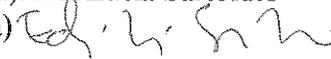


FERNANDA DE CASTRO REIS

Este exemplar corresponde à versão final da **Tese de Doutorado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) **Fernanda de Castro Reis**
Campinas, 18 de fevereiro de 2005.

Prof(a). Dr(a). Edj Lúcia Sartorato
Orientador(a)

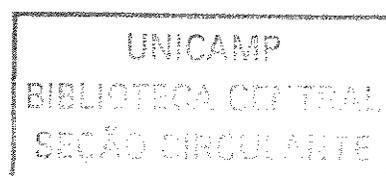


**APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE BIOLOGIA
MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO DA
*OSTEOGENESIS IMPERFECTA***

CAMPINAS

2005

i



FERNANDA DE CASTRO REIS

**APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE BIOLOGIA
MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO DA
*OSTEOGENESIS IMPERFECTA***

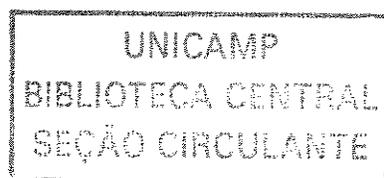
*Tese apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas,
área de concentração em Ciências Biomédicas*

Orientadora: Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

CAMPINAS

2005

iii



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	R. 277a
V	EX
TOMBO BC/	64163
PROC.	16-P-00086-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	10/06/05
Nº CPD	

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

lib id 351655

R277a

Reis, Fernanda de Castro

Aplicação das técnicas de biologia molecular no diagnóstico da osteogenesis imperfecta / Fernanda de Castro Reis. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Edi Lúcia Sartorato

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Colágeno. 2. Mutação (Biologia). I. Sartorato, Edi Lúcia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Slp/fcm

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Edi Lúcia Sartorato

Membros:

- 1. Prof. Dr. Juan Clinton Llerena Júnior**
- 2. Profa. Dra. Chong Ae Kim**
- 3. Profa. Dra. Antônia Paula Marques-de-Faria**
- 4. Profa. Dra. Vera Lúcia Gil Lopes**
- 5. Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato**

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/02/2005

DEDICATÓRIA

À minha mãe Maria Luisa, à minha família e ao Marcelo,
por todo amor, carinho e apoio,
dedico este trabalho.

*Comece tudo que você possa fazer ou sonha poder.
A ousadia tem dentro de si genialidade, poder e magia.*

Goethe

*Há sem dúvida quem ame o infinito.
Há sem dúvida quem deseje o impossível,
Há sem dúvida quem não queira nada
Três tipos de idealistas, e eu nenhum deles.
Porque eu amo infinitamente o finito,
Porque eu desejo impossivelmente o possível,
Porque quero tudo, ou um pouco mais, se puder ser,
Ou até se não puder ser...*

Fernando Pessoa

À Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato, pela orientação desde a minha iniciação científica como sua primeira aluna “oficial”. O tempo passou rápido nesses últimos oito anos e posso dizer que aprendi com você não só a trabalhar no laboratório, mas também amadureci como pessoa e profissional. Vou sentir saudades da nossa convivência.

À Profa. Dra. Antônia Paula Marques-de-Faria por ter aceitado fazer parte da pré-banca e banca examinadora desta tese.

À Profa. Dra. Chong Ae Kim por ter aceitado fazer parte da pré-banca e banca examinadora desta tese, e também por ter feito a triagem de um dos pacientes avaliados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Juan Llerena por ter aceitado fazer parte da pré-banca e banca examinadora desta tese.

À Profa. Dra. Vera Lúcia Gil Lopes por ter aceitado fazer parte da pré-banca desta tese.

À Profa. Dra. Denise Norato por ter feito a triagem dos pacientes avaliados neste trabalho.

À Profa. Dra. Denise Pontes Cavalcanti pela amizade, orientação no PED, pelas sugestões oferecidas e por ter feito parte da triagem dos pacientes avaliados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner pela colaboração e sempre boa vontade em ajudar na coleta de dados clínicos dos pacientes estudados neste trabalho, assim como pela sua participação como parte da banca examinadora do exame de qualificação.

À Profa. Dra. Marcilda Palandi de Mello pela amizade e anos de convivência agradável, e por ter aceitado fazer parte da pré-banca desta tese.

À Prof. Dra. Chistine Hackel, ou simplesmente Chris, por quem sempre tive admiração, obrigada pela amizade e por muitas vezes ter me guiado para o “caminho da luz” quanto as minhas constantes dúvidas e indagações profissionais, também sentirei saudades.

À CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.

A primeira pessoa que gostaria muito de agradecer é a minha mãe, afinal sem sua ajuda não teria ido tão longe. Além disso, aprendi com ela a ser uma pessoa justa, honesta e batalhadora. Obrigada por tudo mãe.

Aos meus avós Luiz, Osmar e Conceição, todos tiveram um papel importante na minha educação e na minha vida, agradeço por tudo que conquistei até aqui.

As minhas queridas tias do coração Fia, Taia, Lourdes, Bê e Lúcia que, apesar da distância, sei que torcem muito por mim e com quem sempre pude contar. E aos tios é claro, que são igualmente especiais e queridos, tio Luiz, Max e Luisinho. Como alguém pode viver sem tios nesse mundo?

Ao Marcelo, meu amor e meu porto seguro, sempre tão calmo, com quem compartilhei minhas angústias e alegrias durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelo carinho, pela super paciência, compreensão, incentivo e força para continuar.

Ao Pedro, pela amizade, preocupação, incentivo e por aquele “laptop” que na minha opinião foi um dos presentes mais úteis que já ganhei na vida, alíás, ele foi muito usado neste trabalho.

À Fabiana Alexandrino, ou Frauzinha para os íntimos, minha amigona do peito, companheira de trabalho e de todas as horas e praticamente minha irmã, afinal é o que todos acham, pelo menos por onde a gente passa... Agradeço pela cumplicidade, pelas muitas risadas e acima de tudo pela incontestável amizade. Acho que sempre nos demos muito bem porque sempre soubemos respeitar nossos limites. Você viu que eu dei um jeitinho de continuar perto de você, não é?

Ao meu bom amigo Lúcio, que mesmo chegando no final, deu um jeitinho de me ajudar. Espero que sejamos bem sucedidos nesta nossa nova empreitada.

À melhor e mais especial técnica de laboratório, Madá, quem eu adoro e admiro pela sua garra e força de vontade. Madá você é a alma desse laboratório, continue sempre do jeito que você é, fale bem alto no telefone, cante, dê risada, porque é assim que a gente gosta de te ver. Te adoro muito.

À Camila, a Ericka e a Lucy pelo companheirismo, força e pelos vários momentos de descontração; e também a Thalita, que apesar de ter chegado bem depois, participou de muitos desses bons momentos.

À todo mundo do laboratório de Genética Humana que contribuiu para realização deste trabalho: as outras Fernandas Soardi e Coeli, Carlinha, Tammy, Andrey, Luiz Eduardo, Maria Claudia, Mari, Erica, Zé Luiz, Priscila, Roberta e Tércio.

Aos funcionários do CBMEG em especial a Tânia, Sandra, Andressa e a “Coleguinha” Cida.

	<i>Pág.</i>
RESUMO	xxxvii
ABSTRACT	xli
1- INTRODUÇÃO	45
1- Definição	47
2- Histórico	48
3- Classificação	49
4-Síntese do colágeno tipo I	55
5- Estrutura dos genes COL1A1 e COL1A2	57
6- Mutações nos genes do colágeno tipo I	59
7- Tratamento	65
2- OBJETIVOS	69
3- MATERIAL E MÉTODOS	73
1- Casuística	75
2- Métodos	77
2.1- Extração de DNA genômico de sangue periférico.....	77
2.2- Análise do gene COL1A1.....	78
4- RESULTADOS	91
1- Alterações encontradas no gene COL1A1	93

2- Rastreamento do gene COL1A1 pela técnica de Seqüenciamento Automático.....	97
2.1- Alterações encontradas associadas ao fenótipo.....	97
2.2- Outras alterações encontradas.....	103
5- DISCUSSÃO.....	107
6- CONCLUSÃO.....	121
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
8- ANEXOS.....	139
1- Parecer do Comitê de Ética em pesquisa.....	141
2- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	143
3- Artigo aceito para publicação no Journal of Applied Genetics.....	145

°C	graus Celsius
μCi	microCurrie
μg	micrograma
μl	microlitro
μM	micromolar
cDNA	DNA complementar
Ci	currie
COL1A1	gene que codifica a cadeia α1 da molécula de colágeno tipo I
COL1A2	gene que codifica a cadeia α2 da molécula de colágeno tipo I
CSGE	Conformation Sensitive Gel Electrophoresis
ddNTP	didesoxinucleotídeo, onde N pode ser guanina, adenina, timina ou citosina.
DEPC	dietil pirocarbonato
DH5α	linhagem da bactéria E. coli
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo, onde N pode ser guanina, adenina, timina ou citosina.
EDS	Ehlers-Danlos Síndrome
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético

EIM	Erros Inatos do Metabolismo
Kb	quilo base
LB	meio de cultura Luria-Bertani
OMIM	On Line Mendelian Inheritance in Man
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MSCs	Mesenquimal Stem Cells
ng	nanograma
OI	Osteogenesis Imperfecta
pb	pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
pmol	picomol
pro α 1(I)	cadeia α 1 da molécula de procolágeno tipo I
pro α 2(I)	cadeia α 2 da molécula de procolágeno tipo I
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
SDS	Lauril dodecil sulfato de sódio
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TA	temperatura ambiente

Taq	DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/ácido bórico/EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N', tetrametiletilenodiamina
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β ,D-galactosidase

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 Classificação da Osteogenesis Imperfecta em seus principais tipos clínicos de acordo com Sillence et al., 1979.....	50
Tabela 2 Os domínios do colágeno tipo I e o número de aminoácidos presentes em cada um deles.....	56
Tabela 3 Classificação clínica e molecular da Osteogenesis Imperfecta baseada em PRIMORAC et al. (2001).....	62
Tabela 4 Relação dos pacientes com Osteogenesis Imperfecta estudados.....	76
Tabela 5 Sequência dos primers utilizados para amplificação do gene <i>COL1A1</i>	80
Tabela 6 Resumo de todas as alterações identificadas no gene <i>COL1A1</i>	94
Tabela 7 Dados clínicos e radiológicos dos pacientes de OI em que foram encontradas mutações no gene <i>COL1A1</i>	96

	<i>Pág.</i>
Figura 1	
Nas figuras A de 1 a 4 observam-se radiografias de dois recém-nascidos diferentes com morte perinatal afetados por OI do tipo IIA. É visível em ambos a osteopenia, costelas com aspecto de “contas de rosário”, arqueamento acentuado do fêmur (fêmur em acordeão). As figuras A.5 e A.6 são de um ultra-som fetal com OI tipo II mostrando arqueamento dos membros inferiores e costelas fraturadas intra-útero. As figuras B.1 e B.2 apresentam raio-X de uma criança afetada por OI do tipo III, observa-se osteopenia, deformidade do esqueleto e ossos longos curtos, finos e angulados. As figuras C.1 a C.3 mostram uma criança afetada por OI tipo IV, com osteopenia, escoliose e arqueamento dos membros inferiores.....	53
Figura 2	
Molécula de colágeno tipo I, com duas cadeias $\alpha 1$ (em preto), e uma cadeia $\alpha 2$ (em preto). Estas cadeias peptídicas se enrolam em hélice e estão unidas entre si por meio de pontes de hidrogênio.....	57
Figura 3	
Estrutura dos genes que codificam o colágeno tipo I, <i>COL1A1</i> e <i>COL1A2</i> . Os exons 1 a 6 codificam o domínio N-terminal (peptídeo sinal e N-propeptídeo), parte do exon 6 e os demais até o 49 codificam o domínio da tripla hélice (N-telo-peptídeo, tripla hélice e C-telo-peptídeo) e do exon 49 ao 52 o domínio C-terminal (C-propeptídeo).....	58

Figura 4	Grupo A: OI tipo I → alterações quantitativas; mutações nos genes do colágeno tipo I (preferencialmente <i>COL1A1</i>) que resultam na síntese insuficiente de moléculas de colágeno; Grupo B: OI tipos II, III e IV → alterações qualitativas; mutações em <i>COL1A1</i> ou <i>COL1A2</i> que provocam a formação de moléculas de colágeno anormais incapazes de formar hélices. (X) indica presença de mutação em heterozigose em um dos genes do colágeno; (*) indica produção de molécula de procolágeno mutante.....	61
Figura 5	Localização de algumas substituições de glicina no domínio da tripla hélice para os aminoácidos mais comuns, indicados na parte de baixo, nos genes <i>COL1A1</i> (metade superior da figura) e <i>COL1A2</i> (metade inferior da figura) e sua relação com o fenótipo de OI, indicado do lado esquerdo da figura de acordo com o alinhamento das barras.....	63
Figura 6	Ciclo utilizado na amplificação dos exons 6 a 52 do gene <i>COL1A1</i>	79
Figura 7	Ciclo utilizado para reação de seqüenciamento automático dos exons 6 a 52 do gene <i>COL1A1</i>	83
Figura 8	Ciclo utilizado para reação de seqüenciamento manual. A temperatura de anelamento é correspondente aos <i>primers</i> do vetor pGEM (T7 e SP6).....	87
Figura 9	Eletroferogramas da fita <i>sense</i> do exon 19 do gene <i>COL1A1</i> da mãe do paciente 4 (A) e do paciente 4 (B). A seta aponta a mutação de CGA→TGA em heterozigose no paciente. A base C está representada pelo pico azul e a base T pelo pico vermelho, ambas estão representadas pela letra N em B.....	97

- Figura 10** (A) Eletroferogramas da fita *sense* do exon 28 de um controle normal e (B) do paciente 28, demonstrando que a partir do ponto onde ocorre a deleção de uma guanina em heterozigose a reação apresenta uma leitura confusa..... 98
- Figura 11** Seqüenciamento manual da fita *sense* do exon 28 do paciente 28: (A) antes da clonagem no vetor pGEM. Pode-se observar que a partir do ponto mostrado pela seta surge uma confusão de bases no gel; (B) após a clonagem, o alelo normal com duas bases G e o alelo mutante (C) com apenas uma base G na mesma posição..... 99
- Figura 12** Eletroferogramas da fita *sense* do exon 33/34: (A) controle normal; (B) paciente 33 mostrando a mutação de GGT→AGT em heterozigose, na seta a base G normal está representada pelo pico preto e a base A mutante pelo pico verde, ambas representadas pela letra N..... 99
- Figura 13** Eletroferogramas da fita *sense* do exon 19: (A) controle normal; (B) paciente 33 mostrando a mutação de CCC→GCC em heterozigose, na seta a base G mutante está representada pelo pico preto e a base C normal pelo pico verde, ambas representadas pela letra N..... 100
- Figura 14** A - Esquema de restrição do exon 19 com a enzima *Ban* I quando a base G mutante está presente. B - Análise de restrição do exon 19 com a enzima *Ban* I em gel de agarose 1000 a 3%. O paciente 43 (P43) apresenta as bandas de 180, 171 e 138 pb, demonstrando que é heterozigoto para a mutação, enquanto os controles normais (C1 a C5) apresentam as bandas de 180 e 138 pb. Não foi possível visualizar a banda de 9 bp. M: marcador de peso molecular de 100 pb (INVITROGEN)..... 101

Figura 15	Eletroferogramas da fita <i>sense</i> do exon 25: (A) controle normal e (B) paciente 74 mostrando a mutação de GGT→AGT em heterozigose. Na seta a base G normal está representada pelo pico preto e a base A mutante pelo pico verde.....	102
Figura 16	Eletroferogramas da fita <i>sense</i> do exon 37: (A) controle normal e (B) paciente 77 mostrando a mutação GGC→GAC em heterozigose. Na seta a base G normal está representada pelo pico preto e a base A mutante pelo pico verde, ambas representadas pela letra N.....	103
Figura 17	Eletroferogramas mostrando o seqüenciamento automático do exon 26 do gene <i>COL1A1</i> . (A) controle normal e (B) a mutação silenciosa de GTC→GTT em heterozigose no paciente 70. Na seta a base C normal está representada pelo pico azul e a base T mutante pelo pico vermelho.....	104
Figura 18	Eletroferogramas do intron 8 do gene <i>COL1A1</i> : (A) controle normal e (B) alteração IVS8-36delT encontrada no paciente 70. A seta demonstra que a partir do ponto onde ocorre a deleção de uma timina em heterozigose a reação apresenta uma leitura confusa.....	105
Figura 19	Amplificação do fragmento de 576 pb obtido por PCR do cDNA de um controle (C), do paciente 43 (P43) e de seu pai, ambos portadores da substituição IVS8-36delT. M: marcador de peso molecular de 100pb.....	105
Figura 20	Heredogramas representando 3 dos 5 casos familiares de OI estudados neste trabalho. A) família do paciente 43 (P43); B) família do paciente 52 (P52) e C) família do paciente 70. O hachurado significa que o indivíduo é portador de sinais sugestivos de OI.....	119

RESUMO

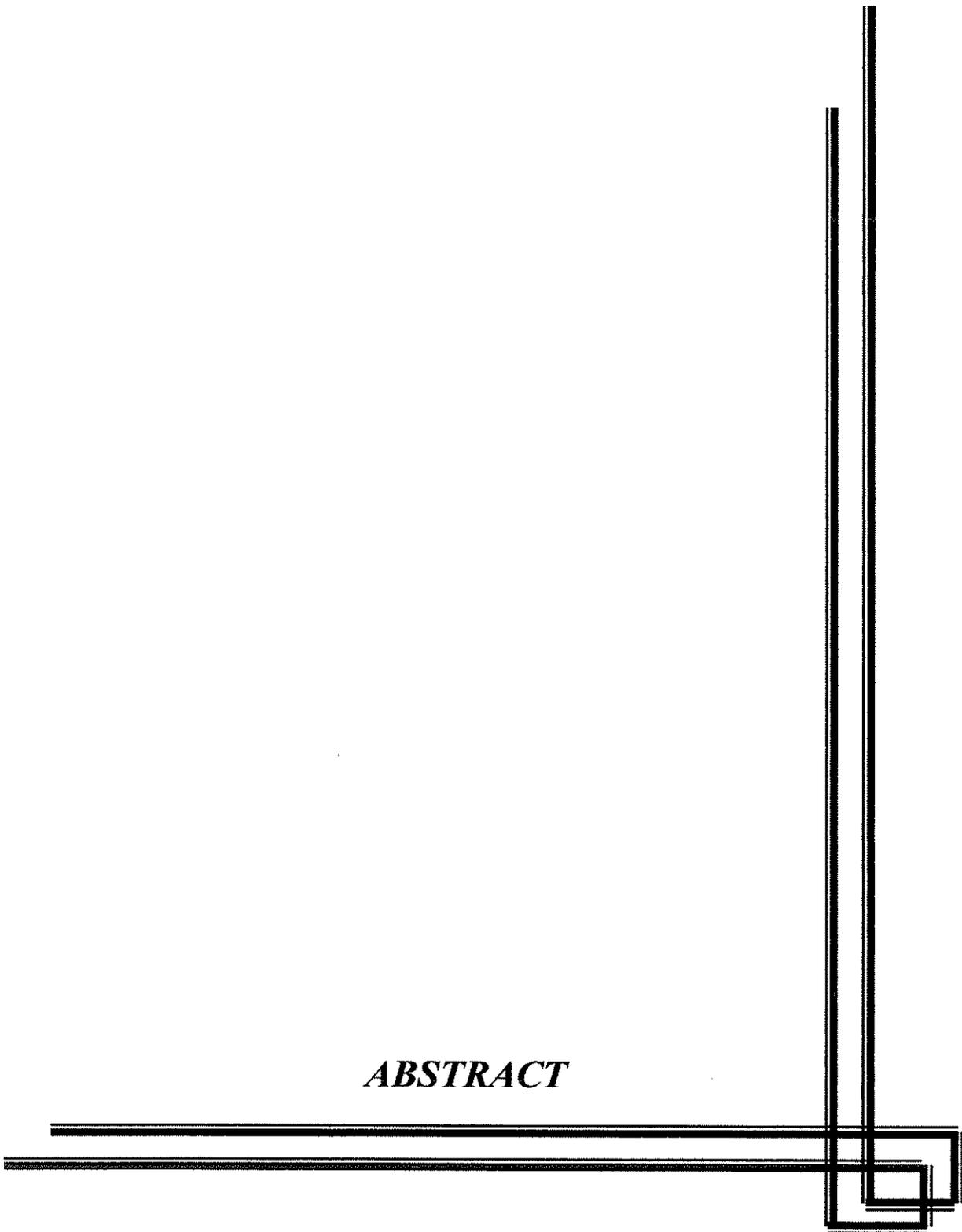
Osteogenesis Imperfecta (OI) é a denominação de um grupo heterogêneo de doenças hereditárias associadas a anormalidades tanto na síntese quanto na estrutura do colágeno tipo I. Esta é a proteína mais abundante encontrada nos ossos, pele, tendões e ligamentos, revestimento dos vasos sanguíneos, e outros tecidos conjuntivos, exceto a cartilagem.

Em mais de 90% dos casos, o fenótipo é resultante de mutações espontâneas ou de transmissão dominante em famílias afetadas em um dos dois *loci* responsáveis pela síntese do colágeno tipo I, onde se localizam os genes *COL1A1* e *COL1A2*. O defeito molecular resulta em uma grande variedade de formas clínicas, desde assintomáticas até letais no período neonatal. As formas mais leves da doença são freqüentemente provocadas por mutações que inativam um dos alelos do gene *COL1A1* resultando numa quantidade normal, porém reduzida de colágeno tipo I. Por outro lado, as formas mais graves da doença resultam de mutações dominante negativas nos genes *COL1A1* ou *COL1A2*, as quais produzem defeitos estruturais na molécula de colágeno. A correlação genótipo-fenótipo observada em pacientes com OI depende, portanto da natureza e posição das mutações.

O principal objetivo do presente estudo foi identificar mutações no gene *COL1A1* em indivíduos portadores dos diversos tipos de OI, uma vez que o diagnóstico molecular não é um exame de rotina oferecido pelos laboratórios e, portanto, não há estudo da prevalência dessas mutações em nosso país. A metodologia empregada para tal diagnóstico foi o seqüenciamento automático direto do produto da PCR do gene *COL1A1*. Os exons 6 a 52, que compreendem o domínio da tripla hélice e o domínio C-terminal da molécula do colágeno tipo I, foram seqüenciados em 13 pacientes portadores de OI. Foram identificadas seis mutações associadas ao fenótipo, sendo quatro novas (c.1885delG, p.P239A, p.G592S, p.G649D) e duas já descritas (p.R237X e p.G382S), além de polimorfismos em exons e introns e outras substituições.

Este foi o primeiro estudo molecular realizado com OI no Brasil. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que não existem mutações prevalentes em nossa amostra e que as características das mutações encontradas estão de acordo com os dados da literatura, onde substituições de glicina por outro aminoácido no domínio da tripla hélice do gene *COL1A1* são as principais responsáveis pelos tipos mais graves de OI, tipos II, III e IV.

ABSTRACT



Osteogenesis imperfecta (OI), commonly known as “brittle bone disease”, is a dominant autosomal disorder and is caused by mutations in type I collagen genes, COL1A1 and COL1A2, which are responsible for the synthesis of the main protein of bone, skin, ligaments, tendon and most other connective tissues.

OI is a genetic disorder of increased bone fragility and low bone mass. Severity varies widely, ranging from intrauterine fractures and perinatal lethality to very mild forms without fractures. The mild forms are usually caused by mutations which inactivate one allele of COL1A1 gene resulting in a reduced amount of normal type I collagen. On the other hand, the severe and lethal forms result from dominant negative mutations in COL1A1 or COL1A2, which produce structural defects in the collagen molecule.

The varied clinical characteristics of OI reflect different classes of mutations in different regions of type I collagen genes. These alterations vary in type and location, although the most common in COL1 loci are single-base substitutions in the part of the gene coding for the triple helix domain, which changes a codon for a glycine to a codon for an amino acid with a bulkier side chain. Therefore, the presence of glycine at every third amino acid is essential to allow the α -chains to adopt the characteristic collagen triple helix.

The main objective of the present study was to search for mutations in the COL1A1 gene in patients previously diagnosed as having OI. Also, providing information about the characteristics of mutations in this gene in our sample. Therefore, here we report the results of the molecular investigation on the COL1A1 gene in 13 Brazilian OI patients. Mutational analysis was performed by direct sequencing of PCR product for each exon. We have found six mutations, four are novel (c.1885delG, p.P239A, p.G592S, p.G649D) and two were previously described (p.R237X and p.G382S).

This is the first molecular study of OI in Brazil. Our findings showed that there are no prevalent mutations in our sample, and that their distribution is similar to that reported by other authors, with a preponderance of substitutions on glycine residues in the triple helix domain causing OI types II, III and IV.

1- INTRODUÇÃO

1- Definição

A *Osteogenesis Imperfecta* (OI), cuja incidência está em torno de 1:10.000 a 1:20.000 nascimentos, é a denominação de um grupo heterogêneo de doenças hereditárias associadas a anormalidades tanto na síntese quanto na estrutura do colágeno tipo I. Essa é a proteína mais abundante encontrada nos ossos, pele, tendões e ligamentos, revestimento dos vasos sanguíneos, e outros tecidos conjuntivos, exceto a cartilagem (BYERS, 1997a).

Em mais de 90% dos casos de indivíduos com OI, o fenótipo é resultante de mutações espontâneas ou de transmissão dominante em famílias afetadas em um dos dois *loci* responsáveis pela síntese do colágeno tipo I, *COL1A1* e *COL1A2*. O defeito molecular resulta em uma grande variedade de formas clínicas, desde assintomáticas até letais no período neonatal (BYERS, 1997a).

O fator comum entre as formas de OI é a fragilidade óssea de gravidade extremamente variável, podendo estar associada a esclerótica de tom azulado, *dentinogenesis imperfecta*, surdez, hiperextensibilidade articular e equimoses frequentes (GOLDMAN *et al.*, 1980; BYERS, 1989a).

O diagnóstico de OI pode ser determinado com facilidade em indivíduos com antecedentes familiares ou em indivíduos que apresentam características típicas da doença, mas pode ser difícil na ausência de membros na família afetados e quando a fragilidade óssea não está associada a anormalidades esqueléticas externas e óbvias. Nesse caso, a análise dos genes que codificam o colágeno tipo I fornece informações importantes, que podem ser obtidas a partir da investigação da quantidade e estrutura das moléculas de procolágeno derivadas de cultura de fibroblastos da pele do paciente (RAUCH e GLORIEUX, 2004). Outra metodologia aplicada é a extração de DNA genômico do paciente a partir de linfócitos e a região codificante dos genes *COL1A1* e *COL1A2* é rastreada em busca de mutações (KORKKO *et al.*, 1998). Sabe-se que ambas as abordagens são capazes de detectar quase 90% de todas as mutações no colágeno tipo I (MARLOWE *et al.*, 2002). A presença de uma mutação nos genes *COL1A1* ou *COL1A2* confirma o diagnóstico de OI. Entretanto, a sua ausência não significa que necessariamente não esteja presente em um dos dois genes, pois pode não ter sido detectada, ou ainda o paciente pode

ter uma forma de OI que não está associada a mutações nos genes do colágeno tipo I (tipos V, VI e VII). Portanto, o fato de uma mutação não ser identificada no colágeno tipo I, não descarta o diagnóstico de OI (RAUCH e GLORIEUX, 2004).

2- Histórico

No final do século XVIII e início do século XIX, surgiram as primeiras descrições na literatura salientando as características de indivíduos de uma mesma família apresentando fragilidade óssea acentuada. Como toda heredopatia conhecida de longa data, a concepção da doença sofreu várias modificações e muitas denominações. Lobstein (1833) foi o primeiro a descrever a entidade, sob o nome de *osteopsatirose idiopática*, embora em 1788, Ekmann, médico sueco, tivesse descrito uma família afetada em quatro gerações com o que denominou de *osteomalácia congênita* (BYERS, 1997a).

Seedorf, em 1942, dividiu a doença em duas formas, congênita e tardia, de acordo com a idade de aparecimento das fraturas. Esse critério mostrou-se incompleto tanto para o uso ortopédico quanto para o aconselhamento genético (BYERS, 1997a).

