

SIMONE CAIXETA DE ANDRADE

**Caracterização molecular e estudo de expressão de mutações no
gene do receptor sensor de cálcio**

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

An24c Andrade, Simone Caixeta de
Caracterização molecular e estudo de expressão de mutações no
gene do receptor sensor de cálcio / Simone Caixeta de Andrade.
Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Lília Freire Rodrigues de Souza Li
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Receptor de detecção de cálcio. 2. Hiperparatireoidismo. 3.
Hipercalcemia. I. Li, Lília Freire Rodrigues de Souza. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

Título em inglês : *Molecular characterization and expression analysis of mutations in the calcium sensing receptor gene.*

Keywords:

- Receptors, Calcium-Sensing
- Hyperparathyroidism
- Hypercalcemia

Titulação: Mestrado em Farmacologia

Banca examinadora: Profa. Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li
Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
Prof Dr Omar Magid Hauache

Data da defesa: 21-02-2006

SIMONE CAIXETA DE ANDRADE

**Caracterização molecular e estudo de expressão de mutações no
gene do receptor sensor de cálcio**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão de
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do
título de Mestre em Farmacologia.*

ORIENTADORA: LÍLIA F. R DE SOUZA LI, MD PhD

CAMPINAS

2006



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador (a):

Prof^ª. Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li

Membros:

Prof^ª. Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li

Prof^ª. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo

Prof^ª. Dr Omar Magid Hauache

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

Data: 21/02/2006

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Mário e Leozina (in memoriam).

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós” Antoine de Saint- Exupéry.

AGRADECIMENTOS

Prof. Dra. Lília F. R. de Souza Li pela confiança, oportunidade e por sua orientação.

Aos professores Carlos Eduardo Martinelli Júnior (FMRP-USP), Carlos Steiner (FCM-Unicamp), Carmen S. Bertuzzo (FCM-Unicamp) e Omar M. Hauache (Unifesp) pelas sugestões.

Angélica e Edgar pelo auxílio com a densitometria e Beta-actina.

Jussara Zenker pelo apoio técnico.

Dona Maria Helena, Simone e Taís do Laboratório de Imunologia (CIPED).

Aos amigos Gustavo Polisseni, Naiane e Roseli, por toda compreensão às minhas ausências.

Luciana, Marcelo, Mércia e Samara por tantos obstáculos superados.

D^a Geni, pelo auxílio nas horas difíceis.

Rose por toda compreensão, paciência e apoio.

Guilherme, companheiro de todos os momentos.

Meus pais e irmãos por todo carinho.

Ao secretário Wanderley Cunha Claro, por toda orientação.

Eduardo Fernandes Formighieri pela ajuda nos programas Phred/Phrap/Consed e Corel.

À Universidade Estadual de Campinas pela acolhida.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

	PÁG.
RESUMO	xv
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO	20
HOMEOSTASE DO CÁLCIO.....	21
RECEPTORES QUE SE ACOPLAM À PROTEÍNA G.....	22
Características estruturais.....	22
Ativação e sinalização dos GPCRs.....	23
Família 3/C GPCRs.....	25
RECEPTOR SENSOR DE CÁLCIO.....	25
RELAÇÃO ESTRUTURA – FUNÇÃO DO CASR.....	26
Expressão e N-glicosilação.....	26
Dimerização do CASR.....	27
Sinalização do CASR.....	28
DOENÇAS ASSOCIADAS A MUTAÇÕES NO CASR.....	30
Hipocalcemia Autossômica Dominante – ADH.....	30
Mutações com perda de função do CASR.....	31
Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar – FHH.....	31
Hiperparatireoidismo Neonatal Grave – NSHPT.....	32
OBJETIVOS	34
Objetivo principal.....	35
Objetivos específicos.....	35

MATERIAL E MÉTODOS.....	36
DETECÇÃO DE MUTAÇÕES.....	37
Pacientes.....	37
Família S.....	37
Família J.....	38
Extração de DNA genômico.....	38
PCR.....	38
Seqüenciamento direto.....	39
Análise dos seqüenciamentos.....	40
ESTUDO DE EXPRESSÃO DAS MUTAÇÕES.....	40
Preparação de Bactérias Competentes.....	40
Transformação de bactérias por choque térmico.....	41
Extração de plasmídeos pelo método de lise alcalina.....	41
Mutagênese dirigida.....	42
Digestão com enzimas de restrição.....	43
Previsão de códon de iniciação.....	43
Clonagem do ATG mutado e controle em pcDNA1 contendo cDNA do CASR.....	43
Transfecção transitória do cDNA humano do CASR e cultura celular.....	44
Preparação de extrato de proteínas celulares.....	44
Western Blot.....	45
Avaliação do grau de expressão dos receptores mutados e análise final dos resultados.....	45
Imunocitoquímica.....	45

RESULTADOS.....	47
Dados bioquímicos.....	48
Família S.....	48
Família J.....	49
Análise dos seqüenciamentos e digestão com enzimas de restrição.....	50
Família S.....	50
Família J.....	53
Análise do ATG.....	54
Construção para análise da expressão dos receptores mutados.....	55
Família S.....	55
Família J.....	56
Western Blot.....	57
Microscopia Confocal.....	60
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	62
CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
ANEXOS.....	79
Anexo 1 – Parecer do comitê de ética.....	80
Anexo 2 – Termo de consentimento livre esclarecido.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µM	Micromolar
Aa	Aminoácidos
AC	Adenilato ciclase
<i>AciI</i>	<i>Arthrobacter citreus</i>
ADD	Anticorpo monoclonal primário anti-hCASR contra um peptídeo sintético correspondente aos resíduos 214-235 do CASR humano (seqüência de aminoácidos 214-235: ADDYGRPGIEKFREEAEERDI)
bp	Pares de bases (<i>Base pairs</i>)
Ca _i ⁺²	Cálcio ionizado intracelular
Ca _o ⁺²	Cálcio ionizado extracelular
CASR	Receptor sensor de cálcio (<i>Calcium sensing receptor</i>)
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
C-terminal	Carboxi terminal
DMEM	Meio de cultura de células (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
ECD	Domínio extracelular
FHH	Hipercalcemia hipocalciúria familiar
HEK-293	Células renais de embrião humano (<i>Human embryonic kidney cell</i>)
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd
kDa	Kilodalton
MOPS	Ácido 3-morfolino-propanossulfônico
<i>NcoI</i>	<i>Nocardia corallina</i>
NSHPT	Hiperparatireoidismo neonatal grave

N-terminal	Amino terminal
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonila (<i>Phenylmethysulphonylfluoride</i>)
PTH	Hormônio da paratireóide, paratormônio.
PVDF	Membrana de Difluoreto de Polivinilideno (<i>Polyvinylidene fluoride</i>)
R.V.	Valores de referência
RNA _t	RNA transportador
<i>SalI</i>	<i>Streptomyces albus</i> G
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (<i>Sodium dodecil sulphate - polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
<i>SmII</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

LISTA DE TABELA

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Primers utilizados para mutagênese dirigida. O códon mutado está sublinhado e o nucleotídeo mutado em negrito.....	43
Tabela 2- Primers utilizados para amplificar a região mutada e controle.....	44
Tabela 3- Dados bioquímicos da família S.....	49
Tabela 4- Dados bioquímicos da família J.....	50

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Diagrama delineando a homeostase do cálcio.....	22
Figura 2- Características estruturais dos GPCRs.....	23
Figura 3- Ativação da proteína G.....	24
Figura 4- Modelo estrutural do Receptor Sensor de Cálcio.....	26
Figura 5- Modelo de dimerização do CASR.....	28
Figura 6- Transdução de sinal mediada por CASR.....	30
Figura 7- Topografia e posição das mutações do CASR.....	33
Figura 8- Tumor marrom Paciente II-2, família S.....	38
Figura 9- Representação esquemática da estrutura genômica e posição dos primers no gene do receptor sensor de cálcio.....	39
Figura 10- Heredograma da família S.....	48
Figura 11- Heredograma da família J.....	49
Figura 12- Seqüenciamento direto na amostra de um dos membros da família S identifica a mutação na posição c. 1913.G>T.....	51
Figura 13- Gel de agarose mostrando a digestão com enzima de restrição <i>AciI</i> dos produtos de PCR do exon 7 da Família S.....	51
Figura 14- Seqüenciamento direto na amostra de um dos membros da família afetada identifica a mutação na posição c. 2244C>G.....	52
Figura 15- Gel de agarose mostrando a digestão com enzima de restrição <i>SmlI</i> dos produtos de PCR do exon 7 da Família S.....	52
Figura 16- Seqüenciamento direto na amostra de um dos membros da Família J identifica a mutação c. 2253T>G.....	53

	Família J. identifica a mutação c.2.T>G.....	
Figura 17-	Gel de agarose mostrando a digestão com enzima de restrição <i>NcoI</i> dos produtos de PCR do exon 2 da Família J.....	54
Figura 18-	Análise da previsão dos ATG's.....	55
Figura 19-	Digestão do controle e mutagênese c.2244C>T e c.1913G>T.....	56
Figura 20-	Digestão da clonagem do ATG mutado e controle em pcDNA1.1.	57
Figura 21-	Western Blot de extrato protéico total de células HEK-293 não transfectada e transfectada com CASR nativo e com as mutações p.M1? e c.1913G>T [p.R638L].....	58
Figura 22-	Densitometria das amostras p.R638L, p.M1? e CASRwt.....	59
Figura 23-	Western Blot de extrato protéico total de células HEK-293 não transfectada e transfectada com CASR nativo e com as mutações p.M1? e c.1913G>T [p.R638L].....	59
Figura 24-	Imunocitoquímica de células humanas renais embrionárias transfectadas com receptor sensor de cálcio.....	61

RESUMO

O CASR pertence à família C dos receptores que se acoplam à proteína G e é ativado quando interage com o cálcio extracelular, sendo responsável pelo ajuste do “set point” do cálcio extracelular por meio da regulação da secreção de PTH e excreção de cálcio. Mutações no Receptor Sensor de Cálcio (CASR) estão associadas a FHH (Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar) e NSHTP (Hiperparatireoidismo Neonatal Grave) quando inativadoras do receptor e ADH (Hipoparatireoidismo Autossômico Dominante) quando ativadoras. O Hiperparatireoidismo Neonatal Grave (NSHPT) é uma doença rara caracterizada por calcemias elevadas, próximas às consideradas incompatíveis à vida, associada ao aumento da concentração de PTH, desmineralização óssea grave e sintomas neonatais como hipotonia e baixo ganho ponderal. Trata-se de uma doença familiar, com pais portadores de Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar (FHH), uma doença autossômica dominante, geralmente assintomática, com calcemias elevadas ou no limite superior da normalidade, associada a concentrações de PTH normais, porém não suprimidas e hipocalciúria. ADH, por sua vez, cursam com desregulação no ajuste da concentração de cálcio extracelular, onde baixas concentrações de cálcio ativam o receptor e inibem a secreção de PTH pelas paratireóides e aumentam a excreção de cálcio pelos rins. Indivíduos afetados apresentam hipocalcemia, PTH no limite inferior ou abaixo do normal, hiperfosfatemia e hipercalcúria. O objetivo desse trabalho foi estudar duas famílias portadoras de NSHPT e FHH, identificar novas mutações e analisar o grau de expressão dos receptores mutados. Identificamos três mutações pontuais, nas posições c.1913.G>T, c.2.T>G e c.2244.C>G. Na família S encontramos a mutação c.1913.G>T que resulta em mudança de aminoácido Arginina por Leucina na posição 638 e a mutação silenciosa c.2244.C>G que não altera o aminoácido Prolina da posição 748. Na família J encontramos a mutação c.2.T>G que resulta em mudança do primeiro aminoácido Metionina e em perda da sequência Kozak (AXXATGG). Um programa de análise para a previsão de seqüências utilizadas para início da tradução protéica, indicou que, na presença da mutação, o ATG com maior probabilidade de ser utilizado como o novo sítio de início de tradução localiza-se no exon 3, na mesma matriz de leitura original. Para análise da expressão do receptor, com a mutação no códon inicial de transcrição do receptor (p.M1?), inserimos no cDNA do CASR um fragmento correspondente à região -226 a 66 do CASR, contendo cinco potenciais seqüências Kozak. Para o estudo da expressão dos receptores mutados da família

S inserimos as mutações no cDNA do CASR através de mutagênese sítio dirigida. Analisamos a expressão dos receptores mutados através do Western Blot. O receptor mutado p.R638L apresentou uma expressão similar ao receptor nativo e foram visualizadas as formas monoméricas correspondentes às bandas de 140kDa (forma imatura, parcialmente glicosilada) e 160kDa (forma madura e glicosilada) e bandas superiores maiores que 220kDa. A mutação c.2244.C>G é silenciosa e apresentou expressão similar à do receptor nativo. Em contraste, a expressão do receptor mutado p.M1? através do Western blot estava consideravelmente reduzida. Nos experimentos de imunocitoquímica, observamos que o receptor nativo foi bem expresso na superfície celular tanto em células não permeabilizadas, quanto permeabilizadas. Padrão semelhante foi observado para o receptor mutado p.R638L, indicando maturação e processamento apropriado no retículo endoplasmático enquanto que o receptor com a mutação p.M1? não foi visualizado na superfície celular de células não permeabilizadas e só foi identificado no interior de células permeabilizadas, sugerindo que o receptor mutado era retido no retículo endoplasmático não conseguindo se expressar na membrana plasmática.

ABSTRACT

The CASR belongs to family C of the G protein coupled receptors and it is activated by the interaction with extracellular calcium, which is responsible for adjusting extracellular calcium set point adjusting PTH and calcium excretion. Calcium Sensing Receptor mutations are related to Familial Hypocalciuric Hypercalcemia (FHH) and Neonatal Severe Hyperparathyroidism (NSHPT) when inactivating and to Autosomal Dominant Hypocalcemia (ADH) when activating. Neonatal Severe Hyperparathyroidism (NSHPT) is a rare disease characterized by hypercalcemia, calcium levels close to those incompatible with life, markedly elevated PTH levels, severe bone demineralization and neonatal symptoms as hypotonia and poor weight gain. Familial Hypocalciuric Hypercalcemia is a familial disease with Autosomal dominant inheritance, in which parents are usually affected, generally asymptomatic, mild – to – moderate hypercalcemia and normal PTH levels (but not suppressed) and hypocalciuria. In ADH, affected individuals' present hypocalcemia, PTH at the lower limit or normal range, hyperphosphatemia and hypercalciuria. The objective of this work was study of two families (S and J) with Neonatal Severe Hyperparathyroidism and Familial Hypocalciuric Hypercalcemia, search for new mutations and analyze the expression pattern of mutated receptors. Three new missense mutations were found: c.1913.G>T, c.2.T>G and c.2244.C>G. The mutation c.1913.G>T was identified at family S. and resulted in Arginine to Leucine change at codon 638. The silent mutation c.2244.C>G didn't change the amino acid Proline at codon 748. A novel mutation in exon 2, T to G transition at nucleotide 2, changing Metionine to Arginine was identified at family M. The mutation disrupts the original Kozak sequence (AXX**ATGG**), altering the protein start site. Computational analysis using a program that predicts start sites showed that the putative new translation start site was in the exon 3 in frame. A portion of the gene containing the mutation and five cryptic Kozak sequences (-226 to 66) was used to analyze the expression of the mutant receptor (p.M1?). To analyze the expression pattern of Family S, the mutated cDNAs was inserted in a vector, using site direct mutagenesis. Western blot was performed to analyze the expression analysis of the mutated receptors. The p.R638L receptor showed similar expression pattern compared with the wild type receptor, presenting the monomeric forms of 140 (immature, partial glycosylated) and 160kDa (mature, glycosylated) and other forms higher than 200kDa. The mutation c.2244.C>G showed similar expression pattern compared with the wild type

receptor. In contrast, Western blot expression levels of the mutant receptor p.M1? was dramatically reduced. Immunocytochemistry experiments showed strong staining at the cell surface of nonpermeabilized and permeabilized HEK293 cells expressing the wild type receptor. The same pattern was observed for the mutant receptor p.R638L, suggesting correct maturation and trafficking. While the mutant receptor p.M1? was not expressed on the cell surface and the staining was only identified inside permeabilized cells, suggesting that the mutant receptor was trapped within the endoplasmatic reticulum and was not expressed at the plasmatic membrane.

INTRODUÇÃO

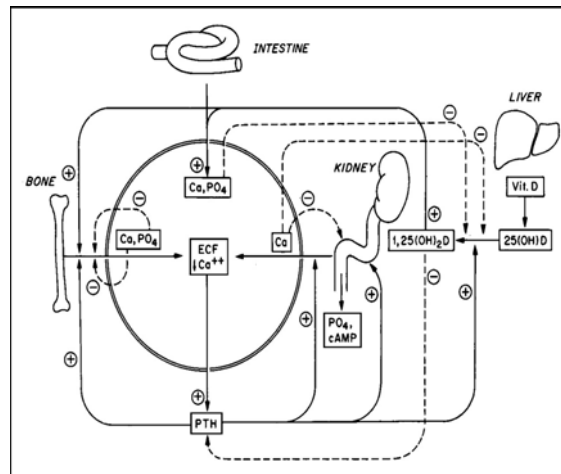
HOMEOSTASE DO CÁLCIO

O íon cálcio participa de inúmeros processos fisiológicos essenciais. O cálcio intracelular pode atuar como segundo mensageiro, cofator enzimático e ainda regular funções celulares críticas como contração muscular, secreção hormonal, proliferação e diferenciação celular (PIETROBON et al, 1990; BERRIDGE et al, 2003). A concentração de cálcio intracelular é de aproximadamente 100nM, cerca de dez mil vezes inferior à concentração de cálcio extracelular, de 1.3mM. O cálcio extracelular é fonte de todo cálcio intracelular e é essencial para coagulação sanguínea, manutenção da integridade óssea e regulação da excitabilidade neuromuscular (BROWN e MACLEOD, 2001).

