

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



**Ângela Maria de Assis**

**ALTERAÇÕES MOLECULARES NOS GENES DA  
ACTIVINA (*Activin receptor-like kinase-1-ALK-1*)  
E ENDOGLINA (ENG) EM TELANGIECTASIA  
HEMORRÁGICA HEREDITÁRIA TIPO 1 e 2.**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Ângela Maria de Assis.  
e aprovada pela Comissão Julgadora.  
[Assinatura]

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
para obtenção do Título de Doutor em  
Genética e Biologia Molecular, na área de  
Genética Animal e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo

- Campinas -

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

As76a

Assis, Ângela Maria de  
Alterações moleculares nos genes activina (activin  
receptor-like kinase (ALK-1) e endoglina (ENG) em  
pacientes com telangiectasia hemorrágica hereditária / Ana  
Ângela Maria de Assis. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Carmen Sílvia Bertuzzo.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Telangiectasia hemorrágica hereditária. 2. Activina.  
3. Endoglina. I. Bertuzzo, Carmen Sílvia. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Three novel mutations in the activin receptor-like kinase 1 (ALK-1) gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2 in brazilian patients.

**Palavras-chave em inglês:** Telangiectasia, Hereditary hemorrhagic; Activin; Endoglin.

**Área de concentração:** Genética Animal e Evolução.

**Titulação:** Doutora em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Carmen Sílvia Bertuzzo, Vera Lúcia Gil da Silva Lopes, Mônica Barbosa de Melo, Maricilda Palandi de Mello, Iscia Teresinha Lopes Cendes.

**Data da defesa:** 22/02/2007.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 22 de fevereiro de 2007.

## BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo (Orientadora)

  
Assinatura

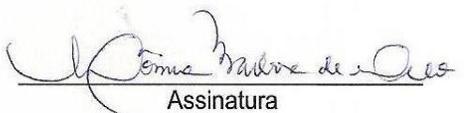
Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

  
Assinatura

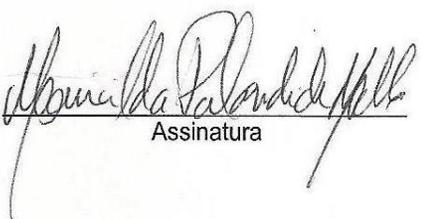
Profa. Dra. Iscia Teresinha Lopes Cendes

  
Assinatura

Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

  
Assinatura

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

  
Assinatura

Prof. Dr. José Andrés Yunes

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## ***DEDICATÓRIA***

Aos meus amados pais:

Minha mãe Maria (Têdinha)

Meu pai (Adeni) *in memorium*

Minha irmã Imaculada

Meus irmãos Carlos e Marcos

Meus sobrinhos Ariela e Yuri

## AGRADECIMENTOS

---

À Deus , a minha mãe e meu pai pela minha existencia.

À Profa. Dra Carmem Silvia Bertuzzo pela orientação e confiança.

Gostaria de demonstrar um sincero agradecimento aos professores Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa e Prof Dr Valder R Arruda, pela oportunidade de trabalho, pelos ensinamentos, orientação, confiança e incentivo sempre demonstrado.

A todos os pacientes, que contribuíram para o estudo.

A minha irmã Imaculada que sempre me pelo apoiou em tudo que faço.

À Monica e José Paulo pela amizade e companheirismo.

À Tereza pela amizade e pelo auxilio na coloração do gel de CSGE.

A todos os membros da banca.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e FAPESP pelo auxilio financeiro.

*“Quando a mente fica quieta, então a Verdade  
tem a chance de ser ouvida  
na pureza do silêncio”.*

**Sri Aurobindo**

---

<b>RESUMO</b> .....	XIII
<b>ABSTRACT</b> .....	XIV
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. HISTÓRICO .....	2
1.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	3
1.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	4
1.4. EVOLUÇÃO DE TELANGIECTASIAS CUTÂNEAS EM THH.....	5
1.5. DIAGNOSTICO .....	7
1.6. TRATAMENTO .....	9
1.7. ASPECTOS GENÉTICOS E MOLECULARES .....	11
1.8. O GENE DA ACTIVINA (ALK-1).....	14
1.9. A ENDOGLINA (ENG).....	14
1.10. MODELO ANIMAL.....	15
1.11. FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE-BETA - TGF- $\beta$ .....	16
1.12. VIA DE SINALIZAÇÃO TGF- $\beta$ .....	17
1.13. EQUILÍBRIO ENTRE TGF-B/ALK 1 E TGF-B/ALK5 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS .....	20
1.14. JUSTIFICATIVA .....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	25
3.1. PACIENTES E CONTROLES .....	26
3.2. ASPECTOS ÉTICOS .....	26
3.3. EXTRAÇÃO DE DNA.....	27
3.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	28
3.5. PCR-CSGE PARA RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE ALK-1 E ENDOGLINA .....	31

3.6.	REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO COM THERMO SEQUENASE RADIOLABELED TERMINATOR CYCLE SEQUENCING KIT .....	32
3.7.	CLONAGEM DOS PRODUTOS DA PCR.....	33
3.8.	PREPARAÇÃO DAS PLACAS DE CULTURA .....	33
3.9.	LIGAÇÃO COM O VETOR PMOS BLUE .....	34
3.10.	TRANSFORMAÇÃO.....	34
3.11.	PLAQUEAMENTO DAS CÉLULAS.....	34
3.12.	TRIAGEM DOS RECOMBINANTES .....	35
3.13.	MINI PREPARAÇÕES .....	35
3.14.	AMPLIFICAÇÃO POR PCR DO FRAGMENTO INSERIDO NO PLASMÍDEO .....	36
3.15.	SEQÜENCIAMENTO AUTOMATIZADO.....	36
3.16.	ANÁLISES DOS DADOS BRUTOS – BASE “CALLING” .....	38
3.17.	ANÁLISES DOS DADOS ATRAVÉS DO “POLY”PHRED”” PARA IDENTIFICAÇÃO DE HETEROZIGOTOS .....	39
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>63</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>74</b>
<b>9.</b>	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>85</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>ALK1/ACVRL1</b>	Activin receptor-like kinase 1
<b>ATP</b>	Adenosina-5" – trifosfato
<b>AVM</b>	Malformação arteriovenosa
<b>BMP</b>	Bone morphogenetic protein
<b>CAVM</b>	malformação arteriovenosa cerebral
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CONSED</b>	Sequence assembly editing
<b>CSGE</b>	Conformation sensitive gel eletrophorese
<b>CT</b>	Domínio citoplasmático
<b>dATP</b>	Deoxyadenosine triphosphate
<b>dCTP</b>	Deoxycytidine triphosphate
<b>ddATP [<math>\alpha^{33}\text{P}</math>]</b>	Dideoxi adenosina trifosfato conjugado com fósforo 33
<b>ddNTP</b>	Dideoxynucleotides
<b>dGTP</b>	Deoxyguanosine triphosphate
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Água deionizada
<b>dITP</b>	2'-deoxyinosine 5'-triphosphate
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeos trifostato
<b>Domínio GS</b>	Domínio glicina serina
<b>Dpp</b>	Decapentaplegica
<b>dTTP</b>	Deoxythymidine triphosphate
<b>EC</b>	Domínio extracelular
<b>ECM</b>	Matrix extracelular
<b>EDTA</b>	Ácido tetracético etilenediamina
<b>ENG</b>	Endoglin
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>HCl</b>	ácido clorídrico
<b>IPTG</b>	Isopropyl-B-D-thiogalactosyranoside
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloreto de amônio

<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de amônio
<b>NIH</b>	National Institutes of Health
<b>ORW</b>	Síndrome de Rendu-Osler-Weber
<b>p</b>	Braço curto de um determinado cromossomo
<b>PAVMs</b>	Malformação arteriovenosa pulmonar sintomática
<b>Pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PHD</b>	Portable Heap Dump
<b>PHRAP</b>	PHRagment Assembly Program
<b>“PHRED”</b>	Phil’s Read Editor
<b>pmol</b>	Picomoles
<b>q</b>	Braço longo de um determinado cromossomo
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>RNase</b>	Ribonuclease
<b>SCF</b>	Standard Chromatogram Format
<b>SDS</b>	Duodecil sulfato de sódio
<b>SMADs</b>	Drosophila mothers against dpp (Mad)
<b>SOB</b>	Super Optimal Broth
<b>SOC</b>	Super Optimal Catabolitic repression glicose
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylenediamine
<b>TGF β</b>	Fator de crescimento transformador-beta
<b>THH</b>	Telangiectasia hemorrágica hereditária
<b>TM</b>	domínio transmembrana
<b>TKM1/ TKM2</b>	Tampões de lise celular
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>X-GAL</b>	5-bromo-4chloro-3-Indolyl-B-D galactoside
<b>μl</b>	Microlitros

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela I:</b> SEQÜÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTIDEOS, CONDIÇÕES DE ANELAMENTO E TAMANHO DOS AMPLICONS PARA O GENE ALK-1.....	30
<b>Tabela II:</b> SEQÜÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTIDEOS, CONDIÇÕES DE ANELAMENTO E TAMANHOS DOS AMPLICONS PARA O GENE DA ENDOGLINA (ENG).....	30
<b>Tabela III:</b> QUADRO CLÍNICO DOS PACIENTES COM TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITÁRIA.....	52
<b>Tabela IV:</b> RESUMO DAS MUTAÇÕES NO GENE ALK-1 EM PACIENTES COM THH.....	52

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>FIGURA 1:</b> EVOLUÇÃO DA TELANGIECTASIA CUTÂNEA.....	07
<b>FIGURA 2:</b> REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DO GENE ALK-1.....	14
<b>FIGURA 3:</b> REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DO GENE ENG.....	15
<b>FIGURA 4:</b> SINALIZAÇÃO DO TGF- $\beta$ .....	19
<b>FIGURA 5:</b> SINALIZAÇÃO DOS RECEPTORES TIPO I TGF- $\beta$ /ALK1 E TGF- $\beta$ /ALK5.....	21
<b>FIGURA 6:</b> MODELO HIPOTÉTICO DE HHT.....	44
<b>FIGURA 7:</b> FAMÍLIA 1.....	46
<b>FIGURA 8:</b> FAMÍLIAS 2 E 3 .....	48
<b>FIGURA 9:</b> FAMÍLIAS 4 E 5.....	50
<b>FIGURA 10:</b> REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DO GENE ALK-1.....	51
<b>FIGURA 11:</b> REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DO GENE ENDOGLINA.....	51

## RESUMO

---

A Telangiectasia Hemorrágica Hereditária (THH) é uma desordem autossômica dominante caracterizada por epistaxe recorrente, telangiectases mucocutânea, hemorragia gastrointestinal, e malformação arteriovenosa pulmonar (PAVM), cerebral e hepática.

A prevalência da doença é de 1/5000 e a mortalidade relatada da doença entre pacientes jovens quando comparado com aqueles com mais de 60 anos é de 36%.

Dois genes da superfamília de receptores para TGF- $\beta$  têm sido relacionados com THH, o gene da endogлина e o gene da activina (*activin receptor-like-kinase*). Estes genes são altamente expressos em células endoteliais e outros tecidos altamente vascularizados como pulmão e placenta.

Mutações no gene da endogлина causam a THH tipo 1 que é caracterizada pela alta incidência de malformação arteriovenosa pulmonar sintomática (PAVMs). Mutações no gene da activina levam a THH tipo 2 caracterizada por epistaxe recorrente e malformação arteriovenosa gastrointestinal.

Foi objetivo deste trabalho realizar uma triagem de mutações na região codificadora dos genes ALK-1 e endogлина em doze pacientes portadores de THH atendidos no Hemocentro da Unicamp. A abordagem metodológica incluiu a amplificação dos exóns dos genes da activina e endogлина seguida pela técnica de PCR/CSGE, clonagem e sequenciamento. Dos doze pacientes estudados, sete apresentaram alguma alteração molecular, destes três pacientes apresentaram uma deleção de um nucleotídeo T na posição 913 no exon 7, um paciente apresentou uma inserção de um nucleotídeo G na posição 204-205 no exon 3 e três pacientes apresentavam uma mutação misense nos exons 7 e 8 na posição 976 e 1204 respectivamente.

Nossos resultados mostraram que a THH tipo 1 e tipo 2 são raras no Brasil e todas as mutações citadas na tabela IV e Figura 10 são novas, somente a mutação ocorrida no exon 8 foi previamente descrita na literatura.

## ABSTRACT

---

**Background:** Hereditary hemorrhagic telangiectasia in humans, also known as HHT or Osler-Rendu-Weber syndrome, is an autosomal dominant vascular disorder characterizes by recurrent epistaxis, mucocutaneous telangiectases, gastrointestinal, pulmonary, cerebral and hepatic arteriovenous malformations (HAVM). The prevalence of the illness is of 1/5000 and the reported mortality of the illness among young patients when compared with those with more than 60 years is 36%. Two genes of the receptors superfamily for TGF- $\beta$  have been related with THH, the gene of the endoglin (ENG) in the chromosome 9q33-34 and the gene of the activin (receptor-like-kinase 1 ALK-1), in the chromosome 12q11q14. These genes are highly express in endothelial cells and other tissue highly vascularized as lung and placenta. Mutations in the gene of the endoglin cause the HHT type 1 which is characterized by the high incidence of symptomatic pulmonary arteriovenous malformation (PAVM). Mutations in the activin gene cause HHT were described among patients in whom the linking with HHT in the chromosome 9q33 or mutation in the endoglin gene was excluded. It was the objective of this work to carry through a selection of mutations in the coding region of gene ALK-1 and endoglin in 12 patients carrying HHT whose are treated in the Blood Center at Unicamp.

**Methods:** Twelve patients were analyzed. Diagnosis of HHT was carried out by means of clinical history of recurrent bleeding, heredity studies, and the presence of multiple telangiectases lesions. PCR products with consistent abnormal migration patterns were cloned into the SureClone<sup>TM</sup> ligation kit vector system and sequenced using the DYEnamic<sup>TM</sup> ET dye terminator cycle sequencing Kit, and analyzed by the MegaBace 1000 DNA automated analyzer. A panel of 252 chromosomes from unrelated individuals without the disease was used to evaluate the frequency of each mutation in the general population.

**Results:** In six patients three novel mutations were identified in the coding sequence of the ALK-1 gene in their families, which demonstrated clinical manifestations of HHT type 2. These mutations included an insertion a deletion of single base pairs in

éxons 3 (c.204-205insG) and 7 (c.913del T), as well as missense mutations in éxons 7 (c.976A>G) and 8 (c.1204G>A) of the ALK-1 gene. The mutations identified in éxons 7 and 8 affect the kinase domain and the mutation identified in éxon 3 affect the extracellular domain. These data indicate that loss-of-function mutations in a single allele of the *ALK1* locus are sufficient to contribute to defects in maintaining endothelial integrity.

**Conclusion:** We suggest the high rate of mutation detection and the small size of the ALK-1 gene make genomic sequencing a viable diagnostic test for HHT2. This was the only research about this subject made in Brazil so far.

# 1. INTRODUÇÃO

---

## **Telangiectasia Hemorrágica Hereditária**

### **1.1. Histórico**

A Telangiectasia Hemorrágica Hereditária (THH), ou Síndrome de Osler-Rendu-Weber (ORW) foi descrita primeiramente pelo médico inglês Henry Gawen Sutton em 1864 como uma alteração que se desenvolve com a epistaxe e degeneração do sistema vascular. Em 1865, Benjamin Guy Babington descreveu o caso de um paciente com epistaxe hereditária, sendo esta doença discutida mais tarde por John Wickham Legg (1876) e por Chiari (1887) que observaram a ocorrência familiar da doença, mas não foram capazes de distingui-la da hemofilia (Sadik *et al* 2006). Em 1896 Henri Rendu reconheceu, pela primeira vez, a combinação de epistaxe hereditária e telangiectasia como uma condição diferente da hemofilia. Ele fez uma descrição detalhada de um paciente com epistaxe recorrente e registrou a presença de múltiplas pintas hemangiomasas na face, tronco, lábios, língua e palato (Rendu, 1986).

Contribuições subsequentes para o conhecimento da doença surgiram nos trabalhos de William Bart Osler em 1901, o qual, pela primeira vez, descreveu completamente a doença enfatizando a natureza familiar através de três casos de pacientes, dois deles eram provenientes de uma família onde a epistaxe ocorria em sete membros. Em 1907 Frederick Parkes Weber seguiu com a descrição de casos de pacientes com múltiplos angiomas associados com hemorragia recorrente, o que levou à designação da doença de “Síndrome de Osler-Rendu-Weber”. Em 1909 Hanes criou o termo “Telangiectasia Hemorrágica Hereditária”, reconhecida pelas três características que definiram a doença: a epistaxe recorrente, telangiectasias e história familiar de quadros hemorrágicos (Fuchizaki *et al.*, 2003 (Sadick *et al.*, 2005 Sadik *et al.*, 2006).

## 1.2. Aspectos Epidemiológicos

A THH ocorre em uma ampla distribuição geográfica entre muitos grupos étnicos e raciais. A incidência global da THH na América do Norte foi estimada em aproximadamente 1 para cada 10.000 em pessoas nascidas vivas (Plauchu *et al* 1989; Marchuk *et al* 1998; Kjeldsen *et al.*, 1999), embora este número seja mais elevado em algumas regiões, como em Ain, na França, com 1:2.351 (Plauchu & Bideau, 1984), na ilha de Funen, na Holanda, com aproximadamente 1:3.500 (Vase & Grove, 1986), nas ilhas de Leeward (Caribe), foi de 1:5.155 (Jesserun *et al.*, 1993), na Dinamarca, com 1:5000 e Japão com 1:8000 (Dakeishi *et al.*, 2002) no estado de Vermont, nos Estados Unidos, com 1:16.500 (Guttmacher *et al.*, 1994; Guttmacher, dados não publicados), no norte da Inglaterra com 1:39216 (Porteous *et al.*, 1992) e 1:1331 em certas ilhas caribenhas nas Antilhas holandesas (Jesserun *et al* 1993).

A distribuição da THH é igual para ambos os sexos afetados, sendo que a herança de uma única cópia mutante é capaz de transmitir a doença aos seus descendentes, apesar da predominância caucasiana, há relatos da doença em todas as raças, incluindo asiáticos, árabes e africanos (Kjeldsen *et al* 2005).

A mortalidade da doença por complicações é de 10%, sendo a longevidade pouco afetada (Peery 1987). Kjeldsen e colaboradores (1999) descreveram um aumento na mortalidade entre pacientes THH jovens de 36% quando comparados com aqueles com mais de 60 anos (20%). Nos primeiros trabalhos descritos sobre o perfil epidemiológico da doença a relação foi de 6:100.000 pessoas o que ainda é aceito e citado por muitos autores até o momento (Kjeldsen *et al*, 1999).

### 1.3. Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas são secundárias a sangramentos, podendo afetar qualquer parte do organismo. Em 90% dos casos a epistaxe recorrente (sangramento nasal) é o sintoma mais comum, devido ao fato da mucosa nasal apresentar fragilidade capilar e ter maior acesso ao trauma direto e conseqüentemente ocorrem lesões espontâneas das telangiectasias presentes nas mucosas, superfície da língua, lábios, face, conjuntiva, orelhas e dedos (Edwards and McVaney, 2005). Cerca de 50% dos pacientes apresentam o primeiro episódio por volta dos 10 anos de idade e em 80 a 90% dos casos até os 30 anos (Byahatti et al 1997). A severidade da epistaxe acontece com o avanço da idade, com a gravidez e após a menopausa, devido aos níveis flutuantes de estrógeno na mucosa. Outros fatores que influenciam são: puberdade, menstruação e uso de anticoncepcionais orais, bem como estresse, álcool e mudança de temperatura (Haitjema et al, 1996, Aassar *et al.*, 1991, Guttmacher *et al.*, 1995).

A doença pode acometer outras regiões do organismo, como olhos, pele, pulmões, cérebro, sistema nervoso central, trato gastrointestinal e geniturinário. O otorrinolaringologista é geralmente o primeiro médico a prestar assistência, este deve estar apto a realizar o diagnóstico, para que o tratamento seja precocemente estabelecido evitando complicações (Plauchu et al 1989, Gluckman et al 1994 Edwards e McVaney, 2005).

As telangiectasias que acometem face, extremidades, conjuntiva e tronco, raramente levam a sangramento, sendo o tratamento basicamente estético e realizado com laser.

