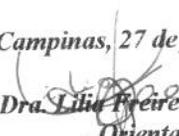


LUCIANA COSENTINO DE MACEDO

**Investigação molecular do gene do receptor de vitamina D
em pacientes com raquitismo e alopecia**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Bióloga – Luciana Cosentino de Macedo.

Campinas, 27 de janeiro de 2006.

*Profa. Dra.  Rodrigues de Souza Li
- Orientadora -*

CAMPINAS

2006



LUCIANA COSENTINO DE MACEDO

**Investigação molecular do gene do receptor de vitamina D
em pacientes com raquitismo e alopecia**

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

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

CAMPINAS

2006

ii



UNIDADE BC
 Nº CHAMADA T/UNICAMP
M151
 V _____ EX _____
 TOMBO BC/ 68771
 PROC. 16.2306
 C D
 PREÇO 11,00
 DATA 02/06/06

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

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

BIB ID. 382015

M119i
151

Macedo, Luciana Cosentino de
 Investigação molecular do gene do receptor de vitamina D em
 pacientes com raquitismo e alopecia. / Luciana Cosentino de Macedo.
 Campinas, SP : [s.n.], 2006.

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

1. Mutação. 2. Calcitriol. 3. Homeostase. 4. Raquitismo. 5.
 Alopecia. 6. Aminoácidos. I. De Souza-Li, Lília Freire Rodrigues.
 II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
 Médicas. III. Título.

(Slp/Fcm)

Título em inglês: *Molecular investigation of the vitamin D receptor inpatients with rickets and alopecia.*

Keywords:

- Mutation
- Calcitriol
- Homeostasis
- Rickets
- Alopecia
- Amino acids

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestrado

Banca examinadora: Prof^a.Dr^a. Lília Freire Rodrigues de Souza Li

Prof^a.Dr^a Sara Maria Thomazzi

Prof^a.Dr^a Marise Lazaretti Castro

Data da defesa: 27 / 01 / 2006



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador (a):

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

Membros:

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

Prof^ª. Dra. Sara Maria Thomazzi

Prof^ª. Dra. Marise Lazaretti Castro

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

Data: 27/01/2006

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Wilma e Roberto, exemplos de força, dedicação e determinação, que por várias vezes abriram mão de seus sonhos para investir em meus estudos, tornando possível que hoje eu encerre mais esse ciclo em minha vida com a conclusão desse trabalho e com a certeza de apoio para as etapas que ainda estão por vir.

Ao meu tio Paulinho, pela confiança e apoio, sem o qual essa etapa de minha vida não teria se concretizado.

Especialmente à minha família pelo apoio e confiança.

À minha segunda mãe Agda Maria pelo suporte emocional e pelas boas vibrações.

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

Aos meus amigos e amigas, Aline P. Otalara, Beatriz Zabotto, Márcia Zabotto, Marcelo Ananias, Mércia Motta, Roselângela Thomaz, Simone Caixeta e Susan P. Ribeiro pela amizade, força e apoio.

Ao casal de amigos muito queridos Renato Muccillo e Cristiane R. Muccillo, pela amizade e compreensão.

Jussara Rehder pelo suporte técnico e orientação em cultura celular.

D. Maria Helena pela amizade, confidências e por suas trufas maravilhosas.

Minha amiga Maricene Sahba pela amizade, apoio, confiança, incentivo e colaboração.

À Universidade Estadual de Campinas pela acolhida.

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

À Dra. Vera Belangero pelo encaminhamento dos pacientes para a pesquisa e disponibilização de dados complementares para o trabalho.

Eduardo Fernandes Formighieri que esteve presente em todas as etapas do trabalho contribuindo sempre para sua melhoria e à sua família pelo apoio, confiança e amizade.

Enfim, um agradecimento especial a todos que fazem parte da minha vida e que de alguma forma contribuíram para meu o meu crescimento.

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xiv</i>
INTRODUÇÃO	16
Metabolismo da vitamina D.....	17
Raquitismo.....	18
Patogênese do raquitismo.....	19
Manifestações clínicas e laboratoriais do raquitismo.....	19
Receptor de vitamina D.....	20
OBJETIVOS	22
Objetivo principal.....	23
Objetivos específicos.....	23
MATERIAL E MÉTODOS	24
Pacientes.....	25
Extração de DNA.....	26
PCR.....	26
Seqüenciamento.....	28
Digestão com enzimas de restrição.....	29
Cultura primária de fibroblasto.....	30
Imortalização e cultura de linfócitos.....	30
Indução da expressão de mRNA da 24-hidroxilase pós tratamento com 1,25(OH) ₂ vitaminaD.....	30

Extração de RNA e RT-PCR.....	31
Extração de proteína total.....	31
Western Blot.....	32
RESULTADOS.....	33
PCR e sequenciamento.....	34
Imortalização e cultura de linfócitos.....	40
Cultura de fibroblasto.....	40
Análise funcional do VDR.....	40
Western Blot.....	41
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	43
Mutações.....	44
Análise funcional do VDR.....	46
Western Blot.....	46
CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	53
Anexo 1 – Parecer do comitê de ética.....	54
Anexo 2 – Termo de consentimento livre esclarecido.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µM	Micromolar
24(OH)ase	24 hidroxilase
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
Ca	Cálcio sérico
CYP1α	25 hidroxivitamina D-1α-hidroxilase
CYP24	Vitamina D 24-hidroxilase
CYP27	P450-vitamina D-25 hidroxilase
DBD	Domínio de interação ao DNA (<i>DNA binding domain</i>)
DMEM	<i>Dulbelco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Deoxinucleotídeo
DTT	Dithiothreitol
g	Força da gravidade
h	Hora
HEPES	Ácido (N-[2-hidroximetil] Piperazina-N'-[2-Etanossulfônico]) (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) ethanesulfonic Acid)
HRP	Peroxidase de rábano (Horse-radish peroxidase)
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodalton
LDB	Domínio de ligação do ligante (<i>Ligand binding domain</i>)
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mg/dL	Miligrama por decilitro
mL	Mililitro

mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro (<i>Messenger ribonucleic acid</i>)
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
°C	Grau Celsius
PBS-T	Solução salina-fosfato tamponada Tween 20 (<i>Phosphate Buffered Saline Tween-20</i>)
P	Fosfato sérico
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pg/mL	Picograma por mililitro
pmol	Picomolar
PMSF	Fenil-metilfluoridosulfóxido (<i>Phenylmethylsulphonylfluoride</i>)
PPAR	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma (<i>peroxisome proliferator activator receptor</i>)
PTH	Paratormônio
PVDF	Difluoreto de polivinilideno (<i>PolyVinylidene Fluoride</i>)
RNA	Ácido ribonucléico (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
RXR	Receptor retinóico X (<i>retinoid X receptor</i>)
SDS-Page	Eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
U/L	Unidades por litro
V	Volt
VN	Valores normais
VDR	Receptor da vitamina D (<i>Vitamin D receptor</i>)

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Dados bioquímicos no início do tratamento e resultados recentes nos quatro pacientes estudados.....	34

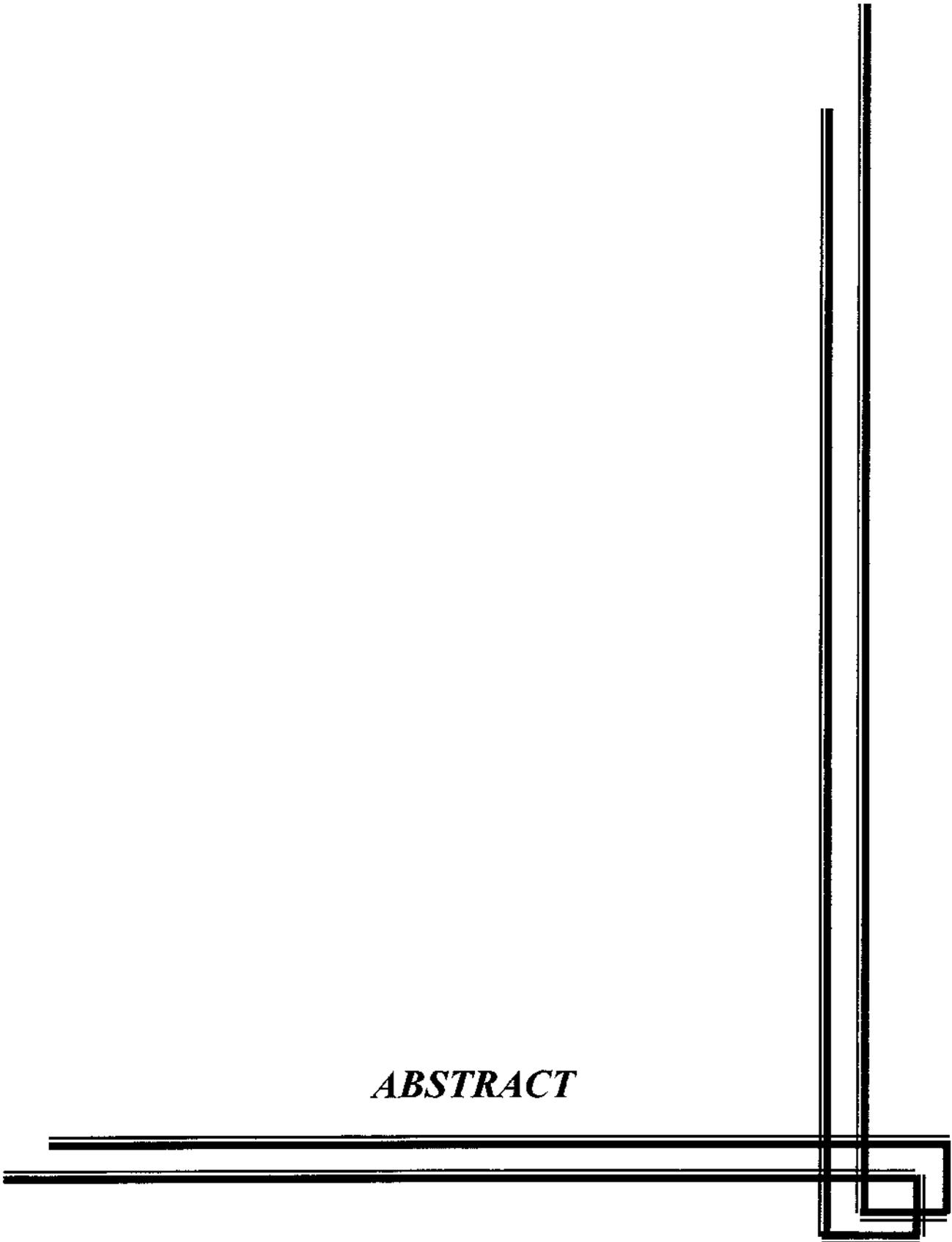
	<i>PÁG.</i>
Figura 1- Cromatograma da região mutada no exon 7 do paciente 3 e da mesma região em controle.....	35
Figura 2- Digestão dos produtos de PCR dos exons 7 e 8 dos pacientes 1, 2, 3 e controle com enzimas de restrição Ava II e Rsa I.....	36
Figura 3- Cromatograma da região mutada no exon 8 do paciente 2 e da mesma região no controle.....	37
Figura 4- Cromatograma da região mutada no exon 3 do paciente 4 e da mesma região no controle.....	38
Figura 5- Produtos de PCR e digestão do exon 3 com enzima de restrição Pvu II.....	39
Figura 6- Indução da expressão do gene da 24(OH)ase após tratamento com 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} nM de 1,25(OH) ₂ vit D.....	41
Figura 7- Análise de Western blot de extrato nuclear de fibroblastos controle e dos pacientes com mutação no VDR.....	42

