Outras alterações	Ausência / HP de púbis			Outras
			C V	S C											
7	6a 4m	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	acetábulo anormal; coxa vara	discreto alargamento metafisário	-	
8	1a 8m	-	-	-	Vértebras ovóides	+	-	+	-	-	+	HP de acetábulo	discreto alargamento metafisário	HP de falange distal de primeiro dedo dos pés, <i>corner fractures</i>	
9	7a 7m	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	acetábulo anormal; coxa vara	discreto alargamento metafisário	-	
21	10a	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	<i>corner fractures</i> , encunhamento anterior de vértebras lombares altas e posterior de vertebrae lombares mais baixas	
32	?	+	-	-	-	+	-	-	-	coxa vara	+	-	HP de ramo ísquio-púbico	alargamento e irregularidade de metafíses em joelhos	-
33	?	si	si	si	si	-	+	-	-	pseudoepífise em segundo metacarpiano	+	+	coxa vara, HP de ramo ísquio-púbico	-	

14	1a	+	-	-	<i>cleft</i> coronal (vértebra T9), vértebra T12 ovóide	+	+	+	-	Atraso de ossificação femoral, epífise proximal de fêmur hipoplásica e bipartida	-	-	-	alargamento com irregularidade principalmente em fêmur	-
15	1a 7m	+	+	si	-	+	+	+	+	-	+	+	bacia típica, acetábulo irregular	-	-
16	10 m	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	acetábulo irregular	metáfises irregulares	-
17	5m	+	-	-	corpos vertebrais ovóides	-	+	+	-	-		+	típica	acetábulo alargado	<i>corner fractures</i>
29	9a	+	si	si	si	si	-	-	-	-	+	-	bacia típica, acetábulo alargado e levemente irregular	+	
28	5a 9m	-	-	-	contorno levemente irregular de corpos vertebrais	-	-	-	-	-	-	-	bacia típica, acetábulo característico	-	-
18	3a	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	coxa vara, acetábulo irregular	+	<i>corner fractures</i>
20	?	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>coxa vara</i>	metáfises alargadas	-
31	?	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
30	22a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	encurtamento metacarpiano de quarto e quinto dedo, artrite de quadril

22	14a 8m	+	-	-	alteração de corpo vertebral, escoliose	-	-	+	-	-	+	acetábulo irregular, coxa vara, afilamento da porção final da asa do ílaco	alargamento discreto	osteoartrite, asa do ílaco hipoplásica
23	3a 6m	-	-	-	alteração de corpo vertebral	-	NC	NC	NC	NC	-	coxa valga esquerda	alargamento distal de fêmur	-
24	2a	+	-	-	alteração de corpo vertebral	-	+	+	-	-	+	acetábulo irregular	alargamento	-
25	1a 3m	+	-	-		-	-	+	-	-	+	HP de ramo ísquio-púbis	alargamento	-
26	3a 11 m	-	-	-	cifoescoliose, costelas alargadas	-	+	+	-	Pseudoepífise no segundo metacarpiano	+	acetábulo irregular, HP de ramo ísquio-púbico	Leve alargamento	ossos <i>wormianos</i>
13	2a 3m	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	HP de acetábulo, luxação de cadeira, HP leve de ramo ísquio-púbico	-	-
27	15a	-	-	-	cifoescoliose	-	+	+	-	pseudoepífise no segundo metacarpiano	-	HP de ramo ísquio púbico	alterações de falange, irregularidade de acetábulo	encurvamento de fêmur, coxa valga, HP proximal de fíbula

Legenda: CV: cervical / SC: sacral / AO: atraso de ossificação / HP: hipoplasia / PLAT: platispondilia / si: sem informação



**Quadro 5:** Características clínicas dos pacientes do estudo na idade da última consulta.

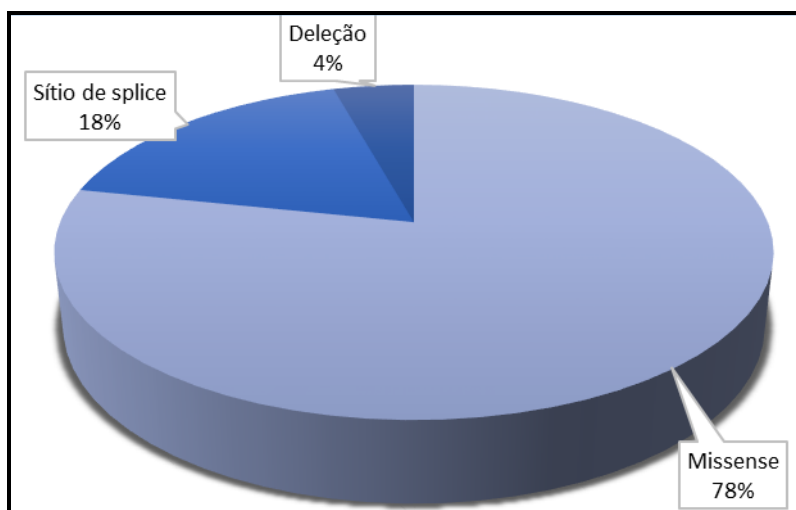
Paciente	Hidropisia	HP de membros	Perfil facial achatado	Fenda palatina	Baixa estatura		Tronco curto	Mãos/pés normais	Pescoço curto	Articulações volumosas	Miopia	Surdez	Outras alterações
					Proporcionada	Desproporcionada							
1	+	++	+	+	-	+	+	+	+	NC	NC	NC	Sobra de pele em pescoço, prega palmar única bilateral, abdução de coxas e clinodactilia de 5º dedo
2	-	+	-	+	-	+	+	-	+	NC	NC	NC	Sobra de pele em pescoço, raiz nasal baixa, abdome proeminente
5	+	++	+	-	-	+	+	+	+	NC	NC	NC	Prega palmar única bilateral, prega única de quinto dedo, hidrocele, língua protusa, proptose ocular
6	+	++	+	-	-	+	+	+	+	NC	NC	NC	Prega palmar única bilateral, língua protusa, proptose ocular leve
3	-	++	+	+	-	+	+	+	+	NC	NC	NC	Sobra de pele em pescoço, prega palmar única unilateral.
4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
10	-	+	+	+	-	+	+	+	+	NC	NC	NC	Pé torto congênito bilateral, membros inferiores encurvados com abdução de coxas
11	-	++	+	+	-	+	+	+	+	NC	-	NC	Olhos proeminentes
12	-	++	+	-	-	+	+	+	+	NC	NC	NC	Membros inferiores encurvados
7	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	si	si	Cifoescoliose, aumento de lordose
8	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	si	si	Varismo de membros inferiores
9	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	si	Discreto pectus carinatum, pés planos, genu valgum
21	-	+	-	-	-	-	++	+	+	-	-	-	Face típica, lordose aumenta, pés planos, pectus carinatum
32	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	si	si	pectus escavatum
33	-	-	+	si	-	+	++	+	-	-	si	si	face triangular
14	si	+	+	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si

15	-	+	+	-	-	+	-	+	-	NC	NC	NC	pé torto congênito bilateral, abdome proeminente
16	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
17	-	+	+	+	-	si	+	+	+	-	-	-	Lordose aumentada
29	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	escoliose
28	-	+	+	-	-	+	++	+	+	-	-	-	pectus carinatum, escoliose, pés planos
18	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	Genu valgum
19	-	-	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Proptose ocular
20	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	Peito carinatum, cifo escoliose, rigidez de cotovelo e joelho
31	-	+	-	-	-	+	++	-	-	-	+	?	Genu valgum, articulação do joelho levemente proeminente
30	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	?	-
23	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	?	Mãe com miopia
24	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
25	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Epicanto bilateral, olhos proeminentes
26	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	Cifo escoliose
13	-	-	+	-	-	+	+	+	+	NC	NC	NC	Lordose acentuada
27	-	-	+++	-	-	++	-	-	+	-	+	+	Hálus valgo, genu valgum

Legenda: HP: hipoplasia / NC: característica não corresponde com a idade do paciente/ +: presença / -: ausência / si: sem informação clínica

## 4.2 Aspectos moleculares

Dos 33 pacientes submetidos ao sequenciamento do gene *COL2A1*, foram identificadas alterações deletérias em heterozigose em 23 (69,7%): 18 alterações do tipo *missense* (11 inéditas e 7 descritas), 4 alterações que modificam sítio de *splice* (2 inéditas e 2 descritas) e uma deleção inédita. Retirando os pacientes com diagnóstico duvidoso (pacientes 19, 24, 25 e 26) a porcentagem de pacientes com mutação encontrada sobe para 79,31%. A maioria das mutações encontradas foram “privadas”, no entanto, houve a recorrência de duas mutações em 5 pacientes. Sendo assim, o total de alterações potencialmente deletérias foi de 20, sendo 14 delas inéditas. A frequência dessas mutações nos pacientes do estudo pode ser vista na Figura 8.



**Figura 8:** Apresentação simplificada da frequência dos tipos de mutações encontradas nos pacientes do estudo.

O quadro 6 mostra em detalhes os resultados obtidos pelo sequenciamento do gene *COL2A1* como a mutação encontrada (nucleotídeo e aminoácido) e domínio e éxon em que a mutação está localizada. Para a maioria dos pacientes em que foi encontrada mutação inédita, foi realizada a coleta e análise de material genético de pais para avaliar a presença/ausência da mutação.

De todos os pais analisados, a mesma mutação do filho foi encontrada somente no pai da paciente 13. Nenhuma das alterações deletérias foram encontradas no sequenciamento de cromossomos controles analisados e nos bancos de dados pesquisados.

**Quadro 6:** Resultado do sequenciamento de todos os pacientes, ordenados de acordo com o diagnóstico final de cada um deles.

Paciente	Diagnóstico Final	Aminoácido	Proteína	Troca do aminoácido	Éxon	Domínio	Sequenciamento/nº de éxons estudados	Sequenciamento		Referência
								Pai	Mãe	
1	ACGII	1358G>A	G453D	Glicina / Aspartato	21	Tripla hélice	18	-	-	(28)
2	ACGII	2409+1G>A	-	-	36	Tripla hélice	Sim	A	-	Inédita
5	D. Torrance	3943T>G	C1315G	Cisteína / Glicina	52	C-propeptídeo	3	-	A	Inédita
6	D. Torrance	4387_4389delATT	Ile1463del	-	54	C-propeptídeo	6	-	-	Inédita
3	HPCG	1826G>A	G609D	Glicina / Aspartato	27	Tripla hélice	Sim	-	-	Inédita
4	HPCG	-	-	-	-	-	13	-	-	-
10	SEDC-LT	1781G>A	G594E	Glicina / Ac. glutâmico	27	Tripla hélice	19	-	-	(53)
11	SEDC-LT	1781G>A	G594E	Glicina / Ac glutâmico	27	Tripla hélice	26	-	-	(53)
12	SEDC-LT	1546G>A	G516S	Glicina / Serina	24	Tripla hélice	24	A	A	Inédita
7	SEDC-G	2965C>T	R989C	Arginina / Cisteína	43	Tripla hélice	11	A	A	(78)
8	SEDC-G	2965C>T	R989C	Arginina / Cisteína	43	Tripla hélice	35	A	A	(78)
9	SEDC-G	2965C>T	R989C	Arginina / Cisteína	43	Tripla hélice	14	A	A	(78)
21	SEDC-G	1709G>A	G570D	Glicina / Aspartato	26	Tripla hélice	36	-	A	Inédita
32	SEDC-G	-	-	-	-	-	Sim	-	-	-
33	SEDC-G	2059G>C	G687R	Glicina / Arginina	32	Tripla hélice	40	-	-	Inédita
14	SEDC	-	-	-	-	-	36	-	-	-
15	SEDC	1583G>C	G528A	Glicina / Alanina	25	Tripla hélice	14	A	-	Inédita
16	SEDC	2122G>C	G708R	Glicina / Arginina	33	Tripla hélice	51	-	-	Inédita

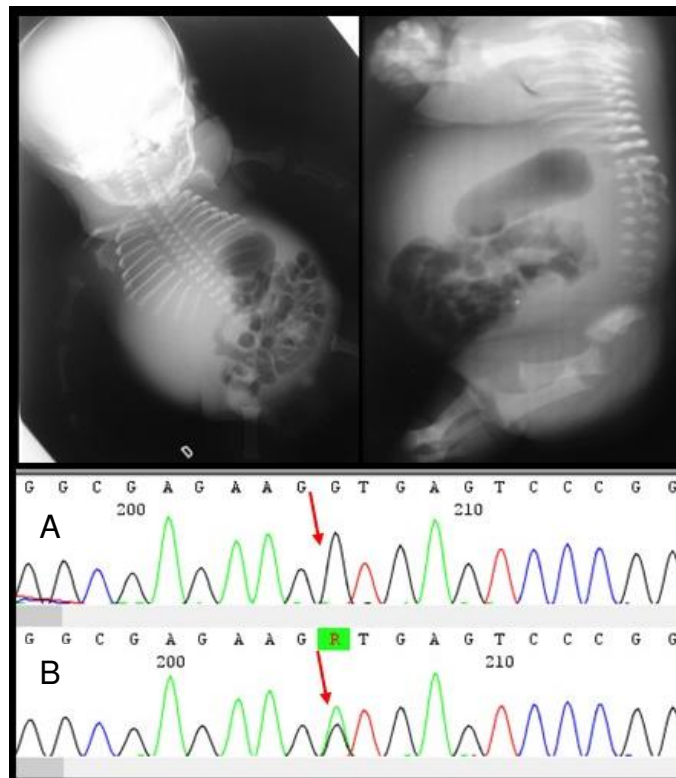
17	SEDC	1493G>A	G498D	Glicina / Aspartato	23	Tripla hélice	17	-	-	Inédita
29	SEDC-L	3445G>A	G1149R	Glicina / Arginina	49	Tripla hélice	47	A	A	Inédita
28	SEDC-L	3239G>T	G1080V	Glicina / Valina	46	Tripla hélice	16	-	-	Inédita
18	SEDC - Strudwick	3364G>A	G1122R	Glicina / Arginina	48	Tripla hélice	27	-	-	(79)
19	D. Kniest	-	-	-	-	-	Sim	-	-	-
20	D. Kniest	Deleção de 28pb	-	-	14	Tripla hélice	2	-	-	(55)
31	D. Kniest	1070C>T	A905V	Alanina / Valina	14	Tripla hélice	48	-	-	(80)
30	Osteoartrite familiar	-	-	-	-	-	Sim	-	-	-
22	S. Stickler	2049+1G>A	-	-	31	Tripla hélice	Sim	A	A	Inédita
23	S. Stickler	-	-	-	-	-	Sim	-	-	-
24	S. Stickler	-	-	-	-	-	Sim	-	-	-
25	S. Stickler	-	-	-	-	-	Sim	-	-	-
26	S. Stickler	-	-	-	-	-	Sim	-	-	-
13	<i>COL2A1</i>	164G>A	C55Y	Cisteína / Tirosina	2	N-propeptídeo	Sim	P	A	Inédita
27	<i>COL2A1</i>	-	-	-	-	-	Sim	-	-	-

Legenda: P: presença da mesma mutação do filho / A: ausência da mutação observada no filho.

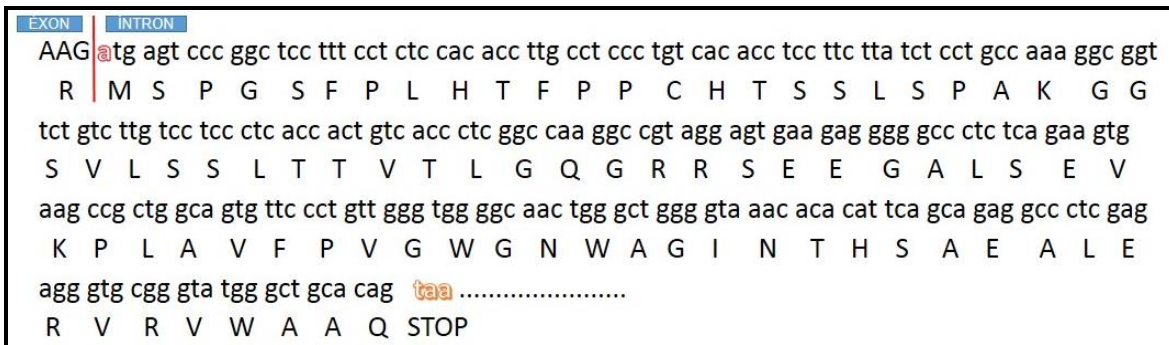
Das 11 mutações do tipo *missense* inéditas, 9 delas representam a troca do aminoácido glicina e estão localizadas no domínio tripla-hélice da proteína relacionadas ao fenótipos de HPCG e SEDC (letal a leve). Das duas mutações restantes, uma está localizada no domínio N-propeptídeo (fenótipo de collagenopatia tipo II não específica) e outra no domínio C-propeptídeo (Displasia de Torrance) e ambas representam a troca do aminoácido cisteína.

