



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARCOS VINÍCIUS DORNELAS DE MORAES

**TRIAGEM DE MUTAÇÕES NO GENE COL1A1 EM
PACIENTES COM OSTEOGÊNESE IMPERFEITA**

VITÓRIA

2011

MARCOS VINÍCIUS DORNELAS DE MORAES

**TRIAGEM DE MUTAÇÕES NO GENE COL1A1 EM
PACIENTES COM OSTEOGÊNESE IMPERFEITA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flavia de Paula

VITÓRIA

2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

M827t Moraes, Marcos Vinícius Dornelas de.
Triagem de mutações no gene COL1A1 em pacientes com
osteogênese imperfeita / Marcos Vinícius Dornelas de Moraes. – 2011.
95 f. : il.

Orientadora: Flavia de Paula.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo,
Centro de Ciências da Saúde.

1. Colágeno tipo I. 2. Osteogênese imperfeita. 3. Polimorfismo
conformacional de fita simples. I. Paula, Flavia de. II. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

“TRIAGEM DE MUTAÇÕES NO GENE COL1A1 EM PACIENTES COM
OSTEOGÊNESE IMPERFEITA”

MARCOS VINÍCIUS DORNELAS DE MORAES

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada por:

Prof^ª. Dr^ª. Flavia de Paula (UFES)

Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Flavia Imbroisi Valle Errera (EMESCAM)

Membro Interno

Prof^ª. Dr^ª. Eliete Rabbi Bortolini (AEV/FAESA)

Membro Externo

Vitória-ES, 26 de agosto de 2011.

Dedico esta dissertação à minha família, que em nenhum momento mediu esforços para a realização dos meus sonhos, que me guiou pelos caminhos corretos, me ensinou a fazer as melhores escolhas, me mostrou que a honestidade e o respeito são essenciais à vida, e que devemos sempre lutar pelo que queremos.

Com paixão e determinação, não há sonho impossível!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Departamento de Ciências Biológicas, ao Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia por possibilitarem o desenvolvimento do estudo.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos colegas do grupo de pesquisa em Osteogênese Imperfeita, pela colaboração mútua, companhia e, principalmente, por contribuírem arduamente com a padronização das técnicas empregadas no estudo.

A toda equipe multidisciplinar do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG) de Vitória-ES pela dedicação e apoio científico prestados.

À professora Dr^a. Flavia de Paula, pela oportunidade de ingresso na pesquisa científica e pela orientação e direcionamento nos trabalhos, sempre com muito carinho, amizade, compreensão e dedicação.

Às professoras Dr^a. Flavia Imbroisi Valle Errera e Dr^a. Eliete Rabbi Bortolini, por aceitarem compor a banca e pelos comentários e sugestões apresentadas com o objetivo de valorizar o trabalho.

Aos meus pais, pela confiança e amor em mim depositados e, sobretudo, por existirem!

Aos meus amigos e familiares, por todo o apoio concedido e pela agradável convivência.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se realizasse.

Às agências de apoio e financiamento: ARCELORMITTAL TURABÃO, FACITEC, FAPES, CNPq e CAPES.

*“A felicidade aparece para aqueles que choram. Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre. E para aqueles que reconhecem a
importância das pessoas que passam por suas vidas.”*

Clarice Lispector

RESUMO

Osteogênese Imperfeita (OI) é um distúrbio hereditário associado com fragilidade óssea e propensão a fraturas. As mutações comumente associadas em OI com padrões de herança dominantes afetam os genes estruturais do colágeno tipo I e podem resultar na falha da síntese dos produtos dos genes *COL1A1* ou *COL1A2* (quantitativa) ou na substituição de resíduos de glicina do *triplet Gly-X-Y* no domínio da triple hélice (qualitativo). O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de mutações patogênicas em regiões codificantes do gene *COL1A1*, incluindo sítios de *splicing* e regiões flangeadoras dos exons, em pacientes com Osteogênese Imperfeita atendidos no Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, Vitória - ES. Amostras de DNA obtidas de sangue periférico de pacientes com OI tipos I a IV foram submetidos à triagem de mutações pela associação das técnicas de Polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) e Sequenciamento automático de exons e regiões flangeadoras do gene *COL1A1*, o que confirmou o diagnóstico molecular em 21,21% (7/33) dos pacientes analisados: c.2750delG (tipo OI I); c.3239delC (OI tipo III); c.1138G> T (OI tipo I); c.3235G> A (OI tipo I); c.1056 1 G> A (OI tipo IV), c.1875 +1 G> C (OI tipo III) e c.2559 +1 G> A (OI tipo I). Estes dados são consistentes com os dados da literatura para mutações descritas em OI tipos I a IV. Uma vez que 78,78% (26/33) dos casos analisados são de OI esporádicos, os fenótipos clínicos podem estar relacionados a mutações *de novo*, mosaicismos gonadais dos pais ou a formas recessivas da doença. A ausência de mutações patogênicas no gene *COL1A1* nestes pacientes pode estar associada a não detecção da mutação que causa OI pela técnica de SSCP ou, a mutação patogênica está no gene *COL1A2* ou o paciente tem um tipo de OI que não está associado a mutações nos genes estruturais do colágeno tipo I. Estes dados enfatizam a importância da realização de estudos moleculares em OI, o que pode contribuir para a compreensão dos aspectos clínicos e genéticos da doença, principalmente, com a finalidade de se evitar a recorrência de novos casos por meio do aconselhamento genético.