RESUMO

A 1,25-dihidroxitamina D é de fundamental importância na homeostase do cálcio. A vitamina D exerce suas ações através da interação com o seu receptor. O receptor da vitamina D (VDR) é membro da superfamília de receptores nucleares. O raquitismo é uma doença causada por mineralização deficiente na matriz óssea ou osteóide, afetando o desenvolvimento e a formação do osso na fase de crescimento. Mutações no receptor da vitamina D causam raquitismo dependente de vitamina D tipo II. Neste tipo de raquitismo ocorre hipocalcemia e as concentrações séricas de 1,25-dihidroxitamina D₃ são elevadas e, na maioria das vezes não há resposta ao tratamento com doses altas de 1,25-dihidroxitamina D. Pacientes apresentam raquitismo grave de início precoce, nos primeiros meses de vida e a maior parte dos indivíduos apresentam pouco ou nenhum pêlo corporal (alopecia).

O objetivo principal deste projeto foi a análise molecular do receptor de vitamina D (VDR) em quatro pacientes com raquitismo dependente de vitamina D tipo II que manifestaram raquitismo e alopecia. Amostras de DNA destes pacientes foram usadas para seqüenciar o gene do VDR. Os cromatogramas gerados foram analisados em programas específicos, visando a busca de mutações. A análise mostrou 2 novas mutações pontuais que resultam em mudança de aminoácido (Q259E e G319V) e uma mutação que introduz um codon terminal (R73X). A cultura primária de fibroblasto proveniente de biópsia de pele dos pacientes foi usada para análise funcional do receptor. Extrato protéico nuclear mostrou redução de expressão de todos os receptores mutados. O receptor truncado contendo apenas parte do domínio de ligação com o DNA perdeu o epítipo de interação com o anticorpo usado, não sendo identificado no Western blot pelo anticorpo utilizado, impossibilitando a avaliação de sua expressão. Tratamento da cultura primária de fibroblasto com doses crescentes de 1,25(OH)₂vitamina D demonstrou que os VDRs mutados foram incapazes de ser ativado e aumentar a expressão de 24-hidroxilase. Este trabalho identificou mutações em quatro pacientes com raquitismo dependente de vitamina D tipo II e estas mutações resultaram em comprometimento funcional do VDR.

ABSTRACT



The 1,25-dihydroxyvitamin D plays a fundamental role in the calcium homeostasis. The vitamin D exerts its actions through the interaction with its receptor. The vitamin D receptor (VDR) is a member of the superfamily of nuclear receptors. Rickets is a disease caused by deficient mineralization in the bone matrix or osteoids, affecting the development and formation of the bone during the growth stage. Mutations in the vitamin D receptor are associated to the vitamin D-dependent rickets type II. The biochemical characteristics is hypocalcemia and increase levels of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and most of time there is no answer to the treatment with high doses of 1,25-dihydroxyvitamin D. Patients present rickets and or osteomalacia of varying severity beginning in the first months of life and most of the individuals presents little or any body hair (alopecia).

The main objective of this project was the molecular analysis of the vitamin D receptor (VDR) in four patients with vitamin D-dependent rickets type II that manifested with rickets and alopecia. DNA samples of these patients were used to sequence the VDR gene. The generated chromatograms were analyzed in specific programs, aiming the search of mutations. The analysis showed two novel missense mutation that result in amino acid change (Q259E e G319V) and one nonsense mutations (R73X). Fibroblast primary culture derived from the patients' skin biopsy was carried out for functional analysis of the receptor. Nuclear protein extract showed reduction of expression of all mutant receptors. The truncated VDR receptor containing only part of the DNA binding domain lost the region containing the epitope which the antibody was raised against and it was not identified by the Western blot analysis. Treatment of the fibroblast primary culture treatment with increasing doses of 1,25(OH)₂ vitamin D showed that the mutant VDR were unable to be activated and to increase the expression of the 24-hydroxylase. It was found mutations in the four patients with vitamin D-dependent rickets type II studied. Functional analysis confirmed that the mutations impaired the VDR activation.

INTRODUÇÃO

Metabolismo da vitamina D

Nas plantas, a vitamina D é convertida pela irradiação da luz solar por fotólise do esteróide vegetal ergosterol, na vitamina D₂ (ergocalciferol). Nos animais, a conversão de 7-deidrocolesterol ocorre naturalmente nas camadas epidérmicas, sendo convertido em vitamina D₃ (colicalciferol), pela irradiação ultravioleta (WILSON e FOSTER, 1995). A vitamina D₂ difere da vitamina D₃ no formato de sua cadeia. A primeira possui uma ligação dupla entre o carbono 22 (C-22) e o C-23, e um grupo metil no C-24 (JONES et al, 1998). Embora diferentes quimicamente, a vitamina D₂ tem a mesma potência biológica do que a vitamina D₃, porém a D₂ tem uma meia vida menor do que a D₃. As vitaminas D₃ e D₂ na circulação se ligam à proteína de ligação da vitamina D e são transportadas para o tecido adiposo para armazenamento ou para o fígado para serem metabolizadas (JONES et al, 1998).

O primeiro passo da ativação da vitamina D acontece no fígado, onde a enzima P450-vitamina D-25 hidroxilase (CYP27) introduz um grupo OH no carbono 25 produzindo 25-hidroxivitamina D (BLUNT et al, 1968). A 25-hidroxivitamina D é a forma de vitamina D mais abundante na circulação porém fisiologicamente pouco potente (BLUNT et al, 1968). A maior razão para a estabilidade deste metabólito é a sua forte afinidade com a proteína de ligação à vitamina D do sangue (BLUNT et al, 1968).

O próximo passo da ativação ocorre no rim, mediado pela enzima P 450-monooxigenase, 25(OH) vitamina D-1 α -hidroxilase (CYP1 α). O produto formado é a forma bioativa da vitamina D, a 1,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃). A ativação e a degradação da vitamina D estão intimamente relacionadas com a homeostase de cálcio (MADHOK e DELUCA, 1979).

A degradação da 1,25-(OH)₂D₃ é conhecida como via de oxidação C-24, e resulta no ácido calcitróico (MADHOK e DELUCA, 1979). O ácido calcitróico, observado *in vivo*, apresenta-se como a principal forma de excreção biliar da vitamina D (MADHOK e DELUCA, 1979). A via tem cinco passos, e o produto do primeiro passo desta via (1,24,25-(OH)₂D) já é dez vezes menos ativo biologicamente que a 1,25 (OH)₂D₃ (MADHOK e DELUCA, 1979). A enzima CYP24 (vitamina D 24-hidroxilase) é

multicatalítica e capaz de agir em vários passos, senão todos da via de oxidação do C-24 (MADHOK e DELUCA, 1979).

Raquitismo

O raquitismo é uma doença causada por mineralização deficiente na matriz óssea ou osteóide, afetando o desenvolvimento e a formação do osso na fase de crescimento (WILSON e FOSTER, 1995). Ele afeta tanto a cartilagem de crescimento na epífise dos ossos corticais bem como os ossos recém-formados tanto corticais como trabeculares. A deposição inadequada de cálcio e fosfato na matriz óssea causa progressivos amolecimento e deformidade do esqueleto. Os mecanismos envolvidos no defeito de mineralização ainda não foram devidamente esclarecidos (FAVUS, 1999).

A causa mais comum de raquitismo nutricional é a deficiência da vitamina D por falta de exposição à luz solar, associado à ingesta insuficiente de alimentos ricos em vitamina D, tais como fígado, peixe ou alimentos fortificados com vitamina D (FAVUS, 1999). Outras formas mais raras de raquitismo incluem o causado por aporte insuficiente de cálcio ou fosfato; crianças em aleitamento materno exclusivo, sem suplementação de vitamina D; e crianças em nutrição parenteral onde vitamina D e cálcio não foram incluídos.

Além das causas nutricionais, várias doenças associadas a mutações em proteínas e enzimas, envolvidas na homeostase de cálcio e fósforo, resultam em quadros clínicos e laboratoriais de raquitismo. Dentre estas proteínas estão a deficiência da enzima 1α -hidroxilase e mutações no receptor da vitamina D que causam os raquitismos dependentes de vitamina D tipo I e tipo II respectivamente (FAVUS, 1999). O raquitismo dependente de vitamina D tipo I é associado à inativação da enzima 1α -hidroxilase e resulta em deficiência na transformação da vitamina D à sua forma bioativa. É uma forma rara, de herança autossômica recessiva, manifestando-se entre os 4 e 12 meses de idade (GLORIEUX et al, 1995). A concentração de 25-hidroxivitamina D_3 é normal, mas a concentração de 1,25-dihidroxivitamina D_3 é baixa. O tipo II é uma doença autossômica recessiva associada ao não funcionamento adequado do receptor da vitamina D (VDR) (HUGHES et al, 1988). As concentrações séricas de 1,25-dihidroxivitamina D_3 estão

elevadas e, na maioria das vezes não há resposta ao tratamento com doses altas de vitamina D. Pacientes apresentam hipocalcemia e raquitismo grave de início precoce, nos primeiros meses de vida e a maior parte dos indivíduos apresentam pouco ou nenhum pêlo corporal (alopecia) (MALLOY et al, 1999).

Patogênese do raquitismo

A produção de vitamina D é regulada pelo paratormônio (PTH), cálcio e fósforo (HASMUSSEN et al, 1963). A 1,25-dihidroxitamina D age nos intestinos e nos ossos promovendo reabsorção de cálcio e fosfato. Em caso de deficiência de vitamina D, há redução da reabsorção intestinal de cálcio e fosfato, resultando em hipocalcemia que estimula a secreção de PTH, promovendo aumento da reabsorção de cálcio e fósforo nos ossos, e reabsorção de cálcio e excreção de fósforo nos rins. Além disso, o PTH aumenta a produção da enzima 1α -hidroxilase que converte a 25-hidroxitamina D em 1,25-dihidroxitamina D ($1,25-(OH)_2D_3$) (HASMUSSEN et al, 1963). Uma vez normalizado a calcemia e a concentração de $1,25-(OH)_2D_3$, aumento da concentração de $1,25-(OH)_2D_3$ tem efeito supressivo na produção de PTH.