A concentração de cálcio extracelular é controlada por um mecanismo complexo de homeostase que envolve rins, intestino e ossos e pela ação de dois hormônios: paratormônio (PTH) e 1,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃) (Fig. 1).

Em resposta à diminuição da concentração de cálcio extracelular no organismo há um aumento de secreção de PTH pelas células principais das glândulas paratireóides. Nos rins, o PTH aumenta a reabsorção de cálcio do filtrado glomerular, reduz a reabsorção de fosfato e ativa a enzima 1 α -hidroxilase, responsável pela conversão de 25 (OH) vitamina D₃ em 1,25 (OH)₂vitamina D₃, que é a forma mais ativa dos hormônios relacionados à vitamina D (WEISINGER et al, 1989) além de estimular a absorção de cálcio e fosfato nos intestinos. Nos ossos, o PTH e a vitamina D promovem a absorção de cálcio e fosfato (CHATTOPADHYAY et al, 1997b; BROWN e MACLEOD, 2001).

Um outro fator responsável pelo controle da concentração de cálcio extracelular é a propriedade de ser auto-regulável, interagindo com o seu receptor, o receptor sensor de cálcio (BROWN et al, 1993; BROWN et al, 1998). Um aumento na concentração de cálcio extracelular ativa o CASR, reduz a taxa de secreção de PTH nas paratireóides e, nos rins, promove a excreção de cálcio fazendo com que o cálcio extracelular retorne ao seu valor basal. Dessa maneira, o receptor sensor de cálcio regula o “set point” das glândulas paratireóides (concentração de cálcio que resulta em metade da inibição máxima da secreção de PTH) (CHATTOPADHYAY et al, 1996).



Annual Review of Nutrition; 20: 507-533,2000.

Figura 1 – Diagrama delineando a homeostase do cálcio. As linhas sólidas representam os efeitos do PTH e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Linhas pontilhadas estão relacionadas a ações diretas do cálcio extracelular e fósforo nos tecidos. Ca^{+2} , cálcio; PO_4 , fósforo; ECF, fluido extracelular; +, efeitos positivos; – efeitos inibitórios.

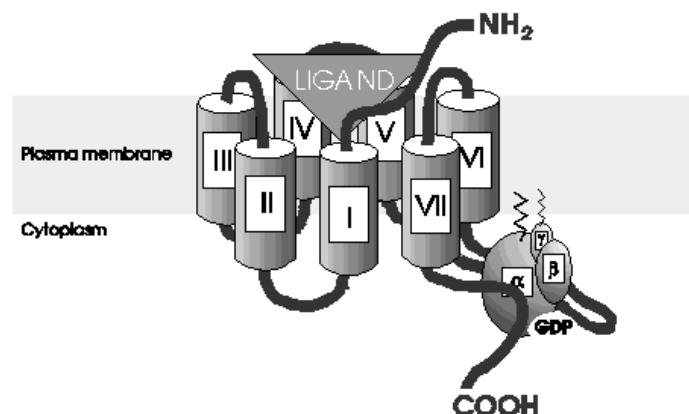
RECEPTORES QUE SE ACOPLAM À PROTEÍNA G

O receptor sensor de cálcio é membro da superfamília dos receptores que se acoplam à proteína G (GPCR) (BROWN et al, 1993; BROWN et al, 1998). GPCRs representam a maior família de moléculas da superfície celular envolvidas em transmissão de sinal. Representam 1% do genoma dos mamíferos. Mais de 1000 receptores para estímulos sensoriais (odorantes, luz, etc) e químicos (catecolaminas, aminoácidos, peptídeos e até íons) foram identificados e compartilham propriedades bioquímicas e estruturais (HERMANS, 2003).

Características estruturais

Todos os receptores que se acoplam à proteína G apresentam características estruturais similares: um segmento N-terminal extracelular, sete segmentos transmembrana, três alças extracelulares, três alças intracelulares e um segmento C-terminal (Fig. 2) (RODBELL, 1980; JI et al, 1998). Uma quarta alça citoplasmática é formada quando o

ácido graxo palmitato liga-se ao segmento C-terminal (JI et al, 1998; BERTHIAUME, 2002).



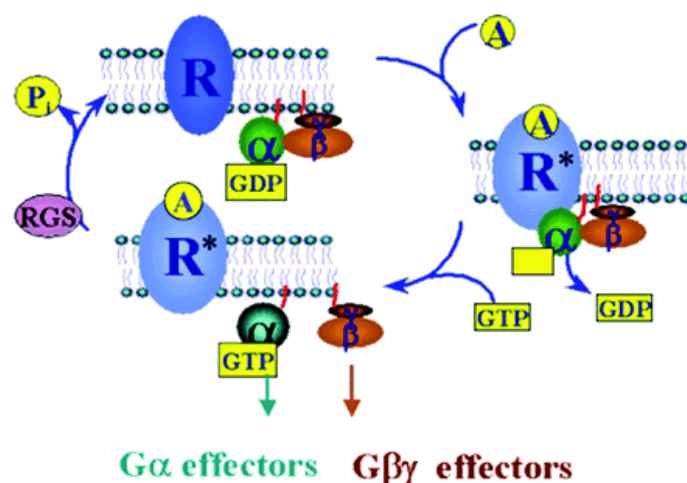
http://www.mbb.ki.se/hejlab/RS/structure_of_GPCR.htm

Figura 2 – Características estruturais dos GPCRs. A estrutura dos GPCRs apresenta uma extremidade amino-terminal, sete domínios transmembrana e uma extremidade carboxi-terminal.

Ativação e sinalização dos GPCRs

O modelo de ativação dos GPCRs (Fig. 3) conhecido como complexo ternário estendido, propõe um equilíbrio entre dois estados funcionalmente distintos: o estado inativo (R) e o estado ativo (R*) (GETHER e KOBILKA, 1998). No estado R as subunidades $G\alpha$ encontram-se ligadas ao complexo $\beta\gamma$ (CONKLIN e BOURNE, 1993; CLAPHAM e NEER, 1997; OFFERMANN, 2003). A interação entre o receptor e o agonista altera a conformação do domínio transmembrana responsável pela estabilização do estado R* do receptor (BOCKAERT e PIN, 1999), o que resulta na troca de GDP por GTP na subunidade $G\alpha$ e a dissociação da proteína G do receptor, assim como a dissociação da subunidade α do complexo $\beta\gamma$. Devido à atividade GTPásica intrínseca de todas as subunidades $G\alpha$, $G\alpha/GTP$ é eventualmente hidrolisado a $G\alpha/GDP$, que é capaz de se ligar com grande afinidade ao complexo $\beta\gamma$ livre e dessa forma, o sistema retorna ao estado

inativado (R) (CONKLIN e BOURNE, 1993; CLAPHAM e NEER, 1997; OFFERMANN, 2003).



Endocrine Reviews, 24(6):765-781,2003.

Figura 3 – Ativação da proteína G. A ativação do receptor (R) promove a troca de GDP por GTP na subunidade α. Gα-GTP se dissocia de Gβγ e R*. As subunidades ficam livres para modular a atividade de outros efetores intracelulares. A finalização do sinal ocorre quando γ-fosfato do GTP é removido através da atividade GTPásica intrínseca da subunidade α, retornando a GDP e associando-se novamente com o complexo βγ. As proteínas reguladoras da sinalização da proteína G (RGS) aceleram a atividade GTPásica da subunidade α.

A ativação de subunidades Gαs e Gαi regulam os níveis de AMP cíclico mediando a ativação ou inibição, respectivamente, de isoformas distintas de adenilato ciclase (SUNAHARA et al, 1996). Gαq/ Gα11/ Gα14/ Gα16 podem ativar fosfolipase C (PLCβ) (EXTON, 1996), resultando na quebra de fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato e a geração dos segundos mensageiros, inositol (1,4,5) trisfosfato e diacilglicerol (CONKLIN e BOURNE, 1993; NEER, 1995; RENS-DOMIANO e HAMM, 1995; WESS, 1998).

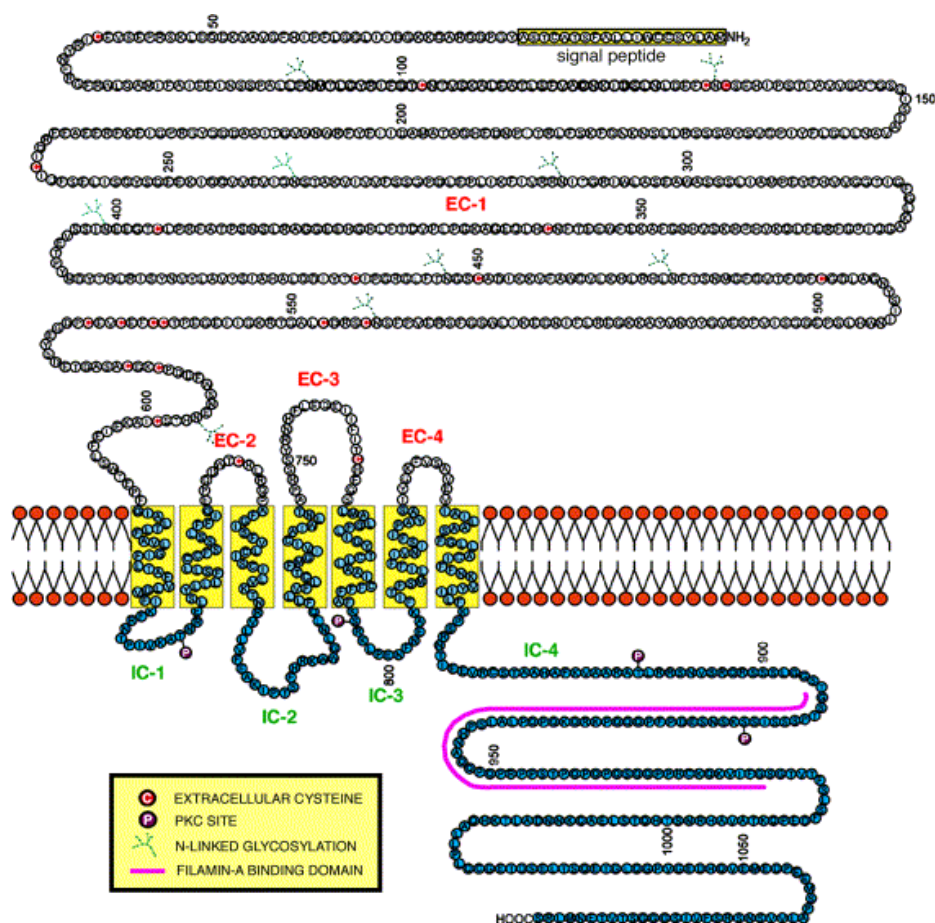
Família 3/C GPCRs

De acordo com semelhanças na sequência do domínio transmembrana os GPCRs foram agrupados em famílias. A família 3/C dos GPCRs compreende os receptores metabotrópicos do glutamato (mGluRs 1-8), os receptores GABAB, o Receptor Sensor de Cálcio e um subgrupo de receptores de ferormônios e os receptores gustativos. Todos esses receptores possuem um extenso domínio extracelular (500-600 resíduos) que apresenta uma homologia limitada às proteínas bacterianas ligadoras periplasmáticas, as quais exibem uma característica estrutural de um “Venus flytrap” bilobado (O'HARA et al, 1993; RAY et al, 1999; REYES-CRUZ et al, 2001).

RECEPTOR SENSOR DE CÁLCIO

Evidências acumuladas na década de 1980 sugeriam um mecanismo sensor para o cálcio relacionado a um receptor com características da superfamília dos GPCRs (BROWN, 1991). Em 1993, a partir de estudos de expressão em oócitos *Xenopus laevis*, o receptor sensor de cálcio foi clonado de paratireóides bovinas e constatou-se que apresentava propriedades similares à do mecanismo sensor de cálcio apresentado endogenamente pelas paratireóides bovinas (BROWN et al, 1993; BROWN e MACLEOD, 2001). Posteriormente, o receptor foi clonado em humanos e em várias espécies e tecidos envolvidos ou não a homeostase do cálcio (GARRETT et al, 1995a; CHATTOPADHYAY et al, 1997a; CHATTOPADHYAY et al, 1997b; CHATTOPADHYAY et al, 1997c; BROWN e MACLEOD, 2001).

O gene humano do receptor sensor cálcio (Fig. 4) está localizado no braço longo do cromossomo 3q21-24 (CHOU et al, 1995). A região do domínio extracelular do receptor é codificada pelo exon 2 até início do exon 7. A região transmembrana do receptor e o domínio intracelular são codificados pelo exon 7 (GARRETT et al, 1995b). O domínio extracelular do receptor é constituído de 612 aminoácidos e representa o local de interação com o cálcio. Duzentos e cinquenta aminoácidos fazem parte da região transmembrana e das três alças intra e extracelulares e 216 aminoácidos constituem o domínio intracelular (BROWN et al, 1993).



Cell Calcium, 35: 183-196,2004.

Figura 4 – Modelo estrutural do Receptor Sensor de Cálcio. Extenso domínio extracelular amino terminal, EC - alças extracelulares, sete domínios transmembrana, IC - alças intracelulares, NH₂ - amino terminal, HOOC - cauda C-terminal.

RELAÇÃO ESTRUTURA-FUNÇÃO DO CASR

Expressão e N-glicosilação

Proteínas do CASR extraídas de células transfectadas transitoriamente com CASR humano (BAI et al, 1996; FAN et al, 1997) possuem o mesmo padrão de expressão daquelas isoladas de células paratireóides bovinas (BAI et al, 1996). A detecção do CASR dessas células através de um anticorpo para esse receptor mostrou a presença de três bandas

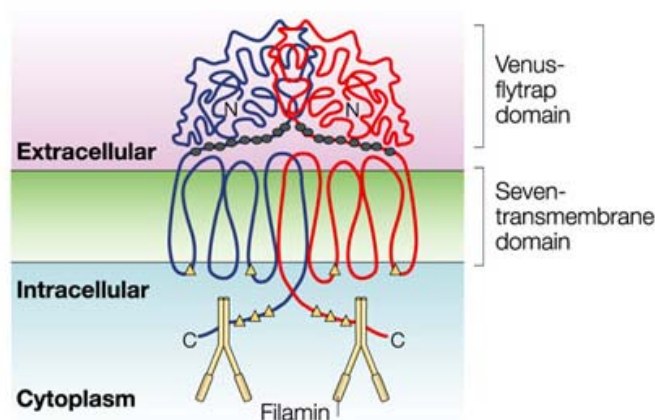
imunorreativas específicas entre 120 e 200 kDa e bandas adicionais de alta massa molecular (~350 kDa). A espécie menor de 120 kDa representa a forma não-glicosilada; a banda de 140 kDa representa a forma imatura glicosilada com alta concentração de manose, sensível a endoglicosidase H (Endo H) e à N-glicosidade F (PNGase F) e a banda de 160 kDa representa a forma completamente madura glicosilada por carboidratos complexos, resistente a Endo H e sensível a PNGase F (BAI et al, 1996; RAY et al, 1998). Em células HEK293 transfectadas com CASR, na presença de tunicamicina, ocorreu a inibição da glicosilação e foi visualizada somente a forma não glicosilada de 120 kDa (BAI et al, 1996; FAN et al, 1997).

Experimentos de mutagênese sítio dirigida revelaram que oito dos onze sítios potenciais para N-glicosilação eram eficientemente glicosilados e que a alteração/destruição de quatro ou cinco desses sítios reduzia a expressão do receptor na superfície celular de 50-90%. A glicosilação de pelo menos três sítios é essencial para a expressão na superfície celular, mas não parece ser crítica para a transdução do sinal, a qual pode ser medida através do acúmulo de fosfato-inositóis induzidos por alta concentração de cálcio extracelular (RAY et al, 1998).

Dimerização CASR

Vários estudos indicam que os GPCRs funcionam como dímeros/oligômeros (HELDIN, 1995). Homodimerização é definida como a associação física entre proteínas idênticas, enquanto na heterodimerização a associação ocorre entre proteínas não idênticas. Essa associação pode ser entre dois monômeros, formando dímeros ou múltiplos monômeros formando oligômeros (RIOS et al, 2001). O envolvimento do domínio extracelular na dimerização tem sido extensivamente investigado, particularmente para o receptor sensor de cálcio (GOLDSMITH et al, 1999; PACE et al, 1999). Resultados de Western Blot sugerem que o CASR é capaz de se associar fisicamente através de pontes dissulfídicas, apresentando as bandas de ~200kDa (GOLDSMITH et al, 1999). Acredita-se que o domínio transmembrana forneça a conformação apropriada para facilitar a formação de pontes dissulfídicas na dimerização do ECD (domínio extracelular) (RIOS et al, 2001).

Bai e colaboradores (1999) em experimentos de co-expressão de dois mutantes inativos do CASR, cada qual com atividade reduzida ou ausente, observaram a formação de heterodímeros com uma reconstituição parcial da sinalização dependente de cálcio extracelular, sugerindo a importância de interações intermoleculares na função do receptor (BAI et al, 1999). O modelo molecular do domínio extracelular (ECD) utilizando a estrutura cristalográfica do mGluR1 sugeriu que as leucinas conservadas na interface dimérica do mGluR1 podem ser importantes para interações hidrofóbicas nesses dois receptores (Fig. 5) (BAI, 2004).



Nature Reviews Molecular Cell Biology 4: 530-538, 2003.