SILLENCE *et al.* (1979) propuseram uma classificação baseada em critérios clínicos, radiológicos e genéticos, dividindo a OI em quatro tipos principais. Atualmente, essa classificação foi ampliada pelo acréscimo de subtipos, cuja transmissão, em sua grande maioria, tem padrão autossômico dominante. Foram descritos casos raros de transmissão recessiva que, posteriormente, foram atribuídos a mutação germinal, muito comum em OI (SPOTILA *et al.*, 1992; WALLIS *et al.*, 1993). Até o momento, somente um indivíduo com OI de herança autossômica recessiva apresentou mutação nos genes do colágeno tipo I. Foi descrito por NICHOLLS *et al.* (1984), como sendo filho de casal consanguíneo e gravemente afetado por OI tipo III, apresentando uma mutação em homozigose no gene *COL1A2*.

Uma forma de transmissão recessiva de OI do tipo III é comparativamente comum entre a população negra do sudeste da África, onde mais de 70 indivíduos afetados foram analisados. Contudo, por meio de estudos de ligação, não foram encontradas alterações nos genes que codificam o colágeno tipo I, sugerindo, portanto, o envolvimento de outros genes (WALLIS *et al.*, 1993).

3- Classificação

Segundo a classificação de SILLENCE *et al.* (1979), a OI do tipo I é a forma mais branda e freqüente da doença, atingindo cerca de 80% dos casos. Os pacientes apresentam estatura normal, esclerótica azulada, poucas fraturas, sem grandes deformações dos ossos longos e tampouco *dentinogenesis imperfecta*. O azulado das escleras é causado pela espessura fina de sua camada de colágeno total, o que permite a visualização do pigmento intraocular, que pode variar de azul escuro a claro (ASSIS *et al.*, 2002).

O tipo II, por outro lado, é o mais grave e, em sua grande maioria, os pacientes falecem no período perinatal. Os indivíduos com o tipo III são afetados em grau que varia de moderado a grave, apresentando fâcie triangular, baixa estatura, deformidades dos ossos longos e *dentinogenesis imperfecta* devido à deficiência na dentina. O restante dos pacientes é classificado como tipo IV. Este último grupo é sumamente heterogêneo, variando não só na gravidade, como também no fenótipo (ASSIS *et al.*, 2002).

Embora se saiba que na realidade a doença apresenta diferentes graus de acometimento e que os pacientes não são sempre classificados convenientemente numa categoria clínica adequada, a classificação é necessária para se ter acesso a um prognóstico adequado e aos efeitos de intervenções terapêuticas (RAUCH e GLORIEUX, 2004).

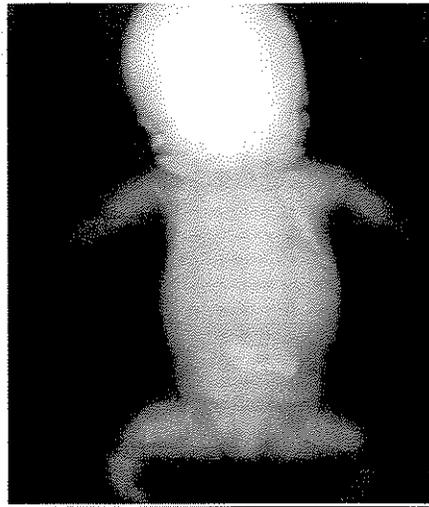
A Tabela 1 apresenta a classificação dos principais tipos e subtipos de OI (I a IV), segundo critérios de diferentes autores, enquanto a Figura 1 exemplifica as principais características radiológicas dos tipos deformantes de OI.

Tabela 1- Classificação da Osteogenesis Imperfecta em seus principais tipos clínicos de acordo com SILLENCE et al., 1979.

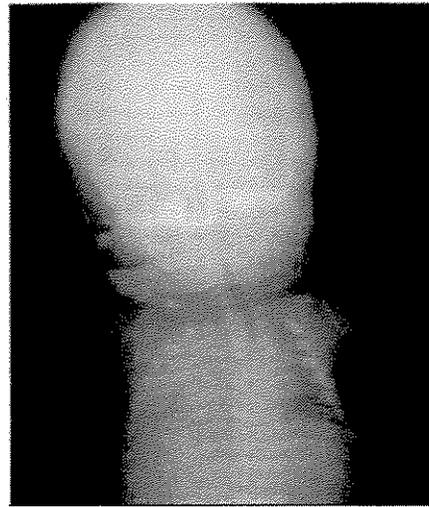
	OI tipo I	OI tipo II
Etiologia	Autossômica dominante	Autossômica dominante, sendo explicados os casos de recorrência por mosaïcismo germinal. Risco de recorrência de 6% (Byers et al., 1991)
Frequência	1:15.000 - 1:20.000	1:20.000 a 1:60.000
Estatura	Normal ou próxima a normal	Baixa estatura e peso ao nascimento.
Esclerótica	Azulada (mais forte ao nascimento)	Escura
Fraturas	Início com a deambulação. Apenas 10% apresentam fraturas ao nascimento, 50% apresentam fraturas até a puberdade quando a frequência decem, sendo mais comuns nos ossos longos, mãos, pés e costelas.	Fraturas intra-útero e fragilidade óssea extrema.
Deformidades	Poucas ou inexistentes	Múltiplas, devido a fraturas intra-útero.
Surdez	50% dos casos, surdez tipo mista e progressiva, para frequências altas.	Não descrita. Morte perinatal.
Dentes	Presença de dentinogenesis imperfecta define dois grupos: IA (com) e IB (sem)	Não descrita. Morte perinatal.
Outros sinais	Hipermobibilidade articular, facilidade para contusões e luxações.	Fragilidade do tecido conjuntivo, calcificações microscópicas na aorta e endocárdio (grupo A), micrognatia. É comum a natimortalidade. Os afetados nativos têm óbito no período neonatal, sendo excepcional uma sobrevivência maior do que 1 mês. A causa mortis mais comum é a insuficiência respiratória.
Radiologia	Osteoporose, fraturas, ossos wormianos e cifoescoliose.	Crânio praticamente não ossificado ou com ossos wormianos e desmineralização grave. Ossos longos apresentam osteoporose difusa com o córtex delgado, encurtado e com aspecto amarrotado (fêmures e úmeros de acordeão), tíbias anguladas. Costelas com aspecto de "contas de rosário". Múltiplas fraturas. São definidos radiologicamente três grupos de OI tipo II: IIA - ossos longos alargados, curtos e de aspecto amarrotado, pobremente modelados (de acordeão), costelas em um rosário contínuo (mais visível em pares de 7 a 10), platisspondilia em mais de 50% dos corpos torácicos e lombares, crânio desmineralizado. IIB - ossos longos semelhantes aos do grupo IIA, com o úmero melhor modelado, costelas fraturadas, sem aspecto em rosário ou com descontinuidade nesse aspecto, leve platisspondilia, crânio bem ossificado. Pode ter sobrevivência maior. IIC - ossos longos encurtados, delgados e fraturados, mostrando alguma modelagem e múltiplas angulações, costelas formando um rosário descontínuo, crânio pobremente mineralizado e ausência de platisspondilia.

Tabela 1- Classificação da Osteogenesis Imperfecta (OI) em seus principais tipos clínicos (continuação).

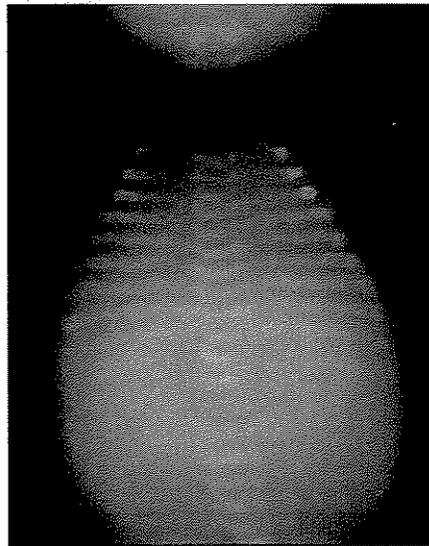
	OI tipo III	OI tipo IV
Etiologia	Autossômica dominante, sendo explicados os casos de recorrência por mosaïcismo germinal ou herança autossômica recessiva. Risco de recorrência de 6%.	Autossômica dominante.
Frequência	Rara.	Inicialmente pensava-se que fosse rara, mas o número de relatos vem aumentando.
Estatura	Muito baixa. Crescimento pobre.	Variável, podendo ser baixa. Normal ao nascimento.
Esclerótica	Azul clara ao nascimento, clareando até a normalidade ao primeiro ano.	Normal ou acinzentada.
Fraturas	Comuns ao nascimento ou primeiro ano. Grande fragilidade óssea, com múltiplas fraturas por toda a vida.	25% têm fraturas ao nascimento. Há grande variação na gravidade, número e início das fraturas. A frequência das fraturas diminui na adolescência e recrudescer na velhice.
Deformidades	Já ao nascimento, como consequência de fraturas intra-útero. Deformidades graves e progressivas pelas fraturas com angulações das coxas e pernas. Cifoescoliose e deformidades torácicas intensas. Fácies triangular, frontal abaulado.	De leves a moderadas. Alguns pacientes apresentam deformidade ao nascimento, outros apenas encurvamento leve dos fêmures. 30% têm cifoescoliose.
Surdez	Poucos casos descritos.	30% dos casos.
Dentes	Dentinogenesis imperfecta é comum.	Dentinogenesis imperfecta define dois grupos: IVA (com) e IVB (sem). É mais frequente que no tipo I.
Outros sinais	Na forma grave e progressiva alguns pacientes sequer chegam a andar, necessitando de cadeira de rodas e cirurgias ortopédicas para colocação de pinos intra-medulares.	Luxações, hérnias, sudorese excessiva. A variação interfamiliar é grande. Os casos mais leves podem passar despercebidos, enquanto os mais graves podem ser difíceis de se distinguir do tipo III.
Radiologia	Osteoporose grave generalizada. Crânio membranoso gravemente desmineralizado e ossos wormianos. Ossos longos: ao nascimento há um aspecto de modelagem exagerada, com as diáfises finas e fraturadas e as metafises alargadas. Esse aspecto desaparece até o sexto mês, dando lugar a um osso alargado e pouco modelado. Há leve encurtamento com marcadas angulações. O córtex é fino. Alargamento epimetáfisário tardio. Calcificação em "milho de pipoca" (disrupção da placa epifisária). Fêmur curto, úmero bem moldado, tíbia angulada distalmente. Vértébras biconvexas. Costelas delgadas, ocasionalmente com rosário descontínuo. Fraturas.	Normal até a primeira fratura. Desmineralização.



A.1



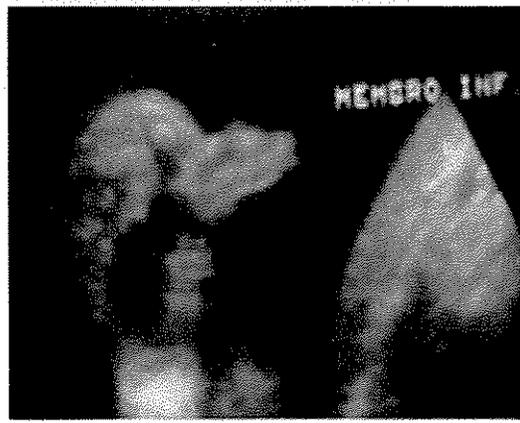
A.2



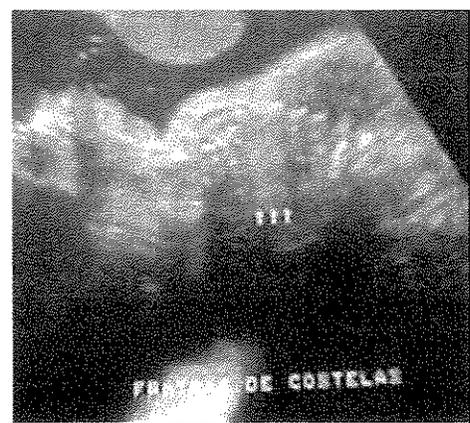
A.3



A.4



A.5



A.6

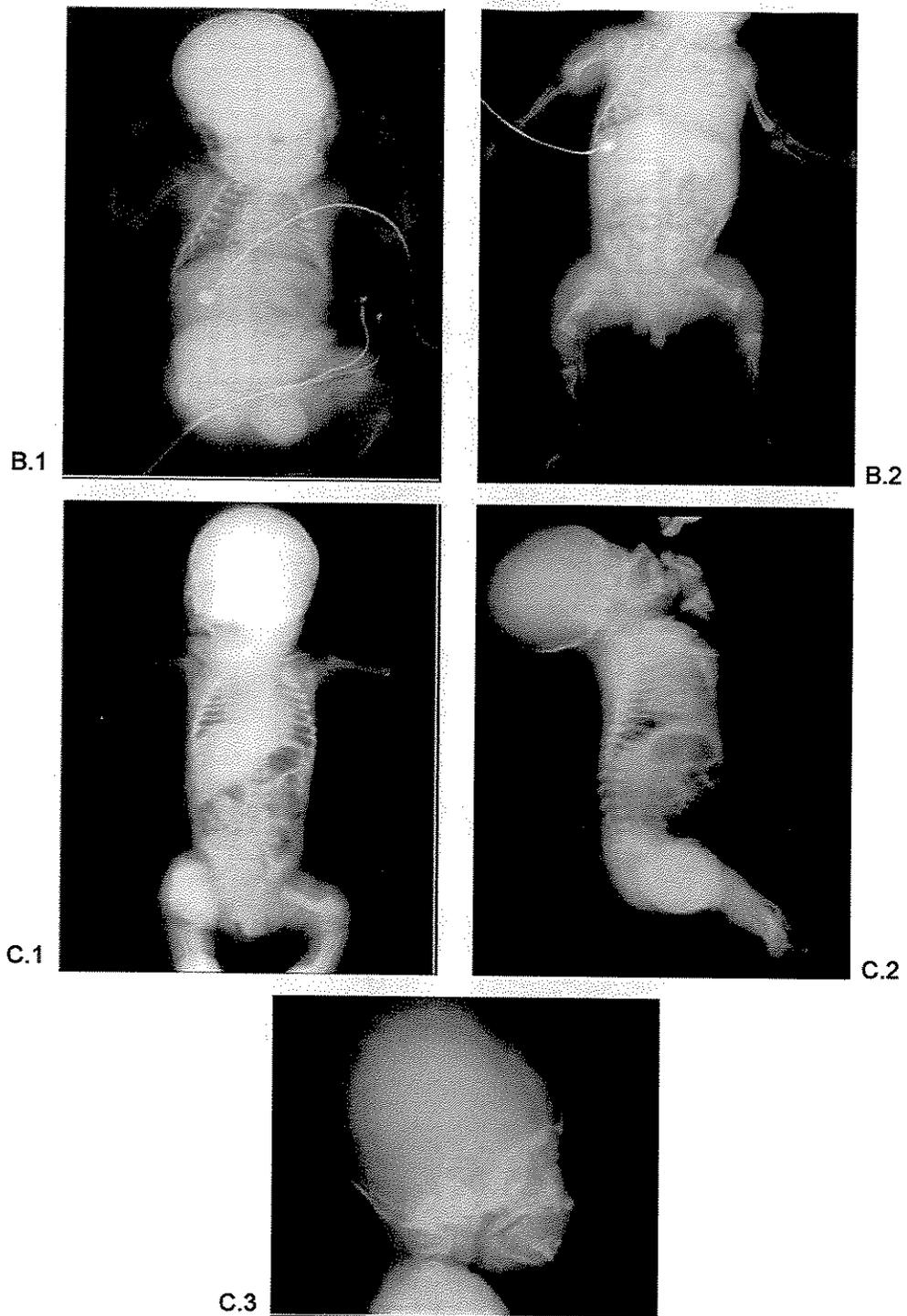


Figura 1- Nas figuras A de 1 a 4 observam-se radiografias de dois recém-nascidos diferentes com morte perinatal, afetados por OI do tipo IIA. É visível em ambos a osteopenia, costelas com aspecto de “contas de rosário”, arqueamento acentuado do fêmur (fêmur em acordeão). As figuras A.5 e A.6 são de um ultra-som fetal com OI tipo II, mostrando arqueamento dos membros inferiores e costelas fraturadas intra-útero. As figuras B.1 e B.2 apresentam raio-X de uma criança afetada por OI do tipo III; observa-se osteopenia, deformidade do esqueleto e ossos longos curtos, finos e angulados. As figuras C.1 a C.3 mostram uma criança afetada por OI tipo IV com osteopenia, escoliose e arqueamento dos membros inferiores.

Recentemente, GLORIEUX *et al.* (2000) utilizando critérios clínicos e histomorfométricos sugeriram uma nova forma de OI, referida na literatura como OI tipo V. Esse novo tipo de OI foi identificado dentro de um grupo de pacientes previamente classificados como OI tipo IV que apresentavam características clínicas semelhantes como calos hipertróficos e ossificação da membrana inter-óssea do antebraço. A OI tipo V também obedece a um padrão de herança autossômico dominante, porém nenhuma alteração na estrutura dos dois genes que codificam a molécula de colágeno tipo I foi encontrada (GLORIEUX *et al.*, 2000).

Outro tipo de OI derivado do tipo IV foi descrito por GLORIEUX *et al.* (2002), sendo classificado como OI tipo VI. Este é caracterizado como sendo uma forma de OI de moderada a grave, com acúmulo de osteóide, devido a um defeito de mineralização, na ausência de um distúrbio do metabolismo mineral. O rastreamento de mutações em ambos os genes que codificam o colágeno tipo I não revelou nenhuma alteração e a análise da proteína do colágeno tipo I também se mostrou normal, portanto o defeito genético que provoca a OI tipo VI ainda deverá ser elucidado, assim como o seu tipo de herança (GLORIEUX *et al.*, 2002).

A OI rizomélica, classificada como OI tipo VII, é uma nova forma de herança autossômica recessiva, encontrada em oito indivíduos procedentes de uma comunidade indígena isolada em Quebec, Canadá. O fenótipo, de moderado a grave, é caracterizado por fraturas ao nascimento, esclerótica azulada, deformidades precoces nos membros inferiores e osteopenia. A rizomelia (úmero e fêmur curtos) é uma característica marcante desse tipo de OI. Através de estudos de ligação, o *locus* da doença foi localizado no braço curto do cromossomo 3, onde não existem genes que codificam a produção de colágeno. Até agora nenhum gene candidato foi identificado no segmento cromossômico de interesse (LABUDA *et al.*, 2002; WARD *et al.*, 2002).

Esta nova classificação que subdivide a OI tipo IV em V, VI e VII que vem sendo apresentada e introduzida à comunidade científica, é pouco utilizada como referência. A classificação de SILLENCE *et al.* (1979) ainda é a mais adotada, inclusive neste trabalho.

Outras síndromes nas quais a OI está associada a outros sinais clínicos são as síndromes de Cole-Carpenter de herança autossômica dominante [OMIM 112240], caracterizada como sendo um tipo de OI com craniossinostose orbital, proptose de globo ocular e hidrocefalia (COLE e CARPENTER, 1987), a osteoporose associada a pseudoglioma ou OI de forma ocular [OMIM 259770; gene 11q13.4] (BEIGHTON, 1986; CAPOEN, 1993) de herança autossômica recessiva e a OI associada a contraturas musculares conhecida como síndrome de Bruck [OMIM 259450; gene 17p12] de herança autossômica recessiva (MCPHERSON, 1997).

4- Síntese do colágeno tipo I

A transcrição dos genes que codificam o colágeno tipo I é regulada por diferentes citocinas, especialmente o TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) e o TNF- α (*Tumor Necrosis Factor α*). O TGF- β exerce um papel determinante na fisiopatologia de reparo dos tecidos, aumentando a expressão do colágeno tipo I. Sua ação é exercida por duas vias complementares, uma que reduz a degradação da matriz extracelular e outra que estimula o seu acúmulo. Em contraste, o TNF- α , cuja função de remodelação da matriz é oposta a do TGF- β , reduz a expressão do colágeno tipo I. O TNF- α exerce um papel importante em doenças inflamatórias como artrite reumatóide e osteoartrite, pois reduz o depósito de matriz extracelular pela indução da produção de colagenases ou por inibição da síntese de componentes estruturais da matriz, como o colágeno tipo I (VERRECHIA e MAUVIEL, 2004).

Os genes *COL1A1* e *COL1A2* são transcritos coordenadamente. Primeiramente, os mRNA são processados e transportados ao citoplasma onde são traduzidos. As proteínas precursoras, conhecidas como procolágeno, são inseridas através da membrana do retículo endoplasmático rugoso e as seqüências sinal são clivadas (BYERS, 1997a).

As cadeias de procolágeno contêm propeptídeos amino e carboxi terminais. Duas cadeias pro α 1(I) e uma cadeia pro α 2(I) associam-se primeiramente por interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre os C-propeptídeos formando uma tripla hélice.

A associação é então estabilizada por pontes dissulfeto entre as cadeias de procolágeno. A partir da extremidade carboxila a formação da hélice continua em direção à extremidade amino terminal (GALICKA, 2002).

Durante o alongamento da cadeia, todos os resíduos prolina que precedem a glicina na tripla hélice (cerca de 100 em cada cadeia) e algumas das lisinas (menos de 10 em cada cadeia) são hidroxilados pelas enzimas 4-hidroxilase de prolil e hidroxilase de lisil, respectivamente. Alguns resíduos de hidroxilisina são glicosilados e uma única asparagina ligada a oligossacarídeo é adicionada a cada cadeia no peptídeo carboxi-terminal. O objetivo dessas modificações é aumentar a estabilidade termodinâmica das cadeias α e formar ligações mais fortes entre elas. Os propeptídeos das extremidades amino e carboxi terminais são clivados por proteases específicas após a secreção da molécula para o meio extracelular, (BYERS, 1997a).

A molécula de colágeno madura apresenta ao final do processo de clivagem somente o domínio do colágeno ou da tripla hélice. Esse é formado pela tripla hélice propriamente dita e pelos telopeptídeos que a flanqueiam. A Tabela 2 apresenta os domínios do colágeno tipo I e o número de aminoácidos que cada um compreende (DALGLEISH, 1997) e a Figura 2 um esquema da molécula de colágeno madura.

Tabela 2- Os domínios do colágeno tipo I e o número de aminoácidos presentes em cada um deles.

Domínio	pro α 1(I)	pro α 2(I)
N-terminal	161	79
Peptídeo sinal	22	22
N-propeptídeo	139	57
Domínio do colágeno	1057	1040
N-telopeptídeo	17	11
Tripla hélice	1014	1014
C-telopeptídeo	26	15
C-terminal		
C-propeptídeo	246	247

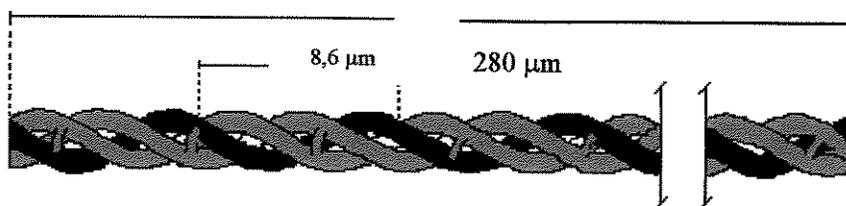


Figura 2 - Molécula de colágeno tipo I, com duas cadeias $\alpha 1$ (em azul), e uma cadeia $\alpha 2$ (em preto). Estas cadeias peptídicas se enrolam em hélice e estão unidas entre si por meio de pontes de hidrogênio.

5- Estrutura dos genes *COL1A1* e *COL1A2*

Ambos os genes *COL1A1* [OMIM 120150] e *COL1A2* [OMIM 120160] possuem 52 exons e uma estrutura muito semelhante. O *COL1A1* (17q 21.31-22.15) possui 18 Kb e o *COL1A2* (7q 21.3-22.1) possui 38 Kb, a diferença de tamanho entre os dois deve-se ao tamanho dos introns (BYERS, 1989b). A seqüência consenso completa de ambos os genes está depositada no banco de dados *GenBank* no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> sob os números de acesso AF017178 (*COL1A1*) e AF004877 (*COL1A2*).

No gene *COL1A1* há um único exon de 108 pb que codifica os aminoácidos de número 568 a 603 (exon 33), enquanto que no gene *COL1A2* esses mesmos aminoácidos são codificados por dois exons diferentes (33 e 34), cada um com 54 pb. Como a seqüência dos exons 33 e 34 no gene *COL1A2* é análoga à seqüência do exon 33 no gene *COL1A1*, passou-se a denominar o único exon do gene *COL1A1* de 33/34, a fim de se evitar confusões no estudo entre exons análogos que codificam aminoácidos C-terminais na posição 603 (DALGLEISH, 1997).

Os cinco primeiros exons de ambos os genes codificam a seqüência sinal de um peptídeo amino-terminal, cuja função ainda não está esclarecida, e também parte do N-propeptídeo, que é posteriormente clivado da molécula de procolágeno tipo I (DALGLEISH, 1997).

O exon seis codifica parte do N-propeptídeo, o N-telopectídeo inteiro e os primeiros três aminoácidos da região da tripla hélice. Do exon 6 ao exon 49, em ambos os genes, são codificados os 1014 aminoácidos que fazem parte da tripla hélice. O exon 49 codifica também o C-telopectídeo inteiro e parte do C-propeptídeo, que termina de ser codificado no exon 52 (Figura 3). Os exons finais codificam também um sítio adicional para clivagem por protease e o território globular carboxi-terminal da proteína, implicado na associação entre as cadeias na formação da estrutura quaternária (DALGLEISH, 1997).

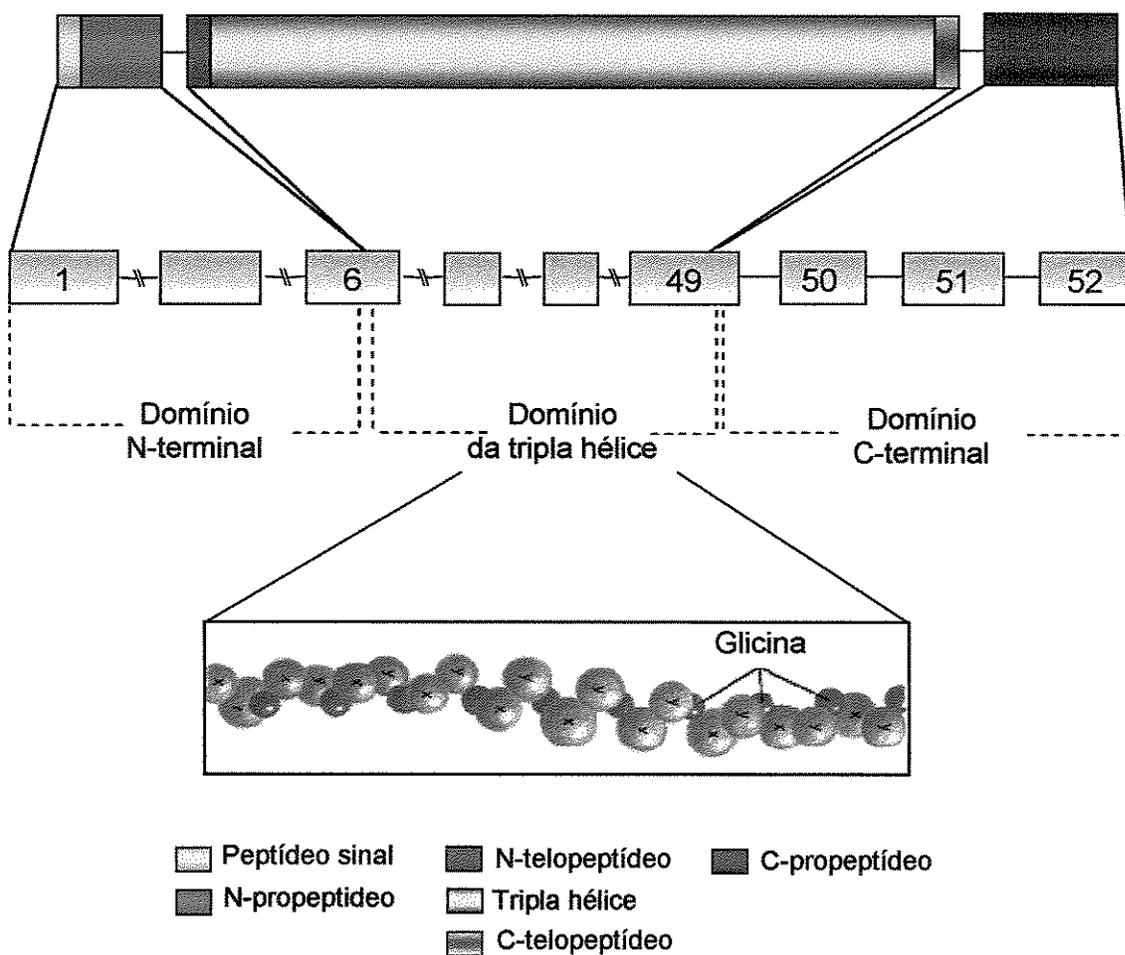


Figura 3- Estrutura dos genes que codificam o colágeno tipo I, *COL1A1* e *COL1A2*. Os exons 1 a 6 codificam o domínio N-terminal (peptídeo sinal e N-propeptídeo), parte do exon 6 e os demais até o 49 codificam o domínio da tripla hélice (N-telopectídeo, tripla hélice e C-telopectídeo) e do exon 49 ao 52 o domínio C-terminal (C-propeptídeo).

