



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DALILA AVILA SILVA

**Validação de mutações no gene *COL1A1*
detectadas por SSCP em pacientes com
Osteogênese Imperfeita do Espírito
Santo**

VITÓRIA

2015

DALILA AVILA SILVA

Validação de mutações no gene *COL1A1* detectadas por SSCP em pacientes com Osteogênese Imperfeita do Espírito Santo

Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

VITÓRIA

2015

DALILA AVILA SILVA

Validação de mutações no gene *COL1A1* detectadas por SSCP em pacientes com Osteogênese Imperfeita do Espírito Santo

Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em ____ de Dezembro de 2015.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Flávia de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Maria do Carmo Pimentel Batitucci
Universidade Federal do Espírito Santo

Mestre Marcos Vinícius Dornelas de Moraes
Universidade Federal do Espírito Santo

Dedico aos meus pais e minha família por todo o suporte e por nunca duvidarem que eu chegaria até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força a mim concedida para superar todos os obstáculos e pela oportunidade de concluir minha graduação;

Aos meus pais que nunca mediram esforços para que eu pudesse estudar e ter o meu diploma. Este sonho também é deles;

Ao meu irmão por todo o amor e carinho que me sustentavam nos dias difíceis;

Ao restante da minha família, avó, tios, tias, padrinho, madrinha e primos por sempre estarem ao meu lado em qualquer situação e pela ajuda concedida em todos os momentos em que precisei;

Aos amigos que fiz durante a minha graduação, especialmente Niliene Souza e Jaqueline Meneghel, que foram as minhas pilasstras de sustentação quando tudo parecia ruim;

Ao Renner Buzatto pela ajuda na formatação desta monografia;

A toda a equipe do NGHМ-UFES, especialmente Maíra, Lígia, Daniela, Gillian e Aline pela companhia do dia-a-dia e por partilharem de alegrias e decepções na realização deste trabalho;

Um agradecimento especial ao Marcos Moraes, sem o qual eu não teria desenvolvido toda a parte prática aqui descrita. Por toda a ajuda dada em cada momento em que precisei;

Agradeço a minha orientadora, professora Flávia de Paula, por todos os ensinamentos e aprendizados, por ter me guiado por tantos anos até aqui, sempre com toda paciência e disponibilidade em ajudar e por toda a contribuição na minha formação acadêmica.

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo”.

(Winston Churchill)

RESUMO

A Osteogênese Imperfeita (OI) é causada por uma má formação dos ossos, consequente da produção defeituosa do colágeno tipo I, o principal componente proteico estrutural dos ossos. Essa falha, na maioria das vezes, é causada por mutações autossômicas dominantes nos genes *COL1A1* ou *COL1A2*. A OI não possui cura, mas existe tratamento farmacológico que reduz a fragilidade óssea e diminui o número de fraturas dos pacientes. Este projeto teve como objetivo validar resultados previamente obtidos de detecção de mutações em diferentes regiões do gene *COL1A1* em pacientes com Osteogênese Imperfeita (OI) do Espírito Santo. Essas validações foram obtidas por meio da utilização de enzimas de restrição que cortam de forma diferenciada o alelo normal e o alelo alterado e por meio do desenho de primers alelo-específicos. As alterações possíveis de se identificar através de endonucleases de restrição foram encubadas a 37°C por cerca de 15 horas e houve cortes diferenciados entre os alelos normais e os alelos alterados conforme esperado. As confirmações obtidas através de oligonucleotídeos alelo-específicos foram realizadas pela verificação, em gel de Agarose, da amplificação ou não dos fragmentos de interesse. Os estudos prévios identificaram sete mutações patogênicas pontuais e em heterozigose, todas associadas com a expressão clínica da OI: quatro em regiões exônicas e três em regiões intrônicas do gene *COL1A1* e através deste trabalho foi possível validar seis destas mutações. Com essas confirmações, por meio de técnicas diferenciadas das utilizadas previamente, há maior riqueza de resultados para futuras publicações em meios científicos.

Palavras-Chave: Mutações Patogênicas, Enzimas de Restrição, Validação de Resultados, Osteogênese Imperfeita, colágeno tipo I.

ABSTRACT

Osteogenesis imperfecta (OI) is caused by a poor formation of bone, which is due the defective collagen type I production, the main structural protein component of the bones. This failure is caused, most of the time, by mutations in the dominant autosomal genes *COL1A1* or *COL1A2*. The OI has no cure, but there is pharmacological treatment that reduces bone fragility and decreases the number of fractures of the patients. This project aimed to validate the results previously obtained for the detection of mutations in different regions of the *COL1A1* gene in patients with Osteogenesis imperfecta (OI) of Espírito Santo. These validations were obtained by the use of allele-specific oligonucleotides and restriction enzymes that cut differently the normal allele and the mutant allele. The digestion with restriction endonucleases was done at 37°C for approximately 15 hours. The digested products were able to differentiated between the normal allele and the mutant alleles, as expected. The confirmations obtained through allele-specific oligonucleotides were carried out in agarose gel to check the amplification or not of the fragments of interest. Previous studies have identified seven pathogenic mutations in heterozygous, that are punctual and all are associated with the clinical expression of OI: four in exon regions and three in intron regions of gene *COL1A1*. Through the present study, it was possible to validate six of these mutations. With these confirmations, using different techniques of previously used, it could contribute to enhance knowledge of the disease for future science publications.

Key Words: Pathogenic Mutations, Restriction Enzymes, Validation of Results, Osteogenesis Imperfecta, Collagen Type I.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura do procolágeno tipo I _____Pág. 17
- Figura 2 - Eletroferogramas de Pacientes com Mutações em $\alpha 1(I)$ _____Pág. 22
- Figura 3 - Digestão do exon 16 pela enzima HphI_____Pág. 27
- Figura 4 - Digestão do exon 45 pela enzima BglII_____Pág. 27
- Figura 5 - Uso de primers alelo-específicos com sequências alteradas (mutadas) e normais _____Pág. 28

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Tipos de OI causados por defeitos nos genes, e nas proteínas relacionadas ao colágeno que eles codificam _____Pág.16

Quadro 2 - Relação de Pacientes com mutações identificadas no gene *COL1A1* _Pág.21

Quadro 3 - Descrição das mutações identificadas _____Pág. 21

Quadro 4 - Enzimas de Restrição selecionadas para o estudo através da ferramenta *online* NEBcutter V2.0. _____Pág. 23

Quadro 5 - Sequências dos primers desenhados. _____Pág.25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padronização dos pares de primers desenhados _____ Pág. 25

SUMÁRIO

1 – Introdução	13
1.1 – Osteogênese Imperfeita.....	13
1.2 – Tipos de OI	14
1.3 – Colágeno Tipo I	17
1.4 – COL1A1	19
2 – Material e Métodos	20
2.1 – Amostra	20
2.2 – Levantamento das Mutações	21
2.3 – Endonucleases de Restrição	23
2.4 – Oligonucleotídeos alelo – específicos (ASO)	24
3 – Resultados	26
4 – Discussão	28
5 – Conclusão	31
6 – Referências	33

1 – Introdução

1.1 – Osteogênese Imperfeita

A Osteogênese Imperfeita (OI) é uma desordem hereditária do colágeno tipo I caracterizada por baixa produção e fragilidade óssea. A severidade da doença varia muito, desde fraturas intra-uterinas e morte perinatal à formas muito leves, sem fraturas. Manifestações extra-esqueléticas típicas também estão associadas com a doença. Estas incluem esclera azulada, dentinogênese imperfeita, hiperlassitude de ligamentos e pele, deficiência auditiva e presença de ossos wormianos em radiografias do crânio (MICHELL et al., 2007).

A manifestação clínica da OI, representada principalmente pela fragilidade do tecido ósseo, é decorrente de um profundo impacto das mutações nos genes associados ao colágeno tipo I sobre as estruturas ósseas, uma vez que o colágeno tipo I é a principal proteína constituinte dos ossos (HUBER, 2007).

A heterogeneidade clínica observada na doença pode ser explicada, pelo menos em parte, pela heterogeneidade de *locus* e alélica, nos quais os fenótipos podem variar de acordo com a cadeia do procolágeno tipo I acometida e com o tipo e localização da mutação no *locus* (NUSSBAUM et al., 2008).

O diagnóstico da doença pode ser feito ainda com a criança no útero da mãe (neonatal) ou após o nascimento, caso haja suspeita de OI (pós-natal). O diagnóstico pré-natal é feito através de ultrassonografias, a partir da 17ª semana de gestação, estudos radiográficos do abdômen materno, ressonância magnética, além de procedimentos invasivos que detectem anormalidades sugestivas de OI (reduzida mineralização do crânio, curvatura, encurtamento e/ou fraturas dos ossos longos). A presença dessas características clínicas é uma importante razão para um encaminhamento para diagnóstico molecular da OI. É possível também a análise da síntese do prócolágeno em células do líquido amniótico. O diagnóstico pós-natal é feito através de radiografias na criança suspeita de possuir OI. Fraturas recorrentes e/ou inexplicáveis, baixa concentração de massa óssea, de preferência com exclusão de causas secundárias, um histórico familiar de OI e pedido de confirmação de diagnóstico clínico, são todas razões para um encaminhamento para diagnóstico molecular da OI. Dependendo da idade de apresentação dos sintomas de OI, pode ser difícil a distinguir de outras doenças genéticas, como por exemplo, Síndrome de Ehlers-Danlos tipo Arthrochalasia, dentinogênese imperfeita isolada, esclerótica azulada e fragilidade da córnea, hipofosfatasia, e causas não genéticas de fraturas e osteoporose juvenil idiopática. Apenas o método de biologia molecular

e o estudo genético podem confirmar o diagnóstico (VAN DIJK et al., 2012; SOUZA et al., 2006).

