UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

MARCUS VINÍCIUS COSTA PEDRONI

ANÁLISE MOLECULAR E FUNCIONAL DOS GENES FORMADORES E REGULADORES DO COLÁGENO TIPO I EM PACIENTES COM OSTEOGÊNESE IMPERFEITA

MOLECULAR AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF REGULATORY AND STRUCTURE-RELATED GENES OF TYPE I COLLAGEN IN PATIENTS WITH OSTEOGENESIS IMPERFECTA

CAMPINAS

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

MARCUS VINÍCIUS COSTA PEDRONI

ANÁLISE MOLECULAR E FUNCIONAL DOS GENES FORMADORES E REGULADORES DO COLÁGENO TIPO I EM PACIENTES COM OSTEOGÊNESE IMPERFEITA

Orientação: Profª. Drª. Lília Freire Rodrigues de Souza Li

Co-oritentação: Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção de título de Mestre em Ciências, área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente.

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno Marcus Vinícius Costa Pedroni, e orientada pela Profª. Drª. Lília Freire Rodrigues de Souza Li.

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Pedroni, Marcus Vinícius Costa, 1985-

P343a Análise molecular e funcional dos genes formadores e reguladores do colágeno tipo I em pacientes com osteogênese imperfeita / Marcus Vinícius Costa Pedroni. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Lília Freire Rodrigues de Souza Li.

Coorientador : Carlos Eduardo Steiner.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doenças do colágeno. 2. Dentinogênese imperfeita. 3. Mutação. 4. Colágenos fibrilares. 5. Osso e ossos. I. Li, Lilia Freire Rodrigues de Souza, 1967-. II. Steiner, Carlos Eduardo, 1969-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Molecular and functional analysis of regulatory and structure-related genes of type I collagen in patients with osteogenesis imperfecta.

Palavras-chave em inglês:

Collagen diseases

Dentinogenesis imperfecta

Mutation

Fibrillar collagens

Bone and bones

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Lília Freire Rodrigues de Souza Li [Orientador]

Carlos Eduardo Martinelli Júnior

Andrea Trevas Maciel Guerra

Data da defesa: 31-08-2012

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Aluno Marcus Vinícius Costa Pedroni

Orientador: Profa. Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li

Membros:
Profa. Dra. Lilia Freire Rodrigues de Souza Li
Prof. Dr. Carlos Eduardo Martinelli Júnior
Profa. Dra. Andrea Trevas Maciel Guerra

Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/08/2012

Dedico este trabalho a todos os familiares e amigos que contribuíram para a sua realização, e a todos os pacientes que vierem a se beneficiar deste estudo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profª. Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li, pela dedicação, paciência, e todos os ensinamentos passados em todos estes seis anos de LEP.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner, pela colaboração e apoio muito úteis na realização deste trabalho.

Aos doutores Andrea Trevas Maciel Guerra, Carlos Eduardo Martinelli Junior, Edi Lúcia Sartorato e Marise Lazaretti, pelo aceite em participar da minha banca de qualificação e da banca de defesa.

Aos funcionários e docentes do CIPED, da FCM e da Unicamp em geral, com as devidas exceções, que ajudaram em cada etapa deste estudo.

Aos amigos de laboratório, do passado e do presente, Simone, Marcelo, Érika, Paula, Carol, Vanessa(s), Bia, Taís, Júlia, sempre muito prestativos e companheiros.

A todos os membros de minha família, que tiveram a sabedoria e paciência para entender minhas ausências quando estava estudando, principalmente minha mãe, Maria, meus irmãos, André e Larissa, meus avós João e Rose, e todos os primos, tios, e demais pessoas da minha grande família.

Aos amigos Gustavo, Fernando(s), Márcio, Ariel, Meire, Tiago, Christiano, Andréia, Jussara, Nina, Thati e tantos outros que faço a injustiça de não citar, pelo companheirismo em todos os momentos.

Aos pacientes e suas famílias, por consentirem em suas participações neste estudo.

À Unicamp pela acolhida desde a graduação, e de forma geral a todos que contribuíram para o meu crescimento. À FAPESP pelo apoio financeiro concedido.

Não se deve ir atrás de objetivos fáceis.
É preciso buscar o que só pode ser alcançado
por meio dos maiores esforços. A mente que se abre
a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original.
Albert Einstein

SUMÁRIO

Agradecimentos ix

Lista de tabelas xvii

Lista de figuras xix

Lista de abreviaturas xxvii

Resumo xxix

Abstract xxxiii

Introdução xxxvii

Osteogênese imperfeita 39

Genes formadores do colágeno 40

Estrutura e função do colágeno 42

Síntese e secreção 44

Genes reguladores do colágeno 46

Base molecular da doença 54

Tipos de OI 59

OI tipo I 59

OI Tipo II 59

OI Tipo III 61

OI Tipo IV 62

OI Tipo V 63

OI Tipo VI 64

OI Tipo VII 65

OI Tipo VIII 66

OI Tipo IX 66

OI tipo X 67

OI tipo XI 68

OI tipo XII 68
Objetivos 71

Objetivos gerais 73

Objetivos específicos 73

Sujeitos e métodos 75

Pacientes e controles 77

Família A 77
Família B 78
Família C 78
Família D 79
Família E 79
Família F 80
Família G 80
Família H 82
Família I 83
Família J 83
Família K 84
Família L 85
Heredogramas das famílias estudadas 85

Biópsia de pele e cultura primária de fibroblastos 87

Extração de RNA e RT-PCR 88

Polymerase Chain Reaction 88

Extração de proteínas e Western blot 90

Real Time - qPCR 91

Sequenciamento direto 94

Digestão com enzimas de restrição 94

Imunocitoquímica 95

Microscopia de fluorescência confocal 96

Análise das mutações *in silico* 96

Análise estatística 101

Resultados 103

Análise molecular dos genes codificadores do colágeno tipo I 105

Comparação pró-colágenos de vertebrados 109

Digestão com enzimas de restrição 111

Expressão do colágeno tipo I nos pacientes com OI 112

Western blot 115

Imunocitoquímica 116

Análise das mutações *in silico* 120

Discussão 127

Conclusão 137

Referências 141

Anexos 159

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa 161

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos tipos de OI segundo gravidade clínica, herança e lócus nos cromossomos. 57

Tabela 2. Primers dos genes formadores do colágeno tipo I. 89

Tabela 3. Primers dos genes reguladores do colágeno selecionados para este trabalho. 90

Tabela 4. Eficiência dos genes do colágeno tipo I e dos genes de referência, tamanho do amplicon e o número de catálogo para o Real Time qPCR. 92

Tabela 5. Sítios de ligação das enzimas de restrição utilizadas nas mutações do colágeno. 94

Tabela 6. Análise *in silico* das mutações do colágeno tipo I 100

Tabela 7. Resumo das mutações de todas as famílias com informações sobre gene, mudança de aminoácido e tipo de OI 108

Tabela 8. Alinhamento das posições mutadas em isoformas de COL1A1 de humanos e outros vertebrados 110

Tabela 9. Alinhamento das posições mutadas em isoformas de COL1A2 de humanos e outros vertebrados 110

Tabela 10. Resultados da inserção de dados para as mutações pontuais de *COL1A1* encontradas no trabalho. As probabilidades de dada mutação ser deletéria são mostradas na coluna "*Probability of deleterious mutation*". As outras características advindas da mutação estão descritas nas demais colunas. 121

Tabela 11. Resultados da inserção de dados para as mutações pontuais de *COL1A2*. As probabilidades de dada mutação ser deletéria são mostradas na coluna "*Probability of*

deleterious mutation". As outras características advindas da mutação estão descritas nas demais colunas..... 122

Tabela 12. Resultados das análises in silico das mutações pontuais encontradas nos genes do colágeno tipo I..... 126

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Os loci de colágeno tipo I no genoma humano. A. gene COL1A1, localizado no cromossomo 17q21.31-q22, tem 18 kb em tamanho e composto de 52 exons. Os exons de 6 a 49 codificam o domínio tríplice hélice. A maioria destes exons são compostos de 45 pb, 54 pb ou múltiplos de 45 pb ou 54 pb. São transcritos dois mRNAs, um de 5,8 kb e outro de 4,8 kb, diferindo em sua sequência 3'UTR e dando origem a uma única proteína de 1464 aminoácidos e 140 kDa. B. gene COL1A2, localizado no cromossoma 7q22.1, tem 36,67 kb e é composto por 52 exons que codificam um mRNA de 5411 pb e uma proteína de 1366 aminoácidos e ~130 KDa. C. A estrutura similar de ambos os genes, mostrando os exons (caixas pretas) e as regiões intrônicas (linha preta). A região promotora é simbolizada pela caixa branca. Esta semelhança nos dois genes faz com que a tríplice hélice seja uma estrutura robusta, onde apenas uma única substituição de aminoácido quebre a estabilidade da hélice. 42

Figura 2. Proteína de colágeno tipo I. A. Heterotrímero mostrando um aminoácido de glicina a cada terceira posição no domínio da tríplice hélice. Todos os resíduos de glicina estão voltados para o interior da hélice, enquanto os radicais dos outros aminoácidos estão voltados para as porções exteriores da proteína. B. Detalhe da triple hélice com duas subunidades α1 e uma subunidade α2. Os radicais H+ da glicina formam pontes de hidrogênio no interior da estrutura. C. Esquema simplificado da organização tridimensional do colágeno que garante sua função de sustentação mecânica e bioquímica de ossos e cartilagens. 46

Figura 3. Potenciais vias moleculares que causam a OI são degradação proteossomal, autofagia ou a incorporação das cadeias mutantes na ME. As consequências funcionais e bioquímicas são a ligação mais frouxa entre as cadeias de colágeno, baixa mineralização da matriz óssea e comunicação entre as células entre si e a matriz extracelular. Figura adaptada de Forlino et al., 2011 (47)..... 56

Figura 4. Probando E, evidenciando a esclera azulada (A). A paciente passou por procedimento cirúrgico para colocar uma haste intramedular telescopada em fêmur bilateral (B), procedimento decorrente do excesso de fraturas (C) e osteopenia (D) em membros inferiores. 80

Figura 5. Probando G, logo após cirurgia para colocação de haste telescópica na tíbia (A). O paciente apresenta lordose lombar grave (B, em radiografia frontal), além de fraturas de repetição em membros superiores, com cicatrização do rádio em forma de V (C) e inferiores, também com baixa mineralização de diâmetro da tíbia (D). 81

Figura 6. Probando H, mostrando a esclera azulada (A), e radiografia mostrando hiperlordose lombar, com corpos vertebrais achatados e alinhados na região central com osteopenia difusa (B), e fratura consolidada no fêmur (seta em C). 82

Figura 7. Probando K, mostrando osteopenia difusa de colo femoral e bacia (A e D), *genu valgum* em tíbia bilateral (B), sindactilia (C), deformidades e tortuosidades e baixa

mineralização craniais (E) e cifose torácica com diminuição da altura de corpos vertebrais (F). 85

Figura 8. Heredograma das famílias incluídas neste estudo (A-K). Família A: ◍ Esclera azulada e surdez, ⃠ Síndrome de Down. Família B: ▨ Descalcificação dos dentes. Família C: ◍ Paralisia infantil, cegueira e surdez. Família D: ▨ Escoliose. Família E: ▨ Alteração no pavilhão auditivo. Família G: ◍ Esclera azulada sem fratura. Família H: ▨ Paralisia infantil, ⊗ Pé torto congênito. Família J: ◍ Fratura de clavícula traumática única. ⓗ Epilepsia. 87

Figura 9. Linha de tendência obtida após construção do gráfico a partir da utilização do logaritmo das concentrações pela diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse. A equação de reta da linha de tendência, a qual possui inclinação menor do que 0,1, indicando que o sistema está validado. 93

Figura 10. Estudo de Grantham de substituição de aminoácidos na estrutura da proteína. Esta tabela foi elaborada com o resultado de cálculos que predizem a distancia química dos aminoácidos de acordo com pH, volume e hidrofobicidade de cada um. Para obter-se a pontuação, basta cruzar o aminoácido selvagem com o substituído e observar o número correspondente. Tabela reproduzida de Grantham, 1976 (106). 100

Figura 11. Sequenciamento direto dos pacientes deste estudo. Em cada imagem, o painel superior mostra o sequenciamento de uma amostra controle, e o painel inferior a mutação encontrada nas famílias, identificadas pelas letras na parte superior. A mutação de cada paciente está especificada na caixa com seta. 108

Figura 12. Digestão dos produtos de PCR dos probandos D, H, J e L. A digestão dos cDNA mutante mostrou o padrão heterozigoto das mutações. O tamanho das bandas em pares de base está indicado ao lado da figura, e a presença (+) ou ausência (-) da enzima está indicada em cada banda. Em todos os casos observa-se o padrão heterozigoto de herança da mutação, pela sobreposição das bandas do cDNA normal com as bandas produzidas pela mutação. 112

Figura 13. Expressão dos genes do colágeno tipo I por Real Time qPCR. Cada gráfico representa a expressão do colágeno com um gene de referência específico. O grupo dos pacientes teve uma hiperexpressão significante comparado ao grupo controle (teste não paramétrico de Mann-Whitney U, com valor de p para *HPRT1* x *COL1A1* = 0,0035; *HPRT1* x *COL1A2* = 0,0079; *GAPDH* x *COL1A1* = 0,0224; *GAPDH* x *COL1A2* = 0,0169; *ACTB* x *COL1A1* = 0,0079 e *ACTB* x *COL1A2* = 0,0079)..... 114

Figura 14. A - Correlação entre expressão de *COL1A1* e *COL1A2*, indiferentemente da mutação em um dos genes, foi muito significativa, (teste não paramétrico R de Spearman, com valor de $p < 0,0001$ para todos os genes de referência). B – A expressão de genes mutados *versus* genes não mutados dentro de cada paciente não teve diferença

significante entre os grupos (teste de Wilcoxon com valor de p para *ACTB* = 0,625; *HPRT1* = 0,875 e *GAPDH* = 0,8750). 115

Figura 15. Expressão de proteínas do colágeno tipo I. Cada banda está identificada com o nome do paciente correspondente. Painel superior mostrando a expressão de proα1(I) e proteína de referência tubulina. No painel inferior, expressão de proα2(I). A expressão das proteínas do colágeno tipo I foi similar entre controles e pacientes. C – extrato celular total. M – extrato de meio de cultura tratado com acido ascórbico 25mg/mL. 116

Figura 16. Imunocitoquímica do colágeno tipo I. Os pacientes estão identificados em cada imagem, e o asterisco identifica que gene está mutado em cada amostra. Os padrões de fibras alongadas estão presentes nos controles e nas proteínas não mutadas, enquanto a desorganização de fibras e localização difusa é observada nos pacientes. A barra vermelha horizontal indica 10µm. 117

Figura 17. Resultado representativo da análise de textura realizada em células de fibroblasto. Uniformidade e entropia foram avaliadas em fibroblastos de pacientes e controles. A - Uniformidade e entropia do probando B com OI tipo IV. B - Uniformidade e entropia do probando M com OI tipo IV. As imagens estão representando as proteínas mutadas em cada paciente e a região ROI (quadrado branco), onde foi realizada a análise de textura. Ctrl = controle. 118

Figura 18. Quantificação da imunocitoquímica dos probandos B, E, J e L, mostrando os padrões de uniformidade, homogeneidade e entropia. Em cada paciente, o gene mutado aparece com a linha de tendência deslocada em relação ao controle e ao gene sem mutação. Porém no probando E, com mutação tanto em *COL1A1* como em *COL1A2*, não há diferença entre as duas proteínas, sendo ambas diferentes do controle. 119

Figura 19. Tela de resultado do banco de dados SNPs&GO, mostrando as informações fisiológicas, bioquímicas e estruturais das proteínas inseridas. No primeiro campo com círculo vermelho, é feita a identificação da posição do aminoácido, o resíduo original e o resíduo substituído na proteína. No segundo campo, o efeito provável causado pela mutação, podendo ser '*Neutral*' ou '*Disease*'. No terceiro campo, o Índice de confiabilidade da coluna efeito, variando de 0 a 10. Quanto maior este número, mais confiável a informação obtida. Nos quadros abaixo, o resultado de cada uma das mutações submetidas ao banco de dados, sendo todas '*Disease*', com exceção da mutação p.1156, de *COL1A2*, que foi considerada '*Neutral*' 123

Figura 20. Tela de resultado do banco de dados PolyPhen 2. Os campos mais importantes de resultado desta ferramenta estão marcados com círculos vermelhos. No círculo 1, o número da proteína adquirido no banco de dados UniProt. O número da proteína *COL1A1* é P02452, enquanto o número da proteína *COL1A2* é P08123. O campo 2 é o local onde se insere a posição do aminoácido que foi substituído na proteína madura. No campo 3, em AA_1, o nome do aminoácido normal da posição indicada, enquanto em AA_2, o nome do aminoácido substituído. No campo 4, aparece um breve descrição da

proteína com nome, símbolo, tamanho e função. No campo 5, o resultado do teste probabilístico em que o conjunto de dados foi submetido, mostrando uma barra de cores que indica a probabilidade ou possibilidade de uma dada substituição ser deletéria ou não. 124

Figura 21. Resultado das substituições em COL1A1 para todas as substituições encontradas. Todas deram como resultado 'Provavelmente deletério', com exceção da mutação da posição p.205, que foi considerada 'Benigna'. 124

Figura 22. Resultado das substituições em *COL1A2* para todas as substituições encontradas. As mutações p.259, p.72 e p.265 retornaram resultados 'Provavelmente deletério', a mutação p.772 retornou 'Possivelmente deletério, enquanto a mutação da posição p.1156, foi considerada 'Benigna'. 125

Figura 23. Resultado da analise *in silico* da ferramenta Panther. O algoritmo desta ferramenta prevê que dada mutação tem seu efeito deletério na proteína final se o valor de $P_{deleterious}$ for menor que 0,5, enquanto o valor de subSPEC for menor que -3. O quadro à esquerda mostra os dados das mutações de COL1A1, enquanto o quadro à direita mostra os dados de COL1A2. Todas as mutações inseridas foram consideradas deletérias para a proteína, com exceção da posição p.1156 de COL1A2 (seta) que não se alinhou ao banco de dados. Esta região corresponde ao domiínio C-terminal que é clivada no colágeno maduro, o que não é levado em consideração neste banco. 125

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µL	microlitro
cDNA	DNA complementar
COL1A1	gene que codifica a proteína proα1(I)
COL1A2	gene que codifica a proteína proα2(I)
DI	Dentinogênese Imperfeita
DNA	ácido desoxirribonucléico
GH	hormônio de crescimento
ME	Matriz extracelular
MIM	*Online Mendelian Inheritance in Man*
Ng	nanograma
Nm	nanômetro
OI	Osteogênese Imperfeita
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCR	reação de polimerase em cadeia
PVDF	membrana de *polyvinylidene difluoride*
RE	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	reação de polimerase em cadeia com transcriptase reversa
RT-qPCR	reação de polimerase em cadeia quantitativo em tempo real
SDS-PAGE	*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
Taq polimerase	DNA polimerase de *Thermus aquaticus*

RESUMO

A Osteogênese Imperfeita (OI) é um distúrbio genético caracterizado por baixa massa e fragilidade óssea, e outras manifestações do tecido conjuntivo, decorrente de defeitos qualitativos ou quantitativos do colágeno tipo I. Está associada a mutações nos genes ***COL1A1*** e ***COL1A2*** que codificam respectivamente as cadeias proα1-(I) e proα-2(I) formadoras da molécula do colágeno tipo I, e mais raramente mutações nos genes reguladores. A OI manifesta-se através de diferentes fenótipos (I-IV), segundo a classificação de Sillence *et al*. O objetivo deste trabalho foi a análise molecular dos genes ***COL1A1*** e ***COL1A2*** em famílias brasileiras portadoras de OI, em suas diferentes formas clínicas. Fizemos biópsia da pele de 12 famílias com OI para cultura primária dos fibroblastos. Desta cultura extraímos RNA total, que foi usado como molde para transcrição reversa e reação em cadeia de polimerase (PCR) dos genes e sequenciamento automático direto de cDNA. A expressão gênica foi determinada por Real Time PCR e o padrão e grau de expressão das proteínas do colágeno foram analisados por Imunocitoquímica e Western blot. Identificamos nove mutações *missense* em heterozigose em nove famílias, e duas mutações com alteração na matriz de leitura em famílias com fenótipos dos tipos I, III ou IV de OI. No gene ***COL1A1*** encontramos quatro mutações já descritas: c.613G>A (p.P205A); c.769G> A (p.G257R); c.859G>A (p.G287S); c.1678G>A (p.G560R). No gene ***COL1A2*** encontramos uma mutação já descrita: c.2314G> A (p.G772S) e quatro novas mutações: c.214G>A (p.G72S); c.775G>A (p.G259S); c.793G> C (p.G265R) e c.3467G>A (p.R1156K). Encontramos hiperexpressão dos transcritos de ***COL1A1*** e ***COL1A2***, porém expressão normal das cadeias α1 e α2 da proteína do colágeno em todos os pacientes. As cadeias mutada apresentaram padrão desorganizado nas células. Pacientes com OI apresentaram hiperexpressão dos genes de colágeno tipo I sugerindo que estes genes são regulados e que as meia vidas destas proteínas estão reduzidas.

ABSTRACT

Osteogenesis Imperfecta (OI) is a genetic disorder characterized by low bone mass and bone fragility, and other manifestations of connective tissue, due to qualitative or quantitative defects of type I collagen. It is associated with mutations in ***COL1A1*** and ***COL1A2*** genes, that encode respectively the proα-1(I) and proα-2(I) chains, forming the molecule of type I collagen, and more rarely mutations in regulatory genes. The OI is manifested by various phenotypes (I-IV), according to the classification of Sillence *et al*. The objective of this study was the molecular analysis of ***COL1A1*** and ***COL1A2*** genes in Brazilian families with OI, in its different clinical forms. We performed skin biopsy from 12 families with OI for primary culture of fibroblasts. From this culture, we made total RNA extract, which was used as template for reverse transcription and polymerase chain reaction (PCR), and automated sequencing directly from cDNA. Gene expression was determined by Real Time qPCR and the level of expression of collagen proteins were analyzed by immunocytochemistry and Western Blot. We identified heterozygous mutations in 11 families that have phenotypes of types I, III or IV of OI. In the ***COL1A1*** gene found four previously described mutations: c.613G> A (p.P205A), c.769G> A (p.G257R), c.859G> A (p.G287S), c.1678G> A (p. G560R). In the ***COL1A2*** gene we found one previously described mutation: c.2314G> A (p.G772S) and four new mutations: c.214G> A (p.G72S), c.775G> A (p.G259S), c.793G> C (p.G265R) and c.3467G> A (p.R1156K). We found upregulation of the transcripts of ***COL1A1*** and ***COL1A2*** genes, but a normal expression of α1 and α2 protein chains in all patients. The mutant chain showed disorganized on the immunocytochemestry. Patients with OI showed upregulation of type I collagen genes, suggesting regulation and decreasing half lives of the proteins.

INTRODUÇÃO

Osteogênese imperfeita

A Osteogênese Imperfeita (OI) é um grupo de doenças congênitas caracterizadas por baixa massa e fragilidade óssea, além de outras manifestações do tecido conjuntivo. Existe uma variedade de manifestações extra-ósseas, como esclera azulada, dentinogênese imperfeita (DI), perda auditiva, e relaxamento excessivo de ligamentos e pele (1). A OI tem incidência em torno de 1:10.000 indivíduos e é associada, em sua maioria, a anormalidades na síntese e/ou estrutura do colágeno tipo I (2). Atualmente, centenas de mutações nestes genes são documentadas na literatura e registradas na *Database of Collagen Mutations* da *University of Leicester*, UK (http://www.le.ac.uk/genetics/collagen/) (3).

A OI é caracterizada usualmente por herança autossômica dominante e causada por mutações em heterozigoze nos genes ***COL1A1*** ou ***COL1A2*** (MIM #120150 e #120160). Mutações *non sense*, com a introdução de um códon de parada precoce na sequência proteica, levam a uma diminuição da quantidade de colágeno tipo I estruturalmente normal, resultando num fenótipo moderado de OI. Mutações *missense*, que levam a troca de aminoácidos e causam mudanças estruturais nas cadeias de procolágeno tipo I afetando a associação das cadeias e a formação da tríplice hélice, secreção e formação da fibrila, geralmente resultam em fenótipos mais graves, incluindo o fenótipo letal perinatal. Bioquimicamente, estas anormalidades estruturais são reflexo do aumento de modificações pós-traducionais nas cadeias de procolágeno tipo I (4). Atualmente, outros genes reguladores do colágeno estão sendo relacionados à OI, e suas mutações causam fenótipos heterogêneos, o que levou a criação de mais subclasses da doença, OI Tipo V a XII. (MIM#s, Tipo I: 166200, Tipo II: 166210, Tipo III: 259420 e Tipo IV: 166220, Tipo

V: 610967, Tipo VI: 610968, Tipo VII: 610682, Tipo VIII: 610915, Tipo IX: 259440, Tipo X 613848, Tipo XI 613849, Tipo XII 613982).

Durante o desenvolvimento, o colágeno atua como sustentação da base da formação dos ossos. O osso é composto de fibras de colágeno tipo I e cristais de hidroxiapatita, formando uma estrutura forte, mas não quebradiça. A osteogênese (desenvolvimento embrionário do osso) envolve a ação conjunta de células especializadas, os osteoblastos (função de depósito de colágeno e promotor de mineralização), osteoclastos (reabsorção de matriz óssea velha ou comprometida) e osteócitos (sensores mecânicos embutidos nos ossos). As alterações da osteogênese podem ser causadas tanto por disfunção celular como defeitos na matriz de colágeno (5). Baseado em critérios clínicos, radiológicos e genéticos, Sillence *et al*.(6) identificaram quatro tipos de OI. A forma mais leve é a OI tipo I, enquanto a OI tipo II é a forma mais severa, perinatal letal. É subdividida em IIA, quando a mutação ocorre em um dos genes formadores do colágeno tipo I, ou em IIB, quando a mutação é no gene regulador ***CRTAP***. Crianças com OI tipo III podem morrer na infância por problemas respiratórios; muitas morrem de pneumonia, *cor pulmonale* (alteração na estrutura e funcionamento do ventrículo direito), ou traumas como fraturas cranianas. A OI tipo IV é a menos comum e tem algumas similaridades com os fenótipos da forma leve do tipo I e do tipo III, sendo muito heterogêneo.

Genes formadores do colágeno

A maioria dos pacientes diagnosticados com OI (> 90%), têm mutações nos genes do colágeno tipo I, localizados nos *loci* 17q21.3–17q22 (***COL1A1***), que codifica a cadeia α1(I); e 7q22.1 (***COL1A2***), que codifica a cadeia α2(I). A proteína é um heterotrímero com duas cadeias α1(I) e uma cadeia α2(I) (7). Os dois genes são similares

em estrutura, o ***COL1A1*** tem 51 exons e o ***COL1A2*** tem 52 exons. O gene ***COL1A1***, com 18Kb de extensão, é cerca de metade do tamanho do ***COL1A2***, com 38 Kb, mas os dois transcrevem mRNAs de quase mesmo tamanho e estrutura, o que difere entre os dois é a quantidade de regiões intrônicas (8). Cada um codifica uma cadeia-α com uma parte central em forma de tríplice hélice de 1014 aminoácidos, composto por repetições do tripeptídeo Gly-X-Y, com domínios pro-peptídicos nas regiões amino e carboxi-terminais. Todos os 43 exons que codificam o domínio da tríplice hélice começam com um códon de glicina e termina com um códon de posição Y (Figura 1), enquanto a mudança de um exon para o outro produzem transcritos ordenados nesta conformação (9). Mutações no gene ***COL1A1*** determinam de acordo com a classificação de Sillence, as formas mais graves de OI, e no gene ***COL1A2*** as formas mais brandas da doença (10).

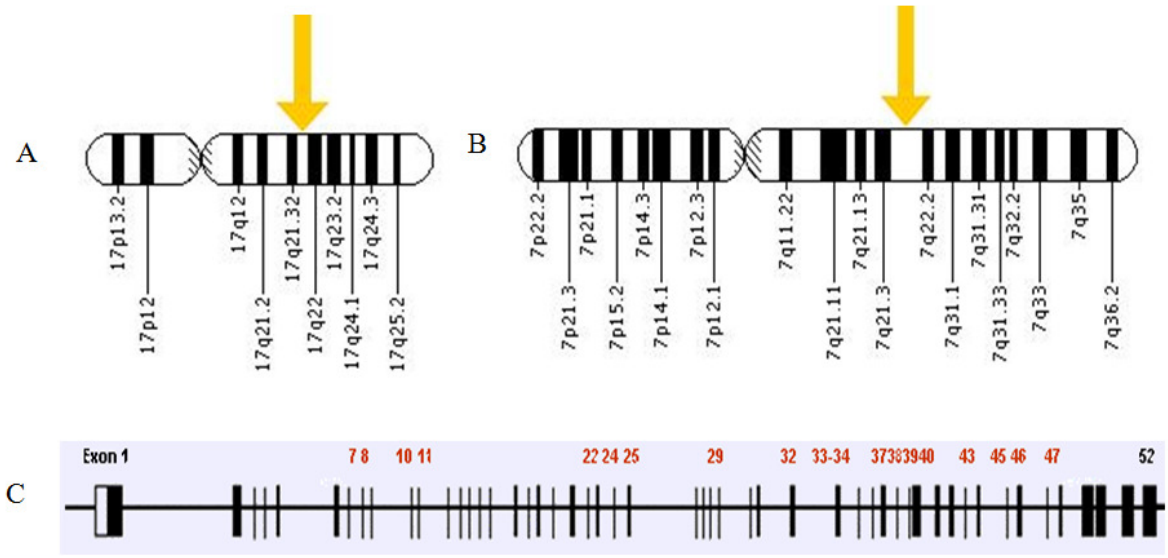


Figura 1. Os loci de colágeno tipo I no genoma humano. A. gene COL1A1, localizado no cromossomo 17q21.31-q22, tem 18 kb em tamanho e composto de 52 exons. Os exons de 6 a 49 codificam o domínio tríplice hélice. A maioria destes exons são compostos de 45 pb, 54 pb ou múltiplos de 45 pb ou 54 pb. São transcritos dois mRNAs, um de 5,8 kb e outro de 4,8 kb, diferindo em sua sequência 3'UTR e dando origem a uma única proteína de 1464 aminoácidos e 140 kDa. B. gene COL1A2, localizado no cromossoma 7q22.1, tem 36,67 kb e é composto por 52 exons que codificam um mRNA de 5411 pb e uma proteína de 1366 aminoácidos e ~130 KDa. C. A estrutura similar de ambos os genes, mostrando os exons (caixas pretas) e as regiões intrônicas (linha preta). A região promotora é simbolizada pela caixa branca. Esta semelhança nos dois genes faz com que a tríplice hélice seja uma estrutura robusta, onde apenas uma única substituição de aminoácido quebre a estabilidade da hélice.

Estrutura e função do colágeno

A molécula de colágeno confere base estrutural para ossos e cartilagens e é responsável pelo formato e propriedades biomecânicas como resistência a pressão, torção e tensão. Dos 20 tipos de colágenos geneticamente distintos descritos para vertebrados, distribuídos em oito famílias, apenas alguns são relacionados à estrutura óssea e cartilaginosa, dominantemente as formas fibrosas. As heterofibrilas de colágeno tipo I e V constituem o arcabouço fibrilar dos ossos, e os tipos I, II e XI aparecem em cartilagem. O colágeno é o maior componente protéico orgânico, com cerca de 90% da massa óssea seca, e 60% da massa seca de cartilagem. Defeitos no seu processo de amadurecimento, desde o

gDNA até a matriz extracelular, geram doenças do tecido conjuntivo, como osteoporose, osteoartrites, condrodisplasia, além da OI.