Figura 5 – Modelo de dimerização do CASR. Interação entre dois receptores no domínio “vênus flytrap” (estrutura bilobulada). Os sítios de fosforilação de PKC são indicados por triângulos. Os círculos no ECD indicam resíduos de cisteína.

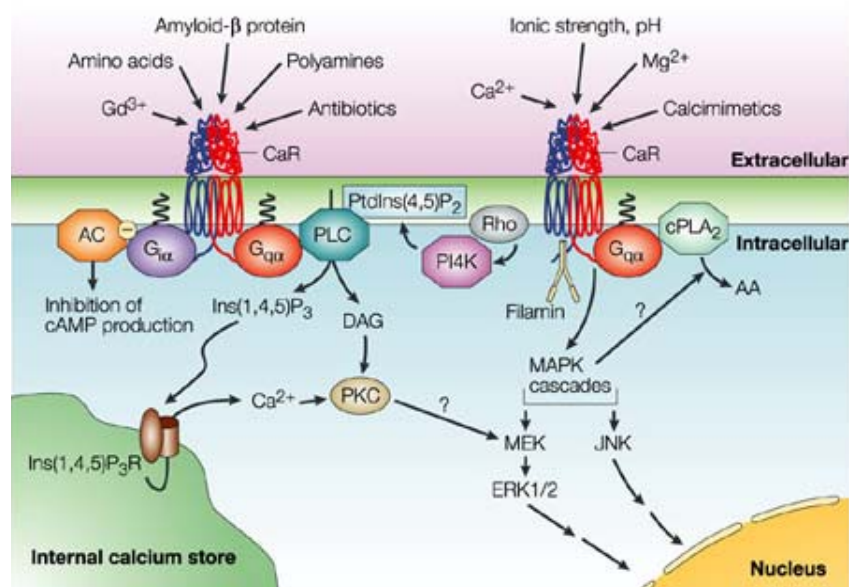
Sinalização do CASR

A primeira evidência da ligação do Ca_0^{+2} (cálcio extracelular) ao ECD foi observada em estudo com receptores quimera, com auxílio do mGluR (NEMETH, 1996; HAMMERLAND et al, 1999). O aumento da concentração de Ca_0^{+2} ou outros agonistas do CASR, comumente liberam Ca_i^{+2} (cálcio intracelular) através da interação do CASR e PLC, que é mediada pelas subunidades $\text{G}\alpha_q$ (KIFOR et al, 1997). Essas interações resultam na

hidrólise do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato pela PLC e a formação de inositol-1,4,5-trisfosfato e diacilglicerol (Fig. 6) (HANDLOGTEN et al, 2001; KIFOR et al, 2001). A liberação do Ca_i^{+2} de lojas intracelulares é mediada por IP_3 através da ativação de receptores IP_3 no retículo endoplasmático, principal loja intracelular de cálcio. Outros autores demonstraram que as alças intracelulares dois e três contêm sítios importantes para a ativação da PLC pelo CASR (BERRIDGE et al, 2000; CHANG et al, 2000; LEE et al, 2004). Paralelamente, CASR também ativa fosfatidilinositol 4-quinase (Fig. 6), uma das enzimas responsáveis pela reposição de fosfatidilinositol 4,5 trisfosfato (HUANG et al, 2002).

O CASR interage diretamente não apenas com $\text{G}_{\alpha q}$, mas $\text{G}_{\alpha i}$, resultando na inibição de adenilato ciclase e redução dos níveis celulares de AMP cíclico. Outras isoformas de Adenilato Ciclase são inibidas por aumentos na concentração de cálcio intracelular e tais isoformas estão presentes nas mesmas células que o Receptor Sensor de Cálcio, exemplificando a complexidade da sinalização do CASR (DE JESUS FERREIRA et al, 1998).

A cascata de sinalização do CASR também se relaciona a várias MAPKs, como ERKs 1e 2 (quinases reguladoras de sinal extracelular) (MCNEIL et al, 1998; KIFOR et al, 2001; CORBETTA et al, 2002) e quinases amino-terminais Jun (JKN) (ARTHUR et al, 2000). O aumento de cálcio intracelular resulta na ativação da PKC, que em contrapartida ativa a cascata da MAPK. O CASR também pode ativar a cascata da MAPK através da isoforma G_i que inibe a adenilato ciclase e ativa as tirosino quinases da família *Src* (KISELYOV et al, 2003).



Nature Reviews Molecular Cell Biology 4: 530-538, 2003.

Figura 6 – Transdução de sinal mediada por CASR. Vários agonistas interagem com CASR e ativam a cascata de sinalização. AA, ácido aracdônico; AC, adenilato ciclase; cAMP, AMP cíclico; cPLA₂, fosfolipase A2 citosólica; DAG, diacilglicerol; ERK, quinase reguladora de sinal; Ins(1,4,5)P₃, inositol-1,4,5-trisfosfato; Ins(1,4,5)P₃R, receptor inositol-1,4,5-trisfosfato; JNK, quinase amino-terminal Jun; MAPK, proteína-quinase mitógeno ativada; MEK, MAPK quinase; PI4K, fosfatidilinositol 4-quinase; PKC, proteína quinase C; PLC, fosfolipase C; PtdIns(4,5)P₂, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato.

DOENÇAS ASSOCIADAS A MUTAÇÕES NO CASR

Mutações no gene do receptor sensor de cálcio estão associadas a três doenças: a hipocalcemia autossômica dominante, o hiperparatireoidismo neonatal grave e a hipercalcemia hipocalciúrica familiar (BROWN e MACLEOD, 2001).

Hipocalcemia Autossômica Dominante – ADH

Mutações que ativam o receptor resultam em hipocalcemia autossômica dominante (POLLAK, M. et al, 1994). A hipocalcemia autossômica dominante cursa com desregulação no ajuste da concentração de cálcio extracelular, onde baixas concentrações

de cálcio ativam o receptor e inibem a secreção de PTH pelas paratireóides e aumentam a excreção de cálcio pelos rins (PEARCE, S. H. et al, 1996). Indivíduos afetados apresentam hipocalcemia, PTH no limite inferior ou abaixo do normal, hiperfosfatemia e hipercalcúria. As mutações ativadoras do receptor estão presentes principalmente nos exons 3 (domínio extracelular) e 7 (domínio transmembrana) (HENDY et al, 2000) (Fig. 7).

Mutações com perda de função do CASR

Landon, J.F. (1932) e Pratt e colaboradores (1947) relataram casos de hiperparatireoidismo na infância, com achados clínicos de calcificações em rins, pulmão, cartilagem brônquica, timo e plexo coróide, indicativos de hiperfunção das glândulas paratireóides. Alguns casos foram seguidos de óbito quando da não realização de paratireoidectomia. Posteriormente, diversos outros estudos relacionaram o gene do CASR a essas doenças. Mutações com perda de função do receptor estão associadas a hipercalcemia hipocalciúrica familiar e hiperparatireoidismo neonatal grave. Nestas doenças, a sensibilidade das células das paratireóides e tubulares renais à elevação do cálcio extracelular está atenuada, alterando o “set point” da glândula e resultando em hipercalcemia e hipocalciúria (BROWN et al, 1995).

Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar – FHH

Indivíduos com hipercalcemia hipocalciúrica familiar são geralmente assintomáticos podendo ter queixas inespecíficas tais como cansaço, fraqueza, cefaléia e polidipsia (MARX et al, 1981). Análises bioquímicas mostram cálcio no limite superior da normalidade ou elevado, com hipocalciúria e PTH dentro dos limites da normalidade, porém não suprimido (FOLEY et al, 1972). Outros achados bioquímicos incluem hipermagnesemia moderada ou níveis séricos de magnésio no limite superior da normalidade, e níveis normais de $25(\text{OH})\text{D}_3$ e $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (PEARCE, S. H. et al, 1996). Devido ao curso clínico benigno da doença, recebe outras designações como Hipercalcemia Benigna Familiar e Hipercalcemia Hipocalciúrica Benigna Familiar (MARX et al, 1981). Uma importante característica nas famílias portadoras de FHH é a inapropriada redução da calciúria, devido à coexistência da hipercalcemia familiar (FOLEY et al, 1972; MARX et al, 1981; PEARCE, S. et al, 1996). Esse achado é mais bem demonstrado através da

mensuração do clearance de cálcio em relação a creatinina, através da equação: Ca^{+2} urinário x creatinina sérica / Ca^{+2} sérico x creatinina urinária (MARX et al, 1981).

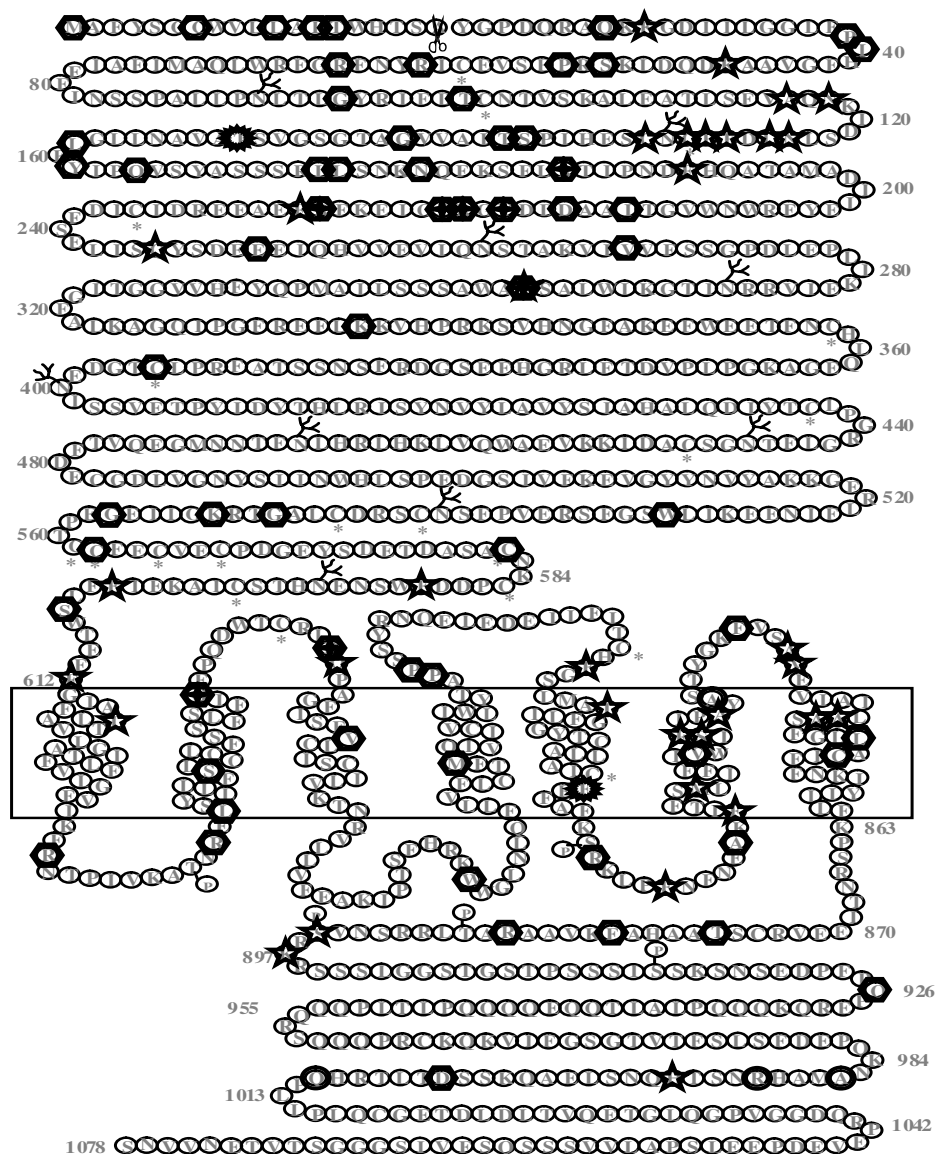
O modo de transmissão desta doença é autossômico dominante com alta penetrância. A maior parte das famílias com hipercalcemia hipocalciúrica familiar possuem mutações no gene do receptor sensor de cálcio localizado no cromossomo 3q21-24 (CHOU et al, 1995). Entretanto, a identificação de FHH em dois diferentes loci, 19p13 (HEATH et al, 1993) e 19q13 (LLOYD et al, 1999) respectivamente, sugerindo heterogeneidade.

Hiperparatireoidismo Neonatal Grave – NSHPT

Hiperparatireoidismo neonatal grave é uma doença rara na qual, concentrações de cálcio estão altíssimas podendo ser incompatível com a vida e com altas concentrações de PTH presente desde o nascimento (MARX et al, 1985). Apesar de o cálcio sérico encontrar-se extremamente elevado, a calciúria persiste muito baixa. O NSHPT representa a expressão mais grave da hipercalcemia hipocalciúrica familiar (POLLAK, M. R. et al, 1994) e na maioria dos casos, os pais são heterozigotos, sendo a criança homozigota para mutações inativadoras no receptor (MARX et al, 1985).

Nos primeiros meses de vida sucção débil, baixo ganho ponderal e hipotonia são os sintomas mais comuns (PRATT et al, 1947). Por esses pacientes não possuírem cópia normal do receptor sensor de cálcio, eles apresentam uma hipercalcemia mais grave, PTH elevado, e hiperplasia celular das paratireóides. Caso não seja diagnosticada precocemente, esses pacientes evoluem com desmineralização óssea grave com fraturas espontâneas, retardo mental e pancreatite. Complicações respiratórias relacionadas às deformidades torácicas e hipotonia são as principais causas de morbidade, com óbito no primeiro ano de vida em 50% dos indivíduos (MARX et al, 1985).

Mais de cinquenta mutações inativadoras foram descritas até o momento e estão localizadas predominantemente no domínio extracelular, na parte N-terminal, principalmente na região onde ocorre a interação do Ca_o^{+2} e no domínio transmembrana (PIDASHEVA et al, 2004) (Fig. 7).



Adaptado de D'Souza, Li, 1999. <http://www.casrdb.mcgill.ca/?Topic=CasrGraph2>

Figura 7 – Topografia e posição das mutações do CASR. Indica a posição de uma mutação inativadora e a posição de duas mutações inativadoras diferentes. Indica a posição de uma mutação inativadora e a posição de duas mutações ativadoras diferentes. Indica a posição de polimorfismos.

OBJETIVOS

Objetivo principal

- ✓ Analisar, por técnicas de biologia molecular, o Receptor Sensor de Cálcio (CASR) em duas famílias portadoras de NSHPT e FHH.

Objetivos específicos

- ✓ Sequenciar o gene do CASR nestas famílias para identificar possíveis mutações.
- ✓ Analisar o grau de expressão dos receptores mutados.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela comissão de ética da Faculdade de Ciências Médica da Unicamp (anexo 1), e pela CONEP (anexo 2). Os pacientes foram informados dos objetivos da pesquisa e assinaram um termo de esclarecimento e consentimento (anexo 3).

DETECÇÃO DE MUTAÇÕES

Pacientes

Família S

A família S (Fig. 10) é portadora de hipercalcemia hipocalciúrica familiar e hiperparatireoidismo neonatal grave. Um de seus membros, o paciente índice II-2, aos 10 anos de idade apresentou aumento progressivo de maxila esquerda (Fig. 8). A tomografia computadorizada de crânio mostrou múltiplas calcificações intracranianas e lesão expansiva em maxila esquerda de 6.5 x 5.5 x 6.1 cm, projetando-se na cavidade nasal, provocando desvio de septo, e na cavidade oral, alterando o palato duro do lado esquerdo, provocando afastamento radicular e comprometimento importante do processo alveolar. Observaram-se lesões com as mesmas características na mandíbula esquerda. Após 20 dias ocorreu exteriorização do tumor pela narina esquerda, acompanhada de sangramento discreto, perda de peso, sem febre. A biópsia foi compatível com tumor marrom. No período neonatal, a criança apresentou hipotonia muscular, constipação intestinal, dificuldade de sucção e perda ponderal importante, além de pneumonias de repetição. Ao exame, a criança apresentava um atraso grave no desenvolvimento neuropsicomotor (não falava, não andava), hipotonia, deformidades ósseas e tumor em joelho direito de longa duração.



Figura 8 – Tumor marrom Paciente II-2, família S., 11 anos, A. Aumento volumétrico na face esquerda, de crescimento rápido, alterando a posição dos dentes anteriores. B. Lesão expansiva em maxila esquerda 6.5 x 5.5 x 6.1 cm projetando-se na cavidade nasal.

Família J

A família J. (Fig. 10) é portadora de hipercalcemia hipocalciúrica familiar e hiperparatireoidismo neonatal grave. O paciente índice II-1 com duas semanas de vida apresentou hipotonia, desidratação e desnutrição e áreas de desmineralização óssea.

Extração de DNA genômico

O DNA genômico de linfócitos foi extraído de sangue periférico utilizando o Wizard® genomic DNA purification kit (Promega).

PCR

O DNA genômico foi usado como molde para as reações de PCR. A região codificadora do receptor sensor de cálcio está contida em 6 exons (exon 2 a 7) (Fig. 9). Os exons da região codificadora da proteína e também os íntrons, próximos aos exons, foram amplificadas através de PCR usando pares de primers específicos para cada região.