A incidência de OI nas populações mundiais é variável de 1/21.000 a 1/50.000 nascidos. Durante muito tempo, o tratamento desta doença limitou-se às eventuais correções cirúrgicas das deformidades, todavia, o procedimento cirúrgico nesses pacientes era complicado devido à fragilidade intrínseca dos ossos. Ultimamente, o uso de fármacos, como os bifosfonatos, pamidronato e alendronato, mudou a qualidade de vida dos pacientes de OI, pois reduzem a reabsorção óssea, evento normal do metabolismo ósseo, fortalecendo a estrutura óssea e reduzindo o número de fraturas dos pacientes (NUSSBAUM et al., 2008). No Brasil, o tratamento da OI é disponibilizado pelo SUS desde 2001, com a instituição da Portaria GM 2305/2001 (BRASIL, 2001).

1.2 – Tipos de OI

A divisão clássica da OI foi proposta por Silienceet al., (1979) levando em consideração os aspectos clínicos e radiológicos da doença. Por apresentar grande heterogeneidade clínica, estes autores categorizaram a doença em quatro tipos que são utilizados na literatura até hoje, como descrito abaixo:

O tipo I é considerado a forma leve da OI. Caracterizado por estatura normal, esclera azulada e dentinogênese imperfeita. As primeiras fraturas podem ocorrer no nascimento ou ao vestir as primeiras fraldas. Mais frequentemente as primeiras fraturas ocorrem quando a criança começa a andar e principalmente, ao cair. As fraturas ocorrem geralmente algumas vezes por ano e diminuem a frequência na puberdade. Muitas vezes a frequência dessas fraturas aumenta novamente na idade adulta, especialmente em mulheres pós-menopausa e em homens acima de cinquenta anos (STEINER et al., 2005).

O tipo II é considerado a forma perinatal letal da doença. Ainda no útero, há o aparecimento de graves e longas deformidades ósseas, incluindo fraturas nas costelas que podem levar a um comprometimento respiratório e eventualmente a morte. O peso e o comprimento do feto são reduzidos em relação à semana gestacional. Nestes casos podem ocorrer abortos espontâneos com os fetos mortos ainda no útero ou no período neonatal. Os indivíduos que se encaixam nesta classificação possuem esclera azulada e o tecido conjuntivo extremamente frágil. Devido à má mineralização óssea, o crânio é grande e frágil. Mais de 60% das crianças afetadas morrem no primeiro dia; 80% morrem ainda na primeira semana e

a sobrevivência para além de um ano é extremamente rara e geralmente envolve intenso e contínuo suporte. (BYERS et al., 1988).

O tipo III é a forma grave da doença, porém a qual o indivíduo acometido consegue sobreviver ao período neonatal. É caracterizado por severa e progressiva deformidade esquelética que pode ter início logo no nascimento. Podem ocorrer múltiplas fraturas no nascimento e o indivíduo pode sofrer frequentes fraturas após o período neonatal, durante sua vida, devido à natureza altamente frágil dos seus ossos. A incidência de fratura continua elevada mesmo na vida adulta. Os indivíduos têm severamente baixa estatura e por causa de sua deformidade e fragilidade óssea, são frequentemente confinados a cadeira de rodas. A dentinogênese imperfeita é comumente presente nestes pacientes (ROUGHLEY et al., 2003).

A OI do tipo IV apresenta variabilidade fenotípica. Os pacientes podem apresentar desde sintomas graves a tão suaves que pode ser difícil fazer o diagnóstico. As principais características dos pacientes com OI do tipo IV são dentinogênese imperfeita, que é comum, mas pode ser leve, perda de audição na fase adulta, esclera normal a acinzentada. A estatura é variável e pode ocorrer impressão basilar (BASEL et al., 2009).

Mutações que levam a uma redução quantitativa da produção de colágeno tipo I estruturalmente normal resultam num fenótipo mais leve de OI (OI tipo I). Mutações que causam alterações estruturais em uma das cadeias do prócolágeno tipo I podem afetar a associação da cadeia, a formação da tripla hélice, a secreção e/ou formação fibrilar, e geralmente resultam em fenótipos mais graves, incluindo o fenótipo perinatal letal (OI tipo II) (BALDRIDGE et al., 2008).

A classificação original de Sillence et al. (1979) inclui quatro tipos de OI causados por mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2*. Porém nos últimos anos, um número de genes não colágenos, cujos produtos de proteína interagem com o colágeno, tem sido identificados como causadores das formas raras de OI resultando num padrão de herança autossômico recessivo. Dentre eles estão *SERPINF1*, *CRTAP*, *P3H1*, *CyPB*, *HSP47*, *FKBP65*, *TMEM38B*, *SP7*, *BMP1* e *IFITM5*. Com estas descobertas, novas formas de OI têm surgido. Atualmente a classificação molecular genética da OI contem tipos que incluem tanto o padrão de herança autossômico dominante como o autossômico recessivo e exhibe ampla variação de severidade clínica (MARINI, BLISSETT, 2013).

De acordo com as recentes descobertas, defeitos nos genes *IFITM5* e *SERPINF1* resultam nos tipos V e VI de OI via insuficiência na mineralização óssea, enquanto que defeitos nos genes *CRTAP*, *LEPRE1* e *PP1B* causam os tipos VII a IX de OI via modificação pós-translacional defeituosa no colágeno. Defeitos nos genes *SERPINH1* e *FKBP10* causam

os tipos X e XI de OI devida a comprometimento da função das chaperonas, defeitos nas dobras e outros processos envolvendo o colágeno, enquanto defeitos no SP7/OSX, WNT1, TMEM38B e CREB3L1, perturbam o desenvolvimento do osteoblasto. Por último, a ausência da C-propeptidase BMP1 do colágeno tipo I causa o tipo XII de OI devido à alteração na maturação/ processamento do colágeno (MARINI et al., 2014). As características de cada tipo de OI descrito estão presentes no Quadro 1.

Quadro 1 – Tipos de OI causados por defeitos nos genes, e nas proteínas relacionadas ao colágeno que eles codificam.

Padrão de Herança	Tipo de OI	Gene Defeituoso	Proteína Defeituosa	Mecanismo defeituoso	Incidência	
Autossômico Dominante	I	<i>COL1A1</i>	Colágeno $\alpha 1(I)$ / $\alpha 2(I)$	Quantidade de colágeno	85-90% dos casos	
	II	<i>COL1A1 OU COL1A2</i>	Colágeno $\alpha 1(I)$ / $\alpha 2(I)$	Estrutura do colágeno		
	III	<i>COL1A1 OU COL1A2</i>	Colágeno $\alpha 1(I)$ / $\alpha 2(I)$			
	IV	<i>COL1A1 OU COL1A2</i>	Colágeno $\alpha 1(I)$ / $\alpha 2(I)$			
	V	<i>IFITM5</i>	BRIL			Mineralização da matriz
Autossômico Recessivo	VI	<i>SERPINF1</i>	PEDF	3-hidroxilação do colágeno		
	VII	<i>CRTAP</i>	CRTAP			
	VIII	<i>LEPRE1</i>	P3H1			
	IX	<i>PPIB</i>	CyPB			
	X	<i>SERPINH1</i>	HSP47	Comprometimento da função das chaperonas		
	XI	<i>FKBP10</i>	FKBP65	Processamento do colágeno		
	XII	<i>BMP1</i>	BMP1/mTLD			
	Sem classificação	<i>SP7/OSX</i>	SP7/OSTERIX			Desenvolvimento do osteoblasto
		<i>WNT1</i>	WNT1			
		<i>TMEM38B</i>	TRIC-B			
<i>CREB3L1</i>		OASIS				

Fonte: Adaptado de MARINI et al., 2014.

Embora a presente literatura descreva até o tipo XII de OI, no banco de dados de mutações de Osteogênese Imperfeita (<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/>) já estão descritos até o tipo XV de OI, devido aos novos genes que têm sido descobertos como causadores de OI. Manteremos neste trabalho a classificação original de Silence et al., (1979) durante todo o desenvolvimento do mesmo.

1.3 – Colágeno Tipo I

O colágeno tipo I é a principal proteína estrutural do corpo, pois é responsável por cerca de 80% do teor proteico dos ossos. Ele tem uma estrutura em tripla hélice consistindo de um super-enrolado de três cadeias polipeptídicas, duas cadeias $\text{pro}\alpha 1$ (I) e uma cadeia $\text{pro}\alpha 2$ (I) (Figura 1) (STEPHEN et al., 2014).