A estrutura do colágeno é altamente organizada na forma de tríplice hélice de 1,5 nm de diâmetro, composto por três cadeias polipeptídicas. Uma apresentação obrigatória das cadeias polipeptídicas, para se formar a hélice, é a presença de um resíduo de glicina a cada terceira posição, resultando num polímero (Gly – X – Y)n, o que caracteriza todos os colágenos. A cadeia α forma uma hélice com 18 resíduos de aminoácidos por volta, e a montagem é feita em volta do eixo central de forma que todos os resíduos de glicina são posicionados no centro da tríplice hélice. As cadeias laterais dos aminoácidos nas posições X e Y ocupam as posições exteriores da molécula madura, onde estão disponíveis para as interações laterais com as moléculas vizinhas de colágeno, para a formação das fibrilas. Outra apresentação típica é a grande quantidade de prolina e hidroxiprolina, (cerca de 20%), onde X é frequentemente prolina e Y é frequentemente hidroxiprolina (11). Os grupos hidroxila da 4-hidroxiprolina são essenciais para a formação de pontes de hidrogênio intramoleculares, e determinam criticamente a estabilidade térmica de cada tríplice hélice. Apesar de o tamanho dos domínios da tríplice hélice variar consideravelmente, nos colágenos formadores de fibrilas chegam a 300 nm, equivalente a 1000 resíduos de aminoácidos por cadeia α processada. Interrupções da estrutura $(Gly–X–Y)_n$ por apenas um resíduo pode causar flexibilidade na tríplice hélice e deixá-la suscetível ao ataque proteolítico (12).

O procolágeno humano tipo I é composto pelas cadeias proα1(I), com 1464 resíduos de aminoácidos e uma cadeia mais curta proα2(I), com 1366 aminoácidos (Figura 2). É sintetizado em grandes quantidades por fibroblastos, osteoblastos, e por

odontoblastos, e numa menor quantidade por quase todos os outros tecidos (13). Está presente nas fibras reticulares de tecidos parenquimais como pulmões, rins, fígado, músculos e baço, com exceção da cartilagem hialina, cérebro e humor vítreo. Apesar de o colágeno tipo I purificado poder ser reconstituído por *cross-banded in vitro*, *in vivo* é incorporado em heterofibrilas contendo o colágeno tipo III, em pele e fibras reticulares, ou tipo V em ossos, tendões, córnea, e outros tecidos. Nos ossos, fibrilas com cerca de 5% de colágeno tipo V aumentam o diâmetro para 400nm ou mais. Juntamente com cristais de hidroxipatita e várias glicoproteínas específicas de ossos, as heterofibrilas do tipo I revelam propriedades biomecânicas únicas, como carga relativa, força de tênsil, e resistência à torção (12).

Além de suas propriedades biomecânicas, o colágeno tipo I é importante como um substrato adesivo para muitas células e tem um maior papel no desenvolvimento de órgãos e tecidos, na migração celular, proliferação e diferenciação, na cicatrização, remodelação de tecido e homeostase. Células reconhecem o colágeno tipo I nativo via integrinas α1β1 e α2β1 (14), que são receptores transmembrana, e sinalizam da matriz extracelular para o meio intracelular cascatas de sinal para secreção de algumas proteínas específicas e também para o citoesqueleto de actina.

Síntese e secreção

O precursor do procolágeno é traduzido no RE, onde são combinadas duas cadeias proα1(I) e uma proα2(I), para formar a tríplice hélice. Para a correta orientação da proteína madura, ocorre uma série de modificações pós-traducionais como 3-hidroxilação e 4-hidroxilação de resíduos de prolina, e hidroxilação de lisina. São modificações necessárias para a estabilidade térmica e o enovelamento correto. Também permitem que as

regiões de *crosslink* com outras tríplices hélices e proteínas não colágenas tornem-se disponíveis para a ligação. Os heterotrímeros são então transportados para a ME através da rede do complexo de Golgi. Após a secreção, os domínios globulares procolágeno são clivados por proteases da ME para resultar em fibras, formando a estrutura de sustentação óssea (15).

Na maioria das proteínas, as cadeias polipeptídicas iniciam o enovelamento na porção N-terminal enquanto ainda estão sendo traduzidas. Mas as cadeias de procolágeno começam a se enovelar na porção distal C-terminal, somente quando a tradução acaba completamente. A formação da tríplice hélice ocorre posteriormente, em direção à região N-terminal (16). Normalmente as células guiam a maioria das proteínas à sua conformação mais estável com a ajuda de chaperonas inespecíficas presentes no citoplasma. No caso do colágeno tipo I, para evitar o enovelamento precoce e a formação de agregados de fibrilas, existem chaperonas especificas (*HSP47*, *FKBP65*, *P3H1*, *CRTAP* e *CYPB*, descritas na seção 'Genes reguladores do colágeno tipo I') para a correta orientação das fibrilas na tríplice hélice (5).

No caso das mutações que afetam a estabilidade tridimensional do colágeno, ocorre a formação de fibras agrupadas insolúveis, envolvendo a transição de um estado nativo metaestável para uma conformação estável não funcional com agregados (17). A incorporação de fibrilas de procolágeno defeituoso na tríplice hélice na matriz óssea é um fator importante para o fenótipo de OI, porém a capacidade afetada das células ósseas também é um fator importante para a doença, com ou sem defeitos na via de biossíntese do colágeno. Tais problemas são a capacidade dos osteoblastos em mineralizar o osso, do

osteoclasto em reabsorver o tecido velho, e do órgão ao todo em responder a sinais metabólicos, como hormônios e sinais cerebrais, e falta de função nos osteócitos (5).

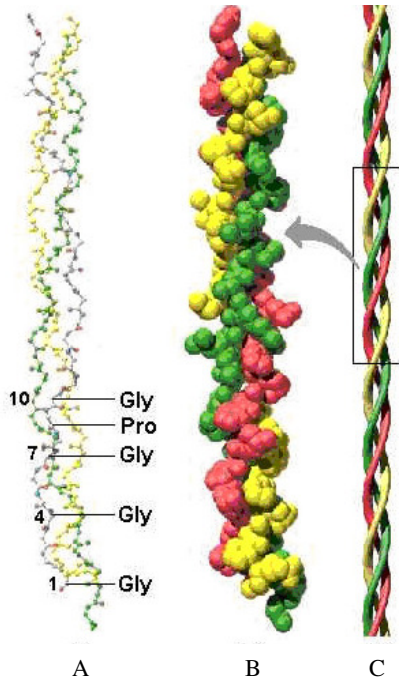


Figura 2. Proteína de colágeno tipo I. A. Heterotrímero mostrando um aminoácido de glicina a cada terceira posição no domínio da tríplice hélice. Todos os resíduos de glicina estão voltados para o interior da hélice, enquanto os radicais dos outros aminoácidos estão voltados para as porções exteriores da proteína. B. Detalhe da triple hélice com duas subunidades α1 e uma subunidade α2. Os radicais H+ da glicina formam pontes de hidrogênio no interior da estrutura. C. Esquema simplificado da organização tridimensional do colágeno que garante sua função de sustentação mecânica e bioquímica de ossos e cartilagens.

Genes reguladores do colágeno

As alterações do processo pós-traducional do colágeno tipo I, na ausência de mutação dos genes ***COL1A1*** e ***COL1A2***, podem também causar OI. Os fenótipos de OI dos Tipos VII à XII foram relacionados com os genes que regulam a conformação tridimensional e o enovelamento correto da proteína madura do colágeno tipo I, assim como algumas chaperonas que auxiliam no processo de maturação proteica.

Um complexo proteico formado pelo produto dos genes ***CRTAP*** (MIM #605497, *cartilage associated protein*), ***LEPRE1*** (MIM #610339, *LEUCINE-AND*

PROLINE-ENRICHED PROTEOGLYCAN 1, que codifica a proteína *prolyl 3-hydroxylase-1*, abreviatura *P3H1*) e ***PPIB*** (MIM #123841, *peptidylprolyl isomerase B,* que transcreve a proteína ciclofilina B, ou *CYPB*), podem causar OI de herança recessiva (18). *Crtap* forma um complexo molecular com *P3H1* e *ciclofilina B* (no reticulo endoplasmático rugoso, numa proporção de 1:1:1) que faz com que o balanço de cargas do colágeno tipo I fique estável, permitindo a conformação correta da proteína. Mutações com perda de função em uma das três proteínas promovem uma falta de alvo de hidroxilização do resíduo P986 no domínio da tríplice hélice (posição 1164 calculando a partir do iniciador metionina na cadeia proα(1)I). A 3-prolil-hidroxilação desta prolina é uma das muitas modificações das cadeias proα que contribuem para a estrutura terciária, estabilidade, e secreção do procolágeno. A 4-hidroxilação da prolina é importante para estabilidade térmica da tríplice hélice enquanto hidroxilação da lisina e glicolização da hidroxilizina contribuem para o *crosslink* para a estabilidade das moléculas extracelularmente. Nas formas humanas de OI, mutações em homozigoze ou heterozigoze composta para ***CRTAP, LEPRE1*** e ***PPIB*** são associadas com modificações pós-traducionais das cadeias de colágeno tipo I sintetizados em culturas de fibroblastos *in vitro*, causando mobilidade diminuída em eletroforese. Apesar de todas as moléculas serem modificadas nos distúrbios recessivos, e metade ou três quartos afetados nos distúrbios dominantes, dependendo do gene em que a mutação ocorre, pode ser difícil distinguir a modificação do colágeno por mutações estruturais do gene do colágeno tipo I das mutações do complexo *CRTAP/LEPRE1/PPIB*, no nível fenotípico (19).

Mutações no gene ***CRATP*** estão relacionadas à OI tipo VII e OI Tipo IIB. Está localizado no cromossomo 3p22.3. É uma proteína de matriz extracelular, e possui seis transcritos, sendo que um não tem produtos de tradução. A proteína transcrita na matriz possui 46,5 KDa, com 401 aminoácidos de extensão e um mRNA de 6668 bases, e possui

sete exons (20). Até o momento, possui 29 mutações descritas no banco de dados, sendo 24 únicas. São 15 substituições (quatro silenciosas, três *missense*, três *nonsense*, três com *splice site* alternativo, uma com *frameshift* – substituição no intron duas bases adjacentes ao exon quatro, e dois outros tipos), e nove mutações que causam *frameshift*, sendo três duplicações, qautro deleções, e duas indels (inserções/deleções). Chang *et al.*, 2010 (21), inseriram transcritos normais de *CRTAP* e *P3H1* em células com mutação nestes dois genes e concluiu que estas duas proteínas são mutuamente estabilizadas no complexo prolyl-3-hidroxilação, o que pode levar a uma sobreposição dos fenótipos de OI VII e VIII.

As mutações do gene ***LEPRE1*** estão relacionadas à OI Tipo VIII, pertencente à família das prolil-hidroxilases de colágeno, necessários para a correta biossíntese, amadurecimento e montagem dos vários tipos de colágeno (22). Está localizado no lócus 1p34.2 e tem 15 exons. Apresenta três isoformas proteicas, a isoforma 1 de 736 aa e 83,4 KDa, a isoforma 2 de 363 aa e 41,2 KDa, e a isoforma 3 de 804 aa e 90,6 KDa, com mRNAs que variam de 2696 a 3115 bp. O gene contém 15 exons (23). Neste gene estão descritas 45 mutações, sendo 30 delas únicas. As mutações incluem 22 substituições (sete *nonsense*, cinco *missense*, uma variante de *UTR* - regiões não traduzidas do mRNA, 73pb depois do fim do exon 14 - sete *splices* alternativo e duas silenciosas), além de cinco deleções, duas duplicações e um *indel* causando *frameshift*.

O gene ***PPIB*** mutado leva ao fenótipo de OI Tipo IX. Está localizado no cromossomo 15q22.31, e tem cinco exons. Apresenta função PPIase (*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*), além de função imunossupressora (*CYPB* se liga com grande afinidade à droga ciclosporina A [CsA], que bloqueia a ativação das células T *helper* antes da transcrição de genes das citocinas). A função PPIase pode ser bloqueada com CsA (24). A proteína contem 216 aminoácidos com 23,7 KDa, e um mRNA de 1045bp. Foram descritas

11 mutações únicas, entre oito substituições (três silenciosas, três *missense*, uma *nonsense*, e uma com *Splice site*), além de três deleções causando *frameshift*.

O gene ***FKBP10*** (MIM #607063, *FK506-binding protein 10*) faz parte da família das *FK506-binding proteins* (*FKBPs*) e está relacionado com a OI tipo VI. Está localizado no lócus 17q21.2, e contém 10 exons. Todos os membros desta família tem atividade PPIase, e agem como chaperonas. A *FBPK10* contém quatro domínios consecutivos de PPIases (25). Tem um papel fundamental na integridade final da tríplice hélice, pois a interação desta proteína com o colágeno confere maior estabilidade contra proteinases que clivam os colágenos (26). A proteína tem 582 aa e 62,4 KDa com um mRNA de 2888pb. Foram descritas 18 mutações, sendo 13 únicas. Entre elas as mutações que causam *frameshift* (quatro duplicações e três deleções), e substituições (duas silenciosas, duas *missense*, uma *nonsense* e um *splice site*). Alem de OI, este gene está relacionado à síndrome de Bruck (27).

O gene ***SERPINH1*** (MIM #600943, *serpin peptidase inhibitor, clade H, member 1*), localizada no lócus 11q13.5, codifica a proteína *CPB2* (*collagen-binding protein*), ou *HSP47* (*heat-shock protein 47*), está relacionado ao fenótipo de OI tipo X. É um tipo específico de glicoproteína que se liga ao colágeno tipo I, tipo IV e gelatinas (família das coliginas). São caracterizadas por uma estrutura que inclui uma sequência-sinal N-terminal hidrofóbica e dois sítios de ligação de oligossacarídeos (28). O gene contém aproximadamente 11Kb de extensão e cinco exons. A proteína contém 418 aminoácidos (29). Christiansen *et al*., 2010 (30), relacionaram mutações no gene com OI grave, com produção e estrutura do pró-colágeno afetados. O gene tem um papel crítico na integridade final da tríplice hélice, e a falta da proteína normal faz com que a fibra de colágeno seja

mais suscetível às proteases citoplasmáticas, além de diminuir a estabilidade térmica e o enovelamento adequado. Existem sete mutações descritas para ***SERPINH1***, todas substituições, sendo duas *missense* e cinco silenciosas.

O gene ***SP7*** (MIM #606633, *specificity protein 7,* sinônimo de *OSTERIX*, ou *OSX*) codifica uma proteína que é um fator de transcrição *zinc finger*, do tipo C2H2, da família SP, e é um dos principais reguladores da diferenciação das células ósseas. O gene está localizado no lócus 12q13.13, contém dois exons, sendo que o exon 1 codifica os primeiros sete aminoácidos, e o exon dois contém o restante da ORF e a sequência 3'-UTR. A proteína contém 431 resíduos de aminoácidos e tem a massa molecular de 45 KDa. A porção N-terminal é rica em prolina, e a porção C-terminal tem três domínios *C2H2 zinc finger* consecutivos. A presença deste domínio rico em prolina distingue esta proteína das outras da mesma família SP, que são ricas em glicina (31). Está relacionada à OI Tipo XI. A hiper-expressão da proteína *Nfatc1* (MIM #600489, *nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1*) estimula a ativação do promotor Osx-dependente do gene ***COL1A1***, em ratos. Foi detectado um complexo Nfat/Osx que se liga ao DNA na região que contém um sítio de ligação de proteínas da família *SP*, e a função cooperativa dos genes é o controle osteoblático da formação óssea (32). Uma única deleção foi descrita neste gene, levando a um fenótipo de OI de herança recessiva, por perda dos domínios *zinc finger*. Este novo lócus no espectro de genes associados com OI se dá pelo fato que ***SP7*** tem um papel fundamental no desenvolvimento ósseo, porém ainda não completamente entendido (33).

O gene ***SERPINF1*** (OMIM# 172860, *Serpin Peptidase Inhibitor, Clade F, Member 1*) codifica a proteína *Pigment Epithelium-derived Factor, PEDF*, e está localizado

no cromossomo 17p13.3. É membro da família *serpin*, um grupo de inibidores de protease. Steele *et al.*, 1993 (34) descreveram sua atividade neurotrófica em retinoblastomas, um tipo de célula neoplástica dos retinoblastos. *PEDF* induz diferenciação neuronal nestas células, sendo secretado na matriz interfotoreceptora e influencia o desenvolvimento e diferenciação neural da retina. *In vitro*, PEDF inibe a migração celular endotelial e fatores de crescimento de fibroblastos. Volpert *et al.*, 2002 (35) descreveram mobilidade normal de colágeno em SDS-page, não tendo o mesmo efeito que os genes PPIB, CRTAP e LEPRE1. O entendimento do mecanismo molecular não está completamente elucidado, porém o gene é expresso em vários tecidos fetais e adultos, como medula óssea, pulmão, cérebro, fígado e olhos (36). Como proteína secretada, *PEDF* acumula na matriz extracelular e se liga, entre outras proteínas, ao colágeno tipo I (37). Becker *et al.*, 2011 (38), que associaram o gene mutado à OI tipo XII, acharam inesperado que a perda de *PEDF* leve a uma OI grave, pois modelos animais não apresentam fenótipos aparentes em ossos, mas anormalidades vascular e epitelial. Discutem que o *splicing* encontrado, entre os exons dois e sete produza uma forma de proteína com função residual que seja essencial ao osso. Porém Tombran-Tink *et al.*, 2004 (39), e Quan *et al.*, 2005 (40) demonstraram que este gene pode ter função de maturação de células ósseas em experimento com animais murinos, onde são expressos em osteoblastos, osteoclastos e condrócitos e agem como inibidor da reabsorção óssea. A proteína tem 418 aa e 46,3 KDa, com um mRNA de 1552 pb e contém oito exons. Foram descritas seis mutações, sendo duas duplicações, uma deleção e três substituições *nonsense*.

O gene ***BMP1*** (OMIM# 112264, *Bone Morphogenetic Protein 1* ou *Tolloid Drosophila Homolog*, *TLD*), localizado no lócus 8p21.3, foi recentemente associado à OI tipo III (41). Faz parte da família de metaloproteases (enzimas que utilizam um metal no

mecanismo catalítico, e são inativadas por quelantes de metais), relacionadas com o padrão embrionário em diversas espécies. Contém principalmente um domínio protease *astacin-like*, alguns domínios *CUB protein-protein interaction* e *EGF motifs* (*motifs* são porções da proteína que se enovelam independentemente e possuem função própria e específica). Apresenta 22 exons, e possui sete isoformas, causadas por mecanismo de *splicing* alternativo em diferentes tecidos, com a proteína variando de 302 a 986 aa. (42). *BMP1/TLD* processa procolágenos na região C-propeptídeo, e cordina (OMIM# 603475, *Chordin*, ou *CHRD*). Scott *et al.*, 1999 (43) compararam a atividade enzimática das proteases *BMP1/TLD* e outras *BMP1/TLD-like*, e descreveram diferenças na habilidade de processar os precursores das fibrilas de colágeno, sugerindo que a proteína seja antagonista da cordina no desenvolvimento embrionário inicial de mamíferos e na esqueletogênese pré e pós-natal. Foi descrita apenas uma substituição *missense* no gene, em um paciente egípcio com OI tipo III.

Com exceção de ***SERPINF1***, cujo mecanismo patológico-molecular ainda não foi completamente entendido, os outros genes OI-AR (autossômicos recessivos) identificados até o momento estão envolvidos na síntese, modificação pós-traducional e secreção do colágeno tipo I na matriz extracelular.

Atualmente, com o melhor estudo clínico e genético da doença, as características de cada subtipo foram mais bem definidas, assim como a classificação de outros tipos 'novos' de OI (Tabela 1). Grupos de pacientes inicialmente classificados como os tipos clássicos de OI apresentavam características clínicas e histológicas únicas. Estas novas formas foram renomeadas de acordo com o gene relacionado com OI, descritos abaixo. Nas formas descritas recentemente, as mutações não estão associados aos genes do

colágeno tipo I, mas em seus genes reguladores ou chaperonas (Tabela 1). Representam em sua maioria casos raros que resultam de uma herança autossômica recessiva enquanto alguns são resultado de mosaicismo de um dos pais que tem ausência ou apresenta pouca anormalidade clínica (44). O prognóstico da doença é influenciado principalmente pelo nível de fragilidade óssea, que aumenta nos tipos de OI segundo a ordem: Tipo I < Tipos IV, V, VI < Tipos III, VII, VIII < Tipo II (45).

O tratamento da doença é definido com base na sua gravidade e no estado clínico e idade do paciente. Deve proporcionar as funções vitais básicas, e a realização de atividades cotidianas, como deambular, estudar, trabalhar, entre outros, o maior tempo possível. São três situações e tratamentos recomendados. O primeiro tipo de tratamento é referente à OI de forma leve, cujos objetivos são aumento da densidade óssea, aumento da síntese de colágeno e a possibilidade de uma vida 'normal'. Para atingi-los são indicados hormônio de crescimento (GH), e tratamento com biofosfonato (análogo aos pirofosfatos, possibilita a inclusão de cristais de hidroxiapatita na matriz óssea de forma rápida e duradoura). A ingestão de vitamina D e cálcio deve ser aumentada ou corrigida de acordo com os dados bioquímicos do paciente. Este deve ser estimulado a ter uma vida normal, tanto escolar quanto socialmente. O segundo tipo de tratamento é referente às formas moderadas, cujos objetivos são autonomia, diminuição da fragilidade óssea e da frequência de fraturas. Para isso, recomenda-se uso de cadeira de rodas e fisioterapia nos casos graves, tratamento com biofosfonato, intervenção cirúrgica e uso controlado de GH. Na terceira situação, referente aos casos letais, os objetivos são permitir a sobrevivência no período pós-nascimento, reduzir as fraturas perinatais e a insuficiência respiratória. São recomendados aconselhamento genético, orientações pré-natais sobre alimentação e

cuidados básicos, antibióticos para infecções nas vias respiratórias e uso de equipamentos para respiração artificial (45).

Outra forma de tratamento que pode vir a ser possível no futuro é a terapia gênica (46). Os pesquisadores usaram vetores AAV (*adeno-associated virus vectors*) para desfazer o efeito dominante negativo de ***COL1A1*** em culturas de células tronco mesenquimais da medula em indivíduos com OI. Embora a porcentagem de *'targeting'* seja alta, e as células com neo DNA inserido tenham boa sobrevida, há cuidados a serem tomados, quanto ao crescimento anormal oncológico das células transfectadas, por terem vantagens de crescimento em relação às células com o gene mutado, e fibrilas de colágeno que não se misturam ao colágeno das células do organismo. Outro problema poderia ser a formação de novos produtos gênicos do gene inserido, como *splicings* alternativos e regulação diferenciada.

Base molecular da doença

A OI se manifesta basicamente por quatro vias moleculares conhecidas (Figura 3). Assumindo que uma mutação pontual seja transcrita em um mRNa mutante e traduzida em uma cadeia polipeptídica com mudança de um resíduo de aminoácido, e que esta cadeia forme uma tríplice hélice que seja incorporada à ME, podem ocorrer as seguintes situações:

1. Degradação proteossomal, onde um complexo enzimático degrada as fibrilas mutantes não incorporadas à tríplice hélice;
2. Autofagia, quando as tríplice hélices com uma ou mais cadeias polipeptídicas mutantes são autodigeridas pela célula em organelas membranosas, e seus aminoácidos reutilizados em outras reações metabólicas celulares;

3. Degradação intracelular de via desconhecida, que ocorre no citoplasma, sem envolvimento de organelas, por enzimas inespecíficas;
4. Atraso da montagem do heterotrímero por causa da incorporação das proteínas mutantes com excesso de modificações pós-traducionais, com consequente processamento, incorporação e secreção das fibrilas mutantes na ME, resultando em desorganização do tecido.

Estas vias geram posteriormente três consequências biológicas para o tecido ósseo. A primeira é a ligação ineficiente entre moléculas de colágeno maduras e entre colágenos e proteínas não colágenas (PNC), tornando o tecido conjuntivo mais frouxo com perda de função sustentatória. A segunda consequência é a falta de sítios de ligação dos cristais de hidroxipatita à matriz do osso, fazendo com que o órgão tenha baixa mineralização, córtex mais delgado e estrutura geral mais fraca. A terceira consequência é a perda da eficiência da comunicação bioquímica entre as células e entre as células e a matriz óssea, todas feitas via colágeno. As principais células presentes no osso são os osteoclastos, osteoblastos e os osteócitos, todas com sítios de ligação para colágeno tipo I. Cada um destes eventos, isolados ou concomitantes, geram no final do processo um órgão ósseo mais frágil e suscetível à fraturas e deformidades.

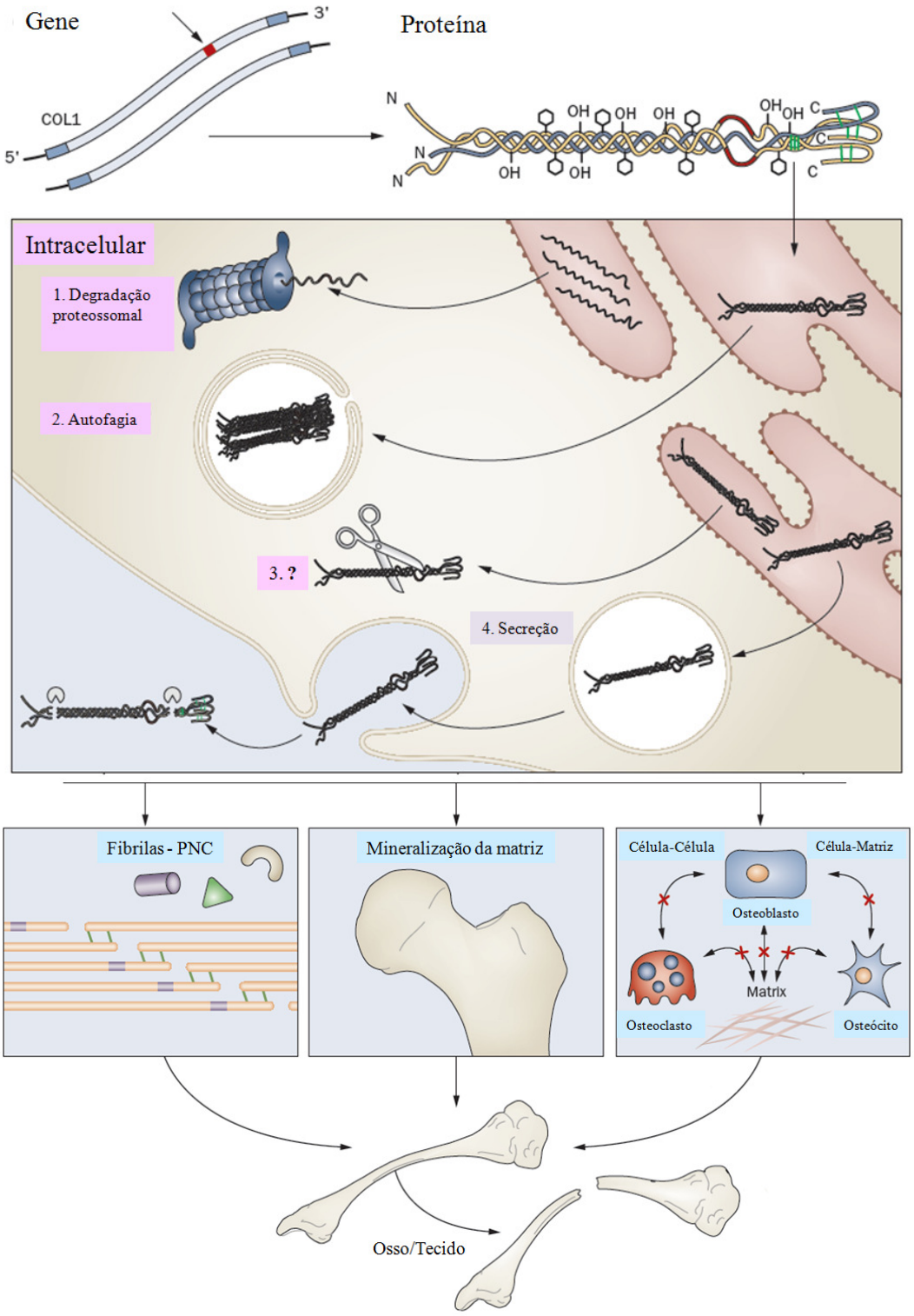


Figura 3. Potenciais vias moleculares que causam a OI são degradação proteossomal, autofagia ou a incorporação das cadeias mutantes na ME. As consequências funcionais e bioquímicas são a ligação mais frouxa entre as cadeias de colágeno, baixa mineralização da matriz óssea e comunicação entre as células entre si e a matriz extracelular. Figura adaptada de Forlino et al., 2011 (47).

Tabela 1. Resumo dos tipos de OI segundo gravidade clínica, herança e lócus nos cromossomos.

Tipo	Gravidade clínica	Tipo de herança	Características Típicas	Mutações associadas	Lócus
Tipos clássicos de Sillence					
I	OI leve não deformante	Autossômica dominante	Estatura alta ou levemente baixa, esclera azulada, sem DI	Stop códon prematuro em ***COL1A1***, mutação em ***COL1A2***	17q21.31-q22, 7q22.1 e possivelmente outros
II	Perinatal Letal	Autossômica dominante e raramente autossômico recessivo	Múltiplas faturas nos ossos longos durante o nascimento, deformidades nítidas, esclera escura, ossos longos abaulados	Substituição de glicina em ***COL1A1*** ou ***COL1A2*** (IIA), mutação em ***CRTAP*** (IIB), ou mutações no domínio C-propeptídeo de ***COL1A1*** (IIC)	IIA:17q21.31-q22, 7q22.1 IIB:3p24.1-p22 IIC: 17q21.31-q22
III	Deformidade grave	Autossômica dominante e raramente autossômico recessivo	Estatura baixa, face triangular, escoliose grave, esclera cinza, DI	Substituição de glicina em ***COL1A1*** ou ***COL1A2***, mutação em ***BMP1***	17q21.31-q22, 7q22.1, 8p21.3
IV	Deformidade moderada	Autossômica dominante	Baixa estatura, escoliose de leve a moderada, esclera cinza ou branca, DI	Substituição de glicina em ***COL1A1*** ou ***COL1A2***	17q21.31-q22, 7q22.1
Etiologia desconhecida					
V	Deformidade moderada	Autossômica dominante	Estatura de baixa a moderada, membrana interóssea mineralizada entre rádio e ulna, calo hiperplásico, histologia desorganizada	Desconhecido	-
Defeitos de mineralização					
VI	Deformidade moderada a grave	Autossômica recessiva	Estatura baixa, escoliose, acúmulo de osteóides no tecido ósseo, padrão de lamelação 'espinha-de-peixe', mineralização deficiente	Mutação em ***FKBP10***	17q21
Defeitos na 3-hidroxilação					
VII	Deformidade moderada	Autossômica recessiva	Estatura baixa, úmero e fêmur curtos, coxa vara	Mutação em ***CRTAP***	3p22, 3p24.1-p22

VIII	Perinatal letal	Autossômica recessiva	Osteoporose grave, ossos longos encurtados, baixa mineralização óssea	Mutação em ***LEPRE1***	1p34
IX	Perinatal letal ou deformidade grave	Autossômica recessiva	Múltiplas fraturas em ossos longos, esclera cinza, fêmures encurtados e hipermobilidade das articulações	Mutação em ***PPIB***	15q21-q22
Defeitos em chaperonas					
X	Deformidade grave a letal	Autossômica recessiva	Deformidade grave, face triangular, esclera azul, fraturas em membros e ossos longos, osteopenia, DI	Mutação em ***SERPINH1***	11q13.5
XI	Deformidade leve a moderada	Autossômica recessiva	Fraturas recorrentes, deformações leves, osteoporose, atraso na erupção de dentes	Mutação em ***SP7***	12q13.13
XII	Deformidade grave	Autossômica recessiva	Fraturas em ossos longos, grave compressão vertebral nos primeiros dias de vida, baixa estatura e baixa densidade mineral óssea	Mutação em ***SERPINF1***	17p13.3
Osteogênese imperfeita sem classificação ou doenças baseadas em defeitos do colágeno					
Síndrome de Bruck tipo 2	Deformidade moderada	Autossômica recessiva	Contraturas nas articulações, com as mesmas limitadas, hérnia inguinal bilateral	Mutações em ***PLOD2***	3q24
Doença de Caffey	Leve a letal	Autossômica dominante	Hiperosteose (hipertrofia óssea) cortical pré-natal	Mutação em ***COL1A1***	17q21.33
Síndrome de Ehlers-Danlos	Variado	Autossômico recessivo ou dominante	Hiperxtensibilidade da pele, hipermobilidade articular, fragilidade do tecido conjuntivo	Mutação em ***COL1A1***, ***COL1A2***, ***COL3A1***, ***COL5A1***, ***COL5A2***, ***PLOD1***, ***PLOD3***, ***TNXB***	Vários

Tipos de OI

OI tipo I

Este fenótipo é produzido por *stop* códon prematuro em ***COL1A1***, mutação em ***COL1A2*** e possivelmente em outros genes. Hartikka *et al*.(48) observaram que pacientes com OI tipo I com mutação em ***COL1A2*** tendem a ter uma estatura mais baixa que os que têm mutação em ***COL1A1***, enquanto estes têm uma frequência maior de esclera azulada. A OI tipo I é caracterizada principalmente por fragilidade óssea e esclera azulada. As mutações dos genes normalmente levam a uma redução da quantidade de colágeno tipo I normal secretada pelos fibroblastos. Outros problemas que os pacientes com OI tipo I podem desenvolver são os problemas cardíacos, causados por prolapso da valva mitral, regurgitação mitral, e regurgitação aórtica causada por diâmetro aumentado da aorta (49-50), perda auditiva durante a segunda década de vida ocasionada pela perda condutiva (51-52), perda significativa da elasticidade, distensibilidade e histerese (tensibilidade) da pele (53) e estrutura craniofacial menor devido a uma deficiência geral de crescimento, porém sem deformação (54). Foi sugerido que a OI tipo I fosse subclassificada em tipo IA e IB, com base na presença ou ausência de dentinogênese imperfeita (55), porém a DI é incomum entre indivíduos com OI tipo I, mesmo nas formas mais leves. Esta tentativa de divisão na verdade reflete a dificuldade em distinguir a esclera azul da OI tipo I da esclera azul-cinzenta da OI tipo IV. Apesar de esta subdivisão existir, inclusive para os outros tipos de OI, ela não é largamente utilizada.