Manifestações clínicas e laboratoriais do raquitismo

Independentemente de sua etiologia, os pacientes com raquitismo apresentam quadros clínico, radiológico, bioquímico e histológico semelhantes (FAVUS, 1999). As manifestações clínicas incluem hipotonia, fraqueza muscular, e em casos graves, tetania. Com o apoio do peso na posição supina, ocorrem deformidades nos ossos longos. Outros sinais clínicos são: proeminência das junções costocodrais (rosário raquítico), deformidades da coluna e anormalidades na calota craniana com amolecimento do calvarium (crânio tabis) (FAVUS, 1999). Há uma maior incidência de broncopneumonias e fraturas. Os achados radiológicos típicos são: o alargamento das epífises em forma de taça, com a concavidade voltada para a articulação, com desaparecimento da cartilagem de crescimento, alargamento da linha epifisária, alargamento e irregularidade das metáfises. Ocorre redução da espessura da cortical com rarefação e borramento ou perda dos limites ósseos que pode aparecer como pequenas estrias no sentido longitudinal do osso produzindo uma imagem em franja (WILSON e FOSTER, 1995). Encurvamento diafisário,

fraturas em “galho verde” e duplo contorno das diáfises podem ocorrer decorrentes da não mineralização do tecido subperiosteal. O exame laboratorial demonstra concentrações baixas ou normais de cálcio sérico, hipofosfatemia e fosfatase alcalina elevada. O PTH sérico estará elevado em presença de hipocalcemia e a 25-hidroxivitamina D estará baixa na deficiência de vitamina D (WILSON e FOSTER, 1995).

Receptor de vitamina D

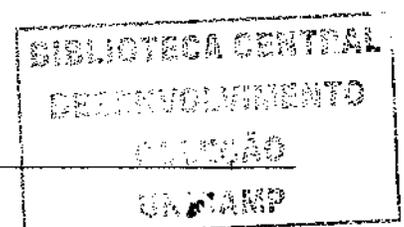
A vitamina D exerce suas ações através da interação com o seu receptor (MALLOY et al, 1994). O receptor da vitamina D (VDR) é membro da superfamília de receptores nucleares (FAVUS, 1999), tendo maior similaridade com a subfamília que inclui os receptores do ácido retinóico, do hormônio da tireóide e do “*peroxisome proliferator activator receptor*” (PPAR), com os quais apresentam semelhança em seqüência e estrutura (JONES et al, 1998). O VDR humano está localizado no *locus* 12q12-q14 (ZMUDA et al, 2000). Sua região codificadora está contida em 8 exons (2 a 9) e traduz uma proteína com 427 aminoácidos.

O VDR é constituído por seis domínios A/B, C, D, E/F, alguns com funções bem definidas (MIYAMOTO et al, 2001). Na região N-terminal está o domínio A/B, que apresenta função menos conservada entre os receptores nucleares. A relevância do domínio A/B no VDR não está elucidada, porém em alguns receptores nucleares este domínio está associado à regulação da transcrição gênica (MIYAMOTO et al, 2001). O domínio C é onde o receptor se liga ao DNA através de duas estruturas denominadas “*zinc fingers*”. Estas estruturas possibilitam a interação com seqüências de pares de bases específicas localizadas nas regiões promotoras dos genes alvo. O domínio D, ou “*hinge*”, é importante para manter a integridade da estrutura funcional dos receptores nucleares (MIYAMOTO et al, 2001). Na região C terminal está o domínio “*ligand-binding*” (domínio E/F), onde ocorre a interação com a 1,25-(OH)₂vitaminaD₃ (MALLOY et al, 2002).

O início da transcrição do VDR depende da ligação com um outro receptor nuclear denominado RXR (receptor retinóico X) formando um heterodímero, bem como do recrutamento de proteínas co-ativadoras responsáveis pela ligação dos receptores às proteínas transcricionais e à RNA polimerase II (MALLOY et al, 2002). As regiões de

dimerização com o RXR e ligação a fatores de transcrição encontram-se no domínio AF (MALLOY et al, 2002). O VDR é principalmente expresso em órgãos envolvidos na homeostase do cálcio tais como ossos, rim e especialmente intestino, porém ele é expresso em baixas concentrações *in vivo* em vários outros tecidos (DAME et al, 1985). Além de sua ação na regulação do metabolismo mineral, a vitamina D possui ações diversas inibindo a proliferação, induzindo maturação e diferenciação celular em diferentes tecidos (DAME et al, 1985).

O VDR nativo liga-se à $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ com afinidade extremamente alta, na faixa de 10^{-10} M (DELUCA e SCHNOES, 1976). Tanto o grupo 1α hidroxila quanto o grupo 25-hidroxila são críticos para a alta afinidade de ligação (DELUCA e SCHNOES, 1976). Mutações no gene VDR são descritas em pacientes com raquitismo dependente de vitamina D tipo II (HUGHES et al, 1988; MALLOY et al, 1990; MALLOY et al, 1994; MALLOY et al, 2002). O VDR é importante para o crescimento do folículo piloso e é expresso em queratinócitos e em células mesenquimais da papila dérmica e mais da metade dos indivíduos onde mutação no VDR foi descrita apresentam alopecia associado (KATO et al, 1999). Experimentos em camundongos com perda de função do VDR demonstram que a alopecia não é causada por concentrações tóxicas de metabólitos de vitamina D, mas pela não funcionalidade do VDR, sugerindo que a sua etiopatogenia seja vitamina D independente (SAKAI et al, 2001).



OBJETIVOS

Objetivo principal

- ✓ Análise molecular do receptor de vitamina D (VDR) em quatro pacientes com raquitismo e alopecia.

Objetivos específicos

- ✓ Seqüenciar o gene do VDR nestes pacientes com raquitismo dependente de vitamina D tipo II para identificar possíveis mutações.
- ✓ Genotipar os pacientes caracterizando os polimorfismos descritos no VDR.
- ✓ Investigar a habilidade do VDR proveniente de cultura primária de fibroblasto dos pacientes com raquitismo, de responder ao tratamento com vitamina D e modular a mensagem do gene para 24-hidroxilase.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

A base molecular de quatro pacientes que manifestaram o raquitismo dependente de vitamina D tipo II acompanhados no ambulatório de Nefro Pediatria do Hospital das Clínicas da UNICAMP foi estudada.

Paciente 1: sexo masculino, 9 anos, cor parda, procedente da Bahia

Paciente foi trazido ao serviço aos 2 anos de idade, após várias consultas por deformidades nos membros inferiores notadas desde o 1º ano de vida. A criança tinha bom desenvolvimento intelectual, falava bem, andava sem apoio, mas com dificuldade. Mãe notou ausência de cabelo desde os 40º dia de vida. Negava antecedentes de crises convulsivas ou infecções. Os avós maternos eram primos de primeiro grau e a mãe sabia de primas com deformidades semelhantes, inclusive uma com epilepsia. A criança brincava frequentemente no sol e a dieta ainda era a base de leite. Na primeira consulta foi observado que o paciente estava em bom estado geral, apresentava alopecia absoluta, com ausência também de cílios e sobrancelhas, deformidade grosseira, em varo, dos joelhos, alargamento de punhos e tornozelos e fronte olímpica.

Paciente 2: sexo masculino, 19 anos, cor parda, procedente de São Paulo

Mãe procurou o serviço com queixa de retardo de crescimento e de desenvolvimento, com antecedente de várias pneumonias e otites, mas sem antecedentes de crises convulsivas. Refere ausência de cabelos desde os primeiros meses de vida. Criança é surda e não balbucia. Condições sócio-econômicas estáveis, com exposição regular ao sol. Nega consangüinidade. O paciente tem uma irmã e um irmão sem anormalidades clínicas ou metabólicas. Ao exame físico era evidente: desnutrição protéico-calórica, rosário raquítico, fronte olímpica, alargamento das articulações de punhos e tornozelos. Criança irritada, hipotônica, firma a cabeça mas não senta com apoio. Apresentava alopecia e pelos escassos em cílios e sobrancelhas.

Após a primeira avaliação laboratorial foi iniciada terapêutica com calciferol (21000 unidades/dia), solução neutra de fosfato (54 mL/dia) e 20 mL de gluconato de cálcio a 10% por via oral. A solução de fosfato foi oferecida como solução de fosfato sódico dibásico.

Paciente 3: sexo feminino, 20 anos, cor branca, procedente da Bahia

Família trouxe a paciente com queixa de ausência de cabelo desde o nascimento acompanhado de deformidade grosseira em membros inferiores que dificultava inclusive a marcha. A mãe havia falecido logo após o parto, e a criança era cuidada pela tia materna que negava consangüinidade dos pais. Tia referia ter conhecimento de que primas do lado paterno da criança tinham deformidades semelhantes às da sobrinha. Negava antecedentes de crises convulsivas ou infecções. A dieta era qualitativamente adequada à idade; com exposição regular ao sol. Negava tratamento anterior. Ao exame físico inicial apresentava-se em bom estado geral, alegre, com deformidades grosseiras nos membros inferiores. Havia alopecia quase absoluta, com pelos escassos em cílios e sobrancelhas. Não havia dados sobre o desenvolvimento pômdero-estatural anterior.

Paciente 4: sexo masculino, 7 anos, cor branca, procedente de Minas Gerais

Pais procuraram atendimento pois a criança não andava sozinha e apresentava deformidade dos membros inferiores, e tem ausência de cabelos desde o 2º mês de vida. Pais primos de 1º grau. Nega antecedentes de crises convulsivas ou infecções. Criança com exposição freqüente ao sol e a dieta a base de leite. Ao exame físico criança apresentava alopecia quase total, alargamento de punhos e tornozelos, genuvaro acentuado, dava passos sem firmeza, com auxílio dos pais. Falava algumas palavras.

Extração de DNA

O DNA genômico dos quatro pacientes que apresentam raquitismo dependente de vitamina D tipo II com alopecia foi extraído a partir de amostra de sangue utilizando kit de extração da promega (*Wizard® genomic DNA purification kit*) após consentimento dos pacientes e/ou responsáveis. Este estudo foi submetido e aprovado pela comissão de ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (registro CEP 330/2002) e pelo CONEP (registro 4623).