#### 4.2.1 Acondrogênese do tipo II

Dois pacientes da casuística apresentaram o fenótipo de ACGII. Na paciente 1 foi encontrada a mutação p.G453D (28). Na paciente 2 (Figura 9) foi encontrada a troca G>A, em heterozigose em sítio doador de splice (primeira base após o término do éxon 36 - c.2409+1G>A), portanto uma alteração obrigatoriamente patogênica. Com essa alteração ocorre a tradução de 83 aminoácidos que não pertencem à proteína normal até chegar a um *stop códon* (TAA) como mostra a figura 10.



**Figura 9:** Raio-x pós-órbito da paciente 2 na parte superior da figura. É possível observar um atraso de ossificação de coluna (cervical e sacral), encurtamento de ossos longos e ausência de púbis. Na parte inferior da figura, pode-se observar o sequenciamento do pai no eletroferograma A apresentando somente um pico de G e o sequenciamento do paciente no eletroferograma B apresentando a troca G>A em heterozigose.

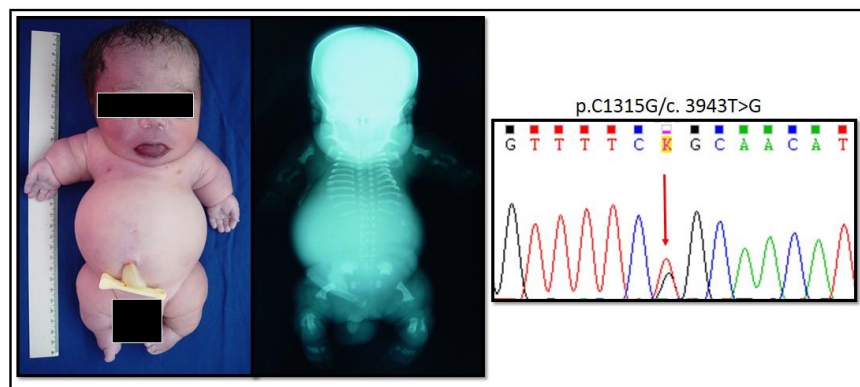


**Figura 10:** Esquema da alteração em sítio de splice, mostrando a formação do stop *códon* (em laranja) após 83 aminoácidos depois do éxon 36. A letra “a” em vermelho representa o nucleotídeo que foi trocado (G>A).

Essa alteração (c.2409+1G>A) obviamente não foi encontrada no sequenciamento do pai nem no sequenciamento de 72 cromossomos controles. O sequenciamento da mãe não foi possível devido ao material biológico insuficiente para a análise e pela impossibilidade de recoleta.

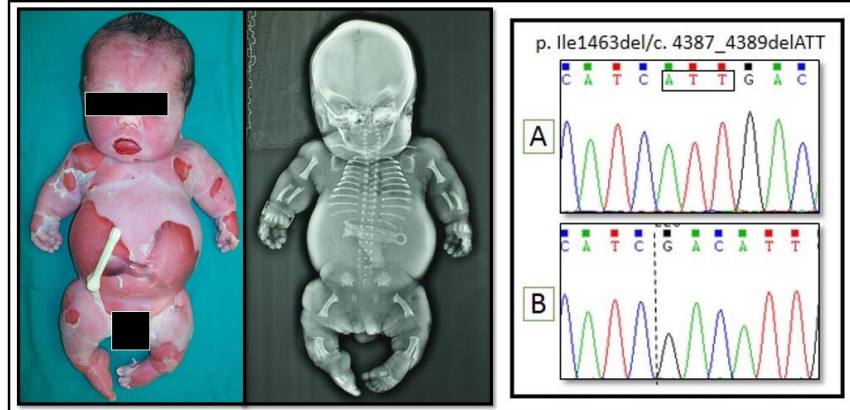
#### 4.2.2 Displasia platisspondilíaca do tipo Torrance

Nos pacientes com diagnóstico de PLSD-T, foram encontradas duas alterações inéditas em domínio C-propeptídeo. Na paciente 5 (Figura 11), foi encontrada a mutação do tipo *missense* p.C1315G localizada no éxon 52. Essa mutação não foi encontrada na mãe e nem em 104 cromossomos controles.



**Figura 11:** À direita, foto e raio-X do paciente 5. Pode-se observar no raio-X um atraso de ossificação de coluna (cervical e sacral), encurtamento e discreto encurvamento de ossos longos, hipoplasia de púbis e comprometimento metafisário.

No paciente 6, foi encontrada no éxon 54 a deleção do aminoácido isoleucina na posição 1463 da proteína, ilustrada na Figura 12. Essa deleção esteve ausente em 98 cromossomos controles.



**Figura 12:** À direita, foto e raio-X do paciente 6. Pode-se observar no raio-X um atraso de ossificação de coluna (cervical), platispondilia, encurtamento de ossos longos, atraso de ossificação de joelho e bacia em caracol. À esquerda, eletroferogramas do sequenciamento do paciente 6: A e B representam o sequenciamento dos dois alelos obtidos após a clonagem do éxon 54 do paciente 6 (A: alelo normal/ B: alelo com o códon ATT deletado).

#### 4.2.3 Hipocondrogênese

O paciente 3 apresentou a troca inédita de uma glicina para o ácido aspártico no códon 609 (p.G609D/c. 1826G>A). A mutação esteve ausente em 100 cromossomos de controles bem como nos bancos de dados pesquisados.

Para o paciente 4 a pesquisa de mutação no gene *COL2A1* foi inconclusiva devido ao material biológico insuficiente para a realização de todas as análises. Foram sequenciados apenas 13 éxons e nenhuma mutação foi encontrada.

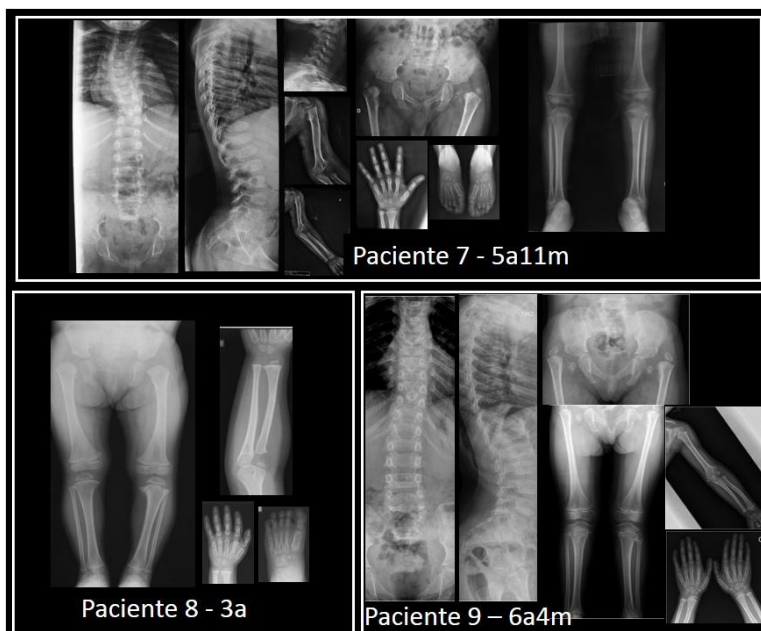
#### 4.2.4 Displasia espondiloepifisária congênita

Dos 15 pacientes da casuística com diagnóstico de SEDC, foram encontradas mutações em 13 deles. Embora todas as mutações encontradas estejam no domínio tripla-hélice, uma parte delas (38,5%) se concentra na região central desse domínio entre os éxons 23 e 27. Dentre as 10 mutações diferentes encontradas, 8 mutações são inéditas (p.G516S, p.G528A, p. G570D, p.G708R, p.G498D, p.G687R, p.G1080V e p.G1149R) e resultam na troca do aminoácido glicina por um aminoácido mais volumoso no domínio tripla hélice. Essas alterações foram consideradas patogênicas por todos os algoritmos utilizados e não foram encontradas nos controles estudados.

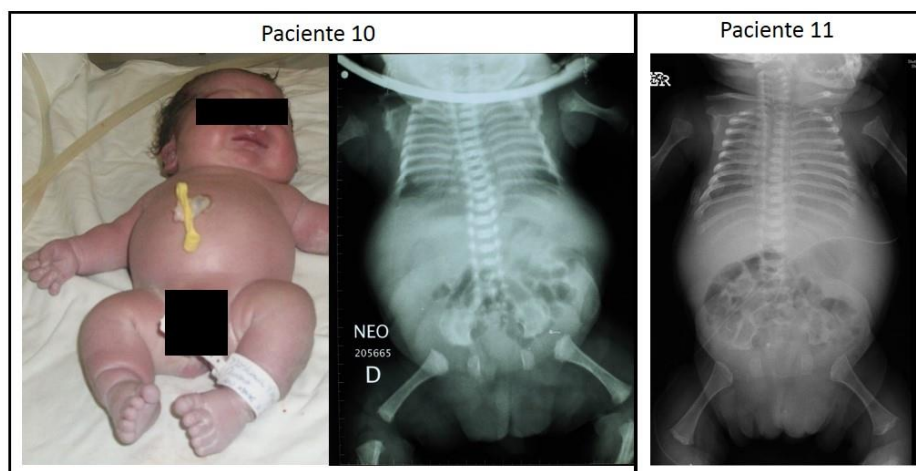
Houve a recorrência de duas mutações em pacientes com SEDC. A mutação p.R989C foi encontrada nos pacientes 7, 8 e 9 (Figura 13) e dois deles (7 e 9) apresentaram um fenótipo de SEDC considerado grave tanto pela baixa estatura como pela coxa vara



(SEDC-G). A terceira paciente que apresentou essa mutação, de acordo com a evolução (4 anos), espera-se que ela tenha evolução clínica similar a dos outros pacientes. A mutação p.G594E foi encontrada nos pacientes 10 e 11 (Figura 14) que apresentaram um fenótipo de SEDC-letal visto que morreram aos 3 meses de vida.



**Figura 13:** Raio-x dos pacientes 7, 8 e 9 que apresentaram a mutação recorrente p.R989C. é possível observar nos raios-x de quadril dos paciente 7 e 9 uma *coxa vara*. No raio-X da paciente 8, ainda não é possível observar tão achado em razão da idade. Os pacientes também apresentam um envolvimento metafisário, encurtamento de ossos longos e acetábulo atípico.



**Figura 14:** Fotos e raios-x dos pacientes 10 e 11 no período perinatal. Pode-se observar nos raios-x dos dois pacientes atraso de ossificação e coluna (sacral e cervical), encurtamento de ossos longos e hipoplasia de púbis.

#### **4.2.5 Displasia espondilometaepifisária do tipo Strudwick**

No sequenciamento da paciente 18 foi encontrada a troca de uma glicina para uma arginina no éxon 48 (p.G1122R/c.3364G>A) descrita por Walter e colaboradores em 2007 (79).

#### **4.2.6 Displasia de Kniest**

No paciente 20 foi encontrada a deleção de 28 pares de base na junção éxon 14-íntron14, deletando o sítio doador de *splice*, descrita pela primeira vez por Winterpacht *et al.* em 1993 (21).

No paciente 31, foi encontrada a mutação p.A905V descrita por Bogaert e colaboradores em 1994 (80).

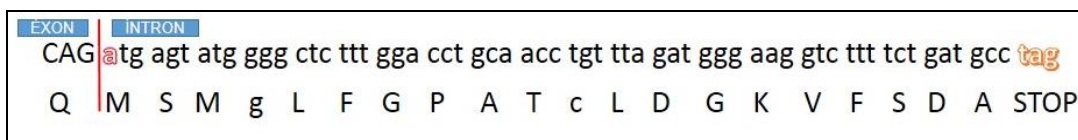
A paciente 19 teve o sequenciamento completo do gene *COL2A1* e não apresentou nenhuma alteração com potencial patogênico. Também foi realizado o sequenciamento do gene *CANT1* devido à segunda hipótese diagnóstica de displasia de Desbuquois, e não foi encontrada alteração patogênica. Recém avaliada (14 anos), levantou-se a suspeita de alterações no colágeno do tipo 11, baseado no quadro-clínico radiológico.

#### **4.2.7 Osteoartrite familiar**

Para a paciente 30, filha de pai com osteoartrite, foi realizada a investigação de todo o gene *COL2A1* e não foi encontrada nenhuma alteração patogênica.

#### **4.2.8 Síndrome de Stickler**

O paciente 22 apresentou a troca inédita em heterozigose de uma guanina por uma adenina no primeiro nucleotídeo após o éxon 31 (c.2049+1G>A), sítio obrigatório de *splice*. Espera-se que essa alteração inclua o íntron 31 no RNAm. Assim, na tradução, são adicionados 20 aminoácidos até chegar a um *stop códon* (TAG) como mostra a Figura 15. A alteração não foi encontrada no sequenciamento do DNA dos pais e de 98 cromossomos controles. Além disso, o paciente teve todo o gene sequenciado e nenhuma outra alteração com potencial patogênico foi encontrada.



**Figura 15:** Esquema da alteração em sítio de splice do paciente 22, mostrando a formação do stop códon (em laranja) após 20 aminoácidos depois do éxon 31. A letra “a” em vermelho representa o nucleotídeo que foi trocado (G>A).

#### 4.2.9 COL2A1

Para dois pacientes da casuística, não foi possível estabelecer um fenótipo específico dentre as collagenopatias do tipo II.

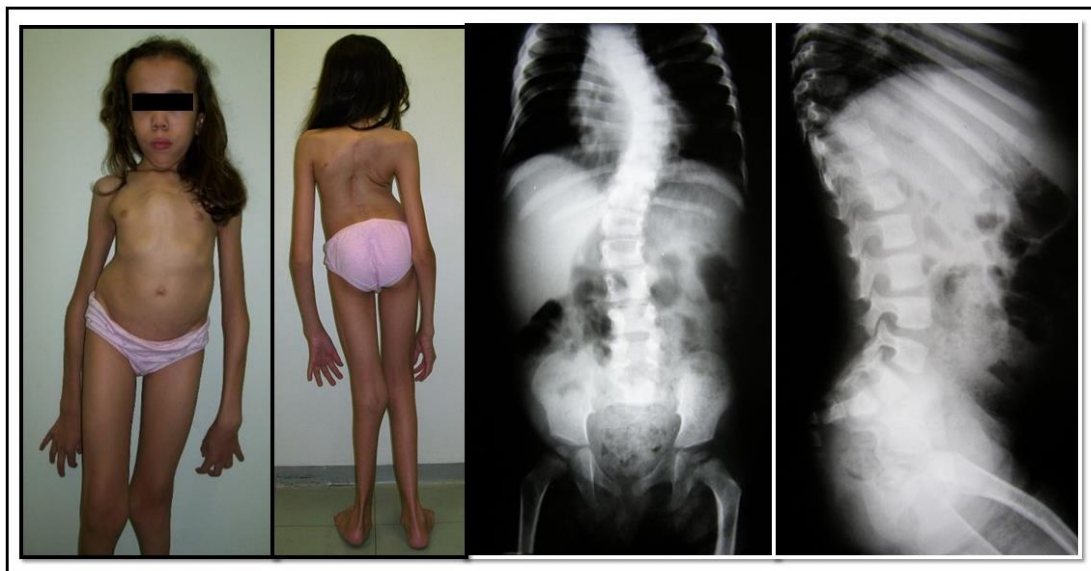
Na paciente 13, cujo fenótipo clínico e bacia (raio-X – Figura 16) são sugestivos de collagenopatia do tipo II, a mutação p.C55Y encontrada é inédita e está localizada no éxon 2, no domínio N-propeptídeo da proteína. A mesma alteração foi encontrada no DNA do pai. A mãe não apresentou tal alteração. A análise *in silico* é compatível com patogenicidade. Além disso, a alteração não foi encontrada em nenhum dos 100 cromossomos controles. O sequenciamento completo dessa paciente não mostrou nenhuma outra alteração com potencial patogênico.