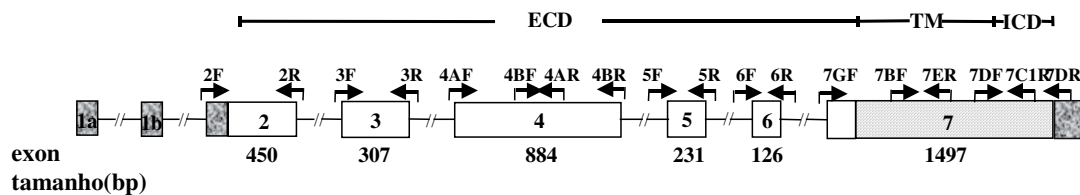


Figura 9 – Representação esquemática da estrutura genômica e posição dos primers no gene do receptor sensor de cálcio. Exon 1a, 1b e região 5' do exon 2 codifica a região 5' não traduzida (5'UTR) (quadrados cinza), exon 2 a porção 5' de 7 codifica os 612 aminoácidos do domínio extracelular (ECD) (quadrado branco); Exon 7 codifica parte do domínio extracelular, a região transmembrana (TM), o domínio intracelular (ICD) (quadrado pontilhado) e a região 3' não traduzida (3'UTR) (quadrado cinza).

Para a amplificação, 250ng de DNA genômico foi usado como molde, com 100ng de primers senso e antisenso, 200µM de dNTPs, 10µL de tampão do PCR para um volume final de 100µL. Após um "hot start" a 98°C por 3 minutos, 1 unidade de Taq DNA polimerase foi adicionada, seguido de 35 ciclos de amplificação que consiste em desnaturação do DNA molde a 94°C por 30 segundos cada, uma temperatura de anelamento que foi otimizada para cada par de primer (variando de 50° a 65°C) por 45 segundos e uma extensão a 72°C por 45 segundos. Uma extensão final a 72°C por 10 minutos foi realizada. Cada reação de PCR foi purificada e seqüenciada.

Seqüenciamento direto

Para o seqüenciamento direto, foram utilizados os mesmos primers usados para a amplificação. No seqüenciamento automático os nucleotídeos foram marcados com o fluorocromo Big Dye (Applied Biosystems).

Para reação de seqüenciamento foram utilizados 2µL (aproximadamente 10ng) do produto do PCR purificado, 1µL de primer (5pmol), 2µL de save money (1M Tris-HCl pH 9, 1M MgCl₂), 2µL de Big Dye (versão 2 Applied Biosystem) para um volume final de 10µL. O ciclo foi realizado no termociclador Matercycler Eppendorf e consistiu em um passo de pré-desnaturação do DNA molde a 96°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de incorporação do Big Dye que consistiu em desnaturação do DNA molde a 96°C,

anelamento do primer a 56°C e uma extensão a 60°C por 4 minutos. Ao produto da reação foram adicionados 80µL de etanol 100% e após repouso de 15 minutos à temperatura ambiente, seguiu-se centrifugação a 13.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 150µL de etanol 70% e centrifugado 13.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco à temperatura ambiente por 1 hora. As amostras foram encaminhadas ao Hemocentro da Unicamp e o sequenciamento realizado no sequenciador de DNA ABIPrism 377.

Análise dos sequenciamentos

Para análise dos sequenciamentos foram utilizados os programas phred/phrap/consed que permitiram a visualização dos cromatogramas e consideram a qualidade das bases. O sistema permitiu alinhamentos múltiplos e facilitou a busca de polimorfismos e mutações. O programa phred gerou valores de qualidade para cada posição dos cromatogramas. O programa phrap comparou os diferentes cromatogramas e/ou seqüências fasta e gerou alinhamentos, na forma de contigs. A seqüência do receptor sensor de cálcio nativo (Genbank - X81086.1|HSPCAR1 H. sapiens PCaR1 gene) foi utilizada na geração dos contigs. Para utilização de uma seqüência fasta como base comparativa, com a seqüência de um gene de indivíduo normal, foi gerado um pequeno script (fasta2phd. perl) que permitiu a geração de arquivos de qualidade (padrão = 20) sem a necessidade de cromatograma. O programa consed permitiu a visualização das montagens realizadas e a busca e análise de mutações e polimorfismos.

ESTUDO DE EXPRESSÃO DAS MUTAÇÕES

Preparação de Bactérias Competentes

Para a preparação de células competentes, a bactéria E. coli DH5α foi utilizada nas transformações foi inoculada em 5 mL de LB (Luria Broth) sem antibiótico, deixada crescer por 12 horas, a 37° C, sob agitação de 250 rpm em agitador orbital. Cento e cinquenta microlitros desta cultura foram inoculados em um volume de 15 mL de LB. A solução foi mantida sob as mesmas condições de agitação e temperatura descritas acima, até atingirem o OD_{660nm} de 0.6. Posteriormente, as bactérias foram colocadas no gelo por

um minuto e centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado de bactérias foi dissolvido em 5 mL de solução de cloreto de cálcio 0.1M estéril a 4°C e incubado no gelo por 40 minutos. Após esse período, as bactérias foram centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de bactérias foi dissolvido em 1 mL de TBF₂ (0.01M de MOPS, pH 7.0, 0.075M de CaCl₂, 0.01M de KCl, 15% de glicerol) e armazenado a -70°C em alíquotas até o momento da transformação.

Transformação de bactérias por choque térmico

Para a transformação, a alíquota de células competentes foi descongelada no gelo por 2 minutos e foram adicionados 2 µL de plasmídeo purificado. Após incubação de 10 minutos, em gelo, foi aplicado um choque térmico de 42°C durante 45 segundos, o que permitiu a abertura dos poros na membrana da bactéria e introduziu o DNA no citoplasma. As células foram incubadas a 37°C por uma hora sob agitação de 250 rpm em 250 µL de meio SOC (0.2g de triptona, 0.05g de extrato de levedura, 0.006g de NaCl, 0.002g de KCl, 0.02g de MgCl₂, 0.024g de MgSO₄ e 20mM de glicose estéril) e, posteriormente, a cultura de bactéria foi espalhada em placas de ágar contendo meio de cultura LB e 100 µg/µL de ampicilina, sendo então incubada a 37°C por 16 h.

Extração de plasmídeos pelo método de lise alcalina

As colônias resultantes da transformação foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo antibiótico específico e incubadas por 14 a 16 horas a 37°C com agitação (250 rpm). O DNA plasmidial foi extraído e purificado utilizando o protocolo de lise alcalina.

Para a extração, a cultura bacteriana foi centrifugada por 30 segundos a 12,000 x g e o precipitado solubilizado em 100 µL da solução I (50mM de glicose, 25mM de Tris-HCl pH 8, 10mM de EDTA pH 8 e 1 µL de RNase 10mg/mL) a 4°C sob forte agitação. Após homogeneização total do precipitado, 200 µL de solução II (0.2N de NaOH, SDS 1%) recém preparada foi adicionada, a qual promove a lise da parede e da membrana bacteriana, e o tubo foi agitado levemente para evitar quebra do DNA e incubado por 3 minutos no gelo. Para neutralizar a solução, foram adicionados 150 µL da solução III (5M de acetado

de potássio, 11.5% de ácido acético glacial e água estéril) e o tubo foi mantido no gelo por 5 minutos. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 12,000 x g, formando um pellet que agregou membranas, parede bacteriana, proteínas, DNA genômico bacteriano e outras impurezas. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado fenol: clorofórmio (1:1) e centrifugado a 12,000 x g por 5 minutos. A fração incolor contendo DNA foi transferida e precipitada com dois volumes de etanol 100% e incubada por 15 minutos a -20°C. Após esse período a solução foi centrifugada por 5 minutos a 12,000 x g e o sobrenadante foi removido. O precipitado contendo DNA foi lavado com 1 ml de etanol 70%, e após sua secagem, foi solubilizado em 50 µL de TE (10mM de Tris-HCl, 20mM de EDTA, pH 8) e mantido a -20°C até sua utilização. A presença do DNA de interesse foi confirmada por digestão.

Mutagênese dirigida

Para a mutagênese, foi utilizado o kit Quick Change Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA). Para cada mutação foi construído um primer complementar com a sequência da mutação localizada no centro (tabela 1). O cDNA do CASR com um tag c-myc em pcDNA 3.1 foi utilizado como molde. Foram realizados 12 ciclos de extensão com utilização da enzima Pfu Turbo DNA polimerase, seguido pela digestão do molde com a enzima *DpnI*. A reação foi utilizada na transformação de uma linhagem de *E. coli* (*XLI-Blue*) que pode incorporar um DNA linear e repará-lo.

As colônias foram cultivadas em mini-preparações e o DNA extraído pelo método de lise alcalina como descrito previamente. A presença da inserção correta no DNA extraído foi confirmada através de enzimas de restrição. Média escala de cDNAs mutados foram então preparados (HISpeed Plasmid Midi Kit® - Qiagen) para transfecções transitórias em células renais embrionárias humanas (HEK-293).

Tabela 1 – Primers utilizados para mutagênese dirigida. O códon mutado está sublinhado e o nucleotídeo mutado em negrito.

1913F	5' GGT GTG TTT ATC AAG TTC <u>CTC</u> AAC ACA CCC ATT GTC 3'
1913R	5' GAC AAT GGG TGT GTT <u>GAG</u> GAA CTT GAT AAA CAC ACC 3'
2244F	5' CTA CAC CGC GCC <u>CCC</u> G TC AAG CTA CCG CAA C 3'
2244R	5' GTT GCG GTA GCT <u>TGA</u> C GG GGG CGC GGT GTA G

Digestão com enzimas de restrição

As mutações descritas destruíram um sítio enzimático. A co-segregação da sequência anormal de DNA nos indivíduos afetados de cada família foi confirmada através da digestão do produto do PCR com as seguintes enzimas de restrição:

Aci I (New England Biolabs) - 5' C[^]C G C 3'

Sml I (New England Biolabs) -5' C[^]T Y R A G 3'

Nco I (Invitrogen) - 5' C[^]CATGG 3'

Previsão do códon de iniciação

Como a mutação c.2.T>G (Fig. 17) altera o sítio natural de início da tradução, foram avaliados sete potenciais sítios de início da tradução. A análise foi feita com o programa de previsão *on line* ATG prediction (<http://www.hri.co.jp/atgpr/>) que estima a probabilidade de cada ATG ser um códon de iniciação de acordo com as regras estabelecidas por Kozak (A/GXXATGG) (SALAMOV et al., 1998).

Clonagem do ATG mutado e controle em pcDNA1.1 contendo cDNA do CASR

O DNA do paciente II-1 (Família J- Fig. 10) foi utilizado com molde. O produto do PCR foi subclonado no vetor ptz57R/T (Fermentas) utilizando o InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit (Fermentas), digerido com as enzimas *Hind*III e *Sal*I. O vetor pcDNA 1.1 c-myc também foi digerido com as mesmas enzimas e tratado com 0.5 µL CIP (Promega) por 60 min a 37°C e inativada a 80°C por 20 min. Os produtos das digestões foram ligados com T4 Ligase (Promega), transformados em DH5α e realizada a lise alcalina para extração do DNA de interesse.

A região mutada foi amplificada utilizando um par de primers (tabela 2) contendo as enzimas de restrição *HindIII* e *SalI* para facilitar a clonagem do cDNA contendo a mutação p.M1? e os 4 ATG's existentes na região 5' não traduzida (5'UTR).

Tabela 2 – Primers utilizados para amplificar a região mutada e controle. Em negrito a sequência das enzimas de restrição *HindIII* e *SalI* respectivamente.

2F4HIND III	5' AAG CTT CCT CTG CAT GAT GTG GCT TCC 3'
2RSAL	5' GTG GAC TGG CCC GTA GGC AGA GGT GTG 3'

Transfecção transitória do cDNA humano do CASR e cultura celular.

Transfecções transitórias foram realizadas em células renais humanas embrionárias (HEK-293, American Type Culture Collection, número CRL-1573, Banco de células, Rio de Janeiro) usadas também para a preparação de extrato de proteínas e imunocitoquímica. As células foram cultivadas em frascos de 60mm até atingirem a confluência de 80-90% em meio de cultura DMEM (GIBCO-GRL) completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina). O meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas com DMEM sem soro. Para a formação do complexo DNA-Polyfect™ (Qiagen) foram incubados: 4 µg de DNA e 40 µL de Polyfect™ Transfection Reagent (Qiagen) em 150 µL de meio DMEM sem soro, por 10 minutos à temperatura ambiente (20-25°C). Para cada tubo contendo o complexo, foi adicionado 1 mL de meio DMEM completo e a solução foi imediatamente transferida para os frascos das células contendo 3mL de DMEM. As células foram incubadas por 48 horas a 37°C a 5% CO₂ e, após esse período, foram utilizadas para a extração das proteínas e experimentos de imunocitoquímica.

Preparação de extrato de proteínas celulares

Para a preparação de extrato total de proteínas celulares, as células foram lavadas com solução de PBS 1X (tampão fosfato-salina) a 4°C e solubilizadas usando um tampão de lise celular (50mM de Tris-HCl, pH 8.0, 1mM de EDTA, 5 µg/µL de Aprotinina, 5µg/µL de Pepstatina, 25µg/µL de PMSF, 150mM de NaCl, NaN₃ 0.02%, SDS 0.1%, NP-40 1% e Desoxicolato de sódio 0.5%) e incubadas por cinco minutos no gelo. Após

homogeneização e centrifugação a 12,000 x g durante 20 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C até o uso. A concentração de proteína no lisado celular foi medida através do método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Western Blot

As amostras foram preparadas à concentração de 40 µg de proteínas com tampão SDS-PAGE 2x (Tris-HCl 100 mM, SDS 4%, Bromophenol blue 0,2%, Glicerol 20% e β-mercaptoetanol 5%), aquecidas por 5 minutos a 95° C e separadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 8%. Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas e imobilizadas em membrana PVDF. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários conjugados a peroxidase do rábano silvestre: monoclonal anti-hCASR denominado ADD (gentilmente cedido pelo Dr. Allen M. Spiegel, National Institute of Health), contra um peptídeo sintético correspondentes aos resíduos 214-235 do CASR humano, diluído a 1:10000, seguido do anticorpo antimouse (Jackson Immunoresearch, diluído 1:4.500), ou anticorpo policlonal antirabbit (Santa Cruz diluído 1:4000), seguido de anticorpo secundário antirabbit (Jackson Immunoresearch, diluído 1:5000). Para detecção das proteínas, foi utilizado o kit de quimioluminescência ECL plus (Amersham Bioscience).

Avaliação do grau de expressão dos receptores mutados e análise final dos resultados

O grau de expressão dos receptores mutados foi analisado por densitometria das bandas, comparando as suas intensidades com as do receptor nativo, utilizando o programa ImagequantTL (Amersham Biosciences). A beta-actina (42kDa, Sigma Aldrich) foi utilizada como controle de *loading*, para normalizar a quantidade de proteína detectada.

Imunocitoquímica

As células foram transfectadas e cultivadas em lâminas previamente tratadas com poly-L-lysina (Sigma) e incubadas com Hoechst (Molecular Probes) para visualização do núcleo. Após 30 minutos, as mesmas foram fixadas em 4% paraformaldeído em PBS e 0.12 M de sacarose por 20 minutos à temperatura ambiente. Para o processo de permeabilização, as células foram tratadas com 0.2% de Triton X-100 por 15 minutos. Locais não específicos de ligação foram bloqueados com o uso de soro de cabra a 6%. As

lâminas foram incubadas com anticorpo monoclonal 9E10 c-myc (1:500 - SIGMA) ou policlonal anti CASR humano (1:320), epítipo nas posições dos aminoácidos 315-335 da porção N-terminal do CASR humano, (gentilmente doado por Dr. Geoffrey N. Hendy, Universidade McGill), seguido de anticorpo secundário conjugado com Cy-3 (Jackson Immunoresearch – 1:850). Após lavagem intensa com PBS, as lâminas serão montadas usando Prolong (Molecular Probes), deixadas secar durante a noite e visualizadas em microscópio fluorescente. As imagens foram obtidas em microscópio confocal (MRC 1024 BioRad - Zeiss) com aumento de 60x.

RESULTADOS

Dados bioquímicos

Família S

Na investigação, o irmão mais novo de 5 meses (Fig. 10) apresentava hipotonia com baixo ganho ponderal com hiperparatireoidismo e hipercalcemia associada a hipocalciúria importante, tendo os dados laboratoriais (Tabela 3) de hiperparatireoidismo neonatal grave. O outro irmão mais velho, II-1, é saudável, não apresentava hipercalcemia, porém não realizou coleta de urina 24 horas para avaliação de calciúria para afastar hipercalcemia hipocalciúrica familiar. Pais (I-1) e (I-2) não são consangüíneos e o pai apresentava calcemia acima do limite superior do valor de referência com PTH não suprimido e a mãe com calcemia e PTH normais. Ambos apresentavam cálcio ionizado acima dos valores de referência e calciúria menor do que 0,01 e dados laboratoriais indicativos de hipercalcemia hipocalciúrica familiar.

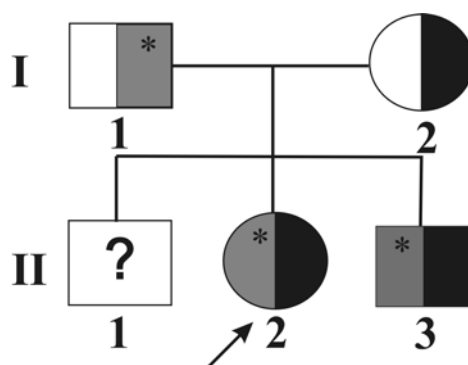


Figura 10 – Heredograma da família S. Os indivíduos são assim apresentados: símbolos metade sólidos (preto ou cinza) (FHH), símbolo com duas metades diferentes (preto e cinza) (NSHPT). O asterisco indica que a mutação do alelo paterno não foi encontrada. O status não investigado é indicado por um ponto de interrogação. A flecha indica o paciente-índice.

Tabela 3 – Dados bioquímicos da família S.