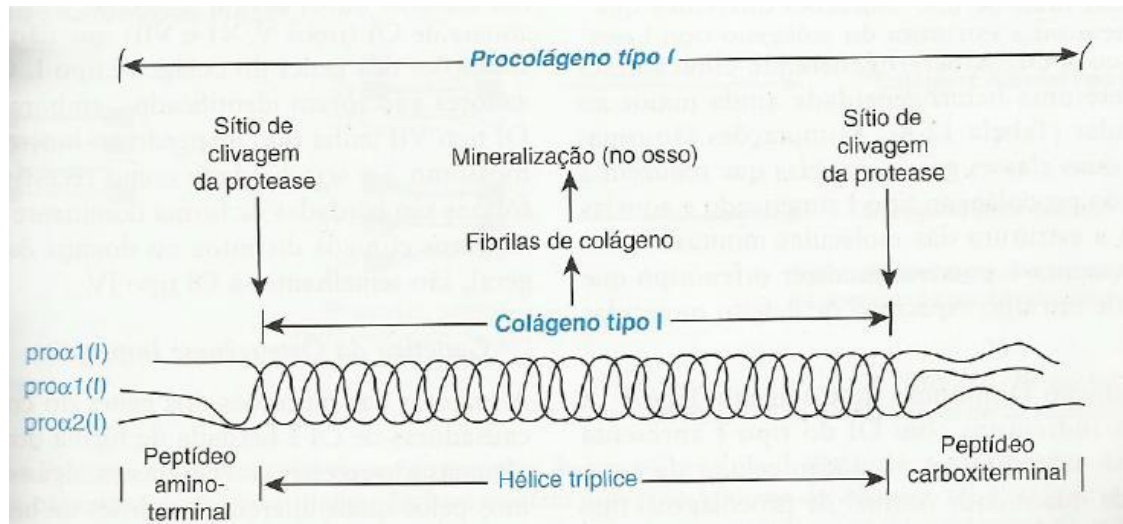


Figura 1 – Estrutura do procolágeno tipo I. Cada cadeia de colágeno é feita como uma hélice tríplice de procolágeno encontrado no espaço extracelular. Os domínios amino e carboxi-terminal são clivados extracelularmente para formar o colágeno. As fibrilas de colágeno maduras são então organizadas e, no osso, mineralizadas. O prócolágeno tipo I é composto por duas cadeias $\text{pro}\alpha 1$ (I) e uma cadeia $\text{pro}\alpha 2$ (I). Fonte: Retirado de NUSSBAUM, R. L., McINNES, R. R., WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson – Genética Médica**. 7 ed. Editora Elsevier Medicina Brasil, 2008.

As proteínas compostas por subunidades, como o colágeno, são frequentemente sujeitas a mutações que impedem a associação das subunidades por alteração na interface da subunidade (NUSSBAUM et al., 2008).

O colágeno tipo I é inicialmente sintetizado como uma cadeia pró-alfa, com um propeptídeo em cada extremidade (N-propeptídeo e C-propeptídeo). Os propeptídeos são necessários para a associação da cadeia pró-alfa e a formação da tripla hélice que se inicia no propeptídeo carboxi-terminal e se estende para o propeptídeo amino-terminal como um zíper (AMOR, 2011).

As cadeias de pró-colágeno são formadas de 338 repetições ininterruptas de Gly-X-Y, onde o aminoácido prolina frequentemente está na posição X, e a hidroxiprolina ou hidroxilisina, na posição Y. A glicina (Gly), o menor aminoácido, é a única unidade compacta o suficiente para ocupar a posição axial da hélice e, conseqüentemente as mutações que substituem essas glicinas por outro aminoácido são altamente desorganizadoras da estrutura

helicoidal. Estas repetições tripeptídicas conferem a estabilidade necessária à molécula para que a proteína seja produzida juntamente com mudanças pós-traducionais que ocorrem no retículo endoplasmático (NUSSBAUM et al., 2008; MARINI et al., 2007; WILLAERT et al., 2009).

As repetições interruptas do tripeptídeo Gly-X-Y são flanqueadas pelos propeptídeos de ambas as extremidades amino e carboxi-terminal. Uma tripla hélice de glicina, a cada terceira posição da cadeia, é essencial, pois este é o único resíduo suficientemente pequeno para ser acomodado dentro do aspecto estericamente restringido do interior da hélice. Os resíduos que são substituídos por glicina rompem, temporariamente, a dobra e a propagação da hélice, expondo as três cadeias ao excesso de hidroxilação (ENGEL e PROKOP, 1991).

Diversas mutações em genes das cadeias codificantes de colágeno já foram descritas em indivíduos com osteogênese imperfeita. Embora não exista uma clara correlação genótipo-fenótipo, de modo geral, as mutações associadas à diminuição da quantidade de colágeno tipo I estão associadas ao fenótipo de osteogênese imperfeita tipo 1. Por outro lado, mutações associadas à alteração da qualidade do colágeno sintetizado estão associadas aos fenótipos de osteogênese imperfeita tipos 2, 3 e 4 (COLE, 1997; LUND et al., 1999). Aproximadamente 75-80% das alterações no colágeno estão relacionadas a mutações de ponto que substituem o aminoácido glicina (LIMA, 2010).

Estudos sugerem que mais de 90% dos pacientes com OI possuem mutações autossômicas dominantes em um dos dois genes responsáveis pela formação do colágeno tipo I, *COL1A1* e *COL1A2*, responsáveis por codificar as subunidades pro-alfa 1(I) e pro-alfa 2(I), respectivamente (KUIVANIEMI et al., 1991).

Existem duas classes de mutações no colágeno tipo I que resultam em OI: aquelas que causam um defeito quantitativo, resultado da síntese parcial (50%) da quantidade normal de pró-colágeno tipo I, e aquelas que resultam na síntese de moléculas de colágeno com anormalidades estruturais. As mutações que afetam $\alpha 1(I)$ costumam originar fenótipos clínicos mais graves daqueles observado em $\alpha 2(I)$, uma vez que o trímero do colágeno tipo I consiste de duas cadeias $\alpha 1(I)$, mas apenas de uma cadeia $\alpha 2(I)$ (MARINI et al., 2007; RAUCH et al., 2010).

1.4 – COL1A1

O gene *COL1A1*(OMIM 120150) está localizado no cromossomo 17q21.33 e possui 18.609 pares de base distribuídos em 52 exons e codifica a cadeia de pro-colágeno $\alpha 1$ da proteína de colágeno tipo I.

Uma vez que o colágeno tipo I consiste em duas cadeias pro α -1 e apenas uma cadeia pro α -2, uma mutação no gene *COL1A1* pode afetar a função da molécula de colágeno mais do que uma substituição semelhante no gene *COL1A2*, resultando assim numa forma de OI mais grave, por exemplo (LUND et al., 1997).

São encontradas mutações patogênicas ao longo de todo gene (DALGLEISH, 1998). Atualmente estão descritas junto ao banco de dados *online* da OI871 variantes genéticas para o gene *COL1A1*. As mutações neste gene resultam nos tipo I-IV de OI, além da síndrome de Ehlers-Danlos e doença de Caffey.

Estudos sobre OI vem sendo realizados desde 2006 no Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM – UFES) coordenado pela Prof.^a Flavia de Paula, envolvendo genes que causam herança autossômica dominante (*COL1A1* e *COL1A2*) e herança autossômica recessiva (*LEPRE-1*, *CRTAP* e *PPIB-2*), todos com coletas de pacientes do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, Vitória-ES. Estudos prévios realizados no NGHM - UFES identificaram sete mutações no gene *COL1A1* por meio de técnica triagem de mutações (Polimorfismo conformacional de fita simples, SSCP) e sequenciamento nestes pacientes. Entretanto é importante validar estes resultados, por meio de técnicas de biologia molecular independentes a fim de se obter dados mais completos em futuras publicações no meio científico.

Por ser o gene que mais influencia a OI, é importante conhecer o padrão de mutações do gene *COL1A1* para possibilitar o desenvolvimento de estratégias otimizadas de diagnóstico molecular desta doença. Além, disto a identificação e posterior validação do gene mutado permite que seja realizado um aconselhamento genético mais eficaz para os familiares dos pacientes, contribuindo com a prevenção de novos casos da doença na população.

O presente trabalho objetiva fazer um levantamento das mutações identificadas no gene *COL1A1* em pacientes com osteogênese imperfeita do estado do Espírito Santo, detectadas por meio de triagem de mutações e sequenciamento, e validar esses resultados, com a utilização de técnicas diferenciadas das utilizadas previamente.

2- Material e Métodos

2.1 – Amostra

Este estudo foi elaborado em consonância com o estabelecido na Resolução CNS/MS Nº. 196/96 e suas complementares. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória de Vitória – ES, e encontram-se registrados sob o número 37/2005.

O estudo de detecção das mutações (MORAES, 2011) compreendeu 33 famílias não aparentadas, das quais 25 representam casos esporádicos. Os demais são casos familiares onde ocorre a recidiva da doença na família.

O diagnóstico e classificação da OI, para cada paciente, foram estabelecidos por um corpo clínico especializado, constituído por pediatras (Dr. Valentim Sipolatti e Dr^a. Vanda Regina Rangel Nunes), um ortopedista (Dr. Akel Nicolau Akel Júnior) e um geneticista clínico (Dr^a. Maria Regina Galveias Oliveira Rebouças), com base nos achados clínicos e radiológicos, incluindo histórico familiar e ocorrência de fraturas ósseas. Foi adotada a classificação clínica tradicional que inclui os tipos I, II, III e IV, descrita por Silience e colaboradores (1979). Contudo, o estudo foi direcionado apenas aos tipos I, III e IV em razão da dificuldade de classificação clínica e coleta de amostras para os demais tipos (II, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI e XII).

Foram coletados entre 2 a 5 ml de sangue periférico de 33 pacientes com OI não consanguíneos (25 casos esporádicos), em tubos de coleta a vácuo contendo EDTA 5%, entre os anos de 2006 a 2009, atendidos no Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória de Vitória/ES (HINSG). Assim, a amostra consistiu de 19 indivíduos do sexo masculino e 14 do sexo feminino, totalizando 33 pacientes, com faixa etária variando de 1 a 16 anos, média de 7.90 ±4.55 anos.

2.2 – Levantamento das mutações

As mutações no gene *COL1A1* previamente encontradas, foram detectadas nos pacientes com OI de registro de laboratório C2, C9, C20, C25, C31, C37 e C44 (Figura 2). Os dados clínicos coletados para cada paciente e as mutações identificadas estão descritos nos Quadros 2 e 3.

Quadro 2 - Relação de Pacientes com mutações identificadas no gene *COL1A1*.