**Figura 16:** Fotos e raio-X da paciente 13. Pode-se observar no raio-X à direita o quadril típico de collagenopatia do tipo II.

Na paciente 27 (Figura 17), cujo diagnóstico de collagenopatia do tipo II se baseou na associação de: surdez, miopia, perfil fácil achatado, desproporção corporal e padrão radiológico tipo espondiloepifisário. Nessa paciente, embora o sequenciamento

completo do *COL2A1* não tenha mostrado nenhuma alteração patogênica, o sequenciamento mostrou-se atípico, uma vez que, diferente dos outros pacientes, nessa paciente observou-se somente uma alteração em heterozigose localizada no íntron 1 (rs76609872). Essa mesma alteração foi encontrada no sequenciamento do DNA da mãe do paciente.



**Figura 17:** Fotos clínicas e raio-X de coluna e quadril da paciente 27. É possível observar no raio-X o quadril típico de colagenopatia do tipo II.

Foi realizada PCR pelo método de QMPSF dos éxons 1, 2, 36 e 54 para pesquisar possíveis deleções desses éxons, mas não foi possível a análise dos resultados.

Os pacientes 23, 24, 25 e 26 tiveram todo o gene *COL2A1* sequenciado e nenhuma mutação foi encontrada.

#### **4.2.10 Estudo em controles**

As alterações potencialmente deletérias identificadas nos pacientes estudados foram investigadas em aproximadamente 100 cromossomos de indivíduos controles. Nenhum dos cromossomos apresentou a alteração pesquisada. O quadro 7 apresenta o número de controles analisados para cada mutação nova.

**Quadro 7:** Relação dos pacientes que apresentaram mutações inéditas e o número de cromossomos analisados em cada caso

PACIENTE	PROTEINA	cDNA	CROMOSSOMOS ANALISADOS
2	-	2409+1G>A	86
3	<b>G609D</b>	1826G>A	100
5	<b>C1315G</b>	3943T>G	104
6	<b>Ile1463del</b>	4387_4389delATT	100
12	<b>G516S</b>	1546G>A	114
13	<b>C55Y</b>	164G>A	100
15	<b>G528A</b>	1583G>C	114
16	<b>G708R</b>	2122G>C	88
17	<b>G498D</b>	1493G>A	100
21	<b>G570D</b>	1709G>A	114
22	-	2049+1G>A	102
28	<b>G1080V</b>	3239G>T	100
29	<b>G1149R</b>	3445G>A	92
33	<b>G687R</b>	2059G>C	72

#### 4.2.11 Análise *in silico* das mutações novas

Todas as alterações potencialmente patogênicas foram comparadas com bancos de dados (*Ensembl*, HGMD®, dbSNP e *Exome Variant Server*). Essas mutações não foram encontradas em nenhum dos bancos de dados citados.

Para as mutações *missenses* inéditas, também foi realizada a análise *in silico* para a predição de patogenicidade. O Apêndice 3 mostra os resultados obtidos em cada algoritmo. Entre parênteses estão os valores de probabilidade de patogenicidade da alteração (quando a predição é >0,5: patogenicidade). Todas as análises *in silico* resultaram em patogenicidade.

A análise *in silico* da deleção do códon ATT no paciente 6 foi realizada pelo algoritmo *Mutation Taster* e a alteração foi considerada patogênica.

Para as alterações intrônicas encontradas nos pacientes 2 e 22, também foi realizada a análise *in silico*. Esses algoritmos mostraram que, para as duas alterações, ocorre a abolição do sítio doador de *splice*, portanto, tornando tais alterações obrigatoriamente patogênicas.





## ***5 - DISCUSSÃO***





As collagenopatias do tipo II formam um grupo heterogêneo de displasias esqueléticas causadas por mutações, na maioria das vezes “privadas”, no gene que codifica o colágeno do tipo II, o *COL2A1*. A correlação genótipo-fenótipo nas collagenopatias do tipo II é prejudicada pela grande variação fenotípica e pelas transições fenotípicas idade-dependente (53).

No presente trabalho, foram investigados 33 pacientes com quadro clínico-radiológico típico ou suspeito de collagenopatias do tipo II.

Se fosse realizado o sequenciamento completo do gene *COL2A1* para os 33 pacientes, no total seriam sequenciados 1782 éxons. Utilizando a estratégia de estudo proposta (sequenciamento das regiões relacionadas a cada fenótipo) foi realizado o sequenciamento de 1151 (64,59%) éxons. Retirando aqueles pacientes com diagnóstico duvidoso de collagenopatia do tipo II (pacientes 19, 24, 25 e 26) em que o sequenciamento do gene *COL2A1* foi realizado principalmente para a exclusão de mutação nesse gene, pôde-se obter um valor mais real em relação a essa estratégia: se fosse realizado o sequenciamento completo dos 29 pacientes com diagnóstico típico seriam sequenciados 1566 éxons e com a estratégia utilizada foram sequenciados 935 (59, 70) éxons. Assim, a estratégia de estudo utilizada mostrou-se eficaz para o sequenciamento de um gene grande como o *COL2A1*, facilitando o estudo deste.

A troca do aminoácido glicina do domínio tripla hélice da proteína é a troca mais frequente e vários estudos demonstraram que essa troca tem importantes consequências funcionais, no entanto tem sido difícil estabelecer uma relação entre a mutação e a gravidade do fenótipo (32,33). Dos 23 pacientes com mutação no gene *COL2A1*, foram encontradas 20 diferentes mutações. Destas mutações, 12 (60%) levam a troca do aminoácido glicina. Uma das trocas do aminoácido glicina que se destacou foi a Gly→Asp por ter aparecido com uma maior frequência e em fenótipos diferentes. Na nossa casuística, essa troca foi encontrada em pacientes com ACGII (éxon 21), HPCG (éxon 27) e em dois pacientes com SEDC (éxons 23 e 26). No Quadro 8 estão todas as mutações que levam a troca Gly→Asp descritas na literatura até o momento incluindo as mutações encontradas no presente estudo. Nota-se que esse tipo de troca aparece em 9 diferentes fenótipos com gravidade diferente sendo, portanto, difícil uma correlação genótipo/fenótipo.

**Quadro 8:** Relação das mutações que levam a troca do aminoácido glicina pelo o ácido aspártico com seus respectivos fenótipos e referência.

Mutação	Éxon	Domínio	Fenótipo	Autor
G267D	12	Tripla hélice	Síndrome de Stickler	Korkko <i>et al.</i> , 1993 (14)
G303D	14	Tripla hélice	Displasia de Kniest	Wilkin <i>et al.</i> , 1994 (81)
G327D	16	Tripla hélice	Displasia de Kniest	Weis <i>et al.</i> , 1998 (82)
G405D	19	Tripla hélice	Displasia espondiloepifisária	Meredith <i>et al.</i> , 2007 (53)
G453D	21	Tripla hélice	ACGII	Korkko <i>et al.</i> , 2000 (28)
G459D	22	Tripla hélice	HPCG	Nishimura <i>et al.</i> , 2005 (19)
G462D	22	Tripla hélice	Strudwick	Tysoe <i>et al.</i> , 2003 (52)
<b>G498D</b>	<b>23</b>	<b>Tripla hélice</b>	<b>SEDC</b>	<b>Presente estudo</b>
G510D	24	Tripla hélice	ACGII	Bonaventure <i>et al.</i> , 1995 (29)
G516D	24	Tripla hélice	ACGII	Faivre <i>et al.</i> , 2004 (22)
<b>G570D</b>	<b>26</b>	<b>Tripla hélice</b>	<b>SEDC-G</b>	<b>Presente estudo</b>
<b>G609D</b>	<b>27</b>	<b>Tripla hélice</b>	<b>HPCG</b>	<b>Presente estudo</b>
G624D	28	Tripla hélice	Displasia espondiloepifisária	Nishimura <i>et al.</i> , 2005 (19)
G753D	34	Tripla hélice	Diespondiloencondromatose	Nakane <i>et al.</i> , 2011 (51)
G759D	34	Tripla hélice	Displasia espondiloepifisária	Meredith <i>et al.</i> , 2007 (53)
G768D	35	Tripla hélice	ACGII	Comstock <i>et al.</i> , 2010 (31)
G771D	35	Tripla hélice	ACGII	Korkko <i>et al.</i> , 2000 (28)
G936D	42	Tripla hélice	HPCG	Nishimura <i>et al.</i> , 2005 (19)
G948D	42	Tripla hélice	ACGII	Korkko <i>et al.</i> , 2000 (28)
G1152D	49	Tripla hélice	SEDC	Zhang <i>et al.</i> , 2011 (83)
G1188D	50	Tripla hélice	HPCG	Nishimura <i>et al.</i> , 2005 (19)
G1305D	52	C-propeptídeo	Vitreoretinopatia com displasia falangeal epifisária.	Richards <i>et al.</i> , 2002 (84)

## 5.1 As mutações e os vários fenótipos

### 5.1.1 Acondrogênese do tipo II

Até o momento, foram descritas 21 mutações em pacientes com ACGII das quais 20 levam a troca da glicina por um aminoácido mais volumoso e 5 delas são a substituição por um ácido aspártico (20,22,28–33). Essas mutações se encontram no domínio tripla hélice em um dos tripletos Gly-X-Y. Na presente casuística foi encontrada a mutação do tipo *missense* c.1358G>A (p.G453D) na paciente 1. Essa mutação encontra-se no éxon 21 no domínio tripla hélice do colágeno do tipo II e foi descrita pela primeira vez por Korkko e colaboradores em 2000 (28) em um paciente com mesmo diagnóstico. Na paciente 2 foi encontrada uma alteração inédita – a troca de G>A, em heterozigose, em sítio doador de *splice* (primeira base após o término do éxon 36 - c.2409+1G>A), portanto uma alteração obrigatoriamente patogênica. De acordo com a análise *in silico*, essa troca abole o sítio doador de *splice* responsável pela retirada do íntron 36.

Não ocorrendo a retirada do íntron 36, espera-se que o íntron 36 passe a compor o RNAm, sendo traduzido 83 aminoácidos que não pertencem à proteína normal até encontrar um *stop codon* TAA. Assim, essa proteína formada não terá a função esperada sendo, provavelmente, degradada ou produzindo o decaimento de RNAm. Essa mutação não foi encontrada em 86 cromossomos controles e em nenhum dos bancos de dados utilizados para análise.

A ausência dessa mutação em controles bem como em bancos dados disponíveis e no pai, corrobora para a patogenicidade da alteração. Entretanto, a ideia de paternidade ilegítima não pode ser descartada.

Mutações em heterozigose em sítio de *splice* representam aproximadamente 16% das mutações no gene *COL2A1* e, normalmente, estão relacionadas com fenótipos mais leves.

### **5.1.2 Displasia platisspondiliáca do tipo Torrance**

O domínio C-propetideo é essencial para a associação e subsequente formação da tripla hélice (85). O sequenciamento do domínio C-propeptideo dos pacientes 5 e 6, com diagnóstico de PLSD-T, apresentaram as seguintes alterações: p. C1315G e p. Ile1463del.

Dos 18 pacientes com PLSD-T descritos na literatura até o momento, 16 apresentam mutações em heterozigose no domínio C-propeptideo nos éxons 51, 53 e 54 e somente dois (irmãos) apresentaram mutação no éxon 50, localizado no final do domínio tripla hélice (13,34–37,86). Mutações no domínio C-propeptideo rompem a tripla hélice em uma fase inicial da formação desta, e tendem a produzir fenótipos mais graves (52). Até o momento, nenhuma mutação foi descrita no éxon 52 em pacientes com PLSD-T, como a mutação encontrada no paciente 5.

### **5.1.3 Hipocondrogênese**

O paciente 3 apresentou a troca de uma glicina para o ácido aspártico no códon 609 (p.G609D/c. 1826G>A). Essa mutação é inédita e não foi encontrada no sequenciamento de 100 cromossomos controles e nos bancos de dados. Até o momento, foram descritas 20 mutações relacionadas a HPCG e todas representam a troca da glicina e 3 delas resultam no aminoácido aspartato.

O estudo do paciente 4 foi inconclusivo devido ao material biológico insuficiente.

#### 5.1.4 Displasia espondiloepifisária congênita

A SEDC é o fenótipo mais comum entre as collagenopatias do tipo II (87). Dos 15 pacientes da casuística com diagnóstico de SEDC, foram encontradas mutações em 13 deles. A maioria das mutações encontradas nesses pacientes se localizaram no centro do domínio tripla-hélice, entre os éxons 23 e 27. No entanto, não foi possível estabelecer uma relação entre a posição e a gravidade do fenótipo para as mutações nesse local. De acordo com o banco de dados HGMD, são conhecidas 19 mutações localizadas entre esses éxons que estão relacionadas com diferentes fenótipos (síndrome de Stickler, ACGII, SEMD-Strudwick, SEDC e HPCG) e o fenótipo de SEDC representa 36,85% deles.

Dentre as 13 mutações encontradas, 8 mutações são inéditas (p.G516S, p.G528A, p.G570D, p.G708R, p.G498D, p.G687R, p.G1080V e p.G1149R) e resultam na troca do aminoácido glicina por um aminoácido mais volumoso no domínio tripla hélice. Essas alterações foram consideradas patogênicas por todos os algoritmos utilizados e não foram encontradas nos controles estudados. Até o momento, foram descritas 30 mutações do tipo *missense* relacionadas com SEDC e 23 (76,67%) delas representam substituições da glicina em tripla hélice. A troca do aminoácido glicina pelo aminoácido arginina apareceu com uma maior frequência nos pacientes com o fenótipo de SEDC (30%) mas não apresentou nenhuma relação com a gravidade.

Houve a recorrência de duas mutações em pacientes com o fenótipo de SEDC. Nos pacientes 10 e 11 foi encontrada a mutação p.G594E. Esses pacientes apresentaram um quadro mais grave de SEDC, e morreram aos 3 meses de vida. A mutação p.G594E foi descrita pela primeira vez por Meredith e colaboradores (2007) (53) em 3 pacientes que também apresentavam o fenótipo de SEDC. Entretanto, as idades dos pacientes descritos foram de 1, 3 e 30 anos de idade. Como o artigo possuía um foco oftalmológico, pouco foi relatado sobre fenótipo. Até o momento, não foi descrita outra recorrência dessa mutação. De todo modo, vista a distribuição das idades dos pacientes descritos e a letalidade nos primeiros meses de vida dos casos dessa casuística, pode-se talvez atribuir a letalidade desses pacientes à anatomia desfavorável que os pacientes aqui estudados apresentavam na região torácica.

A paciente 28, foi encaminhada por um dos grupos colaboradores com fenótipo de collagenopatia do tipo II e, após reavaliação clínico-radiológica, foi classificada com um fenótipo leve de SEDC. O sequenciamento do DNA da paciente apresentou a mutação inédita p.G1080V.

Essa alteração não foi encontrada em nenhum dos bancos de dados nem em 96 cromossomos controles.

Até o momento foram descritas 12 mutações (códon 144, 222, 453, 468, 477, 492, 522, 546, 717, 1017, 1065 e 1128) que levam a troca da glicina para a valina, relacionadas com diferentes fenótipos como ACGII, HPCG, displasia de Kniest, Síndrome de Stickler e SEMD-Strudwick.

A troca do aminoácido glicina é a troca mais frequentemente encontrada no gene *COL2A1* seguida pela troca do aminoácido arginina. Em três pacientes (pacientes 7, 8 e 9) que apresentaram uma forma mais grave de SEDC com *coxa vara*, houve a recorrência da mutação p.R989C (c.2965C>T). A discussão sobre essa mutação se encontra no tópico 5.1.4.1 *Artigo produzido com base na dissertação* em que os pacientes estão identificados por: paciente 7 = patient 1; paciente 8 = patient 2; paciente 9 = patient 3.