Uma característica comum aos dois genes é que os exons que codificam a região da tripla hélice das cadeias de colágeno apresentam, na sua maioria, um tamanho de 54 pb. A subunidade básica desses exons na região da tripla hélice consiste, predominantemente, da repetição de tripeptídeos GlyXY. A presença de glicina a cada três aminoácidos é essencial para a estrutura da tripla hélice (Figura 3). As posições X e Y são freqüentemente ocupadas pelos aminoácidos prolina e hidroxiprolina, respectivamente, havendo 338 repetições desses tripeptídeos nas cadeias α maduras (BYERS, 1989b).

6- Mutações nos genes do colágeno tipo I

Nos últimos anos, foram feitos grandes esforços na tentativa de se correlacionar as formas graves de OI com a localização molecular do defeito na tripla hélice do colágeno.

PEREIRA *et al.*, (1993) estabeleceram uma linhagem de camundongos transgênicos que expressavam níveis moderados do gene *COL1A1* humano deletado. Este gene foi modelado após o surgimento de uma deleção esporádica que produzia um fenótipo letal de OI. Em torno de 6% dos camundongos transgênicos apresentavam um fenótipo letal com várias fraturas ao nascimento, enquanto 33% tinham fraturas, mas eram viáveis. Os 61% restantes não apresentavam fraturas aparentes como observado ao exame de raio-X, o qual foi realizado no dia do nascimento. Esses resultados demonstraram características interessantes em relação a variabilidade fenotípica e penetrância incompleta, muito comum em famílias com OI e muitas vezes explicada por variações no *background* genético e por influência de fatores ambientais. Entretanto, PEREIRA *et al.*, (1994) concluíram que a variação fenotípica nesse caso poderia ser uma característica inerente ao gene do colágeno mutante.

Em 1998, STACEY *et al.* criaram um camundongo transgênico que expressava o gene *COL1A1* mutante devido a uma substituição de glicina por cisteína no códon 859. O gene mutante produziu um fenótipo dominante letal similar ao fenótipo de pacientes humanos com OI tipo II (FORLINO e MARINI, 2000).

Concluiu-se que mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2* resultam nas formas clínicas clássicas de OI (tipos I, II, III e IV). Para se manifestar clinicamente tais mutações podem interferir com a expressão dos genes do colágeno tipo I, a formação da tripla hélice e a secreção do procolágeno tipo I (LACHMAN *et al.*, 1992). Os defeitos decorrentes são traduzidos para a proteína de duas formas:

- ◆ **Defeitos quantitativos:** nos quais há um decréscimo na produção do colágeno tipo I, resultando em uma rarefação da matriz óssea e diminuição na mineralização. Resultam geralmente de mutações *nonsense* em heterozigose no gene *COL1A1*, as quais provocam o surgimento de códons de terminação prematuros e como consequência, o surgimento de alelos nulos provocando o que se chama de insuficiência haplóide (WILLING *et al.*, 1994). Embora apenas metade da quantidade normal de procolágeno tipo I seja sintetizada, sua estrutura é normal. Este tipo de mutação ocorre na forma mais leve da doença, OI tipo I, como mostra a Figura 4A (LACHMAN *et al.*, 1992).
- ◆ **Defeitos qualitativos:** nos quais há populações de colágenos estruturalmente normais e anormais coexistindo (Figura 4B). O colágeno anormal é incorporado à matriz óssea e leva a uma grave paralisação na mineralização. Esse tipo de alteração foi descrito em 85 a 90% dos indivíduos estudados, ocorrendo nos tipos II, III e IV (LACHMAN *et al.*, 1992). A maioria das mutações responsáveis por provocar estes tipos de OI é resultado de substituições de glicina por outro aminoácido. Estas geram um produto gênico anormal e são chamadas de dominante negativa. Por uma análise estequiométrica, mutações no gene *COL1A1* são consideradas mais deletérias do que no gene *COL1A2* (BYERS *et al.*, 1991).

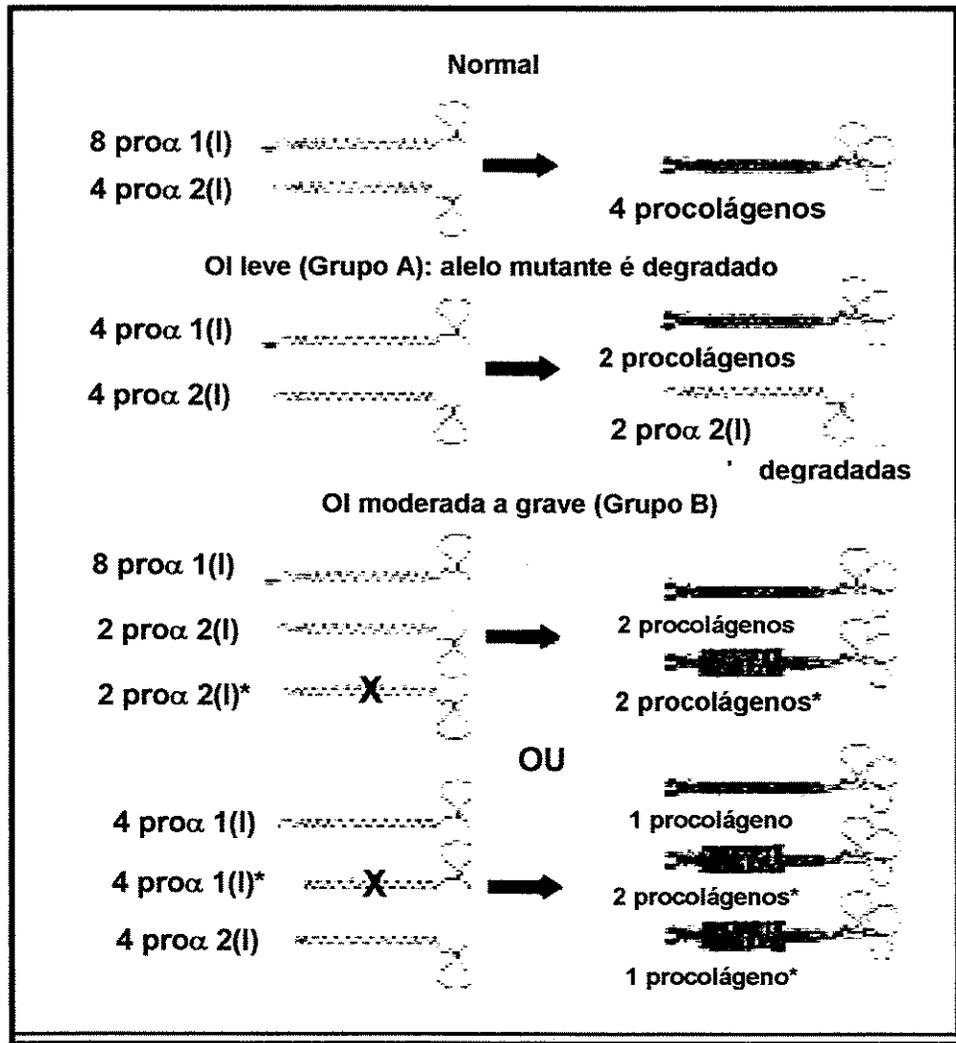


Figura 4- Grupo A: OI tipo I \rightarrow alterações quantitativas; mutações nos genes do colágeno tipo I (preferencialmente *COL1A1*) que resultam na síntese insuficiente de moléculas de colágeno; Grupo B: OI tipos II, III e IV \rightarrow alterações qualitativas; mutações em *COL1A1* ou *COL1A2* que provocam a formação de moléculas de colágeno anormais incapazes de formar hélices. (X) indica presença de mutação em heterozigose em um dos genes do colágeno; (*) indica produção de molécula de procolágeno mutante.

A Tabela 3 faz uma correlação entre a classificação clínica e a molecular dos tipos clássicos de OI e também dos recentemente criados.

Tabela 3- Classificação clínica e molecular da *Osteogenesis Imperfecta* baseada em PRIMORAC *et al.* (2001).

Classificação molecular	Classificação clínica	Mecanismo molecular
Insuficiência haplóide	Tipo I (forma leve de OI)	Alelo não funcional do gene COL1A1, freqüentemente devido ao surgimento de um códon de terminação prematuro. Substituições de glicina preferencialmente localizadas no domínio C-terminal da hélice de ambas as cadeias de colágeno.
Dominante negativa	Tipo II (perinatal letal)	Substituições de glicina preferencialmente localizadas no meio do domínio da tripla hélice de ambas as cadeias de colágeno.
Dominante negativa	Tipo III (deformidade progressiva)	Substituições de glicina preferencialmente localizadas no meio do domínio da tripla hélice de ambas as cadeias de colágeno.
Dominante negativa	Tipo IV (deformidade moderada)	Substituições de glicina preferencialmente localizadas no meio do domínio da tripla hélice da cadeia $\alpha 2$ do colágeno tipo I.
?	Tipo V (deformidade moderada)	Ausência de mutações nos genes que codificam o colágeno tipo I.
?	Tipo VI (deformidade moderada a grave)	Ausência de mutações nos genes que codificam o colágeno tipo I.
?	Tipo VII (deformidade moderada a grave)	Ausência de mutações nos genes que codificam o colágeno tipo I.

Até o momento, mais de 250 mutações já foram descritas nos genes *COL1A1* e *COL1A2* em pacientes com *Osteogenesis Imperfecta*. A maioria das mutações é de ponto e envolve a substituição de uma glicina (GGN) por outro aminoácido, sendo mais comum a alteração para o aminoácido serina (AGN) (Figura 5). Mutações em sítios de *splicing* também são freqüentes, seguidas de deleções, inserções e duplicações, porém em menor quantidade. Uma lista completa e atualizada das mutações nos genes do colágeno tipo I que causam OI pode ser consultada no *Human Type I and Type III Collagen Mutations Database* no endereço eletrônico <http://www.le.ac.uk/genetics/collagen> (DALGLEISH, 1997).

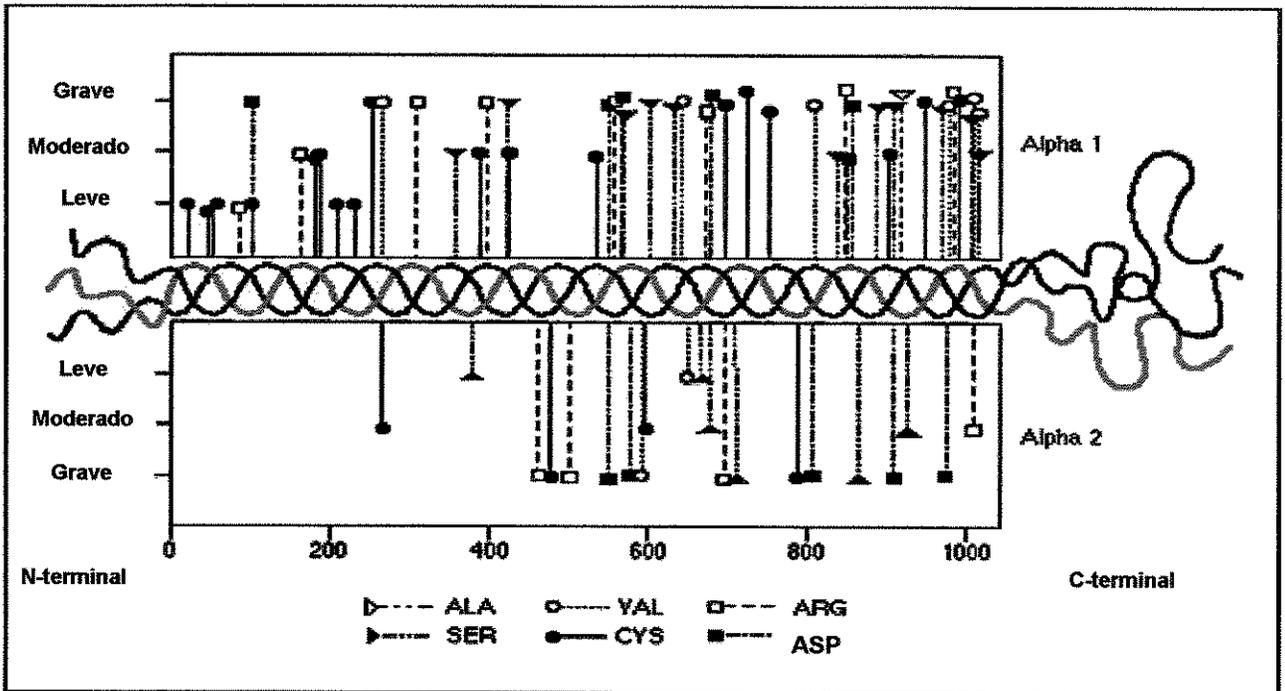


Figura 5- Localização de algumas substituições de glicina no domínio da tripla hélice para os aminoácidos mais comuns, indicados na parte de baixo, nos genes *COL1A1* (metade superior da figura) e *COL1A2* (metade inferior da figura) e sua relação com o fenótipo de OI, indicado do lado esquerdo da figura de acordo com o alinhamento das barras.

A gravidade do fenótipo tende a aumentar quanto mais próxima a mutação estiver da porção C-terminal da tripla hélice, uma vez que mutações nessa região podem interferir diretamente na reunião das cadeias ou na velocidade de formação da molécula de colágeno. Após a agregação na proporção de duas para uma, as cadeias dobram-se em tripla hélice a partir desta região, em direção à região amino-terminal. A tripla hélice requer sempre uma glicina na terceira posição do tripeptídeo básico para dobrar-se corretamente. Embora a modificação pelas enzimas hidroxilantes seja iniciada durante o alongamento da cadeia, ela pára somente com a formação de uma tripla hélice estável. Mutações que interfiram na velocidade de formação da tripla hélice podem, portanto, causar modificações pós-traducionais além do normal, alterando a estabilidade termodinâmica da estrutura molecular. A formação das fibrilas depende da uniformidade das subunidades,

dessa forma moléculas anormais têm efeitos altamente deletérios na estrutura da tripla hélice (BYERS, 1997a).

As probabilidades de se encontrarem mutações fora do domínio da tripla hélice da molécula de colágeno tipo I são poucas. Até o momento não foram detectadas alterações no domínio N-terminal e se existem devem produzir um fenótipo imperceptível. Algumas mutações foram identificadas na região codificante do domínio C-terminal. Parte delas mutações resultam em códons de terminação prematuros, deixando o mRNA instável, ou se este é estável, a cadeia peptídica não o é, sendo rapidamente degradada ou impossibilitada de formar trimeros (BATEMAN *et al.*, 1989; WILLING *et al.*, 1990; WILLING *et al.*, 1996). Nesses casos o fenótipo reflete a quantidade de moléculas de colágeno que conseguem se associar normalmente (PACE *et al.*, 2002).

Outras mutações no C-propeptídeo podem afetar a união das moléculas de procolágeno, sua estrutura e secreção (CHESSLER *et al.*, 1993; OLIVER *et al.*, 1996; PACE *et al.*, 2001; PACE *et al.*, 2002). Em geral, a montagem da tripla hélice acontece de forma mais lenta, sua secreção é diminuída, e a quantidade total de procolágeno é reduzida (PACE *et al.*, 2002).

A heterogeneidade clínica observada em pacientes com OI depende da natureza e posição das mutações. Já foram descritos casos nos quais a mesma mutação em indivíduos de famílias diferentes resultou em fenótipos distintos. Tal fato demonstra que o *background* genético e outros fatores desempenham um papel importante na construção fenotípica desses pacientes (ZHUANG *et al.*, 1996).

É comum observarmos também variações fenotípicas marcantes entre membros da mesma família afetados com OI, o que pode ser explicado pela presença de mosaïcismo somático (PEREIRA *et al.*, 1994; COHEN-SOLAL *et al.*, 1996). Os casos de mosaïcismo são relativamente freqüentes nas formas letais do tipo II. Entretanto, tem sido considerado também nas formas não letais, tipos III e IV, o que explicaria a variação fenotípica observada dentro de uma mesma família (LUND *et al.*, 1999).

Alterações nos genes que codificam o colágeno tipo I também foram encontradas em outras síndromes como a de Ehlers-Danlos (EDS) e a síndrome de Marfan. Mutações estruturais que afetam o sítio de clivagem da N-proteinase na molécula de procolágeno tipo I foram identificadas em variantes raras da síndrome de Ehlers-Danlos, EDS VII A e B. ([OMIM 130060]; BYERS *et al.*, 1997b; NICHOLLS *et al.*, 2000), assim como uma mutação de arginina para cisteína na posição X do tripeptídeo GlyXY da cadeia $\alpha 1(I)$ foi identificada em dois pacientes de famílias diferentes, portadores dos tipos clássicos de EDS I e II ([OMIM 130000 e OMIM 130010] NUYTINCK *et al.*, 2000). Esta síndrome compreende um grupo heterogêneo de sintomas que afetam a pele, os ligamentos, as juntas e os vasos sanguíneos. A classificação mais recente reconhece seis subtipos, a maioria está ligada a defeitos genéticos que afetam um dos colágenos fibrilares (BEIGHTON *et al.*, 1998). Já foram identificadas mutações no colágeno tipo III em EDS IV [OMIM 130050] e no colágeno tipo V nos tipos clássicos de EDS (KUIVANIEMI *et al.*, 1997; NICHOLLS *et al.*, 1996; WENSTRUP *et al.*, 1996; MICHALICKOVA *et al.*, 1998; RICHARDS, *et al.*, 1998).

Já na síndrome de Marfan, uma única substituição de um aminoácido altamente conservado no domínio da tripla hélice da molécula de colágeno pro $\alpha 2(I)$ foi encontrada num indivíduo que apresentava sintomas cardiovasculares e alterações no esqueleto características da síndrome. Esta mutação de ponto resultou da troca de uma arginina por uma glutamina na posição Y da repetição GlyXY no gene *COL1A2* (PHILLIPS *et al.*, 1990).

7- Tratamento

Embora complexa e pouco freqüente, mas longe da extrema raridade que se lhe atribui, a OI, se devidamente diagnosticada e tratada, permite que o portador tenha uma qualidade de vida muito melhor e produtiva. Até recentemente, o tratamento de pacientes com OI estava concentrado no manejo das fraturas, em cirurgias para correção das deformidades e em programas de reabilitação. Todas as outras terapias médicas direcionadas ao alívio da dor, como por exemplo, a vitamina D, o fluoreto de sódio

(aumenta a formação óssea), o óxido de magnésio, a calcitonina (inibe a reabsorção óssea), esteróides anabolizantes e o hormônio de crescimento, não foram efetivos (ASSIS *et al.*, 2002).

Na abordagem terapêutica ortopédica para a OI existem três possíveis áreas de atuação. A primeira destina-se às medidas de prevenção para a redução do número de fraturas, a segunda restringe-se ao tratamento das fraturas e a terceira à correção cirúrgica das deformidades (ASSIS *et al.*, 2002).

Atualmente, o tratamento cíclico intravenoso com pamidronato (3-amino-1-hidroxi-propilideno-1,1-bisfosfonato) mostrou-se efetivo em pacientes portadores das formas deformantes de OI. O pamidronato é um bisfosfonato de segunda geração, que possui uma estrutura química análoga ao pirofosfato, sendo este o único inibidor natural da reabsorção óssea no organismo. O conhecimento atual sobre bisfosfonatos sugere que eles diminuem a vida dos osteoclastos (responsáveis pela reabsorção óssea) e prolongam a vida dos osteoblastos (responsáveis pela formação óssea), inclinando a balança na direção da produção de osso. Esses compostos devem ser administrados juntamente com cálcio, vitamina D e a prática de exercícios físicos e já são amplamente usados no tratamento de adultos com perda de massa óssea e aumento da fragilidade dos ossos. A experiência de utilização dessas drogas em crianças é crescente, porém ainda em fase de testes (PLOTKIN *et al.*, 2000).

Na análise dos primeiros 30 pacientes maiores de três anos de idade que receberam o tratamento com pamidronato em Montreal, no Canadá, a densidade mineral óssea e a atividade física aumentaram significativamente, assim como o grau de fraturas diminuiu. Todos os pacientes tratados referiram substancial alívio da dor e aumento da sua capacidade física (GLORIEUX *et al.*, 1998; GLORIEUX, 2000).

Diante desses resultados, crianças com menos de três anos de idade também passaram a ser tratadas. Nesse grupo etário, os resultados foram ainda mais estimulantes que nas crianças maiores. Nove crianças com OI grave receberam tratamento medicamentoso. No grupo tratado, a densidade mineral óssea aumentou entre 65% e 227%, enquanto no grupo controle não foram observadas alterações significativas. Em todos os

pacientes menores de três anos que foram tratados notou-se aceleração do crescimento (PLOTKIN *et al.*, 2000).

O desaparecimento das dores ósseas e a diminuição do número de fraturas contribuíram para que os pacientes tivessem maior mobilidade e melhor qualidade de vida. Sabe-se que esse aumento da atividade física é fator essencial para o desenvolvimento esquelético e, provavelmente, tem ação sinérgica com o tratamento medicamentoso (ASSIS *et al.*, 2002).

Os bisfosfonatos não representam a cura para a OI, já que o defeito genético básico permanece presente. As possibilidades de se corrigir o mecanismo genético têm sido avaliadas em ratos e em humanos. A possível utilização da terapia gênica como estratégia no tratamento de OI surgiu a partir da análise de indivíduos que possuíam mosaicismos somático para uma mutação que provocava OI, porém não tinham evidências da doença nos ossos. Esses estudos sugeriram que o efeito deletério de células com OI podem ser neutralizados pela presença de células normais. Portanto, se fosse possível a introdução de células normais em indivíduos portadores de OI, a gravidade da doença poderia ser reduzida. Para que esse objetivo seja atingido, várias estratégias de correção do defeito primário no colágeno tipo I, presente na célula óssea endógena que apresenta OI, e sua reintrodução no hospedeiro afetado, têm sido testadas. (PRIMORAC *et al.*, 2001).

Recentemente, CHAMBERLAIN *et al.* (2004) demonstraram que é possível, pelo uso de células totipotentes adultas, obtidas de restos cirúrgicos de portadores de formas graves de OI, corrigir o defeito nos genes do colágeno tipo I. Células mesênquimais (MSCs) são células totipotentes adultas encontradas na medula óssea que podem ser isoladas à medida que proliferam e migram para fora do fragmento de osso colocado em cultura. Estas células oferecem o potencial de tratar várias doenças pela combinação de sua manipulação genética *ex vivo* com transplante autólogo. Nesse trabalho foi utilizado um vetor adenoviral associado para nocautear o gene *COL1A1* mutante presente nas MSCs de indivíduos com OI, o que foi alcançado com sucesso. Um próximo passo será transplantar as células normais de volta para o paciente (CHAMBERLAIN *et al.*, 2004).

Uma outra opção de tratamento é o transplante medular de células mesênquimais com precursores de osteoblastos normais, contudo essa alternativa ainda deve ser considerada experimental. O esqueleto é o protetor da medula óssea, que contém precursores hematopoiéticos e células do estroma mesênquimal multipotenciais capazes de formar osteoblastos. Células totipotentes hematopoiéticas funcionam bem após um transplante medular, porém existem controvérsias quanto ao funcionamento dessas células em humanos (SMITH, 2001).

Nos últimos anos, o conceito de OI tem mudado significativamente. A enfermidade deixou de ser considerada somente como uma alteração nos genes que produzem o colágeno, que clinicamente se classifica em quatro tipos, para a qual não há tratamento médico, e passa a ser compreendida como um fascinante conjunto de alterações genéticas, passível de ser classificado em pelo menos oito formas diferentes, e com perspectivas alentadoras em relação à terapêutica. Os últimos avanços na investigação dessa enfermidade devem ser conhecidos por pediatras e ortopedistas, uma vez que hoje em dia existe a possibilidade de melhorar a qualidade de vida dos portadores dessa doença. Além disso, a OI é freqüente diagnóstico diferencial nos casos de suspeita de maus tratos nas crianças. Portanto, o pediatra e outros profissionais que trabalham com crianças devem estar preparados para reconhecer as características dessa enfermidade (ASSIS *et al.*, 2002).

Nunca foi realizado nenhum estudo brasileiro sobre a frequência e a prevalência de mutações em indivíduos portadores de OI. Dessa forma, o presente trabalho teve com objetivo a identificação de mutações no gene *COL1A1* em pacientes de OI dos tipos I a IV, como também propor uma nova estratégia de rastreamento desses genes, para otimização dos métodos moleculares utilizados no diagnóstico desses indivíduos.

2- OBJETIVOS

Identificar mutações no gene *COL1A1* responsável pela *Osteogenesis Imperfecta*.

Desenvolver um método de rastreamento de mutações mais rápido e simples para o diagnóstico de indivíduos portadores de *Osteogenesis Imperfecta*.

Comparar os métodos usuais de rastreamento de mutações com o método desenvolvido no presente trabalho.

3- MATERIAL E MÉTODOS

1- Casuística

O gene *COL1A1* foi analisado em 13 indivíduos com OI, provenientes de 13 famílias, diagnosticados e classificados de acordo com os critérios de SILLENCE *et al.* (1979). Quatro indivíduos foram selecionados no Ambulatório de Erros Inatos do Metabolismo (EIM) do Hospital de Clínicas/Unicamp e outros quatro do Ambulatório de Genética Perinatal do CAISM/Unicamp, sendo um deles natimorto. Outros cinco pacientes foram avaliados em serviços particulares ou encaminhados por outros pesquisadores de outros estados. Anexa se encontra uma cópia da aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) para o desenvolvimento deste projeto e uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As amostras de sangue foram coletadas após consentimento do paciente ou de seu responsável.

A Tabela 4 apresenta a relação de todos os pacientes estudados e de seus familiares, assim como sua procedência e o tipo de OI que cada um apresenta. Dentre os 13 casos estudados, 8 eram isolados e 5 eram familiares (famílias 3, 6, 7, 9 e 11). Não foi possível obter dados importantes como idade dos pacientes e dos pais.

Tabela 4- Relação dos indivíduos estudados neste trabalho.

Famílias	Indivíduos*	Quadro clínico	Procedência
1	1C	III ou IV	HC – Unicamp
	P	Normal	
	M	Normal	
2	I	Normal	HC – Unicamp
	4C**	IV	
	M	Normal	
3	7C	I	HC – Unicamp
	M	Afetada	
	28C**	I	
4	P	Normal	Curitiba – PR
	M	Normal	
	I	Normal	
5	33C**	III	CAISM - Unicamp
	37C	I	Turvo – SC
6	F	I	Criciúma – SC
	F	I	
7	43C**	I	HC – Unicamp
8	48C	I	São José da Boa Vista – PR
	52C	III ou IV	
	M	Baixa estatura	
9	P	Normal	Instituto da Criança – USP
	T	Afetada	
	68C	II	
10	70C	IV	Hospital Albert Einstein – SP
	I	IV	
	M	Normal	
11	P	Normal	CAISM - Unicamp
	74C**	IV	
	M	Normal	
12	P	Normal	CAISM – Unicamp
	77C**	IIA	
13	77C**	IIA	CAISM – Unicamp

*O número indicado antes dos indivíduos significa o número de entrada no Laboratório de Genética Humana; C-caso índice; P-pai; M-mãe; I-irmão(ã); F-filho(a); T-tia materna; Em negrito estão os casos familiares e (**) indica os pacientes em que foram encontradas mutações no gene *COL1A1*.

2- Métodos

2.1- Extração de DNA genômico de sangue periférico

A extração de DNA genômico foi feita a partir de leucócitos obtidos em 10 a 15 ml de sangue periférico coletado em tubos *Vacutainer* contendo EDTA 10%, de acordo com o protocolo adaptado no laboratório de Genética Humana/CBMEG baseado no método descrito por WOODHEAD *et al.*, (1986).