PCR

O DNA genômico foi usado como molde para a realização de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Foram utilizados *primers* específicos para amplificar os exons e regiões nos introns próximas ao exons 2 a 9 do gene VDR. Devido à proximidade do exon 7 e 8 e

aos seus pequenos tamanhos, o mesmo par de "*primers*" foi usado para a amplificação desta região. Os *primers* utilizados foram:

VDR2F - 5' GGC ACTGACTCTGGCTCTGAC 3'

VDR2R - 5' CAAGGGCTCCCTTCATGGAAACAC 3'

VDR3F - 5' GACAGGTCTCCGTGATGACAGG 3'

VDR3R - 5' CTGACTCCACTTCAGGCCCAAAC 3'

VDR4F - 5' CCGAGTGTAAAGCCCCTCCTATC 3'

VDR4R - 5' CACTAGTGCTTCTCCTCTGGACCG 3'

VDR5F - 5' CTTCGCCTTCCTGTAGACCTTC 3'

VDR5R - 5' CTCCACCTCCTTCCATCCAGCAG 3'

VDR6F - 5' GGCCTGGTCCAAGTATCCTTA 3'

VDR6R - 5' GCTCAGTCTAGGACTCTGACTCTG 3'

VDR7-8F - 5' TTACTGGTAACCTGACCTCCTTCC 3'

VDR7-8R - 5' GCAGGTCTTTGTCCTTCATACTCC 3'

VDR9F - 5' CCAGCTGAGAGCTCCTGTGCCTTC 3'

VDR9R - 5' TGGGTGGATAGGGGAGGTGGCAGA 3'

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

Seqüenciamento

Os produtos das reações de PCR foram purificados e seqüenciados diretamente usando os mesmos “*primers*” das reações de amplificação.

As reações foram amplificadas utilizando o termociclador Mastercycler Eppendorf. Para a reação de seqüenciamento foi usado 2µL (aproximadamente 10ng) do PCR purificado, 1µL de *primer* à 5pmol, 2µL de “*save money*”, 2µL de *big dye* (versão 2 Applied Biosystem) para um volume final de 10µL. O ciclo realizado foi: pré desnaturação do DNA molde à 96° C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de incorporação do *big dye* que consistiu em: desnaturação do DNA molde à 96° C, anelamento do *primer* à 56° C e uma extensão à 60° C por 4 minutos. Ao produto da reação foram adicionados 80µL de etanol 100%, repousando 15 minutos temperatura ambiente, seguido de uma centrifugação à 25.464 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 150µL de etanol 70% e centrifugado 25.464 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* secou à temperatura ambiente por 1 hora. As amostras foram encaminhadas ao Hemocentro da Unicamp, onde foi utilizado o seqüenciador de DNA ‘ABIPrism 377’.

Embora o plano inicial tenha previsto a busca de mutações e polimorfismos através do NCBI-BLAST (ALTSCHUL et al, 1997), o pacote phred/phrap/consed¹ (EWING e GREEN, 1998; EWING et al, 1998) foi utilizado por apresentar características mais específicas a este fim, como o fato de considerar a qualidade das seqüências e a possibilidade de visualização dos cromatogramas alinhados.

Foram utilizados os scripts ‘phredPhrap’ (que executa diversos programas, como ‘phred’, ‘crossmatch’ e ‘phrap’ para gerar a montagem dos fragmentos seqüenciados), ‘fasta2phd’ e ‘consed’ (para visualização de montagens e desenho inicial de *primers*). Os programas exigem uma estrutura inicial, composta pelos diretórios ‘phd_dir’, ‘edit_dir’ e ‘chromat_dir’, e é executado em sistema operacional linux. Os cromatogramas são colocados no diretório ‘chromat_dir’, e os scripts executados a partir do diretório ‘edit_dir’. No diretório ‘phd_dir’ são colocados os arquivos com a descrição da qualidade

¹ <http://www.phrap.org>

das seqüências, que podem ser gerados pelo programa 'phred', através do script 'phredPhrap', ou através do script 'fasta2phd'.

Dentre os programas utilizados pelo script 'phredPhrap' estão o 'phred', que gera arquivos com valores de qualidade para cada posição dos cromatogramas; o programa 'crossmatch', que compara as seqüências; e o 'phrap', que define grupos semelhantes (clusters) e gera contigs. Nos casos em que não está disponível o cromatograma, se faz necessária a utilização de uma seqüência em formato fasta para a comparação, e a utilização do script 'fasta2phd' para a geração de arquivos de qualidade pré-definida sem a necessidade de cromatograma. Este script é utilizado apenas nos casos em que existe seqüência de bases de qualidade garantida, e que não estejam disponíveis os cromatogramas, para que estas informações possam ser utilizadas na montagem. No presente trabalho a seqüência completa do VDR (*GenBank* gi|3617739|gb|AC004466.1) foi utilizada para ancorar a montagem dos fragmentos e para facilitar a separação entre exons e introns.

O programa 'consed' permite a visualização das montagens realizadas, a busca e análise de mutações e polimorfismos (análise visual ou sistema de busca por discrepâncias de alta qualidade), e o desenho de *primers*. Estes programas são gratuitos para utilização acadêmica, mediante autorização prévia.

Digestão com enzimas de restrição

Nos casos em que a mutação cria ou destrói um sítio de enzima de restrição, a co-segregação da seqüência anormal de DNA nos indivíduos afetados de cada família foi confirmada através da digestão do fragmento de PCR com enzimas de restrição. Foram investigados também os polimorfismos presentes no VDR e que são identificados usando diferentes enzimas de restrição. Para a reação de digestão, foram usados 12µL do produto de PCR da região com problemas, 10% de tampão da enzima a ser utilizada, 0,5 µL da enzima e a reação foi completada com água para um volume final de 20µL. A reação foi colocada em um termociclador à 37° C por uma hora e sua ação inativada de acordo com as instruções específicas para cada uma delas. As amostras foram corridas em gel de agarose à 80V por 3h e o mesmo corado com SYBR GOLD (Molecular Probes) por 40 minutos.

Cultura primária de fibroblasto

A cultura primária de fibroblasto foi feita a partir de material de biópsia de pele dos pacientes e usadas para extração de extrato de proteínas nucleares e tratamento com diferentes doses de vitamina D. A amostra de pele foi retirada com um *punch* de pequeno diâmetro, limpa e cortada em pequenos fragmentos e tratada com tripsina por 3 horas a 37°C para separar a derme da epiderme e para dissociar células individualmente. A derme foi separada e mantida em meio DMEM (Gibco), 10% soro fetal bovino. Após cerca de um mês, as células se expandem rapidamente.

Devido a dificuldades e resistência por parte dos pacientes e familiares para a realização da cultura de fibroblastos, e à presença de expressão do VDR em linfócitos, foi testada a possibilidade de estudar o receptor em cultura de linfócitos imortalizados.

Imortalização e cultura de linfócitos

A extração dos linfócitos foi feita a partir de 5mL de amostra de sangue de cada paciente. O sangue foi diluído em 15mL de Hank's 1X. Em um tubo falcon de 50mL limpo colocou-se 10mL do reagente de Ficoll Paque 1077 da GE Healthcare, depois foi adicionado ao sangue diluído cuidadosamente para não misturar com o Ficoll. Foi centrifugado por 30 minutos. Formaram-se três fases, dessas, foi pega a fase do meio. Foi lavado 3 vezes com Hank's 1X por 10 minutos à 187 x g. As células foram ressuspensas em 4mL de meio RPMI, 10% soro fetal bovino e colocadas em placas de 12 poços, 2mL da suspensão em cada poço. Os poços do meio da placa foram usados para evitar contaminações. Ao sobrenadante foi adicionado 400µL do vírus Epstein Barr, para imortalização das células. Esta cultura foi mantida por aproximadamente um mês até se observar sinais de proliferação para depois fazer sua expansão.

Indução da expressão de mRNA da 24-hidroxilase pós tratamento com 1,25(OH)₂ vitaminaD

Para investigar a interação receptor/vitamina D, bem como a ativação de transcrição gênica, os fibroblastos dos pacientes e do indivíduo normal foram tratados com 10⁻⁷, 10⁻⁸ e 10⁻⁹ nM de vitamina D por 6 horas. Para comparação da expressão, foi mantido

um frasco controle para cada frasco tratado, que receberam somente o veículo em que a mesma foi dissolvida (etanol), porém sem o tratamento com a vitamina. Ao fim do experimento, para análise funcional, foi realizada a extração de RNA de todas as células.

Extração de RNA e RT-PCR

Para análise da indução do gene da 24(OH)ase pelo tratamento com a vitamina D, após a extração do RNA total utilizando o método de TRIzol (Invitrogen), foi realizado a transcriptase reversa (RT-PCR) seguida de PCR para amplificar parte do gene da 24 (OH)ase utilizando um par de *primers* específico. Para a realização do RT-PCR foram usados três microgramas de RNA total. Os *primers* utilizados foram:

Primer 24OH F- 5' CGGTGGAAACGACAGCAAAC 3'

Primer 24OH R- 5' CAACAGGCTCATTGTCTGTGG 3'

Para a amplificação, foram usados 5µL do cDNA, com 100ng de *primers sense* (F) e *antisense* (R), 200µM de dNTP, 10% de tampão do PCR para um volume final de 50µL e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase. Foram feitos 35 ciclos de amplificação que consiste em: desnaturação do cDNA molde a 94°C por 30 segundos cada, temperatura de anelamento de 58°C e uma extensão a 72°C por 45 segundos. Uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A reação de PCR foi eletroforada em gel 1% de agarose corado com brometo de etídeo.

Extração de proteína total

A extração de proteína nuclear da cultura de fibroblasto foi preparada em tampão A (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2.5 µg/ml of aprotinina). As células foram centrifugadas por 5 minutos à 130 x g, 4°C. O *pellet* foi suspenso em 200µl do tampão A, agora contendo 0.1% NP-40. Foi incubado no gelo 15 min, a suspensão foi passada 10 vezes em seringa de insulina e centrifugou-se 1 min, 12.000 x g, 4°C. O sobrenadante contendo a fração protéica citosólica foi transferido para um tubo novo. O *pellet* foi lavado com tampão A por 2 vezes e então foi feita a lise da membrana nuclear por choque osmótico em 40µl de tampão B

(20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glicerol, 1.5 mM MgCl₂, 0.42 M NaCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2.5 µg/ml de aprotinina e leupeptina, e 1 µg/ml de pepstatina). A amostra foi incubada a 4°C por 30 min com rotação e centrifugada por 10 min, 4°C, 12,000 x g. O sobrenadante contendo o extrato protéico nuclear foi transferido para um novo tubo. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford.