*5.1.4.1 Manuscrito submetido à revista American Journal of Medical Genetics: Part A produzido com base na dissertação*

### **The SEDC Spectrum and the Progression of the Radiological Findings in Patients with the Recurrent p.R989C Mutation in the *COL2A1* gene**

Karina C Silveira<sup>1</sup>, Luciana C Bonadia<sup>1</sup>, Andrea Superti-Furga<sup>2</sup>, Débora R Bertola<sup>3</sup>, Alexander A L Jorge<sup>4</sup>, Denise P Cavalcanti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Skeletal Dysplasia Group, Department of Medical Genetic, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP – Brazil

<sup>2</sup> Department of Pediatrics, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, University of Lausanne (CHUV), Lausanne, Switzerland

<sup>3</sup> Genetics Unit, Children's Institute, Clinical Hospital, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP - Brazil

<sup>4</sup> Department of Endocrinology, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP - Brazil

Key words: SEDC, R989C mutation, *COL2A1*, type 2 collagenopathie, *coxa vara*.

Spondyloepiphyseal dysplasia congenita (SEDC – OMIM 183900) was first described by Spranger and Wiedemann in 1966 and it was named so because the most striking changes are observed in the spine and proximal epiphyses [Spranger and Langer, 1970]. Clinically, it is characterized by disproportionate short stature with short trunk and normal hands and feet. The causal association with type II collagen was initially observed due to abnormal mobility of this collagen in cases of SEDC [Murray and Rimoin, 1985]. Then it was mapped on the 12q chromosome [Goldberg et al, 1989; Anderson et al, 1990] and finally heterozygous mutations in *COL2A1* were associated with patients with SEDC phenotype [Lumadue et al, 1988; Lee et al., 1989].

All the skeletal disorders associated with heterozygous mutations of *COL2A1* are collectively named type 2 collagenopathies, and among them the classical SEDC spectrum includes achondrogenesis type II, hypochondrogenesis and the dysplasia spondyloepiphyseal congenita (SEDC). Because of the clinical heterogeneity, two variants of the SEDC were proposed by Wynne-Davies and Hall (1982) – one milder, and the other more severe and including very short stature and severe hips changes. Lately, Nishimura et al. (2005) rescued this subdivision of the SEDC and named SEDC with severe *coxa vara* (SEDC-S) and SEDC with mild *coxa vara* (SEDC-M).

The *COL2A1* gene is responsible for encoding the type II collagen, a fibrillar protein initially synthesized as type II procollagen in the chondrocytes. The procollagen is composed by an extended triple helical domain, and also by two other domains - the N-terminal and C-terminal propeptides. The type II collagen is a homotrimer composed by three  $\alpha$ -1 (II) chains containing characteristic Gly-X-Y repeat sequence that forms a triple-helical structure [Prockop and Kivirikko, 1995]. Usually, the X position is occupied by a proline residue and the Y position by a hydroxyproline one [Prockop and Kivirikko, 1995]. The most common types of mutations are missense changes with substitution of a glycine in the triple-helical residue of the alpha1 (II) chain. Usually the glycine is replaced by a bulkier amino acid [Rimoin, 1996; Zhang et al., 2011]. So far, approximately 350 mutations have been described in the *COL2A1* gene [The Human Gene Mutation Data Base, <http://www.hgmd.org/>], the majority of them being Gly-X change and private mutations. Some other few mutations are recurrent [Tysoe et al., 2003]. Interestingly, these recurrent changes are usually non-glycine missense mutations and the majority is arginine-to-cysteine substitution [Bleasel et al., 1996b]. Five recurrent Arg-Cys

mutations have been described - p.R275C , p.R565C, R904C, p.R719C, p.R989C, and they are respectively associated with the following phenotypes: Czech dysplasia, Stickler syndrome, Osteoarthritis, Stickler syndrome again and SEDC [Ala-Kokko et al.,1990; Williams et al., 1993; Chan et al., 1993; Ballo et al., 1998; Richards et al., 2000]. More recently another Arg-Cys substitution was described - p. R1276C, but no recurrence was yet reported [Hoornaert et al., 2006]. Seven patients, all presenting the severe form of the SEDC, have been reported with the p.R989C mutation [Chan et al., 1993; Chan et al., 1995; Nishimura et al., 2005; Hoornaert et al., 2006; Zhang et al., 2011]. We report here 6 new patients with SEDC due to recurrent p.R989C mutation in *COL2A1* showing the follow-up from birth to adulthood and emphasizing the progression of the radiological findings. The clinical data of the patients are shown in table I. Because of the history of short long bones in prenatal ultrasound examinations, the investigation of the short stature begun from birth in patient 1, and from 3 months in patient 2. Unfortunately, patient 1 lost the follow-up at age of 3 months and just came back at age of 5 years. The other four patients begun the short stature investigation during early childhood. Clinically, all patients showed disproportionate short stature with short trunk with increasing of the lumbar lordosis (around the age of three years) and progressively waddling gait and scoliosis (around 3-5 years old). All of them have normal hands and feet as well as normal neuromotor development. At birth length ranged from 0.2 to -3.2 SD, and the short stature ranged from -3.8 to -6.7 SD at childhood. The only adult patient in this cohort has -8.6 SD (table I). Cleft palate, hearing loss were not observed in any of these six patients. Visual impairment (myopia) was detected in patient 3 at age of 8.6 years. Radiologically it was possible to observe ovoid shape of the vertebral bodies, retarded epiphyseal ossification, especially in the knees, proximal femur and wrists, and absence of ossification of the pubis from the first months of life (Figure 1). Later the following radiological changes begun to appear: some platyspondyly; progressive scoliosis; short long bones with retarded ossification of the epiphyses and some involvement of the metaphysis, especially those of knees; short iliac; very late ossification of femur heads, and progressive and severe *coxa vara*. In addition in the patient 2 we have also observed corner fractures from 24 months, and hypoplasia of the distal phalanges of the feet, especially those of the first toes that seem a bipartite phalange. Patient 6 presented a very severe *coxa vara* and also some bone fragments in the growth plates of the proximal femur. Progressive changes in the hips, spine and knees can be seen in the figures 2, 3 and 4. In all patients the direct sequencing by the Sanger

method revealed a heterozygous C-to-T transition mutation at codon 2965 (c.2965 C>T – p.R989C) in the exon 43 of the *COL2A1* gene.

Among the reported patients with the p.R989C mutation, little has been described about the follow-up and the radiological features are briefly resumed as characteristic of SEDC [Hoornaert et al., 2006; Zhang et al., 2011]. As previously reported by others all the patients presented here share a phenotype of severe short stature with short trunk and hands and feet normal. The severity of the disproportionate short stature of the present patients fit with the progressive short long bones associated with the progressive kyphoscoliosis plus lumbar hyperlordosis rather than platyspondyly that seems slight. In addition, the severe *coxa vara*, although not exclusively associated with the mutation p.R989C, seems to be a constant feature of the phenotype SEDC due p.R989C mutation.

Corner fractures have been especially described in spondylometaphyseal dysplasia corner fracture type, also named Sutcliffe type (OMIM 184255). However, these metaphyseal bone fragments also have been recognized in some cases of SEDC, metaphyseal dysplasia Jansen type and even as radiological finding of child abuse [Spranger et al., 2012]. Although named corner fractures, these bone fragments rather than real fractures are considered as extra ossification centers [Spranger et al., 2012]. The progression of the corner fractures seen in patient 2 between the ages of 21 months and 3 years (Figure 4) corroborate with the idea of extra ossification centers. We believe also that the bipartite distal phalanges of the first toes in this same patient (Figure 1 – patient 2) could be considered as extra ossification centers.

Because the recurrence of mutations in the Arg codons, these positions may represent mutational hot spots in *COL2A1* [Ala-Kokko et al., 1990; Chan et al., 1993; Williams et al., 1993; Bleasel et al., 1996b; Ballo et al., 1998; Richards et al., 2000; Hoornaert et al., 2006]. It is of diagnostic relevance that some of these mutations seem to cause unusual phenotypes within the spectrum of type II collagenopathies [Hoornaert et al., 2006]. Arginine to cysteine recurrent mutations cause a spectrum of phenotypes, including classic SEDC and Stickler dysplasia, but also different unusual phenotypes, the phenotypic spectrum of SEDC is also very wide [Zhang et al., 2011].

So far, 41 missense mutations associated with SEDC have been described. Thirty-four are represented by a glycine substitution in the triple helical domain. The other missense mutations described in the triple helical domain are p.P786L, and two arginine substitution – p.R989C and



p.R992G [Zhang et al., 2011]. The four remaining missense mutations are located in C-propeptide domain, and none is a glycine substitution – p.Y1298N, p.T1370M, p.T1439M, and p.I1450T [Unger et al., 2001; Nishimura et al., 2005; Zhang et al., 2011].

The effects of these Arg-Cys mutations on in vitro fibril formation using recombinant type II collagen have been described in several studies [Fertala et al., 1996; Fertala, et al.; 1997; Steplewski et al., 2004; Hoornaert et al., 2006]. Collagen molecules with the p.R275C substitution have a normal structure, which are able to form normal fibrils. Collagen homotrimers with the p.R719C mutation also have a normal structure but when mixed with the wild type collagen they develop abnormal fibrils. Unlike the other two mutations, the p.R989C collagen homotrimers are characterized by an abnormal structure with a kink at the site of the mutation [Steplewski et al., 2004; Hoornaert et al., 2006]. In addition, the p.R989C mutation seems to change the thermostability of the collagen triple helix [Hoornaert et al., 2006]. These observations might explain the more severe phenotype associated with the p.R989C mutation in comparison to the other changes located at the amino-terminal region [Hoornaert et al., 2006].

In summary, we report six new patients with the SEDC severe phenotype, all associated with the p.R989C mutation in *COL2A1* gene. For the first time the follow-up of the radiological findings from birth to adulthood related to this mutation are reported, including corner fracture and a few usual features associated with SEDC. The most important radiological findings that seem to be characteristic of this mutation are severe *coxa vara* plus progressive kyphoscoliosis.

## References

Vide Apêndice 4.

**Table I: Clinical data of the patients with p.R989C.**

Pt	Sex	PA	M A	PN- US	GA (wks)	Delivery	Birth Weight (g)	Birth Weight SDS	Birth Length (cm)	Birth Length SDS	OFC (cm)	OFC SDS	NMF1	Last revision				Physical examination	
														Age (years)	Height (cm)	Height SDS	OFC (cm)		
1	M	25	33	a	37	Cesarean	3 325	1.2	45	-2.0	36	1.8	Normal	6.4	89	-5.6	52	Short neck and trunk, lumbar hyperlordosis, waddling gait	
2	F	36	28	b	41	Forceps	3 865	0.6	48	-1.9	37	1.8	Normal	3	79.5	-3.8	51	Short trunk, lumbar hyperlordosis, varism of lower limbs	
3	F	31	20	c	39	Forceps	1 990	-3.2	41	-5.1	32	-2.5	Normal	8.6	95.8	-6.7	54.5	Short trunk, lumbar hyperlordosis, left knee valgus	
4	M	NE	NE	NE	NE	NE	3 700	1.4	51	0.7	38	3.2	NE	8.3	101	-5.2	54.8	Short neck and trunk, lumbar hyperlordosis	
5	M	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	Short neck and trunk, lumbar hyperlordosis
6	M	29	30	NE	term	Cesarean	3 200	0.2	44	-3.2	NE	NE	Normal	21	113.2	-8.6	56	Short neck and trunk, lumbar hyperlordosis	

a = short long bones and polyhydramnios. b = short long bones. c = no reference to short long bone in four examinations. PA = paternal age; MA = maternal age. NMF1 = neuromotor function in infancy/childhood. NE: not specified. F: female. M: male.

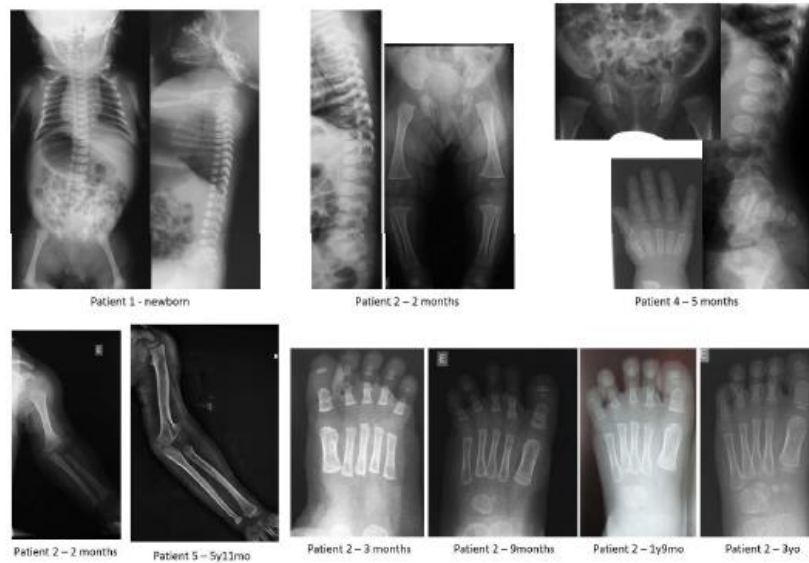


Figure 1 – Patient 1 (newborn) – short long bones, hypoplasia of pubis and ovoid vertebral bodies. Patient 2 (2 months) – ovoid vertebral bodies, hypoplasia of pubis, short long bones, small epiphysis on the knees and metaphyseal. Patient 4 (5 months) – shallow acetabula, absence of the proximal femoral epiphysis, retard of the carpal ossification and ovoid vertebral bodies. Patients 2 and 5 (2 months / 5y11mo) – short long bones in the upper limbs, especially the humerus, which show wide distal metaphysis. Patient 2 (3 / 9 / 21 months and 3 years old) – hypoplasia of the distal phalanges with, especially those from the big toes that show bipartite distal phalange.  
 254x190mm (300 x 300 DPI)



Figure 2 – Images of the hips at different ages in the several patients. The main features of the hip in SEDC are ilia short, shallow acetabula, and, pubis and ischio-pubic rami poorly ossified. In these patients, the follow-up have showed femoral head under ossified and severe coxa vara. Note also some bone fragments in the proximal femoral metaphysis in patient 6 at both ages – 4y1mo and 15 years.  
 254x190mm (300 x 300 DPI)

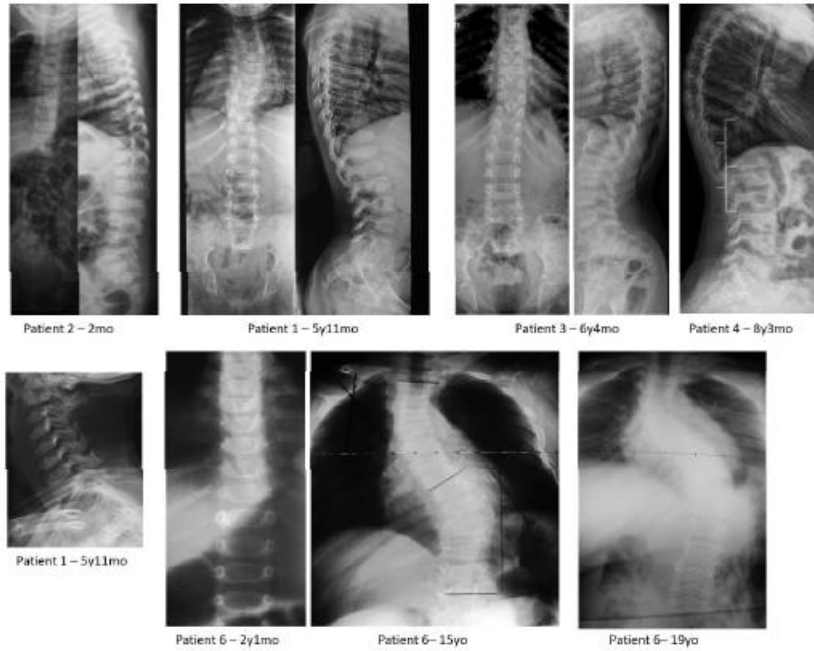


Figure 3 – Vertebral column of the six patients showing: some degree of flatness of the vertebral bodies and progressive scoliosis.  
254x190mm (300 x 300 DPI)



Figure 4 – Images of the knees at different ages. Note wide distal metaphysis of the femurs. The epiphyseal involvement is marked and especially in patient 6 at both ages 4.4 and 6.4 years. Note in patient 2 the presence of corner fractures that appear on distal femoral epiphysis and proximal tibial metaphysis and tend to disappear with age.  
254x190mm (300 x 300 DPI)

### 5.1.5 Displasia espondilometaepifisária do tipo Strudwick

A paciente 18, inicialmente diagnosticada com o fenótipo de SEDC, foi reavaliada com idade mais avançada as características radiológicas apresentaram um acometimento de metáfises grave que sugeria o diagnóstico de SEDC com envolvimento metafisário, fenótipo também referido na literatura como SEMD do tipo Strudwick (88). No sequenciamento dessa paciente foi encontrada a troca de uma glicina para uma arginina no éxon 48 (p.G1122R/c.3364G>A). Essa alteração foi descrita por Walter e colaboradores em 2007(79) em um paciente com 6 anos de idade que também apresentava um importante envolvimento metafisário. No mesmo artigo, Walter *et al.* sugerem que a troca da glicina pelo aminoácido arginina normalmente resulta em fenótipos com envolvimento metafisário. No entanto, de acordo com o banco de dados HGMD, são conhecidas 17 mutações que levam a troca Gly→Arg e que foram descritas em diversos fenótipos como ACGII, HPCG, SEDC e síndrome de Stickler.