Registro	Sexo	Idade	F/E	Tipo da OI	Fraturas	DO
C2	M	14	E	III	19	moderada
C9	F	16	F	I	5	-
C20	M	13	E	III	incontáveis	moderada
C25	F	5	E	I	14	leve
C31	M	16	F	I	2	-
C37	F	2	F	I	4	leve
C44	F	6	E	IV	10	leve

Fonte: Elaborado pela autora.

F: OI familiar; E: OI esporádica; DO: grau da deformidade óssea.

Quadro 3 - Descrição das mutações identificadas.

Registro	Tipo da Mutação	Fragmento	Mutação
C2	<i>frameshit</i> (deleção)	exon 45	c.3239delC
C9	<i>missense</i>	exon 45	c. 3235G>A
C20	<i>splicing</i>	intron 27	c.1875+1G>C
C25	<i>missense</i>	exon 17	c.1138G>T
C31	<i>frameshit</i> (deleção)	exon 40	c.2750delG
C37	<i>splicing</i>	intron 37	c.2559+1G>A
C44	<i>splicing</i>	intron 16	c.1056+1G>A

Fonte: Elaborado pela autora

Após o levantamento das mutações previamente identificadas em pacientes do ES, os seis exons utilizados neste trabalho foram amplificados por Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) segundo Saiki et al.(1985), Mullis et al.(1986) e Innis e Gelfand (1990) para testar o funcionamento dos reagentes. Utilizou-se *primers* específicos do fragmento em análise que anelam em regiões do gene *COL1A1* e os resultados de amplificação foram confirmados por eletroforese em géis de poliacrilamida. Dentre as técnicas de validação (endonuclease de restrição (RFLP), *primers* alelo-específicos (PCR-ASO), clonagem, resequenciamento, etc) de mutações, foram avaliadas as melhores condições em cada caso. Foi dada a preferência para a técnica de endonuclease de restrição.

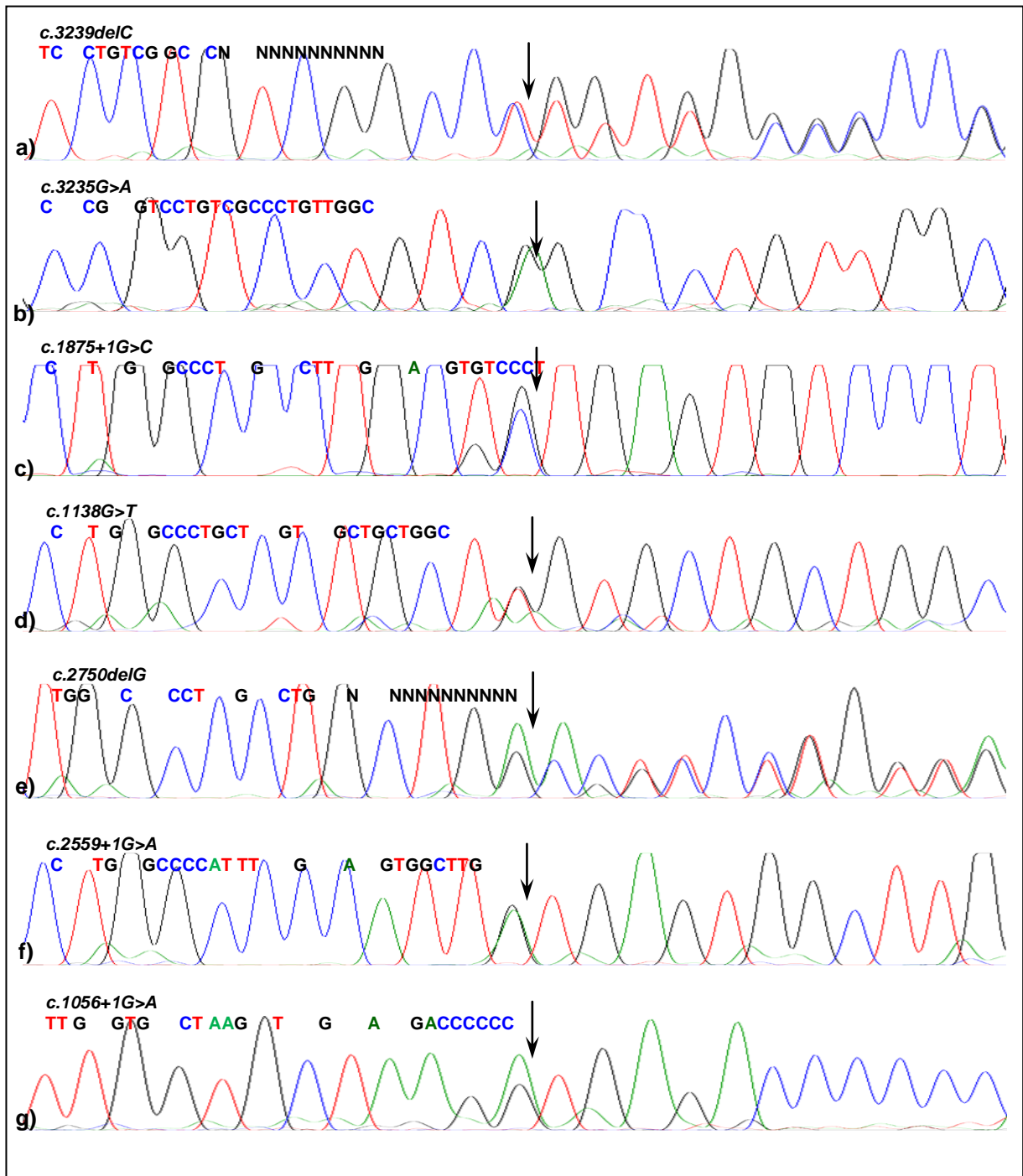


Figura 2 – Eletroferogramas de Pacientes com Mutações em $\alpha 1(I)$. a) Mutação heterozigótica c.3239delC no paciente C2; b) Mutação heterozigótica c.3235G>A no paciente C9; c) Mutação heterozigótica c.1875+1G>C no paciente C20; d) Mutação heterozigótica c.1138G>T no paciente C25; e) Mutação heterozigótica c.2750delG no paciente C31; f) Mutação heterozigótica c.2559+1G>A no paciente C37; g) Mutação heterozigótica c.1056+1G>A no paciente C44. **Fonte:** MORAES, M. V. D. **Triagem de Mutações no Gene COL1A1 em Pacientes com Osteogenesis Imperfecta.** Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia). 2011.

2.3 – Endonucleases de restrição.

Para confirmar as mutações nos determinados exons, foi escolhida, em prioridade, uma adaptação da técnica de RFLP (Polimorfismos nos comprimentos dos fragmentos de restrição). Nesta técnica utilizam-se enzimas de restrição que cortam o DNA em pontos específicos, gerando fragmentos de diferentes tamanhos que são separados e visualizados em forma de bandas. A separação é feita por eletroforese (BARBOSA, 2012). Para que o polimorfismo seja detectado, é necessário que as sequências de nucleotídeos nas fitas de DNA de dois ou mais indivíduos comparados sejam distintas (ANTONINI et al., 2004). Esta técnica frequentemente é utilizada para comparar genomas de dois ou mais indivíduos diferentes, no presente trabalho foi utilizada para diferenciar alelos diferentes (alelo mutado e alelo selvagem) de um mesmo indivíduo.

Através da ferramenta *online*NEBcutter V2.0 (VINCZE, POSFAI, ROBERTS, 2003) foram encontradas as enzimas que promovem cortes diferenciais entre o alelo mutado e o selvagem. Para a mutação c.1875+1G>C, localizada no intron 27 do paciente C20, foi encontrada a enzima Hpy188I, da marca *New England Biolabs* e fornecida pela empresa *Uniscience do Brasil LTDA*. Para a mutação c.1056+1G>A localizada no intron 16 do paciente C44, foi encontrada a enzima HphI da marca *ThermoScientific* e fornecida pela empresa *Sinapse Biotecnologia LTDA*. E para a mutação c.3239delC localizada no exon 45 do paciente C2, foi encontrada a enzima BglII, da marca *Vivantis* e fornecida pela empresa *Biometrix Diagnostica LTDA*. As informações sobre os cortes promovidos pelas enzimas de restrição são apresentadas no Quadro 4.

Quadro 4 - Enzimas de Restrição selecionadas para o estudo através da ferramenta *online* NEBcutter V2.0.

Paciente	Enzima de Restrição	Local da mutação no gene	Tamanho normal do fragmento	Tamanho dos fragmentos gerados após digestão	Alelo que sofre corte pela enzima	Sequência de reconhecimento da enzima
C2	BglII	Exon 45	246pb	129pb e 117pb	normal	gccnnnnnggc
C20	Hpy188I	Intron 27	238pb	140pb e 98pb	mutante	tcnga
C44	HphI	Intron 16	229pb	170pb e 59pb	normal	ggtga

Fonte: Elaborado pela autora.

Para as digestões foram testadas diferentes condições, sendo a condição ideal para ação das enzimas a seguinte: 7,8µl de água ultra pura; 2,0µl de Buffer 10x, 0,2µl de enzima e

10µl de produto de PCR, obtendo-se, portanto 20µl de produto final de digestão. A condição foi utilizada para as três enzimas. Os produtos finais de digestão foram encubados em banho-maria por cerca de 15 horas e as amostras digeridas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% corados com nitrato de prata. Nos géis foram inseridos, além dos produtos de digestão, os produtos de PCR para via de comparação entre os tamanhos dos fragmentos.