Western Blot

Quarenta microgramas do extrato de proteína nuclear de fibroblasto dos pacientes foi usado para eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, seguido de eletrotransferência das proteínas em membrana PVDF. Após bloqueio com PBS-T e 5% de leite desnatado, as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal primário VDR (D-6) sc 13133 (Santa Cruz, Califórnia, USA), diluição 1:50 em PBS-T a noite toda, seguida do anticorpo secundário marcado com peroxidase de rábano (HRP), diluição 1:20.000 em leite desnatado por duas horas. Para detecção das proteínas, foi utilizado o “kit” de quimioluminescência ECL (GE Healthcare).

RESULTADOS

A tabela 1 apresenta os dados bioquímicos do início do tratamento e os mais recentes dos quatro pacientes estudados. Com exceção do paciente 4, todos responderam ao tratamento com doses suprafisiológicas de vitamina D e ou Calcitriol, reposição de cálcio e fósforo. Tanto no paciente 1 como no paciente 2, percebe-se um melhor controle laboratorial e clínico dos pacientes entre a idade de 6-8 anos, necessitando suspensão da reposição de vitamina D devido ao aparecimento de hipercalcúria. Mesmo o paciente 4, que apresentou a pior evolução dos quatro pacientes estudados, agora com 6 anos de idade, se encontra bioquímica e clinicamente estável.

Tabela 1 – Dados bioquímicos no início do tratamento e resultados recentes nos quatro pacientes estudados

Pacientes	Idade inicial e recente (anos)	Ca sérico (mg/dL)	P sérico (mg/dL)	PTH (pg/mL)	Fosfase alcalina (U/L)
1	2	6.6	4.3	270	3180
1	9.5	9.7	5.2	54	262
2	6	8.3	2.7	-	2000
2	19.2	8.9	3.2	132	131
3	7	8.0	2.8	-	725
3	20.6	9.2	2.8	62.9	280
4	2	8.9	2.1	582	7600
4	6.7	8.9	3.8	215	565
VN 2-12 anos		8.8-10.8	4.5-5.5	15-65	Até 719
Adultos		8.6-10.2	2.7-4.5		Homens: 40-129, Mulheres: 35-104

PCR e sequenciamento

O DNA genômico de sangue periférico dos quatro pacientes foi utilizado como molde das reações de PCR. Os exons de 2 à 9 de todos os pacientes foram amplificados através da técnica de PCR e seqüenciados.

A partir dos resultados de seqüenciamento, foi identificada uma mutação em cada um dos quatro pacientes estudados, tendo dois deles apresentado a mesma mutação. Alguns polimorfismos também foram encontrados. Estas três mutações (duas novas) no

receptor da vitamina D estão relacionadas com o raquitismo dependente a vitamina D tipo II. Os quatro pacientes são homozigotos para estas mutações.

Os pacientes 1 e 3 apresentam uma nova mutação *missense* no exon 7 que altera o nucleotídeo 775, mutado de C para G (c.775 C>G) (Fig. 1), causando a troca do aminoácido glutamina por ácido glutâmico na posição 259 (p.Q259E). Esta mutação cria um sítio para a enzima de restrição *Ava II*, e a digestão com esta enzima gera uma banda adicional de 141 bp no alelo mutado destes dois pacientes (Fig. 2). Nas posições dos polimorfismos descritos no VDR ambos pacientes apresentavam os alelos mais freqüentes.

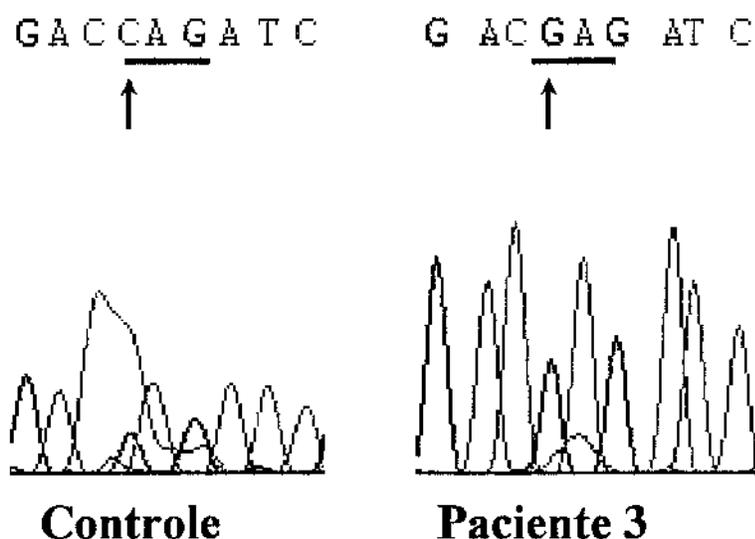


Figura 1 – Cromatogramas da região mutada no exon 7 do paciente 3 e da mesma região no controle. A seta indica o nucleotídeo alterado (C>G) e o tríplet sublinhado destaca o códon referente ao aminoácido alterado (glutamina>ácido glutâmico).

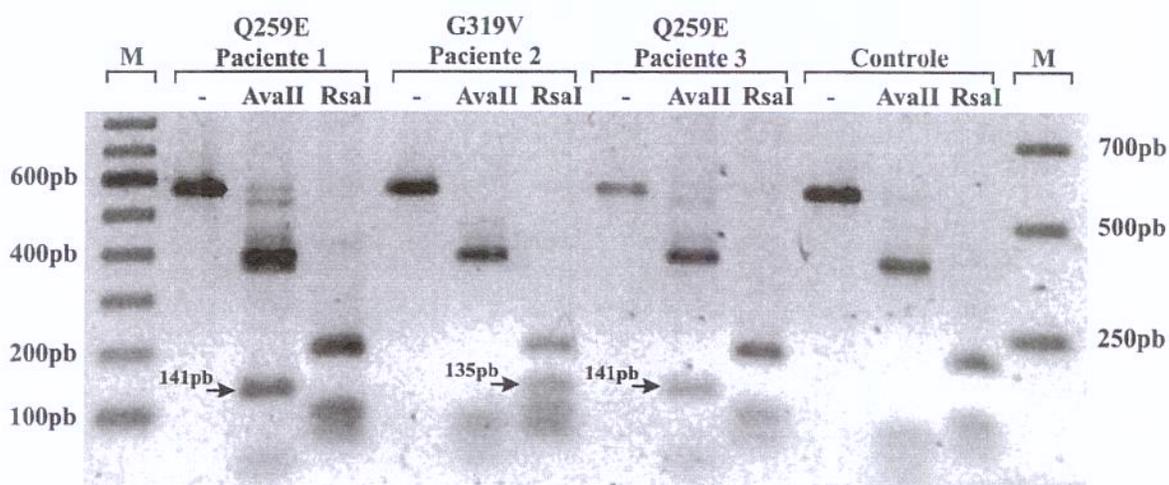


Figura 2 – Digestão dos produtos de PCR dos exons 7 e 8 dos pacientes 1, 2, 3 e controle com enzimas de restrição *Ava II* e *Rsa I* respectivamente. No exon 7 um C foi mudado para G no nucleotídeo 775, mudando o aminoácido na posição 259 de glutamina para ácido glutâmico. A presença da mutação cria um sítio de enzima *Ava II*, apresentando uma banda extra de 141 pb. Paciente 1 e 3 apresentaram-se homozigotos para a mutação. No exon 8 um G foi mudado para T no nucleotídeo 955, mudando o aminoácido na posição 319 de glicina para valina. A presença da mutação cria um sítio da enzima *Rsa I* apresentando uma banda extra de 135 pb comparado com o controle. Marcador 100 pb e marcador 1 Kb.

No paciente 2 identificamos no exon 8 outra mutação ainda não descrita na literatura, no nucleotídeo 955, mutado de G para T (c.955 G>T) (Fig. 3), resultando na mudança de aminoácido de glicina para valina na posição 319 (p.G319V). Esta mutação cria um sítio da enzima *Rsa I* e a digestão com esta enzima resulta em uma banda adicional de 135 pares de base no alelo mutado (Fig. 2). Nesse paciente também foram identificados dois polimorfismos. No exon 2 (c.2 T>C p.M1T). Este polimorfismo altera o sítio de transcrição inicial ATG, sendo usado para início da transcrição um segundo sítio ATG 9 pares de base abaixo não mudando a matriz de leitura. No exon 9, identificamos o polimorfismo *Taq I* (c.1056 T>C p.I352I). A mudança nucleotídica resulta em uma mutação silenciosa, mantendo o mesmo aminoácido. O paciente é homozigoto para ambos os polimorfismos.

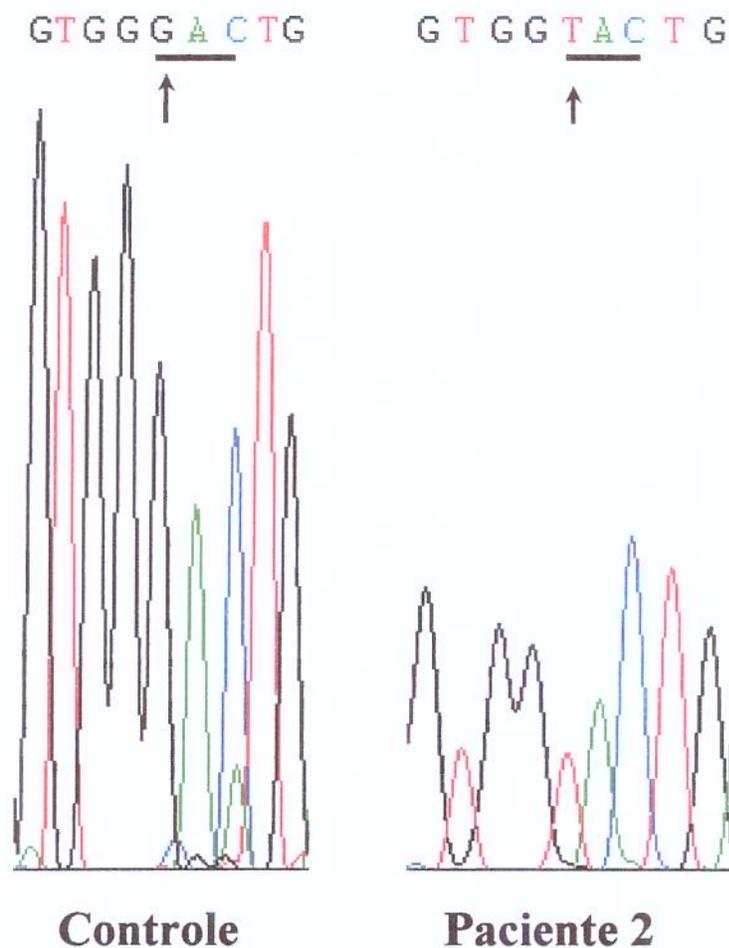


Figura 3 – Cromatogramas da região mutada no exon 8 do paciente 2 e da mesma região no controle. A seta indica o nucleotídeo alterado (G>T) e o tríplet sublinhado destaca o códon referente ao aminoácido alterado (glicina>valina).