Apenas oito mutações do tipo *missense* (p.354R, p.G462D, p.G492V, p.G753D, p.G891R, p.G909C, p.G1041S, p.G1122A) no gene *COL2A1* têm sido relacionadas com o fenótipo de Strudwick (49–53). Todas resultam na troca do aminoácido glicina para um aminoácido mais volumoso e estão no domínio tripla hélice.

O fenótipo clínico-radiológico da SEMD ou displasia de Strudwick só é possível com uma idade mais avançada, pois nos primeiros meses de vida até 1 ano de idade o padrão radiológico é indistinguível com uma SEDC típica.

### 5.1.6 Displasia de Kniest

No sequenciamento do paciente 20, foi encontrada a deleção de 28 pares de base na junção éxon 14-íntron 14, deletando o sítio doador de *splice*. Essa alteração foi descrita pela primeira vez por Winterpacht *et al.* em 1993 (21) em um paciente com o fenótipo da displasia de Kniest e também em sua mãe, cujo diagnóstico descrito como síndrome de Stickler. No entanto, nessa paciente a mutação foi observada em mosaïcismo somático. Essa deleção também foi encontrada em outro paciente com displasia de Kniest descrito por Wilkin e colaboradores em 1996(81). De acordo com Winterpacht *et al.*

(1993)(21), essa mutação é a primeira mutação no gene *COL2A1* relacionada à displasia de Kniest e esse foi o primeiro caso descrito de mosaïcismo somático no *COL2A1*.

No paciente 31, foi encontrada outra alteração (p.A905V) já descrita na literatura. Bogaert e colaboradores (1994) (80), descreveram essa alteração em um paciente com fenótipo de displasia de Kniest. Apesar da alteração encontrada ser uma mutação do tipo *missense*, ela cria um sítio de *splice* dentro do éxon 14, fazendo com que parte desse éxon seja retirado, juntamente com o íntron 14, no processo de *splicing*.

A maioria das mutações relacionadas à displasia de Kniest, são tipo deleções ou alterações em sítio de *splice* que resultam em deleções de éxons. De acordo com o banco de dados HGMD, até o momento, foram descritas 18 mutações relacionadas a esse fenótipo sendo a maioria delas encontradas nos éxons 14 e 46.

O sequenciamento completo do gene *COL2A1* da paciente 19, não apresentou nenhuma alteração patogênica. A reavaliação do quadro clínico-radiológica e os dados do período neonatal, levantou a suspeita de displasia de Desbuquois, condição de herança autossômica recessiva caracterizada por grave retardo de crescimento pré e pós-natal, encurtamento rizomélico de membros, hipoplasia torácica, anormalidades vertebrais e metafisárias e luxações articulares. Essa displasia está associada a mutações no gene *CANT1* (*Calcium-Activated Nucleotidase 1*) (89) que possui 4 éxons dos quais somente 3 são codificantes. Foi realizado o sequenciamento desse gene, porém nenhuma mutação foi encontrada. Como essa paciente só havia sido avaliada no período neonatal, a reavaliação clínico radiológica feita recentemente (paciente com 14 anos de idade) sugeriu que o seu fenótipo, possivelmente, esteja associado com mutações no colágeno do tipo 11.

### **5.1.7 Osteoartrite familiar**

Para a paciente 30, o sequenciamento do gene *COL2A1* não apresentou nenhuma mutação. Quadros de osteoartrite quando presente em outros membros da família têm sido associados com mutações no gene *COL2A1* e já foram descritas duas mutações do tipo *missense*, p. R719C e p.G1176S, de acordo com o banco de dados HGMD (43,90).

### 5.1.8 Síndrome de Stickler

De 5 pacientes com fenótipo sugestivo de síndrome de Stickler, foram encontradas alterações patogênicas em apenas um deles.

O paciente 22 apresentou a troca em heterozigose de uma guanina por uma adenina no primeiro nucleotídeo após o éxon 31 (c.2049+1G>A). Essa troca é uma mutação inédita e sua patogenicidade provavelmente está relacionada ao fato de a mesma ocorrer em sítio de *splice* obrigatório. Além disso, o paciente teve todo o gene sequenciado e não foi encontrada outra alteração com potencial patogênico. Até o momento, foram descritas mais de 180 mutações no gene *COL2A1* relacionadas com a síndrome de Stickler onde as mutações em sítio de *splice* e as pequenas deleções têm sido frequentemente encontradas nesses pacientes. Ao todo são 40 mutações descritas associadas com essa síndrome que também se localizam em sítio de *splice* obrigatório (1,19,91–94).

### 5.1.9 *COL2A1*

A paciente 13 foi encaminhada por um dos grupos colaboradores com o diagnóstico inicial de SEDC. Após, reavaliação clínico-radiológica, suspeitou-se de um fenótipo mais leve. O sequenciamento do gene *COL2A1* mostrou a alteração inédita p.C55Y no DNA da paciente e no do pai. A alteração foi considerada como a responsável pelo fenótipo, entretanto, a avaliação clínico-radiológica dos pais se faz necessária. De acordo com o banco de dados HGMD, existem 11 mutações do tipo *missense* no domínio N-propetídeo e todas foram descritas em pacientes com a síndrome de Stickler (5,91,93–97), que também é um fenótipo de manifestação mais leve.

Em relação à paciente 27, a ausência de trocas de bases não patogênicas tão comuns no gene *COL2A1*, levantou a suspeita de uma possível deleção envolvendo o gene. Van Der Hout e colaboradores (2002), relataram um paciente com Stickler que apresentava uma grande deleção envolvendo o gene *COL2A1*(98). Como o método de Sanger não é uma técnica indicada para confirmar grandes deleções, foi realizado uma PCR pelo método de QMPSF (*Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments*). Os resultados obtidos não foram conclusivos para a suspeita de deleção. Devido a algumas características radiológicas da paciente 27, outra possibilidade diagnóstica foi o fenótipo de displasia

Campomélica. A displasia campomélica é causada por mutações em heterozigose no gene *SOX9* localizado no cromossomo 17 (17q24). Portanto, a análise do gene *SOX9* é necessária para a confirmação dessa possibilidade diagnóstica e será realizada pelo grupo pelo sequenciamento de Sanger e por MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).

#### **5.1.10 Considerações finais**

Como neste trabalho foram analisados apenas éxons e as junções íntron-éxon do gene *COL2A1*, não se pode descartar a possibilidade de que mutações em regiões promotoras, reguladoras e mutações intrônicas distantes estejam implicadas na patogenia dos fenótipos dos pacientes 4, 14, 19, 23, 24, 25, 26, 30 e 32.

De todo modo, esses pacientes devem ser reanalisados pelo sequenciamento de última geração (NGS - Next-Generation Sequencing) por um painel com genes relacionados às displasias esqueléticas, através de projeto futuro do grupo.



## ***6 - CONCLUSÕES***



A análise dos resultados do presente trabalho permitiu concluir:

- A estratégia utilizada para o estudo molecular possibilitou a identificação de 20 mutações diferentes em 23 dos 33 pacientes da casuística.
- 14 mutações inéditas foram encontradas, adicionando dados à literatura especializada.
- Corroborando com a literatura, a maioria das mutações no gene *COL2A1* são privadas e não favorecem uma correlação genótipo-fenótipo, exceto:
  - A análise dos 3 pacientes com a mutação p.R989C, sugere uma possível correlação genótipo-fenótipo no qual o quadro clínico-radiológico é representado pela forma grave de SEDC com *coxa vara*.
  - A identificação de mais dois pacientes com a mutação p.G594E, sugere que esse pode ser outro *hot spot* no gene *COL2A1*. No entanto, a letalidade nos pacientes do presente trabalho não é concordante com os pacientes já descritos na literatura.





## ***7 - REFERÊNCIAS***



1. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:929–58.
2. Donoso L, Edwards A, Frost A, Ritter R, Ahmad N, Vrabec T, et al. Clinical variability of Stickler syndrome: Role of exon 2 of the collagen COL2A1 gene. *Surv Ophthalmol.* 2003;48:191–203.
3. Kadler KE, Holmes DF, Trotter J a, Chapman J a. Collagen fibril formation. *Biochem J.* 1996;316 ( Pt 1:1–11).
4. Nussbaum RL, McInnes RR WH. Thompson & Thompson *Genética Médica.* 7nd ed. Rio de Janeiro. Elsevier; 2004.
5. McAlinden A, Majava M. Missense and nonsense mutations in the alternatively-spliced exon 2 of COL2A1 cause the ocular variant of Stickler syndrome. *Hum Mutat.* 2008;29(1):83–90.
6. Cheah KS, Stoker NG, Griffin JR, Grosveld FG, Solomon E. Identification and characterization of the human type II collagen gene (COL2A1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 ;82(9):2555–9.
7. Tran-Viet K-N, Soler V, Quietie V, Powell C, Yanovitch T, Metlapally R, et al. Mutation in collagen II alpha 1 isoforms delineates Stickler and Wagner syndrome phenotypes. *Mol Vis.* 2013;19:759–66.
8. White A, Wallis G. Endochondral ossification: a delicate balance between growth and mineralisation. *Curr Biol.* 2001;11(15):R589–91.
9. Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol.* 2004;14(2):86–93.
10. Du F, Acland G, Ray J. Cloning and expression of type II collagen mRNA: evaluation as a candidate for canine oculo-skeletal dysplasia. *Gene.* 2000;255(2):307–16.
11. Snead MP, McNinch a M, Poulson a V, Bearcroft P, Silverman B, Gomersall P, et al. Stickler syndrome, ocular-only variants and a key diagnostic role for the ophthalmologist. *Eye (Lond).* Nature Publishing Group; 2011;25(11):1389–400.
12. Terhal P. Mutation-based growth charts for SEDC and other COL2A1 related dysplasias. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2012;216:205–16.

13. Désir J, Cassart M, Donner C. Spondyloperipheral dysplasia as the mosaic form of platyspondylic lethal skeletal dysplasia torrance type in mother and fetus with the same COL2A1 mutation. *Am J Med Genet A*. 2002;158A(8):1948-52.
14. Körkkö J, Ritvaniemi P, Haataja L, Kääriäinen H, Kivirikko KI, Prockop DJ, et al. Mutation in type II procollagen (COL2A1) that substitutes aspartate for glycine alpha 1-67 and that causes cataracts and retinal detachment: evidence for molecular heterogeneity in the Wagner syndrome and the Stickler syndrome (arthro-ophthalmopathy). *Am J Hum Genet*. 1993;53(1):55-61.
15. Lee B, Vissing H, Ramirez F, Rogers D, Rimoin D. Identification of the molecular defect in a family with spondyloepiphyseal dysplasia. *Science*. 1989;244(4907):978-80.
16. Horton WA. Molecular Genetics of Human Chondrodysplasias. *Growth Genet Horm*. 1997;13.
17. Nagendran S, Richards AJ, McNinch A, Sandford RN, Snead MP. Somatic mosaicism and the phenotypic expression of COL2A1 mutations. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(5):1204-7.
18. Hoornaert KP, Dewinter C, Vereecke I, Beemer FA, Courtens W, Fryer A, et al. The phenotypic spectrum in patients with arginine to cysteine mutations in the COL2A1 gene. *J Med Genet*. 2006;43:406-13.
19. Nishimura G, Haga N, Kitoh H, Tanaka Y, Sonoda T, Kitamura M, et al. The phenotypic spectrum of COL2A1 mutations. *Hum Mutat*. 2005;26:36-43.
20. Forzano F, Lituania M, Viassolo A, Superti-Furga V, Wildhardt G, Zabel B, et al. A familial case of achondrogenesis type II caused by a dominant COL2A1 mutation and "patchy" expression in the mosaic father. *Am J Med Genet Part A*. 2007;143:2815-20.
21. Winterpacht A, Hilbert M, Schwarze U. Kniest and Stickler dysplasia phenotypes caused by collagen type II gene (COL2A1) defect. *Nat Genet*. 1993;3(4):323-6.
22. Faivre L, Le Merrer M, Douvier S, Laurent N, Thauvin-Robinet C, Rousseau T, et al. Recurrence of achondrogenesis type II within the same family: evidence for germline mosaicism. *Am J Med Genet A*. 2004;126A(3):308-12.
23. Donahue L, Chang B. A missense mutation in the mouse Col2a1 gene causes spondyloepiphyseal dysplasia congenita, hearing loss, and retinoschisis. *J Bone Miner Res*. 2003;18(9):1612-21.



24. Barbosa-Buck CO, Orioli IM, da Graça Dutra M, Lopez-Camelo J, Castilla EE, Cavalcanti DP. Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(5):1038–45.
25. Zhang Z, Zhao S-C, He J-W, Fu W-Z, Zhang C-Q, Zhang Z-L. Identification of one novel mutation in the C-propeptide of COL2A1 in a Chinese family with spondyloperipheral dysplasia. *Gene*. Elsevier B.V.; 2013;522(1):107–10.
26. Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Lachman R, LeMerrer M, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am J Med Genet Part A*. 2011;155:943–68.
27. Wainwright H, Beighton P. Visceral manifestations of hypochondrogenesis. *Virchows Arch*. 2008;453(2):203–7.
28. Körkkö J, Cohn DH, Ala-Kokko L, Krakow D, Prockop DJ. Widely distributed mutations in the COL2A1 gene produce achondrogenesis type II/hypochondrogenesis. *Am J Med Genet Part A*. 2000;92:95–100.
29. Bonaventure J, Cohen-Solal L, Ritvaniemi P, Van Maldergem L, Kadhon N, Delezoide AL, et al. Substitution of aspartic acid for glycine at position 310 in type II collagen produces achondrogenesis II, and substitution of serine at position 805 produces hypochondrogenesis: analysis of genotype-phenotype relationships. *Biochem J*. 1995;307:823–30.
30. Mortier GR, Weis M, Nuytinck L, King LM, Wilkin DJ, De Paepe A, et al. Report of five novel and one recurrent COL2A1 mutations with analysis of genotype-phenotype correlation in patients with a lethal type II collagen disorder. *J Med Genet*. 2000;37:263–71.
31. Comstock JM, Putnam AR, Sangle N, Lowichik A, Rose NC, Opitz JM. Recurrence of achondrogenesis type 2 in sibs: Additional evidence for germline mosaicism. *Am J Med Genet Part A*. 2010;152:1822–4.
32. Chan D, Cole WG, Chow CW, Mundlos S, Bateman JF. A COL2A1 mutation in achondrogenesis type II results in the replacement of type II collagen by type I and III collagens in cartilage. *J Biol Chem*. 1995;270:1747–53.
33. Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ. Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Hum Mutat*. 1997;9(4):300–15.
34. Tamaru S, Kikuchi A, Takagi K. Prenatal diagnosis of platyspondylic skeletal dysplasia Torrance type with three-dimensional helical computed tomography. *Prenat Diagn*. 2009;29(13):1282–4.