Palavras-chave: Colágeno tipo I. Fragilidade óssea. Polimorfismo conformacional de fita simples. Alterações genéticas. Correlação genótipo: fenótipo.

ABSTRACT

Osteogenesis Imperfecta (OI) is a heritable disorder associated with bone fragility and propensity to fracture. The most common mutations associated with dominant inheritance affect the structural genes of type I collagen and can result from failure to synthesize the products of *COL1A1* or *COL1A2* genes (quantitative) or by substitution for glycine residues within the Gly-X-Y triplet domain of the triple helix (qualitative). The aim of this study was to verify the occurrence of pathogenic mutations in coding regions of the *COL1A1* gene, including splice sites and exon flanking regions, in patients with Osteogenesis Imperfecta assisted at the Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, Vitória - ES. DNA from blood samples of all patients OI types I-IV was submitted to screening for mutations by the association of techniques Single Strand Conformation Polymorphism and Automatic Sequencing through the exons and flanking regions of *COL1A1* gene, which confirmed the molecular diagnosis in 21,21% (7/33) of patients analyzed: c.2750delG (OI type I); c.3239delC (OI type III); c.1138G>T (OI type I); c.3235G>A (OI type I); c.1056+1G>A (OI type IV), c.1875+1G>C (OI type III) and c.2559+1G>A (OI type I). These findings are consistent with the literature data for mutations described in OI types I-IV. Since 78,78% (26/33) of the analyzed cases are sporadic OI, the clinical outcomes might be related to *de novo* mutations, parental gonadal mosaicism or recessive forms of the disease. The absence of pathogenic *COL1A1* mutations in these patients can be associated to a non-detection of OI causing mutation by the SSCP technique or, the pathogenic mutation are in *COL1A2* gene or the patient has a type of OI not associated with changes in structural genes of collagen type I. These data emphasize the importance of molecular studies in OI, which may contribute to the understanding of clinical and genetics aspects of the disease, mainly, in order to prevent the recurrences of new cases through genetic counseling.

Key words: Type I collagen. Bone fragility. Single strand conformation polymorphism. Genetic alterations. Genotype: phenotype correlation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 - A Estrutura do Pró-colágeno Tipo I.....	30
Ilustração 2 - Eventos Intracelulares e Extracelulares na Formação de uma Fibrila de Colágeno Tipo I.....	32
Ilustração 3 - Relação entre Cadeias $\alpha 1(I)$ e $\alpha 2(I)$ Normais vs. Anormais e os Fenótipos Resultantes.....	38
Ilustração 4 - Mecanismo Proposto de Ação dos Bifosfonatos (BP).....	43
Ilustração 5 - Aplicação da Técnica de Triagem de Mutações por SSCP.....	64
Ilustração 6 - Eletroferogramas de Pacientes com Mutações em $\alpha 1(I)$	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação de Pacientes com OI Tipo I.....	50
Quadro 2 - Relação de Pacientes com OI Tipo III.....	51
Quadro 3 - Relação de Pacientes com OI Tipo IV.....	51
Quadro 4 - Relação de <i>Primers</i> Utilizados no Estudo do Gene COL1A1.....	54
Quadro 5 - Padronização da PCR Para o Gene COL1A1.....	56
Quadro 6 - Levantamento do Custo de Análise de Mutações em Duas Técnicas de Rotina.....	68

LISTA DE SIGLAS

A	Adenina
AD	Autossômico Dominante
Ala	Alanina
AR	Autossômico Recessivo
Arg	Arginina
Asp	Ácido Aspártico
BMD	Densidade Mineral Óssea
cDNA	DNA complementar
C	Citosina
COL1A1	Gene que codifica a cadeia $\alpha 1$ do colágeno tipo I
COL1A2	Gene que codifica a cadeia $\alpha 2$ do colágeno tipo I
CRTAP	Gene que codifica a <i>cartilage-associated protein</i>
Cys	Cisteína
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeos Trifosfatados
FKBP10	Gene que codifica a <i>FK506-binding protein 65</i>
G	Guanina
GH	Hormônio do Crescimento