Família S	Ca ⁺² sérico	Ca ⁺² ionizado	Clearance Ca	PTH
I-1	10.7	1.38	0.007	43.5
I-2	9.8	1.32	0.002	23
II-1	10	-	-	8.9
II-3	22	-	0.002	163
Paciente índice	18.3	2.79	0.0004	671
Valores de Referência	8.5 – 10.5 mg/dL	1.15 – 1.29 mmol/L	>0.01	15-65 pg/mL

Família J

O paciente-índice (Fig. 11) foi diagnosticado com hipercalcemia grave precocemente e submetido a exames laboratoriais. O paciente apresentou uma melhora com o tratamento, mas voltou a apresentar hipercalcemia, sendo submetido a paratireoidectomia total com melhora das concentrações séricas de cálcio e PTH. (Tabela 4). Pais (I-1) e (I-2) são consangüíneos e o pai apresentava dados laboratoriais sugestivos de hipercalcemia hipocalciúrica familiar. A mãe apresenta calcemia normal, entretanto não completou a investigação laboratorial. A irmã não foi investigada laboratorialmente.

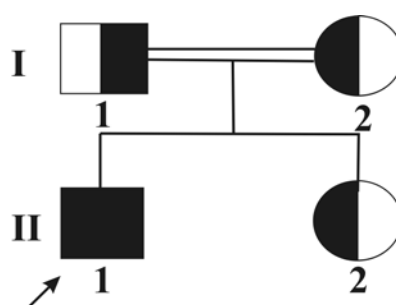


Figura 11 – Heredograma da família J. Os indivíduos são assim apresentados: símbolos metade sólidos (FHH), símbolos sólidos (NSHPT) Traço duplo indica consangüinidade. A flecha indica o paciente-índice.

Tabela 4 – Dados bioquímicos da família J.

Família J	Ca⁺²	Clearance Ca	PTH
I-1	9.81	0.006	-
I-2	8.8	-	-
II-1 – 14º dia de vida	21	-	1550
II-1 – Pós- paratireoidectomia	9.1	-	28
II-1 – Após 50º dia de vida	9.8	-	58
Valores de Referência	8.5 – 10.5 mg/dL	>0.01	15-65 pg/mL

Análise de seqüenciamentos e digestão com enzimas de restrição

Família S.

A análise do seqüenciamento da região do exon 7 da Família S (Fig. 12 e 14) revelou a presença de duas mutações heterozigotas na mãe e no alelo materno e das duas crianças afetadas (II-2 e II-3). Uma mutação no nucleotídeo 1913 com troca de G para T (Fig.12), resultando em mudança de aminoácido de Arginina para Prolina na posição 638. No mesmo alelo, foi encontrada uma outra mutação silenciosa no nucleotídeo 2244, com troca de C para G e sem alteração do aminoácido Prolina (Fig. 14) A co-segregação das mutações em indivíduos foram confirmadas por digestão com enzimas de restrição. A mutação c.1913.G>T (Fig. 13) destrói um sítio da enzima de restrição *Acil* e a mutação c.2244.C>G destrói um sítio da enzima de restrição *SmI* (Fig. 15).

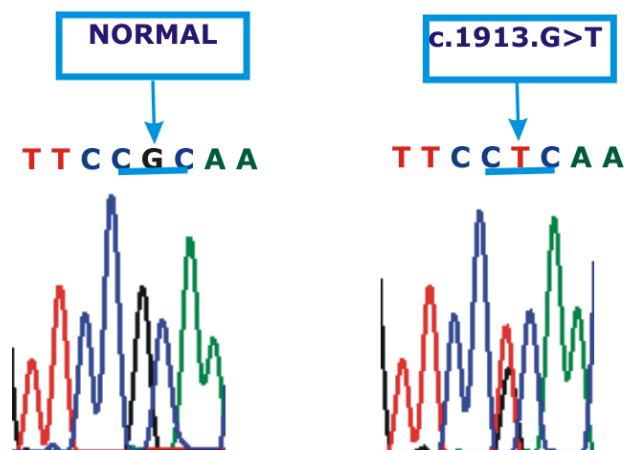


Figura 12 – Seqüenciamento direto na amostra de um dos membros da família S identifica a mutação na posição c. 1913.G>T.

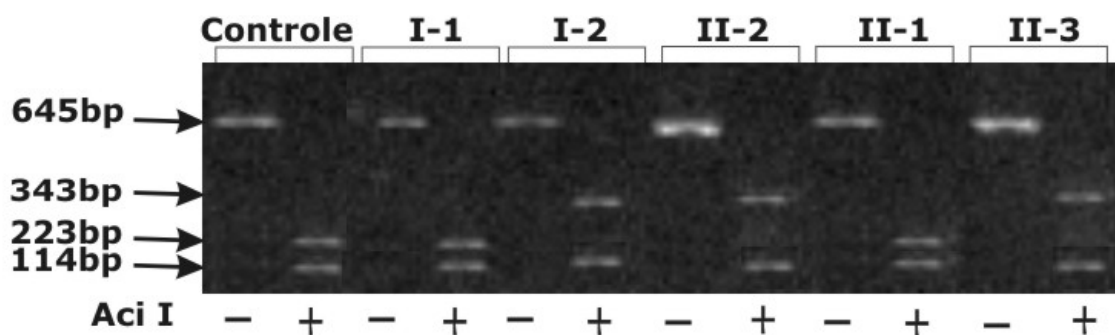


Figura 13 – Gel de agarose mostrando a digestão com enzima de restrição AciI dos produtos de PCR do exon 7 da Família S. A presença da mutação destrói o sítio da enzima apresentando uma banda de 343bp. O pai (I-1) e um dos irmãos (II-1) não apresentam a mutação e possuem a banda de 223bp e 114bp. Todos os demais são heterozigotos para mutação e também possuem a banda de 114bp.

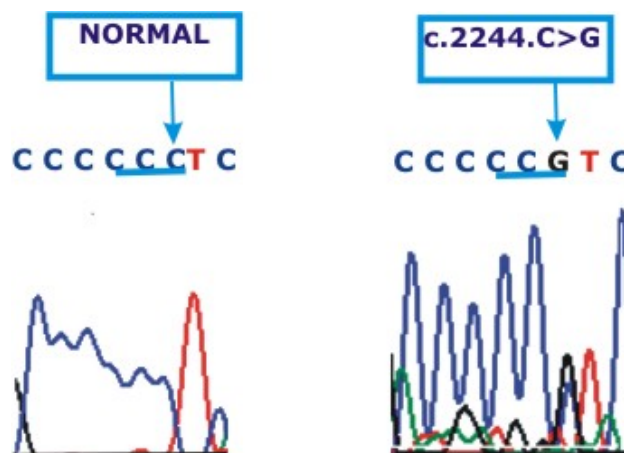


Figura 14 – Sequenciamento direto na amostra de um dos membros da família afetada identifica a mutação na posição c. 2244C>G.

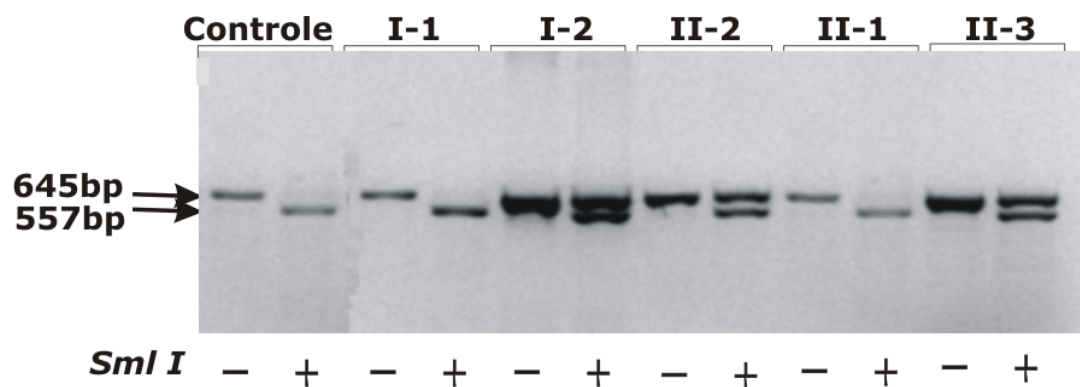


Figura 15 – Gel de agarose mostrando a digestão com enzima de restrição SmlI dos produtos de PCR do exon 7 da Família S. A presença da mutação destrói o sítio da enzima. O pai (I-1) e um dos irmãos (II-1) não apresentam a mutação e possuem somente a banda de 557bp. Todos os demais são heterozigotos para mutação.

Família J

A análise do seqüenciamento da região do exon 2 em amostra de DNA da Família J (Fig. 16) revelou a presença de uma mutação homozigota no DNA do paciente II-1 e heterozigotas nos indivíduos I-1, I-2 e II-2. A mutação é “pontual” na posição c. 2.T>G. Esta mutação resulta em mudança do aminoácido Metionina para Arginina na posição 1, localizada no domínio extracelular do Receptor Sensor de Cálcio. A mutação c.2.T>G destrói o sítio da enzima de restrição *NcoI* (Fig. 17). O paciente-índice II-1 é homozigoto e os demais membros são heterozigotos.

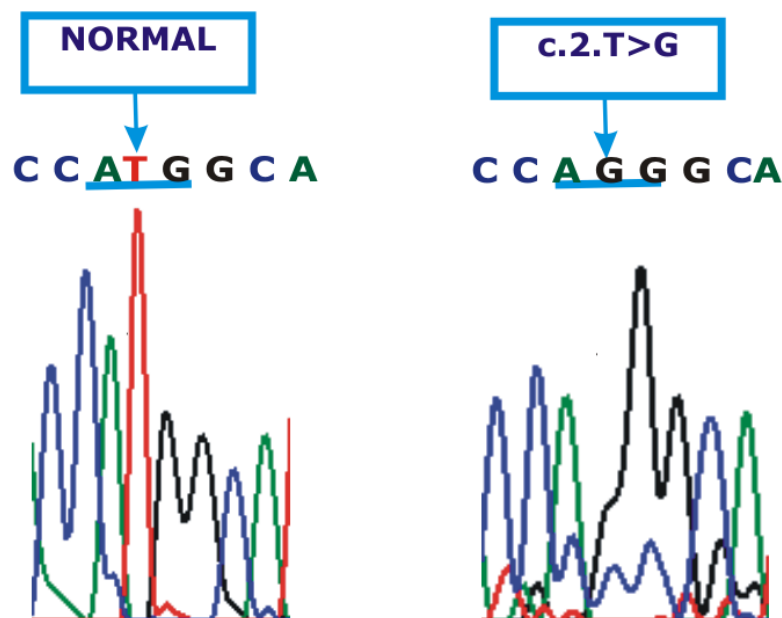


Figura 16 – Seqüenciamento direto na amostra de um dos membros da Família J. identifica a mutação c.2.T>G.

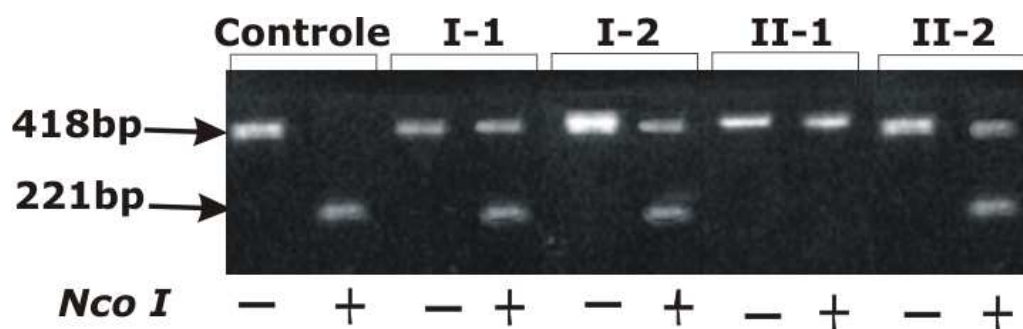


Figura 17 – Gel de agarose mostrando a digestão com enzima de restrição *NcoI* dos produtos de PCR do exon 2 da Família J. A presença da mutação destrói o sítio da enzima, O pai, mãe e irmã são heterozigotos.

Análise do ATG

A mutação c.2 T>G resulta em perda da sequência Kozak (A/GXXATGG). Esta sequência é importante para a correta identificação do ATG e início da tradução protéica. Usando um programa de análise de previsão de sequências de iniciação de tradução protéica (<http://www.hri.co.jp/atgpr/>) foram identificados sete sítios potenciais para o início da tradução: três na matriz de leitura, (Fig. 18, números 2,7 e 3 – destaque cinza) e outros quatro fora da matriz de leitura (Fig. 18, números 4, 5, 6 e 8 - sublinhado). Desses sete, o ATG com maior probabilidade de ser utilizado como o novo sítio de início de tradução, localiza-se no exon 3 (Fig. 18, número 3) na mesma matriz de leitura original. A sequência Kozak não apresentava G na posição +4 se mostrando um contexto sub-ótimo.

Ordem	Eficiência	Identidade com a sequência de Kozak: A/GXXATGG	Início (bp)	Fim (bp)	Códon Terminal	Sequência
1	0.50	ACCATGG	1	493	Não	MAFYSCCWVLLALTW...
2	0.28	tGCATG^a	-219	130	Sim	MMWLPKTQGPPTLQV...
3	0.18	GCTATG^a	220	493	Não	MIFAIEEINSSPALLPNL...
4	0.05	tTGATG^a	376	493	Não	MSSATAQSTFPLRLW...
5	0.04	GACATG^t	-103	-82	Sim	MCPHCRE
6	0.04	GGAATG^t	177	189	Sim	MYQV
7	0.04	ATGATG^t	-216	119	Sim	MWLPKTQGPPTLQVW...
8	0.04	GAAATGG	-155	109	Sim	MEIQTPLLLFY

-226 CCTC**tGCATG²** **aTG⁷**tGGCTTC CAAAGACTCA AGGACCACCC ACATTACAAG
 -176 TCTGGATTGA GAAGGCAGA **AATG⁸**GAGATT CAAACACCAC GTCTTCTATT
 -126 ATTTTATTAA TCAATCTGTA **GACATG⁵**tGTC CCCACTGCAG GGAGTGAAC
 -76 GCTCCAAGGG AGAAACTTCT GGGAGCCTCC AAACCTCCTAG CTGTCTCATC
 -26 CCTTGCCCTG GAGAGACGGC AGA**ACCATG¹**G CATTTTATAG CTGCTGCTGG
 . .24 GTCTCTTGG CACTCACCTG GCACACCTCT GCCTACGGGC CAGACCAGCG
 . .74 AGCCCAAAAG AAGGGGGACA TTATCCTTGG GGGGCTCTTT CCTATTCAAT
 .124 TTGGAGTAGC AGCTAAAGAT CAAGATCTCA AATCAAGGCC GGAGTCTGT**G**
 .174 GA**ATG⁶**tATCA GGTATAATTT CCGTGGGTTT CGCTGGTTAC AG**GCTATG³**aT
 .224 ATTTGCCATA GAGGAGATAA ACAGCAGCCC AGCCCTTCTT CCCAACTTGA
 .274 CGCTGGGATA CAGGATATTT GACACTTGCA ACACCGTTTC TAAGGCCTTG
 .324 GAAGCCACCC TGAGTTTTGT TGCTCAAAAC AAAATTGATT CTTTGAAC**Ct**
 .374 TG**ATG⁴**aGTTT TGCAACTGCT CAGAGCACAT TCCCTCTACG ATTGCTGTGG
 .424 TGGGAGCAAC TGGCTCAGGC GTCTCCACGG CAGTGGCAAA TCTGCTGGGG
 .474 CTCTTCTACA TTCCCCAG

Figura 18 – Análise da previsão dos ATG's.. Em azul o códon original (1) de iniciação no gene do CASR. A mutação resulta em troca do nucleotídeo T por G. Em letra minúscula os nucleotídeos com menor eficiência. Em destaque cinza as seqüências na matriz de leitura e sublinhado as seqüências fora da matriz de leitura. Os números 2, 5, 7 e 8 correspondem aos ATG's no sentido 5' e os números 3, 4, 6 e 7 no sentido 3'.

Construção para análise da expressão dos receptores mutados.

Família S.

Para avaliar a expressão das mutações foram feitas construções através de mutagênese sítio dirigida inserindo os nucleotídeos mutados e o cDNA do CASR no vetor pcDNA3.1, que possuía um tag c-myc. As mutagêneses das posições 1913 e 2244 foram

realizadas com sucesso e confirmadas através de digestão com as mesmas enzimas que confirmaram as mutações, *AciI* e *SmlI* (Fig.19 A e B).

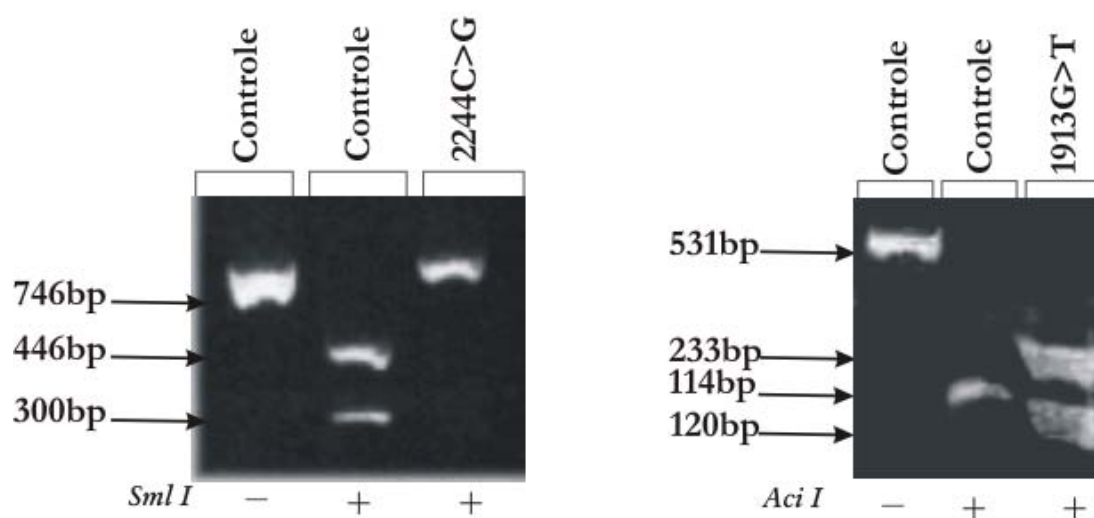


Figura 19 – A. Digestão do controle e mutagênese c.2244C>T com enzima de restrição *SmlI*. A presença da mutação destrói o sítio da enzima de restrição. Somente o controle é digerido. B. Digestão da mutagênese c.1913G>T. A presença da mutação destrói o sítio da enzima de restrição *AciI* apresentando uma banda de 120 e 114bp.