35. Nishimura G. Identification of COL2A1 mutations in platyspondylic skeletal dysplasia, Torrance type. *J Med Genet.* 2004;41(1):75–9.
36. Zankl A, Neumann L, Ignatius J, Nikkels P, Schrandt-Stumpel C, Mortier G, et al. Dominant negative mutations in the C-propeptide of COL2A1 cause platyspondylic lethal skeletal dysplasia, torrance type, and define a novel subfamily within the type 2 collagenopathies. *Am J Med Genet Part A.* 2005;133:61–7.
37. Neumann L, Kunze J, Uhl M, Stöver B, Zabel B, Spranger J. Survival to adulthood and dominant inheritance of platyspondylic skeletal dysplasia, Torrance-Luton type. *Pediatr Radiol.* 2003;33:786–90.
38. Omran H, Uhl M, Brandis M, Wolff G. Survival and dominant transmission of “lethal” platyspondylic dwarfism of the “West coast” types. *J Pediatr.* 2000;136(3):411-3.
39. Spranger JW, Brill PW, Poznanski A. *Bone Dysplasias: an atlas of genetic disorders of skeletal development.* 2nd ed. Oxford University Press. Oxford; 2002.
40. Okamoto T, Nagaya K. Platyspondylic lethal dysplasia torrance type with a heterozygous mutation in the triple helical domain of COL2A1 in two sibs from phenotypically normal parents. *Am J Med Genet Part A.* 2012; 158A(8):1953-6.
41. Horton W a, Machado M a, Ellard J, Campbell D, Bartley J, Ramirez F, et al. Characterization of a type II collagen gene (COL2A1) mutation identified in cultured chondrocytes from human hypochondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(10):4583–7.
42. Freisinger P, Ala-Kokko L, LeGuellec D, Franc S, Bouvier R, Ritvaniemi P, et al. Mutation in the COL2A1 gene in a patient with hypochondrogenesis. Expression of mutated COL2A1 gene is accompanied by expression of genes for type I procollagen in chondrocytes. *J Biol Chem.* 1994;269(18):13663–9. A
43. Williams CJ, Rock M, Considine E, McCarron S, Gow P, Ladda R, et al. Three new point mutations in type II procollagen (COL2A1) and identification of a fourth family with the COL2A1 Arg519-->Cys base substitution using conformation sensitive gel electrophoresis. *Hum Mol Genet.* 1995;4(2):309–12.
44. Mundlos S, Chan D, McGill J, Bateman JF. An alpha 1(II) Gly913 to Cys substitution prevents the matrix incorporation of type II collagen which is replaced with type I and III collagens in cartilage from a patient with hypochondrogenesis. *Am J Med Genet.* 1996;63(1):129–36.
45. Bogaert R, Tiller GE, Weis MA, Gruber HE, Rimoin DL, Cohn DH, et al. An amino acid substitution (Gly853-->Glu) in the collagen alpha 1(II) chain produces hypochondrogenesis. *J Biol Chem.* 1992;267(31):22522–6.

46. Mark PR, Torres-Martinez W, Lachman RS, Weaver DD. Association of a p . Pro786Leu Variant in COL2A1 with Mild Spondyloepiphyseal Dysplasia Congenita in a Three-Generation Family. *Am J Med Genet Part A*. 2010;155:174–9.
47. Cui Y-X, Xia X-Y, Bu Y, Zhou G-H, Yang B, Lu H-Y, et al. Rapid molecular prenatal diagnosis of spondyloepiphyseal dysplasia congenita by PCR-SSP assay. *Genet Test*. 2008;12:533–6.
48. Li S, Zhou H, Qin H, Guo H, Bai Y. A novel mutation in the COL2A1 gene in a Chinese family with Spondyloepiphyseal dysplasia congenita. *Joint Bone Spine*. 2013.
49. Tiller GE, Polumbo PA, Weis MA, Bogaert R, Lachman RS, Cohn DH, et al. Dominant mutations in the type II collagen gene, COL2A1, produce spondyloepimetaphyseal dysplasia, Strudwick type. *Nat Genet*. 1995;11:87–9.
50. Vikkula M, Palotie A, Ritvaniemi P, Ott J, Ala-Kokko L, Sievers U, et al. Early-onset osteoarthritis linked to the type II procollagen gene. Detailed clinical phenotype and further analyses of the gene. *Arthritis Rheum*. 1993;36(3):401–9.
51. Nakane T, Tando T, Aoyagi K, Hatakeyama K, Nishimura G, Coucke IPJ, et al. Dysspondyloenchondromatosis: Another COL2A1-Related Skeletal Dysplasia. *Mol Syndromol*. 2011;3898:21–6.
52. Tysoe C, Saunders J, White L, Hills N, Nicol M, Evans G, et al. A glycine to aspartic acid substitution of COL2A1 in a family with the Strudwick variant of spondyloepimetaphyseal dysplasia. *Q J Med*. 2003;96:663–71.
53. Meredith SP, Richards AJ, Bearcroft P, Pouson A V, Snead MP. Significant ocular findings are a feature of heritable bone dysplasias resulting from defects in type II collagen. *Br J Ophthalmol*. 2007;91(9):1148–51.
54. Yokoyama T, Nakatani S, Murakami A. A Case of Kniest Dysplasia With. 2003;3:1186–8.
55. Wilkin D, Artz A, South S, Lachman RS, Rimoin DL, Wilcox WR, McKusick VA, Stratakis CA, Francomano CA, Cohn DH. Small deletions in the type II collagen triple helix produce Kniest dysplasia. *Am J Med Genet*. 1999;85(2):105-12
56. Yazici Z, Kline-Fath BM, Laor T, Tinkle BT. Fetal MR imaging of Kniest dysplasia. *Pediatr Radiol*. 2010;40:348–52.
57. Spranger J, Winterpacht A, Zabel B. The type II collagenopathies: a spectrum of chondrodysplasias. *Eur J Pediatr*. 1994;153:56–65.

58. Bedeschi MF, Bianchi V, Gentilin B, Colombo L, Natacci F, Giglio S, et al. Prenatal manifestation and management of a mother and child affected by spondyloperipheral dysplasia with a C-propeptide mutation in COL2A1: case report. *Orphanet J Rare Dis.* BioMed Central Ltd; 2011;6:7.
59. Matsui Y, Michigami T, Tachikawa K, Yamazaki M, Kawabata H, Nishimura G. Czech dysplasia occurring in a Japanese family. *Am J Med Genet Part A.* 2009;149:2285–9.
60. Oliveira J, Zechi-ceide RM, Guion-almeida ML, Richieri-costa A, Rita M, Passos-bueno S. Clinical evaluation and COL2A1 gene analysis in 21 Brazilian families with Stickler syndrome : Identification of novel mutations , further genotype / phenotype correlation , and its implications for the diagnosis. *Eur J Med Genet.* 2008;51(3):183-96.
61. Hoornaert KP, Vereecke I, Dewinter C, Rosenberg T, Beemer F a, Leroy JG, et al. Stickler syndrome caused by COL2A1 mutations: genotype-phenotype correlation in a series of 100 patients. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(8):872–80.
62. Richards AJ, McNinch A, Whittaker J, Treacy B, Oakhill K, Poulson A, et al. Splicing analysis of unclassified variants in COL2A1 and COL11A1 identifies deep intronic pathogenic mutations. *Eur J Hum Genet.* Nature Publishing Group; 2012;20(5):552–8.
63. Matsubayashi S, Ikema M, Ninomiya Y, Yamaguchi K, Ikegawa S, Nishimura G. COL2A1 Mutation in Spondylometaphyseal Dysplasia Algerian Type. *Mol Syndromol.* 2013;4(3):148–51.
64. Lachman R, Krakow D, Cohn D, Rimoin D. MED, COMP, multilayered and NEIN: an overview of multiple epiphyseal dysplasia. *Pediatr Radiol.* 2005;116–23.
65. Sambrook J, Russel D w. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
66. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. “Touchdown” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(14):4008.
67. Kannu P, Bateman JF, Randle S, Cowie S, du Sart D, McGrath S, et al. Premature arthritis is a distinct type II collagen phenotype. *Arthritis Rheum.* 2010;62(5):1421–30.
68. Sanger F, Nicklen S. DNA sequencing with chain-terminating. 1977;74(12):5463–7.
69. Campos-Xavier AB, Martinet D, Bateman J, Belluoccio D, Rowley L, Tan TY, et al. Mutations in the heparan-sulfate proteoglycan glypican 6 (GPC6) impair

- endochondral ossification and cause recessive omodysplasia. *Am J Hum Genet.* 2009;84(6):760–70.
70. Charbonnier F, Raux G, Wang Q, Drouot N, Cordier F, Limacher JM, et al. Detection of exon deletions and duplications of the mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families using multiplex polymerase chain reaction of short fluorescent fragments. *Cancer Res.* 2000;60(11):2760–3.
  71. Charbonnier F, Olschwang S, Wang Q, Boisson C, Martin C, Buisine M-P, et al. MSH2 in contrast to MLH1 and MSH6 is frequently inactivated by exonic and promoter rearrangements in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res.* 2002;62(3):848–53.
  72. Bendavid C, Dubourg C, Gicquel I, Pasquier L, Saugier-veber P, Durou M-R, et al. Molecular evaluation of foetuses with holoprosencephaly shows high incidence of microdeletions in the HPE genes. *Hum Genet.* 2006;119(1-2):1–8.
  73. Niel F, Martin J, Dastot-Le Moal F, Costes B, Boissier B, Delattre V, et al. Rapid detection of CFTR gene rearrangements impacts on genetic counselling in cystic fibrosis. *J Med Genet.* 2004;41(11):e118.
  74. Thusberg J, Olatubosun A, Vihinen M. Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants. *Hum Mutat.* 2011;32(4):358–68.
  75. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science.* 1974;185(4154):862–4.
  76. Li WH, Wu CI, Luo CC. Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. *J Mol Evol.* 1984;21(1):58–71.
  77. Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(17):7155–74.
  78. Chan D, Taylor TK, Cole WG. Characterization of an arginine 789 to cysteine substitution in alpha 1 (II) collagen chains of a patient with spondyloepiphyseal dysplasia. *J Biol Chem.* 1993;268(20):15238–45.
  79. Walter K, Tansek M. COL2A1-related Skeletal Dysplasias with predominant Metaphyseal involvement. *Am J Med Genet A.* 2007;143(2):161-7.
  80. Bogaert R, Wilkin D. Expression, in cartilage, of a 7-amino-acid deletion in type II collagen from two unrelated individuals with Kniest dysplasia. *Am J Hum Genet.* 1994;1128–36.

81. Wilkin DJ, Bogaert R, Lachman RS, Rimoin DL, Eyre DR, Cohn DH. A single amino acid substitution (G103D) in the type II collagen triple helix produces Kniest dysplasia. *Hum Mol Genet.* 1994;3(11):1999–2003.
82. Weis M, Wilkin D, Kim H. Structurally abnormal type II collagen in a severe form of Kniest dysplasia caused by an exon 24 skipping mutation. *J Biol Chem.* 1998;273(8):4761-8.
83. Zhang Z, He J-W, Fu W-Z, Zhang C-Q, Zhang Z-L. Identification of three novel mutations in the COL2A1 gene in four unrelated Chinese families with spondyloepiphyseal dysplasia congenita. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;413:504–8.
84. Richards AJ, Morgan J, Bearcroft PWP, Pickering E, Owen MJ, Holmans P, et al. Vitreoretinopathy with phalangeal epiphyseal dysplasia, a type II collagenopathy resulting from a novel mutation in the C-propeptide region of the molecule. *J Med Genet.* 2002;39(9):661–5.
85. Khoshnoodi J, Cartailier J-P, Alvares K, Veis A, Hudson BG. Molecular recognition in the assembly of collagens: terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers. *J Biol Chem.* 2006;281(50):38117–21.
86. Okamoto T, Nagaya K, Asai H, Tsuchida E, Nohara F, Hayashi T, et al. Platyspondylic lethal dysplasia torrance type with a heterozygous mutation in the triple helical domain of COL2A1 in two sibs from phenotypically normal parents. *Am J Med Genet A.* 2012;158A(8):1953–6.
87. Wynne-Davies R, Hall C. Two clinical variants of spondylo-epiphysial dysplasia congenita. *J Bone Joint Surg Br.* 1982;64(4):435–41.
88. Anderson CE, Sillence DO, Lachman RS, Toomey K, Bull M, Dorst J, et al. Spondylometepiphyseal dysplasia, Strudwick type. *Am J Med Genet.* 1982;13(3):243–56.
89. Faden M, Al-Zahrani F, Arafah D, Alkuraya FS. Mutation of CANT1 causes Desbuquois dysplasia. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(5):1157–60.
90. Ala-Kokko L, Baldwin CT, Moskowitz RW, Prockop DJ. Single base mutation in the type II procollagen gene (COL2A1) as a cause of primary osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:6565-8.
91. Richards A, Laidlaw M, Whittaker J. High efficiency of mutation detection in type 1 stickler syndrome using a two-stage approach: vitreoretinal assessment coupled with exon sequencing for screening COL2A1. *Hum Mutat.* 2006;27(7):696-704.

92. Leung L, Hyland JC, Young A, Goldberg MF, Handa JT. A novel mutation in intron 11 of the COL2A1 gene in a patient with type 1 Stickler syndrome. *Retina*. 2006;26(1):106–9.
93. Oliveira J, Zechi-Ceide RM, Guion-almeida ML, Richieri-Costa A, Rita M, Passos-bueno S, et al. Clinical evaluation and COL2A1 gene analysis in 21 Brazilian families with Stickler syndrome: identification of novel mutations, further genotype/phenotype correlation, and its implications for the diagnosis. *Eur J Med Genet*. 2008;51(3):183–96.
94. Richards AJ, Laidlaw M, Meredith SP, Shankar P, Poulson A V, Scott JD, et al. Missense and silent mutations in COL2A1 result in Stickler syndrome but via different molecular mechanisms. *Hum Mutat*. 2007;28(6):639.
95. Richards A, Martin S, Yates J. COL2A1 exon 2 mutations: relevance to the Stickler and Wagner syndromes. *Br J Ophthalmol*. 2000;84(4):364-71.
96. Richards AJ, McNinch A, Martin H, Oakhill K, Rai H, Waller S, et al. Stickler syndrome and the vitreous phenotype: mutations in COL2A1 and COL11A1. *Hum Mutat*. 2010;31(6):E1461–71.
97. Donoso LA, Edwards AO, Frost AT, Ritter R, Ahmad NN, Vrabec T, et al. Identification of a stop codon mutation in exon 2 of the collagen 2A1 gene in a large stickler syndrome family. *Am J Ophthalmol*. 2002;134(5):720–7.
98. Van Der Hout AH, Verlind E, Beemer FA, Buys CHCM, Hofstra RMW, Scheffer H. Occurrence of deletion of a COL2A1 allele as the mutation in Stickler syndrome shows that a collagen type II dosage effect underlies this syndrome. *Hum Mutat*. 2002;20(3):236.
99. Turnpenny PD, Ellard S. *Emery, Genética Médica*. 13th ed. Elsevier; 2009. p. 22-6.
100. Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ. *Genética Médica*. 4th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p. 27-34.