OI Tipo II

Este é o fenótipo mais grave da doença, o perinatal letal. É caracterizado por fragilidade óssea, com várias fraturas perinatais, encurvamento dos ossos longos, baixa

mineralização óssea, e morte no período perinatal por problemas respiratórios, devido ao rompimento das costelas no ato da respiração do recém-nascido (56). A OI Tipo IIA é a forma autossômica dominante causada por mutação em ***COL1A1*** ou ***COL1A2***. A OI Tipo IIB é a forma autossômica recessiva e é causada pela mutação do gene ***CRTAP***. O tipo IIC é autossômico dominante, causado por mutações no domínio C-propeptídeo de ***COL1A1*** (57). Morfologicamente, a OI congênita se apresenta em duas formas: a de ossos finos e o tipo *'broad-bone'* (58). As mutações provocam mudanças basofílicas e mucóides no tecido conjuntivo das válvulas coronárias e da aorta, bem como coarctação da aorta (estreitamento da aorta que dificulta a irrigação das partes inferiores, assim, as artérias torácicas internas e as intercostais anteriores e posteriores - ramos diretos da aorta - se anastomosam para manter a circulação nas porções inferiores do corpo). Geralmente há anormalidade dentária quando visualizado na microscopia eletrônica, e neste ponto alguns autores demonstram a heterogeneidade deste tipo, sugerindo semelhanças com a OI tipo III (59). Bioquimicamente, a OI tipo II pode ser caracterizada por aumento do conteúdo de hidroxilisina, tanto no osso como na cartilagem, com aumento proporcional de ligações covalentes entre glicose e galactose (60). Bodian *et al.*, 2009 (61) fizeram estudos moleculares que sugerem que a prevalência de mutações recessivas em ***CRTAP*** é de 5% na OI grave/letal. Muller-Hermelink *et al.*, 1982 (62) e Steinmann *et al.*, 1984 (63) estudaram material de pacientes com OI Tipo II e descobriram em alguns casos, culturas de fibroblastos onde a mutação incorpora cisteínas, a formação de pontes dissulfeto inviabiliza a formação da tríplice hélice, fazendo com que a proteína não seja funcional, quando ocorre a incorporação de 1 ou 2 cadeias pro-alfa mutadas. Cohn *et al.*, 1986 (64) descreveram um caso em que a ruptura do padrão (Gly-X-Y)n por substituição de uma glicina por uma cisteína causou o fenótipo letal, e este estudo estabeleceu a mutação mínima capaz de

provocar um fenótipo letal, o que indica que há mecanismos que mantêm fortemente esta estrutura de códons específicos no gene. A alta prevalência da OI Tipo II (1 a cada 60000 nascimentos) pode ser explicada pelo fato de esta alteração ser na maioria mais dominante que os outros tipos. O gene ***COL1A1*** é o maior alvo de potenciais mutações letais, pois a mudança nas duas posições iniciais da repetição da sequencia de nucleotídeos GGN-NNN-NNN, que codifica a tríplice hélice, é letal se ocorrer nas regiões do gene que codificam a metade carboxi-terminal da tríplice hélice (62). A maioria dos casos novos de OI tipo II são resultado de novas mutações dominantes, sem efeito de idade parental elevada (65). Em alguns casos, existem evidencias de que mosaicismo gonadal materno seja responsável por este tipo de OI (66).

OI Tipo III

O tipo III clássico de OI descrito por Sillence *et al.*, 1979 (6) na Austrália é a forma dominante com esclera azul, deformidade progressiva nos membros na infância e na coluna entre o fim da infância e o começo da adolescência. A tonalidade da esclera, que pode ser clara ao nascer, tem a possibilidade de se normalizar com a idade. A DI é comum, principalmente na dentição primária. Foram descritos pacientes que apresentam calcificação '*popcorn*' nas placas de crescimento, quando submetidos à radiografia, sendo, portanto, um tipo heterogêneo (67). Um estudo de síntese de procolágeno nos paciente com OI tipo III demonstrou que a migração em eletroforese do procolágeno nesta população é lenta. Quando no meio de cultura, estas moléculas formam agregados insolúveis e não realizam a função de sustentação, devido a uma mudança na região carboxi-terminal, sítio de localização da manose, o que pode alterar a glicolização da proteína (68). Este tipo é relativamente comum na população negra da África do Sul, não sendo limitado às

populações tribais (69). Estudos de pessoas com deficiência física no continente africano identificaram 58 pacientes subdiagnosticados com OI, sendo 42 do tipo III, no Zimbábue. Este fato pode ser explicado devido ao fato de que duas das principais tribos do país estão separadas geograficamente por dois milênios, porém seus fundadores são relacionados. Esta mutação que leva a este fenótipo específico ocorreu 2000 anos atrás e se espalhou pela população das tribos (70-71). Na OI tipo III, mutações em ***COL1A2*** determinam um risco maior de desenvolvimento anormal do pulmão e hemorragia intercranial (72). Recentemente um novo gene foi associado à OI tipo III, ***BMP1*** (OMIM# 112264), em uma família egípcia consanguínea. A proteína transcrita por este gene, e sua isoforma mais longa, *mTLD*, são proteases que estão envolvidas na clivagem da região C-propeptídeo dos colágenos tipo I, II, III e V e ativação da enzima *lysil-oxidase-zymogen* (***LOX***, OMIM# 153455) (73). ***LOX*** é uma enzima extracelular que usa cobre como um cofator na sua catálise, e tem como função a iniciação dos *crosslinks* nos colágenos citados acima (74). Este novo lócus responsável pelo fenótipo de OI tipo III foi descoberto por hibridização por *array* de DNA (41).

OI Tipo IV

É o tipo mais heterogêneo de OI. Algumas características evoluem ao longo dos anos nos pacientes, como modificações graves nos ossos longos, com melhora durante o desenvolvimento, e esclera azul, apesar da classificação de Sillence determinar que a OI Tipo IV tenha esclera normal (75). A presença de esclera azul é corroborado por Bauze *et al.*, 1975 (76) e Francis *et al.*, (77), que definem os casos em OI de 'olho branco' e OI de 'olho azul', sendo também apoiado por dados bioquímicos. A esclera azul pode ocorrer em cerca de 10% dos pacientes com OI Tipo IV, além de outros problemas, como pulmões

levemente menores, malformações angulares no fêmur, esquimoses, fraturas ósseas variando de nenhuma até poucas fraturas ao ano, espondilolistese lombar (escorregamento de uma vértebra sobre a próxima), DI em alguns casos (78). Estudos bioquímicos em culturas de fibroblastos de um paciente com OI tipo IV mostram que são sintetizadas duas subpopulações distintas de moléculas de procolágeno tipo I, apesar de a quantidade de procolágeno e a razão das cadeias alfa-1 e alfa-2 serem normais. A diferença se deve ao excesso de modificações pós-traducionais, com a incorporação de uma cadeia alfa-1 defeituosa na tríplice hélice (79).

Recentemente uma variante, OI IVB, foi descrita em uma mulher de 35 anos e em dois de seus filhos. A família foi inicialmente diagnosticada com displasia cifomélica (OMIM#212350), doença congênita rara caracterizada por uma associação variável de anormalidades esqueléticas como ossos abaulados e frágeis, alterações na pelve, ossos longos afetados, porém com desenvolvimento mental normal. Porém análises moleculares determinaram mutação em ***COL1A2***. As características são diminuição dos pulmões, malformações angulares de fêmur ao nascer, esclera azul-clara, poucas fraturas, e espondilolistese lombar (78).

OI Tipo V

É uma forma autossômica dominante da doença. Ainda não foi definido um lócus para este tipo de OI, porém não há nenhuma alteração nos genes ***COL1A1*** e ***COL1A2*** nestes pacientes. Apresenta características moleculares, histológicas e clínicas distintas das OI de Sillence. É moderadamente deformante, apresentando fragilidade de ossos longos e corpos vertebrais de moderada a grave. Todos os sete pacientes descritos tiveram fraturas no primeiro ano de vida e história de fraturas frequentes. Não apresentam esclera azul ou

DI. As radiografias apresentam três características: formação de calo hiperplásico nos pontos fraturados, calcificação da membrana interóssea entre o rádio e a ulna, além de presença de uma banda metafisária radio-opaca adjacente às placas de crescimento. Todos apresentam limitação na pronação/supinação em um ou nos dois antebraços, devido à calcificação da membrana interóssea. A histologia do osso ilíaco mostrou que a lamela é desorganizada num padrão reticular, e os marcadores bioquímicos ósseos estão geralmente fora dos padrões de referência, porém os níveis de excreção urinária de fosfatase alcalina e do segmento N-telopeptídico do colágeno tipo I aumentam durante os períodos de formação de calos hiperplásicos (80). Esta excreção é diminuída com o tratamento com pamidronato em 50% dos níveis anteriores ao tratamento. A densidade mineral volumétrica e o tamanho das vértebras lombares são aumentados, a incidência de fratura diminui, e a deambulação melhora em alguns casos, demonstrando que o tratamento com pamidronato tem efeito similar tanto em OI tipo V quanto nos outros tipos de OI (81).

OI Tipo VI

É uma forma autossômica recessiva primeiramente descrita por Glorieux *et al.*, 2002 (82). É causada pela mutação no gene ***FKBP10*** (OMIM#607083), que tem função petidil-prolil cis/trans isomerase (*PPIase*), e age como chaperona. É caracterizada por aumento dos níveis de fosfatase alcalina (ALP) no soro, e padrão lamelar em espinha de peixe (83). A nova forma da doença foi descrita em oito pacientes, todos diagnosticados anteriormente com OI Tipo IV. Nenhum apresentou fraturas no nascimento, somente a partir dos quatro aos 18 meses. Apresentam fraturas mais frequentes que pacientes OI Tipo I, o que leva à deformação dos ossos longos. Apresentam ligamentos frouxos, esclera branca ou azul claro, sem DI. Dados radiológicos mostram deformação óssea, coxa vara,

protrusão acetabular e vértebras bicôncavas. A histologia do osso mostra o padrão lamelar em espinha de peixe, e presença excessiva de osteóides. As cinco famílias consangüíneas da Turquia estudadas apresentam este tipo de OI com deformação óssea progressiva juntamente com epidermólise bolhosa simples, sem DI e com padrão lamelar em 'espinha de peixe', e níveis séricos elevados de ALP. O padrão autossômico recessivo foi demonstrado pelas mutações homozigotas no gene encontrados nos membros afetados desta família (26). Pacientes com OI tipo VI podem ter contraturas nas articulações, principalmente cotovelo, joelho e tornozelos (27).

OI Tipo VII

É uma forma autossômica recessiva da doença, caracterizada pela mutação no gene ***CRTAP*** (OMIM# 605497) (84). Este gene faz parte do trímero que forma o complexo CRTAP/LEPREI/PPIB que promove a 3-prolil-hidroxilação do resíduo de prolina na posição 986 (P986) nas cadeias alfa-1 do colágeno tipo I e tipo II (85). A mutação deste gene também leva à OI letal Tipo IIB. Foi inicialmente descrita em quatro crianças e quatro adultos canadenses da mesma família, em duas gerações. Os afetados apresentaram múltiplas fraturas no nascimento, e fraturas recorrentes na infância, diminuindo na puberdade. A esclera se apresenta levemente azulada, e deformidades ósseas progressivas levaram à baixa estatura. Não apresentam DI, porém radiografias mostram rizomelia (encurtamento da porção proximal dos membros) e coxa vara (a diminuição do ângulo cérvico-diafisário em torno de 135º a 148º graus) em todos os pacientes (86). Na OI tipo VII, os pacientes apresentam mutações que anulam o gene em ambos os alelos, além de diminuição nos níveis de mRNA e proteína de CRTAP, além de colágeno tipo I com pouca

3-prolil-hidroxilação. Este colágeno tem sua estrutura normal, porém na região alfa-hélice tem excesso de modificações pós-traducionais (56).

OI Tipo VIII

É uma forma autossômica recessiva, causada pela mutação do gene ***LEPREI*** (OMIM# 610339), que codifica a proteína *Prolyl 3-hydroxylase 1 (P3H1)*. Forma o complexo CRTAP/LEPREI/PPIB que promove a 3-prolil-hidroxilação do resíduo P896 na tríplice hélice do colágeno tipo I. É uma forma letal da doença, caracterizada por esclera branca, deficiência grave de crescimento, baixa mineralização esquelética e metáfise bulbosa. A OI tipo VIII tem características que se sobrepõe às OI Tipo IIB e III de Sillence, porém sem alterações no gene do colágeno, como osteoporose grave, ossos longos encurtados, crânio fino e fontanela ampla, face redonda, e tórax em formato de barril. Radiografias pré-natais mostram costelas e ossos longos com baixa mineralização. Apresentam múltiplas faturas no nascimento, e os pacientes sobreviventes mostram metáfise bulbosa e matriz desorganizada, falanges longas, metacarpos encurtados, e densidade óssea baixa (87). Os loci ***COL1A1*** e ***COL1A2*** foram excluídos como *site* de mutação deste tipo de OI, porém sem estudos para determinação de defeitos na síntese, estrutura, conformação ou secreção do colágeno tipo I (88).

OI Tipo IX

A OI tipo IX tem características que se sobrepõe às OI Tipo IIB e III de Sillence, assim como a OI tipo VIII. O gene envolvido é o ***PPIB*** (OMIM# 123841), que codifica a proteína *ciclofilina B (CYPB)*, que juntamente com as proteínas *CRTAP* e *P3H1* formam o complexo modificador do colágeno. Mutações *nonsense* ou deleções neste gene foram descritos como causadores da doença (89). Na OI tipo IX, a porcentagem de resíduos

P986 3-prolil-hidroxilados é diminuída, porém é maior do que em pacientes com mutações em ***CRTAP*** ou ***LEPREI***. A OI tipo IX é causada pela perda de função do complexo ***CRTAP/LEPREI/PPIB*** e consequente deficiência de 3-prolil-hidroxilação nas cadeias alfa-1 do colágeno tipo I. As características clínicas são ausência de fraturas nas costelas, e ossos longos encurtados, fraturados e curvos, sem rizomelia. Em radiografias e autópsias em fetos de 16 e 22 semanas de gestação, a circunferência do crânio e o peso são normais para a idade, semelhante ao diagnostico de OI Tipo II. Em outro estudo, os pacientes estudados são dois irmãos de casamento consanguíneo de família paquistanesa, que apresentam múltiplas fraturas de ossos longos, crânio grande com fontanela anterior grande, esclera acinzentada e quadris flexionados e abduzidos, fêmures encurtados, hipermobilidade das articulações, consistentes com o diagnostico de OI Tipo III (89-90). Em outra família de Senegal, foi descrita uma mutação *missense* homozigota em ***PPIB*** em dois irmãos com OI. O colágeno e a 3-prolil-hidroxilação são normais, sugerindo que o gene não é a única peptidil-prolil cis-trans isomerase que catalisa a hidroxilação do colágeno maduro. As características destes pacientes são ausência de rizomelia e deformação em ossos longos, com deficiência no crescimento axial dos ossos, porém com comprimento e proporções corporais normais para a idade, sendo que um dos irmãos apresenta anemia falciforme (90).

OI tipo X

É uma forma autossômica recessiva da doença. Causada por mutação no gene ***SERPINH1*** (OMIM# 600943). Foi descrita pela primeira vez em uma criança de pais consanguíneos da Arábia Saudita, com vários outros irmãos normais. Apresenta face triangular, macrocefalia, esclera azulada, micrognatia (mandíbula subdimensionada),

membros pequenos e coxa curvada. Radiografias mostram costelas com baixa mineralização com fraturas cicatrizadas e osteopenia. Com um ano, apresentou cálculos renais bilaterais causando obstrução da junção pelviurética, ocasionando perda da função renal. Também tinha doença pulmonária crônica sem etiologia definida, e apresentava dentes pequenos e opalescentes, consistentes com DI. O paciente estudado morreu aos três anos e seis meses por parada respiratória (30). Este tipo constitui aproximadamente 4% dos casos de OI, e a localização do lócus para este fenótipo foi feita por genotipagem de DNA por mapeamento em chip, com posterior screening do gene por PCR (91) e *'next-generation sequencing'* (sequenciamento do exoma) em outro estudo (38).

OI tipo XI

Esta é uma forma autossômica recessiva da doença, causada por mutação no gene ***SP7*** (OMIM# 606633), caracterizada por fraturas recorrentes, deformações leves em ossos longos, osteoporose, atraso na erupção dos dentes, sem DI, esclera e audição normais. Foi inicialmente descrito numa criança egípcia com pais consanguíneos, com mutação em heterozigoze no gene. Pelo mapeamento das regiões com mutações em homozigoze, foram identificadas várias regiões candidatas, incluindo o cromossomo 12 onde está localizado o gene SP7**.** Devido a sua função de fator de transcrição específico de osteoblastos (92), este gene foi selecionado e sequenciado mostrando que sua mutação causava o fenótipo de OI tipo XI (33).

OI tipo XII

A OI tipo XII é uma forma grave autossômica recessiva, causada por mutação no gene ***SERPINF1*** (OMIM# 172860). Foi descrita em quatro pacientes de três famílias não aparentadas, classificados inicialmente como OI tipo III. Todos os indivíduos

apresentaram fraturas nos ossos longos e fraturas graves por compressão vertebral, com deformidades nos primeiros anos de vida. Tinham estatura baixa e se locomoviam com auxílio de cadeira de rodas. A localização do gene foi feita usando *'next-generation sequencing'* para identificar as regiões de mutação homozigota no exoma de um dos pacientes. O gene ***SERPINF1*** foi identificado, e também foi achado em outro irmão afetado em homozigose, além de duas irmãs não afetadas em heterozigose. A análise dos colágenos de cultura de fibroblastos não mostrou evidência de alteração na secreção ou no enovelamento, assim como em modificação pós-traducionais (38).

Outras doenças relacionadas com a OI (*OI-like*) ou decorrentes de defeitos de colágeno têm sua importância genética destacada nos últimos anos devido à associação de novos genes a estas condições, com o advento de novas tecnologias de sequenciamento de exoma, evidenciando o seu grau de heterogeneidade genética. Tais doenças são Síndrome de *Bruck* tipo 2 (OMIM# 609220), que envolve o gene ***PLOD2***, Doença de *Caffey* (OMIM# 114000), causado por mutações em ***COL1A1***, e a Síndrome de *Ehlers-Danlos* (OMIMs# Tipo I: 130000, Tipo II: 130010, Tipo III: 130020, Tipo IV: 130050, Tipo V: 305200, Tipo VI: 225400, Tipo VII recessivo: 225410, Tipo VII dominante: 130060, Tipo VII: 130080) que além dos genes do colágeno tipo I, ocorrem por mutação nos genes ***COL3A1*** (OMIM# 120880), ***COL5A1*** (OMIM# 120215), ***COL5A2*** (OMIM# 120190), ***PLOD1*** (OMIM# 153454), ***PLOD3*** (OMIM# 603066), e ***TNXB*** (OMIM# 600985).

Este trabalho complementa nossa compreensão das consequências funcionais dessas mutações, já que os estudos com descrição das mesmas mutações que encontramos neste trabalho não incluíam estudos funcionais da proteína mutante.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

✓ Caracterizar , do ponto de vista da genética molecular, os pacientes com OI e realizar análise funcional do colágeno tipo I nestes pacientes.

Objetivos específicos

✓ Investigar e determinar a presença de mutações nos genes ***COL1A1*** e ***COL1A2*** em pacientes com OI.

✓ Investigar o perfil de expressão dos genes ***COL1A1*** e ***COL1A2*** em pacientes com OI.

✓ Realizar análise funcional da proteína do colágeno tipo I em pacientes com OI.

✓ Nos pacientes em que mutações nos genes ***COL1A1*** e ***COL1A2*** forem descartadas, investigar a presença de mutações nos genes ***CRTAP, LEPRE1*** e ***PPIB***.

SUJEITOS E MÉTODOS

Pacientes e controles

Os pacientes e controles que concordaram em fazer parte do projeto assinaram o *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido* aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (CEP#391/2005). O material coletado está estocado no Laboratório de Endocrinologia Pediátrica do Centro de Investigação em Pediatria, onde este trabalho foi desenvolvido.

Os critérios de inclusão dos pacientes foram o diagnóstico de OI nos prontuários do Hospital das Clínicas da Unicamp de 2005 à 2009, e o consentimento dos pacientes e/ou responsáveis em participar da pesquisa e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido elaborado especificamente para este projeto e o aceite em fazer a biópsia para retirada de uma pequena porção de tecido epitelial.

O grupo controle é composto de quatro indivíduos. Os tecidos dos controles utilizados são descarte de postectomia de três crianças com idade em torno de oito anos (Controles 1, 2 e 3) e de uma cirurgia de redução de pálpebra, com doador com idade de 40 anos (Controle 4).

Família A

Probando A1. Sexo feminino, 43 anos, parda, procedente de Araguai – MG. OI tipo IV. A paciente tem como antecedente um tio paterno com OI. Tem altura de 152 cm, teve quatro fraturas de membros inferiores na infância, fraturou clavícula e pé em consequência de queda da própria altura, e recentemente teve fratura pélvica. Apresenta esclera azulada, DI, hipoacusia de condução (perda auditiva por problemas na condução do som do ouvido externo e médio para o ouvido interno), dores articulares e edemas nas pernas. Atualmente

em uso de alendronato e encaminhada para fisioterapia. Ao exame do aparelho locomotor, apresentou espessamento do tendão de Aquiles.

Probando A2. Sexo masculino, 13 anos, pardo, procedente de São Paulo – SP. OI tipo IV. Filho da paciente 1-A. Nasceu de parto cesariano por causa do diagnóstico pré-natal de OI. A DMO da coluna lombar revelou osteopenia, com perda de 27% da mineralização. O paciente tem esclera azulada, hipoacusia leve e DI, porém crescimento e desenvolvimento neuropsicomotor normais. Apresenta múltiplas fraturas em ossos, principalmente no pé. Tem *genu valgum* discreto (deformidade caracterizada por joelhos muito juntos um do outro, e os tornozelos afastados entre si), deformidade no cotovelo direito e encurvamento do fêmur esquerdo, e traço talassêmico beta.

Família B

Probando do sexo feminino, 20 anos, parda, procedente de Poços de Caldas - MG. OI tipo IV com DI. A paciente nasceu de parto normal, e desde um ano de idade apresenta fraturas, decorrentes de traumas leves, como esbarrões e pancadas, num total de 16 fraturas, principalmente em bacia, dedos, braço e perna. A DMO da coluna lombar revela mineralização de 97% do esperado para a idade, e a DMO do trocânter revela 75% de mineralização esperado para a idade. Atualmente em uso de alendronato e suplementação de cálcio de 800mg Ca^{2+}/dia, e uso de colete elástico torácico-lombar. Sofre de depressão e tem escoliose funcional.

Família C

Probando do sexo masculino, 16 anos, branco, procedente de Assis – SP. OI tipo IA. O paciente foi encaminhado ao ambulatório por suspeita de hiperparatireoidismo. Até hoje sofreu em torno de 30 fraturas ósseas com necessidade de imobilização por gesso. Exame

de DMO da coluna lombar evidenciou osteopenia, com 21% da densidade abaixo da esperada. Tem dificuldade para deambular, apresenta hematúria (presença de sangue na urina), osteoporose. Tem hipermobilidade articular acompanhada de dismorfias leves como orelhas de abano, *cubitus valgus* (cotovelos virados para a parte interior do corpo), esclera azulada, alta estatura e hiperelasticidade. O exame neurológico demonstrou tremor nas mãos e hipotonia global moderada, mas hipotonia apendicular mais grave. Apresenta diâmetro da aorta acima da média.

Família D

Probando do sexo feminino, 19 anos, parda, procedente de Americana – SP. OI tipo I. A paciente teve várias fraturas na infância, principalmente em fêmures, em ocasiões diferentes, e em quadril, com necessidade de duas intervenções cirúrgicas. Os exames bioquímicos mostraram os níveis de cálcio total e fósforo inorgânico acima da referência. A DMO revelou osteoporose com mineralização 28% menor que a normal para a idade. A paciente deambula com ajuda de bengala. A última fratura ocorreu em torno dos 11 anos, próximo da menarca. Tem sobrepeso, faz acompanhamento com nutricionista e não faz uso de medicamento.

Família E

Probando do sexo feminino, 25 anos, branca, procedente de Campinas – SP. OI tipo IV sem DI. Sofreu múltiplas fraturas desde um ano de idade, num total de mais de 100, apresenta esclera azulada e osteopenia difusa. Portadora de mal formação do pavilhão auditivo esquerdo com ausência de orifício externo. Necessitou de intervenção cirúrgica para colocação de haste intramedular telescopada em fêmur bilateral. Desde os 12 anos não

deambula, e se locomove com ajuda de cadeira de rodas. Atualmente toma suplementação de vitamina D e $CaCO_3$ (Figura 4).

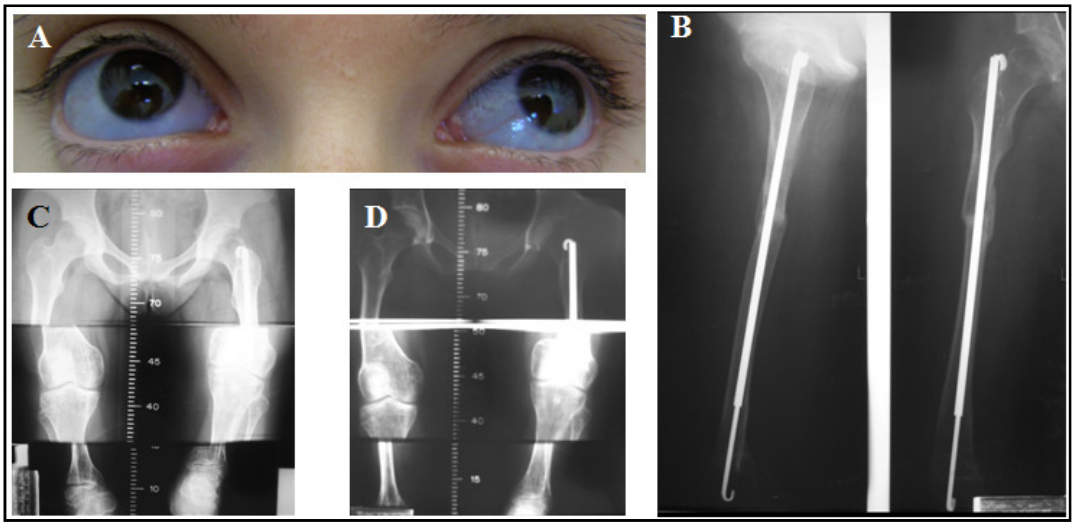


Figura 4. Probando E, evidenciando a esclera azulada (A). A paciente passou por procedimento cirúrgico para colocar uma haste intramedular telescopada em fêmur bilateral (B), procedimento decorrente do excesso de fraturas (C) e osteopenia (D) em membros inferiores.

Família F

Probando do sexo feminino, 19 anos, branca, proveniente de Santa Bárbara do Oeste – SP. OI tipo I. A paciente apresenta fraturas de repetição em cotovelo, antebraço e fêmur e joelho, todas tratadas com ortopedista com imobilização por gesso. Tem esclera azulada, sindactilia (união embriológica de dois ou mais dedos) de 4º e 5º dedos e cefaléia bitemporal. O exame de DMO da coluna lombar revelou osteopenia. Em uso de fluoxetina 20mg/dia.

Família G

Probando do sexo masculino, 21 anos, branco, procedente de Alfenas – MG. OI tipo III. O paciente apresenta fraturas de repetição, e foi internado para colocação de haste telescópica na tíbia. Por complicações devido à migração dos pinos da haste, a cirurgia foi

refeita. Não deambula desde 2003. Exame de imagens radiológicas revelaram a formação diminuída da cartilagem de crescimento nas extremidades distais dos fêmures, apresentando lesão e prejuízo do crescimento ósseo adequado, além de baixa estatura, braquicefalia (fusão da sutura coronal com encurtamento do diâmetro do crânio e seu achatamento no sentido ântero-posterior), fronte larga, esclera acinzentada, palato alto, cifose tóraco-lombar e retificação de lordose lombar. As fraturas são recorrentes desde o primeiro dia de vida, o que prejudicou o desenvolvimento motor. Tem osteopenia difusa, e se locomove com ajuda de cadeiras de rodas (Figura 5).

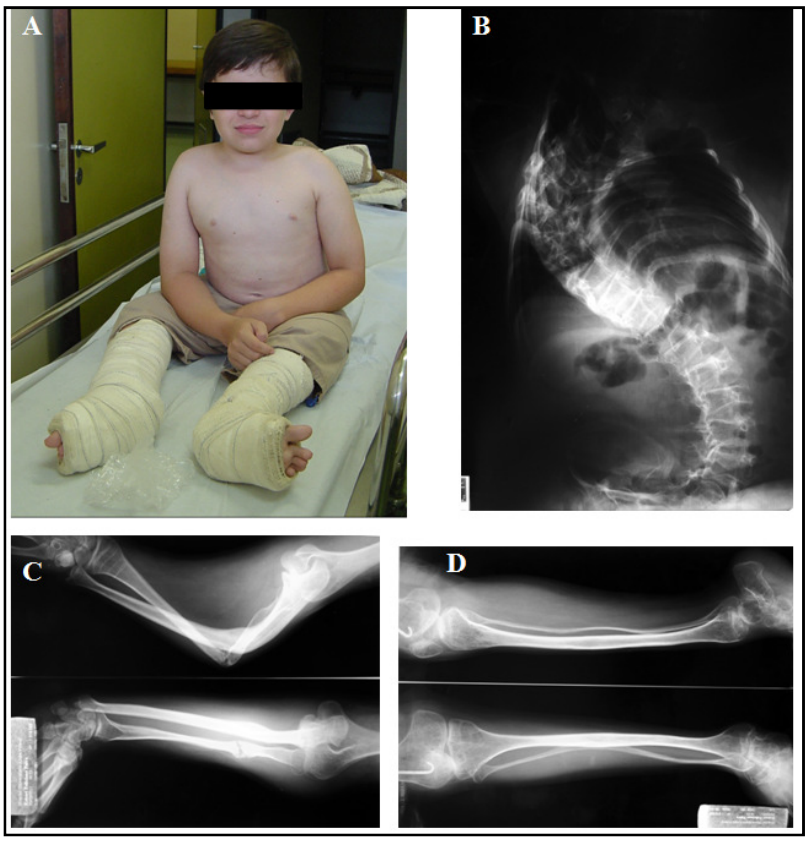


Figura 5. Probando G, logo após cirurgia para colocação de haste telescópica na tíbia (A). O paciente apresenta lordose lombar grave (B, em radiografia frontal), além de fraturas de repetição em membros superiores, com cicatrização do rádio em forma de V (C) e inferiores, também com baixa mineralização de diâmetro da tíbia (D).