No paciente 4, identificamos a presença de uma mutação *nonsense* em homozigose no exon 3, mudando C por T no nucleotídeo 217 (c. 217 C>T) (Fig. 4). Esta mutação resulta na troca de uma arginina por um códon terminal na posição 73 (p.R73X). Para a confirmação da mutação, foi desenhado um *primer* antes da troca nucleotídica, mudando uma base da sequência original para criar um sítio de enzima de restrição *Pvu II*. A digestão com esta enzima de restrição confirmou a presença da mutação em heterozigose nos pais e em homozigose no probando (Fig. 5). O mesmo polimorfismo no exon 2, (c.2 T>C p.M1T) descrito no paciente anterior foi encontrado neste paciente em homozigose.

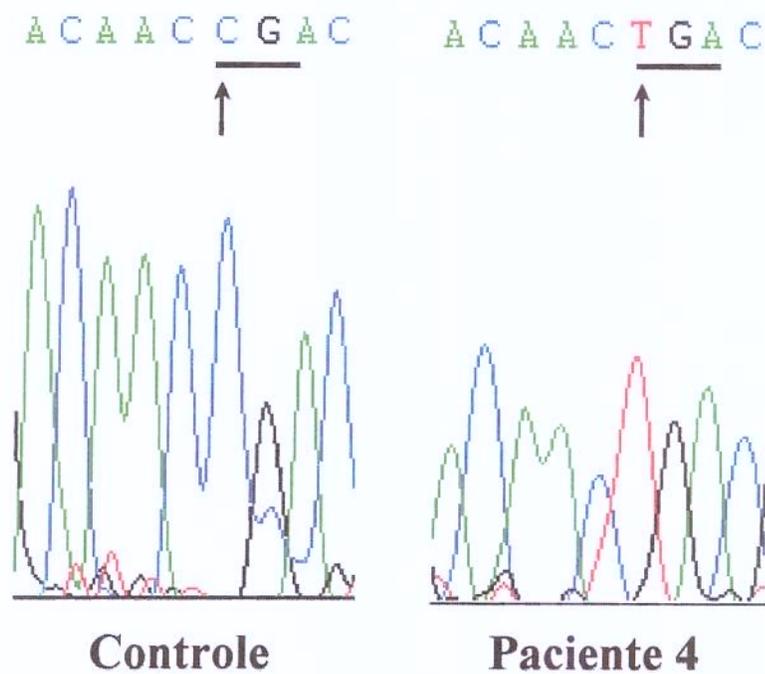


Figura 4 – Cromatogramas da região mutada no exon 3 do paciente 4 e da mesma região no controle. A seta indica o nucleotídeo alterado (C>T) e o tríplet sublinhado destaca o códon referente ao aminoácido alterado (arginina>códon terminal).

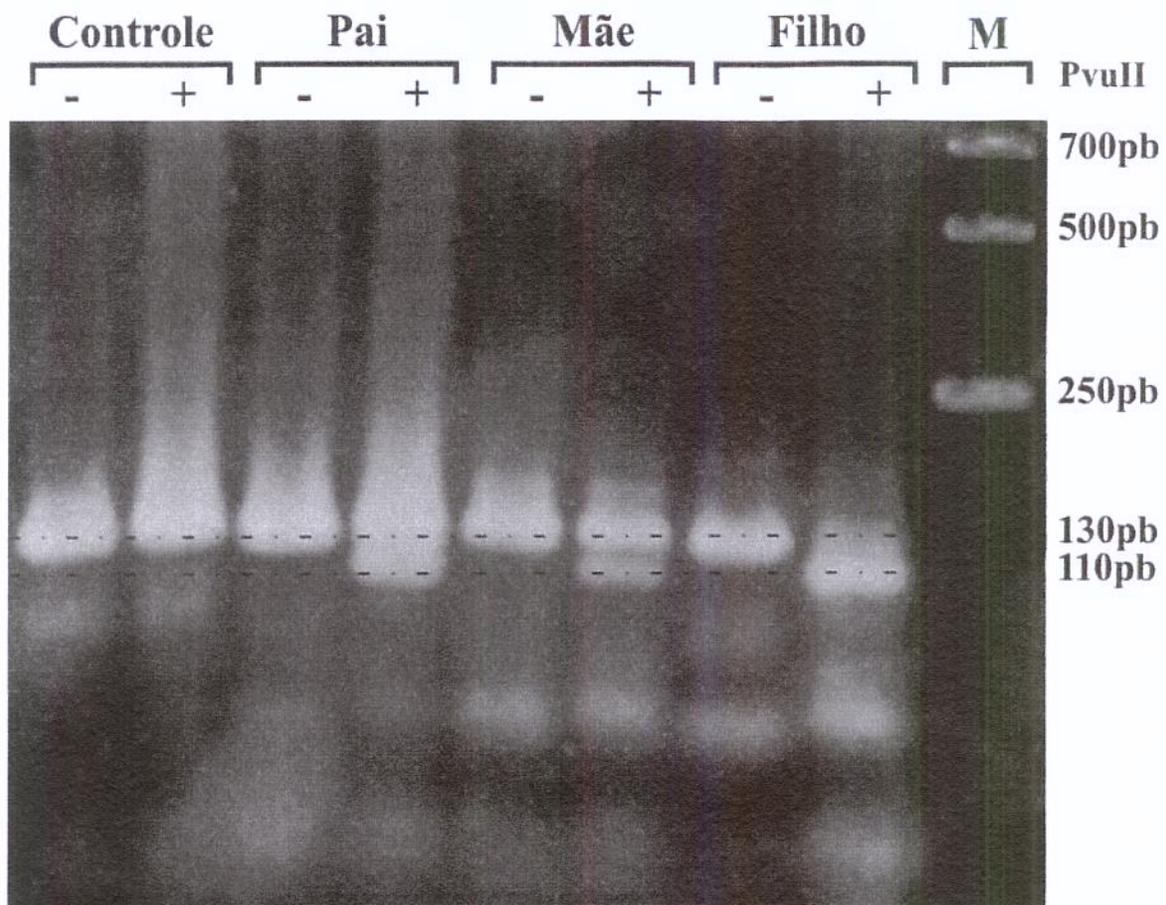


Figura 5 – Produtos de PCR e digestão do exon 3 com enzima de restrição *Pvu II*. Controle, pai, mãe, probando e marcador. O primer desenhado com a troca nucleotídica cria um sítio da enzima *Pvu II*. As colunas com sinal negativo apresentam os produtos de PCR não digeridos e sinal positivo, digeridos com enzima de restrição. O controle possui apenas a banda maior (homozigoto normal), ambos os pais possuem as duas (indicando heterozigose) e o probando apenas a banda menor (homozigoto mutado).

Imortalização e cultura de linfócitos

Para análise funcional do VDR nos pacientes foi tentado inicialmente cultura de linfócitos imortalizados pela facilidade em obtenção do material e por ter sido confirmado uma boa expressão do receptor neste tipo de cultura. Durante o desenvolvimento do estudo foi realizada a técnica de extração e imortalização de linfócitos nos quatro pacientes. Infelizmente, as culturas de células dos pacientes não apresentaram o crescimento esperado e não foi possível expandi-las para a realização do tratamento de indução. Foi repetido a cultura cerca de duas a três vezes em cada paciente sem sucesso. A cultura com linfócitos extraídos de voluntários que não apresentam a doença cresceu normalmente.

Cultura de fibroblasto

Diante do insucesso com a cultura de linfócitos foi retomada a proposta inicial de realizar o estudo funcional do VDR em cultura de fibroblasto. Foi feita biópsia de pele dos quatro pacientes e de um indivíduo normal para controle. As células foram expandidas e cresceram com boa viabilidade e sem contaminações.

Análise funcional do VDR

Para análise funcional do VDR a cultura primária de fibroblastos dos pacientes e de um indivíduo controle foram tratadas com diferentes doses de calcitriol por seis horas. A 24-hidroxilase foi altamente induzida pela vitamina D em um controle de células normais e não foi induzida na cultura de fibroblasto dos quatro pacientes (Fig. 6).

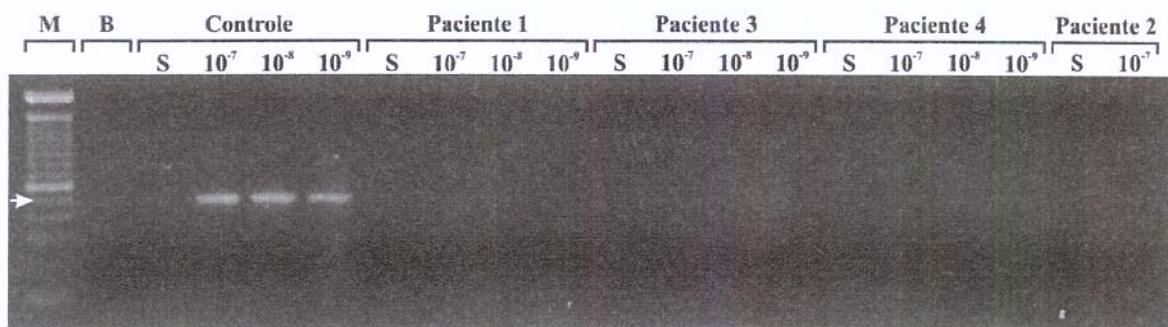


Figura 6 – Indução da expressão do gene da 24(OH)ase após tratamento com 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} nM de $1,25(\text{OH})_2$ vit D. Três microgramas de RNA total foram utilizados para a realização de RT-PCR com primers específicos para o gene da 24(OH)ase. O tamanho do fragmento esperado é de 500 pares de bases. Marcador (M); branco (B) (PCR do produto de RT sem RNA); sem o tratamento da vitamina D (S); tratamento com as diferentes doses de $1,25(\text{OH})_2$ vit D, controle e pacientes respectivamente.

Western Blot

O Western Blot permitiu a análise do receptor nos pacientes estudados comparados com o controle. A expressão do receptor foi comprometida nos quatro pacientes estudados (figura 7). No controle está presente e fortemente expressa a banda de 50 kDa relativa ao VDR (427 aminoácidos). Quando comparados com o controle de células normais, é expressiva a diminuição de expressão do receptor nos pacientes que apresentam mutações pontuais no domínio de ligação mas principalmente no paciente 4 que apresenta a mutação do códon terminal resultando em um receptor truncado no domínio de interação com o DNA.