O comprometimento mucoso-cutâneo inclui telangiectasias maculares de 1 a 3 mm de diâmetro. A tabela abaixo mostra a ordem e frequência que as lesões ocorrem:

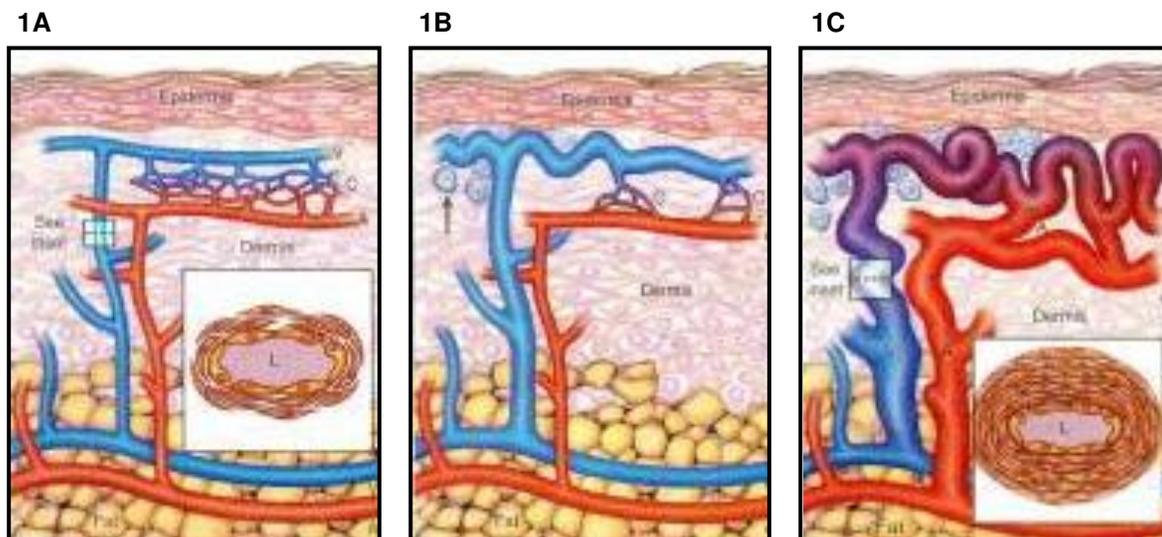
<b>Orgãos mais afetados na THH</b>		<b>Ordem de frequência</b>
<b>Nariz</b>	<b>68~100%</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Septo</li> <li>2. Corneto inferior</li> <li>3. Vestíbulo</li> <li>4. Assoalho da fossa</li> <li>5. Corneto médio</li> <li>6. Mucosa nasal posterior</li> </ol>
<b>Pele</b>	<b>~75%</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Face (63%)</li> <li>2. Mãos e punhos (37%)</li> <li>3. Tórax (8%)</li> <li>4. Pernas (3%)</li> <li>5. Pés (2,7%)</li> <li>6. Abdome (2,7%)</li> <li>7. Costas (2,4%)</li> <li>8. Pescoço (2,4%)</li> </ol>
<b>Cavidade Oral</b>	<b>58~79%</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Língua</li> <li>2. Lábios</li> <li>3. Gengiva</li> <li>4. Palato</li> <li>5. Mucosa jugal</li> <li>6. Orofaringe</li> </ol>
<b>Trato gastrointestinal</b>	<b>13~44%</b>	
<b>Pulmão</b>	<b>14~30%</b>	
<b>Olhos</b>	<b>16~35%</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Retina</li> <li>2. Conjuntiva</li> </ol>
<b>Cérebro</b>	<b>5~15%</b>	

#### **1.4. Evolução de telangiectasias cutâneas em THH**

As anormalidades da estrutura vascular na THH foram evidenciadas a partir da década de 70 com a utilização de microscopia eletrônica (Jahnke, 1970), mas foi somente em 1990 que Braverman e cols obtiveram um cenário mais preciso do

surgimento e evolução dessas lesões que são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. Analisando as telangiectasias sob microscopia óptica e eletrônica em vários estágios de sua evolução, foi observado que o estágio mais precoce da formação das telangiectasias iniciam-se com a dilatação das arteríolas e vênulas pós-capilares na derme com diâmetros de 1-2 mm formando um infiltrado monocitário ao seu redor (**Fig 1A**) os quais contêm na sua estrutura poucas camadas de músculo liso e praticamente ausência de fibras elásticas (**Fig 1B**). Com o desenvolvimento da lesão, as vênulas se tornam marcadamente dilatadas e preenchidas de sangue sem nenhuma função contrátil para drenar o sangue, fazendo com que a pressão do sangue passe para os capilares e arteríolas que também tem deficiência de fibra elástica, promovendo assim uma dilatação (Guttmacher *et al.*, 1995; Shovlin,1996; Shovlin, 1997). Desta forma, os capilares dilatados perdem sua forma original, transformando-se em fistulas arteriovenosas (**Fig 1C**) (Braverman *et al.*, 1990). A degeneração endotelial, os defeitos na função endotelial e a fragilidade do tecido conjuntivo perivascular são fatores que contribuem para a formação das telangiectasias (Guttmacher *et al.*, 1995). O mesmo mecanismo fisiopatológico de formação das telangiectasias mucocutâneas pode explicar a formação de lesões maiores, como fistulas/malformações arteriovenosas encontradas no pulmão, no trato gastrointestinal e cérebro de alguns pacientes. O tipo de lesão vascular causada pela doença encontrada no cérebro pode variar de pequenas telangiectasias a grandes malformações arteriovenosas, passando pela formação de aneurismas (Edwards and McVaney, 2005). O surgimento destas lesões depende de uma serie de fatores como falta de resistência capilar, a deficiência de fibras elásticas, a degeneração das fibras musculares das arteríolas, os defeitos nas

junções intercelulares do endotélio e a fragilidade do tecido perivascular que levam ao agravamento e prolongamento do sangramento (Harrison, 1982).



**Figura 1: Evolução da telangiectasia cutânea.** Na pele normal as arteríolas estão conectadas nas vênulas através de múltiplos capilares, os vasos apresentam diâmetro e forma normais, (a ultraestrutura de uma vênula poscapilar normal é mostrada no corte transversal no centro, incluindo o lúmen) (L) (1A). Num estágio ainda precoce da telangiectasia, uma única vênula torna-se dilatada e esta, está conectada com uma arteríola através de um ou mais capilares, há infiltrados linfocíticos perivascular aparente (na seta) (1B). Numa telangiectasia bem desenvolvida ocorre uma dilatação importante de vênulas, capilares e arteríolas na derme, com presença de infiltrado linfocítico perivascular. Arteríolas dilatadas comunicam diretamente com as vênulas sem intervenção capilar, a parede espessa da vênula (mostrada no corte transversal) contém várias camadas de célula do músculo liso. Há um aumento de diâmetro das vênulas e dos capilares com perda da forma e função (1C) (Adaptado por Harrison, 1982).

## 1.5. Diagnóstico

O diagnóstico da THH baseia-se na presença de pelo menos três das quatro principais características clínicas (critérios de Curaçau) além da avaliação clínica do

paciente e história familiar, no entanto essas características não ocorrem na totalidade dos casos: **1)** epistaxe espontânea recorrente; **2)** presença de telangiectasia mucocutânea, especialmente na cavidade oral, língua, boca, dedos e nariz; **3)** Malformações arteriovenosas (AVMs), incluindo pulmonar, cerebral, hepática e gastrointestinal; **4)** evidência de um padrão de herança autossômica dominante (parente de primeiro grau com THH); **5)** evidência de acometimento visceral (Plauchu et al 1989, Gluckman et al 1994, Kjeldsen et al 1999). Muitos autores estabelecem o diagnóstico de THH na presença de pelo menos duas destas manifestações e mais algum envolvimento visceral bem documentado.

Os exames laboratoriais são inespecíficos, pois na maioria dos casos, o tempo de coagulação, sangramento, protrombina e a contagem de plaquetas estão dentro da faixa de normalidade. A anemia observada nos pacientes com essa doença quase sempre é do tipo ferropriva, em consequência dos sangramentos. Os melhores métodos de diagnósticos complementares são a angiografia, tomografia computadorizada helicoidal de alta resolução, angiografia raios-X e a endoscopia digestiva. Os diagnósticos diferenciais dependem dos órgãos mais acometidos pela doença. As manifestações clínicas da THH são altamente heterogêneas entre as famílias, bem como dentro da mesma família, acredita-se que fatores genéticos e epigenéticos estão envolvidos na diversidade clínica da THH (Sabba et al 2005).

As três características clássicas descritas há mais de um século (epistaxe, telangiectasias, ocorrência familiar) ainda permite um diagnóstico confiável e relativamente simples, baseando-se apenas na história clínica e exame físico.

Para casos duvidosos pode ser útil aplicar os critérios diagnósticos para THH estabelecidos pelo comitê científico da HHT Foundation Institute em 1999, conhecidos como critérios de Curaçau.

<b>Crítérios de Curaçau (1999)</b>	
1. Epistaxe	Sangramentos nasais recorrentes
2. Telangiectasias	Múltiplas, em regiões características: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lábios</li> <li>• Cavidade oral</li> <li>• Dedos</li> <li>• Nariz</li> </ul>
3. Lesões Viscerais	Tais como: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Telangiectasias gastrointestinais</li> <li>• MAV's pulmonares</li> <li>• MAV's do SNC</li> </ul>
4. Historia Familiar	Parente de 1º grau com THH de acordo com estes critérios
<b>O Diagnostico de THH é:</b> Definitivo Possível/Suspeito Improvável	Se 3 critérios estão presentes. Se 2 critérios estão presentes. Se menos de 2 critérios estão presentes

## 1.6. Tratamento

O tratamento inclui ressecção cirúrgica, ligadura arterial e embolização. O objetivo do tratamento é promover o controle da doença o maior tempo possível, com o mínimo de intervenções, tentando evitar sequelas (Rebliz et al 1995). Alguns episódios de sangramento agudo podem ser controlados por compressão manual, tamponamento nasal anterior e/ou posterior, bem como cauterizações. A cauterização, quando utilizada repetidas vezes, pode levar à necrose, sinéquias e até mesmo perfuração septal (Pau et al 2001). Para sangramentos mais intensos, dispõe-se de embolização e ligadura

arterial, que geralmente apresentam bons resultados em curto prazo. Porém, estes métodos tornam-se inefetivos a partir do momento em que a circulação colateral se reestabelece na mucosa nasal, o que geralmente ocorre, pois a doença apresenta caráter persistente. Outras opções de tratamento incluem o uso do ácido aminocapróico, terapia estrogênica, fotocoagulação a laser, bem como braquiterapia intranasal com irídio 192 ( $^{192}\text{Ir}$ ) (Rebliz et al 1995).

A terapia estrogênica leva à metaplasia escamosa do epitélio nasal, o que previne traumas locais e sangramentos, entretanto apresenta efeitos colaterais, tais como: efeitos feminilizantes em homens e aumento do risco de câncer endometrial na pós-menopausa em mulheres (Gluckman and Portugal, 1994).

A cauterização a laser pode substituir a química, e vem se mostrando efetiva da THH moderada, principalmente quando combinada a septodermoplastia (Gluckman et al 1994, Pau et al 2001). Em epistaxes severas e crônicas são citados a septodermoplastia, a técnica de Young modificada e retalhos cutâneos e miocutâneos. A septodermoplastia é considerada padrão ouro de tratamento, quando todas as outras formas foram inefetivas. A técnica consiste em remoção da mucosa do septo nasal, sendo substituída por um fino enxerto de pele. Esse procedimento promove melhora temporária dos sintomas, devido ao reaparecimento de teleangiectasias no próprio retalho. O uso de membrana amniótica na cirurgia tem mostrado algum sucesso (Ulso et al 1983, Pau et al 2001, Gluckman et al 1994).

## 1.7. Aspectos Genéticos e Moleculares

A Telangiectasia Hemorrágica Hereditária THH é uma desordem vascular multissistêmica, transmitida sob padrão de herança autossômica dominante, por isso, os indivíduos afetados são heterozigotos já que a forma homozigota é considerada letal. Tanto a THH tipo 1 quanto a tipo 2 são altamente penetrante (<90% por volta dos 40 anos; 97% por volta dos 60 anos (Plauchu et al, 1989).

Acredita-se que a THH seja marcada por uma heterogeneidade genética, ou seja, genes em loci e cromossomos diferentes expressando o fenótipo da doença em diferentes pacientes. Essa hipótese está baseada no estudo genético de diferentes famílias com THH, nas quais foram possíveis a identificação de genes distintos envolvidos na patogênese da doença. O ponto comum entre esses genes é que todos eles parecem codificar a mesma proteína relacionada ao mecanismo de ação do fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) que está diretamente envolvido no crescimento, reparo, diferenciação e remodelamento dos vasos sanguíneos (Lamouille et al, 2002).

Ate o momento quatro genes diferentes foram identificados como responsáveis pela THH (THH tipo 1, THH tipo 2, THH tipo 3 e THH tipo 4), sendo a THH tipo 2 a mais frequente. Ambas mutações em genes que codificam proteínas transmembrana envolvidas na via de sinalização do fator de crescimento de transformação (TGF- $\beta$ ) são predominantemente expressas no endotélio vascular (Cole, 2005).

O gene responsável pelo desenvolvimento da THH tipo 1 (ORW1) é o gene da endogлина (ENG) uma glicoproteína de membrana do endotélio vascular de 180 kD

mapeado no braço longo do cromossomo 9 (9q33-34) constituído por 15 exons sendo que o exon 9 se divide em 9A e 9B (Figura 3). A endoglina é uma proteína auxiliar de transmissão de sinais do exterior ao interior das células do complexo TGF- $\beta$ , é expressa nas células endoteliais, especialmente nas membranas de arteríolas, vênulas e capilares, funcionam como receptor tipo 1 para TGF  $\beta$  (McAllister et al, 1994a). O TGF- $\beta$  é uma proteína que controla a proliferação, diferenciação celular e outras funções na maioria das células (Lebrin et al 2005).

O segundo gene responsável pela THH (tipo 2) é o gene da activina (ORW2 ou ALK-1) que se encontra no braço curto do cromossomo 12 (12q11-q14) e codifica outro receptor para o TGF $\beta$  (receptor tipo II) (Johnson et al, 1995).

O terceiro gene envolvido na THH (THH3) foi identificada em 2005 por Cole e colaboradores através do estudo de análises de ligação de um novo locus mapeado no cromossomo 5q31.3-q32.

Como os dois primeiros genes (ALK1 e ENG) identificados codificam proteínas envolvidas na sinalização da superfamília de TGF- $\beta$ , o gene responsável pela THH3 também codifica uma proteína envolvida na sinalização Smad/TGF- $\beta$  em conformidade com os padrões de expressão de ENG e ALK-1 que são proteínas transmembranas predominantemente expresso em células endoteliais vasculares (Marchuk et al, 2003).

O quarto gene da telangiectasia (THH4) foi recentemente identificada por Bayrak-Toydemir e colaboradores (2006) dentro de uma região de 7Mb no cromossomo 7p14. Esta região foi confirmada pela análise de haplótipos, as características das famílias estudadas eram epistaxe recorrente, telangiectasias mucocutâneas, PAVMs e

CAVMs, sendo que um membro da família do sexo feminino apresentava hipóxia sintomática, múltiplas PAVMs tratada com embolização transcater, sugerindo fortemente a presença de uma displasia vascular multisistêmica hereditária. Notaram que a frequência e a severidade da epistaxe nesta família foi menor que aquelas tipicamente observadas em outras formas de THH.

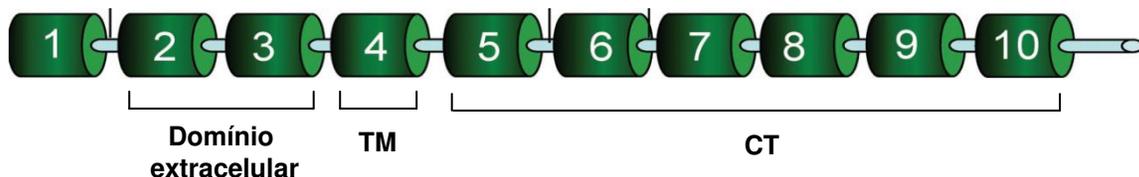
Todos os tipos resultam no desenvolvimento de vasos sanguíneos anormais incluindo telangiectasias na mucosa oral, nasal, trato gastrointestinal e malformação arteriovenosa visceral (AVMs). Há uma diferença sutil entre os fenótipos THH1 e THH2, pacientes THH2 apresentam pouca AVMs pulmonar e o fenótipo THH é mais brando, mas carregam um alto risco de desenvolver THH relacionada com hipertensão arterial pulmonar (McDonald et al 2000).

Clinicamente, ambos os tipos THH1 e THH2 são indistinguíveis apesar de alguns estudos terem demonstrado uma baixa penetrância do gene ALK-1 (activin receptor-like kinase 1) com uma manifestação tardia da THH2, enquanto que em THH1 há uma elevada frequência de malformação arteriovenosa pulmonar (MAVPs) (Berg *et al.*, 1997; Oliviere *et al.*, 2002). Além disso, a predominância de THH1 ou THH2 parece estar correlacionada com a localização geográfica, enquanto que a THH1 é mais abundante na América do Norte, Canadá e na população do norte da Europa (Abdalla *et al* 2000; Oliviere *et al* 2002; Letteboer *et al* 2005). A THH2 é predominante nos países do mediterrâneo como Itália, França e Espanha (Lastella *et al.*, 2003; Lesca *et al.*, 2004; Fernandez *et al.*, 2006).

## 1.8. O gene da activina (ALK-1)

As activinas (*ALK1/ACVRL1* locus activin receptor-like kinase 1) são um grupo de receptores transmembrana serina/treonina-quinase que compreende sete membros (ALK1-7) pertencentes à superfamília TGF- $\beta$  que são proteínas sinalizadoras (ten Dijke *et al.*, 1993).

A região codificante do gene ALK-1 está dentro de uma região de 9 éxons num espaço de 15 kb no DNA genômico (Berg *et al* 1997). O gene ALK1 é um receptor tipo I transmembrana para TGF- $\beta$ , com um domínio extracelular rico em cisteína e um domínio intracelular tipo serina/treonina quinase (Figura 2, tabela I).

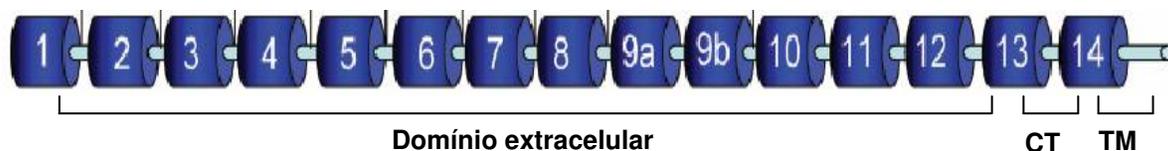


**Figura 2: Representação diagramática do gene ALK-1.** (EC - Domínio extracelular; TM – domínio transmembrana; CT – domínio citoplasmático). Os éxons são os cilindros verdes (numerados 1-10) para a região codificante e as barras entre os exons representam os introns regiões não codificantes. Os números nos éxons estão representados em números arábicos. Mais de 100 mutações têm sido descritas no gene ALK-1 com predominância de mutações “missense” no domínio quinase intracelular (éxons 7 e 8). A tabela das mutações discriminadas encontra-se em anexo (Adaptado por Abdalla and Letarte, 2006).

## 1.9. A Endogлина (ENG)

A endogлина é uma glicoproteína homodimérica integral de membrana expressa em altos níveis em células endoteliais de capilares, arteríolas e vênulas (Gougos &

Letarte, 1990). A endogлина liga-se com alta afinidade ao TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 3. Em células endoteliais a endogлина é a proteína mais abundante ligada ao TGF- $\beta$  (Cheifetz *et al.*, 1992). Na presença do ligante TGF- $\beta$ , a endogлина pode associar-se com receptores I e II (RI; RII) para iniciar uma resposta capaz de estimular o TGF- $\beta$ . O gene da endogлина compreende 14 éxons, no entanto alguns deles são suficientemente pequenos para permitir a amplificação da PCR como mostra a figura 3, tabela II.



**Figura 3: Representação diagramática do gene ENG.** (EC – Domínio extracelular; TM – domínio transmembrana; CT – domínio citoplasmático). A região codificante de ENG está dentro de 14 éxons, marcados pelos cilindros azuis, no intervalo entre os éxon estão os íntrons. Dos 14 éxons o 1º, 3º, 8º e 9º são muito pequenos para permitir amplificação por PCR. As mutações associadas ao THH1 têm sido mostradas nos 12 primeiros éxons correspondendo ao domínio extracelular (Adaptado por Abdalla e, Letarte, 2006).

### 1.10. Modelo Animal

A utilização de modelos animais em pesquisas vem sendo realizada desde a antigüidade para estudo das mais diversas doenças humanas. Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos com a utilização de modelos animais para THH (Li et al 1999, Bourdeau et al 2001, Srinivasan et al 2003, Torsney et al 2003).

Em 1999, Li *e cols*, produziram camundongos deficientes para endogлина e foi observado que camundongos heterozigotos Eng<sup>+/-</sup> apresentam uma sobrevivência normal

enquanto que camundongo *Eng*<sup>-/-</sup> morrem no 11º dia de gestação, além de apresentarem ausência de organização vascular, falha no remodelamento endotelial, cardíaco e formação de musculatura lisa. Em camundongos deficientes em TGF- $\beta$  a vasculogênese não foi afetada mesmo sabendo que a endogлина é essencial para a angiogênese sugerindo assim, um mecanismo patogênico para THH1 (Bourdeau et al 2001).

Foi observado que animais deficientes de endogлина, TGF- $\beta$ 1 e receptor II, morrem no 11º dia de gestação mostrando pouco desenvolvimento da musculatura lisa vascular e uma interrupção na remodelação endotelial. Camundongos deficientes de TGF- $\beta$ 1 morrem após o nascimento com doenças inflamatórias severas. Camundongos *ENG/ALK-1*<sup>-/-</sup> morrem no 10º dia com defeito no desenvolvimento vascular e cardíaco, por outro lado camundongo *ENG/ALK-1*<sup>+/-</sup> apresenta sinais da doença, como epistaxe recorrente e telangiectases (Kulkarni *et al.*, 1993); Li *et al.*, 1999; Srinivasan et al 2003).

### **1.11. Fator de Crescimento Transformante-beta - TGF- $\beta$**

O TGF- $\beta$  é uma proteína multifuncional de 25kDa que está envolvida em diversos processos biológicos incluindo proliferação celular, adesão, diferenciação hematopoiética fatores de crescimento transformantes, activinas e proteínas morfogenéticas ossea (BMPs). Vários trabalhos têm demonstrado a importância do TGF- $\beta$  na complexa cascata de eventos que leva a formação de vasos sanguíneos. Sua sinalização é requerida no primeiro estágio do desenvolvimento vascular, a vasculogênese, quando as primeiras redes de capilares primárias são formadas e

interconectam. O segundo estágio do desenvolvimento vascular é a angiogenese que envolve a remodelação da rede endotelial primária no sistema circulatório primário, onde o TGF- $\beta$  modula vários processos em células endoteliais incluindo migração, proliferação, adesão, organização e composição da matriz extracelular (Lebrin et al 2005; Dean *et al.*, 1999; Sabaà *et al.*, 2001, Attisano *et al.*, 1993; Cárcamo *et al.*, 1994; Bourdeau *et al.*, 2001; Shovlin, 1996; Mathews, 1994; Miyazono *et al.*, 1994).