2.4 – Oligonucleotídeos alelo-específicos (ASO)

Para os demais exons não foram encontradas enzimas que digeriam de forma diferenciada o fragmento selvagem e o fragmento alterado. Foi preciso, portanto, a escolha de outra técnica viável que validasse as mutações. Foi utilizada então, a técnica de PCR-ASO, descrita por Saiki et al. (1985). Segundo o autor:

A variação na sequência de um alelo pode ser analisada por sondas de hibridização de oligonucleotídeos sintéticos capazes de detectar substituições de uma única base no genoma humano. Um oligonucleotídeo alelo-específico (ASO) vai anelar somente a sequência que coincidir perfeitamente, sendo uma única diferença de bases capaz de prevenir a hibridização, mesmo sobre condições apropriadas.

Dentre os métodos de biologia molecular utilizados para detecção de variação de DNA, apenas a PCR-ASO pode ser aplicada a qualquer mutação de ponto ou pequena deleção, enquanto as outras são dependentes da natureza da mutação e da sequência do DNA circundante (FERRIE et al., 1992).

A técnica utilizada, portanto, consistiu no desenho de dois pares de *primers*, através da ferramenta *online Primer Blast*, para cada mutação a ser confirmada, um específico para o alelo mutante, o outro específico para o alelo selvagem. O desenho foi feito de maneira que o *primer* específico para o alelo mutante terminasse com a base mutada na extremidade 3' e o *primer* específico para o alelo selvagem terminasse com a base normal em sua extremidade 3', funcionando como uma sonda alelo-específica. Este método é usado para detectar mutações específicas. A PCR alelo-específica é uma modificação da Reação em Cadeia da Polimerase, que permite a amplificação específica de sequências que diferem muito pouco, como um único par de bases (CHA et al., 1992). Neste trabalho, ao invés de um único *primer* reverso de sequência conservada, foram utilizados *primers* reversos diferentes para os *primers* normal e mutado devido a dificuldade de desenho destes e ao objetivo de gerar fragmentos de tamanho diferentes no gel de agarose.

As informações sobre os *primers* desenhados constam no Quadro 5. Cada par foi padronizado para escolha da melhor condição que permitisse a visualização de bandas e as

informações de padronização estão na Tabela 1. Foi realizada a técnica de PCR utilizando-se ambos os *primers*, tanto o da sequência normal como o da sequência alterada para ambos os DNAs, tanto de um controle normal (DNA que possui a sequência correta, de acordo com a sequência referência do gene) como de um paciente (DNA com a sequência alterada para a mutação) e de um controle negativo (Ausência de DNA) esperando-se que o par de *primer* com a sequência alterada para a mutação não amplifique o DNA do controle normal. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de Agarose a 3% e as bandas foram visualizadas por meio de um transluminador de ultravioleta. A técnica de gel de agarose foi escolhida para este fim por ser mais rápida e permitir uma boa visualização das bandas que foram amplificadas ou não.

Quadro 5 - Sequências dos *primers* desenhados.

Exon	Alelo	Sequência Forward	Sequência Reverse	Tamanho do fragmento gerado
Exon 17	Normal	TGAGCCTGGCCCCCTGGCCCTGCTG	AGCAACAGGCAAGGACTCTGAGGT	107pb
	Mutado	TGAGCCTGGCCCCCTGGCCCTGCTT	ACATTGGCACCTTTAGCACCAGGC	178pb
Exon 37	Normal	GCTGGACCCCTGGCCCCATTG	CCCTGTAGGAGAGCACAGAGGCAT	111pb
	Mutado	GCTGGACCCCTGGCCCCATTA	GGCTCAACAGAGAGGCGGGTGATA	192pb
Exon 40	Normal	GTGGTGAGACTGGCCCTGCTGGACG	CCGACCACACCACGCTGTCC	258pb
	Mutado	GTGGTGAGACTGGCCCTGCTGGACTC	TTCTCCTTGGCTCCGCCCA	385pb
Exon 45	Normal	TGCTGGTCCCGCCGGTCTGTCTG	CCCTGTTCGCCTGTCTCACCTTGT	208pb
	Mutado	TGCTGGTCCCGCCGGTCTGTCA	GCGGAAGTCCATTGGCATCGAGT	132pb

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 1 - Padronização dos pares de *primers* desenhados.

Primer	DI	D	A	E	EF	Ciclos	MgCl₂	DMSO
E17 Normal			72°C	72°C/15s		35	2.50mM	-
E17 Mutado			72°C	72°C/30s		30	3.50mM	-
E37 Normal			72°C	72°C/30s		30	1.50mM	-
E37 Mutado	94°C	94°C	72°C	72°C/30s	72°C	30	1.50mM	-
E40 Normal	5min	30seg	69°C	72°C/30s	30seg	30	1.50mM	-
E40 Mutado			66°C	72°C/30s		40	2.50mM	5%
E45 Normal			72°C	72°C/30s		30	2.50mM	-
E45 Mutado			66°C	72°C/30s		30	1.50mM	-

Fonte: Elaborado pela autora.

DI: Desnaturação Inicial; **D:** Desnaturação; **A:** Anelamento; **E:** Extensão; **EF:** Extensão final.

3 – Resultados

Os produtos de PCR dos exons 16, 27 e 45, depois de encubados em banho-maria por cerca de 15 horas junto às suas respectivas enzimas de restrição, foram submetidos a corrida eletroforética em gel de Poliacrilamida 10% por 1h40min. Como todas as mutações a serem validadas neste projeto de pesquisa são em heterozigose, um dos alelos do DNA do paciente sempre agirá como alelo normal. Dessa forma após as digestões com enzimas que digerem apenas o alelo normal (HphI e BglII), as amostras dos pacientes apresentarão três bandas de tamanhos diferentes, uma que não será digerida, pertencente ao alelo alterado e de mesmo tamanho do fragmento original, e duas bandas, pertencentes ao alelo normal, que são produtos do corte da enzima. Neste caso de enzimas que digerem o alelo normal, as amostras do controle normal apresentarão apenas duas bandas, já que os dois alelos serão cortados da mesma forma.

Não foi possível a confirmação da mutação do paciente C20 devido a problemas enfrentados com a enzima Hpy188I. A enzima não funcionou e não digeriu nenhuma das amostras testes, portanto, a mesma não foi utilizada nas amostras da pesquisa, pois geraria resultados não confiáveis.

As Figuras 2 e 3 registram a ação das enzimas de restrição em seus respectivos exons. Após a amplificação do exon 16 (Figura 3), que possui um fragmento de 229pb, a enzima HphI digeriu os alelos normais originando bandas de 170pb e 59pb. A amplificação do exon 45 (Figura 4) possui tamanho original de 246pb e a digestão pela enzima BglII no alelo normal, gera uma banda de 129pb e outra de 117pb.

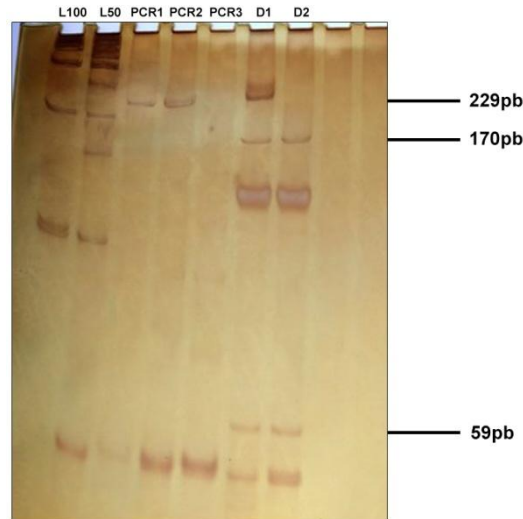


Figura 3 - Digestão do exon 16 pela enzima HphI. **L100:**Ladder de 100pb; **L50:**Ladder de 50pb; **PCR1:** PCR do paciente C44; **PCR2:** PCR do controle normal; **PCR3:** PCR de um controle negativo; **D1:** Digestão do paciente C44; **D2:** Digestão do controle normal.

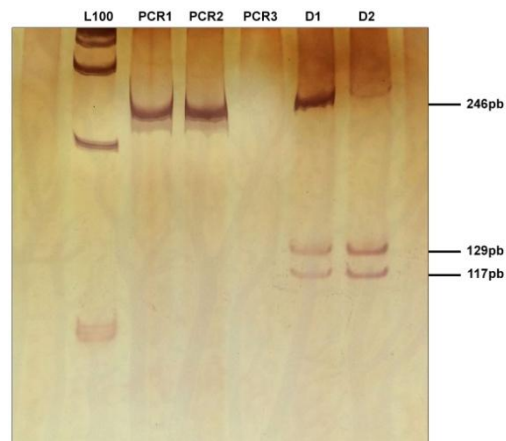


Figura 4 - Digestão do exon 45 pela enzima BglI. **L100:**Ladder de 100pb; **PCR1:** PCR do paciente C2; **PCR2:** PCR do controle normal; **PCR3:** PCR de um controle negativo; **D1:** Digestão do paciente C2; **D2:** Digestão do controle normal.

Os exons que tiveram suas mutações validadas por meio de *primers* alelo-específicos foram submetidos à corrida eletroforética em gel de Agarose 3% por 40 minutos. Novamente, como as mutações são em heterozigose espera-se que os *primers* de sequência normal amplifiquem tanto o DNA do paciente quanto o do controle normal, e os *primers* de sequência alterada amplifiquem somente o DNA do paciente.

A Figura 5 registra as amplificações que ocorreram usando-se os *primers* alelo-específicos. Todas as amplificações ocorrem como esperado, gerando tamanhos de fragmentos ilustrados anteriormente no Quadro 5.