Família H

Probando do sexo feminino, 15 anos, parda, procedente de Campinas - SP. OI tipo I. A paciente tem pais saudáveis e não consanguíneos. Apresenta baixa estatura desproporcional com tronco curto, hiperlordose lombar, esclera azulada, polidactilia, sobrepeso, osteoporose generalizada. Tem dificuldade visual ocasional, episódios frequentes de fraturas, principalmente em metatarsos e artelhos dos pés, e fêmur. Realizou tratamento cirúrgico diversas vezes, após queda de bicicleta (2004) e atropelamento (2008), e para correção de fraturas posteriores. Os corpos vertebrais são achatados na região central e alinhados, e tem osteopenia difusa. Apresenta fósforo e cálcio urinário abaixo da referência, e fosfatase alcalina acima da referência. Exame de DMO de coluna lombar, colo femoral e fêmur inteiro abaixo da esperada para a idade (Figura 6).

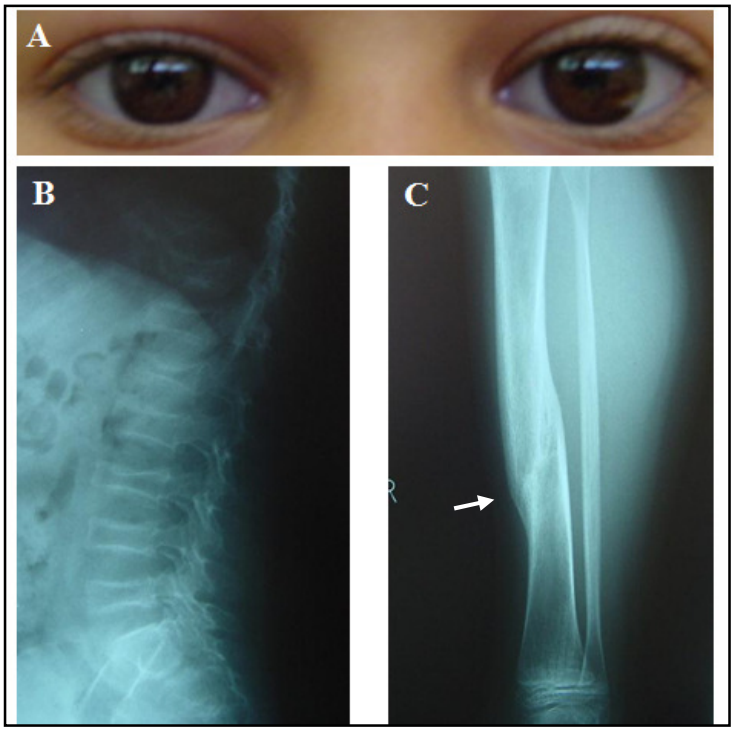


Figura 6. Probando H, mostrando a esclera azulada (A), e radiografia mostrando hiperlordose lombar, com corpos vertebrais achatados e alinhados na região central com osteopenia difusa (B), e fratura consolidada no fêmur (seta em C).

Família I

Probando I-1: Sexo masculino, 18 anos, branco, procedente de Sumaré - SP. OI tipo I. Nasceu de parto normal com fratura de clavícula. Filho de casal não consanguíneo com quatro filhos, sendo três com múltiplas fraturas. As 14 fraturas se concentram nas mãos, clavículas, antebraços, fêmures e tíbias. Tem esclera azulada, DI e hipoacusia. DMO evidencia osteopenia com mineralização de 35,8% para a esperada para a idade.

Probando I-2: Sexo feminino, 42 anos, branca, procedente de Águas Formosas - MG. OI tipo I. Mãe do paciente I-1, teve fraturas recorrentes na infância. Tem esclera azulada, e três de seus quatro filhos, um homem e duas mulheres, têm quadro clínico semelhante. A DMO total revelou osteopenia e DMO de coluna lombar revelou mineralização de 85% da esperada para a idade. Exames radiográficos mostraram processo articular nos ombros, nas articulações têmporo-mandibulares e coxofemorais. A paciente refere dores ósseas nos membros, e teve perda dentária completa, e deformação óssea decorrente das fraturas. Está em uso de alendronato diário e analgésico comum.

Família J

Probando do sexo masculino, 16 anos, branco, procedente de Piracicaba - SP. OI tipo I. O paciente nasceu por parto cesariano com cianose generalizada e sucção débil. Evoluiu com atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. Apresenta esclera azul, dedos alongados bilateralmente com hipoplasia do 4º metatarso. Não tem DI. Filho de pais não consanguíneos deambula com muleta. O pai teve fraturas recorrentes na infância. Tem fraturas de repetição em vários ossos longos, principalmente tíbia e antebraço. Passou por cirurgia para colocação de pino em fêmur. O exame de DMO mostrou mineralização de

47% esperado para a idade. O paciente apresenta leve claudicação ao andar, devido ao pé plano bilateral.

Família K

Probando do sexo feminino, 42 anos, branca, procedente de Pirapemas – MA. OI tipo IV. A paciente tem 110 cm de altura e 40 kg. Apresenta fraturas consolidadas da época da infância, na vida adulta não teve fraturas. Não tem limitação de movimento nem esclera azulada. Tem osteoporose em coluna lombar e colo femoral, apresenta sindactilia. O exame de inventario ósseo determinou tortuosidades em radio e ulna bilateral, linhas horizontais densas em fêmur, correspondendo à parada de crescimento, *genu valgum* em tíbia bilateral, desmineralização focal em extremidades ósseas, osteopenia em bacia, cifose torácica com diminuição da altura de corpos vertebrais, deformidades e tortuosidades craniais. Tem uma filha com OI e um filho normal, de pais diferentes (Figura 7).

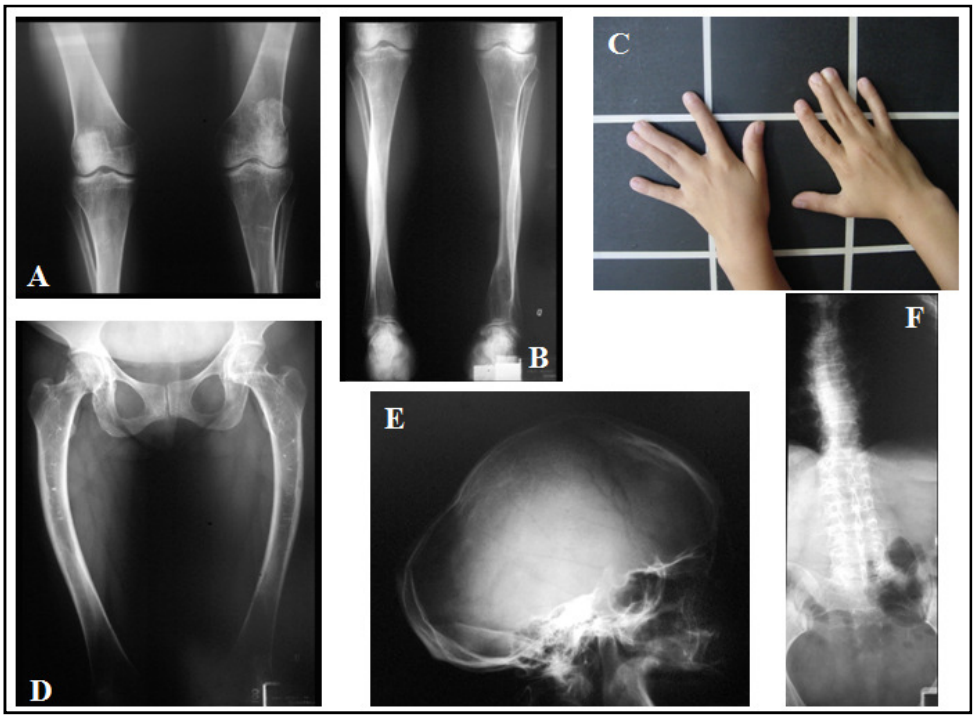
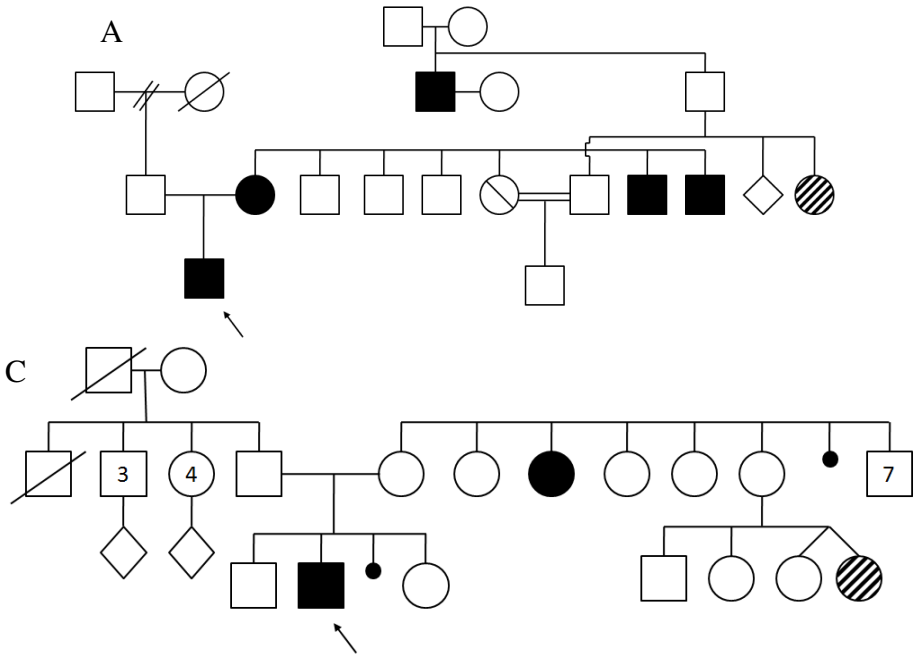


Figura 7. Probando K, mostrando osteopenia difusa de colo femoral e bacia (A e D), *genu valgum* em tíbia bilateral (B), sindactilia (C), deformidades e tortuosidades e baixa mineralização craniais (E) e cifose torácica com diminuição da altura de corpos vertebrais (F).

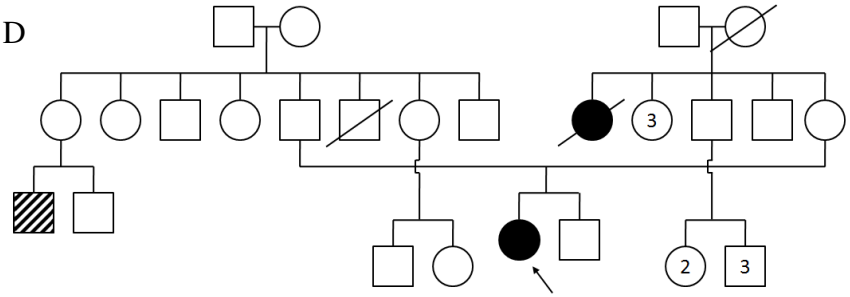
Família L

Probando do sexo masculino, 10 anos, cor parda, procedente de Campinas – SP. OI tipo IV. Nasceu de parto normal e foi inicialmente diagnosticado com displasia óssea metafisária. Peso normal para a idade, mas baixa estatura (nasceu com 43 cm). Primeiro filho de pais saudáveis (mãe fumante durante a gravidez), não consanguíneos. Sem comprometimento auditivo ou visual, porém com esclera azulada. Apresenta histórico de quedas frequentes. Raios-X do feto mostraram deformidades dos membros inferiores e fratura consolidada. Apresenta ossos wormianos, encurtamento de ossos longos com alargamento metafisário e encurtamento do fêmur, costelas alargadas nas porções finais, diminuição do espaço interpeduncular em vértebras sacrais. DMO mostra coluna lombar com osteopenia. Tratamento recente com 25-Hidroxi-Vitamina D, $CaCO_3$ e alendronato de sódio.

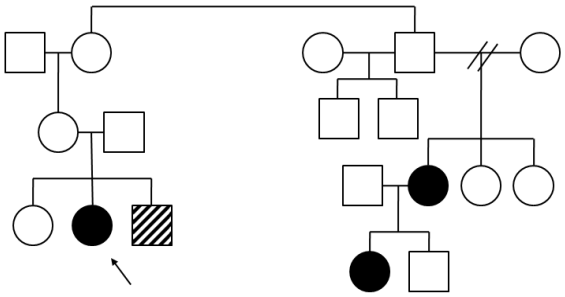
Heredogramas das famílias estudadas



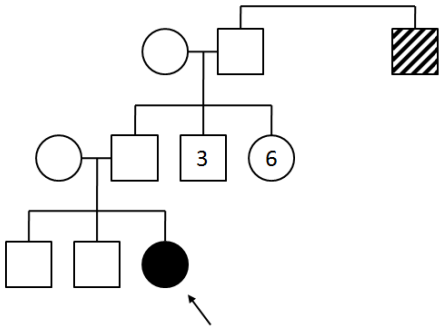
D



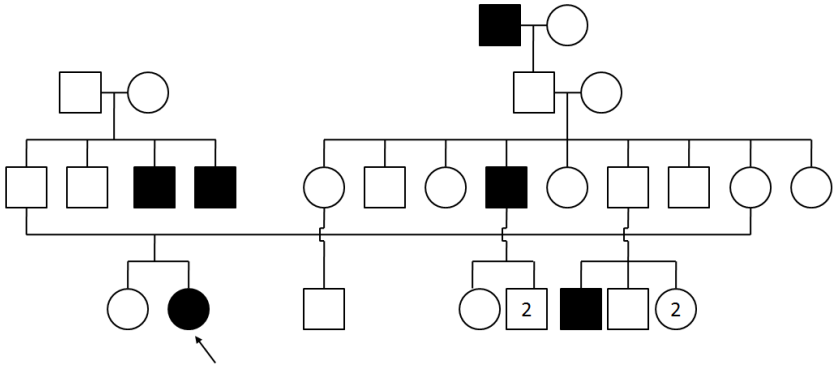
B



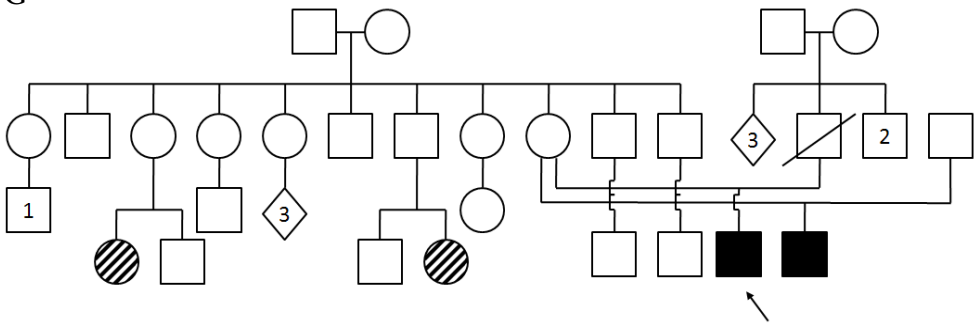
E



F



G



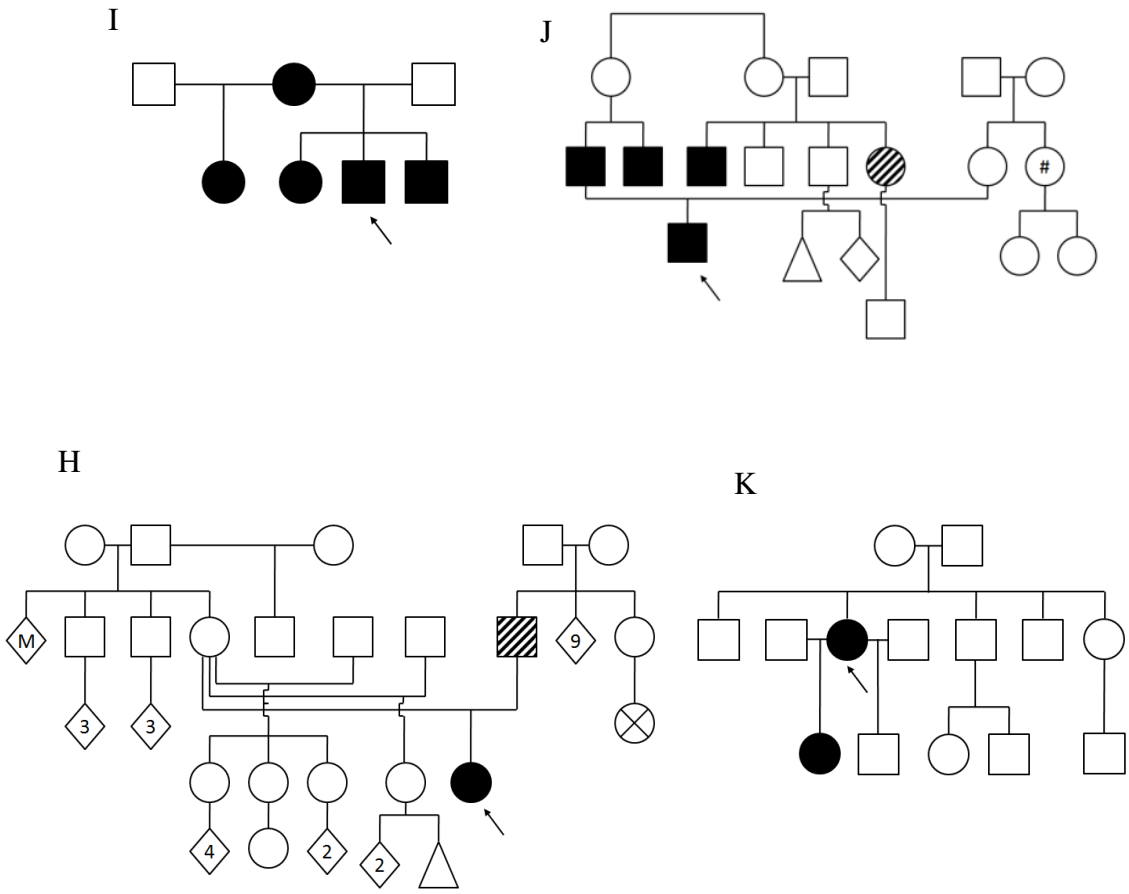


Figura 8. Heredograma das famílias incluídas neste estudo (A-K). Família A: Esclera azulada e surdez, Síndrome de Down. Família B: Descalcificação dos dentes. Família C: Paralisia infantil, cegueira e surdez. Família D: Escoliose. Família E: Alteração no pavilhão auditivo. Família G: Esclera azulada sem fratura. Família H: Paralisia infantil, Pé torto congênito. Família J: Fratura de clavícula traumática única. Epilepsia.

Biópsia de pele e cultura primária de fibroblastos

Solicitamos aos pacientes diagnosticados com OI a retirada de uma pequena quantidade de tecido da pele para realizar a cultura primária, após consentimento livre e esclarecido. A biópsia foi realizada em região inguinal, sob anestesia local, não sendo

necessária a internação do paciente. Estabelecemos a cultura primária de fibroblastos, e as células foram mantidas até a confluência em placas contendo meio DMEM, soro fetal bovino *(Invitrogen)*, penicilina e estreptomicina *(Invitrogen)* em estufa a 37°C com 5% de CO_2. Parte da cultura foi destinada à extração de RNA total, outra parte a ensaios bioquímicos do colágeno tipo I *in vitro*.

Extração de RNA e RT-PCR

Para a extração de RNA total utilizamos o reagente *TRIZOL® (Invitrogen)* diretamente no frasco de cultura de células, seguindo instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro *NanoDrop 2000c* (Kisker, Steinfurt, Germany), e conservadas a -80°C até a utilização para a confecção de cDNA. O cDNA foi obtido com o *Kit SuperScript III® RT (Invitrogen)*, seguindo instruções do fabricante. Para a reação, usamos 1 µg de RNA total e hexâmeros randômicos. O cDNA foi armazenado a -20°C até seu uso.

Polymerase Chain Reaction

Os genes ***COL1A1*** e ***COL1A2*** foram polimerizados por PCR (*polymerase chain reaction*) convencional, com 10 pares e 9 pares de *primers*, respectivamente, que codificam toda a região transcrita e uma parte da região 3´ não-traduzida e 5´ não-traduzida (Tabela 2). As temperaturas de anelamento foram otimizadas para cada par de *primer*, variando de 55°C a 65°C. Utilizamos 1,5 µL do cDNA, com 100ng de primers *sense* (F) e *antisense* (R), 200µM de dNTPs, 25mM de cloreto de magnésio, e 10% de *PCR Buffer* (Invitrogen), e 1 unidade de Taq DNA polimerase, para um volume final de 50µL. Após uma desnaturação inicial de 98°C por 3 minutos, foram feitos 30 ciclos de amplificação que consistem em

desnaturação de DNA molde a 94°C por 30s, anelamento com temperatura específica para cada par de primers por 30s, e extensão a 72 °C por 45s, com uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Para visualizar o resultado, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Nos casos em que não se encontraram mutações nos genes do colágeno tipo I, amplificamos o cDNA com primers específicos para os genes ***CRTAP***, ***PPIB*** e ***LEPRE1*** para determinar novos possíveis sítios de mutação nos genes reguladores do colágeno relacionados à OI (Tabela 3).

Tabela 2. Primers dos genes formadores do colágeno tipo I.

Primers *COL1A1* 5'→3'	**Primers *COL1A2* 5´→3'**
1F GAGTTTCTCCTCGGGGTCGG	1F AGGTGATACCTCCGCCGGT
1R GAGCAAAGTTTCCTCCGAGG	1R TCCTCTCTCACCAGGTCGTC
2F GAGATGGCATCCCTGGACAG	2F CCTGGCAAGGCTGGTGAAGA
2R CTCTCTCACCAGGCAGGCCA	2R CACCCTTGGCACCAGTAAGG
3F GTCCTGCTGGTCCTAAGGGT	3F AGTGGGTCTTCCAGGCCTCT
3R ACCAGGTTCACCGCTGTTAC	3R AGGACCTTCTTTTCCAGCGG
4F GGTATTGCTGGTGCTCCTGGC	4R TGGTCTCATGGGACCCAGAG
4R GGTATTGCTGGTGCTCCTGGC	4F GGCAGCACCACTCTCACCT
5F GGTATTGCTGGTGCTCCTGGC	5F GAGTTTGGTCTCCCTGGTCC
5R CCACGTTCACCAGGCATTCC	5R ATTTGGACCAGCTGGGCCAGCAG
6F GGCAACGATGGTGCTAAGGGTG	6F GAGGAGCCAAAGGGCCTAAG
6R CTTTGCCAGCAGGACCAGG	6R GACTCCAGGACTACCCACAG
7F GCTCCTGGAGCCAAAGGTGCT	7F TTGCTGGTGCTGTGGGTGAACC
7R GCTCCTGGAGCCAAAGGTGCT	7R TTTCCAGCAGGGCCAGAAGG
8F CCTGGTGAATCTGGACG	8F CATGGTGATCAAGGTGCTCC
8R CAGGACCAGCATCACCAGTGC	8R CCATTTCCTTGGAAGTCACTCC
9F CAGGACCAGCATCACCAGTGC	9F CTATCAATGCTGGCAGCCAG
9R CAGGACCAGCATCACCAGTGC	9R GGAGCGGGGGAAGGAGTTAA
10F AGAGGCATGTCTGGTTCGGC	
10R CAGGACCAGCATCACCAGTGC	

Tabela 3. Primers dos genes reguladores do colágeno selecionados para este trabalho.

Primers *CRTAP* 5'→3'
1F GTCGCACCGTCCTCTTTCCTTTC
1R CTTTAATGTAGTCCTCGGCACCAGG
2F GCCGCTGCTCACACCTTTCTACTG
2R GTGTTTCCTGAACGCCAAGAGG
Primers *LEPRE1* 5'→3'
1F GTAGGACTCCGGCCTTGGTGG
1R GCAGCAACAGCTTTCTCCAACTTG
2F GATGGAGCTGGAGTTCCGCAAGCG
2R GGTTCATCACCTCGTCATTGGGGAAG
3F GGGAATTATACACAGGCTGTTG
3R GGAAGTAGGACTCCATGATGCG
4F GTGCCCACCTGTACTACAACGTG
4R GAGAGAGACTCTTGTGCAGGTTCG
Primers *PPIB* 5'→3'
1F GCCTCAGCTGTCCGGGCTGCTTTCG
1R GACTACAGGGCCTGCACAGACGG

Extração de proteínas e Western blot

A extração de proteínas das células da cultura foi feita com o Kit *Complete Lysis-M* (Roche), segundo instruções do fabricante, e o lisado foi usado imediatamente após a extração. Utilizamos 40 µg do extrato de proteína e do meio de cultura tratado com ácido ascórbico 25mg/mL por 24 horas (93) para eletroforese em gel SDS-PAGE 6%, seguido de eletrotransferência das proteínas em membrana PVDF. Após bloqueio com solução de bloqueio Li-Cor, as membranas foram incubadas com anticorpo primário para COL1A1 e COL1A2 (Imuny, Rheabiotech Ltda.) em solução de bloqueio overnight a 4°C, seguido de anticorpo secundário marcado com fluorescência *IR Dye 800CW* (Li-Cor), em solução de

bloqueio por duas horas em temperatura ambiente. Usamos o *Odyssey Image System* (Li-Cor) para a leitura para a identificação das bandas de proteínas correspondentes a COL1A1 e COL1A2 (proteínas alvo) e Tubulina (proteína de referência), e quantificação das bandas.

Real Time - qPCR

A análise da expressão dos genes ***COL1A1*** e ***COL1A2*** foram feitas por RT-qPCR utilizando-se de *primers* marcados com fluorescência de acordo com a sequencia do cDNA dos genes. Foram utilizados como controles endógenos os genes constitutivos ***GAPDH***, ***18S***, ***ACTB*** e ***HPRT1*** (TaqMan Gene Expression Assays, Life Technologies). Utilizamos o equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, UK). Analisamos os experimentos com o software SDS versão 1.7.

Realizamos a validação dos sistemas gene alvo/gene de referência. A validação dos sistemas ***COL1A1*** e ***COL1A2*** *vs.* ***GAPDH***, ***ACTB***, ***18S*** e ***HPRT1*** foram realizadas utilizando-se sete concentrações diferentes de cDNA (diluições seriadas de cinco vezes) de um pool de amostras controle. Com os dados da cinética de amplificação das amostras e utilizando-se o programa *7500 System SDS Software*, construiu-se uma curva padrão para cada gene. Os valores das inclinações (*slope*) das curvas, as eficiências e a confiabilidade desses resultados medida pelo parâmetro R^2 estão discriminados na Tabela 4. A Figura 9 mostra as curvas obtidas para todos os sistemas de genes. Para determinar a amplitude de concentrações para as quais o sistema está validado, construimos um gráfico do logaritmo das concentrações de cDNA utilizadas (eixo X) pela diferença das médias dos Cts do gene de referência e do gene de interesse obtidas para cada concentração (eixo Y). Com isso, obteve-se uma reta com inclinação para cada sistema (Figura 9, com a fórmula de y), mostrando que os ΔCts das amostras não estão variando entre as diferentes concentrações

testadas, sendo mostradas a curva de eficiência para os sistemas e a equação da reta correspondente à linha de tendência.

Tabela 4. Eficiência dos genes do colágeno tipo I e dos genes de referência, tamanho do amplicon e o número de catálogo para o Real Time qPCR.

Símbolo	Nome	Função	TaqMan Assay #	Amplicon	Slope	R^2	Eficiência
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GR	4333764F	122	-3,313	0,996	1,004
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase	GR	4333768F	100	-3,305	0,988	1,007
ACTB	beta actin	GR	4352935E	171	-3,383	0,999	0,975
18S	18S ribossomal RNA	GR	Hs99999901_s1	187	-3,530	0,994	0,920
COL1A1	proα-1 collagen type I	GA	Hs00164004_m1	74	-3,434	0,999	0,955
COL1A2	proα-2 collagen type I	GA	Hs00164099_m1	127	-3,510	0,999	0,927

GR – gene de referência, GA – gene alvo. Amplicon em pares de base.

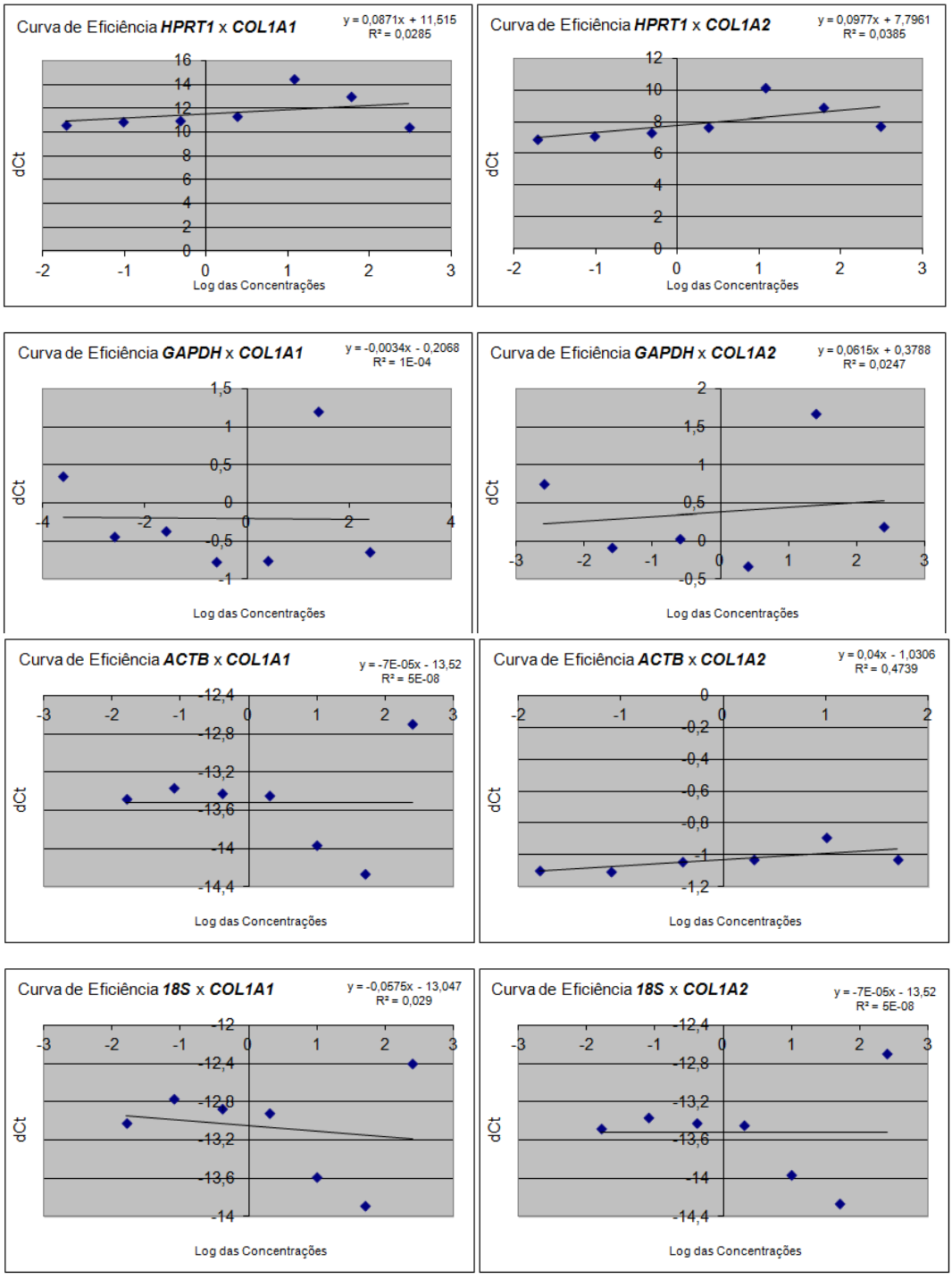


Figura 9. Linha de tendência obtida após construção do gráfico a partir da utilização do logaritmo das concentrações pela diferença entre as médias dos Cts do controle endógeno e as médias dos Cts do gene de interesse. A equação de reta da linha de tendência, a qual possui inclinação menor do que 0,1, indicando que o sistema está validado.