Família J.

Para análise da expressão da mutação no códon inicial de transcrição do receptor (p.M1?), inserimos no cDNA do CASR um fragmento correspondente a região -226 a 66 do CASR, contendo 5 potenciais seqüências O produto do PCR (292bp) foi subclonado no vetor TA cloning e a construção confirmada por digestão com *Hind III* e *Sal*

I (Fig. 20). O fragmento foi ligado ao vetor pcDNA1.1 contendo o cDNA completo do CASR e a construção confirmada por PCR e digestão.

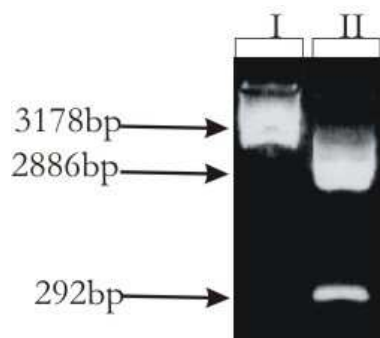


Figura 20 – Minipreparação não digerida (coluna I) e digerida com *HindIII* e *SalI* (coluna II). A banda de 292bp confirma que o produto de PCR do exon 2 clonado no vetor pTZ57R/T.

Western Blot

Foram analisadas as expressões dos receptores mutados através do Western Blot. Dois tipos de anticorpos foram usados e mostraram padrões diferentes: Anticorpo policlonal antirabbit que detectou somente as bandas superiores de ~220kDa, que correspondem às formas oligoméricas e diméricas e o Anticorpo monoclonal anti-hCASR ADD que detectou as formas monoméricas e diméricas. Nos resultados de western blot do receptor nativo foram visualizadas as bandas superiores e as formas monoméricas (140kDa e 160kDa, correspondentes às formas imatura e madura). O receptor com a mutação p.R638L apresentou padrão de expressão similar ao nativo nas bandas superiores e 140kDa. Foi observada expressão reduzida da banda de 160kDa (Fig. 21 e 23). Os resultados densitometria (Fig. 22), utilizando Beta-actina para normalizar os resultados, confirmaram esses resultados. A mutação c.2244.C>G é silenciosa e não altera o aminoácido Prolina, e sua expressão foi similar à do receptor nativo nas bandas superiores (Fig. 23). As formas monoméricas não foram identificadas com este anticorpo. O receptor com a mutação p.M1?

apresentou a expressão drasticamente reduzida tanto das formas diméricas quanto das formas monoméricas, como observado também nos resultados de densitometria (Fig. 21 e 22). Extrato protéico de célula HEK-293 não transfectada foi utilizada como controle negativo.

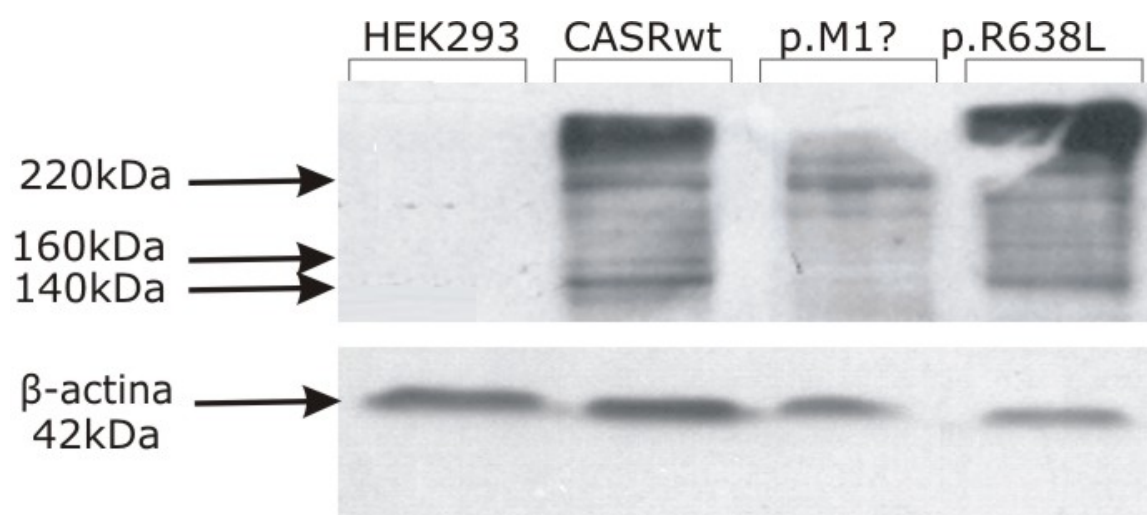


Figura 21 – Western Blot de 40µg de extrato protéico total de células HEK-293 não transfectada e transfectada com CASR nativo e com as mutações p.M1? e c.1913G>T [p.R638L]. Anticorpo monoclonal anti-CASR ADD. O receptor com a mutação p.R638L é expresso de forma similar ao receptor nativo para a banda de 140kDa. O receptor mutado p.M1? apresenta a expressão drasticamente reduzida.

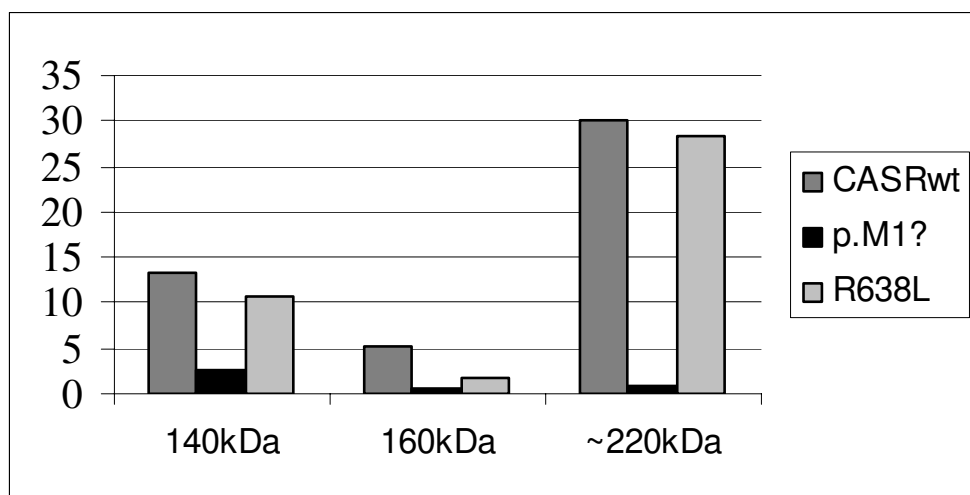


Figura 22 – Densitometria das amostras p.R638L, p.M1? e CASRwt. Foi utilizada Beta-actina como controle de loading. Os resultados confirmam a redução drástica da expressão do receptor mutado p.M1? e a expressão similar do receptor mutado p.R638L, nas bandas de 140kDa e superiores (~220kDa) em comparação com o receptor nativo.

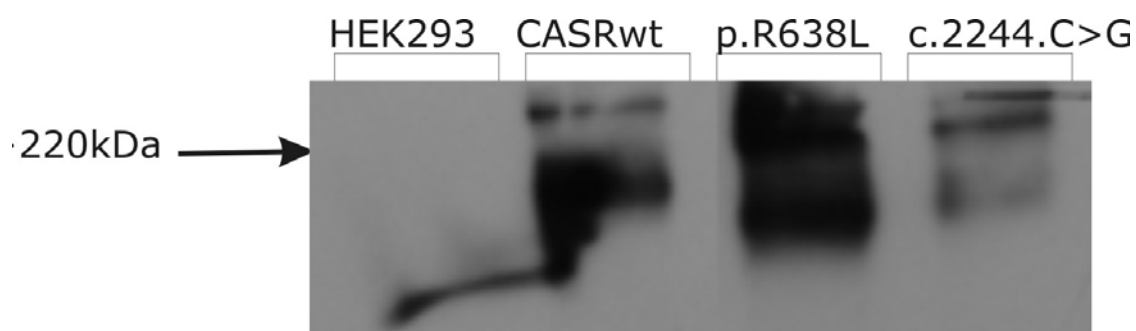


Figura 23 - Western Blot de 40µg de extrato protéico total de células HEK-293 não transfectada e transfectada com CASR nativo e das mutações p.R638L e c.2244.C>G. Anticorpo policlonal antirabbit (1:4000). Os receptores com as mutações p.R638L e c.2244.C>G são expressos de forma similar ao receptor nativo, sendo mais abundante as bandas de 220kDa.

Microscopia Confocal

Para analisar a expressão de receptores mutados na superfície celular dos receptores mutados foi realizada imunocitoquímica e microscopia confocal em células HEK-293 transfectadas transitoriamente. A análise foi realizada em células não permeabilizadas para detectar os receptores mutados somente na superfície celular. Em células permeabilizadas avaliou-se a presença do receptor intracelularmente, passando pelos processos de maturação e tráfego para membrana plasmática, assim como a quantidade de receptor mutado que poderia estar retido no retículo endoplasmático. O controle não transfectado não demonstrou coloração específica (Fig. 24 E). O receptor nativo foi bem expresso na superfície celular tanto em células não permeabilizadas quanto permeabilizadas (Fig. 24 A e B respectivamente). Padrão semelhante foi observado para o receptor mutado p.R638L (Fig. 24 C e D), indicando maturação e processamento no retículo endoplasmático apropriado dos receptores mutados. Entretanto, o receptor mutado p.M1? não foi visualizado na superfície celular de células não permeabilizadas (padrão semelhante ao controle negativo não transfectado). Em células permeabilizadas transfectadas com o receptor mutado p.M1? foi identificada marcação somente no interior das células (Fig. 24 F), sugerindo que este receptor mutado é retido no retículo endoplasmático e estava ausente na membrana plasmática.

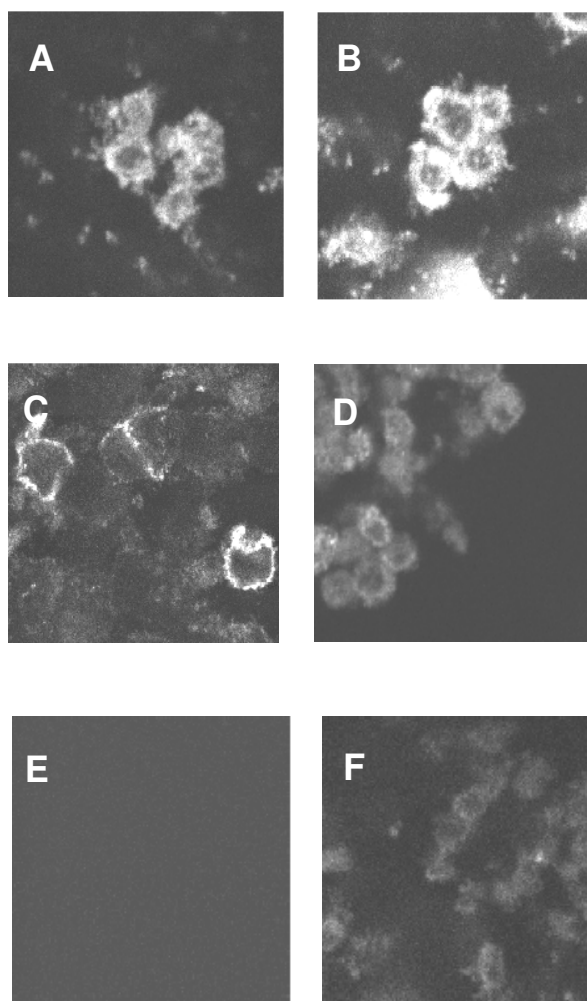


Figura 24 – *Imunocitoquímica de células humanas renais embrionárias transfectadas com receptor sensor de cálcio. A Transfecção com cDNA do receptor nativo em células não permeabilizadas. B: receptor nativo em células permeabilizadas. C: receptor com mutação p.R638L em células não permeabilizadas. D: receptor com mutação p.R638L em células permeabilizadas. E: Controle negativo células não transfectadas. F: receptor com mutação p.M1? em células permeabilizadas.*

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste trabalho realizou-se a avaliação de duas famílias com hipercalcemia hipocalciúrica familiar identificadas a partir do diagnóstico de hiperparatireoidismo neonatal grave dos filhos. O paciente índice da família S foi diagnosticado devido às complicações tardias de hiperparatireoidismo de longa duração, incluindo tumor marrom agressivo na maxila esquerda e a osteíte fibrosa cística em ossos longos. A presença de tumor marrom em maxila é rara, sendo a localização mais comum em mandíbula. A hipercalcemia na infância também é rara e no período neonatal manifesta-se predominantemente com sinais inespecíficos tais como baixo ganho ponderal, baixa estatura, hipotonia e sucção débil. Na investigação dos pais, apesar de assintomáticos, identificou-se concentrações de cálcio iônico elevadas, associadas a concentrações de PTH normais, porém não suprimidas e hipocalciúria, confirmando o diagnóstico de hipercalcemia hipocalciúrica familiar.

Foi caracterizado o defeito molecular nesta família, no entanto, a mutação foi identificada apenas no alelo materno. Apesar de exaustiva procura, não se identificou a mutação do alelo paterno. Entretanto, dados bioquímicos do pai e a gravidade dos dois filhos afetados indicam a presença de um receptor mutado também no alelo paterno. Mutações localizadas em regiões não codificadoras tais como em regiões promotoras e intrônicas reguladoras, podem estar relacionadas a erros na tradução protéica, comprometendo a sua função. Em alguns genes tais como o MEN 1 (Multiple Endocrine Neoplasia 1) em 5 – 10 % dos indivíduos afetados não se consegue identificar mutação (MARX et al., 1999; HAUACHE e HOFF, 2005).

Na literatura é relatado 50% de óbito no primeiro ano de vida em indivíduos com NSHPT. O fato do paciente-índice nesta família ter sobrevivido 10 anos sem tratamento sugere um fenótipo intermediário. Além disso, o seu irmão que realizou paratireoidectomia total apenas aos 9 meses de idade e atualmente com 3 anos de idade apresenta apenas discreto atraso do desenvolvimento neuropsicomotor.

As mutações encontram-se em heterozigose tanto em amostras de DNA materno como nas duas crianças afetadas, sugerem tratar-se de heterozigoto composto nos filhos afetados. Bai e colaboradores (1999) observaram que a co-expressão de receptores, contendo mutações em diferentes domínios do receptor sensor de cálcio, geralmente

resultam em alguma resposta funcional. Um mecanismo possível para esse tipo de complementação funcional é a troca de domínios proposta por Gouldson e Reynolds (1997). Nessa situação, quando há produção de receptores com mutações em domínios diferentes pode ocorrer uma complementação através da dimerização desses receptores, uma vez que o domínio íntegro do receptor mutado interage com o domínio íntegro do outro receptor (que apresenta mutações em posições diferentes). Isto pode ser uma das razões pelas quais os afetados desta família tenham sobrevivido.

A mutação na posição p.R638L localiza-se na primeira alça intracelular próxima a um sítio de fosforilação de PKC (Treonina 646). A fosforilação dos Receptores Acoplados à Proteína G promove a ligação de proteínas citosólicas, conhecidas como arrestinas, impedindo interação GPCRs/proteína G, estabilizando o estado não acoplado do receptor (PENELA et al., 2003). Além de participarem do processo de desacoplamento, as arrestinas também participam diretamente da endocitose (processo também conhecido como internalização) do receptor, tráfego intracelular, ressensibilização e na modulação de cascatas de proteínas-kinases mitógeno ativadas (MAPK) por GPCRs (PENELA et al., 2003).

Na família J, o paciente índice apresentou hipercalcemia e PTH elevado e foi diagnosticado com Hiperparatireoidismo Neonatal Grave. Posteriormente foi investigada a calciúria (pai) e cálcio sérico dos pais e foram diagnosticados com Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar. Realizou-se seqüenciamentos das amostras de DNA dos pais e dos dois filhos. A mutação encontrada na família J (c.2.T>G), localiza-se na porção amino-terminal do sinal peptídico e altera a seqüência Kozak original (AXX**AT**GG), podendo resultar em ativação de um novo sítio para o início da tradução protéica.

De acordo com o modelo de varredura da tradução protéica, o complexo de fatores de iniciação eucarióticos, eIF4F, liga-se a um cap de 7-metilguanosina do RNA mensageiro e recruta o complexo 43S ribossômico (subunidade 40S ribossômica, RNAt^{met} e vários fatores de iniciação eucarióticos). O complexo 43S ribossômico faz uma varredura linear através da região 5'-UTR na direção 5' a 3' até encontrar o primeiro ATG circundado por um bom contexto Kozak, onde a tradução começará (KOZAK, 1991b). Os nucleotídeos mais importantes de acordo com esse contexto, são a purina na posição -3 e G

na posição +4, sendo que o A do códon de iniciação (**ATG**) corresponde a posição +1 (KOZAK, 1986). No contexto sub-ótimo, mutações afetando o A⁻³ e ou G +4 ou as bases próximas ao AUG enfraquecem a iniciação da transcrição, tanto in vivo quanto in vitro (KOZAK, 1997).