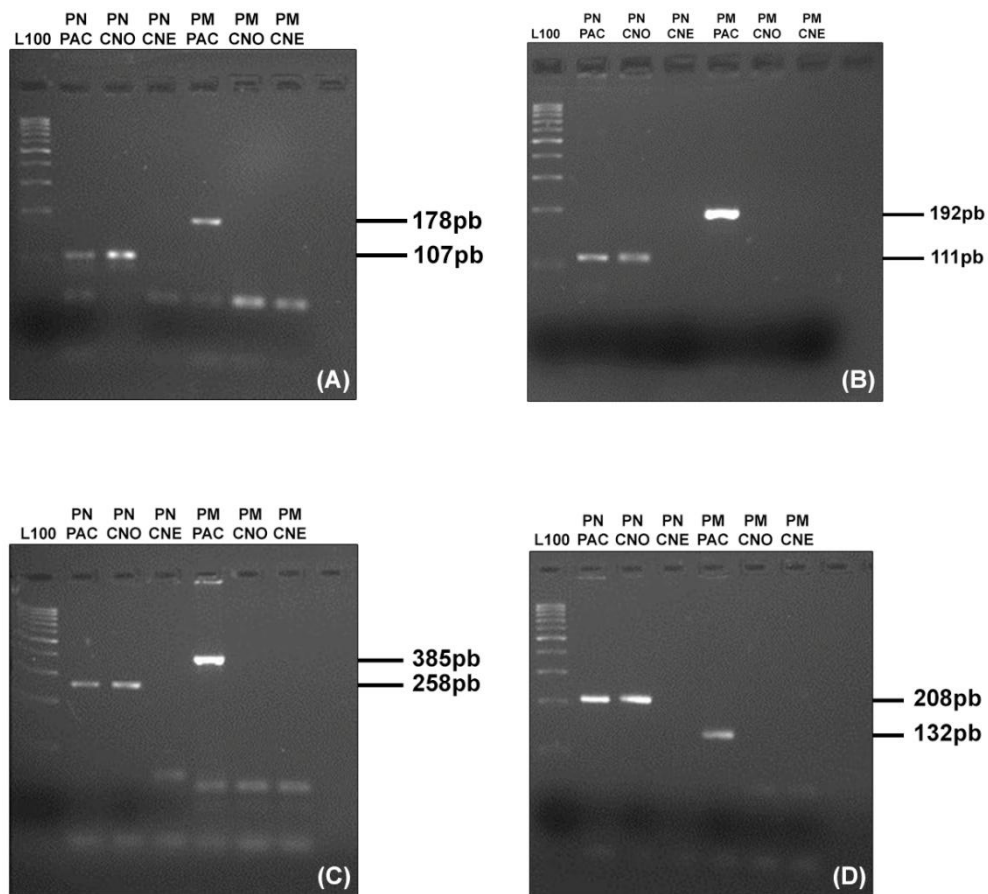


Figura 5 - Uso de *primers* alelo-específicos com seqüências alteradas (mutadas) e normais. Verificação das amplificações dos produtos de PCR. **L100**:Ladder de 100pb; **PN PAC**: PCR com *primer* de seqüência normal e DNA de paciente; **PN CNO**: PCR com *primer* de seqüência normal e DNA de controle normal; **PN CNE**: PCR com *primer* de seqüência normal de controle negativo; **PM PAC**: PCR com *primer* de seqüência mutada e DNA de paciente; **PM CNO**: PCR com *primer* de seqüência mutada e DNA de controle normal; **PM CNE**: PCR, com *primer* de seqüência alterada, de controle negativo. (A) Exon 17, C25; (B) Exon 37, C37; (C) Exon 40, C31; (D) Exon 45, C9.

4 – Discussão

A detecção de mutações patogênicas associadas com a OI, por meio do estudo dos genes estruturais do colágeno tipo I, confirma o diagnóstico de OI. Contudo, um resultado negativo para os genes *COL1A1* ou *COL1A2* pode refletir duas situações críticas: (a) a não detecção da mutação causadora da OI, embora presente; (b) a possibilidade do paciente apresentar uma forma da doença que não está associada a mutações nos genes estruturais do colágeno tipo I, por exemplo, nos genes *LEPRE-1* e *CRTAP*, associados as formas autossômicas recessivas (RAUCH; GLORIEUX, 2004).

A mutação inédita c.3239delC, uma deleção em heterozigose de uma citosina (C), está localizada no fragmento do exon 45 do gene *COL1A1*. Foi identificada no paciente C2 (OI tipo III, esporádica), do sexo masculino, 14 anos de idade, 36 kg, 145 cm, histórico de 19

fraturas, que apresentou deformidades ósseas moderadas e deambulação comprometida, com presença de esclerótica azulada. Não foram observadas manifestações dentárias, comprometimento da visão ou auditivo sob exame clínico. Por se tratar de uma mutação nova, estes dados serão publicados e posteriormente registrados junto ao banco de dados *online* da OI (*The Data base of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations*).

A mutação c.3235G>A, uma transição purínica em heterozigose de uma guanina (G) por uma adenina (A), está localizada no fragmento do exon 45. Foi identificada no paciente C9 (OI tipo I, familiar), do sexo feminino, 16 anos de idade, 54 kg, 155 cm, histórico de 5 fraturas, e que apresentou esclerótica azulada e manifestações dentárias. Não foram observadas deformidades ósseas significativas, comprometimento da visão ou auditiva e deambulação anormal, sob exame clínico. Na literatura científica existem oito relatos da alteração em pacientes com OI tipo I, cinco relatos de pacientes com OI tipo IV, um relato de paciente com OI tipo I/IV e um relato sem identificação do tipo de OI (DALGLEISH, 1998; MARINI et al., 2007).

A mutação c.1875+1G>C está localizada no fragmento no intron 27 e foi identificada no paciente C20 (OI tipo III, esporádica), do sexo masculino, 13 anos de idade, 25 kg, 131 cm, que sofreu inúmeras fraturas (+ de 100: incontáveis), apresentou deformidades ósseas moderadas, manifestações dentárias, esclerótica azulada, visão e deambulação comprometidas (cadeira de rodas), mas sem comprometimento auditivo, sob exame clínico. Estes dados estão atualmente registrados junto ao *Data base of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations* e representam o primeiro relato da alteração em um paciente com OI tipo III, há um outro relato da mutação em um paciente com OI tipo II (BARBIRATO et al., 2009; DALGLEISH, 1998).

Primeiramente descrita por Marini e col. (2007), em um paciente com OI tipo IV, a mutação c.1138G>T, uma transverso em heterozigose de uma guanina (G) codificante da posição 1138 por uma timina (T) (c.1138G>T) está localizada no fragmento do exon 17. No estudo foi identificada no paciente C25 (OI tipo I, esporádica), do sexo feminino, 5 anos de idade, 14kg, 95cm, histórico de 14 fraturas, que apresentou deformidades ósseas leves, manifestações dentárias e deambulação anormal. O exame clínico não revelou comprometimento da visão e da audição ou esclerótica azulada.

A mutação inédita c.2750delG, está localizada no fragmento do exon 40 do gene *COL1A1*. Foi identificada no paciente C31 (OI tipo I, familiar), do sexo masculino, 16 anos de idade, 40kg, 154cm, histórico de duas fraturas e que apresentou esclerótica azulada e comprometimento auditivo, sob exame clínico. Não foram observadas manifestações

dentárias, deformidade de ossos longos, comprometimento da visão e deambulação anormal. Por se tratar de uma mutação nova, estes dados serão publicados e posteriormente registrados junto ao *Data base of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations*.

Já descrita em pacientes com OI tipo III e tipo I, a mutação c.2559+1G>A está localizada no fragmento do intron 37 e foi identificada no paciente C37 (OI tipo I, familiar), do sexo feminino, 2 anos de idade, 12kg, 85cm, histórico de 4 fraturas, que apresentou apenas leves deformidades ósseas e esclerótica azulada, sob exame clínico. Esta alteração foi recentemente registrada ocorrendo em um paciente com OI tipo III (familiar), sexo masculino, 3.5 anos de idade, que apresentou esclerótica azulada e nº de fraturas inferior a 10 (DALGLEISH, 1998; ZHANG et al., 2011).

A mutação c.1056+1G>A está localizada no fragmento do intron 16 e foi identificada no paciente C44 (OI tipo IV, esporádica), do sexo feminino, 6 anos de idade, histórico de 10 fraturas, e que apresentou deformidades ósseas leves, anda com dificuldade e esclerótica azulada. Esta alteração já foi registrada junto ao *Data base of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations*, identificada em um paciente com OI tipo I e um paciente com OI tipo III (MARINI et al., 2007; STEPHEN et al., 2014).

A partir de uma revisão abrangente da literatura científica percebe-se que as publicações sobre OI oriundas do Brasil são escassas, enquanto que no mundo, desde os trabalhos mais importantes divulgados em 1998, mais de 400 pesquisas sobre o tratamento da OI foram publicadas (LIMA, 2014).

No Brasil, a questão da osteogênese imperfeita ganhou maior visibilidade a partir de 2001, quando o tratamento para esta condição foi instituído como uma política pública de saúde (MOREIRA et al., 2011).

Uma vez que o tratamento para OI no Brasil é uma política pública de saúde e que existem centros voltados para o acompanhamento e a prestação de cuidados a esta condição no país, com número significativo de pacientes a eles vinculados - somente no centro de referência do INSMCA/ FIOCRUZ este número ultrapassa 160 pacientes, se torna ainda mais expressivo o pequeno número de estudos brasileiros sobre a doença (LIMA, 2014).