Sequenciamento direto

Sequenciamos as amostras dos pacientes diretamente após a polimerização dos PCRs segundo Sanger *et al.*, 1977 (94). Utilizamos o sequenciador automático ABI PRISM^{TM} 377 e o *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1* (ABI PRISM/ Applied Biosystems), segundo instruções do fabricante. Utilizamos 20 ng de PCR para cada reação de sequenciamento. Os sequenciamentos foram analisados com o software *BioEdit*. A busca por mutações foi feita através do NCBI-BLAST (95), comparados com ***COL1A1*** humano (GenBankMIM#120150), e ***COL1A2*** (GenBank # 120160).

Digestão com enzimas de restrição

Após o sequenciamento, as amostras selecionadas com mutações duvidosas foram confirmadas com digestão por enzimas de restrição. As enzimas de restrição usadas foram StyI, HpaII, BsrSI e NciI (Promega). Os sítios de ligação da enzima estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Sítios de ligação das enzimas de restrição utilizadas nas mutações do colágeno.

Enzima	Sítio de ligação
StyI	5'...C▼C W W G G...3' 3'...G G W W C▲C...5'
HpaII	5'...C▼CG G...3' 3'...G GC▲C...5'
BsrSI	5'…ACTG GN▼…3' 3'…TGAC▲CN…5'
NciI	5'…CC▼(C/G) GG…3' 3'…GG (G/C)▲CC…5'

Imunocitoquímica

Estabelecemos a cultura de fibroblastos de pacientes e controles em lamínulas tratadas com ácido acético 2N para melhor fixação. Após atingirem a confluência, as células foram lavadas com PBS duas vezes e fixadas com paraformaldeído 4% mais 0.12M de sucrose e 0.2% Triton X-100, por 20 minutos em temperatura ambiente. Após a lavagem com PBS, as células foram bloqueadas com a solução de 6% de soro de cabra em PBS mais 0.1% Triton X-100, por uma hora em temperatura ambiente. Logo em seguida foram incubadas com anticorpo primário anti-COL1A1 ou anti-COL1A2 (Imuny, Rheabiotech Ltda.) na proporção 1:500 em PBS com 1.5% soro de cabra mais 0.1% Triton X-100 por 16 horas. As células foram lavadas quatro vezes de cinco minutos com PBS e então incubadas com anticorpo secundário fluorescente *Alexa Fluor* 546 (Life Technologies, USA) por uma hora, seguido de quatro lavagens de cinco minutos. Os núcleos foram contra-corados usando Hoechst (Sigma). As lâminas foram montadas usando *ProLong® Gold antifade reagent* (Invitrogen), deixadas para secar overnight e então visualizadas no microscópio de fluorescência confocal.

Para quantificar o padrão das proteínas de colágeno nas células coradas, as imagens confocais foram analisadas por cálculos de texturas em *Region of Interest* (ROI), cada um com 101 x 101 pixels, de regiões selecionadas perto do núcleo. A análise de textura é usada para examinar a distribuição espacial de valores de pixels e quantificar a heterogeneidade em uma imagem. Para cada paciente, seis ROI foram avaliados. As análise de textura foram baseada no cálculo de uniformidade e de entropia do nível cinzento por co-ocorrência na matriz (GLCM) e foram comparadas contra o índice vizinho. A uniformidade é a soma de raiz quadrada dos valores de pixel GLCM. Considerando-se que

este parâmetro dá maior peso para os *hot spots* da matriz GLCM, a uniformidade é uma medida da ordem da imagem. Em contraste, a entropia é uma medida da complexidade da imagem. O cálculo foi feito para traduzir as imagens em números na direção paralela ou perpendicular, geralmente ao lado de um pixel selecionado. No nosso caso, usamos o valor médio entre os 0 e 90 graus. Os cálculos foram realizados usando os módulos de textura GLCM do software *ImageJ* (NIH).

Microscopia de fluorescência confocal

As imagens das lâminas foram feitas com o microscópio Zeiss invertido, modelo LSM-510 Meta (Carl Zeiss Microimaging, NY) com o filtro UV para identificar os núcleos e laser de excitação 546 nm para identificação das proteínas. O *pinhole* usado foi 16, e o zoom e configurações de contraste/intensidade da luminosidade foram ajustados igualmente para as amostras.

Análise das mutações *in silico*

Fizemos a análise *in silico* de todas as mutações pontuais encontradas nos pacientes. A análise *in silico* é a experimentação com simulação computacional que modela um fenômeno natural. A simulação é a construção de um modelo de uma situação real em que se testam determinadas situações para avaliar qual seria sua resposta. No caso das mutações, existem diversos bancos de dados que compilam informações sobre natureza química do aminoácido, modelagem de estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias para prever possíveis alterações de forma e função. Além disso, fazem comparação ontológica com outras espécies para fazer a previsão de patogenicidade, além

de determinar o grau de conservação filogenética de uma posição específica de um aminoácido na proteína madura.

Utilizamos quatro ferramentas para os cálculos de probabilidade da patogenicidade das mutações: MutPred, SNPs&GO, PolyPhen2 e Panther, e uma análise de predição por cálculo de natureza de aminoácido, a escala Grahtam (Tabela 6).

MutPred é uma ferramenta de internet desenvolvida para classificar uma mutação com substituição de aminoácidos como patogênica ou neutra, em seres humanos. Pode prever a causa bioquímica da doença, como por exemplo, a hidroxilação ou glicosilação do resíduo mutado ou da sua vizinhança. A ferramenta requer a sequencia FASTA da proteína, e uma lista das substituições de aminoácidos, e baseia-se na escala SIFT (*Scale-invariant feature transform* - prevê se uma substituição de aminoácido afeta a função da proteína)(96) e um ganho ou perda de 14 diferentes propriedades estruturais e funcionais, como por exemplo, um ganho de propensão helicoidal ou perda de um local de fosforilação, entre outros. Ele foi programado usando as mutações deletérias do banco de dados *Human Gene Mutation* (97) e polimorfismos neutros do Swiss-Prot (98). A interpretação dos resultados é relacionada a uma pontuação geral (g - a probabilidade de que a substituição de aminoácido seja deletéria ou associada a doença) e cinco propriedades principais com valor de p (confirma que certas propriedades estruturais e funcionais não são afetados pelo acaso). Valores de $g > 0,5$ e $p < 0,05$ são hipóteses viáveis; valores de $g > 0,75$ e $p < 0,05$ são hipóteses confiáveis; e valores de $g > 0,75$ e $p < 0,01$ são hipóteses muito confiáveis (99).

SNPs &GO é um servidor para a predição de doenças relacionadas a mutações pontuais em seres humanos. São investigados polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), causa de várias doenças humanas. Os SNPs investigados são mutações *missenses*

resultantes em substituições de resíduos de aminoácidos na proteína. A ferramenta coleta informações em um formulário único com sequencia de proteína, a posição do aminoácido substituído e que resíduo foi substituído. O enorme número de SNPs humanos disponíveis nas bases de dados relaciona as mutações inseridas com probabilidade de patologias. As informações dos resultados são derivadas do banco de dados *Gene Ontology*. A página de resultado relata o efeito previsto da mutação carregado na forma de previsão: a coluna "EFFECT" indica se a mutação está associada a uma doença com base nas informações depositadas; a coluna "RI" (*Reliability index*) informa o índice de confiabilidade da previsão, pontuando de 0 (pouco confiável) a 10 (muito confiável); a linha "BP" (*Biological Process*) retorna os link para os processos biológicos associados à proteína; a linha "MF" (*Molecular Function*) relata os links de função molecular; e a linha "CC" (*Cellular Component*) relata os links para os componentes celulares (100). Como a maioria das informações já é conhecida para o colágeno, enfatizamos a coluna "EFFECT" e a pontuação RI nos nossos resultados.

PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping v2*) é uma ferramenta que prevê o possível impacto de uma substituição de aminoácido sobre a estrutura e função de uma proteína humana utilizando considerações bioquímicas comparativas. É focada em SNPs não sinônimos (nsSNPs), isto é, SNPs localizado em regiões codificadoras que resultam em substituição de aminoácidos nas proteínas maduras. Foi demonstrado em vários estudos que o impacto das variantes alélicas de aminoácidos na estrutura e função da proteína pode ser previsto através de análise de alinhamento de sequencias múltiplas e estruturas 3D das proteínas (101-102). É uma ferramenta automática e baseia-se em uma série de características que incluem a informação filogenética da sequência, e a caracterização

estrutural da substituição. Para uma determinada substituição de aminoácido em uma proteína, extraem-se as características de alinhamento da sequência e da estrutura do sítio de substituição e as alimenta a um classificador probabilístico, calculando a probabilidade *'Naïve Bayes'* de que esta mutação seja prejudicial e reporta as estimativas de taxa de falsos positivos (FPR, a chance de que a mutação seja classificada como prejudicial quando de fato não é) e taxa de verdadeiros positivos (TPR, a chance de que a mutação seja classificada como prejudicial quando é realmente prejudicial). A mutação também é avaliada qualitativamente, como benigna (*benign*), possivelmente deletéria (*possibly damaging*), ou provavelmente deletéria (*probably damaging*)**,** com base em taxas de falsos positivos (FPR) limiares, otimizada separadamente para cada dado inserido (103).

A escala Panther estima a probabilidade de um determinado nsSNPs causar um impacto funcional na proteína. Ele calcula o subPSEC (conservação evolutiva de uma substituição de posição específica) com base em um alinhamento de proteínas evolutivamente relacionadas. A pontuação de subPSEC estima a probabilidade de um efeito funcional a partir de uma única substituição de aminoácido, e é o logaritmo negativo da razão da probabilidade de os aminoácidos do tipo selvagem e mutante em uma determinada posição. Pontuações subPSEC são valores contínuos de 0 (neutro) a -10 (mais provável que seja deletério). O valor de -3 é o ponto de corte calculado para se ter um comprometimento estrutural e funcional grave (104-105).

A escala Grantham não é uma análise *in silico* via *software web*, mas uma análise simples de uma tabela desenvolvida com a comparação de todos os resíduos de aminoácidos substituídos por quaisquer outros resíduos. Esta tabela (Figura 10) categoriza substituições de códon em classes de dissimilaridade química dos aminoácidos, utilizando

fórmulas específicas de comparação das características estabelecidas pelo autor. A interpretação dos resultados é feita a partir de uma pontuação que varia conforme a mudança de resíduos dentro das 190 combinações possíveis seja mais ou menos prejudicial à conformação da proteína. As duas categorias são intituladas de "moderadamente conservativa" (valores entre 51-100), e "moderadamente radical" (valores entre 101-150). Quando maior o valor, mais patogênica é a mutação (106).

Tabela 6. Análise *in silico* das mutações do colágeno tipo I

Ferramentas *in silico* na web		
Método	**Endereço**	**Referência**
MutPred	http://mutpred.mutdb.org/	Li *et al*., 2009
SNPs&GO	http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/	Calabrese *et al*., 2010
PolyPhen2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/	Adzhubei *et al*., 2010
Panther	http://www.pantherdb.org/tools/csnpScoreForm.jsp	Thomas *et al*., 2003
Predição por cálculos de natureza química dos aminoácidos		
Grahtam	Artigo original de Grahtam	Grantham, 1974

Arg	Leu	Pro	Thr	Ala	Val	Gly	Ile	Phe	Tyr	Cys	His	Gln	Asn	Lys	Asp	Glu	Met	Trp	
110	145	74	58	99	124	56	142	155	144	112	89	68	46	121	65	80	135	177	Ser
	102	103	71	112	96	125	97	97	77	180	29	43	86	26	96	54	91	101	Arg
		98	92	96	32	138	5	22	36	198	99	113	153	107	172	138	15	61	Leu
			38	27	68	42	95	114	110	169	77	76	91	103	108	93	87	147	Pro
				58	69	59	89	103	92	149	47	42	65	78	85	65	81	128	Thr
					64	60	94	113	112	195	86	91	111	106	126	107	84	148	Ala
						109	29	50	55	192	84	96	133	97	152	121	21	88	Val
							135	153	147	159	98	87	80	127	94	98	127	184	Gly
								21	33	198	94	109	149	102	168	134	10	61	Ile
									22	205	100	116	158	102	177	140	28	40	Phe
										194	83	99	143	85	160	122	36	37	Tyr
											174	154	139	202	154	170	196	215	Cys
												24	68	32	81	40	87	115	His
													46	53	61	29	101	130	Gln
														94	23	42	142	174	Asn
															101	56	95	110	Lys
																45	160	181	Asp
																	126	152	Glu
																		67	Met

Figura 10. Estudo de Grantham de substituição de aminoácidos na estrutura da proteína. Esta tabela foi elaborada com o resultado de cálculos que predizem a distancia química dos aminoácidos de acordo com pH, volume e hidrofobicidade de cada um. Para obter-se a pontuação, basta cruzar o aminoácido selvagem com o substituído e observar o número correspondente. Tabela reproduzida de Grantham, 1976 (106).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software *GraphPad Prism version 5.04 for Windows* (GraphPad Software, USA). Na análise do RT-qPCR, testamos a significância da expressão entre o grupo controle e o grupo paciente utilizando o teste de *Mann-Whitney U*. A correlação entre os níveis de expressão de ***COL1A1*** e ***COL1A2***, independente da presença ou não de mutação no gene, foi testada com o teste R de *Spearman*. O nível de expressão entre os genes mutados e não mutados dentro de cada paciente foi testada para identificar eventuais diferenças pelo Teste de *Wilcoxon*. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

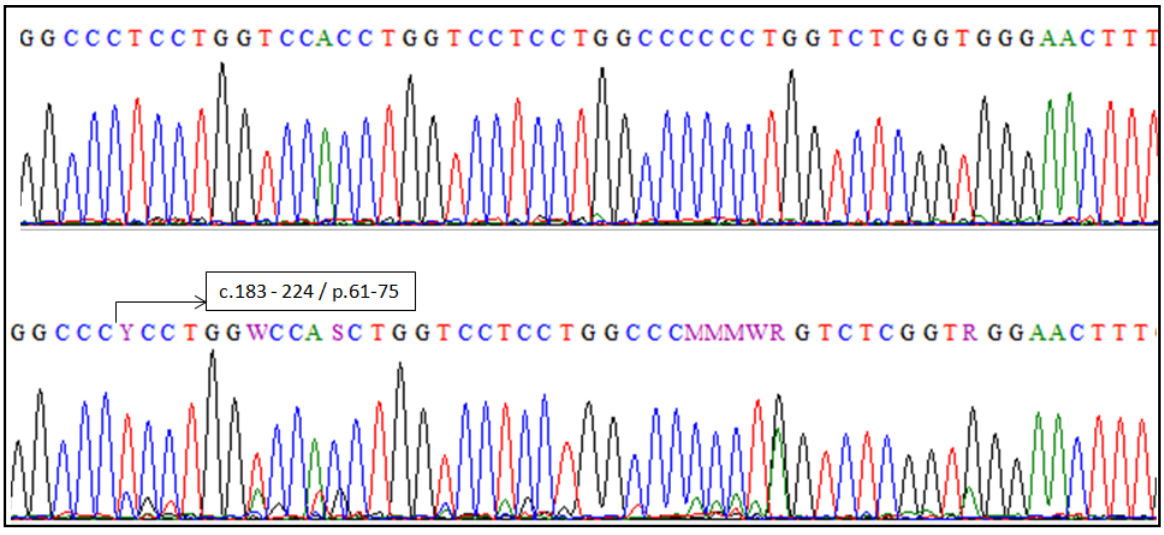
Doze famílias foram estudadas. Todas apresentavam a forma autossômica dominante de OI. Nove apresentaram mutações missense, duas apresentaram mutação com mudança na matriz de leitura e em uma família não conseguimos encontrar mutação.

Análise molecular dos genes codificadores do colágeno tipo I

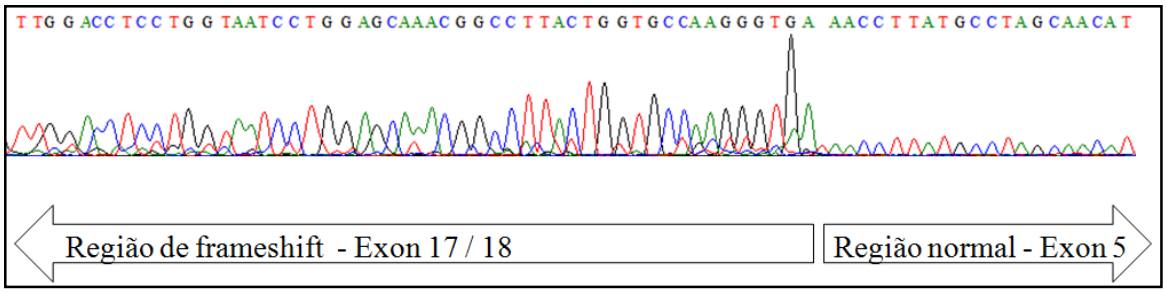
Na Família A não encontramos mutação nos genes do colágeno tipo I e nem nos genes envolvidos na hidroxilação do colágeno. Possivelmente a mutação está em algum dos outros genes reguladores do colágeno ou fora da região estudada, seja na região promotora ou na outra região intrônica. A Família B revelou uma mudança na matriz de leitura de 41 pares de base, da posição c.183 até a posição c.224, o que envolve 14 resíduos de aminoácido, da posição p. 61 até p.75, do gene ***COL1A2***. Estas posições estão localizadas no exon cinco, no domínio propeptídeo N-terminal. A família C também apresentou um caso de mutação gênica complexa onde uma mudança na matriz de leitura comprometeu a posição de uma série de aminoácidos, no exon 17 / 18 do gene ***COL1A2***. A Família D apresentou uma mutação pontual na posição c.2314G>A, no exon 38 do gene ***COL1A2***, com substituição de glicina para serina na posição p.G772S. A Família E apresentou duas mutações pontuais, uma no exon oito do gene ***COL1A1***, na posição c.613C>G, com substituição de aminoácido de prolina para alanina, na posição p.P205A, e outra mutação no exon 16 do gene ***COL1A2***, na posição c.775G>A, com substituição de glicina para serina na posição p.G259S. A Família F apresentou uma mutação pontual no exon 16 gene ***COL1A2***, na posição c.775G>A, com substituição de glicina para serina na posição p.G259S. A Família G apresentou uma mutação pontual no exon 49, no domínio propeptideo C-terminal do gene ***COL1A2*** na posição c.3467G>A, com substituição de uma arginina por uma lisina na posição p.R1156K. A família H apresentou uma mutação

pontual no exon 11 do gene ***COL1A1*** na posição c.769G>A, com substituição de glicina por arginina na posição p.G257R. A Família I apresentou uma mutação de ponto no exon cinco, no domínio propeptídeo N-terminal do gene ***COL1A2***, na posição c.214G>A, com substituição de glicina por serina na posição p.G72S. A Família J apresentou mutação pontual no exon 17 do gene ***COL1A2***, na posição c.793G>C, com substituição de aminoácido de glicina para arginina na posição p.G265R. A família K apresentou uma mutação de ponto no exon 13 do gene ***COL1A1*** na posição c.859G>A, com substituição de glicina por serina na posição p.G287S. A família L apresentou uma mutação de ponto no exon 25 do gene ***COL1A1***, na posição c.1678G>A, com substituição de aminoácido de glicina para arginina, na posição p.G560R. o eletroferograma de cada mutação comparado ao controle está mostrado na Figura 11.

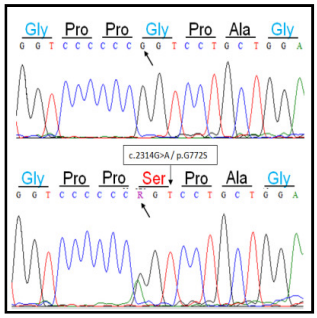
B



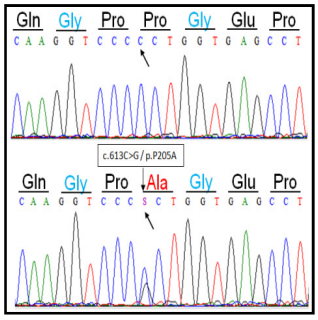
C



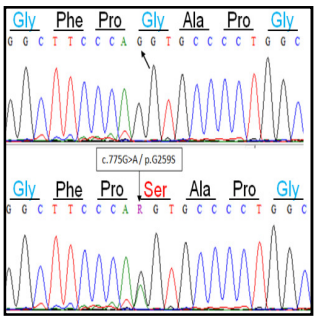
D



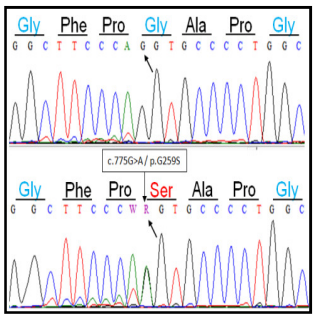
E – ***COL1A1***



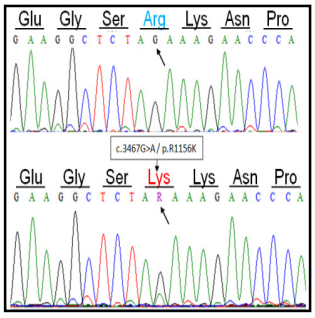
E – ***COL1A2***



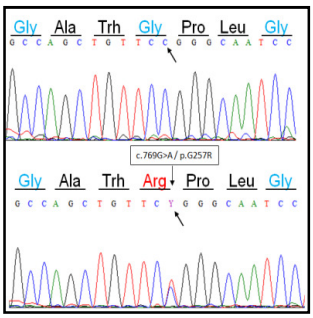
F



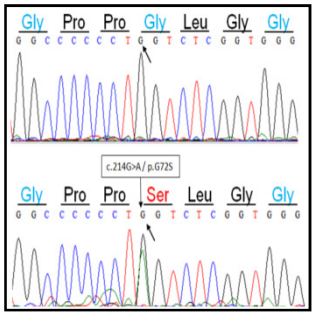
G



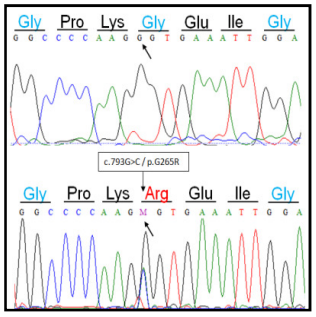
H



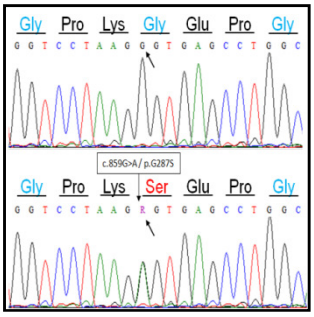
I



J



K



L

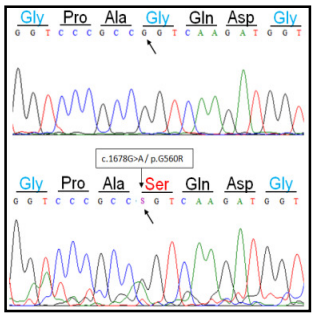


Figura 11. Sequenciamento direto dos pacientes deste estudo. Em cada imagem, o painel superior mostra o sequenciamento de uma amostra controle, e o painel inferior a mutação encontrada nas famílias, identificadas pelas letras na parte superior. A mutação de cada paciente está especificada na caixa com seta.

Tabela 7. Resumo das mutações de todas as famílias com informações sobre gene, mudança de aminoácido e tipo de OI

Família	Gene	Exon	Mutação	Proteína	Localização	OI tipo	Referência
A	-	-	-	-	-	IV	-
B	***COL1A2***	5	Frameshift	?	N-propeptídeo	IV	Nova
C	***COL1A2***	17/ 18	Frameshift	?	Tríplice hélice	I	Nova
D	***COL1A2***	38	c.2314G>A	p.G772S	Tríplice hélice	I	Nuytinck *et al.*, 1997
E	***COL1A1***	8	c.613C>G	p.P205A	Tríplice hélice	IV	Spotila *et al.*, 1994
E	***COL1A2***	16	c.775G>A	p.G259S	Tríplice hélice		Nova
F	***COL1A2***	16	c.775G>A	p.G259S	Tríplice hélice	I	Nova
G	***COL1A2***	49	c.3467G>A	p.R1156K	C-propeptídeo	III	Nova
H	***COL1A1***	11	c.769G>A	p.G257R	Tríplice hélice	I	Redford-Badwal *et al.*, 1996
I	***COL1A2***	5	c.214G>A	p.G72S	N-propeptídeo	I	Nova
J	***COL1A2***	17	c.793G>C	p.G265R	Tríplice hélice	I	Nova
K	***COL1A1***	13	c.859G>A	p.G287S	Tríplice hélice	IV	Kataoka *et al.*, 2007
L	***COL1A1***	25	c.1678G>A	p.G560R	Tríplice hélice	IV	Mackay et al., 1993

Comparação pró-colágenos de vertebrados

Avaliamos a posição de cada aminoácido substituído nos probandos com outras proteínas pró-colágenas de humano e outros vertebrados, nas isoformas proα1 e proα2, com as sequências disponíveis no banco de dados do *NCBI Protein (*http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/). Todos os resíduos com substituição de glicina localizados no domínio da tríplice hélice são altamente conservados em todas as isoformas humanas e de outros vertebrados, sugerindo um papel fundamental desta posição na estrutura da proteína madura. O resíduo p.205 de ***COL1A1*** é uma substituição de prolina por alanina. Como esta posição não envolve a glicina, não é tão conservada, e o alinhamento mostrou a presença de outros aminoácidos nesta posição em outros animais, porém ainda considerada altamente conservada (Tabela 8). O resíduo p.1156 de ***COL1A2*** está localizado no domínio globular C-propeptídeo, e também não é severamente conservado em todas as isoformas analisadas, mas em ambos os casos anteriores, em todos os mamíferos esta posição se mostrou conservada (Tabela 9). Este alinhamento de seqüência dos aminoácidos foi feita com o software *BioEdit*.

Tabela 8. Alinhamento das posições mutadas em isoformas de COL1A1 de humanos e outros vertebrados

COL1A1	p.205	p.257	p.287	p.560
Homo sapiens COL1A1	FQGPPGEPGE	RGLPGTAGLP	AGPKGEPGSP	PGPAGQDGRP
Homo sapiens COL1A2	FQGPAGEPGE	RGFPGTPGLP	PGVKGEPGAP	VGLPGIDGRP
Homo sapiens COL2A1	FQGNPGEPGE	RGFPGTPGLP	PGVKGESGSP	SGAPGEDGRP
Homo sapiens COL3A1	YQGPPGEPGQ	KGPAGIPGFP	PGLKGENGLP	PGSQGESGRP
Homo sapiens COL5A1	PPGSGGLKGE	RGFDGLAGLP	DGERGDDGEV	KGNSGGDGPA
Homo sapiens COL11A1	GPGSSGAKGE	RGFDGLPGLP	DGMRGEDGEI	KGTSGGDGPP
Pan Troglodytes COL1A1	FQGPPGEPGE	RGLPGTAGLP	AGPKGEPGSP	PGPAGQDGRP
Macaca mulatta COL1A1	FQGPPGEPGE	RGLPGTAGLP	AGPKGEPGSP	PGPAGQDGRP
Mus Musculus COL1A1	PPGPKGQPGN	MGFPGIRGFP	KGERGEQGPP	PGPTGAKGVR
Rattus norvegicus COL1A1	FQGPPGEPGE	RGLPGTAGLP	AGPKGEPGSP	PGPAGQDGRP
Bos Taurus COL1A1	FQGPPGEPGE	RGLPGTAGLP	AGPKGEPGSP	PGPAGQDGRP
Gallus gallus COL1A1	FQGPPGEPGE	RGLPGTAGLP	AGPKGEPGSP	PGPAGQDGRP
Danio rerio COL1A1	FTGPPGEPGE	RGFPGTPGLP	AGPKGEPGAP	GGAPGQDGRP

Tabela 9. Alinhamento das posições mutadas em isoformas de COL1A2 de humanos e outros vertebrados

COL1A2	p.72	p.259	p.265	p.772	p.1156
Homo sapiens COL1A2	PGPPGLGGNF	PGFPGAPGPK	PGPKGEIGAV	NGPPGPAGSR	PEGSRKNPAR
Homo sapiens COL1A1	PGPPGLGGNF	PGFPGAVGAK	VGAKGEAGPQ	VGAPGAKGAR	PEGSRKNPAR
Homo sapiens COL4A2	PGPQGPKGQK	PGLPGPPGLS	RGLPGEMGPK	PGIPGLPGFP	TDQEPMCPVG
Homo sapiens COL5A2	PGPDGLSRPF	SGFPGNPGMK	PGMKGEAGPT	NGVPGLKGGR	PDGSKKHPAR
Homo sapiens COL11A2	PGPPGTSLML	PGQQGTPGTQ	PGTQGLPGPQ	QGLPGPSGEK	PTGTQDSPAR
Pan troglodytes COL1A2	PGPPGLGGNF	PGFPGAPGPK	PGPKGEIGAV	NGPPGPAGSR	PEGSRKNPAR
Macaca mulatta COL1A2	PGPPGLGGNF	PGFPGAPGPK	PGPKGEIGAV	NGPPGPAGSR	PEGSRKNPAR
Mus musculus COL1A2	PAPPGLTGNF	PGFPGAPGPK	PGPKGELGPV	NGPPGPVGSR	PEGSRKNPAR
Rattus norvegicus COL1A2	PGPPGLTGNF	PGFPGAPGPK	PGPKGELGPV	NGPPGPAGSR	PEGSRKNPAR
Bos taurus COL1A2	PGPPGLGGNF	PGFPGAPGPK	PGPKGELGPV	NGPPGPAGSR	PEGSRKNPAR
Gallus gallus COL1A2	PGPPGLGGNF	PGFPGAPGAK	PGAKGEIGPA	VGAAGPAGPR	PEGSKKNPAR
Danio rerio COL1A2	PGPPGLGGNF	PGFPGAPGPK	PGPKGELGPA	SGPVGPPGAR	PEGSKKNPAR

Digestão com enzimas de restrição

Nos pacientes que tiveram o sequenciamento duvidoso, fizemos a digestão do produto de PCR com enzimas de restrição específica para cada mutação (Figura 12). As mutações digeridas foram c.2314G>A, na família D, c.769G>A, da família H, c.793G>C, da família J e c.1678G>A, da família L. A presença de mutação na posição c.769G>A resulta em destruição de um sítio da enzima *NciI* e cria uma banda de 482pb no cDNA do probando. No DNA nativo, aparecem duas bandas, de 318 e 164pb, enquanto no probando aparece a banda de padrão heterozigota pela soma das duas bandas nativas. Estas bandas aparecem com metade da intensidade no paciente. A mutação na posição c.1678G>A cria um sítio de ligação da enzima *BsrSI*, mostrando o padrão heterozigoto de digestão do cDNA, com uma banda de 65pb no probando, ausente no DNA nativo. A mutação c.793G>C destrói um sítio de ligação de *StyI*, criando uma banda de 512pb no cDNA mutante, enquanto nos controles aprecem bandas de 377 e 135pb. A mutação c.2314G>A destrói um sitio de ligação da enzima de restrição *HpaII*, criando uma banda de 478pb pela soma das duas bandas nativas, uma de 387 e outra de 91 pb. Em todos os casos em que fizemos a digestão pelas enzimas de restrição específica para cada sítio de mutação, estas mutações foram confirmadas.