Ao sangue coletado, adicionou-se 35 ml de solução A (Triton-X 100 a 1%; MgCl₂ 5 mM; Sacarose 0,32 M; Tris-HCl 10 mM pH 8,0). Após homogeneização, a mistura foi colocada em gelo por 30 minutos para que ocorresse a lise das hemácias. Em seguida, centrifugou-se a 2500 rpm por 10 min a 5^oC e retirou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* (aglomerado de células e restos celulares formado com o processo de centrifugação) novamente em 20 ml de solução A, agitando-se por inversão até o *pellet* se desprender do fundo do tubo, centrifugou-se novamente por 15 minutos a 2500 rpm em temperatura ambiente, desprezando o sobrenadante. Esta etapa foi repetida várias vezes até que o *pellet* estivesse livre de hemácias.

Continuando o procedimento, o *pellet* foi ressuspendido em 1 ml de solução B, 2X concentrada (Na₂EDTA 20 mM; NaCl 20 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0) e adicionou-se 250 µl de solução C preparada na hora (para 1 ml de solução C: 0,5 ml de solução B, 1 mg de Proteinase K - *Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany*, 0,5 ml de SDS 10%). Incubou-se em banho-maria a 37^oC durante a noite. Após o período de incubação, procedeu-se o isolamento do DNA genômico com fenol/clorofórmio. O fenol permite a remoção de peptídeos e proteínas de soluções aquosas. Acrescentou-se às amostras a mesma proporção (volume:volume) de fenol saturado com tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0, homogeneizou-se por inversão lenta dos tubos por 5 minutos e centrifugou-se a 2500 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, coletou-se o sobrenadante em um novo tubo, descartando-se a fase fenólica. A próxima etapa de extração foi feita com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 25:24:1. À fase aquosa coletada acrescentou-se igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1. Novamente os tubos foram centrifugados a 2.500 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente e separou-se a fase aquosa.

O DNA foi precipitado na fase aquosa adicionando-se 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. O precipitado de DNA foi obtido após inversão lenta dos tubos. Com o auxílio de um bastão o DNA foi coletado e em seguida lavado com etanol 70% para retirada do excesso de sal. Dependendo do volume de DNA precipitado ressuspende-se em 200 a 500 µl de TE 1X (TE 10X Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0). Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente durante a noite para que o DNA se dissolvesse apropriadamente.

A concentração final de DNA foi estimada por leitura de absorção óptica a 260 nm em espectrofotômetro e sua integridade foi verificada em gel de agarose 0,8% após eletroforese em tampão Tris-Borato-EDTA, ou TBE 1X, (TBE 10X é composto de Tris Base a 0,089 M, Ácido Bórico a 0,089 M e EDTA a 0,002 M e em pH 8,0). O gel foi corado com brometo de etídeo (na concentração final 0,5 µg/ml), a partir de uma solução estoque a 10 mg/ml e visualizado sob luz ultravioleta.

2.2- Análise do gene *COL1A1*

2.2.1- Amplificação do gene *COL1A1* por PCR

Os exons 6 a 52 do gene *COL1A1* e suas junções exon/intron foram amplificados pela técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando os *primers* cujas seqüências foram descritas por KÖRKKÖ *et al.*, (1998) e estão listadas na Tabela 5. O produto da PCR desses exons foi utilizado para seqüenciamento automático com o objetivo de encontrar mutações. O ciclo utilizado é mostrado na Figura 6. A reação de amplificação se deu nas seguintes condições:

- ◆ 500 ng de DNA genômico
- ◆ 5 µl de tampão de PCR 10X (Tris-HCl 200 mM pH8,4; KCl 500 mM)
- ◆ 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM
- ◆ 1 µl de dNTPs 0,2 mM

- ◆ 0,1 µg de cada *primer* (direto e inverso)
- ◆ 0,25 µl de enzima *Taq* polimerase 5 U/µl
- ◆ Volume final da reação de 50 µl.

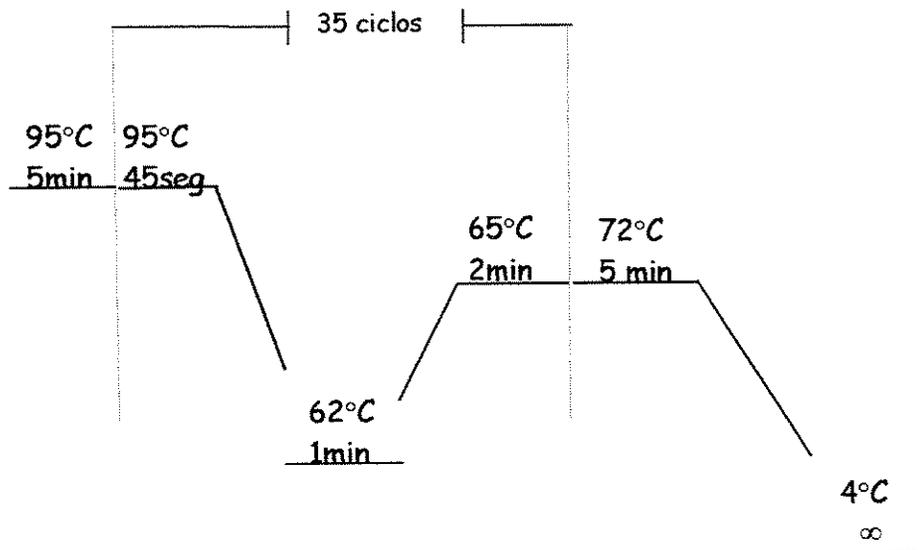


Figura 6- Ciclo utilizado na amplificação dos exons 6 à 52 do gene *COL1A1*.

Tabela 5- Sequências dos *primers* utilizados para amplificação do gene *COL1A1*.

Exons		Sequência dos primers	Tamanho dos fragmentos amplificados (pb)
6	OI 6F	CACACCaggAAgTgCATgATgTCAg	261
	OI 6R	CTCCCAAgCTgTgTATACCAgCCgC	
7	OI 7F	ATACgCggCTggTATACACAg	300
	OI 7R	TCTCTgAgCATCTCTCCTgCCCTCA	
8	OI 8 F	TggAgggAAgACTgggATgAg	247
	OI 8 R	AAgACCCCAggCCTgggAgTTCTTCT	
9	OI 9F	CCCCTggTgAgCCTggCgAg	347
	OI 9R	CTgAgTATCgTTCCCAAATgTg	
10	OI 10F	CTgggCCCCAAACCTgACCTgC	262
	OI 10R	GgCCATTAgAACACATCACTg	
11	OI 11F	CTgAACCTgggCTTCACTgCAC	292
	OI 11R	GATgTCCACTCTCTggCCCTTg	
12	OI 12F	CAAaggATggCggTgATgAC	253
	OI 12R	CTgTAgATCAgAgAATAATgAg	
13	OI 13F	GTAAgAggCTgTCTgAACATC	228
	OI 13R	GTCAgATgAgATgggAgACAgC	
14	OI 14F	GgTgAgTgTgCCCgTTCCAg	263
	OI 14R	CgTTAAgTCCACTgAgCACTg	
15	OI 15F	GATCCCTgAgCTCTggAAggggCTC	279
	OI 15R	GAgATggCAgCTgCAAgTCAC	
16	OI 15F	GATCCCTgAgCTCTggAAggggCTC	438
	OI 16R	TTTggggAACAgggAgACATgAACC	
17	OI 17F	CTgATCATTgCTCTCCTgTCCCTgT	320
	OI 17R	ACCAGGCTgTCCATCAgCAC	
18	OI 18F	TAAgTgTCCCCgACTCAgTgTC	220
	OI 18R	AgCCAgggCgTgAgCCTAggAg	
19	OI 19F	AAgTATCCTgCCAaggCTTCAg	319
	OI 19R	GAAgAggATgAgCTgAgAgTC	
20	OI 20F	CAaggTAACAgCgTgAgTAC	348
	OI 20R	TgAggCTgggCCTCCAgTgTC	
21	OI 21F	GCTCTgAggCTggCACaggATg	292
	OI 21R	GgAAACCACggCTACCAggTC	
22	OI 22F	CCggACCCCCTggCgAgCgTg	278
	OI 22R	CACaggAACAgTTAgggTCTC	
23	OI 23F	CCCAaggTAACCTCTCCTTgC	304
	OI 23R	GATCCAgAACgCCTCATCCCAgAC	
24	OI 24F	GTCTgggATgAggCgTTCTggATC	283
	OI 24R	GTCCggggCgACCATCTTgAC	
25	OI 25F	GCCCTggCAgCCCTggTCCTg	368
	OI 25R	TAgggAggCTgAggTCCAgAAAgTg	
26	OI 26F	AgggCCCAGCAAgAAgCACCTgC	309
	OI 26R	GCTgAggACCgTggCCTCTAgC	
27	OI 27F	CCTgCAggAggggTgCTAgAg	239
	OI 27R	CACAgAgAgAACACTACAgTCAC	

Tabela 5- Sequências dos *primers* utilizados para amplificação do gene *COLIA1* (Continuação).

Exons	Sequência dos primers	Tamanho dos fragmentos amplificados (pb)
28	OI 28F CTgCTgTgAgTgTCCCTgATg	247
	OI 28R GgAgggAAggTTTAgAATCTg	
29	OI 29 F GgTgAggCCTCATggCTgTC	251
	OI 29 R TggCTgTCTgATTAgCTAggAggCgg	
30	OI 30 F GggTTCCTCTCTAATCACggCCAgAC	246
	OI 30 R AgAAgggAAggACAgggCATgTgAAg	
31	OI 31 F CCTCTggAgCAAgAgTAAgTAg	318
	OI 31 R ACCCCACACCCTATCTCCATg	
32	OI 32F TTTCTCAAggCTTgTCgTTggCCTTg	291
	OI 32R GATTCAAAGCaggCagAgATgggAgC	
33/34	OI 33F CCTCTCAggAAACCCAgACACAAGCA	318
	OI 34R GTTCCCaggTTgACAgCTCAg	
35	OI 35F GTCCTgCCAAACTgAgCTgTC	327
	OI 35R ATTggAgAgATgCgTCTgACAggAgg	
36	OI 36 F CCCTgTCTgTgCCTTCACCCCTTgC	249
	OI 36 R CTTCTCCCCTgAggATggCTgAC	
37	OI 37F TgCCTCCACTTgCTCCTCC	276
	OI 37R TgTAggAgAgCACAgACgCATCAAAGC	
38	OI 38F TgAgTggCTTggCCCTCTgTg	240
	OI 38R AgAgggAgAACAgCCAACCTCATCCg	
39	OI 39F GAgTATCACCCgCCTCTCTgTTgAgC	259
	OI 39R TCAGTCAGCCCCACCATCCTTCTg	
40	OI 40F GTgggggCTgCCAgAAggATg	337
	OI 40R TgAggTgCCAgACAgCAGCACAg	
41	OI 41 F AgTgCCAgCTCAgATCTCTgCAGCTC	309
	OI 41 R GTCCgCTggAgTCATCTCTAC	
42	OI 42 F GAgAACAgATTTggTAgAgATgAC	329
	OI 42 R CAggggAACCTTCggCACCAg	
43	OI 43F CCCATgCCAgTACCCTCAgCATggC	242
	OI 43R GggAgAgCAGgggAATATgggTCAG	

44	OI 44 F	GCAACACTCCATgACCACAgC	309
	OI 44 R	CCTgCCTgggTgAAgTCCgAC	
45	OI 45 F	GgAgAgAgAgATCCAgCAgAggggA	246
	OI 45 R	GggACAAACTgTCAggCggAAgTTC	
46	OI 46F	CATgCCTTCAgAACTCTACAg	297
	OI 46R	GgggAAAgAATgACTaTCCAg	
47	OI 47F	GTTgCCCACACTgCCCTTgTC	249
	OI 47R	AACCCTTCTCCAgAgAggCAAAGgg	
48	OI 48 F	CCgTggggCCAgAgCCAgCAg	299
	OI 48 R	GCACAgAgAgggAAgAgAgTggggA	
49	OI 49F	GCTggTCCTgTTgTATgTAgC	475
	OI 49R	CCAgCACCATATggTAggggCACAT	
50	OI 50F	CCAgggTCCCCATgCCCATATgTgC	344
	OI 50R	CATgTCCCTTCTgAgCACTgggCTA	
51	OI 51F	ggACCCTggACAggAggCCAgCagg	399
	OI 51R	gATggAgAgAgggCACTATggC	
52	OI 52F	gggCATTTTggCCAggCCATAgTgCC	319
	OI 52R	gggggggTTCAgTTTgggTTgCTTCTg	

2.2.2- Detecção de mutações por Sequenciamento Automático

Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados utilizando-se o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (PROMEGA, Madison, WI, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a purificação as amostras foram quantificadas em gel de agarose 2% usando-se o marcador de peso molecular *Low Mass DNA Ladder* (INVITROGEN, CARLSBAD, CA, USA) para posterior sequenciamento. Estas deveriam conter de 40 a 80 ng/μl de DNA

As reações de sequenciamento dos exons 6 a 52 do gene *COL1A1* foram feitas de acordo com SANGER *et al.* (1977). O sequenciamento dos fragmentos foi feito no sequenciador automático ABI PRISM™ 377 (PERKIN ELMER) utilizando-se o *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1 Ready Reaction* (ABI PRISM/APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, USA). A Figura 7 mostra o ciclo utilizado para as reações que foram feitas da seguinte maneira:

- ◆ 40-80 ng de DNA
- ◆ 2 μ l do *mix BigDye* contendo os ddNTPs marcados com fluorescência
- ◆ 1 μ l do *primer* direto ou reverso (5 pmol/ μ l)
- ◆ Completar com H₂O deionizada para 10 μ l.

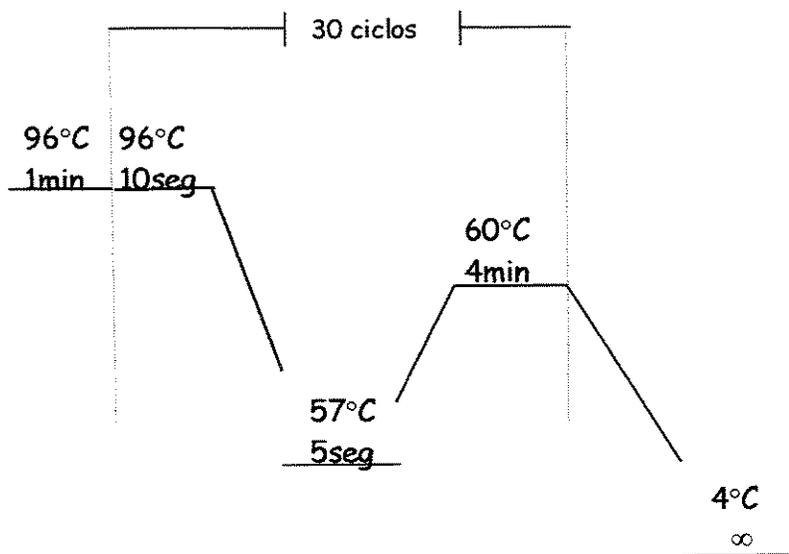


Figura 7- Ciclo utilizado para reação de seqüenciamento automático dos exons 6 a 52 do gene *COL1A1*.

As reações de seqüenciamento foram purificadas e liofilizadas de acordo com as seguintes etapas:

- Adicionou-se 80 μ l de Isopropanol a 75% e incubou-se por 15 minutos no escuro
- Centrifugou-se por 30 minutos a 13.000 rpm, descartando o sobrenadante vagarosamente em papel absorvente
- Adicionou-se 150 μ l de etanol a 70% e centrifugou-se por 10 minutos descartando o sobrenadante e deixando o etanol escorrer e evaporar por completo.

As reações foram então mantidas a -20 °C até o momento da aplicação no gel de seqüenciamento. O gel de acrilamida foi feito como descrito a seguir, e posteriormente filtrado com filtro 0,22 µm (MILLIPORE, Bedford, MA, USA) e estocado em temperatura ambiente.

Gel de acrilamida 4,5%:

- ◆ 36 g de uréia
- ◆ 1 g de resina (Mixed Bed Resin – SIGMA ALDRICH CHEMIE, St. LOUIS, MO, USA)
- ◆ 10 ml de solução de acrilamida/bis (19:1)
- ◆ 10 ml de TBE 10X filtrado com filtro 0,45 µm (MILLIPORE)
- ◆ Completar o volume com H₂O para 100 ml.

Para a polimerização de 30 ml de gel foram adicionados 195 µl de persulfato de amônio (PHARMACIA BIOTECH AB, Upsala, Sweden) 10% e 19,5 µl de TEMED (PHARMACIA BIOTECH). A solução foi vertida em um aparato montado entre duas placas de vidro. As placas foram previamente lavadas com detergente especial Alconox (ABI PRISM/APPLIED BIOSYSTEMS). Antes da aplicação das amostras no gel realizou-se uma pré-corrída em tampão TBE 1X para aquecimento prévio das placas.

Antes da corrida o *pellet* foi ressuspendido em 3 µl de tampão formamida/Blue Dextran (ABI PRISM/APPLIED BIOSYSTEMS) na proporção de 5:2, desnaturado por 2 minutos a 96°C e 1 µl de reação foi aplicado no gel de seqüenciamento. O tempo e as condições de corrida foram estipulados de acordo com o tamanho de cada fragmento seqüenciado, variando em torno de 4 a 7 horas de corrida.

As seqüências obtidas foram alinhadas e comparadas com a seqüência normal do DNA genômico e do cDNA do gene *COL1A1* (*GenBank accession number* AF017178 e Z74615, respectivamente) com o auxílio dos programas de análise *Chromas* (*Technelysium Pty. Ltd.*; Helensvale, Austrália) e *Gene Runner*.

2.2.3- Confirmação das mutações

Para confirmar a deleção em heterozigose encontrada no exon 28 do paciente 28 e determinar sua posição com precisão, foi feita a clonagem do produto da PCR no vetor pGEM, desse modo cada alelo foi analisado separadamente por seqüenciamento manual. O Kit *pGEM-T Easy Vector System* (PROMEGA), permite a clonagem direta de produtos da PCR sem a necessidade de digestão e purificação. A ligação utilizando o pGEM, foi feita a 4°C durante a noite da seguinte maneira:

- ◆ 5 µl de tampão 2x *Rapid Ligation*
- ◆ 1 µl da enzima T4 DNA ligase (3 U//µl)
- ◆ 0,5 µl do vetor pGEM (50 ng/µl)
- ◆ 3,5 µl de produto da PCR

Após a reação de ligação, o plasmídeo contendo o inserto foi introduzido em células competentes DH5α descritas por HANAHAHAN (1983). A preparação de células competentes para transformação foi feita a partir da técnica descrita por NISHIMURA *et al.* (1991). O processo de transformação das células competentes consistiu basicamente de choque térmico, como é descrito a seguir:

- 1-Adicionou-se 5 µl de ligação a 100 µl de células competentes DH5α
- 2- Incubou-se em gelo por 30 – 60 min
- 3- Colocou-se em banho a 42°C por 1 min
- 4- Colocou-se imediatamente em gelo por 2 min
- 5- Acrescentou-se 950 µl de meio LB líquido
- 6- Incubou-se a 37°C por 1 hora sob agitação
- 7- 200 a 300 µl das células transformadas foram espalhadas em placas contendo 20 ml de meio LB ágar e ampicilina (25 mg/ml) para seleção. Foram espalhados nas placas 14 µl de Xgal (50 mg/ml) e 50 µl de água destilada antes de serem semeadas as células transformadas.

As colônias recombinantes (brancas) foram selecionadas pelo Xgal (análogo da lactose), e as bactérias recombinantes foram colocadas para crescer em agitador com 5 ml de meio LB líquido e 10 µl de ampicilina (25 mg/ml) durante 12 horas a 37°C. As que cresceram tiveram seus plasmídios extraídos e purificados por mini-preparação utilizando o kit *GFX MicroPlasmid Prep* (PHARMACIA BIOTECH) de acordo com as instruções do fabricante.

O seqüenciamento manual do exon 28 do gene *COL1A1* foi feito pelo método de terminação de cadeias (SANGER *et al.*, 1977), utilizando o kit *Thermo Sequenase Radiolabeled terminator cycle sequencing* (AMERSHAM LIFE SCIENCE, Cleveland, OH, USA).

Foi utilizado 1 µl do produto da miniprep diluído em H₂O 1:10, sendo 5 µl para cada uma das reações (direta e reversa). Nesse caso foram utilizados os *primers* universais do próprio plasmídio T7 (direto) e SP6 (reverso).

a) Reação:

A mistura de reação para seqüenciamento foi a seguinte:

5 µl do produto da miniprep diluído 1:10

1 µl do *primer* (T7 ou SP6) ~ 2 pmoles

2 µl de *reaction buffer* 10X (260 mM Tris-HCl, pH 9,5; 65 mM MgCl₂)

2 µl enzima Thermo Sequenase (4 U/µl)

10 µl de H₂O.

Foram distribuídos 4,5 µl dessa reação para cada um dos 4 tubos contendo a mistura de terminação que é composta de:

2 µl dGTP *termination master mix* (7,5 µM/µl dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

0,5 µl (0,3 µM/µl) de cada ddNTP marcado com α-³³P:

ddGTP - 0,3 μ M [α - 33 P] ddGTP (1500 Ci/mmol, 450 μ Ci/ml), 11,25 μ Ci

ddATP - 0,3 μ M [α - 33 P] ddATP (1500 Ci/mmol, 450 μ Ci/ml), 11,25 μ Ci

ddTTP - 0,3 μ M [α - 33 P] ddTTP (1500 Ci/mmol, 450 μ Ci/ml), 11,25 μ Ci

ddCTP - 0,3 μ M [α - 33 P] ddCTP (1500 Ci/mmol, 450 μ Ci/ml), 11,25 μ Ci

A reação de seqüenciamento foi feita em 40 ciclos nas condições especificadas na Figura 8.

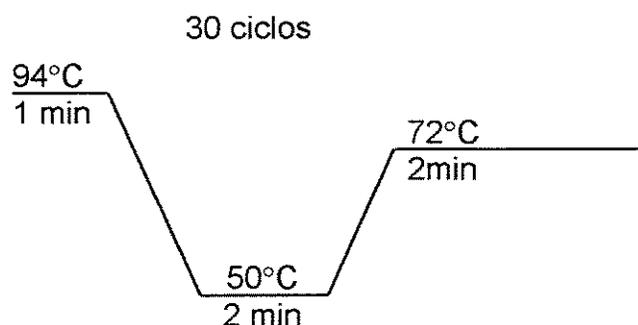


Figura 8- Ciclo utilizado para reação de seqüenciamento manual. A temperatura de anelamento é correspondente aos *primers* do vetor pGEM (T7 e SP6).

Após os ciclos foram acrescentados 4 μ l de *stop solution* (95% formamida, 20 mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol, 0,05% xileno cianol) para interromper a reação.

b) Preparo do gel de acrilamida:

O gel utilizado foi de poliacrilamida a 6%, composto por 10,5 ml de solução estoque de acrilamida a 40% contendo: 3% de bisacrilamida, 7 ml de tampão TBE 10X, 29,4 g de uréia e água destilada para um volume final de 70 ml. Para a polimerização, foram adicionados 500 μ l de persulfato de amônio 10% (PHARMACIA BIOTECH) e 50 μ l de TEMED (PHARMACIA BIOTECH). A solução foi vertida em um aparato montado entre duas placas de vidro (com as dimensões de 42 cm x 33,5 cm e 39,5 cm x 33,5 cm) emparelhadas e tendo entre elas espaçadores sem gradiente de espessura. As placas foram previamente lavadas com detergente, acetona e etanol absoluto e somente a placa maior

sofreu um tratamento com 3ml de REPEL-SILANE (PHARMÁCIA BIOTECH), substância repelente à base de silicone. Antes da aplicação das amostras no gel de seqüenciamento, realizou-se uma pré-corrída em tampão TBE 1X para um aquecimento prévio do gel.

As amostras foram previamente desnaturadas a 95°C por 5 minutos e 3 µl de cada tubo foram aplicados no gel de seqüenciamento e submetidos a uma corrida eletroforética nas condições de 2000 V, 50 W e 50 mA. O tempo de corrida foi estipulado de acordo com o tamanho de cada fragmento que estava sendo seqüenciado.

Decorrido o tempo necessário da corrida eletroforética, as placas foram desmontadas. Da placa menor o gel foi transferido para um papel 3MM (papel de filtro) nas mesmas dimensões da placa. O papel de filtro é lançado sobre o gel na placa. A porosidade deste papel e sua qualidade absorvente por capilaridade promovem a aderência do gel ao papel. Em seguida o papel foi envolto em filme de PVC e foi secado por 1 hora a 80°C a vácuo. Após a secagem do papel, este foi exposto a um filme sensível (KODAK BIOMAX) durante a noite à -70°C com intensificador.

Com o objetivo de confirmar se a substituição de uma base C por G na posição 1249, no exon 19 do paciente 43 se tratava de um polimorfismo ou de uma mutação de ponto, foram estudados 50 indivíduos normais através de análise de restrição. Esta alteração cria um sítio de restrição para a enzima *Ban I* (PROMEGA). O produto de amplificação do exon 19 apresenta 318 bp, na presença da base C o fragmento é digerido apresentando bandas de 138 e 180 bp, entretanto, na presença da base G mutante, o produto da PCR é digerido em fragmentos de 9, 138 e 171 pb. O resultado da análise de restrição foi verificado em gel de agarose 1000 3% (INVITROGEN). A digestão foi feita à 37°C por duas horas como descrito a seguir:

- 20 µl de PCR
- 1 µl da enzima *Ban I* (20 U/µl)
- 1 µl tampão (50 mM de acetato de potássio, 20 mM de Tris-acetato, 10mM de acetato de magnésio, 1 mM de DTT)
- 8 µl de H₂O

2.2.4- Estudo do polimorfismo *IVS8-36delT*

A fim de investigar o possível efeito da deleção *IVS8-36delT* no mecanismo de *splicing* do gene *COL1A1*, foi feita a extração de RNA dos fibroblastos da pele do paciente 70, de seu pai e de um controle normal.

O RNA foi extraído com o reagente Trizol (INVITROGEN) da seguinte maneira:

- As células foram descoladas da garrafa de cultura com o auxílio de uma espátula sem o uso de tripsina e colocadas em um tubo de 2 ml;
- Para cada $5 \cdot 10^6$ células/ml foram acrescentados 1 ml de Trizol. A mistura foi homogeneizada e incubada por 5 min a temperatura ambiente (TA);
- Em seguida foram acrescentados 0,2 ml de clorofórmio por ml de Trizol. A mistura foi vigorosamente homogeneizada e incubada de 2 a 3 min a TA, quando foi centrifugada a 13.000 rpm por 20 min de 2 a 8°C;
- Após a centrifugação a fase aquosa foi separada do Trizol e colocada em outro tubo;
- Sua precipitação foi feita com 0,5 ml de isopropanol por ml de Trizol e incubada por 10 min a TA;
- Em seguida foi feita outra centrifugação a 13.000 rpm por 10 min de 2 a 8°C e descartado o sobrenadante. O *pellet* foi lavado com etanol 75%, no mínimo 1 ml de etanol por ml de Trizol;
- Uma última centrifugação foi feita a 12.000 rpm por 5 min a 2 a 8°C.
- O *pellet* de RNA total foi deixado secando por inversão do tubo a TA e posteriormente dissolvido com H₂O DEPC estéril. O RNA foi armazenado em freezer -70°C até sua utilização.

A reação de síntese de cDNA total foi feita utilizando-se o kit *ThermoScript RT-PCR System* (INVITROGEN). Foram sintetizados cDNAs a partir de *primers* oligo(dT) seguindo o protocolo do fabricante. Na reação foram colocados 4 µl de RNA total de cada amostra que apresentou uma concentração variável de 1 a 2 µg/µl. O cDNA total foi armazenado no freezer a -20°C até sua utilização.

Posteriormente, estes cDNAs foram amplificados com o *primers* específicos **9F**, localizado no exon 8, e **17R** localizado no exon 18, cujas seqüências estão descritas Tabela 5. Estes *primers* foram escolhidos pois se localizavam em exons e juntos cobriam a região de interesse, produzindo um fragmento de amplificação de 576 pb. O ciclo utilizado foi o mesmo descrito na figura 6 e a reação de amplificação se deu nas seguintes condições:

- ◆ 2 µl de cDNA total
- ◆ 5 µl de tampão de PCR 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM)
- ◆ 1,5 µl de MgCl₂ 50mM
- ◆ 1 µl de dNTPs 0,2mM
- ◆ 0,1 µg de cada *primer* (direto e inverso)
- ◆ 0,25 µl de enzima *Taq* polimerase 5 U/µl
- ◆ Volume final da reação de 50 µl.