Nos resultados sobre a previsão do ATG, observou-se que o uso de qualquer ATG (na matriz de leitura ou não) localizado acima da região mutada (sentido 5') resulta em formação de proteínas truncadas com introdução de códons terminais prematuros. O ATG com maior probabilidade para ser utilizado como novo sítio de tradução protéica localiza-se no exon 3 (eficiência - 0.18).

O fato do anticorpo policlonal anti-CASR humano (contra os resíduos 315- 335 do CASR), utilizado no Western Blot e Imunocitoquímica, identificar o receptor apesar da redução considerável da expressão do receptor mutado p.M1? sugere as hipóteses de tradução falha de proteína a partir do códon mutado ou a ativação do sítio de tradução no exon 3 (Metionina 74 – na matriz de leitura), sendo essa última a menos provável.

O códon AGG resultante da mutação c.2.T>G encontra-se em um contexto ótimo (ACC**AGG**G), com uma purina na posição -3 e um G na posição +4. Dessa forma, de acordo com o modelo *leaky scanning*, o pareamento fraco entre os nucleotídeos do códon mutado e anticódon do RNAt iniciador poderiam ser compensados por interações entre nucleotídeos próximos, particularmente purinas na posição -3 e G na posição +4 (PEABODY, 1987; KOZAK, 1991a).

De acordo com a segunda hipótese, a utilização da Metionina no exon 3 resultaria em uma proteína truncada na porção amino terminal, 10 kDa menor (p.M1_A73del), preservando o epítipo segundo o qual o anticorpo foi feito. Não foi possível identificar diferenças de tamanho do receptor mutado quando comparadas ao receptor nativo, uma vez que a proteína é fracamente expressa. Entretanto, de acordo com o modelo de varredura, o sítio da transcrição localiza-se muito longe da região 5'cap e em um contexto sub-ótimo para ser utilizado (KOCHETOV et al., 2005).

Além disso, segundo o programa Signal Peptide Prediction v.3 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) a proteína truncada (p.M1_A73del) não possui uma sequência apropriada de peptídeo sinal, o que dificultaria o arranjo da conformação estrutural esperada. Outras mutações descritas na sequência de sinal peptídeo (L11P, L13P e T14A) do CASR e demonstraram a importância da região para o acoplamento do cálcio e ativação do receptor (MIYASHIRO et al., 2004; PIDASHEVA et al., 2005).

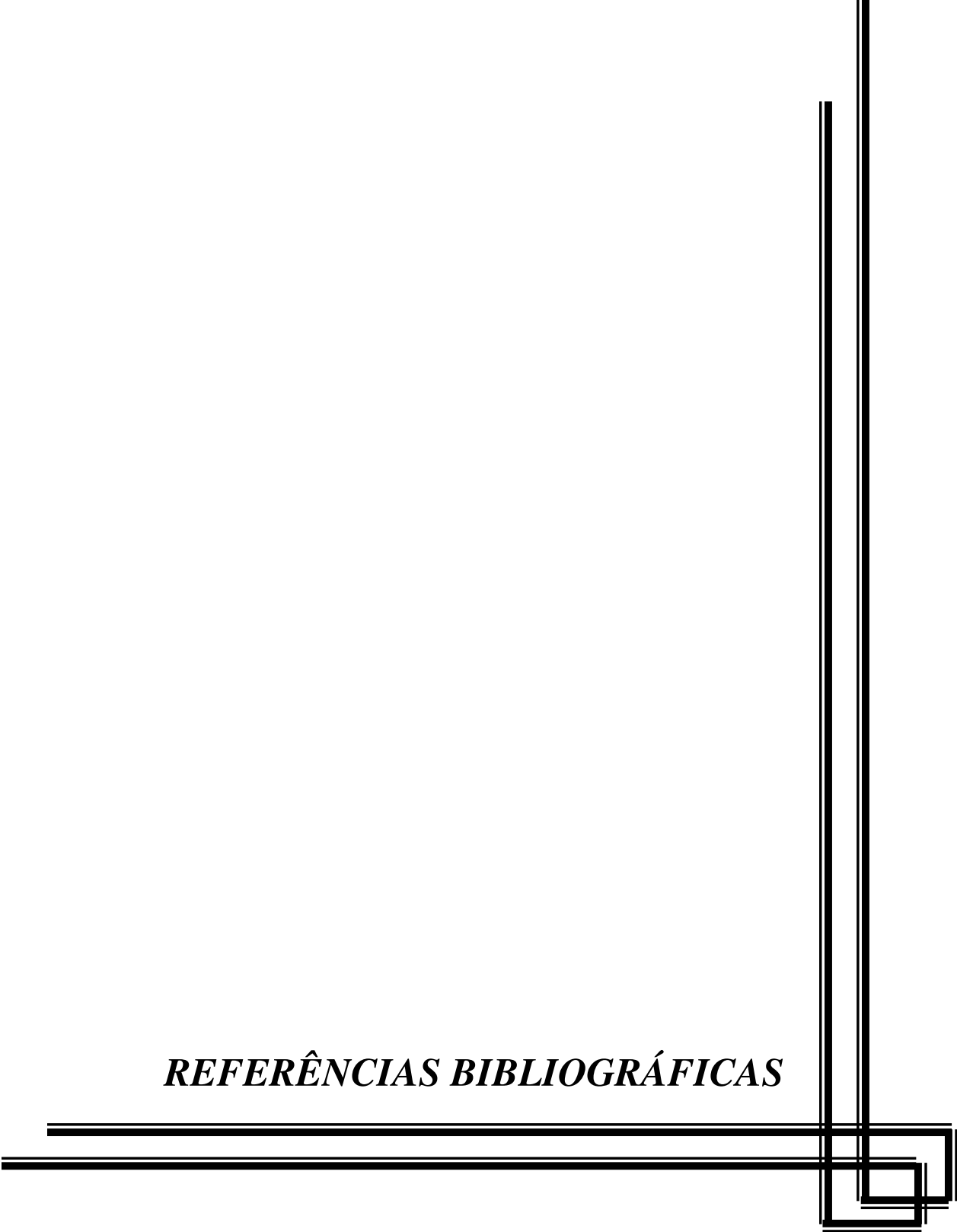
Em amostra de paciente com nove anos de idade, foi identificado o receptor mutado L13P. A paciente apresentou cálcio ionizado 2.1mmol/L (V.R.1.12-1.32) e relação cálcio/creatinina 0.0047. A mutação estava em homozigose e a paciente apresentou calcificação no cérebro e hipocalciúria. O receptor era fracamente expresso na superfície celular e no Western blot (MIYASHIRO et al., 2004; PIDASHEVA et al., 2005). O receptor mutado L11P foi encontrado na amostra de um paciente com 50 anos, cálcio iônico de 1.59mmol/L (V.R.1.15-1.28) e relação cálcio/creatinina de 0.022. O paciente apresentava história de distúrbios psiquiátricos e esquizofrenia moderada por mais de 20 anos. A proteína do receptor mutado era fracamente expressa em Western Blot e o receptor mutado não foi visualizado na superfície celular de células HEK-293, sendo apenas identificado em células permeabilizadas, indicando alterações no processamento da proteína pelo Retículo Endoplasmático. O receptor mutado T14A foi encontrado na amostra de uma paciente com 40 anos e relação cálcio/creatinina de 0.005. O receptor mutado T14A era expresso em Western Blot e superfície celular em níveis semelhantes ao receptor nativo. Em estudos funcionais para avaliação da resposta dos receptores a concentrações de cálcio extracelular, os receptores mutados L11S e L13P não responderam a diversas concentrações de cálcio, enquanto T14A respondeu de forma similar ao receptor nativo. Todas essas mutações pontuais estão associadas à tolerância mais alta a hipercalcemia (PIDASHEVA et al., 2005).

Neste trabalho, foram identificadas e caracterizadas molecularmente três novas mutações em famílias portadoras de Hiperparatireoidismo Neonatal Grave e Hipercalcemia Hipocalciúrica Familiar.

CONCLUSÕES

- Foram identificadas três novas mutações no gene do CASR em duas famílias com FHH e NSHPT.
- A mutação c.1913.G>T com troca de G por T no nucleotídeo 1913, resultando em troca do aminoácido Arginina por Leucina na posição 638.
- O receptor com a mutação p.R638L apresenta um grau de expressão semelhante ao receptor nativo sendo localizado principalmente na membrana plasmática.
- A mutação c.2244.C>G é silenciosa e não há troca do aminoácido Prolina.
- Na família J foi identificada a mutação c.2.T>G que altera a sequência Kozak original.
- O receptor com a mutação p.M1? apresenta redução importante de expressão e não se expressa na membrana plasmática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



ARTHUR, J.; LAWRENCE, M.; PAYNE, C.; RANE, M.; MCLEISH, K. The calcium-sensing receptor stimulates JNK in MDCK cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 275: 538-41, 2000.

BAI, M. Structure-function relationship of the extracellular calcium-sensing receptor. **Cell Calcium**, 35: 197-207, 2004.

BAI, M.; QUINN, S.; TRIVEDI, S.; KIFOR, O.; PEARCE, S. H.; POLLAK, M. R. ,et al. Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca^{2+} -sensing receptor. **J Biol Chem**, 271: 19537-45, 1996.

BAI, M.; TRIVEDI, S.; KIFOR, O.; QUINN, S. J.; BROWN, E. M. Intermolecular interactions between dimeric calcium-sensing receptor monomers are important for its normal function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 96: 2834-9, 1999.

BERRIDGE, M.; BOOTMAN, M.; RODERICK, H. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 4: 517 - 29, 2003.

BERRIDGE, M.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. The versatility and universality of calcium signaling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 1, 2000.

BERTHIAUME, L. G. Insider Information: How Palmitoylation of Ras Makes It a Signaling Double Agent 10.1126/stke.2002.152.pe41. **Sci. STKE**, 2002: pe41-, 2002.

BOCKAERT, J.; PIN, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. **Embo J**, 18: 1723-9, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 1976.

BROWN, A.; ZHONG, M.; RITTER, C.; BROWN, E.; SLATOPOLSKY, E. Loss of calcium responsiveness in cultured bovine parathyroid cells is associated with decreased calcium receptor expression. **Biochem Biophys Res Commun**, 212: 861-7, 1995.

BROWN, E. Extracellular Ca^{2+} sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca^{2+} and other ions as extracellular (first) messengers. **Physiol Rev**, 71: 371-411, 1991.

BROWN, E.; CHATTOPADHYAY, N.; VASSILEV, P.; HEBERT, S. The calcium-sensing receptor (CaR) permits Ca^{2+} to function as a versatile extracellular first messenger. **Recent Prog Horm Res**, 53: 257-80; discussion 80-1, 1998.

BROWN, E.; GAMBA, G.; RICCARDI, D.; LOMBARDI, M.; BUTTERS, R.; KIFOR, O., et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid. **Nature**, 366: 575-80, 1993.

BROWN, E.; MACLEOD, R. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. **Physiol Rev**, 81: 239-97, 2001.

CHANG, W.; CHEN, T.; PRATT, S.; SHOBACK, D. Amino acids in the second and third intracellular loops of the parathyroid Ca^{2+} -sensing receptor mediate efficient coupling to phospholipase C. **J Biol Chem**, 275: 19955-63, 2000.

CHATTOPADHYAY, N.; LEGRADI, G.; BAI, M.; KIFOR, O.; YE, C.; VASSILEV, P., et al. Calcium-sensing receptor in the rat hippocampus: a developmental study. **Brain Res Dev Brain Res**, 100: 13-21, 1997a.

CHATTOPADHYAY, N.; MITHAL, A.; BROWN, E. The calcium-sensing receptor: a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism. **Endocr Rev**, 17: 289-307, 1996.

CHATTOPADHYAY, N.; VASSILEV, P.; BROWN, E. Calcium-sensing receptor: roles in and beyond systemic calcium homeostasis. **Biol Chem**, 378: 759-68, 1997b.

CHATTOPADHYAY, N.; YE, C.; SINGH, D.; KIFOR, O.; VASSILEV, P.; SHINOHARA, T., et al. Expression of extracellular calcium-sensing receptor by human lens epithelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 233: 801-5, 1997c.

CHOU, Y. H.; POLLAK, M. R.; BRANDI, M. L.; TOSS, G.; ARNQVIST, H.; ATKINSON, A. B., et al. Mutations in the human Ca^{2+} -sensing-receptor gene that cause familial hypocalciuric hypercalcemia. **Am J Hum Genet**, 56: 1075-9, 1995.

CLAPHAM, D.; NEER, E. G protein bg subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **Annu Rev Pharmacol Toxicol**: 167-203, 1997.

CONKLIN, B.; BOURNE, H. Structural elements of G α subunits that interact with G $\beta\gamma$ receptors, and effectors. **Cell**, 73: 631-41, 1993.

CORBETTA, S.; LANIA, A.; FILOPANTI, M.; VICENTINI, L.; BALLARÉ, E.; SPADA, A. Mitogen-activated protein kinase cascade in human normal and tumoral parathyroid cells. **J Clin Endocrinol Metab**, 87: 2201-5, 2002.

DE JESUS FERREIRA, M.; HÉLIÈS-TOUSSAINT, C.; IMBERT-TEBOUL, M.; BAILLY, C.; VERBAVATZ, J.; BELLANGER, A. ,et al. Co-expression of a Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclase and of a Ca²⁺-sensing receptor in the cortical thick ascending limb cell of the rat kidney. Inhibition of hormone-dependent cAMP accumulation by extracellular Ca²⁺. **J Biol Chem**, 273: 15192-202, 1998.

EXTON, J. Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 36: 481-509, 1996.

FAN, G. G., PK; COLLINS, R.; DUNN, C. K.; KRAPCHO, K. J.; ROGERS, K. V.; SPIEGEL, A. M. N-linked glycosylation of the human Ca²⁺ receptor is essential for its expression at the cell surface. **Endocr J**, 138: 1916-22, 1997.

FOLEY, T. P., JR; HARRISON, H. C.; ARNAUD, C. D.; HARRISON, H. E. Familial benign hypercalcemia. **J Pediatr**, 81: 1060-067, 1972.

GARRETT, J.; CAPUANO, I.; HAMMERLAND, L.; HUNG, B.; BROWN, E.; HEBERT, S. ,et al. Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. **J Biol Chem**, 270: 12919-25, 1995a.

GARRETT, J.; TAMIR, H.; KIFOR, O.; SIMIN, R.; ROGERS, K.; MITHAL, A. ,et al. Calcitonin-secreting cells of the thyroid express an extracellular calcium receptor gene. **Endocrinology**, 136: 5202-11, 1995b.

GETHER, U.; KOBILKA, B. K. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. **J Biol Chem**, 273: 17979-82, 1998.

- GOLDSMITH, P. K.; FAN, G. F.; RAY, K.; SHILOACH, J.; MCPHIE, P.; ROGERS, K. V. ,et al. Expression, purification, and biochemical characterization of the amino-terminal extracellular domain of the human calcium receptor. **J Biol Chem**, 274: 11303-9, 1999.
- GOULDSON, P. R., CA. Simulation on dimeric peptides: evidence for domains swapping in G - protein coupled receptors? **Biochem Soc Trans**, 25, 1997.
- HAMMERLAND, L. G.; KRAPCHO, K. J.; GARRETT, J. E.; ALASTI, N.; HUNG, B. C.; SIMIN, R. T. ,et al. Domains determining ligand specificity for Ca²⁺ receptors. **Mol Pharmacol**, 55: 642-8, 1999
- HANDLOGTEN, M. E.; HUANG, C.; SHIRAISHI, N.; AWATA, H.; MILLER, R. T. The Ca²⁺-sensing Receptor Activates Cytosolic Phospholipase A2 via a Gqalpha -dependent ERK-independent Pathway. 10.1074/jbc.M007306200. **J. Biol. Chem.**, 276: 13941-8, 2001.
- HAUACHE, O. M.; HOFF, A. N. Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1: Diagnóstico Clínico, Laboratorial e Molecular e Tratamento das Doenças Associadas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 49: 735-46, 2005.
- HEATH, H. D.; JACSON, C. E.; OTTERUD, B.; LEPPERT, M. F. Genetic linkage analysis in familial benign(hypocalciuric) hypercalcemia: evidence for locus heterogeneity. **Am J Hum Genet**, 53, 1993.
- HELDIN, C.-H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. **Cell**, 80: 213-23, 1995.
- HENDY, G.; D'SOUZA-LI, L.; YANG, B.; CANAFF, L.; COLE, D. Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. **Hum Mutat**, 16: 281 - 96, 2000.
- HERMANS, E. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. **Pharmacol Ther**, 99: 25 - 44, 2003.