Dentre os trabalhos brasileiros sobre OI publicados em meio científico, grande parte avalia a área clínica da doença (SANTILI et al., 2005; VIEIRA et al., 2006, TEIXEIRA et al., 2008), testando métodos de tratamento médico (WATZL et al., 2009; BARROS et al. 2012), discutindo o diagnóstico (SOUZA et al., 2006), o desenvolvimento motor (LOPES, 2007; MOREIRA, 2011) e a hospitalização dos pacientes (MELLO, MOREIRA, 2010). Poucos são

os trabalhos que investigam a genética da OI no Brasil, o que dificulta uma definição do padrão de mutações dos genes relacionados à doença.

Atualmente constam na literatura quatro trabalhos brasileiros que estudaram o gene *COL1A1* em pacientes com OI, dois deles fazendo parte do mesmo grupo de pesquisa do presente trabalho. Barbirato et al. (2009) descrevem uma mutação no exon 27 do gene causando OI do tipo III (grave). Moraes et al. (2012) relatam a ocorrência de uma mutação no exon 45, resultando na forma leve da doença (OI tipo I). Kaneto et al. (2014) estudaram a expressão do gene *COL1A1* e do precursor de micro RNA miR-29b em pacientes com OI. Encontraram três mutações patogênicas neste gene, sendo uma causadora de OI tipo III (exon 13) e duas mutações causando OI do tipo I (exons 2 e 42). Neste trabalho os autores concluem que a expressão do gene *COL1A1* é significativamente reduzida nos pacientes que possuem OI do tipo I e III. Reis et al. (2005) encontraram 6 mutações em pacientes brasileiros, sendo duas delas resultando em OI do tipo I (exons 19 e 28), uma resultando em OI do tipo II, forma letal (exon 37), uma em OI do tipo III (exons 33/34) e duas mutações resultando em OI do tipo IV (exons 25 e 19). Percebe-se um maior número de casos de OI do tipo I nos estudos moleculares feitos no Brasil, ocorrendo a maioria das mutações na porção final do gene *COL1A1* (exon 25 para frente).

As doenças genéticas no Brasil apresentam, por vezes, padrões de mutações e correlações genótipo/fenótipo que diferem do restante do mundo (SALZANO, 2002). Ainda de acordo com Lima (2014), considerando a raridade da OI, a importância de conhecer seus dados epidemiológicos e clínicos ganha ainda mais peso, uma vez que tais informações irão refletir na melhor abordagem frente ao diagnóstico, tratamento e até mesmo nas consequências sociais de uma determinada enfermidade.

5 – Conclusão

Este estudo validou seis mutações, das sete detectadas previamente por meios da técnica de SSCP e sequenciamento, mostrando que este estudo prévio, realizado por nossa equipe, foi eficiente, já que encontrou as mutações validadas pelo presente trabalho. Sendo que a única mutação não validada foi por motivos técnicos e não de um resultado negativo de validação.

Estes resultados comprovam a eficácia da técnica de SSCP e sequenciamento para triagem de mutações em um gene, mostrando que as mutações encontradas por meio destas técnicas realmente ocorrem nos pacientes com OI envolvidos no estudo. Porém diferentes

parâmetros podem influenciar a capacidade de detecção de mutações pela técnica de SSCP e por este motivo, a técnica pode ter deixado de acusar alguma mutação existente nos exons estudados. De qualquer forma este estudo confirma a existência das mutações identificadas.

O padrão de herança autossômico dominante na doença está, geralmente, associado a alterações nos genes estruturais do colágeno tipo I, *COL1A1* e *COL1A2*. O teste genético molecular para estes dois genes detecta anomalias aproximadamente, em 90% dos indivíduos com histórico de OI dos tipos I, II, III e IV. De acordo com Moraes (2012), a ausência de mutações no gene *COL1A1* nos demais pacientes pode advir (1) da não detecção da mutação causadora da OI pela técnica de SSCP, embora presente; (2) da possibilidade do paciente apresentar a mutação no gene *COL1A2* e, (3) da possibilidade do paciente apresentar um tipo de OI não associada a mutações nos genes estruturais do colágeno tipo I (formas recessivas da doença).

A detecção de mutações patogênicas ao longo de um gene e a posterior confirmação, através de técnicas diferenciadas, dessas mutações, contribui para o aumento de informações a respeito de uma doença, incentivando a compreensão dos seus aspectos clínicos e genéticos incluindo genes que a ela estão associados. Estes estudos podem auxiliar, evitando a ocorrência de novos casos por meio de técnicas de aconselhamento genético.

Os estudos moleculares de OI são extremamente escassos no Brasil, dificultando, desta forma, o estabelecimento de um padrão de mutações nos genes causadores da doença na população brasileira. Novos estudos são necessários para aumentar o entendimento dos aspectos genéticos e formar um padrão de mutações mais preciso na população brasileira, já que esta apresenta, muitas vezes, uma genética diferenciada do restante do mundo. Estes resultados possibilitariam uma maior compreensão também dos aspectos clínicos e radiológicos da doença e poderiam evitar a ocorrência de novos casos de OI por meio de técnicas de aconselhamento genético. O diagnóstico pré-natal nas anomalias congênitas é importante para realização de um aconselhamento genético adequado.

6 - Referências

- AMOR, M B; GLORIEUX, F H; RAUCH, F. Genotype-Phenotype Correlations in Autosomal Dominant Osteogenesis Imperfecta. **Journal of Osteoporosis**, v.2011. Article ID 540178, 9 páginas, 2011.
- ANTONINI, S R C; MENEGHIN S P; URASHIMA, A S. Técnicas básicas de biologia molecular. Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias – Campus de Araras. SP, Jul 2004.
- BALDRIDGE, D; SCHWARZE, U; MORELLO, R; LENNINGTON, J; BERTIN, T K; PACE, J M; PEPIN, M G; WEIS, M; EYRE, D R; WALSH, J; LAMBERT, D; GREEN, A; ROBINSON, H; MICHELSON, M; HOUGE, G; LINDMAN, C; MARTIN, J; WARD, J; LEMYRE, E; MITCHEL, J J; KRAKOW, D; RIMOIN, D L; COHN, D H; BYERS, P H; LEE, B. CRTAP and LEPRE1 mutations in recessive osteogenesis imperfecta. **Human Mutation**, v. 29(12), p. 1435–1442. Dez. 2008.
- BARBIRATO, C; ALMEIDA, M G; MILANEZ, M; SIPOLATTI, V; REBOUÇAS, M R G O; AKEL JR., A N; NUNES, V R R; PERRONE, A M S; ZATZ, M; LOURO, I D; PAULA, F. A novel *COL1A1* gene-splicing mutation (c.1875+1G>C) in a Brazilian patient with osteogenesis imperfecta. **Genetics and Molecular Research**, v. 8 (1), p. 173-178. 2009.
- BARROS, E R; SARAIVA, G L; OLIVEIRA, T P; CASTRO, M L. Safety and efficacy of a 1-year treatment with zoledronic acid compared with pamidronate in children with osteogenesis imperfect. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 5-6, p. 485–491, 2012.
- BASEL, D; STEINER, R D. Osteogenesis imperfecta: Recent findings shed new light on this once well-understood condition. **Genetics in Medicine**, v. 11, p. 375–385. 2009.
- BYERS, P H; TSIPOURAS, P; BONADIO, J F; STARMAN, B J; SCHWARTZ; R C. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta (OI type II): a biochemically heterogeneous disorder usually due to new mutations in the genes for type I collagen. **American Journal of Human Genetics**, v. 42(2), p. 237-248. Fev. 1988.
- CHA, R. S., ZARBL, H., KEOHAVONG, P., THILLY, W. G. Mismatch Amplification Mutation Assay (MAMA): Application to the c-H-ras Gene. **Genome Research**, v. 2, p. 14-20, 1992.
- COLE, W G. Olpadronate reduced fractures in children with osteogenesis imperfecta. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 86A, p.2575. 2004.
- DALGLEISH, R. The Human Collage Mutation Database 1998. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 1, p. 253-255, 1998.
- DALGLEISH, R. The human type I collagen mutation database. **Nucleic Acids Research** v. 25, p. 181-187. 1997.
- ENGEL J; PROCKOP, D. J. The Zipper-Like Folding of Collagen Triple Helices and the Effects of Mutations that Disrupt the Zipper. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry**. Vol. 20: 137-152 (Volume publication date June 1991).

FEERIE, R M; SCHWARZ, M J; ROBERTSON, N H; VAUDIN, S; SUPER, M; MALONEJ, T G; LITTLE, S. Development, Multiplexing, and Application of ARMS Tests for Common Mutations in the CFTR Gene. **American Journal of Medical Genetics**, v. 51, p.251-262, 1992.

HUBER, M. A. Osteogenesis imperfecta. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Edodontics**, v. 103, n. 3, p. 14-20, 2007.

INNIS, M. A. & GELFAND, D. H. Optimization of PCRs. *In: PCR Protocols a guide to methods and applications*. **Academic Press, Inc**, Califórnia USA, p. 3-12, 1990.

KANETO, C M; LIMA, P S P; ZANETTE, D L; PRATA, K L; NETO, J M P; PAULA, F J A; SILVA JR., W A. *COL1A1* and miR-29b show lower expression levels during osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells from Osteogenesis Imperfecta patients. **BMC Medical Genetics**, v. 15, p.45. 2014.

KUIVANIEMI H; TROMP G; PROCKOP D J. Mutations in collagen genes: Causes of rare and some common diseases in humans. **The FASEB Journal**. v.5, p.2052–2060. 1991.

LIMA, M A F D. **Aplicação clínica da evidência científica: o caso da Osteogênese Imperfeita e o tratamento medicamentoso com bifosfonatos**. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Fernandes Figueira. Pós Graduação em Saúde da Criança e da Mulher. Rio de Janeiro, mar 2010.

LIMA, M A F D; HOROVITZ, D D G. Contradições das políticas públicas voltadas para doenças raras: o exemplo do Programa de Tratamento da Osteogênese Imperfeita no SUS. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, p. 475-480, Fev. 2014.