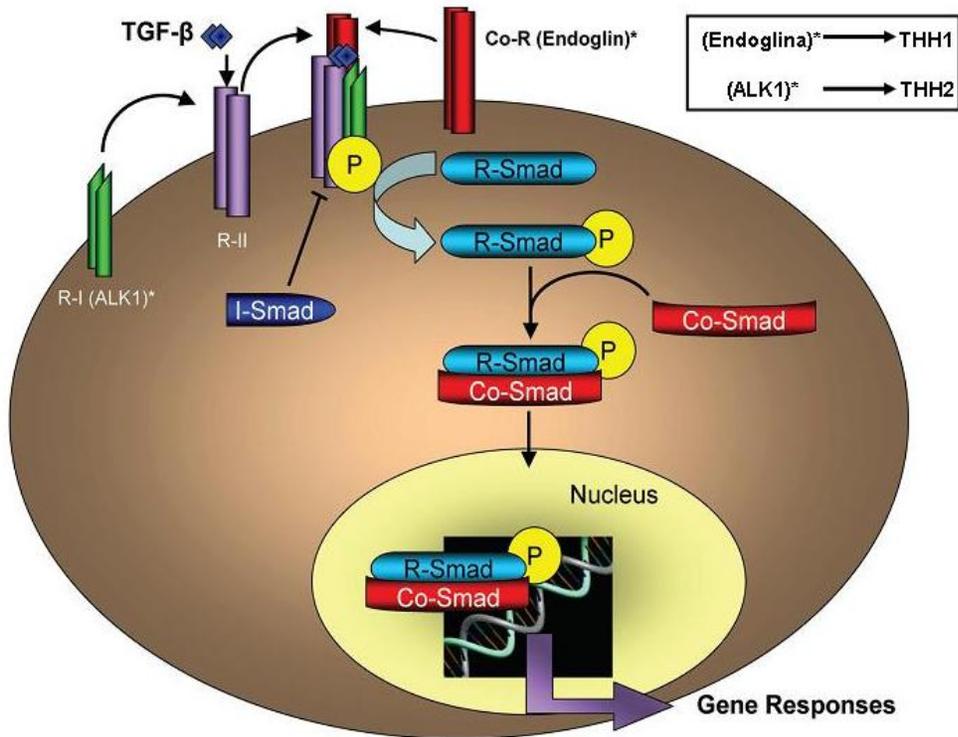
### **1.12. Via de sinalização TGF- $\beta$**

A sinalização do TGF- $\beta$  é mediado pela família de receptores quinase serina/treonina tipo I de 53kDa e tipo II de 75 kDa. A sinalização do TGF- $\beta$  ocorre via formação de complexos heteroméricos consistindo de receptores tipo I e II. O TGF- $\beta$  liga-se com alta afinidade ao receptor tipo II resultando no recrutamento do receptor tipo I (ALK), para formar o complexo receptor-ligante. Sob dimerização, o receptor tipo II fosforila o receptor tipo I no cluster de glicina e nos resíduos de serina presentes próximos a membrana, conhecidos como domínio GS. Uma interrupção na sinalização TGF- $\beta$  implica em várias doenças humanas (Massague, 1998, Itoh et al, 2000).

Foram descritos três classes de receptores de ligantes TGF- $\beta$ , os de tipo I (ALK-1 e 5), os do tipo II (T $\beta$ RII) e os do tipo III (endoglina e betaglicano) (Lebrin, et al., 2005).

Tanto o receptor tipo I como o receptor tipo II contém um domínio serina treonina quinase em sua porção intracelular. Os receptores tipo I (ALKs 1 e 5) não podem se ligar ao receptor tipo II se este não estiver ativado (Attisano *et al.*, 1992).

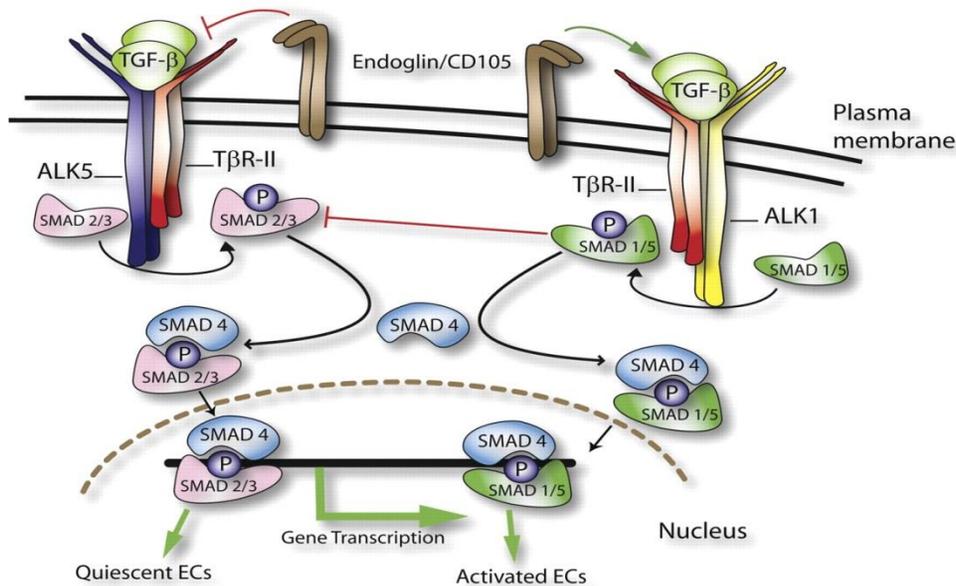
Um dos caminhos de sinalização é ativado por membros da superfamília TGF- $\beta$  envolvendo as proteínas Smad (Figura 4), que desempenham um papel fundamental na transmissão dos sinais da superfamília TGF- $\beta$  da superfície da célula para o núcleo. Elas são as principais moléculas de sinalização que atuam abaixo do receptor serina treonina kinase (Miyazono *et al.*, 2001). As Smads são classificadas em três subclasses de acordo com as diferenças nas suas funções: os receptores Smads (R-Smads), as Smads colaboradoras (Co-Smads), e as Smads inibidoras (I-Smads). As R-Smads são divididas em duas subclasses: Smad2 e Smad3, as quais são ativadas pelas activinas e pelo receptor tipo I, o qual é ativado por TGF- $\beta$  ou ALK-4, 5 e 7. As Smad1, Smad5 e Smad8 são ativadas pelo receptor tipo I, o qual é ativado por BMP ou ALK-3 ou ALK-6. As Smads 1 e 5 são também ativadas por ALK-1 e 2, embora elas sejam menos parecidas com ALK-3/6 do que com as ALK-4/5/7 (Chen *et al* 1996, Itoh *et al* 2001).



**Figura 4: Sinalização do TGF-β** - No espaço extracelular o TGF-β liga-se diretamente ao receptor II (RII) o qual recruta o receptor tipo I (ALK-1) formando um complexo heteromérico na superfície celular. Estes complexos contêm uma endoglina receptora auxiliar que também se liga a este complexo e fosforila o receptor I (RI). O receptor I ativado transmite sinal direto para o núcleo através da família de proteínas co-ativadoras Smad. O RI fosforila a R-Smad, a qual se associa com uma Co-Smads. O complexo resultante R-Smad/Co-Smad move-se do citoplasma para o núcleo para se associar ao DNA no núcleo da célula e interagir com vários outros fatores de transcrição para regular a transcrição do gene e mediar os efeitos de sinalização para superfamília de receptores em resposta a TGF-β. A R-Smad é um receptor dependente de Smad; I-Smad é uma Smad inibitória; Co-Smad é uma Smad colaboradora; ALK1 é um receptor tipo I em THH2; Endoglina é um receptor auxiliar para TGF-β em THH1 (Adaptado por Fernández-L, 2006).

### **1.13. Equilíbrio entre TGF- $\beta$ /ALK 1 e TGF- $\beta$ /ALK5 em células endoteliais**

A existência de dois caminhos ativados pelo mesmo ligante foi demonstrada por Goumans, et al., 2003, (Figura 5) onde células endoteliais deficientes de ALK-5 foram incapazes de responder para ambos TGF- $\beta$ /ALK5 e TGF- $\beta$ /ALK1, demonstrando que a atividade kinase de ALK5 é essencial para ativação de ALK1 e que ambas são necessárias para a sinalização de TGF- $\beta$  em células endoteliais. Embora ALK1 e ALK5 possam induzir resposta celular oposta: com a ligação TGF- $\beta$ /ALK1 ocorre a migração e proliferação de células endoteliais, enquanto que a ligação TGF- $\beta$ /ALK-5 inibe esses efeitos e promove a deposição de matriz extracelular (Figura 5). Estes dois efeitos correspondem as duas fases distintas do processo angiogênico: quiescência (ausência de proliferação, deposição da matriz extracelular recrutamento das células do músculo liso e estabilização dos vasos) versus ativação do endotélio (proliferação e migração das células endoteliais para formar novos vasos) (Figura 5), este antagonismo é exercido a nível molecular via R-Smad (Massagué, 1998, Attisano et al 1993, Lin et al 2002).



**Figura 5:** Sinalização dos receptores tipo I TGF-  $\beta$ /ALK1 e TGF-  $\beta$ /ALK5 em célula endoteliais (adaptado por Fonsatti, 2003). ALK1 e endoglina estão contribuindo na via de sinalização de TGF- $\beta$ /Smad, mantendo assim o nível de endoglina para satisfazer as necessidades fisiológicas das células endoteliais. A falha na sinalização cooperativa em HHT1 e HHT2 seja endoglina ou ALK1 tem como resultado, a expressão da endoglina abaixo de um limiar crítico levando a deficiência na sinalização do TGF- $\beta$ , formação do citoesqueleto anormal e formação do tubo em células endoteliais em THH. Estas funções celulares endoteliais alteradas podem explicar o fenótipo THH. Adaptado de Fernández et al, 2006.

#### 1.14. Justificativa

A telangiectasia hemorrágica hereditária é uma doença rara ainda não foi estudada na população brasileira. As manifestações clínicas da THH são epistaxis recorrente, telangiectasia cutâneo-mucosa da face, das mãos e da cavidade oral são os sintomas clínicos mais frequentes, além do trato gastrointestinal e a associação com lesões cerebrais e pulmonares vem se tornando fonte crescente de morbidade e mortalidade.

O diagnóstico da THH é realizado pela história clínica de sangramento recidivos, história familiar de quadros hemorrágicos e presença de lesões telangiectásicas múltiplas. As anormalidades vasculares no trato gastrintestinal e hepático, pulmão, circulação e cerebral são investigadas por no mínimo um método diagnóstico objetivo semelhante à endoscopia, ultrassom e/ou tomografia computadorizada ressonância magnética e a angiografia.

Em função disso as análises moleculares para identificação de mutações nos genes ALK-1 e ENG contribuirá para um diagnóstico precoce da doença analisar se existe uma correlação entre a gravidade da doença com as possíveis alterações moleculares, baseado nesta relação propor uma terapêutica que possa melhorar o estado clínico do paciente.

## **2. OBJETIVOS**

---

1. Caracterizar as bases moleculares da Telangiectasia Hemorrágica Hereditária nos pacientes brasileiros, por meio de estudos da região codificadora dos genes da activina (*activin receptor like kinase -ALK-1*) e endogлина (ENG).
2. Correlacionar à presença de mutações nos genes ALK-1 e ENG com as características clínicas da THH tipo 1 e tipo 2.

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

---

## **CASUÍSTICA**

### **3.1. Pacientes e controles**

Foram analisadas 10 famílias com telangiectasia hemorrágica hereditária diagnosticadas e acompanhadas no Hemocentro da UNICAMP, sendo que o diagnóstico da THH foi realizado pela história clínica de sangramento recidivos, história familiar de quadros hemorrágicos e presença de lesões telangiectásicas múltiplas. As anormalidades vasculares no trato gastrintestinal e hepático, pulmão, e circulação cerebral foram investigadas por, no mínimo, um método diagnóstico objetivo semelhante à endoscopia, ultrassom e/ou tomografia computadorizada. As amostras de DNA foram extraídas de sangue periférico. Os pacientes acompanhados tinham em média 77 anos (as idades variaram de 2 dias a 82 anos), 5 deles pertenciam ao sexo masculino e 5 ao sexo feminino. Os pacientes eram provenientes do norte e sul do estado de São Paulo. Os dados clínicos dos pacientes encontram-se resumidos na Tabela III.

Foi realizada uma triagem em 126 indivíduos sadios a procura das mutações identificadas nos pacientes.

### **3.2. Aspectos éticos**

O Projeto intitulado “ Alterações moleculares nos genes da activina (activin receptor-like kinase-1-ALK-1) e endogлина (ENG) em telangiectasia hemorrágica hereditária dos tipos 1 e 2” foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP - CEP em 17/10/2003 e aprovado em

25/03/2004 (registro CEP: 494/2003). Foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) em 25/03/2004 (registro CONEP: 9663), parecer no 527/2004 segundo as determinações do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96 e 251/97).

Todos os pacientes envolvidos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os TCLEs para este estudo contêm justificativa, os objetivos e os procedimentos da pesquisa, os desconfortos e riscos possíveis e benefícios esperados, a garantia do sigilo que assegure a privacidade quanto aos dados confidenciais; a liberdade de abandonar a pesquisa em qualquer tempo sem ter sua assistência médica comprometida, o nome e telefone dos pesquisadores para esclarecer eventuais dúvidas, bem como o telefone do Comitê de Ética em Pesquisa (Anexos 1-4).

## **MÉTODOS**

### **3.3. Extração de DNA**

Foram colhidos 10ml de sangue periférico em frasco estéril, com anticoagulante EDTA 10%. A amostra foi centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos. Após o descarte do plasma, os eritrócitos foram lisados com uma mistura das soluções de cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 0,144 M (cinco vezes o volume de células) e bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 0,01M (0,5 vez o volume de células). O hemolisado foi centrifugado por 20 minutos a 2500 rpm, e o sobrenadante foi removido e o precipitado de leucócitos foram lisados com lavagens de solução TKM1 (Tris-HCl 10mM (pH=7,6); KCl 10mM;  $\text{MgCl}_2$

10mM e EDTA 20mM), sendo centrifugados por 10 minutos a 2.500 rpm, por duas vezes consecutivas, quando foi adicionado, aproximadamente, 3 gotas de Triton X-100 (nuclear), na primeira lavagem. A segunda lavagem não continha nenhum desses dois últimos especificados; o sobrenadante foi descartado e após essa etapa, foi acrescentada, ao precipitado, a solução TKM2 (0,8ml da solução contendo Tris-HCl 10mM (pH=7,6); KCl 10mM; NaCl 0,4 M; MgCl<sub>2</sub> 10mM; EDTA 2 mM; 0,025ml de duodecil sulfato de sódio (SDS) 20%. Em seguida o material foi incubado durante 40 minutos a uma temperatura de 56°C e então foi adicionado 0,3 ml de NaCl 5M. Nessa etapa o precipitado foi descartado e o sobrenadante transferido para um tubo estéril.

Ao sobrenadante foi adicionado 4,0 ml de etanol absoluto gelado (EtOH), ocorrendo a precipitação do DNA. O precipitado foi lavado em 1,0 ml de álcool 70% gelado e a seguir foi centrifugado. Descartado o sobrenadante, o DNA precipitado foi seco a temperatura ambiente e solubilizado em água destilada, deionizada e estéril (dH<sub>2</sub>O); sendo deixado por 8 horas em banho-maria a 37°C, ou levado a uma temperatura de aproximadamente 4°C, por 16 horas e sua concentração foi estimada em espectrofotômetro, por meio do valor da densidade óptica em comprimento de onda de 260 nm. (Sambrook, Fritsch, Maniats, 1989).

### **3.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A reação em cadeia da polimerase seguiu o método descrito por Saiki *et al.* (1985 e 1988) com algumas modificações. A orientação dos “primers” (segmentos de 20 - 30 nucleotídeos) faz com que a síntese do DNA ocorra na região interna entre eles. Desse modo, o produto da extensão de um “primer” é utilizado como substrato para o

outro, o que resulta em cada ciclo, na duplicação da quantidade de DNA sintetizada no ciclo precedente. Assim, o número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial, o que faculta no final de 30 ciclos um aumento da ordem de  $10^6$  cópias, partindo-se de uma única célula (SAIKI *et al.*, 1985). A reação em cadeia da polimerase (PCR) (Kary Mullis *et al.*, 1988) foi realizada para a amplificação dos diferentes éxons do gene ALK-1 e endogлина. Para isso utilizou-se 0,5 $\mu$ l de DNA genômico (100ng), 5pmoles de cada “primer” (Shimizu *et al.*, 2001), 200 $\mu$ M da mistura de nucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), tampão da enzima 10X (50 mM de cloreto de potássio, 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) e 0,02 unidades de Taq DNA polimerase em um volume final de 15 $\mu$ l.

Cada ciclo de reação de amplificação consiste na desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos (1 ciclo), desnaturação à 94°C por 45 segundos, anelamento a 57°C por 45 segundos, extensão à 72°C por 1 minuto (35 ciclos), e extensão final à 72°C por 7 minutos (1 ciclo), em termociclador “DNA Thermal Cycler” (Perkin Elmer Cetus). As sequencias dos “primers”, tamanho do fragmento amplificado e respectivas temperaturas de anelamento encontram-se na tabela I e II. Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e visualizados em iluminação ultravioleta.

**Tabela I:** Sequências de oligonucleotídeos, condições de anelamento e tamanho dos amplicons para o gene ALK-1.

ALK-1 Éxon	Sequências				Temperatura aneling (°C)	Referencia	PCR (bp)
	Sense (S)		Anti-sense (AS)				
	5'	3'	5'	3'			
II	CTCTGTTTTCTCTGGGCA		TACATTCTCCCCAGCTTCTCAA		57	Berg et al., 1997	266
III	AGCTGGACCACAGTGGCTGA..		GGAGGCAGGGGCCAAGAAGAT		55	Berg et al., 1997	345
IV	AGCTGACCTAGTGAAGCTGA		CTGATTCTGCAGTTCCTATCTG		56	Berg et al., 1997	318
V	AGGAGCTTGCAGTGACCCAGCA		ATGAGAGCCCTTGGTCCTCATCCA		55	Berg et al., 1997	242
VI	AGGCGCGCAGCATCAAGAT		AAACTTGAGCCCTGAGTGCAG		55	Berg et al., 1997	294
VII	TGACGACTCCAGCCTCCCTTAG		CAAGCTCCGCCCCACCTGTGAA		55	Berg et al., 1997	388
VIII	AGGTTTGGGAGAGGGCAGGAGT		GGCTCCACAGGCTGATTCCCCTT		55	Berg et al., 1997	293
IX	TCCTCTGGGTGGTATTGGGCCTC		CAGAAATCCCAGCCGTGAGCCAC		55	Berg et al., 1997	256
X	TCTCCTCTGCACCTCTCTCCAA		CTGCAGGCAGAAAGGAATCAGGTGCT		55	Berg et al., 1997	197

**Tabela II:** Sequências de oligonucleotídeos, condições de anelamento e tamanhos do amplicons para o gene da endoglina (ENG).

ENG Éxon	Sequencias				Temperatura aneling (°C)	Referencia	PCR (bp)
	Sense(S)		Anti-sense (AS)				
	5'	3'	5'	3'			
I	-		-		-		>67
II	CCTCATAAGGTGGCTGTGATGATG		CATCTGCCTTGGAGCTTCTCT		60	McAllister et al., 1994	341
III	-		-		-		-
IV	TTCCTGACCTCCTACATGG		CTCTTGGTGCCCAAGTTT		51	McAllister et al., 1994	331
V	GGGCTCTGTTAGGTGCAG		GGGTGGGGCTTTATAAGGGA		57	McAllister et al., 1994	325
VI	CTGTCCGCTTCAGTGTTCATC		GGAAACTTCCCTGACCAGAGGTT		59	McAllister et al., 1994	234
VII	GAGGCCTGGCATAACCT		GTGGCCACTGATCCAAGG		60	McAllister et al., 1994	315
VIII	-		-		-	-	-
IX	-		-		-	-	-
X	AGATTGACCAAGTCTCCCTCCC		AGGCTGTCTCCCTCCTGACTCT		61	McAllister et al., 1994	268
XI	ACTCAGGGGTGGGAACCTTT		CCTTCCATGCAAACCACAG		57	McAllister et al., 1994	436
XII	GAGTAAACCTGGAAGCCGC		GCCACTAGAACAAACCCGAG		55	McAllister et al., 1994	154
XIII	CCAGCACAAACAGGGTAGGGGAT		CTCAGAGGCTTCACTGGGCTCC		61	McAllister et al., 1994	255
XIV	TGAAGCCTCTGAGGGATTGAGG		GAGTTCACACCAGTGCTCCAG		57	Gallione et al., 1998	198

### **3.5. PCR-CSGE para rastreamento de mutações no gene ALK-1 e endogлина**

O método de CSGE (“Conformation Sensitive Gel Electroforesis”), descrito por Ganguly e cols (1993) e posteriormente modificado por Willians e cols (1995), é baseado na eletroforese que detecta a sensibilidade conformacional da molécula de DNA. Podem ser observadas as diferenças conformacionais quando dois alelos apresentam alterações na sequência de nucleotídeo. Foi utilizado para o rastreamento de mutações no gene ALK-1 e no gene endogлина. Para isso, foi utilizado um aparato padrão para sequenciamento de DNA, com placas de vidro de 37,5 x 45 cm e um pente de 36 poços de 1mm de espessura. Uma solução estoque de 39,6g de acrilamida e 0,4g de 1,4-Bis (acryloyl)-piperazina (BAP; Fluka) foi preparada em 100 ml de água deionizada e usada para preparar um gel de poliacrilamida 40% contendo 10% (vol/vol) de etileno glicol (Sigma) e 15% (vol/vol) de formamida (Gibco/BRL) em tampão Tris-Taurina-EDTA (TTE) 1X (89mM Tris/15mM tampão Taurina/0,5mM EDTA, pH 9,0; United States Biochemical). O tampão de corrida empregado foi Tris-Taurina-EDTA 1/20 no polo negativo e 1/80 no polo positivo. Antes da eletroforese, 20µl de cada amostra foram aquecidos a 98°C por 5 minutos, seguidos de incubação a 68°C por 1 hora, para a formação de heteroduplexes. Misturou-se 5µl da amostra com 5µl de tampão de corrida (etileno glicol 20% (vol/vol), formamida 30% (vol/vol) contendo xilenocianol e azul de bromofenol 0,25% cada).

Foi realizada uma pré-corrida a 300 Volts por 15 minutos, e em seguida as amostras foram aplicadas e submetidas à eletroforese 300V por 16 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo 1µg/ml, por 15 minutos. Os

produtos foram visualizados sob luz ultravioleta. A análise dos genes ALK-1 e endogлина por PCR/CSGE foi realizada em amostras de DNA extraído de 12 pacientes (HHT), rastreando-se 9 éxons (2 a 10) do gene da activina (ALK-1) e 2 a 14 no gene da endogлина. Para cada mutação foi utilizado o método de triagem (CSGE) num painel de 126 indivíduos controles normais para definir se estas mutações não representariam polimorfismos gênicos neutros na população estudada. Nenhuma das mutações foi encontrada.