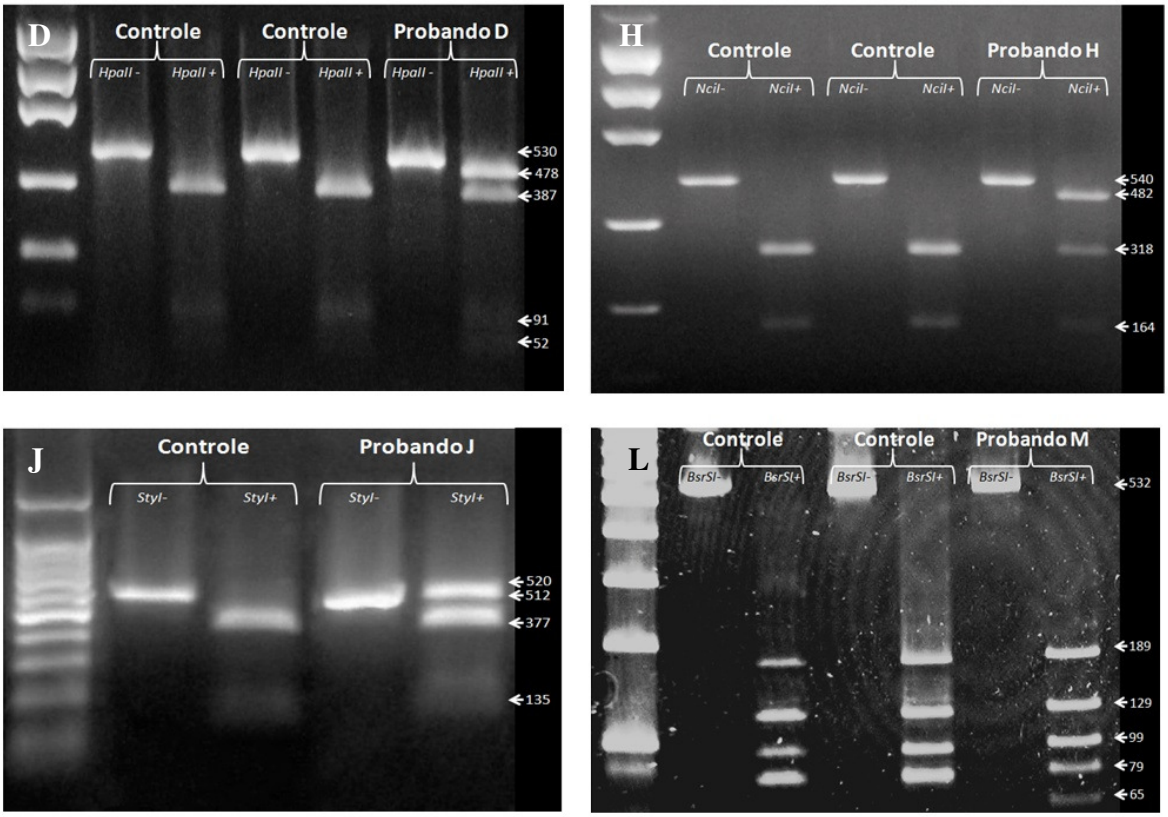
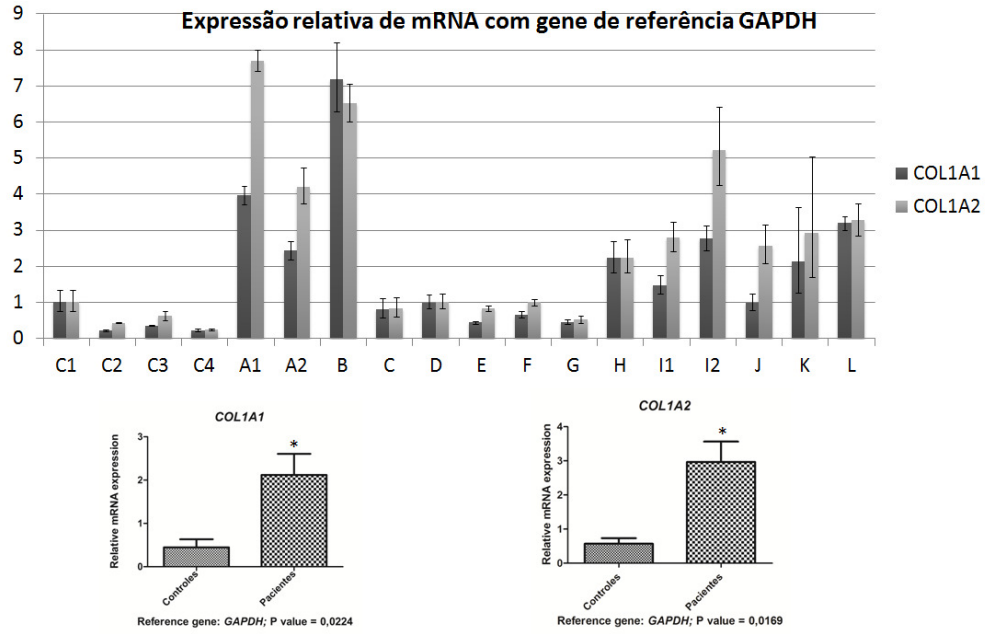


Figura 12. Digestão dos produtos de PCR dos probandos D, H, J e L. A digestão dos cDNA mutante mostrou o padrão heterozigoto das mutações. O tamanho das bandas em pares de base está indicado ao lado da figura, e a presença (+) ou ausência (-) da enzima está indicada em cada banda. Em todos os casos observa-se o padrão heterozigoto de herança da mutação, pela sobreposição das bandas do cDNA normal com as bandas produzidas pela mutação.

Expressão do colágeno tipo I nos pacientes com OI

A análise da expressão dos transcritos de colágeno tipo I mostrou que todos os mRNAs mutantes são expressos. A expressão de ***COL1A1*** e ***COL1A2*** foi semelhante dentro do grupo controle, mas heterogênea dentro do grupo dos pacientes. Uma hiperexpressão estatisticamente significante foi observada quando comparado o grupo controle e o grupo dos pacientes (Figura 13), com todos os quatro genes de referência (teste U de Mann-Whitney, todos com $p<0,05$, Figura 14). O controle quatro é um adulto e

mostrou o menor nível de expressão, como esperado. Entretanto, a hiperexpressão do grupo paciente persiste mesmo excluindo este controle e considerando apenas os controles jovens (C1, C2 e C3). O controle um foi utilizado como calibrador para todas as análises. A expressão de ***COL1A1*** se correlacionou significativamente com a expressão de ***COL1A2*** (teste de Spearman, para ***GAPDH*** R^2= 0,90; ***ACTB*** R^2 = 0,93 e ***HPRT1*** R^2 = 0,88, todos os genes de referência com valor de p<0,0001). Não houve diferença de expressão de ***COL1A1*** comparado com ***COL1A2*** em cada paciente, e, independente da presença de mutação em um dos genes, ambos estavam hiperexpressos em grau similares com todos os genes de referência testados (Teste Wilcoxon, p>0,05, Figura 14). Os dados para o gene de referência 18S corroboram os dados de todos os outros genes, e não está mostrado nos resultados.



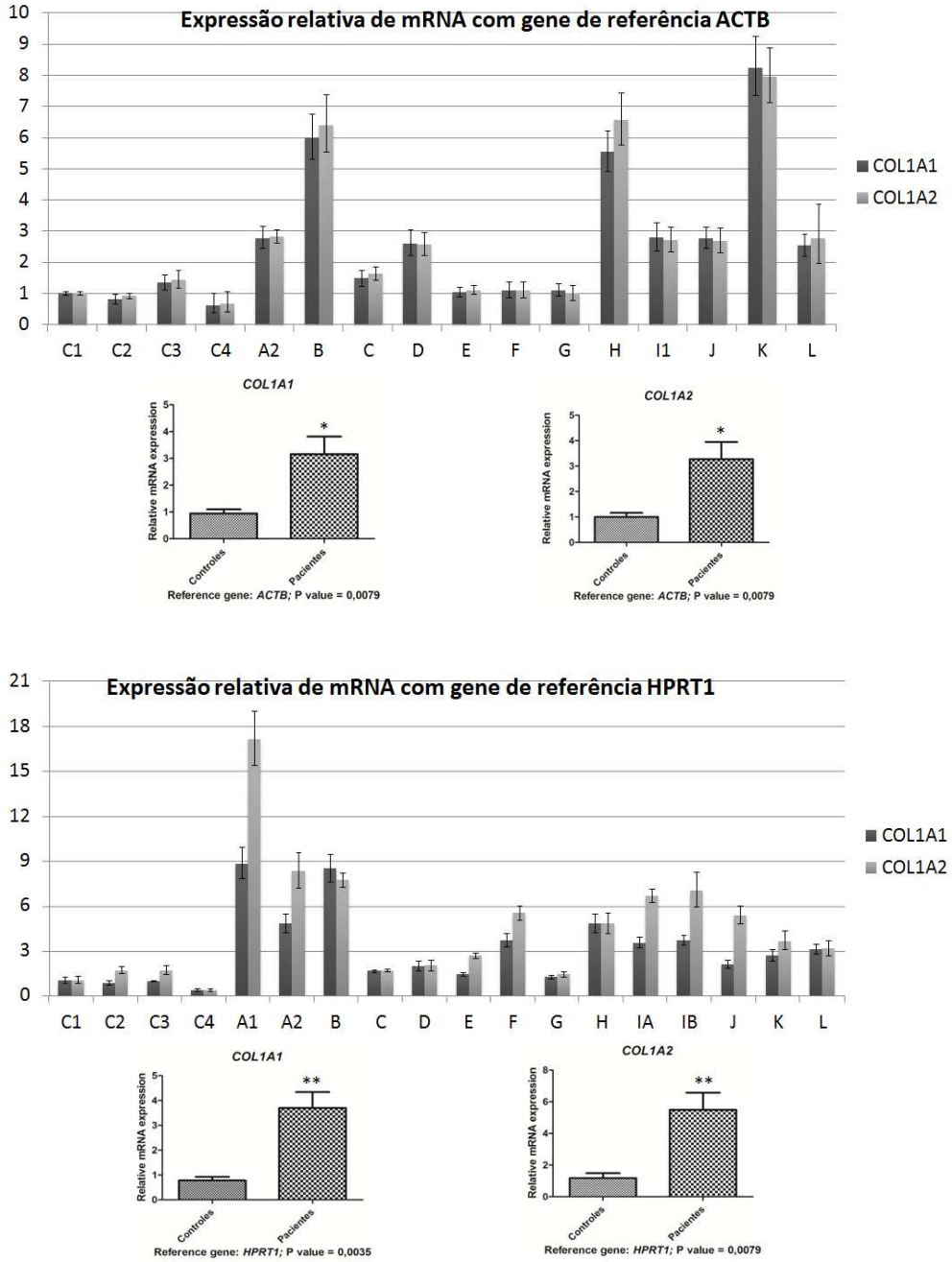


Figura 13. Expressão dos genes do colágeno tipo I por Real Time qPCR. Cada gráfico representa a expressão do colágeno com um gene de referência específico. O grupo dos pacientes teve uma hiperexpressão significante comparado ao grupo controle (teste não paramétrico de Mann-Whitney U, com valor de p para *HPRT1* x *COL1A1* = 0,0035; *HPRT1* x *COL1A2* = 0,0079; *GAPDH* x *COL1A1* = 0,0224; *GAPDH* x *COL1A2* = 0,0169; *ACTB* x *COL1A1* = 0,0079 e *ACTB* x *COL1A2* = 0,0079).

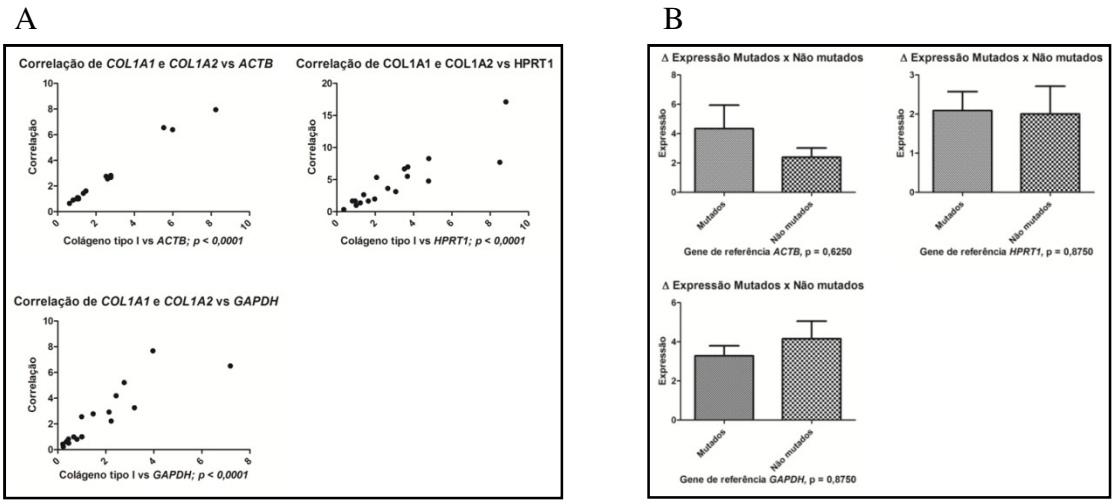


Figura 14. A - Correlação entre expressão de *COL1A1* e *COL1A2*, indiferentemente da mutação em um dos genes, foi muito significativa, (teste não paramétrico R de Spearman, com valor de p < 0,0001 para todos os genes de referência). B – A expressão de genes mutados *versus* genes não mutados dentro de cada paciente não teve diferença significante entre os grupos (teste de Wilcoxon com valor de p para *ACTB* = 0,625; *HPRT1* = 0,875 e *GAPDH* = 0,8750).

Western blot

O Western blot mostrou a expressão das duas proteínas, proα1 (I) e proa2 (I), confirmando a tradução dos transcritos mutados. O anticorpo anti-COL1A1 identificou uma banda de aproximadamente 140 kDa no extrato celular total, mas não a proteína secretada no meio celular, uma vez que o peptídeo utilizado para a imunização está localizado no domínio propeptídeo N-terminal, que é clivado na proteína madura, presente no meio de cultura. O epítopo utilizado para o anticorpo anti-COL1A2 está localizado no domínio da tríplice hélice, e a proteína é abundantemente secretada e identificada no meio de cultura por uma banda de aproximadamente 130 KDa. A tubulina, utilizado como proteína de referência, apareceu apenas no extrato celular total e, uma vez que não é secretada, não parece no extrato protéico do meio de cultura. A intensidade de sinal fluorescente em controles e em pacientes foi semelhante, quando o sinal foi normalizado pela proteína de referência (Figura 15). Observa-se uma alteração em proα1(I) no probando D, com uma

banda mais espessa em relação ao controle e outros pacientes, sugerindo supermodificação da proteína mutada. Não foi possível fazer a análise de todos os pacientes por perda de algumas amostras devido a questões de falta de refrigeração.

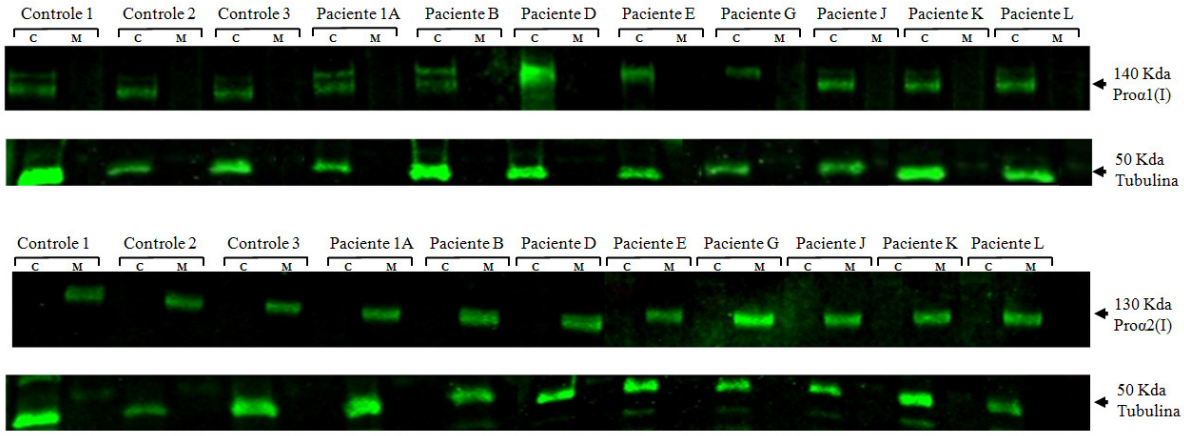


Figura 15. Expressão de proteínas do colágeno tipo I. Cada banda está identificada com o nome do paciente correspondente. Painel superior mostrando a expressão de proα1(I) e proteína de referência tubulina. No painel inferior, expressão de proα2(I). A expressão das proteínas do colágeno tipo I foi similar entre controles e pacientes. C – extrato celular total. M – extrato de meio de cultura tratado com acido ascórbico 25mg/mL.

Imunocitoquímica

Para analisar o padrão de expressão e localização da proteína de colágeno tipo I, a imunocitoquímica com fluorescência foi realizada em células de fibroblasto permeabilizadas. As proteínas foram expressas em todos os fibroblastos dos pacientes. Nos controles e nas células coradas com o anticorpo primário com a proteína não mutada, um padrão de fibras alongadas e organizadas foi observado. Encontramos alterações no padrão e textura da proteína de colágeno mutante, mostrando padrões de vesículas com agregados densos de anticorpos com fluorescência. Nestes casos, o padrão de fibrilas alongadas foi perdido, observamos uma desorganização das fibrilas e sua distribuição no citoplasma (Figura 16). Em alguns pacientes, uma região mais densamente corada foi observada na região perinuclear, sugerindo uma retenção no retículo endoplasmático. A quantificação de

alguns parâmetros como textura da imagem, uniformidade e entropia mostrou diferenças significativas quando mensuradas em proteínas mutadas e proteínas normais (Figura 17). No paciente B, a imagem com a proteína mutada COL1A2 tem uma aparência homogênea pontilhada, enquanto a proteína normal e os controles mostram pontos combinadas com algumas linhas alongadas (estrutura normal das fibrilas de colágeno), o que explica por que eles têm menos uniformidade e maior entropia. No paciente L, as mesmas diferenças foram encontradas na proteína mutada COL1A1.

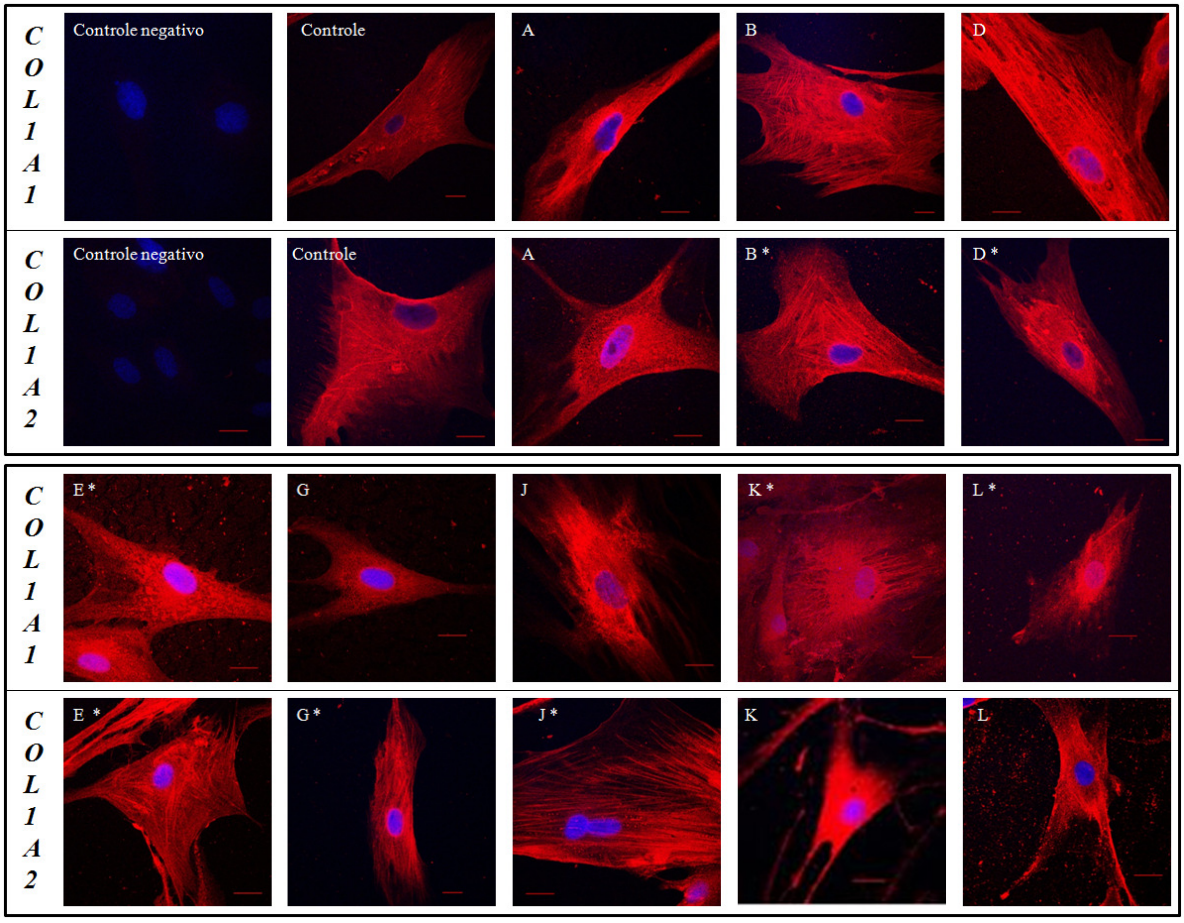


Figura 16. Imunocitoquímica do colágeno tipo I. Os pacientes estão identificados em cada imagem, e o asterisco identifica que gene está mutado em cada amostra. Os padrões de fibras alongadas estão presentes nos controles e nas proteínas não mutadas, enquanto a desorganização de fibras e localização difusa é observada nos pacientes. A barra vermelha horizontal indica 10µm.

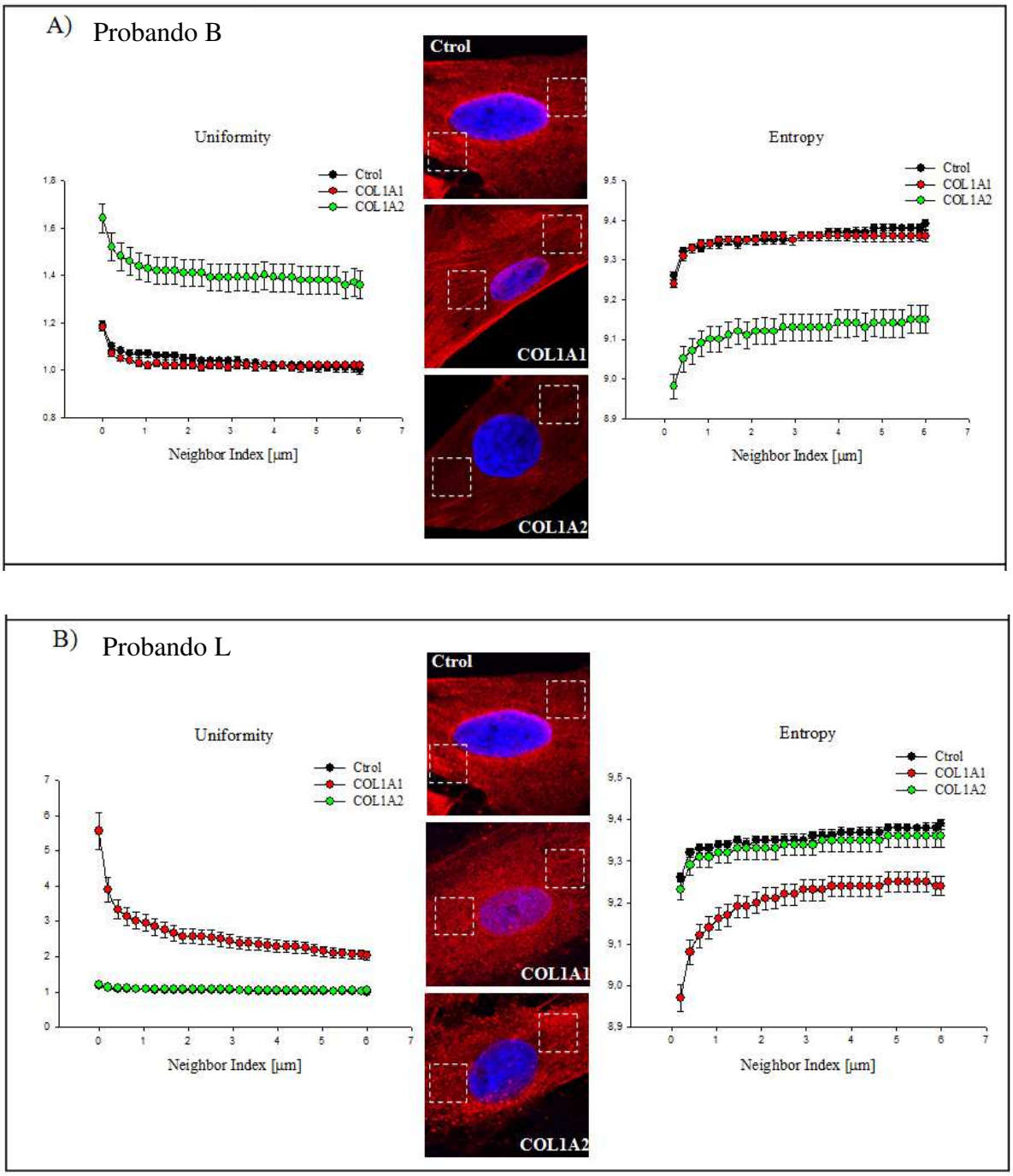


Figura 17. Resultado representativo da análise de textura realizada em células de fibroblasto. Uniformidade e entropia foram avaliadas em fibroblastos de pacientes e controles. A - Uniformidade e entropia do probando B com OI tipo IV. B - Uniformidade e entropia do probando M com OI tipo IV. As imagens estão representando as proteínas mutadas em cada paciente e a região ROI (quadrado branco), onde foi realizada a análise de textura. Ctrl = controle.

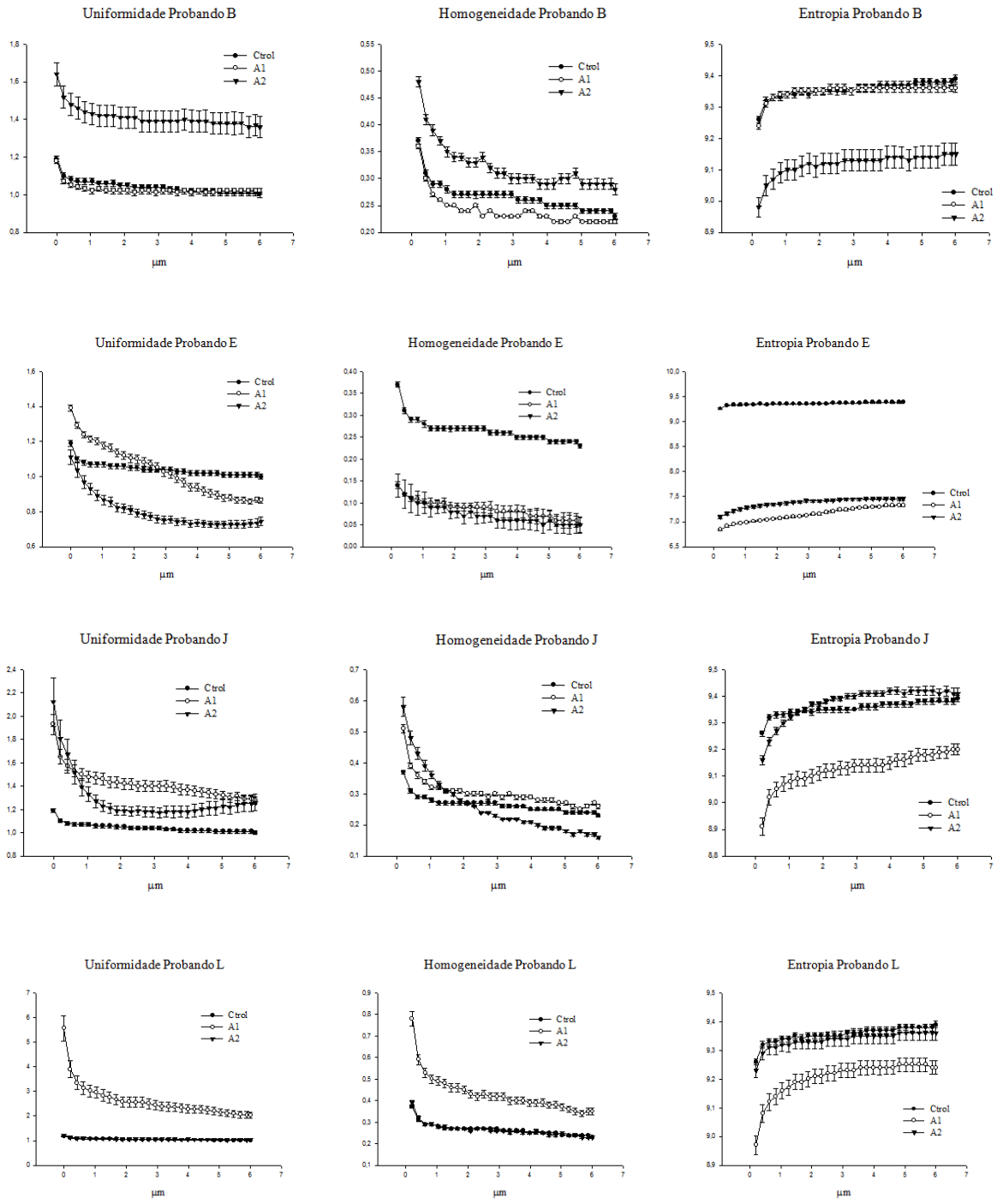


Figura 18. Quantificação da imunocitoquímica dos probandos B, E, J e L, mostrando os padrões de uniformidade, homogeneidade e entropia. Em cada paciente, o gene mutado aparece com a linha de tendência deslocada em relação ao controle e ao gene sem mutação. Porém no probando E, com mutação tanto em *COL1A1* como em *COL1A2*, não há diferença entre as duas proteínas, sendo ambas diferentes do controle.

Análise das mutações *in silico*

Todas as mutações presentes no domínio da tríplice hélice com substituição de glicina retornaram *scores* altamente patogênicos (Tabela 12). As mutações que estavam nos domínios C- e N- terminais retornaram valores menores. Por não fazer parte da proteína madura, estes domínios não são pontuados com altos *scores*, pois o software entende que não são regiões importantes para a estrutura e função da proteína. A mutação da posição R1156K (probando G) não alinhou no banco de dados do Panther e conseguiu pontuações baixas nos outros estudos, porém está presente em uma região importante para a polimerização da tríplice hélice, que começa o enovelamento a partir da região mais distal C-terminal. Nas figuras e tabelas abaixo, os resultados retornados de cada banco de dados pesquisado e as respectivas explicações de cada ferramenta (Figuras 19 a 23 e Tabelas 10 e 11).

Tabela 10. Resultados da inserção de dados para as mutações pontuais de *COL1A1* encontradas no trabalho. As probabilidades de dada mutação ser deletéria são mostradas na coluna "*Probability of deleterious mutation*". As outras características advindas da mutação estão descritas nas demais colunas.