LOPES, P B. **Estudo Sobre o Desenvolvimento Motor Grosso de Crianças do Centro de Referência para Osteogênese Imperfeita do Instituto Fernandes Figueira/FIOCRUZ/RJ**. Dissertação (Pós-Graduação em Saúde da Criança e da Mulher). Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Fernandes Figueira. Rio de Janeiro. Abr 2007.

LUND, A M; MOLGAARD, C; MÜLLER, J; SKOVBY, F. Bone mineral content and collagen defects in Osteogenesis imperfecta. **Acta Paediatrica**, v.88, p.1083-1088. 1999.

LUND, A M; SKOVBY, F; SCHWARTZ, M. (G586V) substitutions in the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of collagen I: Effect of α -chains to ichiometry on the phenotype of osteogenesis imperfecta? **Human Mutation**, v. 9, n. 5, p. 431–436. 1997.

MARINI J C; CABRAL W A; BARNES A M; CHANG W. Components of the collagen prolyl 3-hydroxylation complex are crucial for normal bone development. **Lands Bioscience**, v.6, p.1675-1681. 2007.

MARINI, J C; REICH, A; SMITH; S M. Osteogenesis Imperfecta due to Mutations in Non-Collagenous Genes-Lessons in the Biology of Bone Formation. **Current opinion in pediatrics**, v. 26(4), p. 500-507. 2014.

MARINI, J. C.; BLISSETT, A. R. New Genes in Bone Development: What's New in Osteogenesis Imperfecta. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98(8), Jun. 2013. Disponível em <<http://press.endocrine.org/doi/citedby/10.1210/jc.2013-1505>>. Acesso em 13 de agosto de 2015.

MARINI, J. C.; FORLINO, A.; CABRAL, W. A.; BARNES, A. M.; SAN ANTONIO, J. D.; MILGROM, S.; HYLAND, J. C.; KÖRKKÖ, J.; PROCKOP, D. J.; DE PAEPE, A.;

- COUCKE, P.; SYMOENS, S.; GLORIEUX, F. H.; ROUGHLEY, P. J.; LUND, A. M.; KUURILA-SVAHN, K.; HARTIKKA, H.; COHN, D. H.; KRAKOW, D.; MOTTES, M.; SCHWARZE, U.; CHEN, D.; YANG, K.; KUSLICH, C.; TROENDLE, J.; DALGLEISH, R.; BYERS, P. H. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. **Human Mutation**, v. 28, n. 3, p. 209-221, 2007.
- MELLO, D B; MOREIRA, M C N. A hospitalização e o adoecimento pela perspectiva de crianças e jovens portadores de fibrose cística e osteogênese imperfeita. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15(2), p. 453-461, 2010.
- MICHELL, C., PATEL, V., AMIRFEYZ, R., GARGAN, M. Osteogenesis imperfecta. **Current Orthopaedics**, v. 21, n. 3, p. 236-241, 2007.
- MORAES, M V D; MILANEZ, M; ALMADA, B V P; SIPOLATTI, V; REBOUÇAS, M R G O; NUNES, V R R; AKEL JR., A N; ZATZ, M; ERRERA, F I V; LOURO, I D; PAULA, F. Variable expressivity of osteogenesis imperfecta in a Brazilian family due top. G1079S mutation in the *COL1A1* gene. **Genetics and Molecular Research**, v. 11(3), p.3246-3255. 2012.
- MORAES, M. V. D. **Triagem de Mutações no Gene COL1A1 em Pacientes com Osteogenesis Impefecta**. Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, 2011.
- MOREIRA, C L M; LIMA, M A F D; CARDOSO, M H C A; JUNIOR, S C S G; LOPES, P B; JUNIOR, J C L. Determinantes da marcha independente na osteogênese imperfeita. **Acta ortopédica brasileira**, v. 19, n. 5, p. 312-315, São Paulo, 2011.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symp Quant Biol**.v.51, p.263-273, 1986.
- NUSSBAUM, R. L., McINNES, R. R., WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson – Genética Médica**.7 ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier Medicina Brasil, 2008.
- RAUCH, F.; GLORIEUX, F. H. Osteogenesis imperfect. **Lancet**, v. 363, p. 1377-1385, 2004.
- RAUCH, F.; LALIC, L.; ROUGHLEY, P.; GLORIEUX, F. H. Genotype-phenotype correlations in non lethal osteogenesis imperfecta caused by mutations in the helical domain of collagen type I. **European Journal of Human Genetics**, v. 18, p. 642-647, 2010.
- REIS, F C; ALEXANDRINO, F; STEINER, C E; NORATO, D Y J; CAVALCANTI, D P; SARTORATO, E L. Molecular findings in Brazilian patients with osteogenesis imperfecta. **Journal of Applied Genetics**, v. 46(1), p. 105-108. 2005.
- ROUGHLEY, P J; RAUCH, F; GLORIEUX, F H. Osteogenesis imperfecta – clinical and molecular diversity. **European Cells and Materials**, v. 5, p. 41-47. 2003.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**.v.230, p. 1350-1354, 1985.
- SALZANO F M. Saúde pública no primeiro e terceiro mundos: desafios e perspectivas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.7(1), p.7-16. 2002.

SANTILI, C; AKKARI, M; WAISBERG, G; JÚNIOR, J O C B; FERREIRA, W M. Avaliação clínica, radiográfica e laboratorial de pacientes com osteogênese imperfeita. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.51(4), p. 214-20. 2005.

SILLENCE, D. O.; SENN, A.; DANKS, D. M. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. **Journal of Medical Genetics**, v. 16, p. 101-116, 1979.

SOUZA, A S R; CARDOSO, A S; LIMA, M M S; GUERRA, G V Q L. Diagnóstico pré-natal e parto transpélvico na osteogênese imperfeita: relato de caso. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.28(4), p. 244-50, 2006.

STEINER, R D; ADSIT, J; BASEL, D. *COL1A1/2* - Related Osteogenesis Imperfecta. **GeneReviews®**. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Jan 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1295/>>. Acesso em 03 dez 2015.

STEPHEN J; SHUKLA A; DALAL A; GIRISHA K M; SHAH H; GUPTA N; KABRA M.; DABADGHAO P; PHADKE S R. Mutation spectrum of *COL1A1* and *COL1A2* genes in Indian patients with osteogenesis imperfecta. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v.164A, p.1482–1489, 2014.

TEIXEIRA, C S; FELIPPE, M C S; FELIPPE W T; SILVA-SOUSA, Y T C; SOUSA-NETO M D. The Role of Dentists in Diagnosing Osteogenesis Imperfecta in Patients With Dentinogenesis Imperfecta. **The Journal of the American Dental Association**, v. 139, n. 7, p. 906–914. Jul 2008.

VAN DIJK, F S V; BYERS, P H; DALGLEISH, R; MALFAIT F; MAUGERI A; ROHRBACH M; SYMOENS S; SISTERMANS E A; PALS, G. EMQN best practice guidelines for the laboratory diagnosis of osteogenesis imperfecta. **European Journal of Human Genetics**, v. 20, p. 11–19. 2012.

VIEIRA, R L V; AMARAL, D T; JESUS-GARCIA, F R; SARAIVA, G; FERNANDES, A R C; RESNICK, D. Hyperplastic callus formation in osteogenesis imperfecta type V mimicking osteosarcoma: 4-year follow-up with resolution. **Skeletal Radiology**, v. 35(6), p. 402-405. Jun 2006.

VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R.J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes *Nucleic Acids*, 2003. Disponível em: <<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>>. Acesso em: 19 de Agosto de 2014.

WATZL, M T P; ABREU, A V; KRUSE, R. Tratamento cirúrgico das deformidades e fraturas em membros inferiores na osteogênese imperfeita. **Acta ortopédica brasileira**, v. 17, n. 4, p. 202-206, São Paulo, 2009.

WILLAERT A; MALFAIT F; SYMOENS S; GEVAERT K; KAYSERILI H; MEGARBANE A; MORTIER G; LEROY J G; COUCKE P J; PAEPE A D. Recessive osteogenesis imperfecta caused by *LEPRE1* mutations: clinical documentation and identification of the splice form responsible for prolyl 3-hydroxylation. **Journal Medical Genetics**. v.46, p.233-241. 2009.

ZHANG, Z. L.; ZHANG, H.; KE, Y. H.; YUE, H.; XIAO, W. J.; YU, J. B.; GU, J. M.; HU, W. W.; WANG, C.; HE, J. W.; FU, W. Z. The identification of novel mutations in *COL1A1*, *COL1A2*, and *LEPRE1* genes in Chinese patients with osteogenesis imperfecta. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 30, n. 1, p.69-77, 2011.

Referências Eletrônicas:

BARBOSA, M F S. **Técnica do polimorfismo por RFLP**. Ebiotecnologia: ciência e tecnologia juntas. ago 2012. Disponível em: <http://www.ebiotecnologia.org/2012/08/tecnica-do-polimorfismo-por-rflp_25.html> Acesso em 01 dez 2015, 03:05:00.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Portaria no 2305/2001**, de 19 de dezembro de 2001. Aprova o Protocolo de Indicação de Tratamento Clínico da osteogenesis imperfecta com pamidronato dissódico no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS. Diário Oficial da União 2001; 20 dez.

DALGLEISH, R. Banco de Dados de Mutações da Osteogênese Imperfeita, 1997 e 1998. Disponível em<<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/>>Acesso em 01 dez 2015.

MCKUSICK-NATHANS. Online Mendelian Inheritance in Man, **OMIM®**. Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). Acesso em 04 dez 2015. Disponível em<<http://omim.org/>>.