### **3.6. Reação de Seqüenciamento com Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit**

- **Purificação do produto da PCR**

O produto do PCR foi purificado com 1 $\mu$ l da enzima éxonuclease e 1 $\mu$ l de fosfatase alcalina de camarão, em seguida incubado por 15 minutos à 37<sup>o</sup> C e 15 minutos à 85<sup>o</sup>C. Em tubos denominados G, A,T,C foram colocados 2 $\mu$ l do nucleotídeo máster mix (dITP) e 0,5 $\mu$ l de ddNTP (G, A, T, C) marcado com fósforo 33 ( $\alpha$  33PddNTPs) (Amersham Phamacia).

Em outro tubo coloca-se 1 $\mu$ l do produto da PCR tratado, 2 $\mu$ l do tampão de reação (260 mM Tris-HCl, pH 9,5, 65mM MgCl<sub>2</sub>), 1 $\mu$ l do primer (5 pmol), 2 $\mu$ l da enzima Thermo Sequenase DNA polimerase e água para completar 17,5 $\mu$ l. Foram transferidos para cada tubo com dideoxynucleotídeo (G, A,T, C) 4 $\mu$ l dessa mistura, homogeneizando-se com os 2,5 $\mu$ l da mistura de terminação. As reações foram colocadas em termociclador de temperatura e submetidas a uma pré-desnaturação de 5 minutos a 94<sup>o</sup>C, 35 ciclos envolvendo desnaturação a 94<sup>o</sup>C por 30 segundos, anelamento (de

acordo com as temperaturas descritas nas tabelas I e II) por 30 segundos e extensão a 72°C por 01 min. A reação foi interrompida pela adição de 4µl de "Stop Solution" (formamida 95%, EDTA 20 mM, 0,05% azul de bromofenol, 0,05% xilenocianol). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (acrilamida 5,7g, bisacrilamida 0,3g, uréia 50g, taurina 8x) em placas de 35x50cm e 0,4mm de espessura (aparato Bio Rad) por 2 a 3 horas a 70-90W. O tampão utilizado foi a taurina 1X, o mesmo utilizado na preparação do gel. A auto-radiografia foi obtida após exposição do gel seco em filme de raios-X por 24 a 72 horas.

### **3.7. Clonagem dos Produtos da PCR**

O produto amplificado foi ligado em vetor pMOS Blue T vector (Amersham LIFE SCIENCE).

### **3.8. Preparação das placas de cultura**

Foi utilizado meio de cultura L-Broth Agar (5g triptona, 2,5g de extrato de levedura, 2,5g de NaCl, 0,5ml de NaOH 3N, 6g de Agar, água para completar 500ml), e após liquefeito, foram adicionados os antibióticos ampicilina 50µg/ml e tetraciclina 15µg/ml. O meio foi distribuído em placas de Petri estéreis e em seguida adicionaram-se 20µl de IPTG (isopropil B-D-tiogalactopiranosídeo) 100 mM e 35µl de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-galactosídeo) 50mg/ml por placa.

### **3.9. Ligação com o vetor pMOS Blue**

Para cada produto a ser clonado, foi preparada uma reação de ligação contendo 1µl de tampão de ligase 10X (Tris-HCl 100 mM pH8,8, KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, triton 1%), 0,5µl de ATP 10 mM, 1µl de vetor, 50ng/µl de T4 DNA ligase 2µl do produto da PCR e água livre de nuclease para completar o volume de 10µl. A reação foi homogeneizada e incubada a 16°C “overnight” em termociclador de temperatura.

### **3.10. Transformação**

Foi adicionado em 200µl de células competentes dH5α, acrescentou-se 5,0 µl da reação de ligação e a mistura foi submetida às seguintes condições: 20 minutos no gelo, 1 minuto 30 segundos a 42°C e imediata transferência para o gelo. A reação então foi misturada em 800 µl de meio líquido “SOC” (10 mM de cloreto de magnésio, 10mM de sulfato de magnésio, 20mM de glicose, triptona, extrato de levedura, cloreto de sódio, cloreto de potássio) e permaneceu sob agitação de 220 rpm à 37°C por 1 hora. Após centrifugação a 3000 rpm por 1 minuto, descartou-se 600 µl do meio; o restante foi ressuspendido e 150 µl foram utilizados para o plaqueamento.

### **3.11. Plaqueamento das Células**

Foram utilizados 50µl da suspensão de células em cada placa. As mesmas foram invertidas e vedadas com incubação a 37°C “overnight”.

### **3.12. Triagem dos recombinantes**

O vetor pMOS BLUE permite uma triagem através de colônias brancas (recombinantes) e azuis. As colônias brancas foram retiradas e colocadas em 5ml de meio líquido L-broth (5g de triptona, 2,5g de extrato de levedura, 2,5g de NaCl, 0,5ml de NaOH 3N qsp 500 ml) e os antibióticos ampicilina (50µg/ml) e tetraciclina 15µg/ml). Os tubos foram mantidos sob agitação intensa à 37°C. O crescimento foi verificado através da turvação do meio.

### **3.13. Mini preparações**

As células bacterianas foram removidas através de centrifugação a 6000 rpm por 1 minuto. À essas células bacterianas foram adicionados 100µl da solução I gelada (glicose 50mM, Tris-HCl 25mM EDTA 10mM). Em seguida procedeu-se com a incubação à temperatura ambiente por 5 minutos e após este período adicionaram 200µl da solução II (NaOH 0,2N, SDS 1%), com incubação de 5 minutos em banho de gelo. Após esse período foram adicionados 150µl da solução III gelada (acetato de potássio pH 4,8). Em seguida centrifugou-se a 12000 rpm por 5 minutos à 4° C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e em seguida adicionaram-se 250µl de fenol saturado e 250µl de álcool isoamílico mantendo-os sob agitação vigorosa por 1 minuto e prosseguindo com a centrifugação 14000 rpm por 2 minutos. Ao sobrenadante acrescentou-se 0,5ml de clorofórmio/álcool isoamílico mantendo sob agitação vigorosa por 1 minuto e centrifugação a 14000 rpm por 2 minutos. Ao sobrenadante foram acrescentado 800µl de etanol absoluto gelado e 40µl de acetato de sódio 3M pH 5,2. As amostras foram mantidas em freezer -80°C por 2 horas. Após este período foram

centrifugadas à 14000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” diluído em água estéril. Foram adicionados à preparação de plasmídeo 2µl de RNase T1 (*Aspergillus oryzae*) e incubados a 37°C “overnight”.

### **3.14. Amplificação por PCR do fragmento inserido no plasmídeo**

Os plasmídeos recombinantes foram identificados pela amplificação por PCR, utilizando-se primers específicos do plasmídeo (T7 sense e U19 antissense).

### **3.15. Seqüenciamento automatizado**

MegaBACE 1000, é um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia Amersham Biosciences. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit” (Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase).

A amplificação para seqüenciamento automático foi realizada com o DYEnamic™ Terminator cycle sequencing Kit (MegaBACE™) (Amersham Pharmacia Biotech, Inc Cleveland, Ohio, USA). Para esta reação foram utilizados 20ng do produto de PCR purificado, 5pmol de iniciador sense e antisense (em reações separadas), 4µl da solução *DYEnamic ET* reagente premix e água deionizada estéril (volume final 15µl). A reação, distribuída em placa própria para seqüenciamento, foi protegida da luz com papel de alumínio. Em termociclador automático (GeneAmp® PCR System 9700 – Applied Biosystems), as amostras foram submetidas a desnaturação inicial (95°C - 2

minutos) e 30 ciclos com as seguintes temperaturas e tempos: desnaturação a 96°C - 20 segundos, anelamento a 57°C - 15 segundos, extensão a 60°C - 1 minuto.

O produto da reação de sequenciamento foi submetido à purificação com 2µl de acetato de amônio 7,5 M e 50µl de etanol absoluto adicionado aos 15µl de reação, com posterior homogeneização. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente protegido da luz, a placa foi centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e a seguir foram adicionados 100µl de etanol 70%. Posteriormente o material foi centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos. Novamente o sobrenadante foi desprezado por inversão tomando-se o cuidado de não remover o *pellet*. Para completa remoção do etanol, a placa foi submetida à centrifugação invertida a 200 rpm por 6 segundos e finalmente aquecida em termobloco a 65°C por 5 minutos para a secagem dos poços. Para a eletroforese, foi adicionado 10µl de “loading buffer”, uma mistura de formamida deionizada, 25mM EDTA (pH 8,0) em cada poço. As amostras foram homogeneizadas, aquecidas a 65°C por 3 minutos e colocadas em gelo. Finalmente foram colocadas no sequenciador para a eletroforese.

O gel para a eletroforese é o MegaBACE Long Read Matrix com poliacrilamida linear (LPAAAs) e as condições de eletroforese foram as seguintes:

Voltagem de injeção da amostra – 3 Kv, tempo de injeção da amostra 60 segundos, voltagem de corrida – 9 Kv, tempo de corrida 70 minutos, potência do Laser – 40 mW.

### 3.16. Análises dos dados brutos – “Base calling”

Os dados brutos provenientes do sequenciador de DNA foram submetidos diretamente a um programa de “base calling”, que consiste no processo de leitura dos dados do sequenciador e identificação da sequência de DNA gerada, atribuindo um valor de qualidade para cada posição nucleotídica identificada. Normalmente cada sequenciador apresenta um programa de “base calling” associado e um dos programas mais utilizados nessa etapa é o “PHRED”, o qual reconhece dados de sequências a partir de arquivos SCF (Standard Chromatogram Format), arquivos de cromatograma dos analisadores automáticos de DNA ABI e arquivos MegaBACE esd. Este software reconhece a sequência de nucleotídeos a partir do arquivo de dados brutos do sequenciador, atribui valores de qualidade às bases constituintes da sequência nucleotídica e gera arquivos de saída contendo informações sobre o “base call” e os valores de qualidade das sequências analisadas, que podem ser encontradas nos arquivos de formato “PHD” (qualidade) e “FASTA” (nucleotídeo). De acordo com Ewing e cols (1998) as atribuições seguras de valores às sequências nucleotídicas são proporcionadas pela implantação de um algoritmo que tem como base os métodos de Análise de Fourier. O algoritmo analisa as quatro bases e prediz a provável região central dos picos e as distâncias relativas entre os picos da sequência de DNA. O valor de qualidade (“PHRED” Quality) atribuído a cada base é obtido pela fórmula a seguir, [“PHRED” Quality =  $-10 \log (P_e)$ ], onde o  $P_e$  é a probabilidade de uma base ter sido atribuída erroneamente. As pontuações inseridas nos arquivos de saída do “PHRED” representam a probabilidade logarítmica negativa em escala de erro de um “base call”. Portanto, quanto maior o valor de qualidade do “PHRED”, menor a probabilidade de ter

ocorrido um erro na atribuição da base. Por exemplo, um valor de qualidade 20 para uma determinada posição nucleotídica significa que ela apresenta uma chance em 100 de estar errada. Já um valor de qualidade 30 significa que determinada base apresenta uma chance em 1000 de ter havido um erro no “base calling”. Esses valores são importantes para determinar se uma região precisa ser re-sequenciada garantindo confiabilidade dos dados.

### **3.17. Análises dos dados através do “PolyPhred” para identificação de heterozigotos**

Os cromatogramas foram transferidos para uma estação de trabalho Linux (Mandrake 7.2) (Sun Microsystems Inc., Mountain View, CA) base chamada como “Phred” (versão 0.961028), junto com o “Phrap” (Phragment Assembly Program) (versão 0.960731), escaneado pelo “PolyPhred” (versão 0.970312) e os resultados foram analisados no programa “Consed” (versão 4.0). O “PolyPhred” é um programa que compara sequencias fluorescentes baseadas através dos traços obtidos de indivíduos diferentes para identificar locais de heterozigose para únicas substituições de nucleotídeos. O “PolyPhred” não é uma aplicação de plataforma única. As funções do “PolyPhred” são integradas com o uso de outros de três programas: “Phred” (Brent Ewing and Phil Green), “Phrap” (Phil Green), e Consed (David Gordon e Phil Green). O “PolyPhred” identifica heterozigotos potenciais utilizando as chamadas baixas e a informação pico fornecidas pelo “Phred” e pelos alinhamentos da sequencia fornecidas

pelo "Phrap". Os heterozigotos e homozigotos potenciais identificados por "PolyPhred" são marcados para a inspeção rápida usando a ferramenta do "Consed".

## **4. RESULTADOS**

---

#### **4.1 Pacientes**

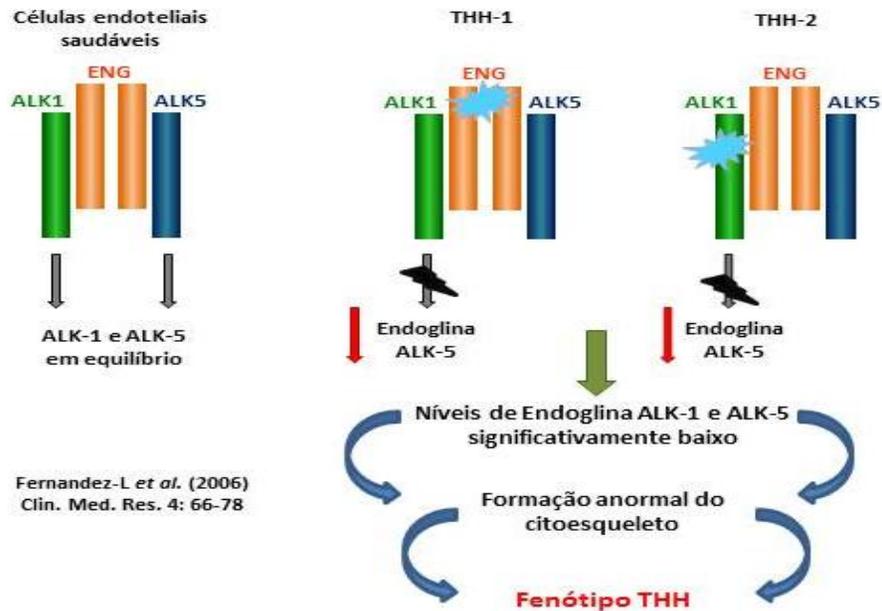
Foram estudados 12 pacientes relacionados e não relacionados de 10 famílias afetadas com a THH cujo diagnóstico clínico foi definido de acordo com o critério Curaçau (Fuchizaki et al 2003) e incluindo a presença de três características: a história familiar positiva, epistaxes recorrente e telangiectasias sugerindo THH tipo 2. Do total destes pacientes 50% eram homens e 50% mulheres, a idade variava entre 42 a 82 anos, com média de 64,75 anos e desvio padrão (DP=11,49). Os pacientes eram provenientes da região norte e sul do estado de São Paulo. Os dados clínicos dos pacientes encontram-se resumidos na Tabela III. Foram analisados 126 indivíduos controle sadios a procura das mutações identificadas nos pacientes.

#### **4.2 Análise das mutações**

O DNA de sangue periférico foi extraído usando protocolo fenol clorofórmio. Todas as regiões codificantes dos genes ALK1 e ENG foram amplificadas pela PCR e analisado por sequenciamento manual e automático. Para “screening” de mutações foi utilizada a técnica de PCR-heteroduplex (CSGE) que se baseia na diferença de mobilidade eletroforética entre a dupla fita homoduplex e a heteroduplex. A fita heteroduplex por possuir inserção ou deleção, não é totalmente complementar, havendo assim, a formação de alças que irão gerar diferença de migração na eletroforese. Esta técnica consiste em desnaturar o produto da PCR de amostras contendo misturas de DNA com o gene normal e mutado. O produto da amplificação da PCR foi submetido à eletroforese vertical em gel desnaturante de poliacrilamida com visualização da migração após coloração com brometo de etídeo.

O produto da PCR dos indivíduos que apresentaram uma alteração no padrão de mobilidade eletroforetica (Figura B das famílias 1, 2, 3, 4 e 5) foi sequenciado manualmente utilizando  $^{32}\text{P}$  como descrito em material e métodos. Posteriormente todas as amostras foram clonadas e novamente sequenciadas manualmente e as mutações confirmadas através de sequenciamento automático. A tabela IV e Figura 10 sumariza todas as mutações identificadas no gene ALK-1 nas famílias THH estudadas e a tabela III todas as famílias com suas características clinicas.

O genótipo THH foi estabelecido nas 10 famílias. Foram identificados 4 mutações no gene ALK1 incluindo três novas mutações e uma mutação previamente descrita na literatura (Figura 6 tabela IV Figura 10). Das três novas mutações duas delas são mutações em “frameshift” identificadas no exon 3 e 7 uma mutação missense identificada no exon 7 e 8.



**Figura 6: Modelo hipotético de THH.** Modelo representando complexo receptor de TGF- $\beta$  em células endoteliais saudáveis (não-THH) em comparação com THH1 e THH2. Em células endoteliais normais (não-THH), ALK1 e endogлина estão cooperando na via de sinalização de TGF- $\beta$ /Smad, mantendo assim o nível de endogлина para satisfazer as necessidades fisiológicas das células endoteliais. A falha na sinalização cooperativa em THH1 e THH2 seja endogлина ou ALK1 tem como resultado, a expressão da endogлина abaixo de um limiar crítico levando a deficiência na sinalização do TGF- $\beta$ , formação do citoesqueleto anormal e formação do tubo em células endoteliais em THH. Estas funções celulares endoteliais alteradas podem explicar o fenótipo THH (Adaptado de Fernández *et al.*, 2006).

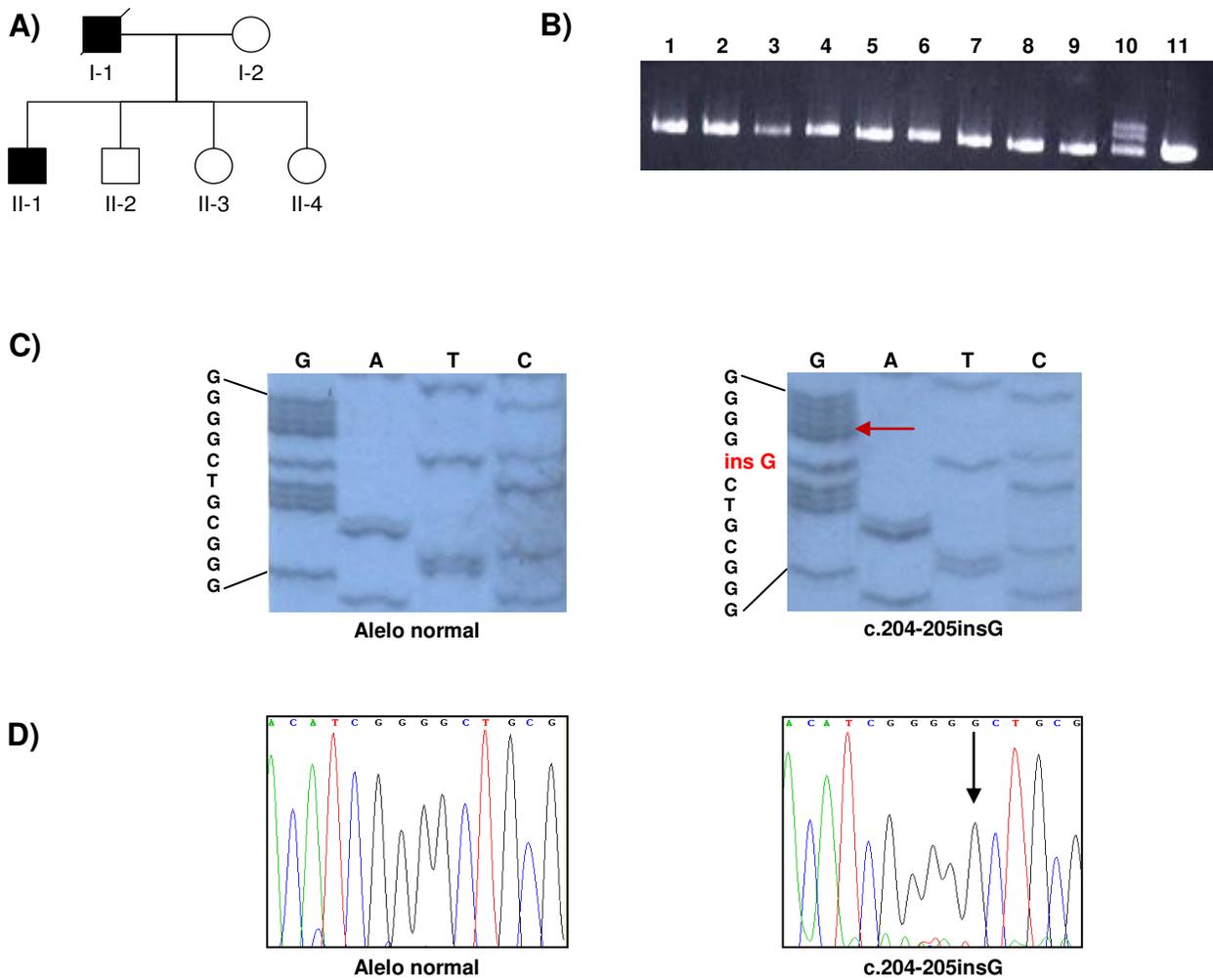
Nenhuma mutação foi observada no gene da Endogлина (ENG) em todos os pacientes estudados. Pacientes com a mesma mutação ou mutação diferente apresentaram o mesmo quadro clínico. Não houve diferença no quadro clínico entre pacientes cujas mutações foram detectadas ou não.

### **4.3 Mutação no domínio extracelular e transmembrana**

Nós identificamos uma nova mutação no éxon 3, na família 1, probando II-I, onde ocorreu uma inserção de um nucleotídeo G na posição 204-205 causando um “frameshift” no códon 68 (Figura 7, tabela IV Figura 10). Este paciente tem epistaxe, telangiectasia oral, nasal e gástrica. O paciente I-I apresentou os mesmos sintomas enquanto que os outros três membros da família não foram afetados.