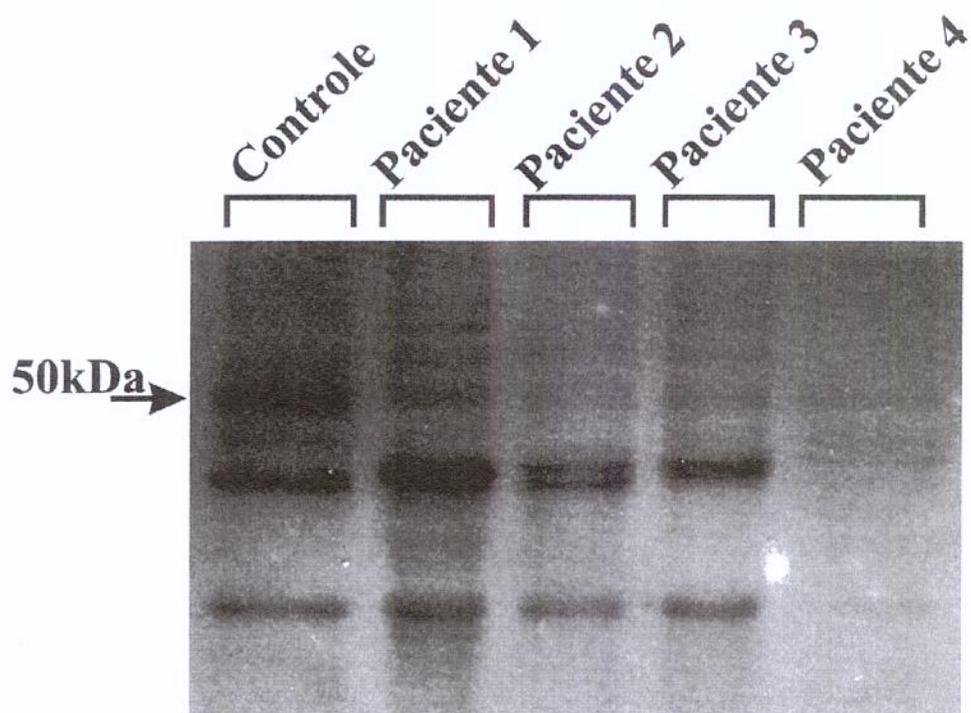


Figura 7 – Análise de Western blot de extrato nuclear de fibroblastos controle e dos pacientes com mutação no VDR. O tamanho esperado da proteína é de 50 kDa. Coluna 1- extrato protéico de controle; coluna 2- paciente 1, mutação Q259E; coluna 3- paciente 2, mutação G319V; coluna 4- paciente 3, mutação Q259E e coluna 5- paciente 4, mutação R73X. As proteínas foram marcadas com anticorpo monoclonal anti VDR contra a posição 344-424 do VDR humano.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O raquitismo dependente da vitamina D tipo II é uma doença autossômica recessiva associada ao não funcionamento adequado do receptor da vitamina D (VDR) (HUGHES et al, 1988). As concentrações séricas de 1,25-dihidroxitamína D₃ são elevadas e, na maioria das vezes não há resposta ao tratamento com doses altas de vitamina D. Os pacientes apresentam hipocalcemia e raquitismo grave de início precoce, nos primeiros meses de vida e a maior parte dos indivíduos apresentam pouco ou nenhum pêlo corporal (alopecia) (MALLOY et al, 1999).

Os pacientes 1, 2 e 3 com mutações no domínio de interação com o ligante apresentaram uma surpreendente evolução favorável ao tratamento, diferente dos casos clássicos que apresentam uma resistência importante ao tratamento com vitamina D e ou Calcitriol. Metade dos pacientes responde parcialmente ao tratamento e na literatura há relatos de evoluções não habituais (LIBERMAN e MARX, 2003). O paciente 4 com a mutação do códon de parada no domínio de interação como DNA apresentou uma pior evolução clínica, porém atualmente, aos 7 anos de idade, apresenta-se clinicamente estável. Mesmo apresentando uma proteína truncada com nítida diminuição de expressão protéica, a preservação de parte do domínio de interação com o DNA parece garantir um mínimo de função do receptor.

Mutações

Foi identificada uma mutação em cada um dos quatro pacientes estudados, sendo duas novas e dois deles apresentam a mesma mutação. Essas três mutações no receptor da vitamina D estão relacionadas com o raquitismo dependente a vitamina D tipo II. Os quatro pacientes são homozigotos para estas mutações.

Existem quatro possíveis mecanismos pelos quais uma mutação altera a função do VDR: diminuição da afinidade do receptor pelo ligante, diminuição da capacidade de heterodimerização com o RXR, deficiência de localização nuclear por alteração de conformação tridimensional porém com perda apenas parcial da afinidade com o agonista ou mutações em que o receptor mantém a afinidade com o agonista porém perde a sua capacidade de interação com o DNA (LIBERBAN e MARX, 2003). Uma mesma mutação pode resultar em defeitos múltiplos no receptor podendo comprometer a sua capacidade de

ligação com o ligante e também a sua heterodimerização ou ativação com proteínas co-ativadoras e co-repressoras (MALLOY et al, 2004).

A mutação Q259E, encontrada nos pacientes 1 e 3, se localiza no domínio de ligação com o agonista. Nessa mesma posição é descrita uma mutação trocando glutamina por prolina em uma família Indiana consanguínea e que os membros afetados apresentavam raquitismo e alopecia (COCKERILL et al, 1997), sugerindo que esta região é um *hot spot* para mutação. Além da interação com o ligante, esta região é importante para a heterodimerização e o potencial de transativação induzido pela ligação com o agonista (MALLOY et al, 1999). Ambos pacientes apresentam um quadro clínico muito semelhante. A mutação G319V encontrada no paciente 2 e localizada no exon 8 também está no domínio de interação com o ligante. Mutações nesta região, estão mais associadas à perda de afinidade do receptor pelo ligante porém com manutenção da interação do receptor com o DNA e geralmente não cursam com a alopecia. A presença de alopecia neste paciente, sugere que esta mutação, apesar de estar na região de ligação do ligante, compromete a atividade de transativação do receptor. No modelo da estrutura tridimensional do domínio de ligação do ligante o exon 8 representa a alfa hélice 7 e 8. Na presença do ligante ocorre uma mudança conformacional com uma reorganização dessas hélices para posterior formação do heterodímero (MALLOY et al, 1999). A presença da mutação em uma dessas hélices pode alterar a reorganização dessas hélices comprometendo a ligação com o ligante e a posterior formação da heterodimerização. Malloy et al. (2002) descreveu também uma mutação na posição 317 trocando o aminoácido glutamina por um códon terminal em uma menina de origem iraniana com raquitismo e alopecia (MALLOY et al, 2002).

A mutação *nonsense* R73X encontrada no paciente 4 está localizada no domínio de ligação com o DNA no segundo *zinc finger* do receptor da vitamina D, resultando em um receptor truncado (COCKERILL et al, 1997). Esta mutação já foi descrita na literatura em um paciente de origem Grega (COCKERILL et al, 1997). Em uma outra família brasileira, uma troca de arginina por códon de parada foi descrita, mas na posição 30 (R30X) fazendo parte do primeiro *zinc finger* do domínio de interação com o DNA (MECHICA et al, 1997). O domínio de interação com o DNA contém resíduos altamente conservados e alterações neste domínio causam diminuição da afinidade de ligação do receptor ao DNA (MALLOY et al, 1990).

Análise funcional do VDR

A expressão do gene da 24(OH)ase é modulada pela interação entre a vitamina D e seu receptor (MALLOY et al, 1990). Para melhor esclarecimento da consequência funcional da mutação no receptor da vitamina D, é necessário a cultura de tecido dos pacientes. Por ser menos invasiva e expressar bem o VDR optou-se inicialmente pela realização do estudo do receptor em cultura de linfócitos. A cultura de linfócitos dos pacientes não apresentou o crescimento esperado e não foi possível expandi-la para a realização do tratamento de indução. A cultura com linfócitos extraídos de voluntários que não apresentam a doença cresceu normalmente, o que sugere algum fator intrínseco nos pacientes que dificultou um bom crescimento destas células. Foram realizadas três tentativas da cultura de linfócitos com os mesmos resultados discutidos.

A biopsia de material de pele para a cultura de fibroblastos foi realizada nos quatro pacientes. A cultura foi expandida, parte dela foi usada para realização de atividades propostas e outra parte congelada para possibilitar experimentos futuros. A cultura primária de fibroblastos dos pacientes e de um indivíduo controle foram tratadas com diferentes doses de vitamina D por seis horas. A 24-OH contém elementos responsivos ao VDR e sua expressão é aumentada pela vitamina D em células normais (MALLOY et al, 1990). A 24-hidroxilase foi altamente induzida pela vitamina D em um controle de células normais e não foi induzida na cultura de fibroblasto dos quatro pacientes, indicando que as mutações afetam a capacidade de induzir a atividade desta enzima.

Western Blot

O Western permitiu a análise do receptor nos pacientes estudados comparados com o controle. Houve uma diminuição de expressão dos receptores mutados nos extratos nucleares de cultura de fibroblastos dos pacientes com mutações pontuais no domínio de ligação. No paciente 4, não foi possível a análise de expressão protéica do receptor truncado no domínio de interação com o DNA, pois esta proteína perde o epítipo utilizado para a produção do anticorpo não sendo identificado no Western blot. Entretanto, dados clínicos confirmam que apesar de truncado, este receptor mantém algum grau de função, pois o paciente apresentou resposta ao tratamento.