## ***8 – RECURSOS DA INTERNET***



*Chromas* (Download), [http://technelysium.com.au/?page\\_id=13](http://technelysium.com.au/?page_id=13)  
*Codon Code Aligner* (Download), <http://www.codoncode.com/aligner/download.htm>  
*Ensembl*, <http://www.ensembl.org/index.html>  
*Exome Variant Server/Sequencing Project (ESP)*, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>  
*Gene Runner* (Download), <http://www.generunner.net/>  
*HGMD – The Human Gene Mutation Data Base*, <http://www.hgmd.org/>  
*Human Splicing Finder*, <http://www.umd.be/HSF/>  
*Mutation Taster*, <http://www.mutationtaster.org/>  
*Mutpred®*, <http://mutpred.mutdb.org/>  
*Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>  
*Panther*, <http://www.pantherdb.org/>  
*PHD-SNP (Predictor of human Deleterious Single Nucleotide Polymorphisms)*,  
<http://snps.uib.es/phd-snp/phd-snp.html>  
*Polyphen 2® (Polymorphism Phenotyping)*, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>  
*Primer 3*, <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>  
*Scroogle – Splicing Regulation Online Graphical Engine*, <http://sroogle.tau.ac.il/>  
*SNPs&GO®*, <http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>  
*SIFT® (Sorting Intolerant from Tolerant)*, <http://sift.jcvi.org/>  
*SNAP*, <https://roslab.org/services/snap/>  
*Splice View*, [http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview\\_ex.html](http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview_ex.html)



## ***9 - ANEXOS***



## ANEXO 1: Parecer do Comitê de Ética



CEP, 20/12/11.  
(PARECER CEP: N° 992/2007)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa](http://www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa)

### PARECER

#### I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DAS DISPLASIAS ESQUELÉTICAS NO BRASIL - CRIAÇÃO DE UMA REDE NACIONAL PARA AVALIAÇÃO CLÍNICO-RADIOLÓGICA, ORIENTAÇÃO E ESTUDO DAS DISPLASIAS ESQUELÉTICAS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cecília Oliveira Barbosa Buck

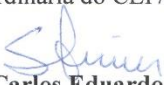
#### II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a adendo que inclui o projeto “ESTUDO DAS MUTAÇÕES DO COL2A1 EM UMA COORTE DE PACIENTES COM DISPLASIAS DO GRUPO COLAGENOPATIA TIPO 2 SEGUNDO CRITÉRIOS CLÍNICOS-RADIOLÓGICOS”, com a finalidade de mestrado da aluna Karina da Costa Silveira, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de dezembro de 2011.

  
**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br



Faculdade de Ciências Médicas – Departamento de Genética Médica

## ANEXO 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Folha de Informação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Projeto de investigação clínico-molecular sobre as displasias esqueléticas

**Pesquisador principal:**

Denise P Cavalcanti  
Departamento de Genética Médica  
FCM – UNICAMP

Tel/Fax: (19) 3521-0385

E-mail: [denisepc@unicamp.br](mailto:denisepc@unicamp.br) / [denisepcavalcanti@gmail.com](mailto:denisepcavalcanti@gmail.com)

#### **INTRODUÇÃO / OBJETIVO DA PESQUISA:**

A pesquisa médica, em geral, ajuda no entendimento sobre as causas das doenças bem como na tentativa de encontrar terapias para melhorar a vida das pessoas afetadas. Nós estamos lhe convidando para participar desse estudo porque você ou algum membro de sua família tem problemas com seus ossos e/ou suas articulações. Acreditamos que a doença óssea na sua família pode ser causada por alteração de algum gene (pequeno erro na sua informação genética) relacionado com a formação/desenvolvimento do esqueleto.

O objetivo desta investigação é o de identificar a origem da displasia esquelética em questão e aprofundar no estudo dos mecanismos envolvidos com a mesma. As radiografias, fotos e amostras de sangue do paciente, bem como as informações médicas a respeito da família, poderão ser compartilhadas com outros pesquisadores que trabalham com displasias esqueléticas.

#### **PROCEDIMENTO:**

Concordando em participar deste estudo, os pesquisadores terão necessidade de obter alguns dados da história clínica e familiar do paciente, assim como haverá necessidade de dados do exame clínico, fotos clínicas e radiografias para o estabelecimento ou confirmação do diagnóstico clínico. O sangue para extração de DNA poderá ser coletado em qualquer momento e, normalmente a coleta é feita a partir de punção de uma veia periférica. Em várias situações DNA dos pais, e eventualmente de outros familiares, também será necessário para conclusão dos estudos. Normalmente se coleta de 4 a 10 ml de sangue (quantidade equivalente a uma ou duas colheres de sopa).

#### **RISCOS:**

A participação na presente pesquisa não acarreta riscos adicionais aos que eventualmente um paciente está exposto quando consulta um médico (ex: ser submetido a exames de raio X, coleta de sangue para exames de sangue). Com a coleta de sangue o paciente pode sentir um breve desconforto e o procedimento pode deixar uma pequena marca no local da punção. Esse procedimento dura uns poucos segundos.

#### **VANTAGENS / RESULTADOS:**

Os resultados desta pesquisa devem fornecer um maior conhecimento sobre a doença em questão, embora não seja esperado nenhum benefício direto além do resultado do(s) exame(s) realizado(s). A participação nesta pesquisa não deverá acarretar mudanças no atendimento médico nem no aconselhamento genético imediato. Os resultados da pesquisa serão fornecidos a você e à sua família pelo seu médico assistente ou pelos pesquisadores responsáveis e estarão também referidos no prontuário médico hospitalar.

#### **SIGILO:**

Todas as informações médicas, assim como os resultados dos exames e dos testes genéticos realizados nessa pesquisa, farão parte do prontuário médico e dos bancos de dados do projeto de displasias esqueléticas e serão submetidos aos regulamentos do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-UNICAMP.

O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos que possam advir dessa pesquisa por meio da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes. Os resultados ou informações fornecidos devem ser utilizados para fins de publicação científica, no entanto, nenhum nome será utilizado.

#### **FORNECENDO INFORMAÇÃO ADICIONAL:**

A qualquer momento é possível obter informações adicionais relativas à presente pesquisa. A Dra. Denise P Cavalcanti ou os seus colaboradores estarão disponíveis para responder às suas questões e/ou preocupações (Tel.: 019 3521-8908). Em caso de recurso, dúvida ou reclamações relacionadas aos aspectos éticos da pesquisa você poderá contactar a secretaria do Comitê de Ética da FCM-UNICAMP (Tel.: 019 3521-7232).

#### **RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:**

A sua participação, bem como dos seus familiares, na presente pesquisa é voluntária. Sendo assim, a qualquer momento você e/ou os seus familiares poderá(ão) se recusar a participar ou retirar o consentimento e interromper a participação na presente pesquisa sem comprometimento dos cuidados médicos que recebe(m) atualmente ou receberá(ão) no futuro.

De forma semelhante, os pesquisadores responsáveis podem interromper a participação de qualquer indivíduo da família nessa pesquisa a qualquer momento em que julgarem apropriado.

#### **COLETA, FUTURAS PESQUISAS E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO:**

O DNA, material genético obtido a partir de uma amostra de sangue [seu e/ou de outro(s) membro(s) de sua família] será(ão) usado(s) para esse estudo, se você concordar. Nenhum outro teste ou estudo poderá ser feito com as amostras de DNA, a menos que você concorde com isso. Você pode concordar com o uso da sua amostra de sangue apenas para esse estudo (opção 1 do termo de consentimento), ou também para outros estudos (opção 2 e 3). Você pode escolher ser consultado no futuro sobre sua permissão para uso de sua amostra em um outro estudo (opção 2) ou você pode dar sua permissão agora, sem ter que ser solicitado novamente (opção 3). Em qualquer caso, seu nome será conhecido apenas pelo investigador do estudo e ninguém mais. O que os médicos fazem em pesquisa médicas deve sempre ser aceito pelo Comitê de Ética, um grupo de pessoas (médicos, advogados e outros) que assegurará que o estudo tenha um bom propósito e seja realizado para atender o interesse das pessoas doentes.

Você tem o direito de se retirar desse estudo a qualquer momento. Se você escolher se retirar, nenhum outro estudo será conduzido com sua amostra.

Se você concordar em participar desse estudo, sua amostra será armazenada no Laboratório de Genética Molecular do Depto. de Genética Médica, FCM, UNICAMP sob a responsabilidade do investigador principal. Essas amostras serão usadas exclusivamente para os propósitos científicos descritos aqui. Você pode requerer a destruição da amostra em qualquer momento.

Uma cópia dessa folha de informação será fornecida a você.





## Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Projeto de investigação clínico-molecular sobre displasias esqueléticas  
Pesquisador Principal: Denise P Cavalcanti

A assinatura do(s) item(ns) abaixo indica que você foi informado tanto oralmente como pela folha de Informação sobre a pesquisa mencionada acima. Dessa forma, você confirma que leu e entendeu o conteúdo da folha de Informação e que voluntariamente concorda em participar desse estudo. Você também entendeu que pode questionar qualquer coisa sobre a pesquisa ao seu médico e/ou ao pesquisador e que a informação que lhe foi fornecida permitiu-lhe tomar uma decisão livre e completamente informada sobre a sua participação nesse estudo. Você tem o direito de sair desse estudo em qualquer momento sem qualquer consequência para você. Uma cópia desse termo de consentimento será providenciada para você.

I. Escolhendo um dos itens abaixo você estará concordando, ou não, com a utilização do seu DNA e/ou o de seu(ua) filho(a) em outras pesquisas ou apenas na atual pesquisa. Em quaisquer das opções abaixo sua identidade será mantida confidencial (ASSINALE APENAS UM DOS ITENS ABAIXO):

- 1  Sua amostra de sangue e/ou de seu(ua) filho(a) pode ser usada apenas nesse projeto de pesquisa. Essas amostras não podem ser usadas em nenhum outro projeto. Você não quer ser contactado para outras permissões no futuro.
- 2  Sua amostra de sangue e/ou de seu(ua) filho(a) pode ser usada apenas nesse projeto, e, para outros projetos com sua permissão. Se essas amostras puderem ser usadas em um outro projeto, você quer ser contactado para que solicitem sua permissão. Uma nova aprovação do Comitê de Ética é necessária para usar sua amostra em um outro estudo.
- 3  Sua amostra de sangue e/ou de seu(ua) filho(a) pode ser usada para qualquer outro propósito científico envolvendo este ou qualquer outro projeto. Você não quer ser contactado para permissão. Uma nova aprovação do Comitê de Ética é necessária para que a sua amostra seja utilizada em um outro estudo.

II. Assinalando os itens abaixo você estará concordando, ou não, com a utilização de fotos clínicas.

- Utilização de fotos clínicas apenas para estudo
- Utilização de fotos clínicas para eventuais apresentações em publicações científicas

Nome:

Data de nascimento:

Assinatura:

Se o participante for menor de idade ou um adulto legalmente incapaz:

Assinatura do(s) pai(s) ou responsável legal:

Relação com o participante:

Local e data:

Médico que encaminha

A assinatura abaixo indica que o médico que encaminhou forneceu uma explicação apropriada sobre a pesquisa, chamou atenção sobre as limitações assinaladas na folha de informação e respondeu as questões dos participantes.

Nome completo:

Assinatura:

Local e data:

Carimbo médico

**Pesquisador principal:**

Denise P Cavalcanti

Departamento de Genética Médica

FCM – UNICAMP

R. Tessália V. De Camargo, 126

13083-887 Campinas, SP

**Assinatura:**

**Local e data:**





## ***10 - APÊNDICES***



## Apêndice 1: Glossário de mutações

**Mutação** é uma alteração permanente na sequência de nucleotídeos ou no arranjo de DNA. As mutações ativam a evolução mas também podem ser patogênicas. As mutações podem ser classificadas em:

**Substituição de uma base (mutação de ponto):** representam 50% das mutações causadoras de doenças.

- *Mutações silenciosas ou sinônimas:* Um aminoácido pode ser determinado por mais de um códon; algumas mutações, portanto, não alteram a sequência de aminoácidos produzida pelo gene modificado e sua função permanece a mesma. Essas mutações são chamadas de silenciosas e são bastante frequentes.

- *Mutações de sentido trocado (missense):* provocadas por uma mutação de ponto que altera o código em uma trinca de bases e causa a substituição de um aminoácido por um outro no produto gênico. Tais mutações alteram o “sentido” da codificação do filamento do gene ao especificar um aminoácido diferente.

- *Mutação sem sentido (nonsense):* são mutações de ponto que causam a substituição do códon normal para um dos três códons terminais. Mutações de terminação prematura podem ter duas consequências: primeira, o mRNA carregando uma mutação prematura é frequentemente instável (decaimento do mRNA mediado por mutação sem sentido) e não é possível a tradução; segunda, mesmo que o mRNA seja estável o bastante para ser traduzido, a proteína truncada é normalmente tão instável que é rapidamente degradada dentro da célula.

**Deleções, Inserções e Duplicações:** Nem todas as mutações gênicas são substituições de bases. Às vezes um ou mais nucleotídeos podem ser inseridos, excluídos ou duplicados na sequência de bases do DNA.

- *Pequenas deleções e inserções:* No processo de síntese protéica, cada trinca de bases corresponde a um determinado aminoácido. Algumas deleções afetam apenas um pequeno número de pares de bases. Se um número de pares de bases inseridas ou deletadas é um múltiplo de três, não ocorre mudanças de matriz de leitura e haverá somente uma inserção ou deleção de aminoácidos correspondentes. Quando um número de bases envolvidas não é

um múltiplo de três e ocorre em uma sequência de codificação, a leitura da estrutura é alterada iniciando no ponto da inserção da deleção. As mutações resultantes são chamadas de mutações por mudança de matriz de leitura (**frameshift**).

- *Grandes deleções e inserções*: alterações da estrutura do gene que podem levar a aumentos ou perdas consideráveis do material genético. São relativamente incomuns, mas têm sido descritas em muitos distúrbios herdados.

Além das regiões codificadoras, outras porções do DNA podem sofrer mutação como os sítios de *splicing*, sequências regulatórias, genes de fatores de transcrição ou regiões 5' e 3' não traduzidas. Apesar de não fazerem parte do RNAm, estão diretamente relacionadas aos éxons, podendo interferir na expressão gênica, reduzindo ou aumentando-a, além de conferir instabilidade ao RNAm quando mutadas.

**Mutações no processamento de RNA:** Para os íntrons serem recompostos ao mesmo tempo para formar um RNAm maduro requer sequências específicas de nucleotídeos localizadas dentro ou próximas das junções éxon-íntron (local doador de 5') ou íntrons-éxon (local receptor de 3'). As mutações que afetam estas bases requeridas em cada ponto doador ou receptor de recomposição interferem na (e em alguns casos cancelam) recomposição normal de RNA naquele local.

As mutações podem exercer seus efeitos fenotípicos de duas maneiras:

**Mutações de perda de função:** mutação que reduz ou elimina a função do produto genético. A mutação de perda de função no estado heterozigoto no qual metade dos níveis normais do produto gênico resulta em efeitos fenotípicos são chamadas de *mutações de haploinsuficiência*.

**Mutações de ganho de função:** pode ser decorrente tanto do aumento de sua quantidade, geralmente por causa de um aumento em sua expressão ou na expressão de seu gene cognato, como de um aumento da capacidade de cada molécula de proteína em realizar uma ou mais funções normais.

❖ **Mutações dominantes negativas:** mutação na qual um gene mutante em heterozigose resulta na perda da atividade da proteína, como uma consequência do produto do gene mutante interferindo na função do produto gênico normal do alelo correspondente (4,99,100).