Os resultados da análise molecular, com heredograma das famílias serão apresentados a seguir:

**Figura 7**

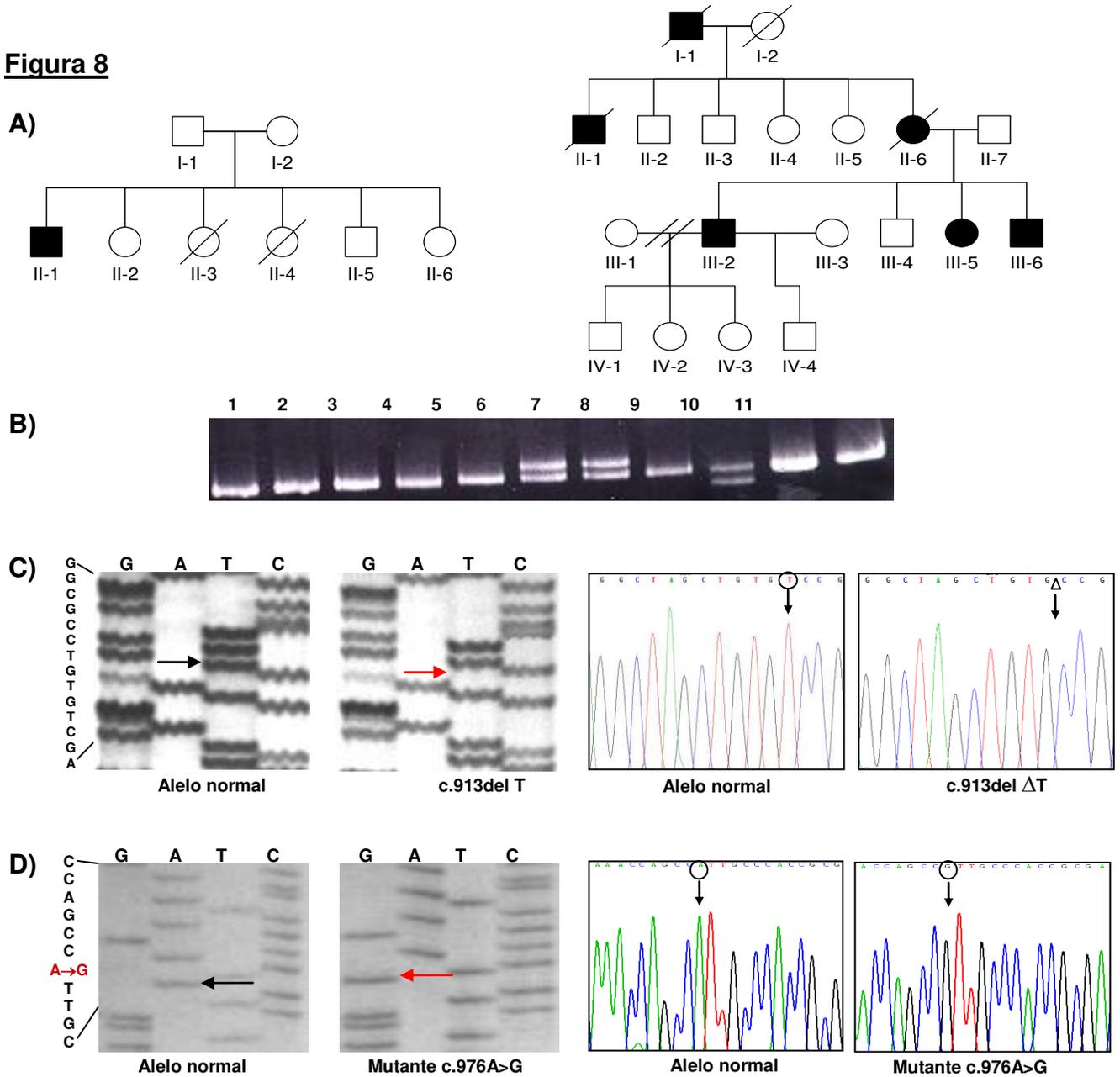


**Família 1 (A)** Heredograma; **(B)** paciente que apresentou diferença de mobilidade eletroforética no CSGE (amostra 10 probando II-1); **(C)** sequenciamento manual de produto da PCR clonado, a esquerda alelo normal a direita a seta aponta o alelo mutado; **(D)** sequenciamento automático de produto da PCR clonado para o éxon III do gene ALK1, mostrando uma inserção de uma base G (∇ G) c.204-205insG (a direita indicado pela seta) no probando II-1, a esquerda alelo normal.

#### **4.4 Mutações no domínio quinase intracelular**

A segunda nova mutação encontrada foi uma deleção de um nucleotídeo T na posição 913 do éxon 7, criando um “frameshift” no códon 305 do aminoácido 68 no domínio quinase (Figura 8b e 8c, tabela IV Figura 10). Esta mutação estava presente em três pacientes das 10 famílias estudadas sendo dois pacientes pertencentes à família 3 (probando III-5 e III-6 - figura 8) e 1 paciente não relacionado pertence à família 2 (probando II-1 - figura 8).

**Figura 8**

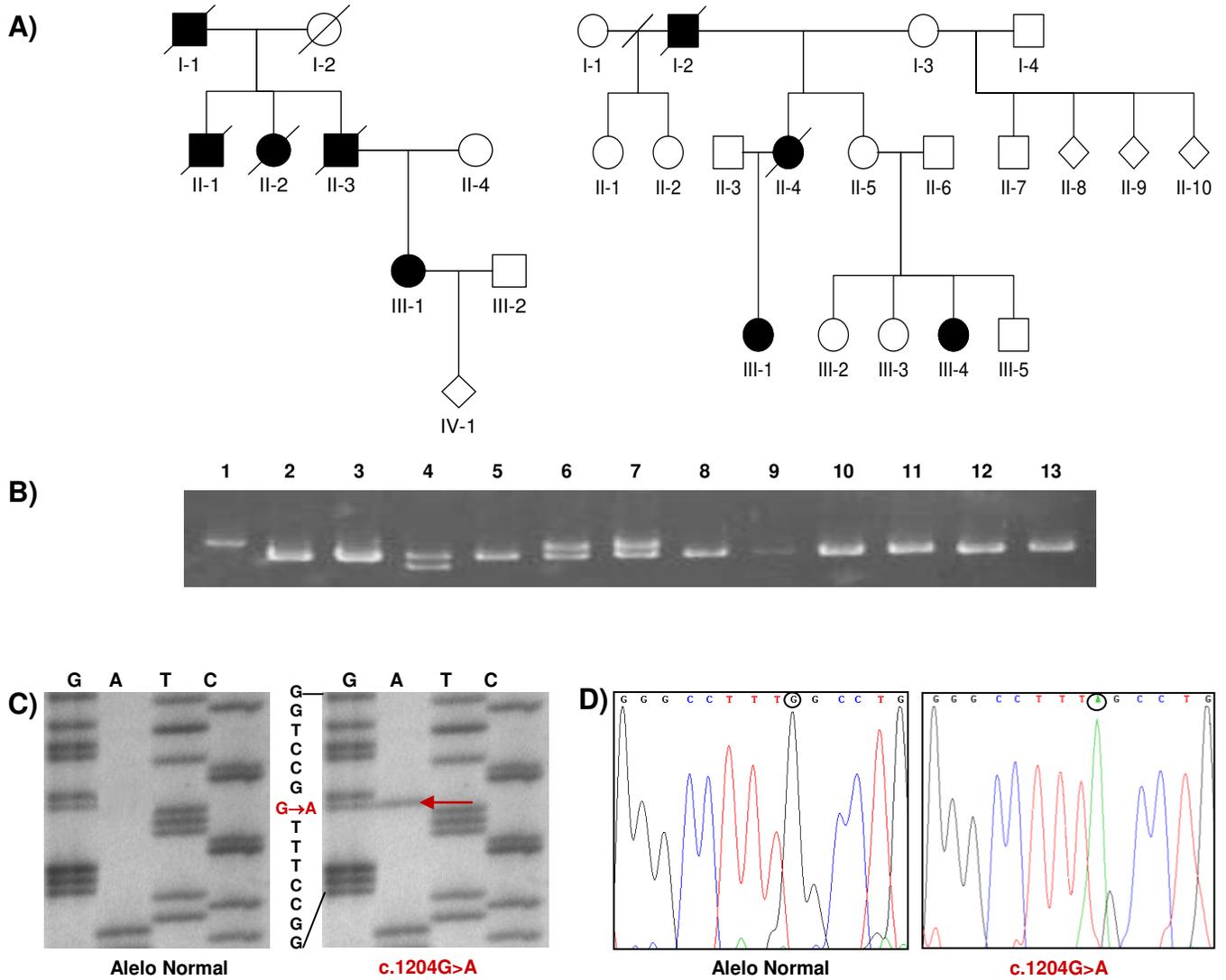


**Famílias 2 e 3 (A)** Heredograma da família 2 a esquerda e família 3 a direita **(B)** pacientes que tiveram diferença de mobilidade eletroforética no CSGE (amostra 6 probando II-1 da família 2, amostra 7 probando III-5 amostra 9 probando III-6 da família 3 **(C)** a esquerda - sequenciamento manual de produto da PCR clonado; a direita - sequenciamento automático de produto da PCR clonado para o éxon VII do gene ALK1, mostrando uma deleção de uma base T, c.913delΔT (seta) nos probandos III-5 e III-6 da família 3 e II-1 da família 2 **(D)** a esquerda - sequenciamento manual de produto de PCR clonado (a esquerda alelo normal a direita alelo mutante indicado pela seta) a direita - sequenciamento automático de produto de PCR clonado mostrando uma mutação em heterozigose (c 976A>G) no paciente III-6 da família 3, alelo normal a esquerda alelo mutado a direita indicado pela seta.

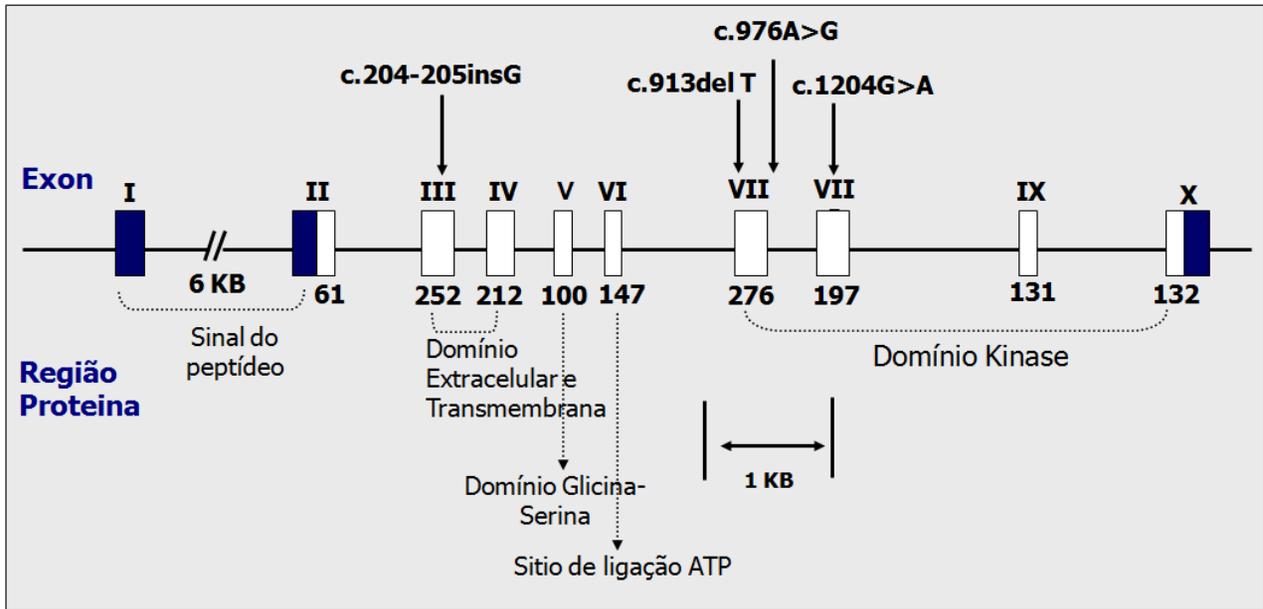
A terceira nova mutação foi identificada no exon 7, é uma mutação “missense” no domínio quinase de ALK-1. Esta nova mutação provocou uma substituição de A976G que alterou o aminoácido isoleucina 326 pela valina. Esta mutação foi encontrada no probando III-6 da família 3, embora não tenha sido encontrada no probando III-5, uma vez que ambos apresentaram MAV gastrointestinal (Figura 8).

A quarta mutação encontrada, foi uma substituição do aminoácido glicina por uma serina na posição 1204 encontrada no probando III-1 e III-4 da família 5 e no probando III-1 da família 4. Encontramos esta mutação em duas famílias, aparentemente não relacionada. Na família 5 encontramos dois indivíduos clinicamente afetados, enquanto que na família 4 encontramos apenas um indivíduo vivo afetado (Figura 9).

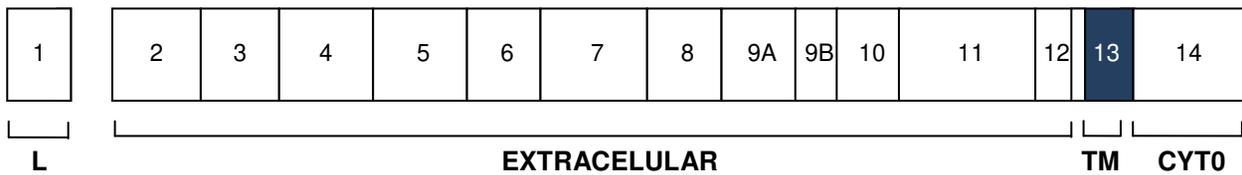
**Figura 9:**



**Famílias 4 e 5 (A)** Heredograma da família 4 a esquerda e família 5 a direita **(B)** pacientes que tiveram diferença de mobilidade eletroforética no CSGE **(C)** sequenciamento manual de produto da PCR clonado e **(D)** sequenciamento automático de produto da PCR clonado para o éxon VIII do gene ALK1, mostrando uma mutação em heterozigose (c.1204G>A) no probando III-1 da família 4 e nos probandos III-1 e III-4 da família 5.



**Figura 10:** Representação diagramática do gene ALK-1 e o resumo das mutações; os éxons são marcados pelos boxes brancos para regiões codificantes, a cor escura para as regiões não codificantes. As alterações na sequência do gene ALK-1 estão identificados ao longo do gene e inclui mutações “missense” e “frameshift”.



**Figura 11:** Representação diagramática do gene endoglina; os exons são marcados pelos boxes com numero correspondente. Exons de 2-12 codifica o domínio extracelular, o exon 13 codifica o domínio transmembrana e o exon 14 o domínio citoplasmático (CYT0). Somente regiões que codificam proteínas são mostrados (Raab et al 1999).

**Tabela III:** Quadro clínico dos pacientes com Telangiectasia Hemorrágica Hereditária

Famílias	Sexo	Idade	Apresentação clínica	Tipo de lesão
F1	M	42 a	Epistaxe bilateral freqüente desde a infância/anemia	Telangiectasia mucosa gástrica, oral e nasal
F2	F	64 a	Epistaxe/anemia frequente	Telangiectasia na cavidade oral face e palma das mãos
F3	M	76 a	epistaxe freqüente desde infância /sangramento digestivo/anemia	Telangiectasia no septo nasal, oral face e palma das mãos
F3	F	78 a	epistaxe unilateral freqüente /angiодisplasia gástrica e duodenal	Telangiectasia na cavidade oral, face e palma das mãos
F4	M	67 a	Epistaxe bilateral freqüente / desde infância/anemia	Telangiectasia na face, tronco e membros
F4	F	59 a	Epistaxe e melena/anemia	Telangiectasia mucosa oral e palma das mãos
F5	M	86 a	epistaxe bilateral desde a infância	Telangiectasia na face e palma das mãos
F6	M	48 a	Epistaxe e melena/anemia	Telangiectasia na mucosa nasal face e palma das mãos/hemorragia digestiva
F7	F	73 a	Epistaxe e melena/anemia	Telangiectasia na face e palma das mãos
F8	F	51 a	epistaxe freqüente desde infância/	Telangiectasia na mucosa oral face e palma das mãos
F9	M	77 a	epistaxe bilateral/anemia frequente	Telangiectasia na face e tronco
F10	F	70 a	epistaxe bilateral	Telangiectasia na mucosa oral, face e palma das mãos

**Tabela IV:** Resumo das mutações no gene ALK-1 em pacientes com THH

Família	Localização	Gene	Região da Proteína	DNA alterado	Mutação encontrada (posição)
F1	éxon III	ALK-1	Domínio Extracelular	p.Gly68fs	c.204-205insG
F2	éxon VII	ALK-1	Domínio Quinase	p.Ser305fs	c.913del T
F3	éxon VII	ALK-1	Domínio Quinase	p.Ile326Val	c.976A>G
	éxon VII	ALK-1	Domínio Quinase	p.Ser305fs	c.913del T
F4	éxon VIII	ALK-1	Domínio Quinase	p.Gly402Ser	c.1204G>A
F5	Éxon VIII	ALK-1	Domínio Quinase	p.Gly402Ser	c.1204G>A

A maior concentração de mutações no gene ALK1 foram encontradas nos exons 3, 4, 7 e 8 o qual codifica o domínio extracelular e quinase respectivamente (Abdala, 2003; Oliviere, 2002).

## **5. DISCUSSÃO**

---

Nosso trabalho foi pioneiro no Brasil, nos estudamos um total de 12 pacientes distribuídos em 10 famílias não relacionadas. Após analisar as 10 famílias, em 50% delas foi possível detectar alterações no gene ALK-1, classificando esses pacientes como THH tipo 2. Das 4 mutações encontradas todas estavam no gene ALK1 e nenhuma mutação foi encontrada no gene da endogлина (THH tipo 1) nos pacientes estudados. Assim, a mutação no gene ALK1 foi muito maior que no gene ENG. Estes resultados se assemelha somente ao trabalho de Lesca et al 2006 realizado na região da França. Outras regiões como Canadá (Abdalla et al 2006) Dinamarca (Kjeldsen et al 2001) Japão (Azuma et al 2000) Estados Unidos (Berg et al 2003) mutações patogênicas no gene da ENG foram mais frequentes que ALK1.

Nós não encontramos uma evidencia clara na sintomatologia entre THH1 e THH2 e o numero de malformação arteriovenosa gastrointestinal e epistaxe recorrente foram igualmente partilhada por todos pacientes.

Descrevemos 4 mutações no gene ALK1 incluindo 3 novas mutações (uma mutação em “frameshift” Gly68fs no exon 3 (c.204-205insG), outra mutação em “frameshift” Ser305fs no exon 7 (c.913delT) e uma mutação “missense” Ile326Val no exon 7 (c.976A>G), a quarta mutação foi uma mutação missense Gly402Ser encontrada no exon 8 (c.1204G>A) em três pacientes, esta já havia sido descrita por Bayrak-Toydemir (2006). As mutações ocorreram em famílias não relacionadas (Tabela IV, Figura 10).

Nossos resultados foram inverso ao que está descrito na literatura, 50% das mutações encontradas foram “missense” e 50% foram mutações que causaram

“*frameshift*”. As mutações “missense” foram encontradas no domínio quinase de ALK1 e as mutações em frameshift encontradas no domínio extracelular e domínio quinase. Estas mostraram alterações nas polaridades, cargas, hidrofobicidade e/ou tamanho do aminoácido substituído e têm um efeito estrutural criando uma desestrutura e uma proteína instável tal fato pode explicar a falta de expressão dessas proteínas mutantes na superfície celular. Aminoácidos alterados resultam numa subsequente alteração na forma e funcionamento das proteínas.

Não houve diferença significativa nas características clínicas observadas nas 5 famílias com mutações descritas com aquelas que não tiveram mutação, sugerindo que os aspectos moleculares para as mutações de baixa função ou para uma pequena deleção/inserção podem ser os mesmos. Assim, é possível perceber que a THH é uma doença geneticamente heterogênea.

Abdalla *et al.*, 2003, demonstraram que a maioria (70%) das mutações encontradas em THH2 associadas ao gene ALK-1 são substituições de um único par de base levando a mutações “missense” e “nonsense” ao contrário da THH1 associada ao gene da endogлина que apresenta mutações causando “*frameshift*” e “*stop códon*” prematuro.

Berg e cols (2003) identificaram um número maior de mutações no gene ENG (59%) do que no gene ALK1 (40%) nas famílias THH estudadas. Letteboer e cols (2004), tiveram um resultado semelhante ao trabalho de Berg e cols num estudo com 37 pacientes THH sendo 30 pacientes relacionados e 7 não relacionados, a proporção

de mutações encontradas entre ALK1/ENG foram 40% para ALK-1 e 53% para ENG e em 7% dos pacientes não foi encontrada mutações nesses genes estudados.

Numa população na região da França os estudos mostraram uma alta prevalência de mutações no gene activina em relação ao gene da endogлина, sendo que na endogлина predominaram inserções e deleções. A porcentagem de mutações foi de 88%, identificadas através de sequenciamento das regiões codificantes. O numero amostral deste estudo foi de 48 pacientes com 31 mutações encontradas, sendo que 23 delas ocorreram no gene da activina e 8 no gene da endogлина (Lesca *et al.*, 2006).

Resultado semelhante foi encontrado por Abdalla *et al* 2006 num estudo na população Canadense em 192 famílias estudadas foram encontradas 153 mutações, 37% dessas mutações ocorreram no gene ALK-1 (57 mutações) enquanto que 61% ocorreram no gene ENG (93 mutações) estas foram determinadas utilizando-se sequenciamento direto das regiões codificantes.

Na Dinamarca, Kjeldsen e cols (2001) estudaram 211 pacientes através de triagem por DGGE e sequenciamento de regiões codificantes, encontraram apenas 44 pacientes com THH, sendo que 37 pacientes eram relacionados e 7 não relacionados. Foram encontradas 7 mutações no gene ALK1 e 12 no gene ENG (16% e 27% respectivamente).

No Japão, Azuma e cols (2000) obtiveram um número maior de mutações em ENG (29 mutações) do que em ALK-1 (17 mutações), utilizando sequenciamento de região codificante. Na Itália, Gennaro e cols (2006) demonstraram num estudo com 66 pacientes THH que o numero de mutações no gene ALK1 foi maior que no gene ENG,

nestes pacientes 51 mutações foram identificadas sendo 31 em ALK1 e 20 em ENG, nos outros 15 pacientes nenhuma mutação foi encontrada.

Em nosso trabalho o método de “screening” utilizado foi o CSGE, todos os indivíduos que apresentaram alteração na mobilidade eletroforetica tiveram algum tipo de mutação mostrando uma eficiência de 100%, após sequenciamento manual e automático do produto da PCR clonado de todos os pacientes estudados. A literatura mostra que a eficiência do método de “screening” adotado em nosso estudo é de 70-85% de acordo com o tamanho do fragmento amplificado e concentração de CG (Ikeda *et al.*, 2003; Blesa *et al.*, 2004), mesmo os indivíduos que não apresentaram alteração na mobilidade eletroforetica no CSGE para o gene da activina foram clonados e sequenciados, devidos as características clínicas de THH tipo 2. Para o gene da endoglina foi utilizado somente o método de “screening” e sequenciamento direto do produto da PCR os mesmos não apresentaram mutações sugerindo que todos os pacientes estudados tem a mesma característica clínica de THH tipo 2.