4- RESULTADOS

1- Alterações encontradas no gene *COL1A1*

Os exons 6 a 52 do gene *COL1A1*, que compreendem o domínio da tripla hélice e o domínio C-terminal da molécula do colágeno tipo I, foram seqüenciados em 13 pacientes portadores de OI. Foram identificadas 6 mutações associadas ao fenótipo, sendo 4 novas e 2 já descritas, além de polimorfismos em exons e introns, e outras substituições. A Tabela 6 (páginas 67 e 68) mostra um resumo de todas as alterações identificadas nos pacientes estudados e a Tabela 7 (página 69) descreve os dados clínicos e radiológicos dos pacientes de OI em que foram encontradas mutações no gene *COL1A1*.

As alterações encontradas na seqüência do gene *COL1A1* foram comparadas com as seqüências do DNA genômico e cDNA depositadas no banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) sob o número de acesso AF017178 e Z74615, respectivamente. Assim como também foram comparadas com o seqüenciamento do mesmo fragmento em indivíduos normais.

Como o material usado para o rastreamento de alterações no gene *COL1A1* foi o DNA genômico, o possível efeito das mutações na proteína foi baseado na seqüência de nucleotídeos. Do mesmo modo, as deduções em relação ao seu impacto no fenótipo de pacientes com OI foram feitas com referência aos dados disponíveis na literatura.

A seqüência de DNA foi numerada a partir da primeira base do códon de início da tradução, como determinado pelas regras internacionais de nomenclatura de mutações em genes humanos (ANTONARAKIS, 1998). A numeração da seqüência de aminoácidos, de acordo com as mesmas regras, deve começar no primeiro códon do peptídeo sinal da molécula de colágeno tipo I. Dessa forma a primeira glicina da tripla hélice seria o códon de número 179. Entretanto, praticamente todos os autores que publicaram suas mutações no gene *COL1A1*, pelo menos até 2003 (BENUSIENE e KUCINSKAS, 2003; GALICKA, 2002; WARD *et al.*, 2001) consideraram como aminoácido número 1 a primeira glicina da tripla hélice. Para evitar confusão com os dados já publicados na literatura e facilitar sua comparação com os achados deste trabalho, optou-se por manter a versão mais utilizada na literatura tanto na dissertação da tese quanto no artigo.

Tabela 6- Resumo de todas as alterações identificadas no gene *COL1A1*.

Família	Paciente	Tipo de OI	Nucleotídeo	Aminoácido	Exon/ Intron	Referência
1	1(F)	Tipo III ou IV	IVS12-14T>G		Intron 12	Mirandola et al., 2000
2	4(F)	Tipo IV	c.1243C>T	p.R237X	Exon 19	Redford-Badwal et al., 1996; Willing et al. 1996 Este trabalho
			IVS49+4T>A			Este trabalho
			c.1548C>T	P338P	Exon 23	Marini et al., 1993
			IVS21+27A>G		Intron 21	Este trabalho
			IVS27-44C>T		Intron 27	Este trabalho
			IVS28-20C>T		Intron 28	Este trabalho
3	7(M)	Tipo I	IVS29-42A>G		Intron 29	Mirandola et al., 2000
			IVS37-18G>C		Intron 37	Ward et al., 2001
			IVS44-32C>A		Intron 44	Este trabalho
			IVS45+31C>T		Intron 45	Este trabalho
			IVS48+46T>A		Intron 48	Este trabalho
			IVS49+4T>A		Intron 49	Este trabalho
			c.1885delG	Frameshift G451	Exon 28	Este trabalho
			c.1548C>T	P338P	Exon 23	Marini et al., 1993
4	28(F)	Tipo I	IVS24+58T>C		Intron 24	Este trabalho
			IVS27+60C>T		Intron 27	Este trabalho
			IVS49+4T>A		Intron 49	Este trabalho
			c.2308G>A	p.G592S	Exon 33/34	Este trabalho
5	33 (RN)	Tipo III	c.1548C>T	P338P	Exon 23	Marini et al., 1993
			IVS12-14T>G		Intron 12	Mirandola et al., 2000
			IVS15+17G>A		Intron 15	Este trabalho
			c.1548C>T	P338P	Exon 23	Marini et al., 1993
6	37(F)	Tipo I	IVS12-14T>G		Intron 12	Mirandola et al., 2000
			IVS24+58T>C		Intron 24	Este trabalho
			IVS49+4T>A		Intron 49	Este trabalho
			c.1249C>G	p.P239A	Exon 19	Este trabalho
			c.1548C>T	P338P	Exon 23	Marini et al., 1993
7	43(M)	Tipo I	c.1803C>T	P423P	Exon 26	Mirandola et al., 2000
			IVS24+58T>C		Intron 24	Este trabalho
			IVS49+4T>A		Intron 49	Este trabalho
			c.1548C>T	P338P	Exon 23	Marini et al., 1993
			c.1803C>T	P423P	Exon 26	Mirandola et al., 2000
8	48(F)	Tipo I	IVS29-42A>G		Intron 29	Mirandola et al., 2000
			IVS37-18G>C		Intron 37	Ward et al., 2001
			IVS45+31C>T		Intron 45	Este trabalho
			IVS49+4T>A		Intron 49	Este trabalho

(M) masculino; (F) feminino; (RN) recém-nascido; em negrito estão as mutações encontradas associadas ao fenótipo de OI.

Tabela 6- Resumo de todas as alterações identificadas no gene *COL1A1* (continuação).

Família	Paciente	Tipo de OI	Nucleotídeo	Aminoácido	Exon/ Intron	Referência
9	52(RN)	Tipo III ou IV	c.1548C>T	P338P	Exon 23	Marini et al., 1993
			IVS19-8C>G		Intron 19	Ward et al., 2001
			IVS48+46T>A		Intron 48	Este trabalho
			IVS49+4T>A		Intron 49	Este trabalho
10	68(Feto)	Tipo II	c.1548C>T	P338P	Exon 23	Marini et al., 1993
			IVS24-31T>C		Intron 24	Este trabalho
			IVS48+10C>A		Intron 48	Este trabalho
			c.1548C>T	P338P	Exon 23	Marini et al., 1993
11	70(RN)	Tipo IV	c.1821C>T	V429V	Exon 26	Este trabalho
			IVS8+18A>C		Intron 8	Este trabalho
			IVS8+25T>C		Intron 8	Este trabalho
			IVS8-36delT		Intron 8	Este trabalho
			IVS12-14T>G		Intron 12	Mirandola et al., 2000
			IVS21+27A>G		Intron 21	Este trabalho
			IVS29-42A>G		Intron 29	Mirandola et al., 2000
			IVS38-18G>C		Intron 38	Este trabalho
			IVS49+4T>A		Intron 49	Este trabalho
			12	74(RN)	Tipo IV	c.1678G>A
c.1548C>T	P338P	Exon 23				Marini et al., 1993
IVS21+27A>G		Intron 21				Este trabalho
IVS24-31T>C		Intron 24				Este trabalho
c.2480G>A	p.G649D	Exon 37				Este trabalho
c.1548C>T	P338P	Exon 23				Marini et al., 1993
13	77(NM)	Tipo IIa	IVS8-36delT		Intron 8	Este trabalho
			IVS9-30A>G		Intron 9	Este trabalho
			IVS15+52G>A		Intron 15	Este trabalho
			IVS15+77G>A		Intron 15	Este trabalho
			IVS19-8C>T		Intron 19	Ward et al., 2001
			IVS21-33C>T		Intron 21	Este trabalho
			IVS22+30C>G		Intron 22	Este trabalho

(M) masculino; (F) feminino; (RN) recém-nascido; (NM) natimorto; em negrito estão as mutações encontradas associadas ao fenótipo de OI.

Tabela 7- Dados clínicos e radiológicos dos pacientes de OI em que foram encontradas mutações no gene COL1A1.

Paciente	DNA	Proteína	Exon	Tipo		Esclera azul	Dentinogenesis imperfecta		Surdez	Fraturas nascimento		Múltiplas fraturas nascimento		Deformidade óssea
				OI	OI		imperfecta	imperfecta		nascimento	nascimento	fraturas nascimento	fraturas nascimento	
4	c.1243C>T	p.R237X	19	IV	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	+
28	c.1885delG	<i>Frameshift</i> G451	28	I	I	+	-	-	-	-	-	-	-	-
33	c.2308G>A	p.G592S	33/34	III	III	+	?	?	?	+	-	-	-	+
43	c.1249C>G	p.P239A	19	I	I	+	?	?	?	-	-	-	-	-
74	c.1678G>A	p.G382S	25	IV	IV	-	+	+	?	-	-	-	-	+
77	c.2480G>A	p.G649D	37	IIA	IIA	+	/	/	/	+	+	+	+	+

O símbolo (+) significa presença; (-) ausência; (/) morte perinatal; (?) não disponível.

2- Rastreamento do gene COL1A1 pela técnica de Seqüenciamento Automático

2.1- Alterações encontradas associadas ao fenótipo

Mutação p.R237X

O seqüenciamento automático do gene *COL1A1* da paciente 4 revelou uma mutação *nonsense* em heterozigose no exon 19, já descrita na literatura por REDFORD-BADWAL *et al.* (1996) e WILLING *et al.* (1996). Esta mutação é constituída pela substituição de uma citosina por uma timina na posição 1243 (c.1243C>T) que promove a troca de uma arginina (CGA) por um códon de terminação prematuro (TGA) na posição 237, produzindo provavelmente uma proteína truncada. A mãe da paciente foi analisada e não apresentou a mesma mutação, não foi possível obter amostra de sangue do pai (Figura 9A e B).

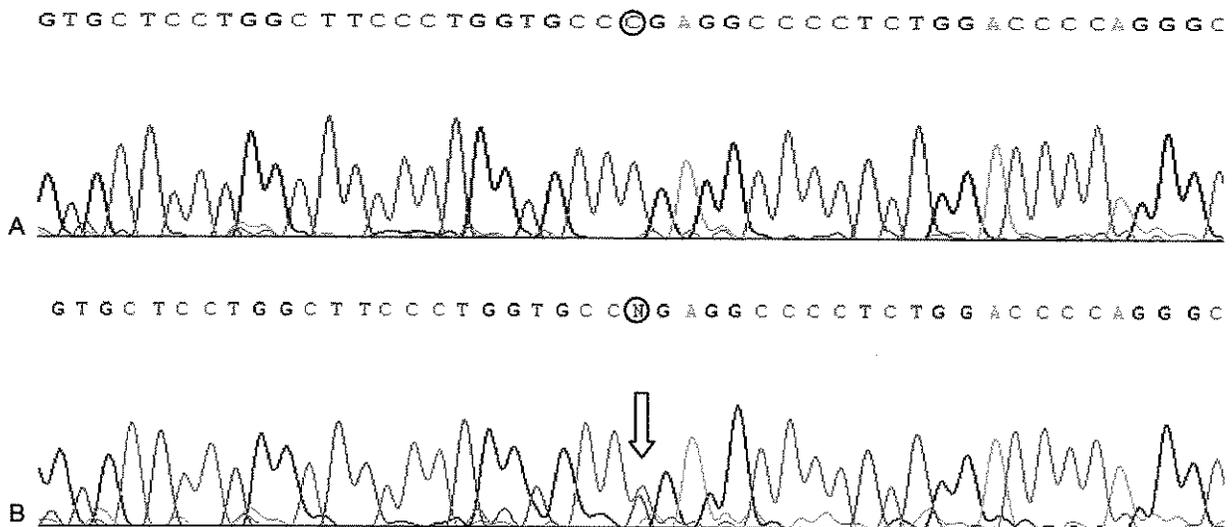


Figura 9- Eletroferogramas da fita *sense* do exon 19 do gene *COL1A1* da mãe do paciente 4 (A) e do paciente 4 (B). A seta aponta a mutação de CGA→TGA em heterozigose no paciente. A base C está representada pelo pico azul e a base T pelo pico vermelho, ambas representadas pela letra N em B.

Frameshift G451

Foi detectada a deleção em heterozigose de uma guanina na posição 1885 (c.1885delG) no exon 28 da paciente 28. Esta deleção nova no códon 451 (GGC) que codifica uma glicina, leva a alteração na matriz de leitura de aminoácidos conhecida como *frameshift* (Figura 10). O seqüenciamento do gene *COL1A1* dos pais da paciente e de sua irmã, que são clinicamente normais, também foi realizado e nenhuma alteração foi encontrada. Tendo em vista que a reação de seqüenciamento automático ficou muito confusa e não foi possível determinar através da análise do eletroferograma a posição exata da deleção, este fragmento foi clonado em vetor pGEM, e os alelos foram analisados separadamente por seqüenciamento manual (Figura 11).

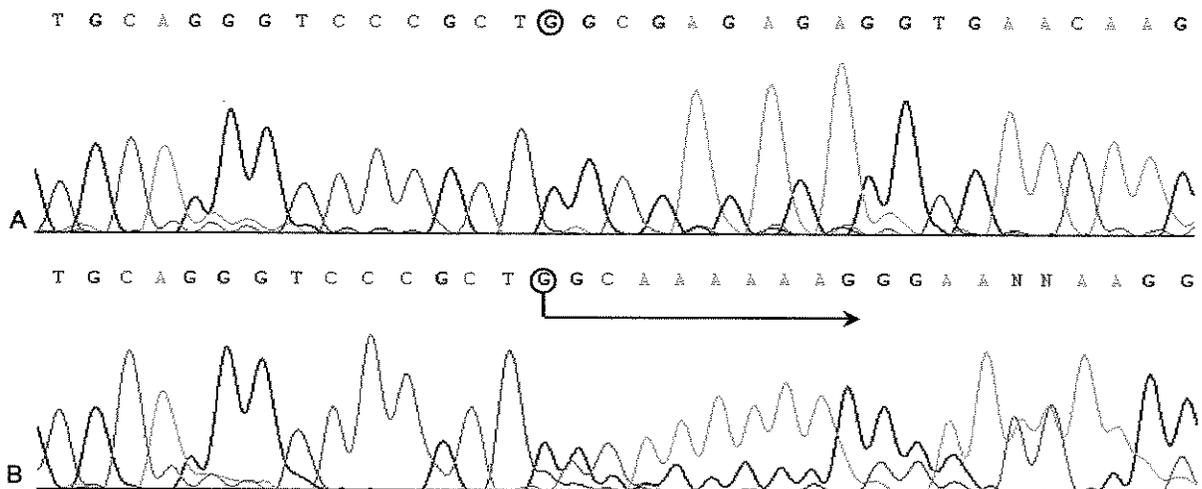


Figura 10- (A) Eletroferogramas da fita *sense* do exon 28 de um controle normal e (B) do paciente 28, demonstrando que a partir do ponto onde ocorre a deleção de uma guanina em heterozigose a reação apresenta uma leitura confusa.

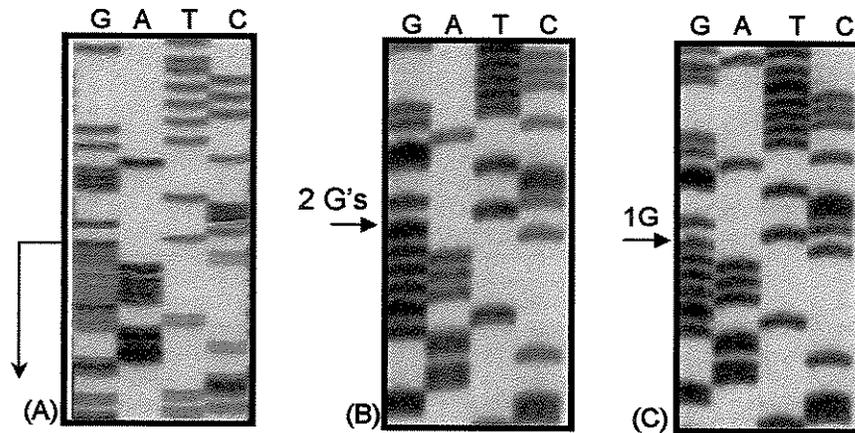


Figura 11- Seqüenciamento manual da fita *sense* do exon 28 do paciente 28: (A) antes da clonagem no vetor pGEM. Pode-se observar que a partir do ponto mostrado pela seta surge uma confusão de bases no gel; (B) após a clonagem, o alelo normal com duas bases G e o alelo mutante (C) com apenas uma base G, na mesma posição, tendo o outro sido deletado.

Mutação p.G592S

A mutação nova p.G592S foi encontrada no paciente 33 e provoca a substituição de uma glicina (GGT) por uma serina (AGT) no códon 592 do exon 33/34. A alteração foi encontrada em heterozigose na posição nucleotídica 2308 do gene *COL1A1* (Figura 12).

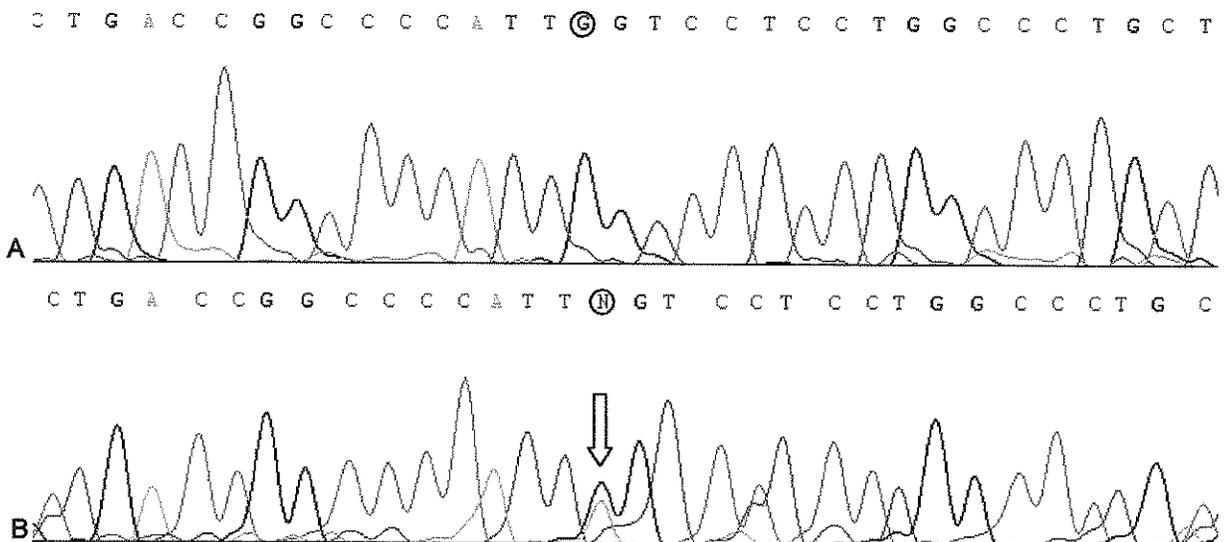


Figura 12- Eletroferogramas da fita *sense* do exon 33/34: (A) controle normal; (B) paciente 33 mostrando a mutação de GGT→AGT em heterozigose, na seta a base G normal está representada pelo pico preto e a base A mutante pelo pico verde, ambas representadas pela letra N.

Mutação p.P239A

O seqüenciamento do paciente 43 revelou uma outra mutação de ponto nova, de citosina para guanina, na posição 1249 (c.1249C>G), que provoca a substituição em heterozigose de uma prolina (CCC) por uma alanina (GCC) no códon 239, no exon 19 do gene *COL1A1* (Figura 13).

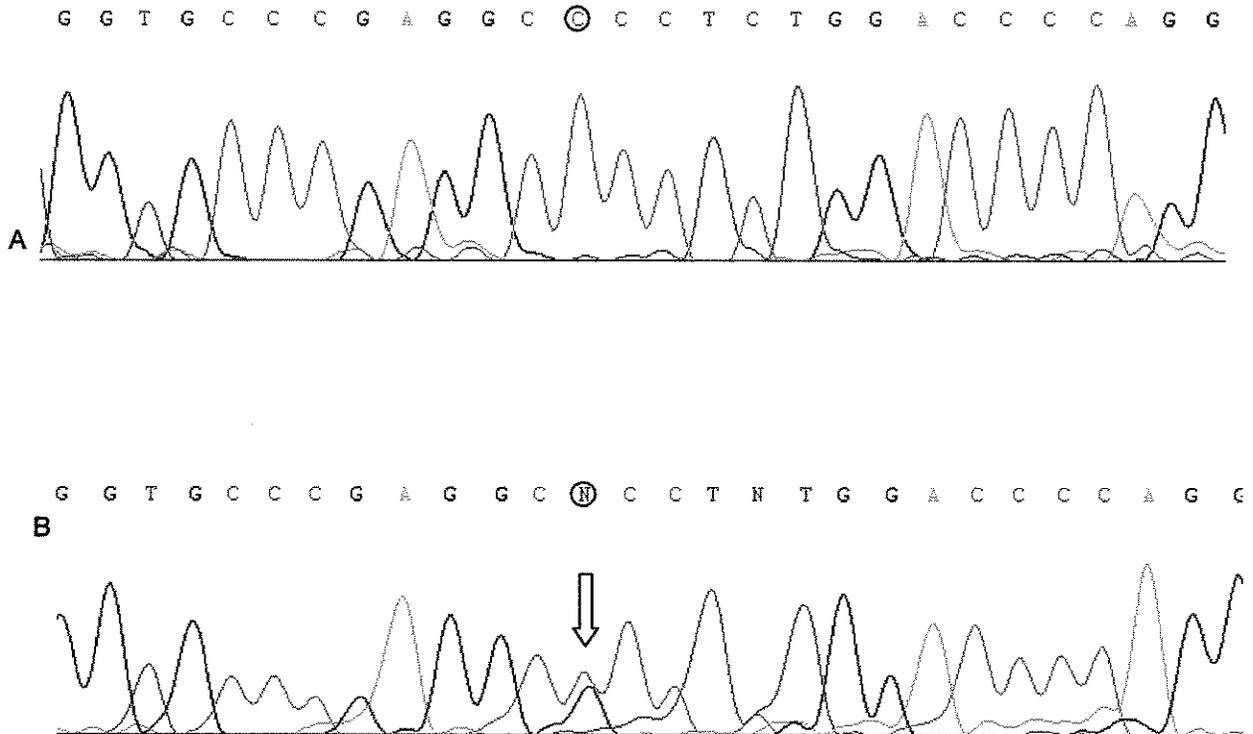


Figura 13- Eletroferogramas da fita *sense* do exon 19: (A) controle normal; (B) paciente 33 mostrando a mutação de CCC→GCC em heterozigose, na seta a base G mutante está representada pelo pico preto e a base C normal pelo pico verde, ambas representadas pela letra N.

Pela análise de restrição com a enzima *Ban* I (PROMEGA), foi confirmada a presença dessa mutação no paciente 43, como pode ser observado na Figura 14. Quando a base C está presente, existe somente um único sítio de restrição da enzima e o fragmento amplificado de 318 pb, é digerido em dois de 138 e 180 bp. Quando a base G mutante está presente, o fragmento apresenta dois sítios para *Ban* I, sendo digerido em três fragmentos

de 138, 171 e 9 pb (Figura 14A). Desse modo foi possível também detectar se essa alteração se tratava ou não de polimorfismo. A digestão do produto de PCR do exon 19 em 50 controles normais não revelou essa alteração (Figura 14B).

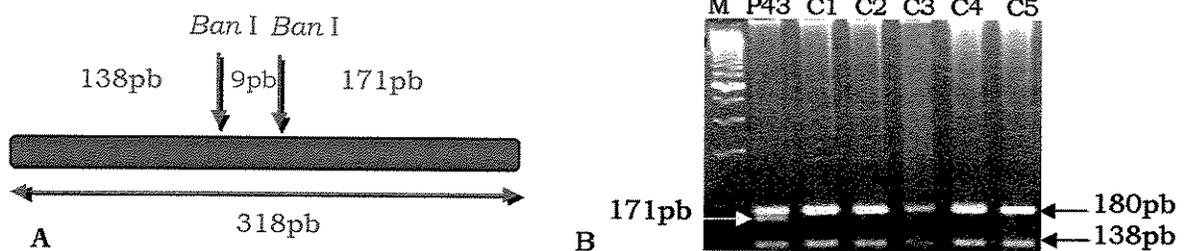


Figura 14- A- Esquema de restrição do exon 19 com a enzima *Ban I* quando a base G mutante está presente. **B -** Análise de restrição do exon 19 com a enzima *Ban I* em gel de agarose 1000 a 3%. O paciente 43 (P43) apresenta as bandas de 180, 171 e 138 pb, demonstrando que é heterozigoto para a mutação, enquanto os controles normais (C1 a C5) apresentam as bandas de 180 e 138 pb. Não foi possível visualizar a banda de 9pb. M: marcador de peso molecular de 100 pb (INVITROGEN).

Mutação p.G382S

A mutação p.G382S, anteriormente descrita por MACKAY *et al.* (1993), foi identificada no paciente 74 e provoca a substituição de uma glicina (GGT) por uma serina (AGT) no códon 382 do exon 25 (c.1678G>A) do gene *COL1A1* (Figura 15).

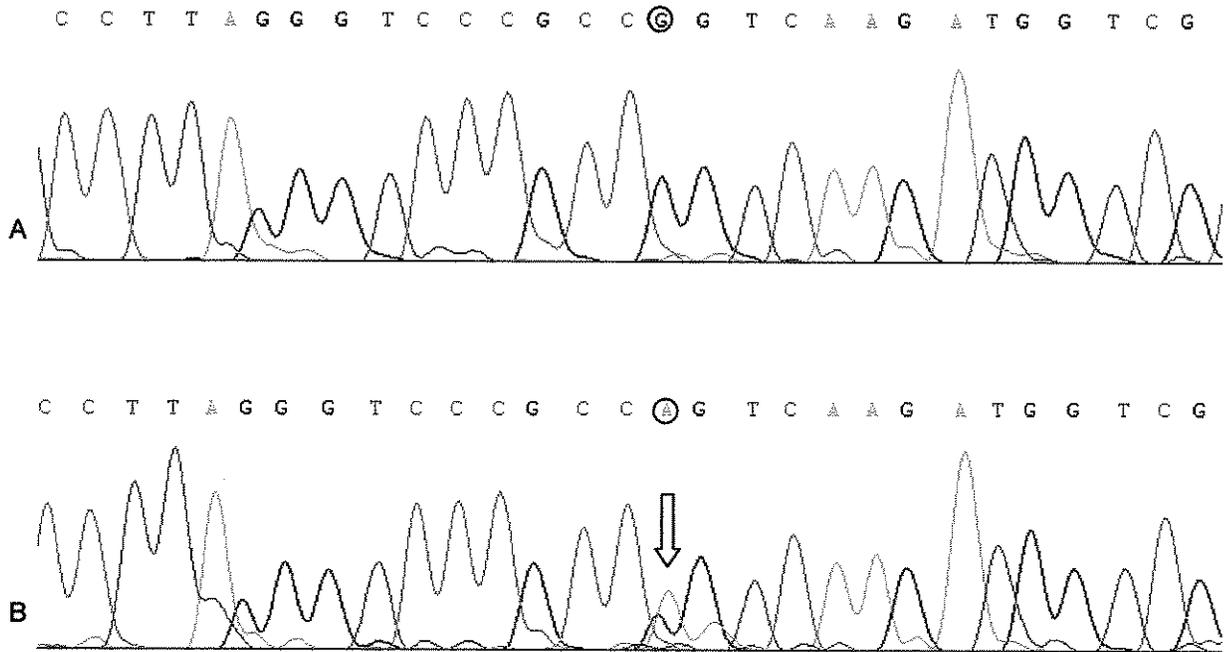


Figura 15- Eletroferogramas da fita *sense* do exon 25: (A) controle normal e (B) paciente 74 mostrando a mutação de GGT→AGT em heterozigose. Na seta a base G normal está representada pelo pico preto e a base A mutante pelo pico verde.

Mutação p.G649D

Outra mutação de ponto nova no gene *COL1A1* foi encontrada no paciente 77 e provoca a troca de uma glicina (GGC) por ácido aspártico (GAC) no códon 649 localizado no exon 37 do gene *COL1A1*, nucleotídeo 2480 (Figura 16).