**Apêndice 2: Quadro com as sequências nucleotídicas de cada *primer*.**

<b>PRIMERS</b>	<b>SEQUENCIA</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Exo-Star®</b>
<i>COL2A1</i> EX 1 F <i>COL2A1</i> EX 1 R	AGCGTGACTCCCAGAGAG TGCCTGTGCCTAAGTCG	51,7	-
<i>COL2A1</i> EX 2 F <i>COL2A1</i> EX 2 R	CCAGCCTACATTCTTCAGC TCTACCCCAGCTACCAGG	59,5	-
<i>COL2A1</i> EX 345 F <i>COL2A1</i> EX 345 R	AACAAAGTCTGGGTACCTC AGATGACAGCAAGGCCAG	57,0	X
<i>COL2A1</i> EX 67 F <i>COL2A1</i> EX 67 R	CTCACCCGGTATTGCAGC CCAGGTAAGTGCAAGCAGC	56,7	-
<i>COL2A1</i> EX 8 F <i>COL2A1</i> EX 8 R	GCCACTGTCATCTAATAATCC GTAAAGCAGAGGTTGTCAGAC	59,5	-
<i>COL2A1</i> EX 910 F <i>COL2A1</i> EX 910 R	AGTGGGAAATGAGAGGGAG CATCCGAATTCCTTGGG	59,5	X
<i>COL2A1</i> EX 11 F <i>COL2A1</i> EX 11 R	ACCTTTGCTCTGACCTTCC ATAGGAGATGGCGTCAGG	58,0	X
<i>COL2A1</i> EX 12 F <i>COL2A1</i> EX 12 R	CACATACAGTCAGCAGAACC GGAGACGCTAGGAAAGATG	57,0	-
<i>COL2A1</i> EX 1314 F <i>COL2A1</i> EX 1314 R	CTGGGCAGTTGTTATTTATACC CTCGCACTGACACAACTTC	57,0	X
<i>COL2A1</i> EX 15 F <i>COL2A1</i> EX 15 R	GTTTGTGTCAGTGCAGC CCTTGCAGTAGATGAGCTTG	59,5	X
<i>COL2A1</i> EX 16 F <i>COL2A1</i> EX 16 R	ACTGTTGGGTGTGATCTG ACTGGTAAAGAGAATCATGC	57,0	-
<i>COL2A1</i> EX 17 F <i>COL2A1</i> EX 17 R	AGGTGGAGGTTGTAGTGAG CCAGTAGACATCAGAGTGC	52,8	-
<i>COL2A1</i> EX 18 F <i>COL2A1</i> EX 18 R	GTGAAATCAGTACAGAGGAGG GTCTTACTTTCCTCCAGG	56,7	-
<i>COL2A1</i> EX 1920 F <i>COL2A1</i> EX 1920 R	AGTCATCAGCTCGGTCAG GAAGAAGGGAGGGGTGTC	58,0	X
<i>COL2A1</i> EX 2122 F <i>COL2A1</i> EX 2122 R	GTAACCCTGGAACAGATGG AGCCCTGTAAAGTCTCCTCC	58,0	X
<i>COL2A1</i> EX 23 F <i>COL2A1</i> EX 23 R	TGGCCTCTCGTCCTCAAG GGTGTGGATGGAGAAAGAGG	60,0	X
<i>COL2A1</i> EX 242526 F <i>COL2A1</i> EX 242526 R	CAGGCTCCAGAAGTTAACC CCAGTGCCTACCATCTACC	57,0	-
<i>COL2A1</i> EX 27 F <i>COL2A1</i> EX 27 R	TTCGGGGCTTATCCTTGG CCCAAATCACATACAGACCC	57,0	X
<i>COL2A1</i> EX 28 F <i>COL2A1</i> EX 28 R	TGCTTTATCTTGGCTGTCC AATGGCAAACAGAAGTCTCC	57,0	X
<i>COL2A1</i> EX 29 F <i>COL2A1</i> EX 29 R	ACTTCTGTTTGCCATTGGTC CTCAGCCACATTCACATC	55,4	-
<i>COL2A1</i> EX 30 F <i>COL2A1</i> EX 30 R	AGTGTGGGTGGCTGATGG AGCAGCAGCAGTGACAGC	57,9	-
<i>COL2A1</i> EX 31 F <i>COL2A1</i> EX 31 R	CAGCAGCAGGCACTATCG TGTCATCTGTGGAGGCTGG	60,0	-
<i>COL2A1</i> EX 3233 F	CCATGGGAGGAGTGATATTC	60,0	X

<i>COL2A1</i> EX 3233 R	TCTGTTCTTCATTCCTCCTG		
<i>COL2A1</i> EX 34 F <i>COL2A1</i> EX 34 R	TCTACATGGGAGGAAGGG GTGAGATGAAGGAACAGGG	55,4	X
<i>COL2A1</i> EX 35 F <i>COL2A1</i> EX 35 R	CCCTGTTCCCTTCATCTCACC GAGAAGTCCCTGCAGTTGC	57,0	-
<i>COL2A1</i> EX 36 F <i>COL2A1</i> EX 36 R	CTGGTCCTGTCTCTGTCCG CTTCACTCCTACGGCCTTG	57,0	-
<i>COL2A1</i> EX 37 F <i>COL2A1</i> EX 37 R	GGCCGTAGGAGTGAAGAGG CTCCCTGGCTCTCTGGTTC	59,5	-
<i>COL2A1</i> EX 38 F <i>COL2A1</i> EX 38 R	AGAGATGGGAAGGGAAAGG AGAGATGGGAAGGGAAAGG	56,7	X
<i>COL2A1</i> EX 39 F <i>COL2A1</i> EX 39 R	CATCATGTCCAGACCAGG GAGATCAGCAGCTTGGTTC	57,0	-
<i>COL2A1</i> EX 40 F <i>COL2A1</i> EX 40 R	CTCAGGGGTCCATTGTTG GGTTTCCACAGTCAGCACT	57,0	-
<i>COL2A1</i> EX 41 F <i>COL2A1</i> EX 41 R	TTCATAACCAGGCTCTGAGAC TAATCATGGCAGCCCTGTC	57,9	-
<i>COL2A1</i> EX 42 F <i>COL2A1</i> EX 42 R	GGTTGCAGCGGTAGATTG GAGAGGCAGGAGATGAGAAC	57,0	-
<i>COL2A1</i> EX 4344 F <i>COL2A1</i> EX 4344 R	AGGGTCGTGAGTGGCTTC TCTATGCCCGTCTCTCTCC	57,0	
<i>COL2A1</i> EX 4546 F <i>COL2A1</i> EX 4546 R	GGAAACTTGGTGAGGAAAC ACTGCTCCTTAGTCCAGAGA	57,0	X
<i>COL2A1</i> EX 4748 F <i>COL2A1</i> EX 4748 R	AAGCAAGGAGACAGAGGAGA GAAACTGCTTAGGGTGATCC	57,0	-
<i>COL2A1</i> EX 49 F <i>COL2A1</i> EX 49 R	GAAGTGGAAAGGGAATGG GAGGCTGATTCATGTTTGTC	57,9	-
<i>COL2A1</i> EX 50 F <i>COL2A1</i> EX 50 R	CTGAGCATGTGAAGAACTGG CTTCTCTTCAGTTTCCAGC	57,0	-
<i>COL2A1</i> EX 51 F <i>COL2A1</i> EX 51 R	GAAGAAATAGACATGGTGCTG TGTGAAATAAGAGAGGAACCC	62,9	X
<i>COL2A1</i> EX 52 F <i>COL2A1</i> EX 52 R	CTTAGCTCATGCAGATCTCCC TTCCTCCTCTTCCCTCCTC	57,0	X
<i>COL2A1</i> EX 53 F <i>COL2A1</i> EX 53 R	ATGTCCAACCTAGCTCCCTGC TCACCCTGTACACATTGCG	57,0	-
<i>COL2A1</i> EX 54 F <i>COL2A1</i> EX 54 R	GAGTTGAAGTGGAGAGGCC AGAGGGTGGGATGAATGG	57,0	X



**Apêndice 3: Predição das mutações do tipo *missense* encontradas nos pacientes da casuística.**

<b>PACIENTE</b>	<b>PROTEINA</b>	<b>GRANTHAM</b>	<b>POLYPHEN</b>	<b>MUTPRED</b>	<b>SNAP</b>	<b>PHD-SNP</b>	<b>SIFT</b>	<b>PANTHER*</b>	<b>SNP&amp;GO</b>
3	G609D	94	Provavelmente deletéria (1,000)	Provavelmente deletéria (0,989)	Não-neutra (87%)	Deletéria (0,947)	Deletéria (2,63)	Deletéria (0,994)	Deletéria (0,970)
5	C1315G	159	Provavelmente deletéria (0,997)	Provavelmente deletéria (0,878)	Não-neutra (58%)	Deletéria (0,907)	Deletéria (2,69)	Não analisa	Deletéria (0,988)
12	G516S	56	Provavelmente deletéria (1,000)	Provavelmente deletéria (0,974)	Não-neutra (82%)	Deletéria (0,918)	Deletéria (2,63)	Deletéria (0,9988)	Deletéria (0,991)
13	C55Y	194	Provavelmente deletéria (0,991)	Provavelmente deletéria (0,869)	Não-neutra (58%)	Deletéria (0,585)	-	Deletéria (0,878)	Deletéria (0,968)
15	G528A	60	Provavelmente deletéria (0,998)	Provavelmente deletéria (0,999)	Não-neutra (63%)	Deletéria (0,803)	Deletéria (2,65)	Não analisa	Deletéria (0,974)
21	G570D	94	Provavelmente deletéria (1,000)	Provavelmente deletéria (0,966)	Não-neutra (87%)	Deletéria (0,910)	Deletéria (2,62)	Não analisa	Deletéria (0,990)
16	G708R	125	Provavelmente deletéria (1,000)	Provavelmente deletéria (0,952)	Não-neutra (87%)	Deletéria (0,877)	Deletéria (2,66)	Deletéria (0,999)	Deletéria (0,956)
17	G498D	94	Provavelmente deletéria (0,999)	Provavelmente deletéria (0,966)	Não-neutra (87%)	Deletéria (0,915)	Deletéria (2,63)	Não analisa	Deletéria (0,988)
28	G1080V	109	Provavelmente deletéria (0,999)	Provavelmente deletéria (0,971)	Não-neutra (82%)	Deletéria (0,853)	-	Deletéria (0,900)	Deletéria (0,978)
29	G1149R	125	Provavelmente deletéria (1,000)	Provavelmente deletéria (0,981)	Não-neutra (87%)	Deletéria (0,760)	-	Não analisa	Deletéria (0,939)
33	G687R	125	Provavelmente deletéria (1,000)	Provavelmente deletéria (0,996)	Não-neutra (87%)	Deletéria (0,919)	-	Deletéria (0,990)	Deletéria (0,968)

PANTHER\*: Este algoritmo não realiza a predição de todas as alterações.

GRANTHAM: “conservadas” (<50), “moderadas” (51–100), “radicais” (101–150) e “muito radicais” (>151).

#### Apêndice 4: Referências do artigo produzido com base na dissertação.

- Ala-Kokko L, Baldwin CT, Moskowitz RW, Prockop DJ. 1990. Single base mutation in the type II procollagen gene (*COL2A1*) as a cause of primary osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6565-8.
- Anderson IJ, Goldberg RB, Marion RW, Upholt WB, Tsipouras P. 1990. Spondyloepiphyseal dysplasia congenita: genetic linkage to type II collagen (*COL2A1*). *Am J Hum Genet* 46:896-901.
- Ballo R, Beighton PH, Ramesar RS. 1998. Stickler-like syndrome due to a dominant negative mutation in the *COL2A1* gene. *Am J Med Genet* 80:6-11.
- Bleasel JF, Holderbaum D, Mallock V, Haqqi TM, Williams HJ, Moskowitz RW . 1996b. Hereditary osteoarthritis with mild spondyloepiphyseal dysplasia—are there “hot spots” on *COL2A1*? *J Rheumatol* 23:1594–1598.
- Chan D, Taylor TK, Cole WG. 1993. Characterization of an arginine 789 to cysteine substitution in alpha 1 [II] collagen chains of a patient with spondyloepiphyseal dysplasia. *J Biol Chem* 268:15238–45.
- Chan D, Cole WG, Chow CW, Mundlos S, Bateman JF. 1995. A *COL2A1* mutation in achondrogenesis type II results in the replacement of type II collagen by type I and III collagens in cartilage. *J Biol Chem* 270:1747-53.
- Fertala A, Ala-Kokko L, Prockop DJ. 1996. Characterization of recombinant human collagen II with Arg519-to-Cys substitution. *Ann N Y Acad Sci* 785:251–3.
- Fertala A, Ala-Kokko L, Wiaderkiewicz R, Prockop DJ. 1997. Collagen II containing a Cys substitution for arg-alpha1-519. Homotrimeric monomers containing the mutation do not assemble into fibrils but alter the self-assembly of the normal protein. *J Biol Chem* 272:6457–64.
- Goldberg RB, Marion RW, Pritzker H, Wang FM, Anderson I, Tsipouras P. 1989. Clinical heterogeneity in a family with spondyloepiphyseal dysplasia congenita (SEDC). *Am J Hum Genet* 45 (suppl.): A46.
- Hoornaert KP, Dewinter C, Vereecke I, Beemer FA, Courtens W, Fryer A, Fryssira H, Lees M, Müllner-Eidenböck A, Rimoin DL, Siderius L, Superti-Furga A, Temple K, Willems PJ, Zankl A, Zweier C, De Paepe A, Coucke P, Mortier GR. 2006. The phenotypic spectrum in patients with arginine to cysteine mutations in the *COL2A1* gene. *J Med Genet* 43:406–13.
- Lee B, Vissing H, Ramirez F, Rogers D, Rimoin D. 1989. Identification of the molecular defect in a family with spondyloepiphyseal dysplasia. *Science* 244:978-80.

- Lumadue, J., Rowan, B. G., Francomano, C. A. Structural alteration of the type II collagen gene in an individual with spondyloepiphyseal dysplasia congenita. *Am J Hum Genet* 43:A193.
- Murray LW, Rimoin DL. 1985. Type II collagen abnormalities in the spondyloepi- and spondyloepimetaphyseal dysplasias. *Am J Hum Genet* 37:A13.
- Nishimura G, Haga N, Kitoh H, Tanaka Y, Sonoda T, Kitamura M, Shirahama S, Itoh T, Nakashima E, Ohashi H, Ikegawa S. 2005. The phenotypic spectrum of *COL2A1* mutations. *Hum Mutat* 26:36–43.
- Richards AJ, Martin S, Yates JR, Scott JD, Baguley DM, Pope FM, Snead MP. 2000. *COL2A1* exon 2 mutations: relevance to the Stickler and Wagner syndromes. *Br J Ophthalmol* 84:364-71.
- Rimoin DL. 1996. Molecular defects in the chondrodysplasias. *Am J Med Genet* 63:106-10.
- Prockop DJ, Kivirikko KI. 1995. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 64:403–434.
- Spranger J, Wiedemann HR. 1966. Studies on mucopolysaccharide excretion in healthy children and in those with dysostosis. *Ann Paediatr* 206:342-55.
- Spranger JW, Langer LO Jr. 1970. Spondyloepiphyseal dysplasia congenita. *Radiology* 94:313-22.
- Spranger JW, Brill P, Superti-Furga A, Unger S, Nishimura G. 2012. *Bone Dysplasias: An Atlas of Genetic Disorders of Skeletal Development*. 3rd edition. New York: Oxford University Press. 132-133 p.
- Stepkowski A, Ito H, Rucker E, Brittingham RJ, Alabyeva T, Gandhi M, Ko FK, Birk DE, Jimenez SA, Fertala A. 2004. Position of single amino acid substitutions in the collagen triple helix determines their effect on structure of collagen fibrils. *J Struct Biol* 148:326–37.
- Tysoe C, Saunders J, White L, Hills N, Nicol M, Evans G, Cole T, Chapman S, Pope FM. 2003. A glycine to aspartic acid substitution of *COL2A1* in a family with the Strudwick variant of spondyloepimetaphyseal dysplasia. *Q J M* 96:663–71.
- Unger S, Korkko J, Krakow D, Lachman RS, Rimoin DL, Cohn DH. 2001. Double heterozygosity for pseudoachondroplasia and spondyloepiphyseal dysplasia congenita. *Am J Med Genet* 104:140-6.
- Williams CJ, Considine EL, Knowlton RG, Reginato A, Neumann G, Harrison D, Buxton P, Jimenez S, Prockop DJ. 1993. Spondyloepiphyseal dysplasia and precocious osteoarthritis in a family with an Arg75-->Cys mutation in the procollagen type II gene (*COL2A1*). *Hum Genet* 92:499–505.

Wyne-Davies R, Hall C. 1982. Two clinical variants of spondylo-epiphyseal dysplasia. *J Bone Joint Surg Br* 64:435–441.

Zhang Z, He JW, Fu WZ, Zhang CQ, Zhang ZL. 2011. Identification of three novel mutations in the *COL2A1* gene in four unrelated Chinese families with spondyloepiphyseal dysplasia congenita. *Biochem Biophys Res Commun* 413:504–8.