Frente aos resultados encontrados no presente estudo, devemos levar em consideração alguns fatores. O primeiro seria de que não foram analisadas as regiões promotoras (presentes no éxon 1) e íntrons dos genes ALK-1 e ENG. Pode ser também que nos pacientes onde nenhuma mutação foi encontrada a doença tenha ocorrido devido à mutações em outros genes.

Pacientes com características clínicas de THH sem mutações em ENG ou ALK-1 também foi descrito, sugerindo que outros genes possam estar envolvidos com a THH (Wallace & Shovlin, 2000). A existência de outro gene relacionado com a doença em

alguns pacientes com envolvimento hepático foi descrito por Cole e cols (2005). Um novo locus para THH3 foi mapeado no cromossomo 5 (5q31.3-5q32). O gene ainda não foi localizado e portanto, não foi alvo de estudo no presente trabalho.

Os pacientes deste estudo que não tiveram mutações não tinham acometimento hepático, acreditamos que a hipótese relativa à heterogeneidade seja a mais viável.

Além

disso, a predominância de THH1 ou THH2 parece estar correlacionada com a localização geográfica. Assim, enquanto THH1 é mais abundante na população da América do Norte, Canadá (Abdalla *et al.*, 2000; Abdalla *et al.*, 2003) e norte da Europa (Letteboer *et al.*, 2005), a THH2 é predominante nos países do mediterrâneo como Itália, França e Espanha (Fernandez *et al.*, 2006). Levando-se em conta a formação étnica brasileira, é de se esperar uma prevalência elevada de THH2, como observado no presente estudo.

Segundo Abdalla & Letarte (2006), até o momento 105 mutações foram descritas no gene ALK-1, sendo que a maioria encontra-se nos éxons 3, 7 e 8. Assim, as mutações identificadas em nosso trabalho ocorreram em regiões gênicas com alto índice de mutações (pontos quentes) do gene ALK1 em domínios funcionais.

Com relação à nova mutação “missense” identificada no éxon 7, cabe algumas considerações. Nessa alteração temos uma troca do aminoácido interleucina para valina (p.Ile326Val), um aminoácido apolar para outro aminoácido apolar, sendo que ambos se assemelham tanto na estrutura como na função, além de serem extremamente hidrofóbicos. Nessa posição não há descrição de mutação no gene

ALK1. Como se trata de uma alteração dominante, cuja homozigose parece ser letal, o fato dos pacientes III-5 e III-6 da família 3 apresentarem o mesmo quadro clínico, é interessante notar que apenas o paciente III-6 possui essa mutação, assim, sugerimos que essa alteração deve-se tratar de uma mutação neutra ou seja, incapaz de provocar alterações funcionais na proteína. Outra observação é que somente esse paciente (III-6 família 3) apresentou esta mutação juntamente com a deleção T (c.913del T no exon 7) a mesmo não ocorreu com o probando III-5.

Nenhuma das mutações encontradas em nosso estudo foi encontrada na análise de 126 indivíduos sadios. Esse resultado, associado ao fato de que a mesma mutação encontrada em pacientes portadores de THH não relacionados, diminui a possibilidade de tratar-se de um polimorfismo neutro, pelo menos nos casos das mutações em “frameshift”.

Embora AVMs sejam mais frequentes em THH1 do que em THH2 (McAllister *et al.*, 1994; Berg *et al.*, 1996), apenas esta característica não é suficiente para determinar clinicamente o tipo de THH. Isso suporta a hipótese de que o locus heterogênico nesta desordem pode ser devido a mutações dentro da superfamília de receptores para TGF- $\beta$  ou outros componentes das células endoteliais presentes no caminho de transdução de sinais para TGF- $\beta$ .

Diante da diferença entre o número de mutações encontradas em ALK1 e ENG, uma explicação óbvia é que o gene ENG contém mais informações codificantes (658 aminoácidos em 15 éxons) do que o gene ALK1 (504 aminoácidos em 9 éxons). Outra

explicação, do ponto de vista clínico, é que o fenótipo THH2 é mais brando quando comparado ao THH1 (Shovlin *et al.*, 1996; Berg *et al.*, 2003).

O número mutações vem aumentando continuamente, o que indica que algum nucleotídeo pode ser mutado, exceto aquele que codifica a região transmembrana (éxon 13 região com 45 aminoácidos) ou domínio citoplasmático (éxon 14 região com 47 aminoácidos) no gene da endogлина. As mutações incluem deleções, inserções de uma ou mais bases, substituições de base. As mutações mais frequentes no gene da endogлина são mutações missense, deleções e inserções concentradas nos éxons 3, 4, 7, 8 e 9 embora todos os éxons possam ser afetados. Para dados foram encontradas 123 mutações foram encontradas no gene ACVRL1/ALK1 (Anexo 5) e 136 mutações no gene da endogлина ate o momento.

## **6. CONCLUSÕES**

---

1. Nosso estudo demonstrou o alta prevalência da THH tipo 2, que é coerente com ascendência étnica da nossa população.
2. Nosso estudo reforça a heterogeneidade alélica e não alélica molecular da doença, com a descrição de três mutações novas.
3. As novas mutações encontradas em nossa população ocorrem nos éxons onde foram descritos os maiores índices de mutações (pontos quentes).
4. Com os métodos empregados foi possível a detecção do erro molecular em 50% dos pacientes (taxa de detecção).
5. Devido a essa taxa de detecção de mutações no gene ALK-1, o teste diagnóstico que utilizamos torna-se proveitoso para os pacientes THH2, uma vez que possibilita o diagnóstico precoce e o estabelecimento de tratamento antes do desenvolvimento de complicações severas.
6. O aconselhamento genético é o conjunto de informações dado à família com relação ao risco de recorrência, prognóstico e possíveis tratamentos para THH.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- Aassar OS, Friedman CM, White RI. The natural history of epistaxis in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Laryngo-scope* 1991;101:977–980.
- Abdalla SA, Geisthoff UW, Bonneau D, Plauchu H, McDonald J, Kennedy S, Faughnan ME, Letarte M. Visceral manifestations in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *J Med Genet*. 2003;40:494-502.
- Abdalla SA, Letarte M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet*. 2006;43:97-110.
- Abdalla SA, Pece-Barbara N, Vera S, Tapia E, Paez E, Bernabeu C, Letarte M. Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet*. 2000;9:1227-1237.
- Attisano L, Carcamo J, Ventura F, Weis FM, Massague J and Wrana JL. Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell*. 1993;75:671-80.
- Attisano L, Wrana JL, Cheifetz S, Massagué J. Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell*. 1992;68:97–108.
- Azuma H. Genetic and molecular pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Med Invest*. 2000;47:81-90.
- Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Markewitz B, Lewin S, Miller F, Chou L-S, Gedge F, Tang W, Coon H, Mao R. Genotype-phenotype correlation in hereditary hemorrhagic telangiectasia: Mutations and manifestations. *Am J Med Genet Part A*. 2006;140A:463–470.
- Berg J, Porteous M, Reinhardt D, Gallione C, Holloway S, Umasunthar T, Lux A, McKinnon W, Marchuk D and Guttmacher A. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a questionnaire based study to delineate the different phenotypes caused by endoglin and ALK1 mutations. *J Med Genet*. 2003;40:585-90.

- Berg JN, Gallione CJ, Stenzel TT, Johnson DW, Allen WP, Schwartz CE, Jackson CE, Porteous ME and Marchuk DA (). The activin receptor-like kinase 1 gene: genomic structure and mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Am J Hum Genet.* 1997;61:60-7.
- Berg JN, Guttmacher AE, Marchuk DA., Porteous ME. Clinical heterogeneity in hereditary haemorrhagic telangiectasia: are pulmonary arteriovenous malformations more common in families linked to endoglin? *J Med Genet.* 1996;33:256-257.
- Bourdeau A, Faughnan ME, McDonald ML, Paterson AD, Wanless IR, Letarte M. Potential role of modifier genes influencing transforming growth factor-beta1 levels in the development of vascular defects in endoglin heterozygous mice with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Pathol.* 2001;158:2011-2020.
- Braverman I.M, Keh A, Jacobson B.S. Ultrastructure and three-dimensional organization of the telangiectases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Invest Dermatol.* 1990;95:422-427.
- Braverman IM, Keh A, Jacobson BS. Ultrastructure and three-dimensional organization of the telangiectases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Invest Dermatol* 1990;95:422-427.
- Byahatti SV, Rebeiz EE, Shapshay SM. Hereditary haemorrhagia telangiectasia: what the otolaryngologist should know. *Am J Rhinol.* 1997;11:55-62.
- Carcamo J, Weis FM, Ventura F, Wieser R, Wrana JL, Attisano L, Massague J. Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol.* 1994;14:3810-21
- Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1992;267(27):19027-30.
- Chen X, Rubock MJ, Whitman M. A transcriptional partner for MAD proteins in TGF- $\beta$  signalling. *Nature.* 1996;383:691-696.

- Cole SG, Begbie ME, Wallace GM and Shovlin CL. A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet.* 2005;42:577-82.
- Conselho Nacional de Saúde (Br). Resolução nº 196/96. Normas de pesquisa envolvendo seres humanos. *Bioética* 4: 15-25.
- Dakeishi M, Shioya T, Wada Y, Shindo T, Otaka K, Manabe M, Nozaki J, Inoue S, Koizumi A. Genetic epidemiology of hereditary hemorrhagic telangiectasia in a local community in the northern part of Japan. *Hum Mutat.* 2002;19:140-8.
- Dean AG. Epi Info™ and Epi Map: current status and plans for Epi Info™ 2000. *J Public Health Manag Pract.* 1999;5:54-7.
- Edwards PC, McVaney T. External cervical root resorption involving multiple maxillary teeth in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100:585-91.
- Ewing B, Hillier LD, Michael C, Wend I and Green P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using “Phred”. *Accuracy Assessment Genome Res.* 1998 8:175-185.
- Fernández-L A, Sanz-Rodríguez F, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Morales C, Restrepo CM, Ramirez JR, Coto E, Lenato GM, Bernabeu C, Botella LM. Mutation study of Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and expression analysis of Endoglin and ALK1. *Hum Mutat* 2006;27:295.
- Fonsati E, Sigalotti L, Arslan P, Altomonte M, Maio M. Emerging Role of endoglin (CD105) as a marker of angiogenesis with clinical potential in human malignancies. *Current cancer drug targets.* 2003;6:427-432.
- Fuchizaki , Miyamori H, Kitagawa S, Kaneko S, Kobayashi K. Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber disease) *The Lancet.* 2003;362:1490–1494.

- Ganguly A, Rock MJ and Prockop DJ (). 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 U S A*. 1993;90:10325-29.
- Gennaro M, Lastella P, Di Giacomo MC, Resta N, Suppressa P, Pasculli G, Sabaa C, Guanti G. DHPLC-based mutation analysis of ENG and ALK-1 gene in HHT Italian population. *Human Mutation*. 2006;213-214.
- Gluckman JL, Portugal LG. Modified Young's procedure for refractory epistaxis due to hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Laryngoscope*. 1994;104:1174-7.
- Gluckman JL, Portugal LG. Modified Young's procedure for refractory epistaxis due to hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Laryngoscope*. 1994;104:1174-7.
- Gougos A and Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1990;265:8361-4.
- Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- $\beta$  receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13:301-307.
- Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI Jr. Current concepts: hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med*. 1995; 333: 918-24.
- Guttmacher AE, McKinnon WC, Upton MD. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: a disorder in search of the genetics community. *Am J Med Genet*. 1994;52:252-3.
- Haitjema TJ, Balder W, Dish FJM, Westermann CCJ. Epistaxis in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Rhinology*. 1996;34:176-8.
- Hanes FM. Multiple hereditary telangiectases causes hemorrhage (hereditary hemorrhagic telangiectasia). *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1909; 20: 63-73.
- Harrison, DFN. Use of estrogen in treatment of familial hemorrhagic telangiectasia. *Laryngoscope* 92:314-319, 1982.

- Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor- $\beta$  family members through Smad proteins. *Eur J Biochem.* 2000;267:6954-67.
- Jahnke, V. Ultrastructure of hereditary telangiectasia. *Archives of Otolaryngology.*1970; 91:262-265.
- Jessurun GA, Kamphius DJ, van der Zande FH, Nossent JC. Cerebral arteriovenous malformations in The Netherlands Antilles. High prevalence of hereditary hemorrhagic telangiectasia-related single and multiple cerebral arteriovenous malformations. *Clin Neurol Neurosurg.* 1993;95:193-8.
- Johnson DW, Berg JN, Gallione CJ, McAllister KA, Warner JP, Helmbold EA, Markel DS, Jackson CE, Porteous ME, Marchuk DA. A second locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12. *Genome Res.*1995;5:21–28.
- Kjeldsen AD, Brusgaard K, Poulsen L, Kruse T, Rasmussen K, Green A, Vase P. Mutations in the ALK-1 gene and the phenotype of hereditary hemorrhagic telangiectasia in two large Danish families. *Am J Med Genet.* 2001;98:298-302.
- Kjeldsen AD, Møller TR, Brusgaard K, Vase P, Andersen PE. Clinical symptoms according to genotype amongst patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Intern Med.* 2005;258:349-55.
- Kjeldsen AD, Vase P and Green A. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a population-based study of prevalence and mortality in Danish patients. *J Intern Med.* 1999;245:31-9.
- Kulkarni A.B, Karlsson S. Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol.* 1993;143:3-9.
- Lamouille S, Mallet C, Feige JJ, Bailly S. Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood.* 2002;100:4495-501.
- Lastella P, Sabba C, Lenato GM, Resta N, Lattanzi W, Gallitelli M, Cirulli A, Guanti G. Endoglin gene mutations and polymorphisms in Italian patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Clin Genet.* 2003;63:536-540.

- Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P. TGF- $\beta$  receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res*. 2005;65:599-608.
- Lesca G, Plauchu H, Coulet F, Lefebvre S, Plessis G, Odent S, Riviere S, Leheup B, Goizet C, Carette MF, Cordier JF, Pinson S, Soubrier F, Calender A and Giraud S. Molecular screening of ALK1/ACVRL1 and ENG genes in hereditary hemorrhagic telangiectasia in France. *Hum Mutat*. 2004;23:289-99.
- Letteboer TG, Zewald RA, Kamping EJ, de Haas G, Mager JJ, Snijder RJ, Lindhout D, Hennekam FA, Westermann CJ, Ploos van Amstel JK. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: ENG and ALK-1 mutations in Dutch patients. *Hum Genet*. 2005;116:8-16.
- Letteboer TG, Zewald RA, Kamping EJ, Haas G, Mager JJ, Snijder RJ, Lindhout D, Hennekam FA, Westermann CJ, Ploos van Amstel JK. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: ENG and ALK-1 mutations in Dutch patients. 2005; *Hum Genet*. 116:8-16.
- Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, Wendel DP. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science*. 1999;284:1534-1537.
- Lin Y, Chang L, Solovey A, Healey JF, Lollar P, Hebbel RP. Use of blood out growth endothelial cells for gene therapy for hemophilia A. *Blood* 2002;99:457-462.
- Marchuk DA, Genetic abnormalities in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Curr Opin Hematol*. 1998;5:332-8.
- Marchuk DA, Srinivasan S, Squire TL, Zawistowski JS Vascular morphogenesis: tales of two syndromes. *Hum Mol Genet*. 2003;12:97-112.
- Massague J. TGF- $\beta$  signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:753-791.
- Mathews LS. Activin receptors and cellular signaling by the receptor serine kinase family. *Endocr Rev*. 1994;15:310-25.

- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J and, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 1994;8:345-51.
- McAllister KA, Lennon F, Bowles-Biesecker B, McKinnon WC, Helmbold EA, Markel DS, Jackson CE, Guttmacher AE, Pericak-Vance MA and Marchuk DA. Genetic heterogeneity in hereditary haemorrhagic telangiectasia: possible correlation with clinical phenotype. 1994;*J Med Genet* 31:927-32.
- McDonald JE, Miller FJ, Hallam SE, Nelson L, Marchuck DA, Ward KJ. Clinical manifestations in a large hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2 kindred. *Am J Med Genet*. 2000;93:320-7.
- Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. Divergence and convergence of TGF- $\beta$ /BMP signaling. *J Cell Physiol*. 2001;187:265-76.
- Miyazono K, ten Dijke P, Yamashita H, Heldin CH. Signal transduction via serine/threonine kinase receptors. *Semin Cell Biol*. 1994;5:389-98.
- Olivieri C, Mira E, Delu G, Pagella F, Zambelli A, Malvezzi L, Buscarini E and Danesino C. Identification of 13 new mutations in the ACVRL1 gene in a group of 52 unselected Italian patients affected by hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet*. 2002;39:E39.
- Osler W. On a family form of recurring epistaxis, associated with multiple telangiectases of the skin and mucous membranes. *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1901;7: 333-7
- Pau H, Carney AS, Murty GE. Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu syndrome): otorhinolaryngological manifestations. *Clin Otolaryngol*. 2001;26:93-8.
- Pau H, Carney AS, Murty GE. Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu syndrome): otorhinolaryngological manifestations. *Clin Otolaryngol* 2001;26:93-8.

- Peery, W.H. 1987. Clinical spectrum of hereditary hemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu disease). *Am. J. Medicine.* 1986;82:989-996.
- Plauchu H, Bideau A. Épidémiologie et constitution d'un registre de population à propos d'une concentration géographique d'une maladie héréditaire rare. *Population.*1984;5:765-786.
- Porteous ME, Burn J and Proctor SJ. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical analysis. *J Med Genet.* 1992;29:527-30.
- Raab U, Velasco B, Lastres P, Letamendia C C, Langa C, Tapia E, Lopez-Bote JP, Paez E, Bernabeu C. Expression of normal and truncated forms of human endoglin. *Biochem J.* 1999;339:579-588.
- Rebliz EE, Bryan DJ, Ehrlichman RJ, Shapsy SM. Surgical management of life-threatening epistaxis in Osler-Weber-Rendu disease. *Ann Plastic Surgery.* 1995;35:208-13.
- Rendu H. Epitaxis répétées chez un sujet porteur de petits angiomes cutanés et muqueux. *Gaz des Hôpitaux.* 1986;1322-3.
- Ress, MM; Rodgers, GM. Bleeding disorders caused by vascular abnormalities. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*, Baltimore, Williams & Williams. 1999;1633-47.
- Sabbà C, Gallitelli M, Palasciano G. Efficacy of unusually high doses of tranexamic acid for the treatment of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.* 2001; 345:926.
- Sabba C. A rare and misdiagnosed bleeding disorder: hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Thromb Haemost.* 2005;3:2201-10. Sadick H, Riedel F, Naim R, Goessler U, Hörmann K, Hafner M, Lux A. Patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia have increased plasma levels of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- $\beta$ 1 as well as high ALK1 tissue expression. *Haematologica.* 2005;90:818-28.

- Sadick H, Sadick M, Gotte K, Naim R, Riedel F, Bran G, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on clinical manifestations and diagnostic measures. *Wien Klin Wochenschr.* 2006;118:72-80.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn, GT. Mullis KB & Erlich, HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase *Science.* 1988;239:487-91.
- Saiki, RK, Sharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA & Arnheim N. `Enzymic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985;230:1350-4.
- Sambrook J, Fritch EF, Maniatis T. *Molecular cloning.* Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory 1989.
- Shimizu K, Bourillot, PY, Nielsen SJ, Zorn A. & Gurdon JB. Swift is a novel BRCT domain coactivator of Smad2 in transforming growth factor  $\beta$  signaling. *Mol. Cell. Biol,* 2001;21:3901–3912.
- Shovlin CL, Hughes JM, Scott J, Seidman CE and Seidman JG. Characterization of endoglin and identification of novel mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet.* 1997;61:68-79.
- Shovlin CL, Scott J. Inherited diseases of the vasculature. *Annu Rev Physiol.* 1996;58:483-507.
- Srinivasan S, Hanes MA, Dickens T, Porteous MEM, Oh SP, Hale LP et al. A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2. *Hum Mol Genet.* 2003;12:473–82
- ten Dijke P, Ichijo H, Franzen P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin CH and Miyazono K. Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene.* 1993;8:2879-87.
- ten Dijke, P., H. Ichijo, P. Franzen, P. Schulz, J. Saras, H. Toyoshima, CH, Heldin, and K. Miyazono.. Activin receptor-like kinases: A novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene.* 1993;8:2879-2887.

- Ulso C, Vase P, Stoksted P. Long term results of dermatoplasty in the treatment of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Laryngol Otol.* 1983;97:223–6.
- Vase, P, and Grove O. Gastrointestinal lesions in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Gastroenterology.* 1986;91: 1079-1083.
- Williams CJ, Rock M, Considine E, McCarron S, Gow P, Ladda R, McLain D, Michels VM, Murphy W, Prockop DJ. 1995. Three new point mutations in type II procollagen (COL2A1) and identification of a fourth family with the COL2A1 Arg519→Cys base substitution using conformation sensitive gel electrophoresis. *Hum Mol Genet*4:309–312.
- Yamamoto H, Itoh F, Nakamura H, Fukushima H, Sasaki S, Perucho M, Imai K. Genetic and clinical features of human pancreatic ductal adenocarcinomas with widespread microsatellite instability. *Cancer Res.* 2001;61:3139-44.

## **8. ANEXOS**

---

## ANEXO 1

**Termo de consentimento livre e esclarecido a ser obtido de pacientes para participação no projeto de estudo intitulado: “ALTERAÇÕES MOLECULARES NOS GENES DA ACTIVINA (Activin receptor-like kinase-1-ALK-1) E ENDOGLINA (ENG) EM TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITÁRIA DOS TIPOS 1 e 2”.**

Nome do paciente .....

Idade :..... anos      RG: ..... HC:.....

Endereço:.....

Nome do responsável legal (se paciente menor de idade):.....

RG:..... Grau de Parentesco:.....

Endereço.....