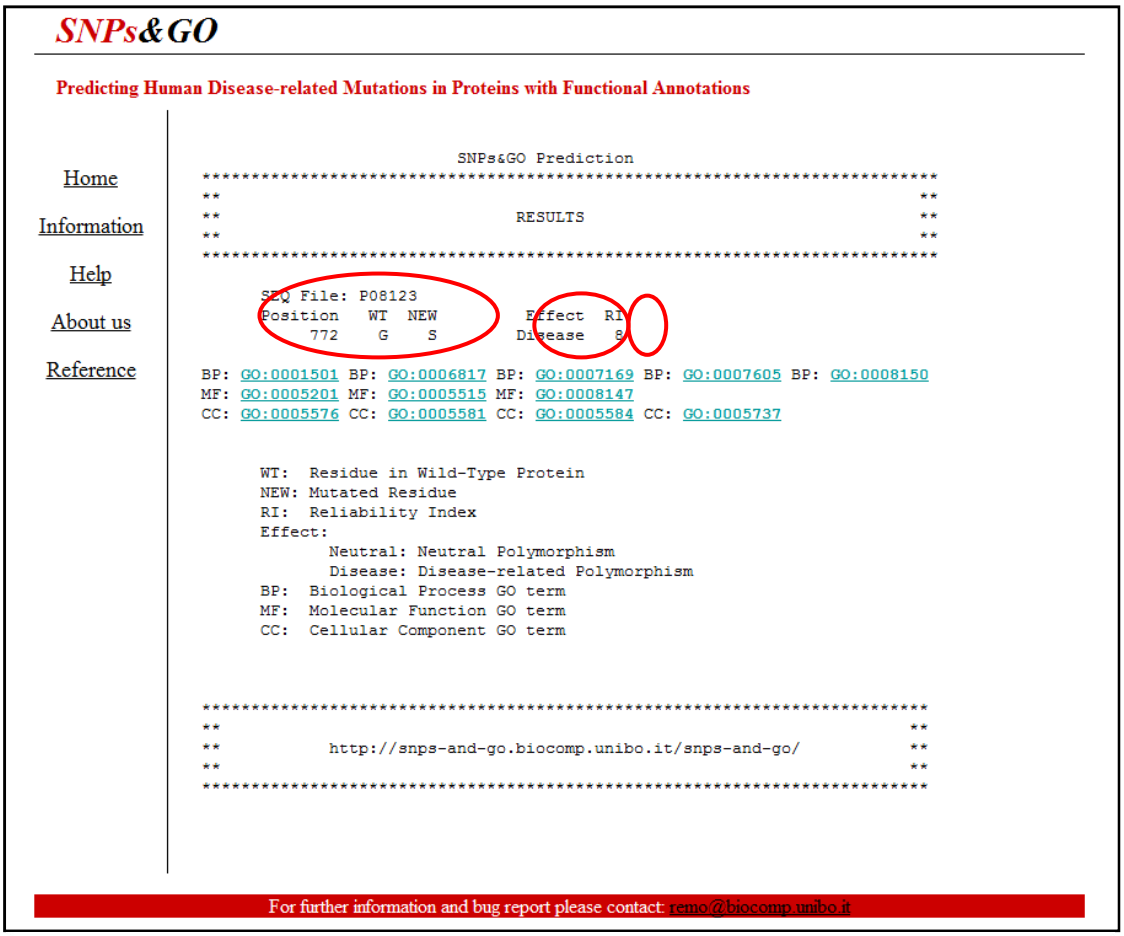
Mutation	Probability of deleterious mutation	MOLECULAR MECHANISM DISRUPTED			Top 5 features	Exact PTM Match	Neighbor PTM Match
		Actionable Hypotheses	**Confident Hypotheses**	**Very Confident Hypotheses**			
P205A	**0.610**	Loss of catalytic residue at P204 (P = 0.0131) Loss of glycosylation at P205 (P = 0.0232)			Loss of catalytic residue at P204 (P = 0.0131) Loss of glycosylation at P205 (P = 0.0232) Gain of relative solvent accessibility (P = 0.1571) Loss of sheet (P = 0.5184) Loss of stability (P = 0.8106)	Hydroxylation, CO1A1_CHICK, SwissProt56.6,P,194	Hydroxylation, CO1A1_CHICK, SwissProt56.6,P,197
G257R	**0.994**		Gain of methylation at G257 (P = 0.0229)	Gain of MoRF binding (P = 0.0066)	Gain of MoRF binding (P = 0.0066); Gain of methylation at G257 (P = 0.0229) Gain of solvent accessibility (P = 0.0584) Loss of glycosylation at T258 (P = 0.0754) Gain of relative solvent accessibility (P = 0.09)		Hydroxylation, CO1A1_CHICK, SwissProt56.6,P,245
G287S	**0.986**		Gain of glycosylation at G287 (P = 0.014) Gain of relative solvent accessibility (P = 0.0166) Gain of solvent accessibility (P = 0.0374)	Gain of phosphorylation at G287 (P = 0.0025)	Gain of phosphorylation at G287 (P = 0.0025) Gain of glycosylation at G287 (P = 0.014) Gain of relative solvent accessibility (P = 0.0166) Gain of solvent accessibility (P = 0.0374) Loss of ubiquitination at K286 (P = 0.1983)		
G560R	**0.997**		Gain of solvent accessibility (P = 0.0171) Gain of methylation at G560 (P = 0.0427) Gain of relative solvent accessibility (P = 0.0479)		Gain of solvent accessibility (P = 0.0171) Gain of methylation at G560 (P = 0.0427) Gain of relative solvent accessibility (P = 0.0479) Gain of glycosylation at P558 (P = 0.0845) Loss of catalytic residue at P556 (P = 0.1132)		

Molecular Mechanism disrupted: Mecanismos moleculares alterados pela presença da mutação. *Top 5 features*: as cinco principais características bioquímicas apresentadas na proteína madura com a substituição deste aminoácido. *Exact PTM Match / Neighborhood PTM Match*: dados ontológicos e filogenéticos de posições conservadas da proteína em outros organismos.

Tabela 11. Resultados da inserção de dados para as mutações pontuais de *COL1A2*. As probabilidades de dada mutação ser deletéria são mostradas na coluna "*Probability of deleterious mutation*". As outras características advindas da mutação estão descritas nas demais colunas.

Mutation	Probability of deleterious mutation	MOLECULAR MECHANISM DISRUPTED			Top 5 features	Exact PTM Match	Neighbor PTM Match
		Actionable Hypotheses	**Confident Hypotheses**	**Very Confident Hypotheses**			
G72S	**0.990**		Gain of phosphorylation at G72 (P = 0.0165) Loss of relative solvent accessibility (P = 0.0186)	Gain of glycosylation at G72 (P = 0.0019)	Gain of glycosylation at G72 (P = 0.0019) Gain of phosphorylation at G72 (P = 0.0165) Loss of relative solvent accessibility (P = 0.0186) Loss of catalytic residue at G72 (P = 0.1099) Loss of solvent accessibility (P = 0.1579)		
G259S	**0.963**		Gain of phosphorylation at G259 (P = 0.0174)	Gain of glycosylation at G259 (P = 7e-04)	Gain of glycosylation at G259 (P = 7e-04) Gain of phosphorylation at G259 (P = 0.0174) Gain of solvent accessibility (P = 0.1683) Loss of catalytic residue at G259 (P = 0.1805) Gain of ubiquitination at K264 (P = 0.2995)		
G265R	**0.981**				Gain of glycosylation at P263 (P = 0.0648) Loss of sheet (P = 0.0817) Gain of methylation at G265 (P = 0.0909) Loss of catalytic residue at P261 (P = 0.1002) Loss of loop (P = 0.1242)		
G772S	**0.953**		Loss of catalytic residue at G772 (P = 0.0251)	Gain of glycosylation at G772 (P = 0.0012) Gain of phosphorylation at G772 (P = 0.0035)	Gain of glycosylation at G772 (P = 0.0012) Gain of phosphorylation at G772 (P = 0.0035) Loss of catalytic residue at G772 (P = 0.0251) Gain of solvent accessibility (P = 0.5334) Loss of methylation at R777 (P = 0.5583)		
R1156K	**0.523**	Gain of ubiquitination at R1156 (P = 0.0101) Gain of methylation at R1156 (P = 0.0253)			Gain of ubiquitination at R1156 (P = 0.0101) Gain of methylation at R1156 (P = 0.0253) Gain of glycosylation at R1156 (P = 0.1009) Loss of phosphorylation at S1155 (P = 0.1044) Gain of catalytic residue at R1156 (P = 0.1525)		

Molecular Mechanism disrupted: Mecanismos moleculares alterados pela presença da mutação. *Top 5 features*: as cinco principais características bioquímicas apresentadas na proteína madura com a substituição deste aminoácido. *Exact PTM Match / Neighborhood PTM Match*: dados ontológicos e filogenéticos de posições conservadas da proteína em outros organismos.



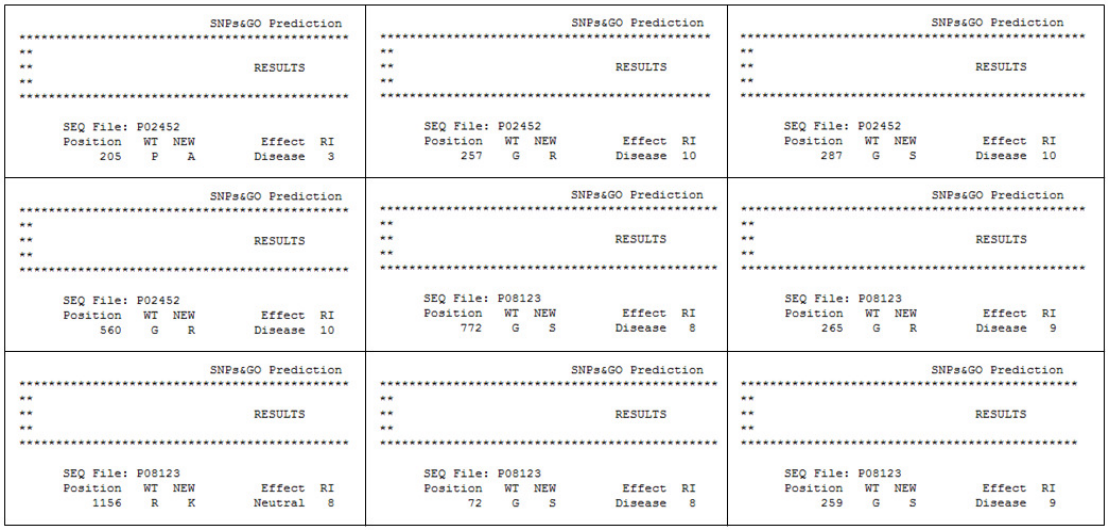


Figura 19. Tela de resultado do banco de dados SNPs&GO, mostrando as informações fisiológicas, bioquímicas e estruturais das proteínas inseridas. No primeiro campo com círculo vermelho, é feita a identificação da posição do aminoácido, o resíduo original e o resíduo substituído na proteína. No segundo campo, o efeito provável causado pela mutação, podendo ser '*Neutral*' ou '*Disease*'. No terceiro campo, o Índice de confiabilidade da coluna efeito, variando de 0 a 10. Quanto maior este número, mais confiável a informação obtida. Nos quadros abaixo, o resultado de cada uma das mutações submetidas ao banco de dados, sendo todas '*Disease*', com exceção da mutação p.1156, de *COL1A2*, que foi considerada '*Neutral*'.

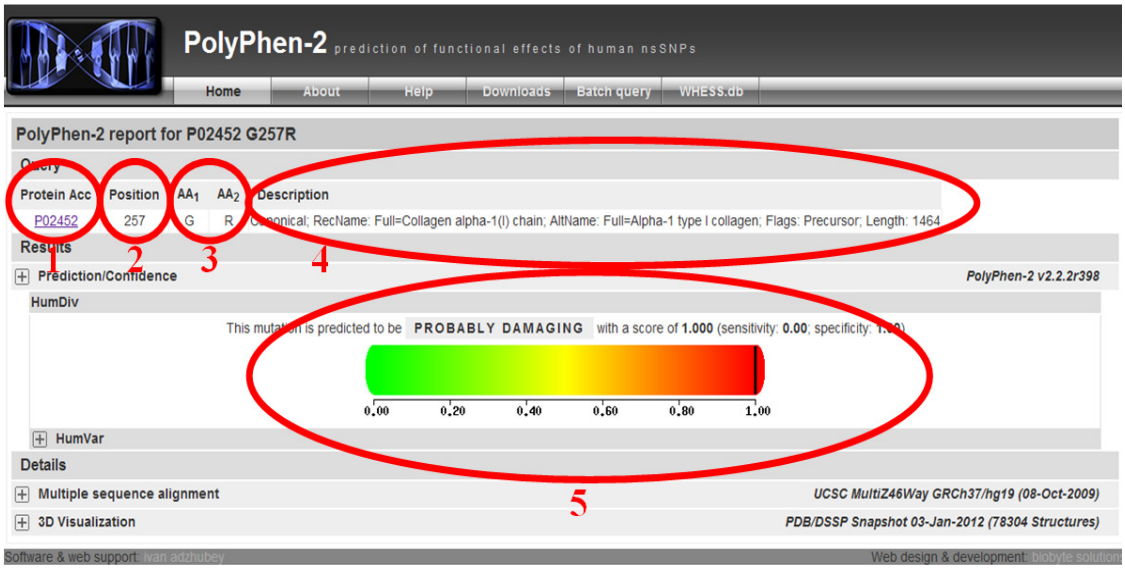


Figura 20. Tela de resultado do banco de dados PolyPhen 2. Os campos mais importantes de resultado desta ferramenta estão marcados com círculos vermelhos. No círculo 1, o número da proteína adquirido no banco de dados UniProt. O número da proteína *COL1A1* é P02452, enquanto o número da proteína *COL1A2* é P08123. O campo 2 é o local onde se insere a posição do aminoácido que foi substituído na proteína madura. No campo 3, em AA_1, o nome do aminoácido normal da posição indicada, enquanto em AA_2, o nome do aminoácido substituído. No campo 4, aparece um breve descrição da proteína com nome, símbolo, tamanho e função. No campo 5, o resultado do teste probabilístico em que o conjunto de dados foi submetido, mostrando uma barra de cores que indica a probabilidade ou possibilidade de uma dada substituição ser deletéria ou não.

Figura 21. Resultado das substituições em COL1A1 para todas as substituições encontradas. Todas deram como resultado 'Provavelmente deletério', com exceção da mutação da posição p.205, que foi considerada 'Benigna'.

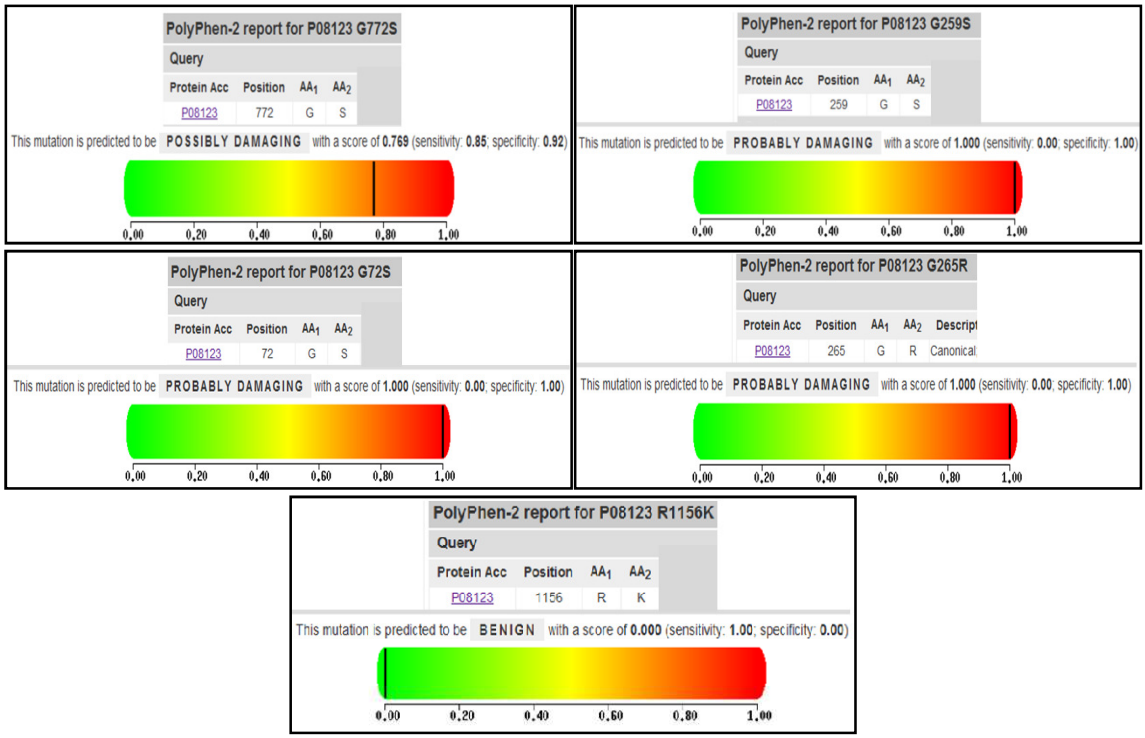


Figura 22. Resultado das substituições em *COL1A2* para todas as substituições encontradas. As mutações p.259, p.72 e p.265 retornaram resultados 'Provavelmente deletério', a mutação p.772 retornou 'Possivelmente deletério, enquanto a mutação da posição p.1156, foi considerada 'Benigna'.

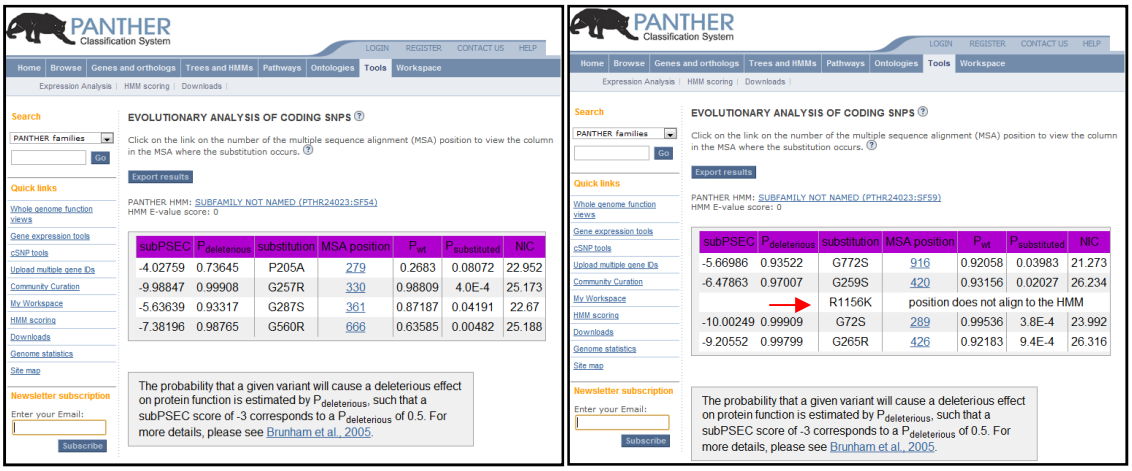


Figura 23. Resultado da analise *in silico* da ferramenta Panther. O algoritmo desta ferramenta prevê que dada mutação tem seu efeito deletério na proteína final se o valor de $P_{deleterious}$ for menor que 0,5, enquanto o valor de subSPEC for menor que -3. O quadro à esquerda mostra os dados das mutações de COL1A1, enquanto o quadro à direita mostra os dados de COL1A2. Todas as mutações inseridas foram consideradas deletérias para a proteína, com exceção da posição p.1156 de COL1A2 (seta) que não se alinhou ao banco de dados. Esta região corresponde ao domiínio C-terminal que é clivada no colágeno maduro, o que não é levado em consideração neste banco.

Tabela 12. Resultados das análises in silico das mutações pontuais encontradas nos genes do colágeno tipo I

Probando	Mutpred	SNPs&GO	PolyPhen2	Panther	Escala Grantham
D	0,953	RI 8 - Disease	0,769	-5,66986	56
E - ***COL1A1***	0,610	RI 3 - Disease	0,007	-4,02759	27
E - ***COL1A2***	0,963	RI 9 - Disease	1	-6,47863	56
F	0,963	RI 9 - Disease	1	-6,47863	56
G	0,523	RI 8 - Neutral	0	-	26
H	0,994	RI 10 - Disease	1	-9,98847	125
I	0,990	RI 8 - Disease	1	-10,00249	56
J	0,981	RI 9 - Disease	1	-9,20552	125
K	0,986	RI 10 - Disease	0,999	-5,63639	56
L	0,997	RI 10 - Disease	1	-7,38196	125

SNPs&GO - RI, índice de confiabilidade da previsão (pontuando de 0 para pouco confiável a 10 confiável); PolyPhen2e MutPred – valores em probabilidade, quanto mais perto de 1, maior a probabilidade da mutação ser patogênica; Panther - Valores de subPSEC menores que -3 consideram a substituição deletéria; escala de Grantham - "moderadamente conservativa" (valores entre 51-100), "moderadamente radical" (valores entre 101-150).

DISCUSSÃO

Neste estudo, identificamos 11 mutações em famílias brasileiras com OI autossômica dominante que apresenta fenótipos dos tipos I e IV OI de acordo com os critérios de classificação originais de Sillence. A maioria dos pacientes tem um dos *locus* de colágeno tipo I com mutação pontual no domínio de tríplice hélice, o que leva a ruptura do polímero peptídico (Gly - X - Y)n, que resulta em uma matriz de colágeno disfuncional no osso e tecido conjuntivo, ou nas regiões C- e N-terminais. Do total de mutações, encontramos duas mutações gênicas complexas com mudança da matriz de leitura, que ainda não foram elucidadas, envolvendo um trecho de vários pares de base de DNA e comprometendo a posição de vários aminoácidos. Em uma família não encontramos mutação. Estas últimas famílias precisam ser mais bem analisadas com o estudo do gDNA, para cobrir regiões do gene que não temos acesso apenas com o cDNA. Das nove mutações *missense* encontradas, cinco já foram descritos na literatura, e quatro são inéditas. Todos estes resíduos são altamente conservados em outras sequências de proteínas pré-colagenas em humanos ou outros vertebrados, confirmando a importância destas posições específicas nas propriedades e nas funções da proteína madura. As mutações que não estão presentes no domínio da tripla hélice não alinhavam com todos os pró-colágenos dos vertebrados, mas na maioria das espécies e nas outras isoformas humanas esta posição era conservada, sugerindo que a pressão evolutiva sobre estas regiões específicas é menor que na tríplice hélice, porém causam OI. Nenhuma das mutações encontradas era do tipo nula, e como consequência, todos os pacientes tiveram expressão de transcritos e de proteína, assim como as células eram imunoreativas ao ensaio de imunocitoquímica.

A mutação c.613C>G no gene ***COL1A1*** foi descrita por Spotila *et al*., 1994 (107). Este é um caso raro de mutação em que o aminoácido substituído na doença não é a glicina,

mas um aminoácido na posição Y do trímero Gly-X-Y. Apesar desta característica atípica, o paciente descrito tem um fenótipo típico de OI, apresentando escoliose, dilatação aórtica e sindactilia. Até agora, sete alterações neste sítio foram notificados, com OI letal tipo II e síndrome de Bruck tipo 3 (108). O exon oito de ***COL1A1*** tem 14 mutações descritas, com 11 variantes únicas (109).

A mutação c.769G> A no gene ***COL1A1*** foi descrita por Redford-Badwal *et al*., 1996 (110) e, até agora, 29 mutações de novo foram relatadas neste sítio, incluindo casos de tipos de OI I, IA, III e IV. Estes dados sugerem que este é um *hot spot* para mutação neste gene. O exon 11 de ***COL1A1*** tem 46 mutações já descritas, com 11 variantes únicas (109).

A mutação c.859G>A no gene ***COL1A1*** foi descrita por Kataoka *et al.*, 2007 (111). Os autores deste trabalho analisaram 22 famílias japonesas com diagnostico de OI. Até o momento, foram descritas duas mutações neste sítio, com OI tipos I e III. O exon 13 de ***COL1A1*** tem sete mutações únicas catalogadas (109).

A mutação c.1678G>A no gene ***COL1A1*** foi descrita por Mackay *et al.*, 1993 (112). Até agora, 12 alterações neste sítio foram notificadas no banco de dados de colágeno, incluindo casos de tipos de OI I, III e IV. Outras duas alterações de nucleotídeos foram relatadas na mesma posição: c.1678G> T, embora o resíduo modificado não fosse serina, mas cisteína, resultando em OI moderada tipo IV (113), e c.1678G> C, com substituição de glicina para arginina, associado à OI letal tipo II (114). Estes dados mostram que não só a posição das mutações, mas também o tipo de aminoácido que substitui a glicina é crucial para determinar a gravidade clínica do fenótipo (112). O exon 25 de ***COL1A1*** tem 36 mutações descritas, sendo 15 variantes únicas (109).

A mutação c.214G>A é inédita e está presente no domínio propeptídeo N-terminal de ***COL1A2***. Esta localização é rara, pois a grande maioria das mutações que causam fenótipo de OI estão localizadas no domínio da tríplice hélice, onde o arranjo de glicina é mais rígido e causa defeitos na conformação final da proteína madura. Esta região corresponde à região globular que é clivada na matriz extracelular, sendo um dos últimos domínios a ser enovelado e conformado na estrutura inicial do colágeno tipo I, que começa a formar o heterotrímero na região C-terminal. Apesar desta característica atípica, o paciente apresenta todas as manifestações fenotípicas de OI, como fraturas de repetição em membros superiores e inferiores, clavículas, esclera azulada, DI e hipoacusia.

A mutação c.775G>A, localizada no domínio da tríplice hélice do gene ***COL1A2*** é inédita e apareceu em duas famílias, a Família E, que apresenta duas mutações, e a família F. Pelas características clínicas (fenótipo evidente de OI) e moleculares (substituição de glicina) típicas que os pacientes apresentam, consideramos esta mutação patogênica. Estes pacientes aparentemente não têm nenhum nível de parentesco pelos registros clínicos que dispomos. Este fato nos faz supor um possível mecanismo de efeito fundador desta mutação, onde um antepassado comum possa ter dado origem às duas famílias no passado, mas este dado não foi comprovado. O exon 16 do gene ***COL1A2*** tem nove mutações descritas até hoje e quatro mutações são variantes únicas (109).

A mutação, c.793G> C é inédita e está localizada no domínio da tríplice hélice de ***COL1A2***. Esta mutação parece levar a um tipo não grave da doença. O paciente descrito tem OI leve tipo I e, embora ande com muletas e apresente algumas fraturas ósseas, após a puberdade houve uma diminuição na taxa de fraturas e nenhuma deformidade. O exon 17 de ***COL1A2*** tem 41 mutações descritas, sendo 19 únicas (109).

A mutação c.2314G>A foi descrita por Nuytinck *et al*., 1997 (115). Até agora, 10 alterações neste sítio foram notificadas, incluindo casos de tipos de OI I, III e IV. O exon 38 do ***COL1A2*** tem 19 mutações na lista de variantes, com sete variantes únicas (109).

A mutação c.3467G>A é inédita e está localizada no domínio propeptídeo C-terminal do gene ***COL1A2***. Esta região é critica para a montagem da proteína, pois as chaperonas específicas de colágeno começam a modelar o enovelamento da proteína nesta região, que vai se alongando em direção à região N-terminal. Desta forma, mutações nesta região atrasam o correto arranjo do heterotrímero e fazem com que ocorra excesso de modificações pós-traducionais nas porções não enoveladas da proteína, levando a uma desorganização da tríplice hélice e da matriz extracelular por consequência. O exon 49 de COL1A2 é o último a codificar o domínio da tríplice hélice e tem 27 mutações descritas, sendo 22 variantes únicas (109).

As famílias B e C apresentaram mutações gênicas, onde uma porção grande do DNA foi alterada, envolvendo alteração na matriz de leitura e consequentemente a posição de vários aminoácidos. Estas mutações se apresentaram de forma heterozigota, pois um alelo dos pacientes era normal e se alinhavam aos controles, enquanto uma pequena faixa no eletroferograma do sequenciamento se mostrada com picos duplos, sugerindo algum tipo de inserção ou deleção gênica nesta região. Não conseguimos estabelecer qual nucleotídeo(s) está(ão) envolvidos nesta alteração. Uma suposição é que a mutação esteja presente numa região intrônica perto da junção de um exon e outro, o que pode levar a erro de leitura da RNA polimerase que vai traduzir o gDNA para mRNA. Como utilizamos apenas cDNA destes pacientes, não foi possível uma analise dos introns destes casos específicos.

Na família A não encontramos nenhuma mutação nos genes que codificam o colágeno tipo I. Possivelmente o gene envolvido é algum gene regulador ou chaperona de colágeno, cuja mutação também causa fenótipo de OI. Surpreendemente a família A teve a maior hiperexpressão relativa dentre todos os pacientes, e o ensaio de imunocitoquímica sugere que o gene mutado seja o ***COL1A2***, pelo padrão desorganizado das fibras (Figura 11). É necessário realizar estudo de gDNA das famílias A, B e C para cobrir regiões intrônicas ou promotoras do gene, que são editadas e eliminadas com o cDNA, para buscar possíveis sítios de mutação neste gene.

O aminoácido glicina tem um radical de apenas um hidrogênio e é o menor de todos os aminoácidos. Esta característica é essencial para a estabilidade da tríplice hélice e do polipeptídeo (Gly - X - Y)n. Todos os radicais H^+ fazem pontes de hidrogênio na porção interna da hélice, deixando os radicais dos resíduos nas posições X e Y livres para interagir com outras fibrilas de colágeno, proteínas não-colágenas ou células na matriz extracelular (47). As substituições de arginina nos pacientes H, J e L levam a OI tipos I e IV, e a substituição de serina nos pacientes D, E, I e K levam à OI tipos I e IV. O radical do resíduo de arginina consiste de uma cadeia linear alifática com três carbonos com a extremidade distal encapada por um grupo guanidina, enquanto que a serina tem um grupo hidroxila curto, resultando em um aminoácido polar. Uma vez que a glicina é um aminoácido neutro e não-polar, a carga elétrica positiva de arginina e a natureza polar de serina podem desestabilizar o arranjo fibrilar. A cadeia de tamanho maior destes aminoácidos substituídos provavelmente interfere nas ligações internas de pontes de hidrogênio, resultando em uma angulação no local onde a glicina estaria ligada na porção interna da hélice. Mutações em diferentes pontos ao longo da tríplice hélice são suscetíveis

a interagir por meios distintos com enzimas ou proteínas modificadoras e resultar em diferentes fenótipos. Mesmo mutações na mesma posição no domínio de tríplice hélice poderia interromper ligação a chaperonas específicas do colágeno ou proteínas com ação pós-traducionais. Isso poderia explicar a variação acentuada nas características clínicas da OI em diferentes pacientes com mutações nas mesmas posições do gene (30).

Todos os pacientes expressam o mRNA mutante e os transcritos de colágeno nos pacientes estava hiperexpressos considerando todos os genes de referência. Esta hiperexpressão pode ser uma tentativa de compensar a taxa de transcritos mutantes de ***COL1A1*** e ***COL1A2*** no tecido conjuntivo, mas este mecanismo não está claro. O colágeno desempenha um papel muito importante em uma grande variedade de tecidos, mas no tecido ósseo e conjuntivo é fundamental para fazer a sustentação mecânica das células, macromoléculas e do arranjo apropriado do tecido. Supomos que o nível de expressão elevado dos transcritos de ***COL1A1*** e ***COL1A2*** em pacientes com OI seja uma tentativa de compensar uma maior degradação da proteína mutante, e a redução da sua meia-vida. Uma vez que a expressão do colágeno diminui com o aumento da idade cronológica (116). Para excluir a possibilidade de que controles com idade avançada e nível reduzido de expressão possam alterar o resultado da expressão dos pacientes, foi realizada a análise de transcritos com extrato de mRNA de fibroblastos obtidos a partir de crianças submetidas a postectomia. Os controles 1 a 3 têm média de idade de oito anos, enquanto o controle quatro é adulto submetido a blefaroplastia. Mesmo com os níveis altos de expressão dos controles jovens, o grupo de pacientes manteve uma expressão significativamente maior comparado ao grupo controle. Como esperado, não houve decaimento de mRNA,

demonstrado pela quantificação relativa dos transcritos com mutação *missense*, sem queda de expressão.

Em contraste com a hiperexpressão dos transcritos de colágeno, a expressão proteica não teve diferença significativa entre o grupo de controles e pacientes. Todos os pacientes têm a expressão da proteína semelhante aos controles, não mostrando qualquer diferença entre o gene mutado envolvido ou a classificação da doença. A migração das cadeias α1(I) e α2(I) em SDS-PAGE não foram atrasadas, sugerindo a falta de modificações pós-traducionais nas proteínas mutantes. A retenção das proteínas no retículo endoplasmático encontrado na imunocitoquímica pode explicar a diferença encontrada na hiperexpressão de mRNA e a expressão normal das proteínas. A incorporação das cadeias de colágeno mutantes pode ser regulada no retículo, e um *feedback* negativo pode estar envolvido na maturação da proteína e na expressão dos transcritos no retículo. Observamos uma supermodificação da banda de proα1(I) no paciente D, o que sugere um enovelamento atrasado do colágeno que pode estar associado com a gravidade da doença (47).