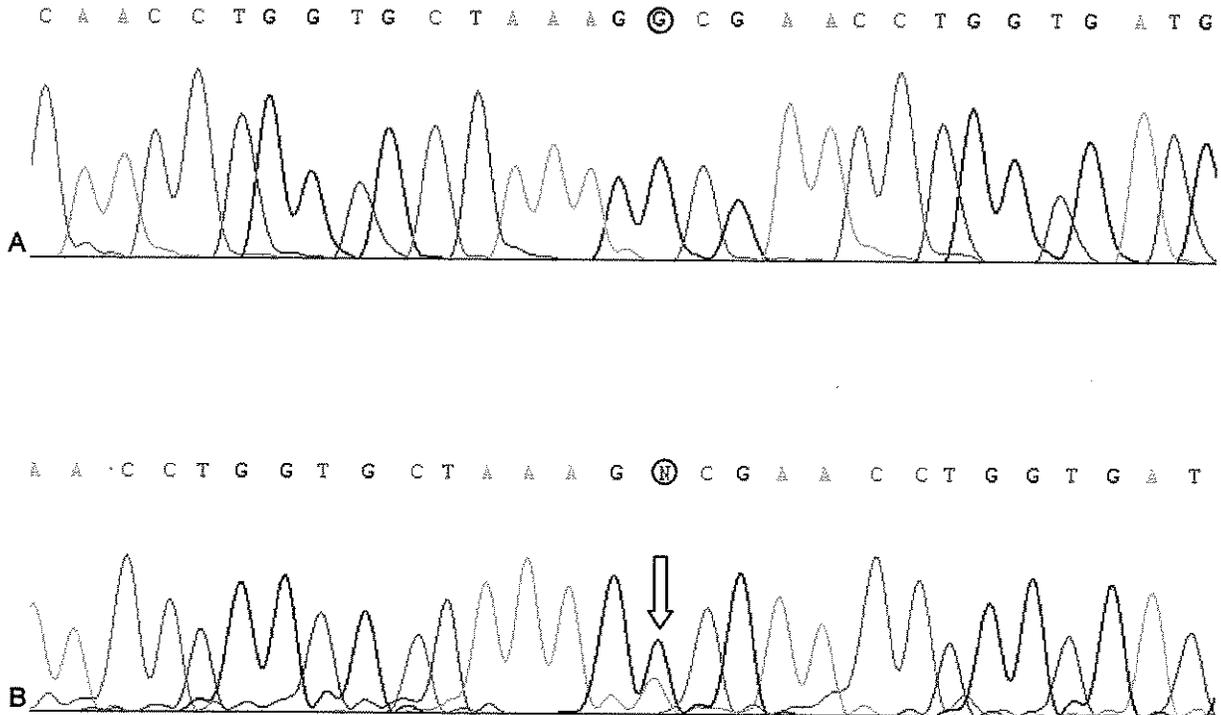


Figura 16- Eletroferogramas da fita *sense* do exon 37: (A) controle normal e (B) paciente 77 mostrando a mutação GGC→GAC em heterozigose. Na seta a base G normal está representada pelo pico preto e a base A mutante pelo pico verde, ambas representadas pela letra N.

2.2- Outras alterações encontradas

A mutação silenciosa c.1821C>T foi encontrada em heterozigose no exon 26 do paciente 70 e provoca a troca de uma valina (GTC) por outra (GTT) no códon 429 do gene *COL1A1* sendo, portanto, uma substituição neutra. Esta alteração está ausente em sua mãe,

que tem um fenótipo normal, mas está presente em heterozigose em sua irmã portadora de OI e em seu pai que, assim como a mãe, é clinicamente normal (Figura 17).

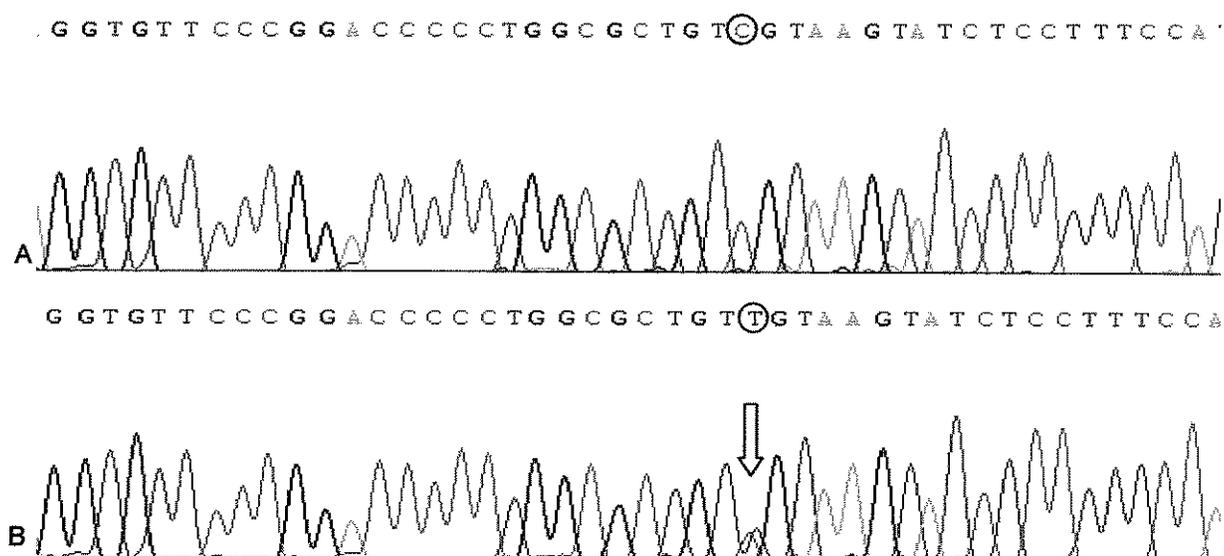


Figura 17- Eletroferogramas mostrando o seqüenciamento automático do exon 26 do gene *COL1A1*. (A) controle normal e (B) a mutação silenciosa c.1821C>T em heterozigose no paciente 70. Na seta a base C normal está representada pelo pico azul e a base T mutante pelo pico vermelho.

Outra alteração encontrada em heterozigose no paciente 70 foi uma deleção no intron 8, IVS8-36delT, que apesar de estar a uma distância considerável da junção exon-intron também foi investigada em sua família (Figura 18). A irmã é heterozigota para esta alteração, assim como seu pai, enquanto a mãe se mostrou normal(Figura 18).

Apesar do pai ser heterozigoto para a deleção e ter um fenótipo normal, ainda restavam dúvidas quanto à influência desta substituição no fenótipo dos seus filhos. Por se tratar de uma deleção, esta poderia provocar o surgimento de alguma seqüência *consensu* alternativa e com isso um mecanismo de *splicing* alternativo. Com base nesta hipótese e também porque não foram encontradas outras alterações neste paciente que justificassem o seu fenótipo, foi feita uma extração de RNA total a partir de cultura de fibroblastos do paciente 70, de seu pai e de um controle. O cDNA total foi sintetizado e utilizando *primers* específicos para os exons 8 e 17 do gene *COL1A1*, um fragmento com

tamanho esperado de 576pb deveria ser amplificado, caso a alteração não provocasse nenhuma modificação no mecanismo de *splicing*. Foi possível verificar pelo tamanho do fragmento amplificado que a substituição em questão não provocava nenhuma alteração no *splicing* do gene *COL1A1*, uma vez que tanto o paciente 70 quanto o pai apresentaram uma banda de mesmo tamanho que o controle utilizado (Figura 19). Este fragmento foi seqüenciado e nenhuma alteração de seqüência foi constatada, sendo esta mesma substituição (IVS8-36deT) posteriormente identificada em heterozigose também no paciente 77.

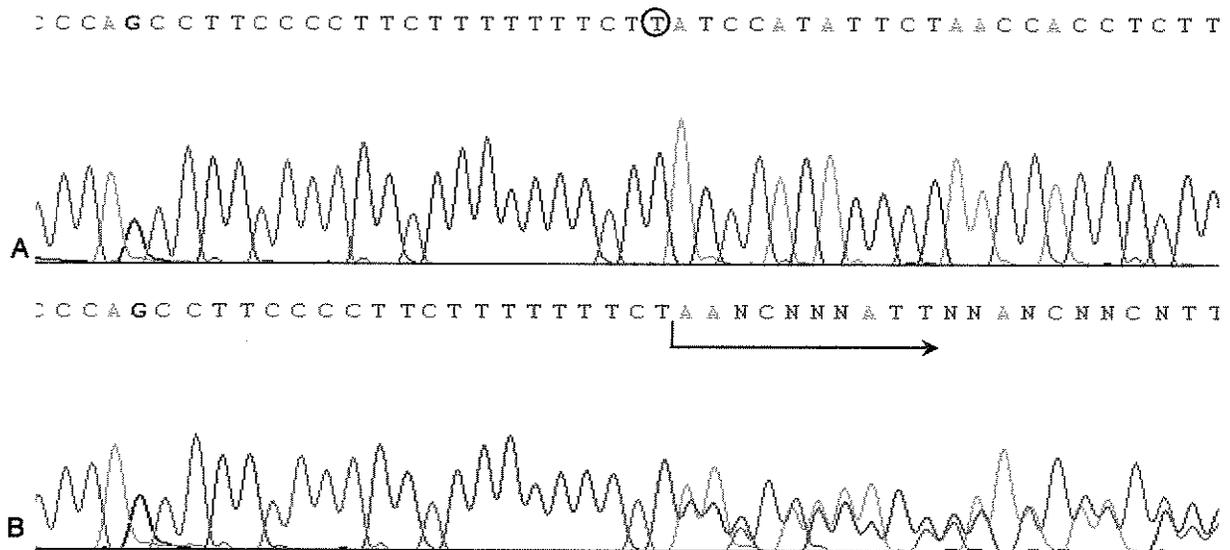


Figura 18- Eletroferogramas do intron 8 do gene *COL1A1*: (A) controle normal e (B) alteração IVS8-36delT encontrada no paciente 70. A seta demonstra que a partir do ponto onde ocorre a deleção de uma timina em heterozigose a reação apresenta uma leitura confusa.

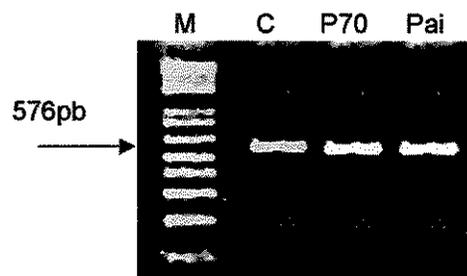


Figura 19- Amplificação do fragmento de 576pb obtido por PCR do cDNA de um controle (C), do paciente 70 (P70) e de seu pai, ambos portadores da substituição IVS8-36delT. M: marcador de peso molecular de 100pb.

Foram encontrados também dois polimorfismos em região codificante do gene *COL1A1* (P338P e P423P) e três polimorfismos em introns (IVS12-14T>G, IVS19-8C>T e IVS29-42A>G) todos previamente descritos. Os pacientes em que esses polimorfismos foram encontrados, assim como sua localização e os autores que os descreveram pela primeira vez estão listados na Tabela 6 (pág. 67 e 68)

Por fim, foram identificadas 20 alterações em região intrônica que nunca haviam sido descritas; algumas aparecem em mais de um paciente e estão dentro da sequência consenso, já outras se encontram fora (Tabela 6 pág. 67 e 68).

5- DISCUSSÃO

A detecção de mutações nos genes do colágeno tipo I é complicada e difícil por várias razões. Os dois genes envolvidos possuem um grande número de exons a serem rastreados, tornando difícil a localização do defeito estrutural. O domínio da tripla hélice das cadeias $\alpha 1(I)$ e $\alpha 2(I)$ é altamente repetitivo e composto de unidades repetidas de GlyXY, onde Gly é glicina, X é frequentemente prolina e Y hidroxiprolina. Portanto, a cada nove pares de base existe uma região de alta homologia. Além disso, as seqüências são ricas em GC e extremamente repetitivas, dificultando o anelamento de *primers*, a amplificação dos fragmentos de interesse e seu seqüenciamento (GALICKA e GINDZIENSKI, 2002).

Sabe-se que a maioria das mutações que promovem a troca de um códon glicina no domínio da tripla hélice, em um dos dois alelos dos genes *COL1A1* ou *COL1A2*, é responsável pelas variantes graves da doença, OI tipos II, III e IV. Este aminoácido é essencial na formação da tripla hélice e é frequentemente substituído por resíduos de serina, cisteína, arginina, ácido aspártico e valina (CULBERT *et al.*, 1996).

Embora a gravidade da doença esteja relacionada com a posição e o tipo de aminoácido substituído, os parâmetros desta relação se mostraram evasivos. BYERS *et al.* (1991) propuseram que, ao menos para a cadeia $\alpha 1(I)$, existe um gradiente de gravidade do fenótipo que coincide com o gradiente de modificação, com mutações letais mais próximas à extremidade C-terminal e mutações não-letais localizadas em direção da extremidade N-terminal da cadeia $\alpha 1(I)$. Contudo, este modelo requer que cada aminoácido em particular tenha seu próprio gradiente de gravidade, com uma transição diferente de letal para não-letal, levando-se em conta a intercalação de algumas substituições não-letais de cisteína e arginina, por substituições letais de valina e ácido aspártico ao longo da cadeia (MARINI *et al.*, 1993).

A relação de gravidade e localização das substituições de glicina por serina na cadeia $\alpha 1(I)$ é complexa e não pode ser descrita por um gradiente linear. Ao invés disso, existem grupos de mutações alternados ao longo da cadeia. Dois conjuntos letais de substituições de serina localizam-se um no meio da cadeia $\alpha 1(I)$, p.G565S, p.G598S e p.G631S (WESTERHAUSEN, *et al.*, 1990), e outro bem próximo a extremidade

C-terminal da tripla hélice, p.G913S, p.G964S e p.G1003S (BYERS *et al.*, 1991; PRUCHNO *et al.*, 1991). Entretanto, existe um grupo de substituições de serina associadas a fenótipos não-letais que se localiza entre os conjuntos letais, além de outras substituições não-letais isoladas (MARINI *et al.*, 1993).

Neste trabalho foram identificadas três mutações de ponto envolvendo o aminoácido glicina no gene *COL1A1*, sendo duas substituições para serina, p.G382S e p.G592S, e uma para ácido aspártico, p.G649D. Todas foram encontradas em pacientes e com tipos deformantes de OI como descrito a seguir.

A mutação nova p.G592S foi encontrada em heterozigose no exon 33/34 do gene *COL1A1* do paciente 33. Trata-se de um caso esporádico de OI, e o paciente foi clinicamente diagnosticado como portador de OI tipo III, apresentando fraturas ao nascimento e deformidade óssea, tal como arqueamento dos ossos longos. Apesar desta alteração estar situada próxima a um grupo de mutações de glicina para serina que estão associadas a letalidade, o paciente em questão apresenta um fenótipo não-letal, embora de gravidade elevada. A mutação p.G589S descrita por FORLINO *et al.* (1994), no mesmo exon do gene *COL1A1* também está associada ao mesmo fenótipo.

A segunda mutação de glicina para serina, p.G382S, foi identificada em heterozigose no exon 25 do paciente 74, que apresenta sinais característicos de OI tipo IV, como *dentinogenesis imperfecta* e deformidades ósseas. Os pais do paciente não apresentam a mutação e, portanto, deve se tratar de outro caso esporádico de OI provocado por mutação *de novo*. MACKAY e colaboradores (1993) descreveram esta mesma alteração em um paciente com fenótipo idêntico de OI. Neste mesmo códon outra mutação foi identificada, porém neste caso o aminoácido glicina foi substituído por uma cisteína resultando em um fenótipo mais brando de OI do tipo IV do que o descrito anteriormente (BYERS, 1990). Esse fato demonstra a importância da natureza do resíduo que substitui a glicina na expressão do fenótipo.

Outra mutação de ponto nova no gene *COL1A1* foi encontrada no paciente 77 e provoca a troca de uma glicina por ácido aspártico, p.G649D, no exon 37 do gene *COL1A1*. Este paciente apresentou morte perinatal, com múltiplas fraturas ao nascimento, sendo

considerado um caso típico de OI tipo II. Levando em consideração a correlação genótipo-fenótipo, o efeito letal desta mutação não é surpreendente, pois todas as substituições identificadas de glicina para ácido aspártico, em qualquer posição ao longo da cadeia $\alpha 1(I)$, foram descritas como letais, baseado no *Human Type I Collagen Mutations Database* (<http://www.le.ac.uk/genetics/collagen/>). As mutações mais desestabilizadoras das cadeias α são substituições de glicina, um aminoácido pequeno, por aminoácidos volumosos e carregados, como é o caso do ácido aspártico. Por exemplo, a alteração p.G700D identificada na cadeia $\alpha 2(I)$, provoca uma modificação na molécula de colágeno tipo I, que diminui a estabilidade da tripla hélice e aumenta drasticamente a degradação intra e extracelular da molécula de colágeno, produzindo um fenótipo letal (COHEN-SOLAL *et al.*, 1994).

A maioria das alterações encontradas em pacientes portadores de OI tipo I introduzem códons de terminação prematuros ou provocam um mecanismo de *splicing* aberrante, levando a redução da expressão do gene *COL1A1* (KÖRKKÖ *et al.*, 1998). As mutações que introduzem um códon de terminação prematuro são a causa mais freqüente para o surgimento de alelos nulos. Estas podem ser derivadas diretamente de mutações pontuais ou indiretamente de mutações do tipo *frameshift* (BENUSIENE e KUCINSKAS, 2003). Duas mutações identificadas neste trabalho, p.R237X e c.1885delT, se encaixam na descrição acima.

A paciente 4, cujas características clínicas e radiológicas apontam para um diagnóstico de OI tipo IV, é a segunda de dois filhos de um casal de primos em terceiro grau, com dois abortamentos na irmandade e sem recorrência familiar. Em sua última visita ao Ambulatório de EIM do HC/Unicamp, a paciente tinha 8 anos de idade, e apesar de apresentar deformidades ósseas, como escoliose e assimetria dos membros inferiores, só havia tido 3 fraturas desde o seu nascimento, talvez devido ao tratamento com reposição de cálcio.

O rastreamento do gene *COL1A1* desta paciente revelou a presença da mutação *nonsense* p.R237X em heterozigose no exon 19, sendo sua mãe normal para esta mutação. Esta alteração foi primeiramente descrita em pacientes clinicamente diagnosticados como

OI tipo I, resultando na produção de alelos nulos (REDFORD-BADWAL *et al.*, 1996; WILLING *et al.*, 1996; RIES-LEVAVI *et al.*, 2004). As causas mais freqüentes de OI do tipo I são mutações que provocam o surgimento de códons de terminação prematuros. Como o C-propeptídeo da cadeia $\alpha 1(I)$ não é transcrito, as cadeias α encurtadas não são incorporadas na formação da tripla hélice, provocando uma redução na produção de moléculas de colágeno tipo I normais (DALGLEISH, 1997). Entretanto, a paciente em questão apresenta características clínicas de OI tipo IV, o que pode ser explicado pela variabilidade de expressão fenotípica intra e interfamiliar observada em OI. Já foram descritos casos em que a mesma mutação nos genes do colágeno tipo I provocou a expressão de fenótipos diferentes em pacientes com OI de famílias distintas ou da mesma família (ZHUANG *et al.*, 1996; ZOLEZZI *et al.*, 1997; FORLINO *et al.*, 1999).

Como previamente descrito por KÖRKKÖ *et al.* (1998), a maioria das mutações que convertem um códon de arginina CGA para um códon de terminação prematuro TGA, foram encontradas na seqüência contexto G/CCC CGA GG/T do gene *COL1A1*, incluindo a mutação p.R287X identificada neste trabalho. Em contraste, nenhuma mutação que substitui o aminoácido arginina por um códon de terminação foi encontrada se o códon CGA não for precedido de G/CCC (KÖRKKÖ *et al.*, 1998).

Neste caso da paciente 4 existem duas hipóteses de diagnóstico. Pode ser considerado como um evento esporádico, provocado por uma mutação espontânea, o que é o mais provável, ou um caso de mosaicismo germinativo, uma vez que dois abortos espontâneos foram observados na irmandade da paciente, embora casos de abortamento espontâneo até o terceiro mês de gestação também sejam muito freqüentes. Casos de mosaicismo germinativo são muito comuns em doenças de herança dominante quando se têm recorrência de indivíduos afetados sendo os pais aparentemente normais (COHN *et al.*, 1990; CONSTANTINOU-DELTAS *et al.*, 1993). Para investigar essa hipótese seria necessário ter acesso ao sêmen paterno, assim como a células somáticas da mãe e do pai, que não as do sangue, como, por exemplo, fibroblastos, o que não foi possível. Devido à possibilidade de mosaicismo germinal o risco de recorrência de nova criança afetada por OI na prole de seus pais pode ser estimado em 6%.

A paciente 28 apresenta OI do tipo I, é filha de pais normais e tem uma irmã que não é afetada. Foi detectada no gene *COL1A1* desta paciente a deleção de uma guanina na posição 1885 em heterozigose no exon 28. Esta deleção no códon 451 leva a alteração na matriz de leitura de aminoácidos conhecida como *frameshift*, provavelmente, a causa do fenótipo leve desta paciente. Os pais da paciente e sua irmã são normais para a deleção. Este dado demonstra que se trata de um caso de mutação *de novo* e que este tipo de mutação, assim como mutações *nonsense*, são comumente responsáveis pela expressão do fenótipo de OI tipo I (KÖRKKÖ *et al.*, 1998).

Deleções e inserções de uma base são relativamente raras nos genes do colágeno tipo I, entretanto algumas delas já foram descritas em pacientes afetados por OI tipo I. Estas tendem a aparecer numa seqüência contexto comum CCC CCT no gene *COL1A1* (KÖRKKÖ *et al.*, 1998), porém esta não é uma característica da deleção encontrada neste trabalho. PEPIN *et al.* (1997), realizando o diagnóstico pré-natal de 129 gestações com risco de OI, detectaram uma mutação de ponto p.G451S, no mesmo códon da deleção encontrada em nossa paciente. Entretanto, a substituição de uma glicina (GGC) por uma serina (AGC) nesta posição, produziu um fenótipo letal (OI tipo II) no paciente, demonstrando, mais uma vez, que a natureza da mutação está intimamente envolvida com a expressão fenotípica na *Osteogenesis Imperfecta*.

O seqüenciamento do paciente 43 revelou uma mutação de ponto nova, p.P239A, em heterozigose no exon 19 do gene *COL1A1*. Substituições de prolina por alanina nos genes do colágeno tipo I são um evento raro e só foram identificadas anteriormente uma única vez. SPOTILA *et al.* (1994) descreveram a mutação p.P27A em um paciente com baixa densidade óssea, porém sem sinais de doença metabólica óssea aparente. Seu efeito na função biológica da molécula de colágeno tipo I, assim como na osteopenia do paciente, permanece indefinido (SPOTILA *et al.*, 1994).

Uma das principais características na constituição da tripla hélice é a presença de tripeptídeos formados por GlyXY, onde Gly é glicina, X é frequentemente prolina e Y frequentemente uma prolina hidroxilada pós-tradução.

O tripeptídeo Gly-Pro-Hyp é o que garante mais estabilidade à molécula de colágeno tipo I e também é o mais freqüente, constituindo 10% de todos os tripletos presentes na seqüência do gene (BHATE *et al.*, 2002). Portanto, mutações que modifiquem esta estrutura, como p.P27A, na qual o resíduo prolina se localiza na posição Y (Gly-Pro-Pro→Ala) acabam por desestabilizar a tripla hélice (BERG e PROCKOP, 1973).

A mutação p.P239A identificada no paciente 43 está dentro do contexto Gly-Pro→Ala-Ser, entretanto YANG *et al.* (1997) demonstraram que a seqüência Gly-Ala-Z, onde Z pode ser qualquer aminoácido, confere a tripla hélice uma estabilidade térmica muito menor quando comparada aos tripletos Gly-Pro-Hyp ou Gly-Pro-Arg. Sendo assim, esta alteração pode-se associar ao fenótipo do paciente.

O paciente 43 foi encaminhado ao Ambulatório de EIM do HC/Unicamp por suspeita de Síndrome da Criança Espancada, devido a fraturas de repetição, para avaliação etiológica das alterações esqueléticas. Em sua última consulta, aos quatro meses de idade, apresentava esclerótica azulada e o exame de inventário ósseo mostrou doze fraturas consolidadas. O paciente foi diagnosticado como portador de OI do tipo I.

Seus pais são aparentemente normais, porém uma irmã e um irmão mais velhos apresentam alguns sinais peculiares. A primeira filha do casal nunca teve fraturas, porém apresenta escleróticas azul-acinzentadas e fãcie que lembra OI. Já o irmão mais velho, segundo filho do casal, apresenta atraso do desenvolvimento estatural com suspeita de raquitismo, história de fraturas, arqueamento dos membros inferiores e, ao exame de raio-X, apresenta sinais sugestivos de OI (Figura 20A, página 93). Portanto, este se trata de um caso de OI familiar, transmitido por mosaicismo germinativo, já que os irmãos do paciente também parecem ser afetados, porém em um grau menor.

Não foi possível investigar a presença da mutação p.P239A nos irmãos, pois a única amostra de sangue que nos foi fornecida foi a do paciente 43. Além disso, seria interessante fazer o estudo molecular de diferentes tecidos do pai e da mãe, a fim de esclarecer a hipótese de mosaicismo. Dos 5 casos familiares estudados, este foi o único em que foi encontrada uma mutação no gene *COL1A1* responsável pelo fenótipo de OI.

Em 7 dos 13 pacientes analisados, não foram identificadas mutações no gene *COL1A1* que pudessem justificar o fenótipo de OI. Desses, três são casos esporádicos (pacientes 1, 48 e 68) e quatro são familiares (pacientes 7, 37, 52 e 70). Estes pacientes provavelmente apresentam alguma alteração no gene *COL1A2*, o qual não foi investigado, ou ainda em outros genes que não os envolvidos com a síntese de colágeno tipo I, o que, como citado na introdução deste trabalho, pode ocorrer com pacientes diagnosticados como OI tipo IV. A seguir é feito o detalhamento de três desses casos em que mutações associadas ao fenótipo não foram encontradas.

O paciente 52 foi diagnosticado como portador de OI do tipo III ou IV, apresentando acentuado encurvamento de membros inferiores. Seu pai e irmã mais velha são normais. Trata-se de um caso familiar de transmissão materna, mas a mãe não apresenta sinais de OI, exceto pela baixa estatura e por ter quatro irmãs mais velhas gravemente afetadas, além de um irmão e uma irmã normais (Figura 20B, página 93). A grande heterogeneidade fenotípica intrafamiliar talvez seja explicada por mosaicismos germinativos que parece ter surgido nas células da avó materna do probando.

CONSTANTINOU-DELTAS *et al.* (1993) descreveram dois casos de variabilidade fenotípica intrafamiliar provocada por mosaicismos celulares somáticos no qual um dos genitores é mosaico para a mutação, sendo capaz de transmitir a mutação para sua prole através de mosaicismos germinativos. Em ambas as famílias, o primeiro indivíduo afetado apresentou manifestações mínimas da doença, já os membros da próxima geração apresentaram um fenótipo mais grave. A explicação mais simples para este fenômeno é que bem no início do desenvolvimento embrionário da mãe surge uma mutação esporádica em um dos genes que codificam o colágeno tipo I em uma célula progenitora, antes mesmo das células da linhagem germinativa se separarem das células somáticas. Os genes do colágeno são alvos fáceis para mutações devido ao seu tamanho e a grande quantidade de repetições GC (CONSTANTINOU-DELTAS *et al.*, 1993).

A análise do gene *COL1A1* desse paciente não revelou a presença de mutações em regiões codificantes e sim alguns polimorfismos como o P338P e IVS19-8C>G ambos já descritos na literatura (MARINI *et al.*, 1993; WARD *et al.*, 2001). Foram encontradas também as alterações intrônicas IVS48+46T>A em homozigose e IVS49+4T>A em

heterozigose. A substituição IVS48+46T>A não deve influenciar no fenótipo devido a sua presença em homozigose e a distância das junções exon-intron. Já a substituição IVS49+4T>A está presente em praticamente todos os pacientes estudados.

O material do paciente 68 enviado para análise do gene *COL1A1* foi coletado por cordocentese. Embora os pais sejam normais, o feto já apresentava fraturas comprovadamente um polimorfismo (MARINI *et al.*, 1993) e a segunda, além de estar fora da sequência consenso, também foi identificada em outro paciente que apresenta OI tipo IV, devido a presença da mutação p.G382S.

Dentre as alterações identificadas no gene *COL1A1* do paciente 68, a única que poderia estar envolvida com o seu fenótipo seria a IVS48+10C>A, devido a produção de erros no mecanismo de *splicing*. Seriam necessários estudos dessa alteração em amostras de sangue dos pais, as quais não puderam ser obtidas, e em controles normais, para afastar a hipótese de polimorfismo e, posteriormente, estudos de expressão. A alteração IVS48+1G>A, que se encontra muito próxima à substituição encontrada, já foi descrita na literatura como sendo responsável pelo fenótipo de OI tipo I. Tal alteração provoca erros no processamento do RNA através da inclusão do intron 48 no transcrito maduro (WILLING *et al.*, 1994). Entretanto, não podemos afirmar que esse também seja o caso deste paciente sem a realização de estudos adicionais, uma vez que a mutação responsável pelo fenótipo de OI também possa estar presente no gene *COL1A2*.