Estou ciente de que para participar do estudo que me foi explicado, será coletado de 10 a 20 ml sangue periférico. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento. Estou ciente que meus dados serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se alguma alteração for encontrada no meu material genético, os pesquisadores irão me explicar o que foi encontrado e o que isso significa. O meu material será guardado no laboratório e se alguma outra pesquisa sobre telangiectasia hemorrágica hereditária puder ser feita com esse material, primeiramente o estudo deverá ser aprovado pelo Comitê de Ética e pela Comissão Nacional de Ética. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a aluna de doutorado **Ângela Maria de Assis (F: 3521-8661)**, pesquisadora responsável pelo estudo ou **Profa. Dra. Carmem Silvia Bertuzzo (F: 3521-8709)**, Profa livre docente na área de Genética Molecular, responsável pelo estudo – UNICAMP. Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo poderei procurar a secretaria do **Comitê de Ética em Pesquisa da FCM, UNICAMP, F: 3521-8936**.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....  
Assinatura do paciente

RG:

.....  
Assinatura do responsável legal

RG:

.....  
Assinatura da aluna de doutorado

Ângela Maria de Assis

RG: 37 939 956-8

Campinas,...../...../.....

## ANEXO 2

**Termo de consentimento livre e esclarecido a ser obtido dos indivíduos controle, para participação no projeto de estudo intitulado: “ALTERAÇÕES MOLECULARES NOS GENES DA ACTIVINA (Activin receptor-like kinase-1-ALK-1) E ENDOGLINA (ENG) EM TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITÁRIA DOS TIPOS 1 e 2”.**

Nome do paciente .....

Idade :..... anos      RG: ..... HC:.....

Endereço:.....

Nome do responsável legal (se paciente menor de idade):.....

RG:..... Grau de Parentesco:.....

Endereço.....

Estou ciente de que para participar do estudo que me foi explicado, será coletado de 10 a 20 ml sangue periférico. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento. Estou ciente que meus dados serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se alguma alteração for encontrada no meu material genético, os pesquisadores irão me explicar o que foi encontrado e o que isso significa. O meu material será guardado no laboratório e se alguma outra pesquisa sobre telangiectasia hemorrágica hereditária puder ser feita com esse material, primeiramente o estudo deverá ser aprovado pelo Comitê de Ética e pela Comissão Nacional de Ética. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a aluna de doutorado **Ângela Maria de Assis (F: 3521-8661)**, pesquisadora responsável pelo estudo ou **Profa. Dra. Carmem Silvia Bertuzzo (F: 3521-8709)**, Profa livre docente na área de Genética Molecular, responsável pelo estudo – UNICAMP. Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo poderei procurar a secretaria do **Comitê de Ética em Pesquisa da FCM, UNICAMP, F: 3521-8936**. Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....  
Assinatura do paciente

RG:

.....  
Assinatura do responsável legal

RG:

.....  
Assinatura da aluna de doutorado

Ângela Maria de Assis

RG: 37 939 956-8

Campinas,...../...../.....

### ANEXO 3

**Termo de consentimento livre e esclarecido a ser obtido de pacientes, para participação no projeto de estudo intitulado: “ALTERAÇÕES MOLECULARES NOS GENES DA ACTIVINA (Activin receptor-like kinase-1-ALK-1) E ENDOGLINA (ENG) EM TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITÁRIA DOS TIPOS 1 e 2”.**

Nome do paciente .....

Idade :..... anos      RG: ..... HC:.....

Endereço:.....

Nome do responsável legal (se paciente menor de idade):.....

RG:..... Grau de Parentesco:.....

Endereço.....

**Objetivo:** O projeto demonstrará quais as alterações moleculares existentes nos genes da activina e endogлина dos indivíduos com telangiectasia e se essas alterações estariam influenciando no aumento ou diminuição da expressão da proteína. A telangiectasia hemorrágica hereditária tem uma prevalência de 10-20/100.000 indivíduos brancos sem predileção pelo sexo.

No Brasil, nenhum estudo foi realizado para determinar as alterações moleculares nos dois genes responsáveis pela doença. Estamos realizando este trabalho, para caracterizar as alterações moleculares nesses genes uma vez que este conhecimento pode contribuir de forma indireta para a melhoria da terapia da telangiectasia. Para isso, como você tem telangiectasia hemorrágica hereditária, estamos pedindo sua colaboração. Não há remuneração aos participantes da pesquisa caso você não queira participar, não terá qualquer problema. Em nada será alterado o seu tratamento no Hemocentro e no Hospital das Clínicas da UNICAMP. Caso concorde em participar, leia atentamente o que está escrito abaixo e assine duas vias desse termo. Uma delas será entregue a você.

Estou ciente de que para participar do estudo que me foi explicado, serão coletados 10 ml de sangue a ser colhida em veia de um dos braços. Estou ciente que os riscos do procedimento são os mesmos que terei com a coleta das amostras para exames de rotina (hematoma (“roxidão”) no local da coleta de sangue). Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento na UNICAMP. Sei ainda que meus dados serão mantidos em sigilo pelo pesquisador, e todo acompanhamento clínico, genético e psicológico serão realizados pelos médicos hematologistas e psicólogos do Hemocentro. O meu material será guardado no laboratório e se alguma outra pesquisa

sobre telangiectasia hemorrágica hereditária puder ser feita com esse material, um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLEs) devesse ser feito, e o estudo ser aprovado pelo Comitê de Ética e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CEP/CONEP).

Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar pela aluna de doutorado **Ângela Maria de Assis** (F: 3521-8661, pesquisadora responsável pelo estudo) ou o **Profa. Dra. Carmem Silvia Bertuzzo** (F: 3521-8709, orientador responsável pelo estudo), Hemocentro, UNICAMP. Qualquer reclamação sobre o procedimento do estudo poderei procurar a secretária do **Comitê de Ética da FCM, UNICAMP**, Fone: 3521-8936.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

Nome do paciente .....

Idade :..... anos      RG: ..... HC:.....

Endereço:.....

Nome do responsável legal (se paciente menor de idade):.....

RG:..... Grau de Parentesco:.....

Endereço.....

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Campinas,...../...../.....

## ANEXO 4

**Termo de consentimento livre e esclarecido a ser obtido de controles, para participação no projeto de estudo intitulado: “ALTERAÇÕES MOLECULARES NOS GENES DA ACTIVINA (Activin receptor-like kinase-1-ALK-1) E ENDOGLINA (ENG) EM TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITÁRIA DOS TIPOS 1 e 2”.**

Nome do paciente .....

Idade :..... anos      RG: ..... HC:.....

Endereço:.....

Nome do responsável legal (se paciente menor de idade):.....

RG:..... Grau de Parentesco:.....

Endereço.....

**Objetivo:** O projeto demonstrará quais as alterações moleculares existentes nos genes da activina e endogлина dos indivíduos com telangiectasia e se essas alterações estariam influenciando no aumento ou diminuição da expressão da proteína.

No Brasil, nenhum estudo foi realizado para determinar as alterações moleculares nos dois genes responsáveis pela doença. Estamos realizando este trabalho, para caracterizar as alterações moleculares nesses genes uma vez que este conhecimento pode contribuir de forma indireta para a melhoria da terapia da telangiectasia. Para isso, como você não tem telangiectasia hemorrágica hereditária, estamos pedindo sua colaboração. Não há remuneração aos participantes da pesquisa caso você não queira participar, não terá qualquer problema. Caso concorde em participar, leia atentamente o que está escrito abaixo e assine duas vias desse termo. Uma delas será entregue a você.

Estou ciente de que para participar do estudo que me foi explicado, serão coletados 10 ml de sangue a ser colhida em veia de um dos braços. Estou ciente que os riscos do procedimento são os mesmos que terei com a coleta das amostras para exames de rotina (hematoma (“roxidão”) no local da coleta de sangue). Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o tratamento de meu familiar na UNICAMP. Sei ainda que meus dados serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. O meu material será guardado no laboratório e se alguma outra pesquisa sobre telangiectasia hemorrágica hereditária puder ser feita com esse material, um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLEs) devera ser feito, e o estudo ser aprovado pelo Comitê de Ética e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CEP/CONEP).

Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar pela aluna de doutorado **Ângela Maria de Assis** (F: 3521-8661, pesquisadora responsável pelo estudo) ou o **Profa. Dra. Carmem Silvia Bertuzzo** (F: 3521-8709, orientador responsável pelo estudo), Hemocentro, UNICAMP. Qualquer reclamação sobre o procedimento do estudo poderei procurar a secretaria do **Comitê de Ética da FCM, UNICAMP**, Fone: 3521-8936.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

Nome do paciente .....

Idade :..... anos      RG: .....      HC:.....

Endereço:.....

Nome do responsável legal (se paciente menor de idade):.....

RG:.....      Grau de Parentesco:.....

Endereço.....

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Campinas,...../...../.....

## Anexo 5

n°	Localização	Tipo	Mudança de Nucleotídeo	Consequência
1	Ex 2	D	c.37delC	p.L13fs
2	Int 2	Sp	c.61+10G→A	unknown
3	Ex 3	D	c.83delG	p.R28fs
4	Ex 3	D	c.86delG	p.G29fs
5	Ex 3	I	c.139_140insG	p.G48fs
6	Ex 3	M	c.142G→A	p.G48R
7	Ex 3	M	c.143G→A	p.G48E
8	Ex 3	M	c.143G→A, 145delG, 146_147insT	p.G48E,A49P
9	Ex 3	I	c.144_145insG	p.A49fs
10	Ex 3	D	c.145delG	p.A49fs
11	Ex 3	M	c.150G→T	p.W50C
12	Ex 3	N	c.150G→A	p.W50X
13	Ex 3	M	c.152G→A	p.C51Y
14	Ex 3	N	c.172G→T	p.E58X
15	Ex 3	D	c.190delC	p.Q64fs
16	Ex 3	M	c.199C→T	p.R67W
17	Ex 3	M	c.200G→A	p.R67Q
18	Ex 3	D	c.203delG	p.G68fs
19	Ex 3	M	c.231C→G	p.C77W
20	Ex 3	I	c.237_238insG	p.R80fs
21	Ex 3	I	c.243_244dupC	p.T82fs
22	Ex 3	M	c.286A→G	p.N96D
23	Ex 3	D	c.289_294delCACAAAC	p.H97_N98del
24	Ex 3	D	c.301_307delCTGGTGC	p.L101fs
25	Ex 4	N	c.352C→T	p.Q118X
26	Ex 4	I	c.372_373insCC	p.P125fs
27	Ex 4	M	c.383C→A	p.A128D
28	Ex 4	D	c.400delG	p.A134fs
29	Ex 4	D	c.406_409delGGTG	p.G136fs
30	Ex 4	N	c.423G→A	p.W141X
31	Ex 4	N	c.430C→T	p.R144X
32	Ex 4	N	c.439C→T	p.Q147X
33	Ex 4	N	c.475G→T	p.E159X
34	Ex 4	D	c.510delC	p.G170fs
35	Ex 5	M	c.536A→C	p.D179A
36	Ex 5	I	c.625_626insTG	Splice defect, p.G209fs
37	Int5	Sp	c.626-6del14bp	Unknown
38	Ex 6	M	c.632G→A	p.G211D
39	Ex 6	M	c.643G→A	p.E215K
40	Ex 6	D	c.664_668delCACGG	p.H222X
41	Ex 6	M	c.667G→C	p.G223R
42	Ex 6	D	c.682delG	p.V228fs
43	Ex 6	M	c.686A→G	p.K229R
44	Ex 6	D	c.694_696delCTC	p.S232del
45	Ex 6	D	c.704delA	p.D235fs
46	Ex 6	D	c.759_761delCGA	p.D254del
47	Int 6	Sp	c.773-2A→G	splice defect
48	Ex 7	D	c.810_822delCACGCAGCTGTGG	p.S271fs
49	Ex 7	M	c.818T→C	p.L273P
50	Ex 7	M	c.827T→C	p.I276T
51	Ex 7	I	c.838_846dupCACGAGCAC (c.1120_1129dupCACGAGCAC)*	p.H280_H282dupHEH (Y379_380dupHEH)*
52	Ex 7	M	c.851C→T	p.S284F
53	Ex 7	M	c.853C→T	p.L285F
54	Ex 7	N	c.858C→A	p.Y286X
55	Ex 7	I	c.864_865insT	p.L289fs
56	Ex 7	M	c.913T→C	p.S305P
57	Ex 7	M	c.916G→C	p.A306P
58	Ex 7	N	c.924C→A	p.C308X
59	Ex 7	M	c.925G→A	p.G309S
60	Ex 7	M	c.940C→T	p.H314Y
61	Ex 7	N	c.961C→T	p.Q321X
62	Ex 7	D	c.972delA	p.P324fs
63	Ex 7	M	c.986G→A	p.R329H
64	Ex 7	M	c.988G→T	p.D330Y
65	Ex 7	M	c.988G→A	p.D330N
66	Ex 7	M	c.998G→T	p.S333I
67	Ex 7	InDel	c.1000_1005delCGCAATinsG	p.R334fs
68	Ex 7	M	c.1010T→C	p.L337P
69	Ex 7	M	c.1023C→G	p.N341K

Continuação...

nº	Localização	Tipo	Mudança de Nucleotídeo	Consequência
70	Ex 7	M	c.1031G→A	p.C344Y
71	Ex 7	M	c.1031G→T	p.C344F
72	Ex 7	M	c.1039G→C	p.A347P
73	Ex 7	D	c.1042delG	p.D348fs
74	Ex 7	Sp (M)	c.1048G→C	Splice defect, p.G350fs (p.G350R)
75	Ex 8	M	c.1054G→C	p.A352P
76	Ex 8	D	c.1061_1068del8bp	p.M354fs
77	Ex 8	I	c.1062_1080dupGCACTCACAGGGCAGCGAT	p.Y361fs
78	Ex 8	N	c.1069C→T	p.Q357X
80	Ex 8	D	c.1107_1108delAG	p.R369fs
81	Ex 8	I	c.1112_1113insG	p.G371fs
82	Ex 8	M	c.1120C→T (c.1402C→T)*	p.R374W (p.R354W)*
83	Ex 8	D	c.1120_1137del18bp	p.R374_E379del
84	Ex 8	M	c.1121G→A	p.R374Q
85	Ex 8	M	c.1123T→C	p.Y375H
86	Ex 8	I	c.1125_1126insGTAC	p.M376fs
87	Ex 8	M	c.1126A→G	p.M376V
88	Ex 8	M	c.1127T→G	p.M376R
89	Ex 8	M	c.1133C→T	p.P378L
90	Ex 8	M	c.1133C→A	p.P378H
91	Ex 8	M	c.1135G→A	p.E379K (p.N379L)*
92	Ex 8	M	c.1139T→G	p.V380G
93	Ex 8	M	c.1157G→A	p.R386H
94	Ex 8	N	c.1171G→T	p.E391X
95	Ex 8	M	c.1189G→A	p.D397N
96	Ex 8	M	c.1190A→G	p.D397G
97	Ex 8	M	c.1193T→A (c.1475T→A)*	p.I398N
98	Ex 8	M	c.1196G→C	p.W399S
99	Ex 8	M	c.1199C→A	p.A400D
100	Ex 8	M	c.1204G→A	p.G402S
101	Ex 8	M	c.1218G→C	p.W406C
102	Ex 8	M	c.1221G→T	p.E407D
103	Ex 8	M	c.1231C→T	p.R411W
104	Ex 8	M	c.1232G→A	p.R411Q (p.R411N)*
105	Ex 8	M	c.1232G→C	p.R411P
106	Ex 9	M	c.1270C→A	p.P424T
107	Ex 9	M	c.1270C→T	p.P424S
108	Ex 9	M	c.1271C→T	p.P424L
109	Ex 9	M	c.1275C→G	p.F425L
110	Ex 9	M	c.1297C→T	p.P433S
111	Ex 9	D	c.1299delC	p.P433fs
112	Ex 9	M	c.1313T→C	p.M438T
113	Ex 9	M	c.1321G→A	p.V441M
114	Ex 9	M	c.1355C→T	p.P452L
115	Ex 10	N	c.1385C→G	p.S462X
116	Ex 10	N	c.1408G→T	p.E470X
117	Ex 10	I	c.1428_1429dupC	p.S477fs
118	Ex 10	N	c.1435C→T	p.R479X
119	Ex 10	M	c.1436G→T	p.R479L
120	Ex 10	M	c.1450C→T	p.R484W
121	Ex 10	I	c.1450C→T, 1450_1451insG	p.R484Wfs
122	Ex 10	M	c.1460A→C	p.K487T
123	Ex 10	N	c.1468C→T	p.Q490X

## **9. APÊNDICE**

---

## Three novel mutations in the activin receptor-like kinase 1 (ALK-1) gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2 in Brazilian patients

A. M. Assis · F. F. Costa · V. R. Arruda ·  
J. M. Annichino-Bizzacchi · C. S. Bertuzzo

Received: 20 September 2006 / Accepted: 13 December 2006 / Published online: 12 January 2007  
© The Japan Society of Human Genetics and Springer 2007

**Abstract** Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) or Osler–Rendu–Weber disease is a systemic fibrovascular dysplasia with an autosomal dominant inheritance pattern. Mutations in two genes, *endoglin* and *ALK-1*, are known to cause HHT, both of which mediate signaling by transforming growth factor  $\beta$  ligands in vascular endothelial cells. Ten patients were analyzed. Diagnosis of HHT was carried out by means of family history, recurrent bleeding, and the presence of multiple telangiectases lesions. Conformation-sensitive gel electrophoresis analyses with consistent abnormal migration patterns were cloned and sequenced using the MegaBace 1000 DNA automated analyzer. Three novel mutations were identified in the coding sequence of the ALK-1 gene in five patients and their families, which demonstrated clinical manifestations of HHT type 2. These mutations included a G insertion and a T deletion of single base pairs in exons 3 and 7, as well as missense mutations in exons 7 and 8 of the ALK-1 gene. These data indicate that loss-of-function mutations in a single allele of the *ALK1* locus are sufficient to contribute to

defects in maintaining endothelial integrity. We suggest the high rate of mutation detection and the small size of the ALK-1 gene make genomic sequencing a viable diagnostic test for HHT2.

**Keywords** Activin receptor-like kinase 1 (ALK1) · Endoglin (ENG) · Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT)

### Introduction

Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) or Osler–Rendu–Weber disease (ORW) is an autosomal dominant multisystemic vascular dysplasia (Plauchu et al. 1989; Guttmacher et al. 1995), characterized by severe recurrent nose bleeding, localized mucocutaneous telangiectases, gastrointestinal hemorrhage, as well as arteriovenous malformations (AVM) in the lungs, liver, gastrointestinal tract, and brain, which can cause severe ischemic injury or stroke (Guttmacher et al. 1995). Gastrointestinal bleeding occurs in approximately one third of patients, especially in later life, and is well recognized (Plauchu et al. 1989).

Estimates of the incidence of HHT vary widely, but studies have shown that it affects between 1 in 8,345 and 1 in 40,000 people with even a higher incidence in some isolated populations (Shovlin et al. 2000; Berg et al. 2003). The mortality rate as a direct result of the disease is about 36% (Sawabe et al. 2001). Furthermore, Kjeldsen et al. 1999 reported an increased mortality among young HHT patients when compared with those of patients older than 60 years.

Molecular heterogeneity of the disease has been revealed by linkage and mutational studies showing at

A. M. Assis (✉) · F. F. Costa · J. M. Annichino-Bizzacchi  
Hemoglobin and Genome Laboratory, Hematology and  
Hemotherapy Center, State University of Campinas,  
Unicamp, R. Carlos Chagas, 480, Cidade Universitária  
"Zeferino Vaz", CEP: 13081-970, Barão Geraldo,  
Campinas, SP, Brazil  
e-mail: angassis@yahoo.com

C. S. Bertuzzo  
Department of Medical Genetics,  
State University of Campinas, Campinas, Brazil

V. R. Arruda  
University of Pennsylvania School of Medicine,  
Philadelphia, PA, USA

least two distinct loci for HHT. The first locus, HHT-1, comprises the endoglin (ENG) gene mapped to chromosome 9q33 (McAllister et al. 1994a, b). Studies have shown that patients with HHT-1 are more likely to develop pulmonary arteriovenous malformations (PAVM) than patients with HHT-2 (Berg et al. 1996).

Endoglin is a TGF- $\beta$  binding protein, expressed predominantly by endothelial cells and placenta (Gougos and Letarte 1990; Cheifetz et al. 1992). Loss-of-function mutations in the human ENG gene cause HHT type I, which is characterized by a higher prevalence of symptomatic PAVM (Attisano et al. 1993).

The second locus, HHT-2, harbors the activin-like kinase receptor-1 (ALK-1) gene, which has been mapped to the pericentromeric region of chromosome 12 (Vincent et al. 1995; Johnson et al. 1996). The ALK-1 protein has the properties of a type I serine-threonine kinase receptor (Attisano et al. 1993; ten Dijke et al. 1993). Both genes are members of the TGF- $\beta$  receptor superfamily (Cheifetz et al. 1992; Attisano et al. 1993; ten Dijke et al. 1993) and are highly expressed in endothelial cells and other vascularized tissues such as lung and placenta (Attisano et al. 1993).

The ALK-1 gene is a type I cell surface receptor for the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and has the properties of a type I serine threonine kinase receptor superfamily of ligands; however, its ligand and corresponding type II receptor are unknown. This receptor has been shown to bind either activin or TGF- $\beta$  in the presence of their respective type II receptors, but it does not bind to any ligand alone (Attisano et al. 1993). These genes mediate binding and signaling of TGF- $\beta$ . ALK-1 can interact with TGF- $\beta$  or activin, type II receptors as shown by Oh et al. 2000, but the mechanisms for downstream signaling of ALK-1 are yet to be elucidated.

Mutations in the ALK-1 gene in HHT-2 patients include nonsense and missense mutations, as well as

insertions and deletions resulting in frameshifts (Johnson et al. 1996; Piantanida et al. 1996; Olivieri et al. 2002).

These mutations have been found throughout the ALK-1 gene coding region, including the extracellular ligand binding, transmembrane and the intracellular kinase domains. The nature and location of these mutations suggest that HHT type 2 results from loss of function of the ALK-1 gene.

In order to analyze the molecular abnormalities in ten unrelated patients with HHT, we have performed a complete sequencing of the coding region of the ENG and activin genes. We were able to identify mutations only in the ALK-1 gene in five patients.

We have developed polymerase chain reaction (PCR) assays to amplify each exon of the coding region of the ALK-1 and ENG gene from genomic DNA. The ALK-1 and ENG genes were sequenced in ten related and unrelated patients with HHT.