O ensaio de imunocitoquímica revela que as células de todos os pacientes são imunoreativas com os anticorpos anti-COL1A1 e anti-COL1A2, demonstrando a expressão de todas as proteínas mutantes, como esperado. O padrão do colágeno nos controles foi de fibras alongadas, distribuídos por todo o citoplasma, simulando o citoesqueleto. Quando a proteína mutante foi corada, um padrão diferente foi observado, mostrando desorganização de fibrilas e em alguns pacientes, observou-se um agregado de proteína na região perinuclear, sugerindo uma retenção no retículo endoplasmático. Um atraso no enovelamento do heterotrímero pode resultar em excesso de modificações pós-traducionais na região da tríplice hélice, e as cadeias procolágeno mutantes remanescentes, podem ser

incapazes de incorporar em heterotrímeros. Estas cadeias podem ser retrotranslocadas no citosol e degradadas. Em uma via alternativa, o procolágeno anormal pode ser secretado, processado e incorporado na matriz extracelular (47). Estas formas diferentes de processamento do colágeno tipo I podem explicar a diferença nos padrões de textura e localização das proteínas mutantes nas células.

Os estudos *in silico* confirmaram a o poder deletério da maioria das mutações, com exceção da mutação da posição R1156K (probando G), que foi considerada neutra e com baixa probabilidade de ser deletéria nos diversos métodos. Porém a mutação está localizada num domínio essencial para a montagem da tríplice hélice do colágeno. A montagem da estrutura tridimensional do colágeno começa a partir da região mais distal C-terminal e vai em direção à região N-terminal, contrário à maioria das proteínas. A mutação nesta região pode atrasar a polimerização das três cadeias polipeptídicas, deixando as regiões não enoveladas disponíveis para mudanças pós-transcricionais, como hidroxilação e adição de carboidratos, impossibilitando a montagem final da estrutura. Portanto, consideramos esta mutação deletéria e causou OI no probando G. As análises *in silico* são mais uma ferramenta útil para determinar o efeito patogênico das mutações que encontramos nos pacientes com OI.

CONCLUSÃO

Neste estudo apresentamos um estudo funcional e molecular em famílias brasileiras com OI com mutações em genes que codificam o colágeno tipo I levando a diferentes fenótipos. Nenhuma correlação entre genótipo e fenótipo foi encontrada.

Encontramos hiperexpressão dos transcritos de colágeno de tipo I, mas nenhuma diferença na expressão da proteína em pacientes OI quando comparada com os controles. A proteína mutante apresenta alterações morfológicas mensuráveis que podem ser quantificadas. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de regulação do RNA e seu significado funcional. Este estudo contribui para a compreensão da determinação dos genótipos dos OI famílias brasileiras e também revela novos dados sobre a expressão de colágeno.

REFERÊNCIAS

1. Smith R. Osteogenesis imperfecta: from phenotype to genotype and back again. Int J Exp Pathol. 1994 Aug;75(4):233-41.

2. Byers T, Levin B, Rothenberger D, Dodd GD, Smith RA. American Cancer Society guidelines for screening and surveillance for early detection of colorectal polyps and cancer: Update 1997. Ca-Cancer J Clin. 1997 May-Jun;47(3):154-&.

3. Marini JC, Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, San Antonio JD, Milgrom S, et al. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. Hum Mutat. 2007 Mar;28(3):209-21.

4. Byers PC, WG. Osteogenesis Imperfecta. In: Steinmann B, editor. Connective tissue and it heritable disorders: molecular, genetic, and medical aspects. New York: Wiley-Liss; 2002. p. 285-430.

5. Makareeva E, Aviles NA, Leikin S. Chaperoning osteogenesis: new protein-folding disease paradigms. Trends Cell Biol. 2011 Mar;21(3):168-76.

6. Sillence DO, Senn A, Danks DM. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. J Med Genet. 1979 Apr;16(2):101-16.

7. Sykes B, Ogilvie D, Wordsworth P, Wallis G, Mathew C, Beighton P, et al. Consistent linkage of dominantly inherited osteogenesis imperfecta to the type I collagen loci: COL1A1 and COL1A2. Am J Hum Genet. 1990 Feb;46(2):293-307.

8. Byers PH, Bonadio JF. The nature, characterization and phenotypic effects of mutations that affect collagen structure and processing. In: Olsen BR, Nimni M, editors.

Collagen: Biochemistry, Biotechnology, and Molecular Biology. Boca Raton, FL: CRC; 1989.

9. Chu ML, Prockop DJ. Collagen: gene structure. In: Royce PM, Steinmann B, editors. Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic and medical aspects. New York: Wiley-Liss; 2002. p. 223-48.

10. Bateman JF, Chan D, Mascara T, Rogers JG, Cole WG. Collagen defects in lethal perinatal osteogenesis imperfecta. Biochem J. 1986 Dec 15;240(3):699-708.

11. D'Souza-Li L. Osteogênese Imperfeita - Aspectos clínicos. Atheneu. [Book]. 2006;1:513-7.

12. Von Der Mark K. Structure, Biosynthesis and Gene Regulation of Collagens in Cartilage and Bone. In: Seibel MJR, P.S.; Bilezikian, J.P., editor. Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism Principles and Clinical Applications. 2 ed. London: Academic Press; 2006. p. 3-19.

13. Byers PH. Disorders of collagen biosynthesis and structure. In: Scriver CRea, editor. The metabolic basis of inherited disease. 6 ed. New York: McGraw-Hill Book Company; 1997. p. 2805-42.

14. Staatz WD, Rajpara SM, Wayner EA, Carter WG, Santoro SA. The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg++-dependent adhesion of platelets to collagen. J Cell Biol. 1989 May;108(5):1917-24.

15. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. J Cell Sci. 2005 Apr 1;118(Pt 7):1341-53.

16. Koide T, Nagata K. Collagen Biosynthesis. In: Brinckmann J, Notbohm H, Muller PK, editors. Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2005. p. 85-114.

17. Ramirez-Alvarado M. Principles of protein misfolding. Prog Mol Biol Transl Sci. 2008;84:115-60.

18. Willaert A, Malfait F, Symoens S, Gevaert K, Kayserili H, Megarbane A, et al. Recessive osteogenesis imperfecta caused by LEPRE1 mutations: clinical documentation and identification of the splice form responsible for prolyl 3-hydroxylation. J Med Genet. 2009 Apr;46(4):233-41.

19. Baldridge D, Schwarze U, Morello R, Lennington J, Bertin TK, Pace JM, et al. CRTAP and LEPRE1 mutations in recessive osteogenesis imperfecta. Hum Mutat. 2008 Dec;29(12):1435-42.

20. Morello R, Rauch F. Role of cartilage-associated protein in skeletal development. Curr Osteoporos Rep. 2010 Jun;8(2):77-83.

21. Chang W, Barnes AM, Cabral WA, Bodurtha JN, Marini JC. Prolyl 3-hydroxylase 1 and CRTAP are mutually stabilizing in the endoplasmic reticulum collagen prolyl 3-hydroxylation complex. Hum Mol Genet. 2010 Jan 15;19(2):223-34.

22. Vranka JA, Sakai LY, Bachinger HP. Prolyl 3-hydroxylase 1, enzyme characterization and identification of a novel family of enzymes. J Biol Chem. 2004 May 28;279(22):23615-21.

23. Jarnum S, Kjellman C, Darabi A, Nilsson I, Edvardsen K, Aman P. LEPREL1, a novel ER and Golgi resident member of the Leprecan family. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Apr 30;317(2):342-51.

24. Price ER, Zydowsky LD, Jin MJ, Baker CH, McKeon FD, Walsh CT. Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Mar 1;88(5):1903-7.

25. Patterson CE, Gao J, Rooney AP, Davis EC. Genomic organization of mouse and human 65 kDa FK506-binding protein genes and evolution of the FKBP multigene family. Genomics. 2002 Jun;79(6):881-9.

26. Alanay Y, Avaygan H, Camacho N, Utine GE, Boduroglu K, Aktas D, et al. Mutations in the Gene Encoding the RER Protein FKBP65 Cause Autosomal-Recessive Osteogenesis Imperfecta. Am J Hum Genet. 2010 Oct 8;87(4):572-3.

27. Shaheen R, Al-Owain M, Faqeih E, Al-Hashmi N, Awaji A, Al-Zayed Z, et al. Mutations in FKBP10 cause both Bruck syndrome and isolated osteogenesis imperfecta in humans. Am J Med Genet A. 2011 Jun;155A(6):1448-52.

28. Clarke EP, Cates GA, Ball EH, Sanwal BD. A collagen-binding protein in the endoplasmic reticulum of myoblasts exhibits relationship with serine protease inhibitors. J Biol Chem. 1991 Sep 15;266(26):17230-5.

29. Ikegawa S, Nakamura Y. Structure of the gene encoding human colligin-2 (CBP2). Gene. 1997 Jul 31;194(2):301-3.

30. Christiansen HE, Schwarze U, Pyott SM, AlSwaid A, Al Balwi M, Alrasheed S, et al. Homozygosity for a missense mutation in SERPINH1, which encodes

the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta. Am J Hum Genet. 2010 Mar 12;86(3):389-98.

31. Gao Y, Jheon A, Nourkeyhani H, Kobayashi H, Ganss B. Molecular cloning, structure, expression, and chromosomal localization of the human Osterix (SP7) gene. Gene. 2004 Oct 27;341:101-10.

32. Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrugghe B, Nakashima K, et al. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. Nat Med. 2005 Aug;11(8):880-5.

33. Lapunzina P, Aglan M, Temtamy S, Caparros-Martin JA, Valencia M, Leton R, et al. Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. Am J Hum Genet. 2010 Jul 9;87(1):110-4.

34. Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Feb 15;90(4):1526-30.

35. Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. Nat Med. 2002 Apr;8(4):349-57.

36. Tombran-Tink J, Mazuruk K, Rodriguez IR, Chung D, Linker T, Englander E, et al. Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. Mol Vis. 1996 Nov 4;2:11.

37. Meyer C, Notari L, Becerra SP. Mapping the type I collagen-binding site on pigment epithelium-derived factor. Implications for its antiangiogenic activity. J Biol Chem. 2002 Nov 22;277(47):45400-7.

38. Becker J, Semler O, Gilissen C, Li Y, Bolz HJ, Giunta C, et al. Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. Am J Hum Genet. 2011 Mar 11;88(3):362-71.

39. Tombran-Tink J, Barnstable CJ. Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Apr 2;316(2):573-9.

40. Quan GM, Ojaimi J, Li Y, Kartsogiannis V, Zhou H, Choong PF. Localization of pigment epithelium-derived factor in growing mouse bone. Calcif Tissue Int. 2005 Feb;76(2):146-53.

41. Martinez-Glez V, Valencia M, Caparros-Martin JA, Aglan M, Temtamy S, Tenorio J, et al. Identification of a mutation causing deficient BMP1/mTLD proteolytic activity in autosomal recessive osteogenesis imperfecta. Hum Mutat. 2012 Feb;33(2):343-50.

42. Bond JS, Beynon RJ. The astacin family of metalloendopeptidases. Protein Sci. 1995 Jul;4(7):1247-61.

43. Scott IC, Blitz IL, Pappano WN, Imamura Y, Clark TG, Steiglitz BM, et al. Mammalian BMP-1/Tolloid-related metalloproteinases, including novel family member mammalian Tolloid-like 2, have differential enzymatic activities and distributions of

expression relevant to patterning and skeletogenesis. Dev Biol. 1999 Sep 15;213(2):283-300.

44. Zlotogora J. Germ line mosaicism. Hum Genet. 1998 Apr;102(4):381-6.

45. Monti E, Mottes M, Fraschini P, Brunelli P, Forlino A, Venturi G, et al. Current and emerging treatments for the management of osteogenesis imperfecta. Ther Clin Risk Manag. 2010;6:367-81.

46. Chamberlain JR, Schwarze U, Wang PR, Hirata RK, Hankenson KD, Pace JM, et al. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. Science. 2004 Feb 20;303(5661):1198-201.

47. Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, Marini JC. New perspectives on osteogenesis imperfecta. Nat Rev Endocrinol. 2011 Sep;7(9):540-57.

48. Hartikka H, Kuurila K, Korkko J, Kaitila I, Grenman R, Pynnonen S, et al. Lack of correlation between the type of COL1A1 or COL1A2 mutation and hearing loss in osteogenesis imperfecta patients. Hum Mutat. 2004 Aug;24(2):147-54.

49. Pyeritz RE, Levin LS. Aortic root dilatation and valvular dysfunction in osteogenesis imperfecta. Circulation. 1981;64(IV-311).

50. Hortop J, Tsipouras P, Hanley JA, Maron BJ, Shapiro JR. Cardiovascular involvement in osteogenesis imperfecta. Circulation. 1986 Jan;73(1):54-61.

51. Riedner ED, Levin LS, Holliday MJ. Hearing patterns in dominant osteogenesis imperfecta. Arch Otolaryngol. 1980 Dec;106(12):737-40.

52. Pedersen U, Bramsen T. Central corneal thickness in osteogenesis imperfecta and otosclerosis. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 1984;46(1):38-41.

53. Hansen B, Jemec GB. The mechanical properties of skin in osteogenesis imperfecta. Arch Dermatol. 2002 Jul;138(7):909-11.

54. Waltimo-Siren J, Kolkka M, Pynnonen S, Kuurila K, Kaitila I, Kovero O. Craniofacial features in osteogenesis imperfecta: a cephalometric study. Am J Med Genet A. 2005 Mar 1;133A(2):142-50.

55. Levin LS, Salinas CF, Jorgenson RJ. Classification of osteogenesis imperfecta by dental characteristics. Lancet. 1978 Feb 11;1(8059):332-3.

56. Barnes AM, Chang W, Morello R, Cabral WA, Weis M, Eyre DR, et al. Deficiency of cartilage-associated protein in recessive lethal osteogenesis imperfecta. N Engl J Med. 2006 Dec 28;355(26):2757-64.

57. Takagi M, Hori N, Chinen Y, Kurosawa K, Tanaka Y, Oku K, et al. Heterozygous C-propeptide mutations in COL1A1: osteogenesis imperfecta type IIC and dense bone variant. Am J Med Genet A. 2011 Sep;155A(9):2269-73.

58. Remigio PA, Grinvalsky HT. Osteogenesis imperfecta congenita. Association with conspicuous extraskeletal connective tissue dysplasia. Am J Dis Child. 1970 Jun;119(6):524-8.

59. Levin LS, Rosenbaum KN, Brady JM, Dorst JP. Osteogenesis imperfecta lethal in infancy: case report and scanning electron microscopic studies of the deciduous teeth. Am J Med Genet. 1982 Dec;13(4):359-68.

60. Trelstad RL, Rubin D, Gross J. Osteogenesis imperfecta congenita: evidence for a generalized molecular disorder of collagen. Lab Invest. 1977 May;36(5):501-8.

61. Bodian DL, Chan TF, Poon A, Schwarze U, Yang K, Byers PH, et al. Mutation and polymorphism spectrum in osteogenesis imperfecta type II: implications for genotype-phenotype relationships. Hum Mol Genet. 2009 Feb 1;18(3):463-71.

62. Muller-Hermelink HK, Steinmann G, Stein H. Structural and functional alterations of the aging human thymus. Adv Exp Med Biol. 1982;149:303-12.

63. Steinmann B, Rao VH, Vogel A, Bruckner P, Gitzelmann R, Byers PH. Cysteine in the triple-helical domain of one allelic product of the alpha 1(I) gene of type I collagen produces a lethal form of osteogenesis imperfecta. J Biol Chem. 1984 Sep 10;259(17):11129-38.

64. Cohn DH, Byers PH, Steinmann B, Gelinas RE. Lethal osteogenesis imperfecta resulting from a single nucleotide change in one human pro alpha 1(I) collagen allele. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Aug;83(16):6045-7.

65. Tsipouras P, Bonadio JF, Schwartz RC, Horwitz A, Byers PH. Osteogenesis imperfecta type II is usually due to new dominant mutations. Am J Hum Genet. 1985;37:A79.

66. Horwitz AL, Lazda V, Byers PH. Recurrent type II (lethal) osteogenesis imperfecta: apparent dominant inheritance. Am J Hum Genet. 1985;37:A59.

67. Sillence DO, Barlow KK, Cole WG, Dietrich S, Garber AP, Rimoin DL. Osteogenesis imperfecta type III. Delineation of the phenotype with reference to genetic heterogeneity. Am J Med Genet. 1986 Mar;23(3):821-32.

68. Peltonen L, Palotie A, Prockop DJ. A defect in the structure of type I procollagen in a patient who had osteogenesis imperfecta: excess mannose in the COOH-terminal propeptide. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Oct;77(10):6179-83.

69. Beighton P, Versfeld GA. On the paradoxically high relative prevalence of osteogenesis imperfecta type III in the black population of South Africa. Clin Genet. 1985 Apr;27(4):398-401.

70. Viljoen D, Beighton P. Osteogenesis imperfecta type III: an ancient mutation in Africa? Am J Med Genet. 1987 Aug;27(4):907-12.

71. Viljoen DL, Nelson MM, de Jong G, Beighton P. Proteus syndrome in southern Africa: natural history and clinical manifestations in six individuals. Am J Med Genet. 1987 May;27(1):87-97.

72. Faqeih E, Roughley P, Glorieux FH, Rauch F. Osteogenesis imperfecta type III with intracranial hemorrhage and brachydactyly associated with mutations in exon 49 of COL1A2. Am J Med Genet A. 2009 Mar;149A(3):461-5.

73. Bonod-Bidaud C, Beraud M, Vaganay E, Delacoux F, Font B, Hulmes DJ, et al. Enzymatic cleavage specificity of the proalpha1(V) chain processing analysed by site-directed mutagenesis. Biochem J. 2007 Jul 15;405(2):299-306.

74. Ge G, Greenspan DS. Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases. Birth Defects Res C Embryo Today. 2006 Mar;78(1):47-68.

75. Kamoun-Goldrat A, Pannier S, Huber C, Finidori G, Munnich A, Cormier-Daire V, et al. A new osteogenesis imperfecta with improvement over time maps to 11q. Am J Med Genet A. 2008 Jul 15;146A(14):1807-14.

76. Bauze RJ, Smith R, Francis MJ. A new look at osteogenesis imperfecta. A clinical, radiological and biochemical study of forty-two patients. J Bone Joint Surg Br. 1975 Feb;57(1):2-12.

77. Francis MJ, Bauze RJ, Smith R. Osteogenesis imperfecta: a new classification. Birth Defects Orig Artic Ser. 1975;11(6):99-102.

78. Johnson MT, Morrison S, Heeger S, Mooney S, Byers PH, Robin NH. A variant of osteogenesis imperfecta type IV with resolving kyphomelia is caused by a novel COL1A2 mutation. J Med Genet. 2002 Feb;39(2):128-32.

79. Wenstrup RJ, Hunter AG, Byers PH. Osteogenesis imperfecta type IV: evidence of abnormal triple helical structure of type I collagen. Hum Genet. 1986 Sep;74(1):47-53.

80. Glorieux FH, Rauch F, Plotkin H, Ward L, Travers R, Roughley P, et al. Type V osteogenesis imperfecta: a new form of brittle bone disease. J Bone Miner Res. 2000 Sep;15(9):1650-8.

81. Zeitlin L, Rauch F, Travers R, Munns C, Glorieux FH. The effect of cyclical intravenous pamidronate in children and adolescents with osteogenesis imperfecta type V. Bone. 2006 Jan;38(1):13-20.

82. Glorieux FH, Ward LM, Rauch F, Lalic L, Roughley PJ, Travers R. Osteogenesis imperfecta type VI: a form of brittle bone disease with a mineralization defect. J Bone Miner Res. 2002 Jan;17(1):30-8.

83. Alanay Y, Avaygan H, Camacho N, Utine GE, Boduroglu K, Aktas D, et al. Mutations in the gene encoding the RER protein FKBP65 cause autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. Am J Hum Genet. 2010 Apr 9;86(4):551-9.

84. Labuda M, Morissette J, Ward LM, Rauch F, Lalic L, Roughley PJ, et al. Osteogenesis imperfecta type VII maps to the short arm of chromosome 3. Bone. 2002 Jul;31(1):19-25.

85. Morello R, Bertin TK, Chen Y, Hicks J, Tonachini L, Monticone M, et al. CRTAP is required for prolyl 3- hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. Cell. 2006 Oct 20;127(2):291-304.

86. Ward LM, Rauch F, Travers R, Chabot G, Azouz EM, Lalic L, et al. Osteogenesis imperfecta type VII: an autosomal recessive form of brittle bone disease. Bone. 2002 Jul;31(1):12-8.

87. Cabral WA, Chang W, Barnes AM, Weis M, Scott MA, Leikin S, et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. Nat Genet. 2007 Mar;39(3):359-65.

88. Wallis GA, Sykes B, Byers PH, Mathew CG, Viljoen D, Beighton P. Osteogenesis imperfecta type III: mutations in the type I collagen structural genes, COL1A1 and COL1A2, are not necessarily responsible. J Med Genet. 1993 Jun;30(6):492-6.

89. van Dijk FS, Nesbitt IM, Zwikstra EH, Nikkels PG, Piersma SR, Fratantoni SA, et al. PPIB mutations cause severe osteogenesis imperfecta. Am J Hum Genet. 2009 Oct;85(4):521-7.

90. Barnes AM, Carter EM, Cabral WA, Weis M, Chang W, Makareeva E, et al. Lack of cyclophilin B in osteogenesis imperfecta with normal collagen folding. N Engl J Med. 2010 Feb 11;362(6):521-8.

91. Homan EP, Rauch F, Grafe I, Lietman C, Doll JA, Dawson B, et al. Mutations in SERPINF1 cause osteogenesis imperfecta type VI. J Bone Miner Res. 2011 Dec;26(12):2798-803.

92. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell. 2002 Jan 11;108(1):17-29.

93. Korkko J, Ala-Kokko L, De Paepe A, Nuytinck L, Earley J, Prockop DJ. Analysis of the COL1A1 and COL1A2 genes by PCR amplification and scanning by conformation-sensitive gel electrophoresis identifies only COL1A1 mutations in 15 patients with osteogenesis imperfecta type I: identification of common sequences of null-allele mutations. Am J Hum Genet. 1998 Jan;62(1):98-110.

94. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5463-7.

95. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1;25(17):3389-402.

96. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. Nucleic Acids Res. 2003 Jul 1;31(13):3812-4.

97. Stenson PD, Ball EV, Howells K, Phillips AD, Mort M, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: providing a comprehensive central mutation database for molecular diagnostics and personalized genomics. Hum Genomics. 2009 Dec;4(2):69-72.

98. Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter MC, Estreicher A, Gasteiger E, et al. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. Nucleic Acids Res. 2003 Jan 1;31(1):365-70.

99. Li B, Krishnan VG, Mort ME, Xin F, Kamati KK, Cooper DN, et al. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. Bioinformatics. 2009 Nov 1;25(21):2744-50.

100. Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. Hum Mutat. 2009 Aug;30(8):1237-44.

101. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. Nucleic Acids Res. 2002 Sep 1;30(17):3894-900.

102. Sunyaev SR, Eisenhaber F, Rodchenkov IV, Eisenhaber B, Tumanyan VG, Kuznetsov EN. PSIC: profile extraction from sequence alignments with position-specific counts of independent observations. Protein Eng. 1999 May;12(5):387-94.

103. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods. 2010 Apr;7(4):248-9.

104. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. Genome Res. 2003 Sep;13(9):2129-41.

105. Thomas PD, Kejariwal A. Coding single-nucleotide polymorphisms associated with complex vs. Mendelian disease: evolutionary evidence for differences in molecular effects. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct 26;101(43):15398-403.

106. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. Science. 1974 Sep 6;185(4154):862-4.

107. Spotila LD, Colige A, Sereda L, Constantinou-Deltas CD, Whyte MP, Riggs BL, et al. Mutation analysis of coding sequences for type I procollagen in individuals with low bone density. J Bone Miner Res. 1994 Jun;9(6):923-32.

108. Shaheen R, Al-Owain M, Sakati N, Alzayed ZS, Alkuraya FS. FKBP10 and Bruck syndrome: phenotypic heterogeneity or call for reclassification? Am J Hum Genet. 2010 Aug 13;87(2):306-7; author reply 8.

109. Dalgleish R. The human type I collagen mutation database. Nucleic Acids Res. 1997 Jan 1;25(1):181-7.

110. Redford-Badwal DA, Stover ML, Valli M, McKinstry MB, Rowe DW. Nuclear retention of COL1A1 messenger RNA identifies null alleles causing mild osteogenesis imperfecta. J Clin Invest. 1996 Feb 15;97(4):1035-40.

111. Kataoka K, Ogura E, Hasegawa K, Inoue M, Seino Y, Morishima T, et al. Mutations in type I collagen genes in Japanese osteogenesis imperfecta patients. Pediatr Int. 2007 Oct;49(5):564-9.

112. Mackay K, Byers PH, Dalgleish R. An RT-PCR-SSCP screening strategy for detection of mutations in the gene encoding the alpha 1 chain of type I collagen: application to four patients with osteogenesis imperfecta. Hum Mol Genet. 1993 Aug;2(8):1155-60.

113. Byers PH. Brittle bones--fragile molecules: disorders of collagen gene structure and expression. Trends Genet. 1990 Sep;6(9):293-300.

114. Cohen-Solal L, Zolezzi F, Pignatti PF, Mottes M. Intrafamilial variable expressivity of osteogenesis imperfecta due to mosaicism for a lethal G382R substitution in the COL1A1 gene. Mol Cell Probes. 1996 Jun;10(3):219-25.

115. Nuytinck L, Wettinck K, Freund M, Van Maldergem L, Fabry G, De Paepe A. Osteogenesis imperfecta phenotypes resulting from serine for glycine substitutions in the alpha2(I) collagen chain. Eur J Hum Genet. 1997 May-Jun;5(3):161-7.

116. Uitto J, Bernstein EF. Molecular mechanisms of cutaneous aging: connective tissue alterations in the dermis. J Investig Dermatol Symp Proc. 1998 Aug;3(1):41-4.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP.
(0_19) 3788-8936
FAX (0_19) 3788-7187
www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
cep@fcm.unicamp.br

CEP, 16/08/05.
(Grupo I)

PARECER PROJETO: N° 391/2005
CAAE: 0196.1.146.000-05

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: **"ANÁLISE GENÉTICO MOLECULAR DE FAMÍLIAS COM OSTEOGÊNESE IMPERFEITA".**
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Lilia Freire Rodrigues de Souza Li
INSTITUIÇÃO: CIPED/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/07/2005
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 26/01/06 e 26/07/06

II - OBJETIVOS

Determinar as genéticas moleculares nos genes COL1A1 ou responsáveis pelo fenótipo de osteogênese imperfeita.

III - SUMÁRIO

Serão estudados cerca de 40 pacientes atendidos nos Ambulatórios de Erros Inatos do metabolismo e de Ortopedia do HC/UNICAMP. Será realizada cultura de fibroblasto, análise bioquímica e análise molecular dos genes COL1A1 e A2.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

A nova versão do projeto e do TCLE apresentados estão de acordo com as normas, podendo ser aprovados.
Observação: Lembramos que é necessário que seja enviado ao CEP/FCM o Regulamento do Banco de Amostras Biológicas do Laboratório de Endocrinologia Pediátrica/CIPED para aprovação.

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 complementares, 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.

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

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.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de julho de 2005.

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PROJETO: **ANÁLISE GENÉTICO MOLECULAR DE FAMÍLIAS COM OSTEOGÊNESE IMPERFEITA**

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

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

ENDEREÇO: Centro de investigação em Pediatria - CIPED

Departamento de Pediatria – FCM – UNICAMP

Cidade Universitária Zeferino Vaz

Campinas – SP – CEP 13081-970

Telefone: (19) 3521-8966 Fax: (19) 3521-8972

e-mail: ldesouza@fcm.unicamp.br

Dr. Carlos Steiner – Departamento de Genética Médica – FCM – UNICAMP

ENDEREÇO: Departamento de Genética Médica – FCM – UNICAMP

Cidade Universitária Zeferino Vaz

Campinas – SP – CEP 13081-970

Telefone: (19) 3521-8903 Fax: (19) 3521-8909

e-mail: steiner@fcm.unicamp.br

Dra. Marise Lazareti Castro – Disciplina de Endocrinologia - UNIFESP

ENDEREÇO: Ambulatório de Endocrinologia

Rua Borges Lagoa 800, Vila Clementino, São Paulo.

Telefone: (11) 5573-9889

e-mail: mlazaretti@endocrino.epm.br

Dr. William Belangero – Departamento de Ortopedia e Traumatologia – FCM - UNICAMP

ENDEREÇO: Ambulatório de Ortopedia e Traumatologia

Hospital das Clínicas - UNICAMP

Cidade Universitária Zeferino Vaz

Campinas – SP - CEP 13081-970

Fone 19 3521-7750

e- mail: belanger@sigmanet.com.br

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:

Nome: Registro do Hospital:

Nome do pai: Nome da mãe:

Endereço:

Bairro: Cidade: UF:

CEP: Fone:

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu, _____, R.G.:_____, entendo que meu filho _____foi convidado a participar como voluntário de um projeto de pesquisa, aprovado pelo Comitê de Ética da FCM – UNICAMP envolvendo avaliação do perfil genético de pessoas com osteogênese imperfeita. O objetivo desta pesquisa é investigar defeitos no código genético que estejam relacionadas à doença nos indivíduos. O sangue e uma pequena amostra de pele serão colhidos para avaliação genética e da proteína a as pesquisas laboratoriais utilizando os tecidos poderão ser feitas durante um período de cinco anos após a coleta e, após sua realização, essas amostras de tecido serão destruídas. Em todas as amostras coletadas o sigilo será mantido através da identificação dos pacientes por um código. Caso houver interesse de realizar um novo projeto de pesquisa com este material, este será submetido à análise do CEP e um novo consentimento será solicitado.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que, se concordar que em meu filho participe desse estudo como voluntário, ele será submetido a coleta de sangue (10 ml, o equivalente a uma a duas colheres de sobremesa) e será

solicitado uma pequena amostra de sua pele através de uma biopsia de pele, não sendo necessária a hospitalização. As pesquisas laboratoriais utilizando a amostra de sangue deverão ser feitas durante um período de cinco anos, o qual poderá ainda ser renovado. Se neste período ele tiver que me submeter a alguma cirurgia por qualquer outro motivo, na ocasião da cirurgia poderão ser colhidas amostras dos tecidos que foram retirados (pele ou osso). As pesquisas laboratoriais utilizando as amostras coletadas poderão ser feitas durante o referido período 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. O tecido e o sangue serão preservados durante cinco anos e, ao término deste período, se ainda for necessário mantê-lo armazenado, um novo pedido será submetido ao CEP.

RISCO E DESCONFORTO:

Para a extração de DNA e dosagens bioquímicas, serão necessários cerca de 10 ml de sangue venoso, que poderão ser obtidos em uma única ou mais coletas. 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 a realizá-la. 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 a participação de meu filho neste projeto é voluntária e não obterei nenhum ganho imediato. As informações desta pesquisa em relação ao perfil genotípico estarão à minha disposição.

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados desse projeto de pesquisa, serão sigilosos. 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. A médica responsável, Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li, fone (019)3521-8966 ou (019)3521-8986 estará disponível 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) 3521-8936.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a participação nesse projeto de pesquisa é voluntária e que eu posso recusar ou retirar meu consentimento, a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue), sem qualquer prejuízo ao meu tratamento. Eu reconheço também que a Dra. Lília Freire Rodrigues de Souza Li pode interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado.

Li este termo e compreendi as informações que me foram explicadas. Concordo na participação da minha pessoa / da pessoa sob minha responsabilidade legal nesta pesquisa.

Nome do participante: _____
Assinatura do participante ou responsável: _____
Nome da testemunha:_____
Assinatura da testemunha:_____
Local e data:_____

Li este termo e concordo no armazenamento do material biológico da minha pessoa / da pessoa sob minha responsabilidade legal para esta pesquisa e para eventuais pesquisas futuras, desde que aprovadas pelo CEP.

Nome do participante: _____
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.

Nome do pesquisador:_____

Assinatura do pesquisador:_____

Local e data:_____