No paciente 70, que apresenta OI tipo IV, foram encontradas além das alterações já citadas na literatura como os polimorfismos, c.1548C>T, IVS12-14T>G e IVS29-42A>G, outras sete alterações não descritas, são elas: c.1821C>T, IVS8+18A>C, IVS8+25T>C, IVS8-36delT, IVS21+30A>G, IVS38-18G>C e IVS49+4T>A. Os pais desse paciente são clinicamente normais e ele tem uma irmã também afetada, ambos com diagnóstico de OI tipo IV (Figura 20C, página 93). Esse caso dificilmente se trata de uma mutação *de novo*, uma vez que ambos os filhos do casal são afetados, podendo se tratar de um caso de mosaicismos germinativo ou até de herança recessiva.

A alteração neutra c.1821C>T (V429V), presente em heterozigose no exon 26 do paciente 70 também está presente em sua irmã, que é portadora de OI, e em seu pai,

nesta mesma condição, estando ausente somente em sua mãe. O fato de esta ser uma substituição neutra e dela estar presente no pai, que é fenotipicamente normal, praticamente a exclui de ser a causa da doença. As outras alterações intrônicas encontradas nesse paciente IVS8+18A>C, IVS8+25T>C, IVS21+30A>G, IVS38-18G>C e IVS49+4T>A, todas em heterozigose, teriam que ser testadas em indivíduos normais e em estudos de expressão, com a exceção da última, que foi encontrada em quase todos os outros pacientes. Dados da literatura demonstram que alterações deste tipo como, por exemplo, IVS20-12G>A, podem ser responsáveis pelo fenótipo de OI, uma vez que provoca a produção de uma seqüência *consensu* nesta posição, levando a perda do intron 21. Como conseqüência observam-se níveis de expressão anormais de proteína e mRNA de um dos alelos do gene *COL1A1* (KÖRKKÖ *et al.*, 1998).

No entanto, a alteração IVS8-36delT encontrada em heterozigose no paciente 70, apesar de estar a uma distância considerável da junção exon-intron, também foi investigada em sua família por se tratar de uma deleção. WARD *et al.* (2001) descreveram a deleção IVS15-33_-44delCTGCCATCTCTT no gene *COL1A1* como responsável pelo fenótipo de um paciente portador de OI tipo I. Segundo estes autores, apesar desta estar distante do sítio de *splicing* deveria produzir um efeito deletério sobre o mesmo devido a sua magnitude.

A irmã do paciente 70 e seu pai, que é normal, apresentaram a deleção IVS8-36delT em heterozigose, mesmo assim foram feitos estudos de expressão e não foi encontrada alteração no tamanho e nem na seqüência do mRNA tanto do paciente quanto de seu pai devido a presença desta alteração, que posteriormente também foi encontrada no paciente 77 que apresenta fenótipo de OI tipo IIa.

Assim como nos outros casos descritos, seriam necessários estudos adicionais, tais como a investigação do gene *COL1A2* ou ainda de outros genes que não os envolvidos com a síntese de colágeno tipo I. Especialmente esta última hipótese pelo fato do paciente apresentar OI tipo IV, como foi explicado na introdução deste trabalho. É interessante notar que dos cinco pacientes diagnosticados como OI tipo I e analisados neste trabalho somente em dois foram identificadas mutações no gene *COL1A1*, o que demonstra que nem todos os

casos de OI tipo I apresentam obrigatoriamente alteração neste gene e que o gene *COLIA2* provavelmente está envolvido.

A maioria dos pesquisadores desenvolveu estratégias que envolvem duas etapas experimentais para detecção de mutações em OI. Primeiro a região da mutação é localizada por estudos na proteína ou por técnicas de rastreamento de mutação como CSGE (*Conformation Sensitive Gel Electrophoresis*) ou SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) (GANGULY *et al.*, 1993; HONGYO *et al.*, 1993). Caso a região seja localizada, a mutação deve ser identificada por subclonagem do cDNA e seu subsequente seqüenciamento. Contudo, estas técnicas consomem muito tempo, são caras e muitas vezes apresentam problemas quanto à sensibilidade para identificação de mutações (GALICKA e GINDZIENSKI, 2002).

Como a técnica de seqüenciamento é atualmente indispensável em um laboratório de biologia molecular, sendo sempre o último passo na identificação de mutações, optou-se por utilizá-la neste trabalho, sem a realização prévia de qualquer técnica de rastreamento de mutação. Várias dessas técnicas de *screening* foram testadas no início deste trabalho, como PCR-Multiplex, SSCP radioativo ou com coloração pela prata, SSCP em *PhastSystem* (PHARMACIA) e Heteroduplex. Tentou-se também desenvolver uma nova metodologia de rastreamento, usando enzimas de restrição que reconhecessem sítios de glicina. Entretanto, nenhuma delas foi eficiente em detectar alterações em controles positivos para mutação no gene *COLIA1*. Todas as substituições descritas neste trabalho foram identificadas somente pela técnica de seqüenciamento automático direto do produto da PCR.

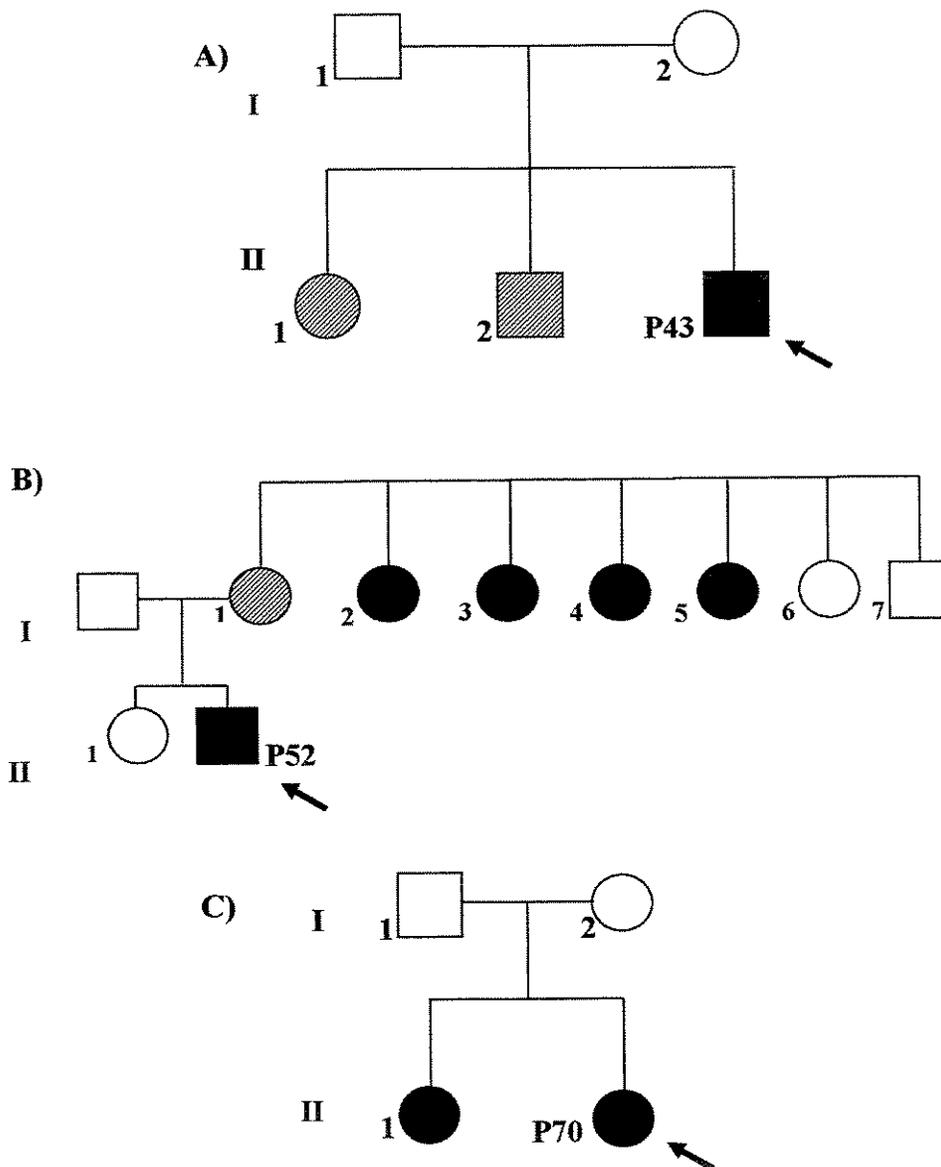


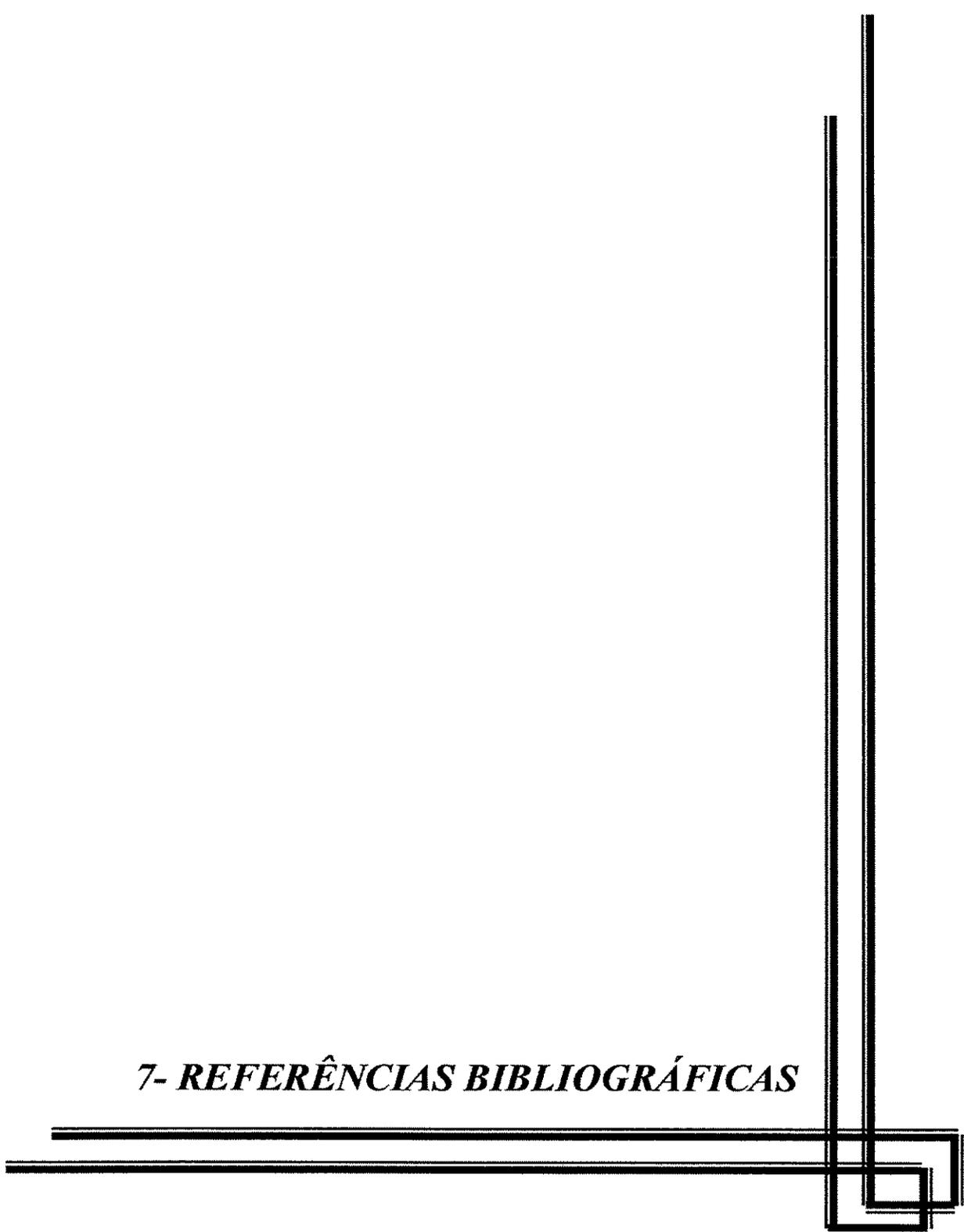
Figura 20- Heredogramas representando 3 dos 5 casos familiares de OI estudados neste trabalho. A) família do paciente 43 (P43); B) família do paciente 52 (P52) e C) família do paciente 70. O hachurado significa que o indivíduo é portador de sinais sugestivos de OI.

6- CONCLUSÃO

- 1- Dentre os 13 pacientes de OI analisados foram identificadas mutações no gene *COL1A1* em seis indivíduos. Quatro mutações são novas (c.1885delG, p.P239A, p.G592S, p.G649D) e duas foram anteriormente descritas na literatura (p.R237X e p.G382S). Também foram detectados polimorfismos em exons e introns, além de outras substituições;
- 2- Foi desenvolvida uma metodologia eficaz na identificação de mutações em pacientes com OI, apesar de lenta e trabalhosa. Não foi possível estabelecer uma metodologia mais rápida e simples para o diagnóstico de OI. Comparando-se os métodos de identificação de mutações nos genes do colágeno tipo I com o método utilizado neste trabalho, todos têm a mesma eficácia, assim como são todos muito trabalhosos;
- 3- Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os dados da literatura que apontam as substituições de ponto de glicina para outro aminoácido no domínio da tripla hélice do colágeno tipo I, como a causa mais freqüente das formas graves de OI. Assim como foi possível estabelecer uma relação entre mutações que introduzem um códon de terminação prematuro e a expressão de um fenótipo mais leve da doença;
- 4- Em sete dos 13 pacientes analisados não foi possível detectar mutações no gene *COL1A1* que pudessem justificar o fenótipo de OI. Estes pacientes provavelmente apresentam alguma alteração no gene *COL1A2*, que não foi investigado, ou ainda em outros genes que não os envolvidos com a síntese de colágeno tipo I;
- 5- Foi difícil o estabelecimento de uma correlação genótipo-fenótipo mesmo nos pacientes em que foram identificadas mutações já conhecidas, pois cada mutação é única e muitas vezes produz um fenótipo único. Outro fator que contribui para que essa correlação seja difícil é a grande heterogeneidade fenotípica intrafamiliar presente em alguns casos, e na maioria das vezes provocada por mosaicismo germinativo;

6- Concluimos que a análise do gene *COL1A1* que codifica o colágeno tipo I fornece informações importantes para o diagnóstico clínico do paciente, principalmente em casos de dúvida quanto ao fenótipo. Um diagnóstico correto, especialmente quanto à diferenciação do tipo de herança, se dominante ou recessiva, e ainda se há presença de mosaicismo, é muito útil para o aconselhamento genético da família e do indivíduo. A presença de uma mutação nos genes *COL1A1* ou *COL1A2* confirma o diagnóstico de *Osteogenesis Imperfecta*. Entretanto, é importante deixar claro que sua ausência não descarta o diagnóstico de OI.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- ANTONARAKIS, S.E. Recommendations for a Nomenclature System for Human Gene Mutations. **Hum. Mutat.** 11:1-3,1998.
- ASSIS, M.C.; PLOTKIN, H.; GLORIEUX, F.H.; SANTILLI, C. Osteogenesis Imperfecta: novos conceitos. **Revista Brasileira de Ortopedia** 37(8), 2002.
- BATEMAN, J.F.; LAMANDE, S.R.; DAHL, H.H.; CHAN, D.; MASCARA, T.; COLE, W.G. A frameshift mutation results in a truncated nonfunctional carboxyl-terminal pro alpha 1(I) propeptide of type I collagen in osteogenesis imperfecta. **J Biol Chem** 264(19):10960-4, 1989.
- BEIGHTON, P. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome [letter]. **Clin Genet**, 29:263, 1986.
- BEIGHTON, P.; DE PAEPE, A.; STEINMANN, B.; TSIPOURAS, P.; WENSTRUP, R.J. Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). **Am J Med Genet.** 77:31-37, 1998.
- BENUSIENE, E.; KUCINSKAS, V. *COL1A1* mutation analysis in Lithuanian patients with *osteogenesis imperfecta* . **J. Appl. Genet.**, 44(1):95-102, 2003.
- BERG, R.A.; PROCKOP, D.J. The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. **Biochem. Biophys. Res. Commun** 52:115-220, 1973.
- BHATE, M.; WANG, X.; BAUM, J.; BRODSKY, B. Folding and conformational consequences of glycine to alanine replacements at different positions in a collagen model peptide. **Biochem** 41(20):6539-47, 2002.
- BYERS, P.H.; BONADIO, J.F. The nature, characterization and phenotypic effects of mutations that affect collagen structure and processing, in OLSEN, B.R.; NIMNI, M. (eds): **Collagen: Biochemistry, Biotechnology, and Molecular Biology**. Vol 4, Boca Raton, FL, CRC, 1989a.

BYERS, PH. Inherited disorders of collagen gene structure and expression. **Am J Hum Genet**, 34:72-80, 1989b.

BYERS, P.H. Brittle bones – fragile molecules: disorders of collagen gene structure and expression. **Trends Genet**, 6:293-300, 1990.

BYERS, P.H.; WALLIS, G.A.; WILLING, M.C. Osteogenesis imperfecta: translation of mutation to phenotype. **J Med Genet**, 28: 433-442, 1991.

BYERS, P.H. Disorders of collagen biosynthesis a structure. In: SCRIVER, C.R. *et al.* (eds.): **The metabolic basis of inherited disease**. 6a. ed. New York, McGraw-Hill Book Company pp2805-2842, 1997a.

BYERS, P.H.; DUVIC, M.; ATKINSON, M.; ROBINOW, M.; SMITH, L.T.; KRANE, S.M.; GREALLY, M.T. *et al.* Ehlers-Danlos syndrome type VIIA and VIIB result from a splice-junction mutations or genomic deletions that involve exon 6 in the *COL1A1* and *COL1A2* genes of of type I collagen. **Am J Med Genet** 72:94-105, 1997b.

CAPOEN, J.; DE PAEPE, A.; LAUWERS, H. Osteogenesis Imperfecta pseudoglioma syndrome. **J Belge Radiol**, 76:224-225, 1993.

CHAMBERLAIN, J.R.; SCHWARZE, U.; WANG, P.R.; HIRATA, R.K.; HANKENSON, K.D.; PACE, J.M.; UNDERWOOD, R.A.; SONG, K.M.; SUSSMAN, M.; BYERS, P.H.; RUSSELL, D.W. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. **Science**. 303(5661):1198-201, 2004.

CHESSLER, S.D.; WALLIS, G.A.; BYERS, P.H. Mutations in the carboxyl-terminal propeptide of the pro alpha 1(I) chain of type I collagen result in defective chain association and produce lethal osteogenesis imperfecta. **J Biol Chem** 268(24):18218-25, 1993.

COHEN-SOLAL, L.; ZYLBERBERG, L.; SANGALLI, A.; GOMEZ-LIRA, M.; MOTTES, M. Substitution of an aspartic acid for glycine 700 in the alpha 2(I) chain of type I collagen in a recurrent lethal type II osteogenesis imperfecta dramatically affects the mineralization of bone. **J Biol Chem**. 269(20):14751-8, 1994.

COHEN-SOLAL, L.; ZOLEZZI, F.; PIGNATTI, P.F.; MOTTES, M. Intrafamilial variable expressivity of osteogenesis imperfecta due to mosaicism for a lethal G382R substitution in the *COL1A1* gene. **Mol Cell Probes** 10: 219-225, 1996.

COHN, D.H.; STARMAN, B.J.; BLUMBERG, B.; BYERS, P.H. Recurrence of lethal osteogenesis imperfecta due to parental mosaicism for a dominant mutation in a human type I collagen gene (*COL1A1*). **Am J Hum Genet** 46(3):591-601, 1990.

COLE, D.E.; CARPENTER, T.O. Bone fragility, craniosynostosis, ocular proptosis, hydrocephalus, and distinctive facial features: a newly recognized type of osteogenesis imperfecta. **J Pediatr** 110:76-80, 1987.

CONSTANTINOU-DELTAS, C.D.; LADDA, R.L.; PROCKOP, D.J. Somatic cell mosaicism: another source of phenotypic heterogeneity in nuclear families with osteogenesis imperfecta. **Am J Med Genet** 45(2):246-51, 1993.

CULBERT, A.A.; WALLIS, G.A.; KADLER, K.E. Tracing the pathway between mutation and phenotype in osteogenesis imperfecta: isolation of mineralization-specific genes. **Am J Med Genet** 63(1):167-74, 1996.

DALGLEISH, R. The human type I collagen mutation database. **Nucleic Acids Research** 25(1): 181-187, 1997.

FORLINO, A.; ZOLEZZI, F.; VALLI, M.; PIGNATTI, P.F.; CETTA, G.; BRUNELLI, P.C.; MOTTES, M. Severe (type III) osteogenesis imperfecta due to glycine substitutions in the central domain of the collagen triple helix. **Hum Mol Genet** 3(12):2201-6, 1994.

FORLINO, A.; PORTER, F.D.; LEE, E.J.; WESTPHAL, H.; MARINI, J.C. Use of the Cre/lox recombination system to develop a non-lethal knock-in murine model for osteogenesis imperfecta with an alpha1(I) G349C substitution. Variability in phenotype in *Brt1IV* mice. **J Biol Chem** 274(53):37923-31, 1999.

FORLINO, A.; MARINI, J.C. Osteogenesis Imperfecta: Prospects for Molecular Therapeutics. **Molecular genetics and metabolism** 71:225-232, 2000.

GALICKA, A. Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. **Acta Biochim Pol.**49(2):433-41, 2002.

GALICKA, A.; GINDZIENSKI, A. Direct sequencing of PCR products for mutation detection in osteogenesis imperfecta. **J Appl Genet** 43(3):365-9, 2002.

GANGULY, A.; ROCK, M.J.; PROCKOP, D.J. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. **Proc Natl Acad Sci USA** 90(21):10325-9, 1993.

GLORIEUX, F.H.; BISHOP, N.J.; PLOTKIN, H.; CHABOT, G.; LANOUE, G.; TRAVERS, R. Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfecta. **N Engl J Med** 339(14):947-52, 1998.

GLORIEUX, F.H. Biphosphonate Therapy for Severe Osteogenesis Imperfecta. **J Pediatr Endocrinol Metab.** 13 (s)2:989-92, 2000.

GLORIEUX, F.H.; RANCH, F.; POLTROON, H.; WARD, L.M.; TRAVERS, R.; ROUGHLEY, P.J. Type V Osteogenesis Imperfecta: a new form of brittle bone disease. **J Bone Miner Res** 15:1650-8, 2000.

GLORIEUX, F.H.; WARD, L.M.; RAUCH, F.; LALIC, L.; ROUGHLEY, P.J.; TRAVERS, R. Osteogenesis imperfecta type VI: a form of brittle bone disease with a mineralization defect. **J Bone Miner Res** 17(1): 30-8, 2002.

GOLDMAN, A.V.; DAVIDSON, D.; PAVLOV, H.; BULLOUGH, P.G. "Popcorn" calcification: A prognostic sign in osteogenesis imperfecta. **Radiology** 136: 351, 1980.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escheria coli* with plasmid. **J Mol Biol** 166:557-80,1983.

HONGYO, T.; BUZARD, G.S.; CALVERT, R.J.; WEGHORST, C.M. 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. **Nucleic Acids Res** 21(16):3637-42,1993.

KÖRKKÖ, J.; ALA-KOKKO, L.; DE PAEPPE, A.; NUYTINCK, L.; EARLEY, J.; PROCKOP, D.J. 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** 62: 98-110, 1998.

KUIVANIEMI, H.; TROMP, G.; PROCKOP, D.J. Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. **Hum Mutat.** 9(4):300-315, 1997.

LABUDA, M.; MORISSETTE, J.; WARD, L.M.; RAUCH, F.; LALIC, L.; ROUGHLEY, P.J.; GLORIEUX, F.H. Osteogenesis Imperfecta Type VII maps to the short arm of chromosome 3. **Bone** 31(1):19-25, 2002.

LACHMAN, R.S. Skeletal dysplasias. In: TAYBI, H. & LACHMAN, RS. (eds.) **Radiology of syndromes, Metabolic Disorders and Skeletal Dysplasias**, 3a. ed. Chicago, Year Book Medical Publishers, pp761-767,1990.

LACHMAN, TILLER, G.E.; GRAHAM, J.M.J.R; RIMOIN, D.L. Collagen, genes and skeletal dysplasias on the edge of a new era: a review and update. **Eur J Radiol** 14: 01-10, 1992.

LUND, A.M.; ASTROM, E.; SODERHALL, S.; SCHWARTZ, M.; SKOVBY, F. Osteogenesis imperfecta: mosaicism and refinement of the genotype-phenotype map in OI type III. **Hum Mut** 13(6):503, 1999.

MACKAY, K.; BYERS, P.H.; 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.** 2:1155-1160, 1993.

MARINI, J.C.; LEWIS, M.B.; WANG, Q.; CHEN, K.J.; ORRISON, B.M. Serine for glycine substitutions in type I collagen in two cases of type IV Osteogenesis Imperfecta. **J Biol Chem** 268(4):2667-2673, 1993.

- MARLOWE, A.; PEPIN, M.G.; BYERS, P.H. Testing for osteogenesis imperfecta in cases of suspected non-accidental injury. **J Med Genet** 39(6):382-6, 2002.
- MCPHERSON, E.; CLEMENS, M. Bruck Syndrome (osteogenesis imperfecta with congenital joint contractures): review and report on the first North American case. **Am J Med Genet** 70:28-31, 1997.
- MICHALICKOVA, K.; SUSIC, M.; WILLING, M.C.; WENSTRUP, R.J.; COLE, W.G. Mutations of the alpha2(V) chain of type V collagen impair matrix assembly and produce ehlers-danlos syndrome type I. **Hum Mol Genet.** 7(2):249-55, 1998.
- MIRANDOLA, S.; PIGNATTI, P.F.; MOTTES, M. Three novel polymorphic sequence variants in type I collagen gene *COL1A1*, the main disease locus for Osteogenesis Imperfecta. **Mol Cell Probes** 14: 329-332, 2000.
- NICHOLLS, A.C.; OSSE, G.; SCHLOON, H.G.; LENARD, H.G.; DEAK, S.; MYERS, J.C.; PROCKOP, D.J.; WEIGEL, W.R.F.; FRYER, P.; POPE, F.M. The clinical features of homozygous $\alpha 2(I)$ collagen deficient osteogenesis imperfecta. **J Med Genet** 21: 257, 1984.
- NICHOLLS, A.C.; OLIVER, J.E.; MCCARRON, S.; HARRISON, J.B.; GREENSPAN, D.S.; POPE, F.M. An exon skipping mutation of a type V collagen gene (*COL5A1*) in Ehlers-Danlos syndrome. **J Med Genet.** 33:940-946, 1996.
- NICHOLLS, A.C.; SHER, J.L.; WRIGHT, M.J.; OLEY, C.; MUELLER, R.F.; POPE, F.M. Clinical phenotypes and molecular characterisation of three patients with Ehlers-Danlos syndrome type VII. **J Med Genet.** 37(11):E33, 2000.
- NISHIMURA, A.; MORITA, M.; NISHIMURA, Y.; SUGINO, Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. **Nucleic Acids Res.** 18:6169,1991.
- NUYTINCK, L.; FREUND, M.; LAGAE, L.; PIERARD, G.E.; HERMANNNS-LE, T.; DE PAEPE, A. Classical Ehlers-Danlos Syndrome caused by a mutation in type I collagen. **Am J Med Genet,** 66:1398-1402.

OLIVER, J.E.; THOMPSON, E.M.; POPE, F.M.; NICHOLLS, A.C. Mutation in the carboxy-terminal propeptide of the Pro alpha 1(I) chain of type I collagen in a child with severe osteogenesis imperfecta (OI type III): possible implications for protein folding. **Hum Mutat** 7(4):318-26, 1996.

PACE, J.M.; KUSLICH, C.D.; WILLING, M.C.; BYERS, P.H. Disruption of one intra-chain disulphide bond in the carboxyl-terminal propeptide of the proalpha1(I) chain of type I procollagen permits slow assembly and secretion of overmodified, but stable procollagen trimers and results in mild osteogenesis imperfecta. **J Med Genet** 38(7):443-9, 2001.