CONCLUSÕES

- Foram encontradas e confirmadas três mutações no receptor da vitamina D nos quatro portadores de raquitismo e alopecia.
- A mutação Q259E é uma mutação nova e localiza-se no domínio de ligação com o agonista, em uma região importante para a heterodimerização do receptor. Esta mutação resultou em diminuição de expressão protéica do VDR e perda funcional parcial do receptor.
- A mutação G319V é uma mutação nova e localiza-se no domínio de ligação com o agonista, em uma região importante para manutenção da mudança conformacional necessária para interação do VDR/RXR. Esta mutação resultou em diminuição de expressão protéica do VDR e perda funcional parcial do receptor.
- A mutação R73X resulta em uma proteína truncada no domínio de ligação com DNA. Esta mutação perde o epítipo de interação com o anticorpo usado, não podendo ser feito um estudo de expressão protéica. Está associada a perda funcional do receptor.
- Os pacientes com mutação no domínio de ligação com o ligante, apresentaram resposta clínica mais favorável do que o paciente com mutação no domínio de interação com DNA sugerindo uma relação genótipo/fenótipo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, 25(17): 3389-402, 1997.
- BLUNT, J. W., DELUCA, H. F., SCHNOES, H. K. 25-Hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolite of vitamin D₃. **Biochemistry**, 7: 3317-3322, 1968.
- COCKERILL, F. J.; HAWA N. S.; YOUSAF, N.; HEWINSON, M.; O'RIODARN, J. L.; FARROW, S.M. Mutations in the vitamin D receptor gene in three kindreds associated with hereditary vitamin D resistant rickets. **J Clin Endocrinol Metab**, 82(9): 3156-60, 1997.
- DELUCA, H.F., SCHNOES.H.K. Metabolism in mechanism of action of vitamin D³. **Annu. Rev. Biochem.** 45: 631-666, 1976.
- DAME, M. C., PIERCE, E.A., DELUCA, H.F. Identification of the porcine intestinal 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor on sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gels by renaturation and immunoblotting. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 82: 7825-7829, 1985.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res**, 8(3): 186-94, 1998.
- EWING, B.; HILLIER L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res**, 8(3): 175-85, 1998.
- FAVUS, M. E. Rickets. **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1999. p. 501.
- GLORIEUX, F. H.; ARABIAN A.; DELVIN, E. E. Pseudo-vitamin D deficiency: absence of 25-hydroxyvitamin D 1 alpha-hydroxylase activity in human placenta decidual cells. **J Clin Endocrinol Metab**, 80(7): 2255-8, 1995.
- RASMUSSEN, H., DELUCA, H.F., ARNAUD, C., HAWKER, C., VONSTEDINGK.M., The relationship between vitamin D and parathyroid hormone. **J. Clin. Invest.** 42: 1940-1946, 1963.
- HUGHES, M. R.; MALLOY P. J.;KIEBACK, D. G.; KESTERSON, R. A.; PIKE, J. W.; FELDMAN, D. et al. Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets. **Science**, 242(4886): 1702-5, 1988.

- JONES, G.; STRUGNELL S. A.; DELUCA, H. F. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. **Physiol Rev**, 78(4): 1193-231, 1998.
- KATO, S.; TAKEYAMA K.; KITANAKA, S.; MURAYAMA, A.; SEKINE, S.; YOSHIZAWA, T. In vivo function of VDR in gene expression-VDR knock-out mice. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 69(1-6): 247-51, 1999.
- LIBERMAN, U. A.; MARX, S. J. Vitamin D-dependent rickets. **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2003. p.407.
- MADHOK, T. C., DELUCA, H.F. Characteristics of the rat liver microsomal enzyme system converting cholecalciferol to 25-hydroxycholecalciferol. Evidence for participation of cytochrome P-450. **Biochem. J.** 184: 491-499, 1979.
- MALLOY, P. J.; HOCHBERG, Z.; TIOSANO, D.; PIKE, J. W.; HUGUES, M. R.; FELDMAN, D. The molecular basis of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D3 resistant rickets in seven related families. **J Clin Invest**, 86(6): 2071-9, 1990.
- MALLOY, P. J.; PIKE J. W.; FELDMAN, D. The vitamin D receptor and the syndrome of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. **Endocr Rev**, 20(2): 156-88, 1999.
- MALLOY, P. J.; WEISMAN, Y.; FELDMAN, D. Hereditary 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets resulting from a mutation in the vitamin D receptor deoxyribonucleic acid-binding domain. **J Clin Endocrinol Metab**, 78(2): 313-6, 1994.
- MALLOY, P. J.; XU, R.; PENG, L.; CLARK, P.A.; FELDMAN, D. A novel mutation in helix 12 of the vitamin D receptor impairs coactivator interaction and causes hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets without alopecia. **Mol Endocrinol**, 16(11): 2538-46, 2002.
- MALLOY, P. J.; XU, R.; PENG, L.; PELEG, S.; AL-ASHWAL, A.; FELDMAN, D. Hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D resistant rickets due to a mutation causing multiple defects in vitamin D receptor function. **Endocrinology**, 145(11): 5106-14, 2004.
- MALLOY, P. J.; ZHU, W.; BOUILLON, R.; FELDMAN, D. A novel nonsense mutation in the ligand binding domain of the vitamin D receptor causes hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. **Mol Genet Metab**, 77(4): 314-8, 2002.

MECHICA, J. B.; LEITE, M. O. R.; MENDONÇA, B. B.; FRAZZATTO, E. S. T.; BORELLI, A.; LATRONICO, A.C. A novel nonsense mutation in the first zinc finger of the vitamin D receptor causing hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D3-resistant rickets. **J Clin Endocrinol Metabol**, 82(11): 3892-94, 1997.

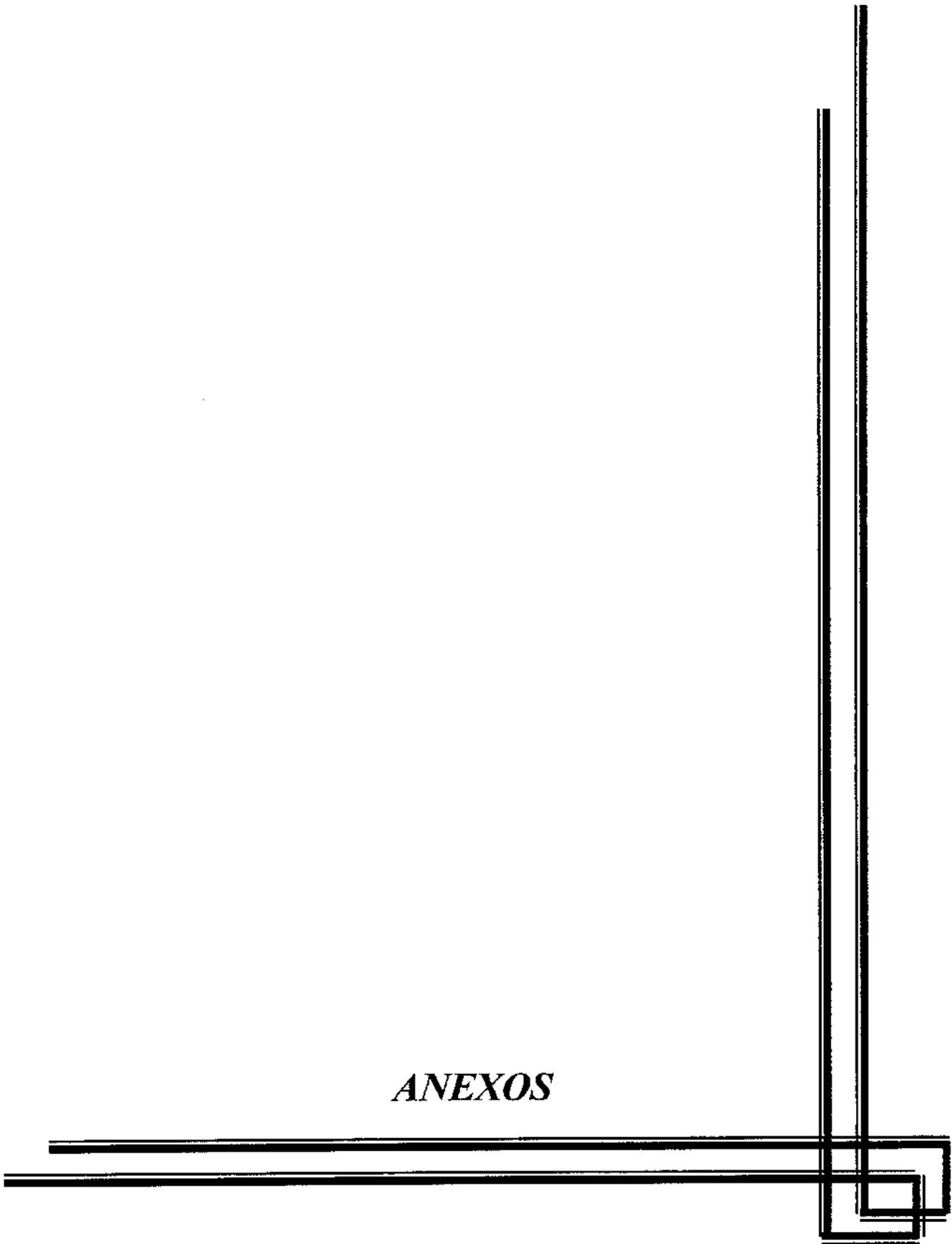
MIYAMOTO, T.; KAKIZAWA, T.; ICHIKAWA, K.; NISHIO, S.; TAKEDA, T.; SUZUKI, S. et al. The role of hinge domain in heterodimerization and specific DNA recognition by nuclear receptors. **Mol Cell Endocrinol**, 181(1-2): 229-38, 2001.

SAKAI, Y.; KISHIMOTO, J.; DEMAY, M. B. Metabolic and cellular analysis of alopecia in vitamin D receptor knockout mice. **J Clin Invest**, 107(8): 961-6, 2001.

WILSON, J.; FOSTER, D. **Williams textbook of endocrinology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 1995. p.1712.

ZMUDA, J. M.; CAULEY, J. A.; FERRELL, R. E. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. **Epidemiol Rev**, 22(2): 203-17, 2000.

ANEXOS



ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



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

PARECER N.º 1933/2002

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

Registro CEP: 330/2002

Processo nº 25000.110038/2002-91

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

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

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP

Área Temática Especial : Genética Humana

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

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

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

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

Situação : Projeto aprovado com recomendação

Brasília, 30 de dezembro de 2002

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS



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

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

CEP, 20/08/02
(Grupo I)

PARECER PROJETO: Nº 330/2002

I-IDENTIFICAÇÃO:

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

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Lília Freire Rodrigues de Souza Li

INSTITUIÇÃO: CIPED/ UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 16/07/2002

II - OBJETIVOS

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

III - SUMÁRIO

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

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

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

V - PARECER DO CEP

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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

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

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

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

VII - DATA DA REUNIÃO

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


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

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE
ESCLARECIDO**

PROJETO: Investigação molecular de genes envolvidos em homeostase de cálcio

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

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

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

Outro: _____

ENDEREÇO:

Centro de investigação em Pediatria - CIPED

Departamento de Pediatria – FCM – UNICAMP

Cidade Universitária Zeferino Vaz

Campinas – SP – CEP 13081-970

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

e-mail: ldesouza@fcm.unicamp.br

Outro: _____

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:

Nome: _____ Registro do Hospital: _____

Nome do pai: _____ Nome da mãe: _____

Endereço:

Bairro: _____ Cidade: _____ UF: _____

CEP: _____ Fone: _____

IDENTIFICAÇÃO DO RESPONSÁVEL:

Nome: _____ Grau de parentesco: _____

Endereço:

Bairro: _____ Cidade: _____ UF: _____

CEP: _____ Fone: _____

OBJETIVO DA PESQUISA:

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

PROCEDIMENTO:

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

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

RISCO E DESCONFORTO:

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

VANTAGENS:

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

SIGILO:

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

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

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

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

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

Nome do participante ou responsável: _____

Assinatura do participante ou responsável: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Local e data: _____

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

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

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Local e data: _____