- HUANG, C.; HANDLOGTEN, M.; MILLER, R. Parallel activation of phosphatidylinositol 4-kinase and phospholipase C by the extracellular calcium-sensing receptor. **J Biol Chem**, 277: 20293-300, 2002.
- JI, T. H.; GROSSMANN, M.; JI, I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. **J Biol Chem**, 273: 17299-302, 1998.
- KIFOR, O.; DIAZ, R.; BUTTERS, R.; BROWN, E. The Ca^{2+} -sensing receptor (CaR) activates phospholipases C, A2, and D in bovine parathyroid and CaR-transfected, human embryonic kidney (HEK293) cells. **J Bone Miner Res**, 12: 715-25, 1997.
- KIFOR, O.; MACLEOD, R.; DIAZ, R.; BAI, M.; YAMAGUCHI, T.; YAO, T. ,et al. Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells. **Am J Physiol Renal Physiol**, 280: F291-302, 2001.
- KISELYOV, K.; SHIN, D.; MUALLEM, S. KISELYOV, K., SHIN, D.M. MUALLEM, S. Signalling specificity in GPCR - dependent Ca^{2+} signalling. **Cell Signal**, 15: 243-53, 2003.
- KOCHETOV, A.; SARAI, A.; ROGOZIN, I.; SHUMNY, V.; KOLCHANOV, N. The role of alternative translation start sites in the generation of human protein diversity. **Mol Genet Genomics**, 273: 491-6, 2005.
- KOZAK, M. Influences of mRNA Secondary Structure on Initiation by Eukaryotic Ribosomes. **PNAS**, 83: 2850-4, 1986.
- KOZAK, M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. **J. Cell Biol.**, 115: 887-903, 1991a.
- KOZAK, M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation **J. Biol. Chem.**, 266: 19867-70, 1991b.
- KOZAK, M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. **EMBO J**, 16: 2482-92, 1997.
- LANDON, J. F. Parathyroidectomy in generalized osteitis fibrosa cystica. **J Pediatr**, 1: 544-613, 1932.

LEE, M.; KOLLARIK, M.; CHUAYCHOO, B.; UNDEM, B. Ionotropic and metabotropic receptor mediated airway sensory nerve activation. **Pulm Pharmacol Ther**, 17: 355-60, 2004.

LLOYD, S.; PANNETT, A.; DIXON, P.; WHYTE, M.; THAKKER, R. Localization of familial benign hypercalcemia, Oklahoma variant (FBHOk), to chromosome 19q13. **Am J Hum Genet**, 64: 189-95, 1999.

MARX, S. J.; AGARWAL, S. K.; KESTER, M. B.; HEPPNER, C.; KIM, Y. S.; SKARULIS, M. ,et al. Multiple endocrine neoplasia type 1: clinical and genetic features of the hereditary endocrine neoplasias. **Recent Prog Horm Res**, 54: 397-438, 1999.

MARX, S. J.; ATTIE, M. A.; LEVINE, A. M.; SPIEGEL, R. W.; DOWNS, J.; LASKER, R. D. The hypocalciuric or benign variant of familial hypercalcemia: clinical and biochemical features in fifteen kindreds. **Medicine (Baltimore)**, 60: 397-412, 1981.

MARX, S. J.; FRASER, D.; RAPOPORT, A. Familial hypocalciuric hypercalcemia. Mild expression of the gene in heterozygotes and severe expression in hoozygotes. **Am J Med**, 78: 15-22, 1985.

MCNEIL, L.; HOBSON, S.; NIPPER, V.; RODLAND, K. Functional calcium-sensing receptor expression in ovarian surface epithelial cells. **Am J Obstet Gynecol**, 178: 305-13, 1998

MIYASHIRO, K.; KUNII, I.; MANNA, T.; DE MENEZES FILHO, H.; DAMIANI, D.; SETIAN, N. ,et al. Severe hypercalcemia in a 9-year-old Brazilian girl due to a novel inactivating mutation of the calcium-sensing receptor. **J Clin Endocrinol Metab**, 89: 5936-41, 2004.

NEER, E. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrana signals. **Cell**, 80: 249-57, 1995.

NEMETH, E. Calcium receptors as novel drug targets. In: NEMETH, E. BILEZIKIAN. **Principles of Bone Biology**. ed. San Diego: Academic Press, 1996. p. 1019-35.

OFFERMANN, S. G-proteins as transducers in transmembrane signalling . **Prog Biophys Mol Biol**, 80: 01-130, 2003.

O'HARA, P. J.; SHEPPARD, P. O.; THOGERSEN, H.; VENEZIA, D.; HALDEMAN, B. A.; MCGRANE, V. ,et al. The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. **Neuron**, 11: 41-52, 1993.

PACE, A.; GAMA, L.; BREITWIESER, G. Dimerization of the calcium-sensing receptor occurs within the extracellular domain and is eliminated by Cys --> Ser mutations at Cys101 and Cys236. **J Biol Chem**, 274: 11629-34, 1999.

PEABODY, D. Translation initiation at an ACG triplet in mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, 262: 11847-51, 1987.

PEARCE, S. H.; WILLIAMSON, C.; KIFOR, O.; BAI, M.; COULTHARD, M. G.; DAVIES, M. ,et al. A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutations in the calcium-sensing receptor. **N Engl J Med**, 335: 1115-22, 1996.

PENELA, P.; RIBAS, C.; MAYOR, F. Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. **Cell Signal**, 15: 973-81, 2003.

PIDASHEVA, S.; CANAFF, L.; SIMONDS, W.; MARX, S.; HENDY, G. Impaired cotranslational processing of the calcium-sensing receptor due to signal peptide missense mutations in familial hypocalciuric hypercalcemia. **Hum Mol Genet**, 14: 1679 - 90, 2005.

PIDASHEVA, S.; D'SOUZA-LI, L.; CANAFF, L.; COLE, D.; HENDY, G. CASRdb: calcium-sensing receptor locus-specific database for mutations causing familial (benign) hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. **Hum Mutat**, 24: 107-11, 2004.

PIETROBON, D.; DI VIRGILIO, F.; POZZAN, T. Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. **Eur J Biochem**, 120: 599-622, 1990.

POLLAK, M.; BROWN, E.; ESTEP, H.; MCLAINE, P.; KIFOR, O.; PARK, J. ,et al. Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca(2+)-sensing receptor gene mutation. **Nat Genet**, 8: 303-7, 1994.

- POLLAK, M. R.; BROWN, E. M.; ESTEP, H. L.; MCLAINE, P. N.; KIFOR, O.; PARK, J., et al. Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca(2+)-sensing receptor gene mutation. **Nat Genet**, 8: 303-7, 1994.
- PRATT, E. L.; GEREN, B. B.; NEUHAUSER, E. B. D. Hypercalcemia and idiopathic hyperplasia of parathyroid glands in an infant. **J Pediatr**, 30: 388-99, 1947.
- RAY, K.; CLAPP, P.; GOLDSMITH, P. K.; SPIEGEL, A. M. Identification of the sites of N-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction. **J Biol Chem**, 273: 34558-67, 1998.
- RAY, K.; HAUSCHILD, B. C.; STEINBACH, P. J.; GOLDSMITH, P. K.; HAUACHE, O.; SPIEGEL, A. M. Identification of the cysteine residues in the amino-terminal extracellular domain of the human Ca(2+) receptor critical for dimerization. Implications for function of monomeric Ca(2+) receptor. **J Biol Chem**, 274: 27642-50, 1999.
- RENS-DOMIANO, S.; HAMM, H. Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. **FASEB J**, 9: 1059-66, 1995.
- REYES-CRUZ, G.; HU, J.; GOLDSMITH, P. K.; STEINBACH, P. J.; SPIEGEL, A. M. Human Ca(2+) receptor extracellular domain. Analysis of function of lobe I loop deletion mutants. **J Biol Chem**, 276: 32145-51, 2001.
- RIOS, C. D.; JORDAN, B. A.; GOMES, I.; DEVI, L. A. G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. **Pharmacol Ther**, 92: 71-87, 2001.
- RODBELL, M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. **Nature**, 284: 17 - 22, 1980.
- SALAMOV, A.; NISHIKAWA, T.; SWINDELLS, M. Assessing protein coding region integrity in cDNA sequencing projects. **Bioinformatics**, 14: 384-90, 1998.
- SUNAHARA, R.; DESSAUER, C.; GILMAN, A. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 36: 461 - 80, 1996.

WEISINGER, J.; FAVUS, M.; LANGMAN, C.; BUSHINSKY, D. Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 by calcium in the parathyroidectomized, parathyroid hormone-replete rat. **J Bone Miner Res**, 4, 1989.

WELLENDORPH, P.; BRAUNER-OSBORNE, H. Molecular cloning, expression, and sequence analysis of GPRC6A, a novel family C G-protein-coupled receptor. **Gene**, 335: 37-46, 2004.

WESS, J. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. **Pharmacol Ther**, 80: 231-64, 1998.

ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER N.º 1933/2002

Registro CONEP: 4623 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 330/2002

Processo nº 25000.110038/2002-91

Projeto de Pesquisa : " *Investigação molecular de genes envolvidos em homeostase de cálcio* ".

Pesquisador Responsável : Dr.ª. Lília Freire Rodrigues de Souza Li

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP

Área Temática Especial : Genética Humana

Ao se proceder à análise das respostas às considerações da CONEP no Parecer nº 1588/2002, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

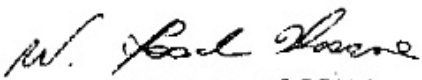
- a) foram atendidas as solicitações do referido parecer;
- b) o projeto preenche, de modo geral, os requisitos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- c) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada .

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa -CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com a seguinte recomendação a ser acompanhada pelo CEP:

- ✓ acrescentar no final do 1º parágrafo do TCLE no caso de nova pesquisa, será feito um novo protocolo que será submetido à apreciação do CEP/CONEP .

Situação : Projeto aprovado com recomendação

Brasília, 30 de dezembro de 2002


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP
☎ (0__19) 3788-8936
fax (0__19) 3788-8925
✉ cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 20/08/02
(Grupo I)

PARECER PROJETO: Nº 330/2002

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE GENES ENVOLVIDOS EM HOMEOSTASE DE CÁLCIO"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Lília Freire Rodrigues de Souza Li

INSTITUIÇÃO: CIPED/ UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 16/07/2002

II - OBJETIVOS

Realizar o diagnóstico molecular de doenças associadas a alterações da homeostase de cálcio. Identificar novas mutações em genes conhecidos envolvidos no processo e novos genes. Investigar as consequências funcionais das proteínas afetadas. Oferecer tratamento adequado.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um estudo de casos, em que uma população de 100 pacientes com alterações em homeostase de cálcio será investigada visando a realização de diagnóstico molecular. Inicialmente os genes estudados serão o do receptor sensor de cálcio, da proteína FGF-3 e do receptor de vit. D. Será utilizado o DNA e o RNA. Será feita cultura de queratócitos.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de um projeto de grupo I onde serão analisados os genes envolvidos na homeostase do cálcio. O projeto é bem estruturado. O termo de consentimento é adequado. O material será guardado para a análise de novos genes envolvidos com o metabolismo do cálcio que forem descobertos. Sendo assim, a pesquisadora responsável deverá comunicar ao CEP qualquer novo gene que venha a ser analisado.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

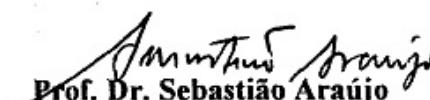
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Atenção: Projetos de Grupo I serão encaminhados à CONEP e só poderão ser iniciados após Parecer aprovatório desta.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de agosto de 2002.


Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

PROJETO: **Investigação molecular de genes envolvidos em homeostase de cálcio**

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li – Depto. de Pediatria - CIPED – FCM – UNICAMP

Prof. Dra. Vera – Depto. de Pediatria – FCM – UNICAMP

Outro: _____

ENDEREÇO:

Centro de investigação em Pediatria - CIPED

Departamento de Pediatria – FCM – UNICAMP

Cidade Universitária Zeferino Vaz

Campinas – SP – CEP 13081-970

Fone: (19) 3788-8966 Fax: (19) 3788-8972

e-mail: ldesouza@fcm.unicamp.br

Outro: _____

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:

Nome:

Registro do Hospital:

Nome do pai:

Nome da mãe:

Endereço:

Bairro:

Cidade:

UF:

CEP:

Fone:

IDENTIFICAÇÃO DO RESPONSÁVEL:

Nome:

Grau de parentesco:

Endereço:

Bairro:

Cidade:

UF:

CEP:

Fone:

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu _____, R.G.: _____, entendo que o paciente _____ (_____), o qual se encontra sob minha responsabilidade, foi convidado a participar de um projeto de pesquisa, aprovado pelo Comitê de Ética da FCM – UNICAMP. Este estudo inclui pacientes com doenças que resultam em problema no cálcio e outros minerais no organismo, como é o caso de meu(minha) filho(a). O objetivo desta pesquisa é investigar se existe alguma alteração no código genético que esteja relacionada à doença que meu filho apresenta. Como muitas dessas doenças são transmitidas de pais para filhos, eu entendo que essa é uma oportunidade para a minha família estar melhor esclarecida sobre os riscos de transmissão e do tipo de defeito que ocorreu no DNA. Desta forma é oferecido também para examinar o sangue de nós pais e de outros filhos, se desejarmos. A análise de um grupo de pacientes é melhor que a avaliação individual de cada caso, porque permite uma idéia mais ampla da doença. É esse o objetivo maior do estudo, que poderá ser útil no futuro, tanto para a minha família, quanto para outras, além de alertar para um diagnóstico mais precoce, e para orientar tratamentos mais eficazes. O sangue colhido para avaliação do DNA será preservado durante todo o estudo e destruído depois que ele se completar. Como nem todos os genes relacionados ao controle de cálcio no organismo foram descritos, o sangue poderá ser armazenado até 20 anos. Em caso de identificação de alguma alteração no código genético serei contatado(a) previamente para dar o meu consentimentos no caso de realização de outras pesquisas. Neste caso, um novo protocolo será realizado e submetido à apreciação do comitê de ética (CEP/CONEP). O sigilo será mantido através da identificação dos pacientes por um código.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que, se concordar que o paciente, sob minha responsabilidade, participe desse estudo, os pesquisadores envolvidos farão perguntas a respeito dos antecedentes médicos e familiares de meu(minha) filho(a). O paciente será submetido a um exame físico para avaliação de seu estado clínico. Além disso, ele será submetido a coleta de sangue (5 a 10 ml, o equivalente a uma a duas colheres de sobremesa), não sendo necessária a hospitalização. As pesquisas laboratoriais utilizando a amostra de sangue poderão ser feitas durante um período indeterminado após a coleta, e após sua realização, essa amostra de sangue será destruída. No caso de alguma alteração no código genético for identificada no meu(minha) filho(a), serei contatado(a) novamente para a realização de um exame de raspado de mucosa oral, isto é, um pouco de células da parte interna da bochecha será coletada através de raspagem. O raspado de mucosa oral será usado para complementação diagnóstica e será preservado durante todo o estudo e destruído depois que ele se completar. Havendo necessidade de um procedimento cirúrgico ser realizado por indicação médica para fins terapêuticos, será solicitado a coleta de amostras do tecido retirado. As pesquisas laboratoriais utilizando o tecido poderão ser feitas durante um período indeterminado após a coleta, e após sua realização, essa amostra de tecido será destruída. Nos indivíduos em que a doença acompanhe de alterações na pele como falta de pelos e cabelos, será solicitado uma pequena amostra de pele através de uma biopsia de pele, não sendo necessária a

hospitalização. As pesquisas laboratoriais utilizando o tecido da biópsia poderão ser feitas durante um período indeterminado após a coleta, e após sua realização, essa amostra será destruída. Em todas as amostras coletadas o sigilo será mantido através da identificação dos pacientes por um código.

RISCO E DESCONFORTO:

Para a extração de DNA, será necessário cerca de 5 ml de sangue venoso, que poderão ser obtidos em uma única ou mais coletas, considerando as condições e faixa etária do paciente. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e/ou manchas roxas (equimoses) no local da coleta de sangue. O desconforto será mínimo, pois, em geral, essa coleta será realizada de veia do braço, por profissional treinado e devidamente habilitado para realizá-la. Os riscos associados ao raspado de mucosa oral são mínimos, podendo raramente ocorrer dor e/ou sangramento discreto no local da coleta. O desconforto será mínimo pois estes sintomas podem persistir por alguns minutos. O risco associado à coleta de material durante a cirurgia está associado ao procedimento cirúrgico, e a coleta de material durante o procedimento cirúrgico não acarretará em risco nem desconforto adicional ao paciente. A biópsia de pele será realizado sob anestesia local e os riscos associados a esse procedimento são mínimos. Os riscos incluem pequeno sangramento no local da biópsia, que não costuma durar mais que alguns minutos e possibilidade de infecção local (celulite). Há o desconforto devido à aplicação da anestesia local, porém é mínimo, pois o procedimento será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizá-lo.

VANTAGENS:

Eu entendo que obterei com a participação do paciente, pelo qual sou responsável, a vantagem de poder auxiliar no diagnóstico da sua doença. Os resultados dos testes moleculares obtidos deverão ser transmitidos durante o acompanhamento do paciente em seu Ambulatório de atendimento médico. A sua participação neste estudo garante aconselhamento genético para ele e nossa família. É importante salientar que qualquer membro da família que desejar obter orientação clínico-genética, poderá também ser atendido nesse Ambulatório.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados desse projeto de pesquisa, farão parte do prontuário médico do paciente e serão submetidos aos regulamentos do Hospital, referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Eu entendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. As médicas responsáveis, Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li, fone (019)3788-8966 ou (019)3788-8986 e Dra. Vera Maria Santoro Belangero, fone (019)3788-7311 ou (019)3788-7861 estarão disponíveis para responder às minhas questões e preocupações. No caso de dúvidas sobre questões éticas do estudo, poderei ligar para a secretaria da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, fone (19) 3788 8938.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a participação nesse projeto de pesquisa, do paciente pelo qual sou responsável, é voluntária e que eu posso recusar ou retirar meu consentimento, a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue), sem comprometer os cuidados médicos que o paciente recebe atualmente, ou receberá no futuro. Eu reconheço, também, que a Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li e Dra. Vera Maria Santoro Belangero podem interromper a participação do paciente nesse estudo a qualquer momento que julgarem apropriado.

Nome do participante ou responsável: _____

Assinatura do participante ou responsável: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Local e data: _____

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Foi explicado ao responsável por _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Local e data: _____