## Subjects, materials and methods

### Human subjects

Informed consent was obtained from all patients and controls, and the study was approved by the local ethics committee.

A diagnosis of HHT was carried out in ten unrelated patients by (1) family history, (2) recurrent episodes of bleeding, and (3) the presence of multiple telangiectatic lesions (Shovlin et al. 2000). The summary of the patients' clinical data is shown in Table 1. Vascular abnormalities in the gastrointestinal tract, pulmonary, hepatic, and brain circulations were investigated by at least one objective diagnostic method such as endoscopy, ultrasound, and computerized tomography. A panel of 252 chromosomes from unrelated individuals

**Table 1** Clinical characteristics of patients with HHT type 2

Family	Gender	Age (years)	Clinical manifestation	Sites of telangiectases
F1	M	42	Bilateral epistaxis frequent since infancy/anemia	Telangiectasia in gastrointestinal tract, oral, and nasal
F2	F	63	Epistaxis/frequent anemia	Telangiectasia in oral cavity, face, and hands
F3	M	77	Epistaxis recurrent since infancy/digestive hemorrhage/anemia	Telangiectasia in nasal septum, oral face, and hands
F4	F	67	Epistaxis and melena/anemia	Telangiectasia in oral mucous and hands
F5	M	61	Epistaxis and melena/anemia	Telangiectasia in mucous nasal face and hands/digestive hemorrhage
F6	M	55	Epistaxis/frequent anemia	Telangiectasia in face and hands
F7	F	84	Epistaxis and melena/anemia	Telangiectasia in face and hands
F8	F	48	Epistaxis frequent since infancy	Telangiectasia in oral mucous in face and hands
F9	M	73	Bilateral epistaxis/frequent anemia	Telangiectasia in face and trunk
F10	F	50	Bilateral epistaxis	Telangiectasia in oral mucous, face, and hands

without the disease was used to evaluate the frequency of each mutation in the general population.

### Materials and methods

#### Extraction of DNA from peripheral blood

Genomic DNA was extracted from 1–3 ml of peripheral blood lymphocytes and separated from blood collected in EDTA obtained from healthy volunteers and individuals with HHT in a steady state, using standard procedures.

#### Mutation analysis

Initially, PCR and sequencing were performed, and when frameshift was detected, this fragment was then cloned and sequenced.

#### PCR amplification of individual exons

All coding regions and flanking intronic sequences of the *ENG* and *ALK-1* genes were amplified by PCR. Primer sequences and conditions for both genes were previously described by Berg et al. (1997) and McAllister et al. (1994a, b), respectively. PCR products were run on 1.5% agarose/0.5 TBE gels.

#### Cloning of the PCR products

Polymerase chain reaction products were cloned into the commercial vector SureClone Ligation kit (Amersham Biosciences, San Francisco, CA), and plasmid DNA was prepared using the Wizard Plus SV Minipreps kit (Promega; <http://www.promega.com>). Cycle sequencing was performed using the MegaBACE Dye Terminator procedure, and reactions were analyzed by a MegaBACE 1000 automatic sequencer (GE Healthcare Life Sciences, USA; <http://www.gehealthcare.com>). Conservation of the region affected by the mutation was determined by the use of the Blast algorithm to match the *ALK-1* region containing the mutation against the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) nonredundant protein database.

#### Automized sequencing

Direct sequencing of PCR plasmid products were sequenced in forward and reverse orientation on a MEGABACE 1000 sequencer using the DYEamic ET Terminator cycle sequencing kit (GE Healthcare,

USA; <http://www.gehealthcare.com>), according to the manufacturer's instructions. The sequences were analyzed by the sequence analyzed software using the Base Caller Cimarron 3.12 (GE Healthcare, USA; <http://www.gehealthcare.com>).

#### Polymorphism screening

For each mutation, a panel of 126 healthy normal control individuals' genomic DNAs from unrelated individuals was screened. As a screening method for mutation detection, we carried out conformation-sensitive gel electrophoresis (CSGE) as described by Ganguly et al. (1993), a method that allows the detection of single base mismatches in DNA heteroduplexes. We have utilized CSGE to screen for potential mutations in a mixed population of normal controls. The entire coding region and intron–exon boundaries of the *ALK-1* gene and *ENG* gene were analyzed.

Following the amplification of the PCR product, 20  $\mu$ l of each sample was heated at 98°C for 5 min followed by incubation at 68°C for 1 h to generate heteroduplexes. The best separations of heteroduplexes and homoduplexes were obtained with a standard 6% polyacrylamide gel polymerized in 10% ethyleneglycol/15% formamide/Tris-taurine buffer 0.5% (Sigma-Aldrich Brasil Ltd; <http://www.sigma-aldrich.com.br>).

### Results

#### Identification of novel mutations detected in the *ALK-1* gene

In this article, we studied ten patients with clinical features of HHT; five of them presented four mutations in the *ALK-1* gene (three novel and one already described). *ENG* was not found in any of the ten analyzed patients.

As to the three novel mutations in the *ALK-1* gene, two of them are frameshift mutations identified in exons 3 and 7 after direct sequencing of the PCR products, suggesting the existence of a deletion or insertion, and one is a missense mutation identified in exon 7. As to the mutation already described in the literature, it is a missense identified in exon 8.

The first novel mutation was a T deletion (c.913delT) in exon 7 in three patients (brother/sister and one unrelated identified at Table 2 and Fig. 1 as F3 and F2, respectively). The same patient (brother, F3)

**Table 2** Summary of ALK-1 gene mutations in HHT type 2

Family	Location	Gene name	Protein region	DNA change	Mutation found (position)
F1	Exon III	ALK-1	Extracellular domain	p.Gly68fs	c.204-205insG
F2	Exon VII	ALK-1	Kinase domain	p.Ser305fs	c.913del T
F3	Exon VII	ALK-1	Kinase domain	p.Ile326Val	c.976A > G
	Exon VII	ALK-1	Kinase domain	p.Ser305fs	c.913del T
F4	Exon VIII	ALK-1	Kinase domain	p.Gly402Ser	c.1204G > A
F5	Exon VIII	ALK-1	Kinase domain	p.Gly402Ser	c.1204G > A

also presented the second missense mutation (c.976A > G), which was not found in his sister (F3).

The third novel mutation (c.204insG) was a G insertion in the exon 3 (father and son: Table 2; Fig. 2 as F1).

The fourth mutation, which is a missense and has already been described in the literature (c.1204G > A), was found in three patients (aunt/niece and one unrelated, Table 2 and Fig. 1 as F4 and F5, respectively; Abdalla et al. 2000; Trembath 2001; Olivieri et al. 2002; Lesca et al. 2004).

Those four mutations identified in our five patients are shown in Table 2 and Fig. 2. For each mutation a screening in a panel of 126 normal control individuals was performed to define if these mutations would not represent genetic polymorphisms of the studied population. The summary of the mutations identified is shown in Table 2 and Fig. 2.

## Discussion

Endoglin and ALK-1 have been reported to demonstrate an association with HHT (McAllister et al. 1994a, b), an autosomal dominant disorder that causes localized angiodysplasia (Johnson et al. 1996).

Phenotypic penetrance in HHT is age dependent and, at about the age of 40 years, patients are expected to present characteristic clinical manifestations. The inheritance of at least one single mutant copy can predispose the individual to the development of the vascular abnormalities observed in HHT, which are modulated by several genetic, physiologic, and mechanical events (Porteous et al. 1992). Little is known about the genetic basis of the observed clinical heterogeneity of HHT. Even within the same family, there could be great variations with respect to the manifestation and severity of the disease (Shovlin et al. 1997).

These data indicate that loss-of-function mutations in a single allele of the *ALK1* locus are sufficient to contribute to defects in maintaining endothelial integrity.

In our work with this series of patients with type 2 HHT, three novel mutations and a mutation already described in the ALK-1 gene were identified. All of these four mutations affect the kinase domain of the ALK-1 gene, and both the deletion and the insertion change conserved amino acids.

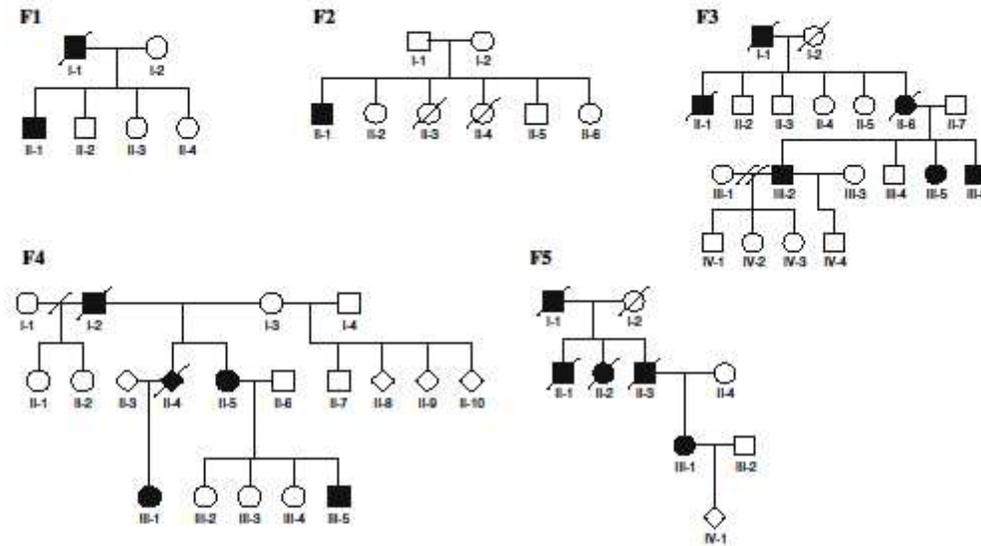
From the four detected ALK-1 gene mutations, the insertion within exon 3 encodes the extracellular domain. The T deletion within exon 7 and the other two mutations within exon 7 and 8 encode the kinase domain located near highly conserved cysteines. Several studies suggest that the majority of the mutations grossly truncate the ALK-1 protein and are, thus, classic functional null alleles (McAllister et al. 1994a, b; Johnson et al. 1996; Gallione et al. 1998; Klaus et al. 1998; Pece-Barbara et al. 2005).

Five patients did not present any mutations in ALK1 or ENG genes, suggesting that the disease may be linked to other loci. In these five patients, the ENG gene was sequenced, and no mutation was found. We have performed the whole coding sequences of both genes (ALK-1 and ENG), suggesting the existence of a third HHT gene mentioned by Piantanida et al. (1996). Wallace and Shovlin (2000) confirmed, by linkage analyses, the exclusion of linkage to ENG and activin (chromosome 9 and chromosome 12).

Indeed, the presence of a third rare variant may be speculated, as suggested by Piantanida et al. (1996) and Wallace and Shovlin (2000), who described the existence of another locus accounting for the disease in some HHT patients with pulmonary involvement.

The existence of another locus accounting for disease in some HHT patients with hepatic involvement was described by Cole et al. (2005), a new locus for HHT3 has been mapped at chromosome 5 (5q31.3–5q32) and will probably account for a subset of individuals without mutations in the ENG or ALK-1 genes.

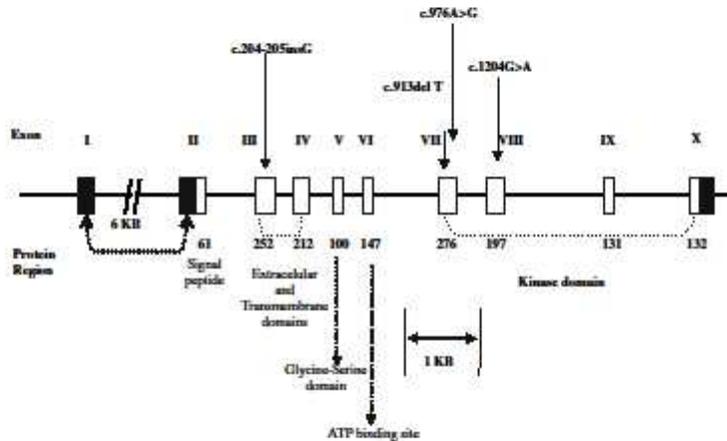
One of the central questions in HHT research has been the cause of the disease phenotype, whether it is due to haploinsufficiency or to dominant-negative interactions between mutant and normal proteins. The current model, therefore, is that the disease phenotype is the result of inherited haploinsufficiency of either



**Fig. 1** Pedigrees of five HHT families: affected individuals are indicated by *black symbols* and unaffected by *white symbols*. *Squares* represented males, *circles* represent females, and a *slashed symbol* indicates a deceased individual. The individuals of the families F1 (I-1 and II-1), F2 (II-1), F3 (III-5 and III-6), F4

(II-5 and III-1), and F5 (III-1) had all been sequenced once, and joined mutations are in Table 2. The other individuals of F3 (I-1, II-1, II-6 and III-2), F4 (I-2, II-4 and III-5), and F5 (I-1, II-1, II-2 and II-3) had not been sequenced and had only been cited by the patients as carrying the illness

**Fig. 2** The diagrammatic representation of the ALK-1 gene. The exons are marked by *boxes unblackened* for the coding regions and *blackened* for the noncoding regions. The ALK-1 sequence alterations are identified during all the length of the gene and include missense and frameshift sequence changes



ALK-1 or ENG genes. Missense mutations that are stably expressed can result in constitutively active proteins or in a gain of function, or they can display a dominant-negative mechanism (Wilkie 1994).

We describe herein three novel mutations in the ALK-1 gene in a group of Brazilian HHT patients. All

of the mutations detected are novel and have not been published previously. From an initial group of ten patients, we identified ALK-1 mutations in five of them, as demonstrated in Table 2 and Fig. 2. As it was not possible to establish specific ALK-1 gene mutations in the other five patients, we performed a genetic

study in the ten patients, and no ENG mutations were identified, suggesting that the phenotypic pattern of HHT may be linked to distinct genetic regulators, such as mutations in other genes or alterations in the promoter region. Since, to date, no mutations in the ALK-1 exon I have been reported, this region was not included in the analysis as described by Attisano et al. (1993), the exon I contains the 5' untranslated sequence and is part of exon II; for ten Dijke et al. (1993), it is a splice variant that appears from the splicing of exon I to a consensus splice junction present 7 bp upstream of the start in exon II. In five alleles, we found frameshift mutations such as a G insertion within the exon 3 (Table 2, Fig. 1 as F1; which encodes the extracellular domain) and the deletion of a single T nucleotide in exon 7 (Table 2, Fig. 1 as F3; a kinase domain). Two missense mutations were also characterized in a highly conserved cysteine-containing region, related to exons 7 and 8: a p.Ile326Val substitution and a p.Gly402Ser substitution (Table 2, Fig. 1 as F4 and F5), respectively.

In one patient, it was possible to characterize the co-inheritance of both the T deletion (p.Ser305fs) and the p.Ile326Val substitution (Fig. 1 as F3). To the best of our knowledge, this is the first description of two mutant alleles in the same individual. One important question is concerned about the genotypic determinants of HHT phenotypes. Commonly, TGF- $\beta$  may activate both the ALK-1 and ENG in association with the receptor II. One possible explanation for the HHT phenotype variability may be the existence of an abnormal ALK1 protein, which might have the ability to bind to the type II receptor without producing signal transduction, either because of kinase domain disruption or due to extracellular domain alteration, leading to ligand-binding failure (Piantanida et al. 1996).

The lack of correlation between the genotype and clinical manifestations of HHT supports the haploinsufficiency model and dominant-negative effect as suggested in McAllister et al. (1995) and Berg et al. (1997). This current model postulates that the disease phenotype may be developed despite the presence of at least a half normal tissue ALK-1 or ENG, which indicates a dominant-negative mechanism (Wilkie 1994; Pece-Barbara et al. 2005).

Several studies have suggested that pulmonary AVMs are more frequent in HHT1 than HHT2 patients.

Our results support the hypothesis that HHT2, like HHT1, is associated with haploinsufficiency, as previously suggested (Piantanida et al. 1996).

We conclude that the rate of mutation detection by the genomic sequence of the ALK-1 gene suggests that

this will be a potential useful diagnostic test for HHT type 2. Moreover, this approach will be particularly important for identifying young HHT patients at high risk of developing severe complications.

**Acknowledgments** We thank Vera Suzigan for proofreading the manuscript. This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPESP (Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo).

## References

- Abdalla SA, Pece-Barbara N, Vera S, Tapia E, Paez E, Bernabeu C, Letarte M (2000) Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet* 9(8):1227–1237
- Attisano L, Carcamo J, Ventura F, Weis FM, Massague J, Wrana JL (1993) Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75(4):671–680
- Berg JN, Guttmacher AE, Marchuk DA, Porteous ME (1996) Clinical heterogeneity in hereditary haemorrhagic telangiectasia: are pulmonary arteriovenous malformations more common in families linked to endoglin? *J Med Genet* 33(3):256–257
- Berg JN, Gallione CJ, Stenzel TT, Johnson DW, Allen WP, Schwartz CE, Jackson CE, Porteous ME, Marchuk DA (1997) The activin receptor-like kinase 1 gene: genomic structure and mutations in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Am J Hum Genet* 61(1):60–67
- Berg J, Porteous M, Reinhardt D, Gallione C, Holloway S, Umasunthar T, Lux A, McKinnon W, Marchuk D, Guttmacher A (2003) Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a questionnaire based study to delineate the different phenotypes caused by endoglin and ALK1 mutations. *J Med Genet* 40(8):585–590
- Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267(27):19027–19030
- Cole SG, Begbie ME, Wallace GM, Shovlin CL (2005) A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet* 42(7):577–582
- Gallione CJ, Klaus DJ, Yeh EY, Stenzel TT, Xue Y, Anthony KB, McAllister KA, Baldwin MA, Berg JN, Lux A, Smith JD, Vary CP, Craigen WJ, Westermann CJ, Warner ML, Miller YE, Jackson CE, Guttmacher AE, Marchuk DA (1998) Mutation and expression analysis of the endoglin gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia reveals null alleles. *Hum Mutat* 11(4):286–294
- Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ (1993) 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):10325–10329
- Gougos A, Letarte M (1990) Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 265(15):8361–8364
- Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI Jr (1995) Hereditary haemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 333(14):918–924

- Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, Stenzel TT, Speer M, Pericak-Vance MA, Diamond A, Guttmacher AE, Jackson CE, Attisano L, Kucherlapati R, Porteous ME, Marchuk DA (1996) Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* 13(2):189–195
- Kjeldsen AD, Vase P, Green A (1999) Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a population-based study of prevalence and mortality in Danish patients. *J Intern Med* 245(1):31–39
- Klaus DJ, Gallione CJ, Anthony K, Yeh EY, Yu J, Lux A, Johnson DW, Marchuk DA (1998) Novel missense and frameshift mutations in the activin receptor-like kinase-1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Mutations in brief* no. 164. Online. *Hum Mutat* 12(2):137
- Lesca G, Plauchu H, Coulet F, Lefebvre S, Plessis G, Odent S, Riviere S, Leheup B, Goizet C, Carette MF, Cordier JF, Pinson S, Soubrier F, Calender A, Giraud S (2004) Molecular screening of ALK1/ACVRL1 and ENG genes in hereditary haemorrhagic telangiectasia in France. *Hum Mutat* 23(4):289–299
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J et al (1994a) Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 8(4):345–351
- McAllister KA, Lennon F, Bowles-Biesecker B, McKinnon WC, Helmbold EA, Markel DS, Jackson CE, Guttmacher AE, Pericak-Vance MA, Marchuk DA (1994b) Genetic heterogeneity in hereditary haemorrhagic telangiectasia: possible correlation with clinical phenotype. *J Med Genet* 31(12):927–932
- McAllister KA, Baldwin MA, Thukkani AK, Gallione CJ, Berg JN, Porteous ME, Guttmacher AE, Marchuk DA (1995) Six novel mutations in the endoglin gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1 suggest a dominant-negative effect of receptor function. *Hum Mol Genet* 4:1983–1985
- Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S, Li E (2000) Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(6):2626–2631
- Olivieri C, Mira E, Delu G, Pagella F, Zambelli A, Malvezzi L, Buscarini E, Danesino C (2002) Identification of 13 new mutations in the ACVRL1 gene in a group of 52 unselected Italian patients affected by hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 39(7):E39
- Pece-Barbara N, Vera S, Kathirakamthamby K, Liebner S, Di Guglielmo GM, Dejana E, Wrana JL, Letarte M (2005) Endoglin null endothelial cells proliferate faster and are more responsive to transforming growth factor beta1 with higher affinity receptors and an activated Alk1 pathway. *J Biol Chem* 280(30):27800–27808
- Piantanida M, Buscarini E, DellaVecchia C, Minelli A, Rossi A, Buscarini L, Danesino C (1996) Hereditary haemorrhagic telangiectasia with extensive liver involvement is not caused by either HHT1 or HHT2. *J Med Genet* 33(6):441–443
- Plauchu H, de Chadarevian JP, Bidaud A, Robert JM (1989) Age-related clinical profile of hereditary haemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet* 32(3):291–297
- Porteous ME, Burn J, Proctor SJ (1992) Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical analysis. *J Med Genet* 29(8):527–530
- Sawabe M, Arai T, Esaki Y, Tsuru M, Fukazawa T, Takubo K (2001) Three-dimensional organization of the hepatic microvasculature in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Arch Pathol Lab Med* 125(9):1219–1223
- Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faugnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, Kjeldsen AD, Plauchu H (2000) Diagnostic criteria for hereditary haemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* 91(1):66–67
- Shovlin CL, Hughes JM, Scott J, Seidman CE, Seidman JG (1997) Characterization of endoglin and identification of novel mutations in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet* 61(1):68–79
- ten Dijke P, Ichijo H, Franzen P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin CH, Miyazono K (1993) Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* 8(10):2879–2887
- Trembath RC (2001) Mutations in the TGF-beta type 1 receptor, ALK1, in combined primary pulmonary hypertension and hereditary haemorrhagic telangiectasia, implies pathway specificity. *J Heart Lung Transplant* 20(2):175
- Vincent P, Plauchu H, Hazan J, Faure S, Weissenbach J, Godet J (1995) A third locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12q. *Hum Mol Genet* 4(5):945–949
- Wallace GM, Shovlin CL (2000) A hereditary haemorrhagic telangiectasia family with pulmonary involvement is unlinked to the known HHT genes, endoglin and ALK-1. *Thorax* 55(8):685–690
- Wilkie AO (1994) The molecular basis of genetic dominance. *J Med Genet* 31(2):89–98