PACE, J.M.; CHITAYAT, D.; ATKINSON, M.; WILCOX, W.R.; SCHWARZE, U.; BYERS, P.H. A single amino acid substitution (D1441Y) in the carboxyl-terminal propeptide of the proalpha1(I) chain of type I collagen results in a lethal variant of osteogenesis imperfecta with features of dense bone diseases. **J Med Genet** 39(1):23-9, 2002.

PATERSON, C.R.; MCALLION, S.J.; SHAW, J.W. Clinical and radiological features of osteogenesis imperfecta type IVa. **Acta Paediatr Scand** 76: 548-522, 1987.

PEREIRA, R.; KHILLAN, J. S.; HELMINEN, H. J.; HUME, E. L.; PROCKOP, D. J. Transgenic mice expressing a partially deleted gene for type I procollagen (COL1A1): a breeding line with a phenotype of spontaneous fractures and decreased bone collagen and mineral. **J Clin Invest** 91: 709-716, 1993.

PEREIRA, R.; KENNETH, H.; SOKOLOV, B.P.; KHILLAN, J.S. E PROCKOP, D.J. Phenotypic variability and incomplete penetrance of spontaneous fractures in an inbred strain of transgenic mice expressing a mutated collagen gene (COL1A1). **J Clin Invest** 93:1765-1769, 1994

PHILLIPS CL, SHRAGO-HOWE AW, PINNELL SR, WENSTRUP RJ. A substitution at a non-glycine position in the triple-helical domain of pro alpha 2(I) collagen chains present in an individual with a variant of the Marfan syndrome. **J Clin Invest.** 86(5):1723-8, 1990.

PLOTKIN, H.; RAUCH, F.; BISHOP, N.J.; MONTPETIT, K.; RUCK-GIBIS, J.; TRAVERS, R.; *et al.* Pamidronato treatment of severe osteogenesis imperfecta in children under three years of age. **J Clin Endocrinol Metab** 85:1846-50, 2000.

PRIMORAC, D.; ROWE, D.W.; MOTTES, M.; BARISIC, I.; ANTICEVIC, D.; MIRANDOLA, S.; GOMEZ, L.M.; KALAJZIC, I.; KUSEC, V.; GLORIEUX, F.H. Osteogenesis imperfecta at the beginning of bone decade and joint decade. **Croat Med J** 42(4): 393-415, 2001.

PRUCHNO, C.J.; COHN, D.H.; WALLIS, G.A.; WILLING, M.C.; STARMAN, B.J.; ZHANG, X.M.; BYERS, P.H. Osteogenesis imperfecta due to recurrent point mutations at CpG dinucleotides in the *COL1A1* gene of type I collagen. **Hum Genet** 87(1):33-40, 1991.

RAUCH, F.; GLORIEUX, F.H. Osteogenesis imperfecta. **Lancet** 363:1377-85, 2004.

REDFORD-BADWAL, D.A.; STOVER, M.L.; VALLI, M.; MCKINSTRY, M.B.; ROWE, D.W. Nuclear retention of *COL1A1* messenger RNA identifies null alleles causing mild Osteogenesis Imperfecta. **J Clin Invest** 97(4):1035-1040, 1996.

RICHARDS, A.J.; MARTIN, S.; NICHOLLS, A.C.; HARRISON, J.B.; POPE, F.M.; BURROWS, N.P. A single base mutation in *COL5A2* causes Ehlers-Danlos syndrome type II. **J Med Genet.** 35(10):846-8, 1998.

RIES-LEVAVI, L.; ISH-SHALOM, T.; FRYDMAN, M.; LEV, D.; COHEN, S.; BARKAI, G.; GOLDMAN, B.; BYERS, P.; FRIEDMAN, E. Genetic and biochemical analyses of Israeli *Osteogenesis Imperfecta* patients. **Hum. Mutat.** 23(4):399-400, 2004.

ROUGHLEY, P.J.; RAUCH, F.; GLORIEUX, F.H. Osteogenesis imperfecta – Clinical and molecular diversity. **Eur Cell Mater** 5:41-7; 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, 74:5463, 1977.

SILLENCE, D. Osteogenesis imperfecta: An expanding panorama of variants. **Clin Orthop** 159: 11, 1981.

SILLENCE, D.O.; HORTON, W.A.; RIMOIN, D.L. Morphologic studies in the skeletal dysplasia. **Am J Pathol** 96: 813, 1979.

SMITH R. Hyperplastic callus and osteogenesis imperfecta. **Lancet** 357:248-9, 2001.

SPOTILA, L.D.; SEREDA, L.; PROCKOP, D.J. Partial isodisomy for maternal chromosome 7 and short stature in an individual with mutation at the *COL1A2* locus. **Am J Hum Genet** 51: 1396-1405, 1992.

SPOTILA, L.D.; COLIGE, A.; SEREDA, L.; CONSTANTINOU-DELTAS, C.D.; WHYTE, M.P.; RIGGS, B.L.; SHAKER, J.L.; SPECTOR, T.D.; HUME, E.; OLSEN, N. *et al.* Mutation analysis of coding sequences for type I procollagen in individuals with low bone density. **J Bone Miner Res** 9:923-932, 1994.

STACEY, A.; BALEMAN, J.; CHOI, T., MASCARA, T., COLE, W.; JAENISH, R. Perinatal lethal Osteogenesis Imperfecta in transgenic mice bearing an engineered mutant $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$ collagen gene. **Nature** 332:131-136, 1998.

THOMPSON, E.M.; YOUNG, I.D.; HALL, C.M., PEMBREY, M.E. Recurrence risks and prognosis in severe sporadic osteogenesis imperfecta. **J Med Genet** 24: 390, 1987.

VERRECHIA, F. AND MAUVIEL, A. TGF- β and TNF- α : antagonist cytokines controlling type I collagen expression gene. **Cell Sig** 16:873-880, 2004.

WALLIS, G.A.; SYKES, B.; BYERS, P.H.; MATHEW, C.G.; 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**, 30:492-96, 1993.

WARD, L.M.; LALIC, L.; ROUGHLEY, P.J.; GLORIEUX, F.H. Thirty-three novel *COL1A1* and *COL1A2* mutations in patients with osteogenesis imperfecta types I-IV. **Hum Mutat.** 17(5):434, 2001.

WARD, L.M.; RAUCH, F.; TRAVERS, R.; CHABOT, G.; AZOUZ, E.M.; LALIC, P.J.; GLORIEUX, F.H. Osteogenesis Imperfecta Type VII: an autosomal recessive form of brittle bone disease. **Bone** 31(1):12-18, 2002.

WENSTRUP, R.J.; LANGLAND, G.T.; WILLING, M.C.; D'SOUZA, V.N.; COLE, W.G. A splice-junction mutation in the region of COL5A1 that codes for the carboxyl propeptide of pro alpha 1(V) chains results in the gravis form of the Ehlers-Danlos syndrome (type I). **Hum Mol Genet.** 5(11):1733-6, 1996.

WESTERHAUSEN, A.; KISHI, J.; PROCKOP, D.J. Mutations that substitute serine for glycine alpha 1-598 and glycine alpha 1-631 in type I procollagen. The effects on thermal unfolding of the triple helix are position-specific and demonstrate that the protein unfolds through a series of cooperative blocks. **J Biol Chem.** 265(23):13995-4000, 1990.

WILLING, M.C.; COHN, D.H.; BYERS, P.H. Frameshift mutation near the 3' end of the COL1A1 gene of type I collagen predicts an elongated Pro alpha 1(I) chain and results in osteogenesis imperfecta type I. **J Clin Invest** 85(1):282-90, 1990.

WILLING, M.C.; DESCHENES, S.P.; SCOTT, D.A.; BYERS, P.H.; SLAYTON, R.L.; PITTS, S.H.; ARIKAT, H.; ROBERTS, E.J. Osteogenesis imperfecta type I: molecular heterogeneity for COL1A1 null alleles of type I collagen. **Am J Hum Genet** 55(4):638-47, 1994.

WILLING, M.C.; DESCHENES, S.P.; SLAYTON, R.L.; ROBERTS, E.J. Premature chain termination is a unifying mechanism for COL1A1 null alleles in osteogenesis imperfecta type I cell strains. **Am J Hum Genet** 59(4):799-809, 1996.

WOODHEAD, J.L.; FALLON, R.; FIGUEREDO, H.; LANGDALE, J.; MALCOM, A.D.B. – Alternative methodology of gene diagnosis. In: Davies, K.E. – **Human genetic diseases – a practical approach.** Oxford. IRL Press Limited, 1986. p.51-64.

YANG, W.; CHAN, V.C.; KIRKPATRICK, A.; RAMSHAW, J.A.; BRODSKY, B. Gly-Pro-Arg confers stability similar to Gly-Pro-Hyp in the collagen triple-helix of host-guest peptides. **J Biol Chem** 272(46):28837-40, 1997.

YOUNG, I.D.; THOMPSON, E.M.; HALL, C.M.; PEMBREY, M.E. Osteogenesis imperfecta type IIA: Evidence for dominant inheritance. **J Med Genet** 24: 386, 1987.

ZHUANG, J.; TROMP, G.; KUIVANIEMI, H.; CASTELLS, S. E PROCKOP, D.J. Substitution of arginine for glycine at position 154 of the $\alpha 1$ chain of type I collagen in a variant of Osteogenesis Imperfecta: Comparison to previous cases with the same mutation. **Am J Med Genet** 61: 111-116, 1996.

ZOLEZZI, F.; VALLI, M.; CLEMENTI, M.; MAMMI, I.; CETTA, G.; PIGNATTI, P.F.; MOTTES, M. Mutation producing alternative splicing of exon 26 in the *COL1A2* gene causes type IV osteogenesis imperfecta with intrafamilial clinical variability. **Am J Med Genet** 71(3):366-70, 1997.

8- ANEXOS

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



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

PARECER Nº 569/2001

Registro CONEP = 2219 (Este nº deverá ser citado nas correspondências referentes a este projeto),

Protocolo CEP = 325/2001

Processo nº 25000.031099/2001-10

Projeto de Pesquisa: "Aplicação das técnicas de biologia molecular na diagnóstico da Osteogênese Imperfeta"

Pesquisador Responsável: Dra. Fernanda de Castro Reis (doutoranda),

Dra. Edilúcia Santoro (orientadora),

Instituição: UNICAMP

Área Temática Especial: Genética Humana

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, cabem as seguintes considerações:

a) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da instituição supracitada;

b) as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 195/96 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;

c) será oferecido aconselhamento genético aos sujeitos da pesquisa e fornecimento de informações pertinentes ao sujeito se os resultados indicarem necessidade;

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 195/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com as seguintes recomendações a serem acompanhadas pelo CEP:

- 1- explicitar melhor os critérios de inclusão e exclusão;
- 2- caso sejam incluídos menores de idade na amostra, acrescentar ao protocolo um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE adaptado às suas necessidades;

Situação: Projeto aprovado com recomendações

Brasília, 30 de maio de 2001


WILLIAM SAAD MOSSNE
Coordenador da CONEP-MS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO DA OSTEOGÊNESE IMPERFEITA

Responsáveis:

Fernanda de Castro Reis - Bióloga

(Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - CBMEG - UNICAMP)

Profa. Dra. Denise Y. J. Norato

(Departamento de Genética Médica - FCM - UNICAMP)

Nome do paciente: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado _____

CEP: _____ Fone: (____) _____

Responsável: _____ Idade: _____

RG: _____

Grau de parentesco: _____

Objetivos do estudo:

O paciente está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa envolvendo portadores de Osteogênese imperfeita (OI), uma doença de origem genética onde ocorre a produção de grande variedade de fragilidades ósseas associadas a defeitos em diversos tecidos ricos em colágeno.

O presente estudo tem por objetivo o entendimento da origem ou fatores de risco relacionados a essa doença. Pretende-se desenvolver um método mais rápido e fácil para tal diagnóstico.

Procedimentos a que serão submetidos os pacientes:

Os pacientes já avaliados no Ambulatório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital das Clínicas da Unicamp serão submetidos à coleta de cerca de 5ml de sangue, do qual será extraído, em laboratório, o material genético (DNA) necessário ao estudo molecular.

Risco e desconforto:

Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer manchas roxas (equimoses) no local da coleta de sangue. O desconforto será mínimo, pois em geral será feita a coleta de sangue da veia do braço, por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento. O material colhido será utilizado unicamente para atingir os objetivos acima descritos.

Benefícios esperados:

O estudo da Osteogênese Imperfeita hereditária poderá ser fundamental no diagnóstico, permitindo, assim, um aconselhamento genético adequado do casal, com a estimativa do risco de repetição entre os próximos filhos. Assim, muitos poderão ser totalmente tranquilizados, e aqueles que tiverem um risco real de gerarem crianças com OI poderão tomar uma decisão consciente quanto à reprodução. Caso o paciente não queira participar do estudo ou resolver abandoná-lo por qualquer motivo, continuará a ter seu atendimento realizado normalmente.

Fornecimento de informação adicional:

Garantimos aos pacientes e suas famílias resposta a qualquer pergunta e esclarecimento de qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados com esta pesquisa, sendo proporcionadas ainda informações atualizadas durante o estudo.

Será mantido o sigilo e o caráter confidencial das informações, e a identificação dos pacientes não será exposta nas conclusões ou publicações.

Caso seja necessário contate-nos:

Fernanda de Castro Reis

CBMEG - (19) 3788-1147

Profª. Dra. Denise Y. J. Norato

Depto. de Genética Médica - (19) 3788-8904

Comitê de Ética

(19) 3788-8936

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, _____ de _____ de _____.

Paciente ou responsável: _____.

Responsável pelo estudo: _____.

Molecular findings in Brazilian patients with *osteogenesis imperfecta*

Fernanda C. Reis¹, Fabiana Alexandrino¹, Carlos E. Steiner², Denise Y.J. Norato²,
Denise P. Cavalcanti², Edi L. Sartorato¹

¹ CBMEG/Human Genetics Laboratory and ² Department of Medical Genetics/FCM, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Abstract. *Osteogenesis imperfecta* (OI) is a genetic disorder of increased bone fragility and low bone mass. Severity varies widely, ranging from intrauterine fractures and perinatal lethality to very mild forms without fractures. Most patients with a clinical diagnosis of OI have a mutation in the *COL1A1* or *COL1A2* genes that encode the chains of type I procollagen, the major protein in bones. Hence, the aim of the present study was to identify mutations in the *COL1A1* gene in 13 unrelated Brazilian OI patients. This is the first molecular study of OI in Brazil. We found 6 mutations, 4 of them novel (c.1885delG, p.P239A, p.G592S, p.G649D) and 2 previously described (p.R237X and p.G382S). Thus, the findings show that there are no prevalent mutations in our sample, and that their distribution is similar to that reported by other authors, with preponderance of substitutions for glycine in the triple helix domain, causing OI types II, III and IV.

Key words: *COL1A1*, mutation, osteogenesis imperfecta, type I collagen.

Osteogenesis imperfecta (OI) is a dominant autosomal disorder caused by mutations in type I collagen genes, *COL1A1* and *COL1A2*, which are responsible for synthesis of this main protein of bones, skin, ligaments, tendons and most other connective tissues. Those genes encode the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of the collagen triple helix, respectively (Gajko-Galicka et al. 2002).

OI patients present with bone fragility and skeletal deformity within a broad phenotypic range: from a mild (type I) to a lethal form (type II), including two other types presenting varied severity (types III and IV). The mild forms are usually caused by mutations that inactivate one allele of the *COL1A1* gene, resulting in a reduced amount of normal type I collagen. On the other hand, the severe and lethal forms result from dominant negative mutations in *COL1A1* or *COL1A2*,

which produce structural defects in the collagen molecule (Gajko-Galicka et al. 2002).

The varied clinical characteristics of OI reflect different classes of mutations in different regions of type I collagen genes. Consequently, more than 250 different mutations in the *COL1A1* and *COL1A2* genes had been characterized and they have been registered in the Human Type I and Type III Collagen Mutations Database (Dalglish 1997; <http://www.le.ac.uk/genetics/collagen>). Besides, these alterations vary in type and location, although the most common in *COL1* loci are single-base substitutions in the part of the gene coding for the triple helix domain, which result in replacing glycine by an amino acid with a bulkier side chain.

Summarizing, the main objective of the present study was to search for mutations in the *COL1A1*

Received: September 21, 2004. Accepted: November 22, 2004.

Correspondence: F.C. Reis, UNICAMP/CBMEG, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo, Campinas, São Paulo, Brazil, e-mail: reis@unicamp.br

gene in Brazilian patients previously diagnosed as having OI. Also, we wanted to collect information about the characteristics of mutations in this gene in our sample.

Thirteen patients recruited from different states were diagnosed as having OI types I, II, III or IV, according to their clinical and radiological characteristics, on the basis of the Sillence OI classification (Sillence et al. 1979). Blood samples were obtained with the approval of the Ethics Committee of the Medical Academy and with informed parental consent. Total genomic DNA was extracted from 10 ml of peripheral blood by phe-

Six different mutations in the *COL1A1* gene were identified. Five of them were from unrelated, sporadic cases and one was from a familial case. Four of the 6 mutations are novel (i.e. not yet registered in the Human Type I and Type III Collagen Mutations Database). Among them, 3 are missense mutations (p. P239A, p. G592S and p. G649D) and one is a single-base deletion (c. 1885delG). The characteristics of these mutations and information on their clinical manifestation are summarized in Table 1.

The most frequent mutations that change a codon for glycine in the triple helical domain in

Table 1. *COL1A1* mutations identified in Brazilian OI patients and their clinical manifestation

Patient no.	Mutation		Exon	OI type	Blue sclerae	Dentogenesis imperfecta	Hearing loss	Fractures at birth	Multiple fractures at birth	Bone deformity	References
	DNA level	Protein level									
74	c.1678G>A	p.G382S	25	IV	-	+	?	-	-	+	Mackay et al. 1993
33	c.2308G>A	p.G592S	33/34	III	+	?	?	+	-	+	this study
77	c.2480G>A	p.G649D	37	IIA	+	/	/	+	+	+	this study
43	c.1249C>G	p.P239A	19	I	+	?	?	-	-	-	this study
28	c.1885delG	frameshift at G451	28	I	+	-	-	-	-	-	this study
4	c.1243C>T	p.R237X	19	IV	-	-	-	-	-	+	Redford-Badwal et al. 1996, Willing et al. 1996

Features: (+) denotes presence; (-) denotes absence, (/) denotes non corresponding and (?) denotes unknown.

nol-chloroform standard methods. All exons of the *COL1A1* gene and its flanking sequences, with the exception of the 6 exons encoding the N-propeptides, were amplified by PCR, followed by direct DNA sequencing. The primers and PCR conditions used were previously described (Körkkö et al. 1998). PCR-amplified segments of the *COL1A1* gene were sequenced using an ABI PRISM™ 377 Sequencer and Big Dye Terminator Sequencing protocol (PE Biosystems Foster City CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. Next, the mutations were identified by a comparison of the obtained DNA sequence with the reference cDNA sequence of the *COL1A1* gene (GenBank accession number Z74615).

Since the material used for screening mutations in the *COL1A1* gene was genomic DNA, the putative effect on protein level was based on the nucleotide sequence. Assumptions regarding their impact on phenotype (structural or null allele) were made by referring to the clinical phenotype of OI patients harboring the mutation and literature data.

either of the two alleles of *COL1A1* or *COL1A2* are responsible for the severe variants of the disease OI types II, III and IV (Culbert et al. 1996). In this study, three of these single-nucleotide substitutions in the *COL1A1* gene were identified: p.G382S, p.G592S, and p.G649D (Table 1, patients 74, 33 and 77, respectively).

As described before by Mackay et al. (1993), the mutation c.1678G>A (p.G382S) was found in a patient diagnosed as having OI type IV (Figure 1, patient 74). Also, a second mutation was identified at that position, although the residue changed was not serine but cysteine, resulting in a mild OI type IV (Byers 1990). This shows the relevance of the nature of the residue that substitutes for glycine in determining the phenotype (Mackay et al. 1993).

The c.2308G>A mutation also resulted from a substitution of a glycine residue by serine (p.G592S), causing a severe OI type III (Figure 1, patient 33). The correlation between the positions of serine substitutions with the severity of the OI phenotype is interesting, since they do not show

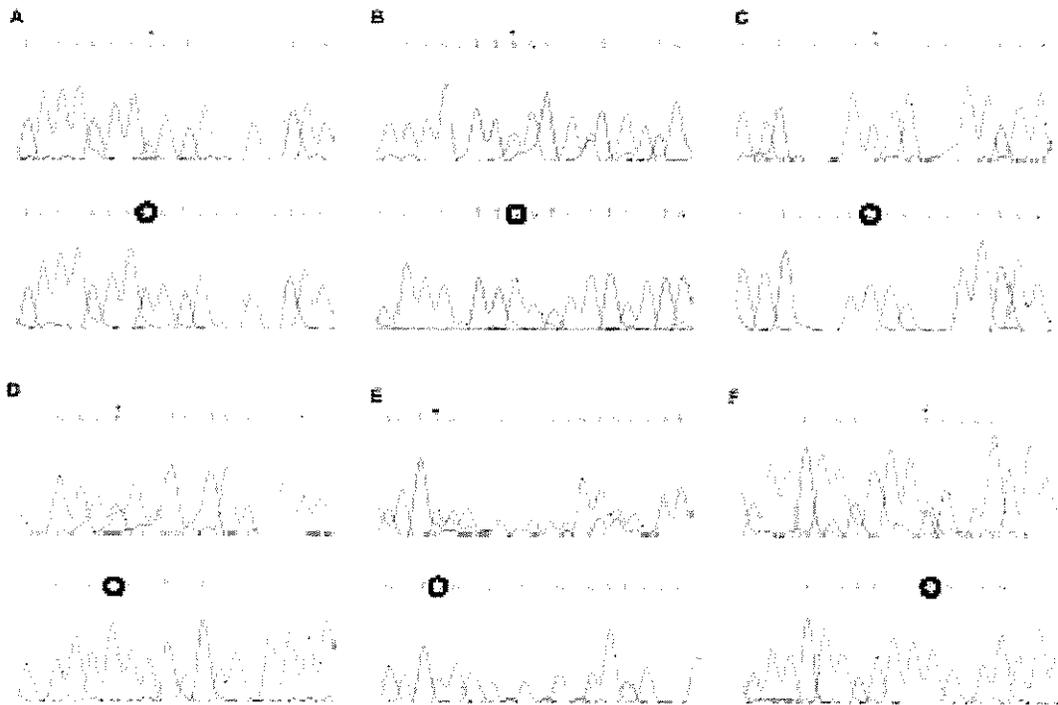


Figure 1. Electrophoregrams illustrating sequencing data from patients 74, 33, 77, 43, 28 and 4 (above) and healthy individuals (below). Asterisks show base-pair substitutions, circles indicate the normal nucleotide, and an arrow shows the deletion.

a gradient of severity that depends on the position of the mutation on the triple helix (Byers 1990). Thus, the mutations reported here reinforce this hypothesis because substitutions at positions 382 and 592 resulted in non-lethal phenotypes of OI type IV and severe OI type III, respectively.

The structural alteration c.2480G>A (p.G649D) was identified in an OI type IIa patient, which leads to a lethal phenotype (Figure 1, patient 77). Taking into account the genotype-to-phenotype correlations, the lethal outcome of this mutation is not surprising, since all the substitutions of glycine by the bulky aspartic acid in any position along the $\alpha 1(I)$ collagen chains have so far been described as lethal, basing on the Human Type I Collagen Mutations Database.

The most unusual mutation found in this OI population was p.P239A (Table 1 and Figure 1, patient 43). This point mutation converts proline to alanine, because of a change in nucleotide 1249 of the *COL1A1* gene in a patient with OI type I phenotype. Proline substitutions for alanine are very rare and this is the first one described in a patient with low bone density but no apparent meta-

bolic bone disease. The substitution identified before by Spotila et al. (1994) was c. 613C>G (p. P27A), and its effect on the biological function of type I collagen, as well as its role in osteopenia, is uncertain. Since the c.1249C>G was the only alteration identified in the *COL1A1* coding sequence of that patient and the sequence was situated in the middle of the triple helix domain, Berg and Prockop (1973) suggested that proline and hydroxyproline promote triple helix stability. Thus alterations in those amino acid residues may be responsible for mild OI phenotypes. This patient has two affected brothers but his parents are apparently normal in respect of OI clinical symptoms. The recurrence of their phenotype may be explained by parental mosaicism that results in affected children from unaffected parents.

Most of mutations found in patients with OI type I could introduce either premature-termination codons for translation or aberrant RNA splicing. Moreover, they thereby reduce the expression of the *COL1A1* gene. Mutations introducing a premature stop codon are the most frequent cause for a null *COL1A1* allele arising either directly from a point mutation or indirectly from

a frameshift mutation (Körkkö et al. 1998). As such, two *COL1A1* gene mutations identified in this study were considered as null mutations: c.1885delG and p.R237X (Table 1, patients 28 and 4).

The frameshift mutation at position 1885 of *COL1A1* was found in a patient with a very mild OI type I (Figure 1, patient 28). Single-base deletions are relatively rare in type I collagen genes, but many of them have already been described as causing OI type I. They tend to occur in the common sequence context of CCC CCT (Körkkö et al. 1998), although this is not a characteristic of the deletion found in this study.

The nonsense mutation p.R237X converts a codon for arginine to a premature stop codon in nucleotide 1243, producing a truncated protein (Figure 1, patient 4). As previously reported by Körkkö et al. (1998), the majority of the mutations that converted the arginine codon CGA to the premature stop codon TGA was found in the sequence context of G/CCC CGA GG/T in the *COL1A1* gene. The p.R237X identified in this study is in such a sequence (GCC CGA GG). This mutation was found in a patient who had been clinically diagnosed as having OI type IV, but other cases of this same alteration are described in patients with OI type I (Redford-Badwal et al. 1996, Willing et al. 1996). Variable phenotypic outcomes were observed in unrelated cases bearing the same mutation also by Zhuang et al. (1996).

No mutations were found in the remaining 7 patients, even though they present the typical clinical features of OI. Probably these patients have mutations on the *COL1A2* gene, which was not analyzed in this study but is equally involved with this disease.

Finally, as expected, there are no predominant mutations in Brazilian OI patients in the *COL1A1* gene. The lack of a small cluster of mutations in OI, combined with the fact that mutations are scattered throughout the gene and their private nature in each family, makes mutational analysis an expensive and labor-intensive process. Anyway, the description of novel mutations and their correlation with phenotype may definitely contribute to the disease prognosis.

Acknowledgements. This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), and by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

REFERENCES

- Berg RA, Prockop DJ 1973. The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 52: 115–220.
- Byers PH 1990. Brittle bones – fragile molecules: disorders of collagen gene structure and expression. *Trends Genet* 6: 293–300.
- Culbert AA, Wallis GA, Kadler KE 1996. Tracing the pathway between mutation and the phenotype in *Osteogenesis Imperfecta*: Isolation of mineralization-Specific Genes. *Am J Med Genet* 63: 167–174.
- Dalgleish R 1997. The human type I collagen mutation database. *Nucleic Acids Res* 25: 181–187.
- Gajko-Galicka A 2002. Mutations in type I collagen genes resulting in *osteogenesis imperfecta* in human. *Acta Biochim Polon* 49: 433–441.
- Körkkö J, Ala-Kokko L, De Paeppe A, Nuytinck L, Earley J, Prockop DJ 1998. 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* 62: 98–110.
- Mackay K, Byers PH, Dalgleish R 1993. 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* 2: 1155–1160.
- Redford-Badwal DA, Stover ML, Valli M, McKinstry MB, Rowe DW 1996. Nuclear retention of *COL1A1* messenger RNA identifies null alleles causing mild *Osteogenesis Imperfecta*. *J Clin Invest* 97: 1035–1040.
- Sillence DO, Horton WA, Rimoin DL 1979. Morphologic studies in the skeletal dysplasia. *Am J Path* 96: 813.
- Spotila LD, Colige A, Sereda L, Constantinou-Deltas CD, Whyte MP, Riggs BL, et al. 1994. Mutation analysis of coding sequences for type I procollagen in individuals with low Bone Density. *J Bone Miner Res* 9: 923–932.
- Willing MC, Deschenes SP, Slayton RL, Roberts EJ 1996. Premature chain termination is a unifying mechanism for *COL1A1* null alleles in *osteogenesis imperfecta* type I cell strains. *Am J Hum Genet* 59: 799–809.
- Zhuang J, Tromp G, Kuivaniemi H, Castells S, Prockop DJ 1996. Substitution of arginine for glycine at position 154 of the alpha 1 chain of type I collagen in a variant of *osteogenesis imperfecta*: comparison to previous cases with the same mutation. *Am J Med Genet* 61(2): 111–16.