Glu	Glutamina
Gly	Glicina
LEPRE1	Gene que codifica a <i>prolyl 3-hydroxylase 1</i>
Leu	Leucina
mRNA	RNA mensageiro
OI	Osteogênese Imperfeita
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PLOD2	Gene que codifica a <i>lysyl hydroxylase 2</i>
PPIB	Gene que codifica a <i>ciclofilina B</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
Ser	Serina
SERPINF1	Gene que codifica um inibidor de serino-proteases
SERPINH1	Gene que codifica a <i>heat shock protein 47</i>
siRNAs	Pequenos RNAs de Interferência
SP7	Gene de um fator de transcrição específico de osteoblasto
SSCP	Polimorfismo Conformacional de Fita Simples
ssDNA	DNA Fita Simples
T	Timina
Val	Valina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Histórico.....	16
1.2	A Caracterização da OI.....	18
1.3	A Classificação da OI.....	19
1.3.1	<i>OI Tipo I.....</i>	20
1.3.2	<i>OI Tipo II.....</i>	20
1.3.3	<i>OI Tipo III.....</i>	21
1.3.4	<i>OI Tipo IV.....</i>	22
1.3.5	<i>OI Tipo V.....</i>	23
1.3.6	<i>OI Tipo VI.....</i>	23
1.3.7	<i>OI Tipo VII.....</i>	24
1.3.8	<i>OI Tipo VIII.....</i>	25
1.3.9	<i>OI Tipo IX.....</i>	25
1.3.10	<i>OI Tipos X, XI e XII.....</i>	26
1.4	O Tecido Ósseo.....	26
1.4.1	O Osso.....	27
1.4.2	<i>Os Componentes da Matriz Óssea.....</i>	28
1.4.2.1	<i>Células do Tecido Ósseo.....</i>	28
1.4.2.2	<i>Colágenos.....</i>	29
1.4.2.2.1	<i>Colágeno Tipo I.....</i>	29
1.4.2.3	<i>Demais Proteínas.....</i>	33
1.4.2.4	<i>Minerais.....</i>	33
1.5	Aspectos Genéticos e Moleculares da OI.....	34
1.5.1	<i>Os Genes Humanos Associados à OI.....</i>	34
1.5.2	<i>Mutações nos Genes Estruturais do Colágeno Tipo I e a Expressão Clínica da OI.....</i>	36
1.6	Técnicas Básicas em Biologia Molecular Aplicadas ao Diagnóstico de Doenças Genéticas.....	39
1.6.1	<i>Reação em Cadeia da Polimerase.....</i>	39
1.6.2	<i>Polimorfismo Conformacional de Fita Simples.....</i>	40
1.6.3	<i>Sequenciamento Automático por Eletroforese Capilar.....</i>	41

1.7	Tratamento e Perspectivas Futuras em OI.....	42
2	OBJETIVOS.....	46
2.1	Objetivo Geral.....	47
2.2	Objetivos Específicos.....	47
3	METODOLOGIA.....	48
3.1	Amostras.....	49
3.2	Extração de DNA.....	52
3.3	Amplificação das Regiões de Interesse do DNA e Análise dos Fragmentos Amplificados.....	52
3.4	Triagem de Mutações no Gene COL1A1.....	57
3.5	Sequenciamento e Análise das Alterações Genéticas.....	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1	Resultados.....	62
4.2	Discussão.....	66
5	CONCLUSÕES.....	80
6	REFERÊNCIAS.....	82
7	APÊNDICE.....	94
7.1	Ficha de Inclusão de Pacientes à Pesquisa.....	95

1 Introdução

Ao longo dos anos, as doenças Mendelianas têm sido cada vez mais o foco das atenções quando o assunto envolve aplicações de técnicas biotecnológicas em Saúde. Em razão da presença impactante dessas enfermidades na realidade da população, devido ao crescente aumento na expectativa de vida, novos métodos para o diagnóstico e tratamento adequados são desenvolvidos na medida em que novas doenças surgem.

A Biotecnologia tem permitido diagnosticar diferentes doenças Mendelianas com base no emprego de técnicas de Biologia Molecular e Bioinformática, como a PCR e o sequenciamento, entre outros.

Em razão da grande heterogeneidade genética da Osteogênese Imperfeita (OI), uma doença caracterizada pela fragilidade óssea e predisposição a fraturas ósseas, o diagnóstico molecular tradicionalmente envolve aplicações metodológicas complexas e dispendiosas. Para os tipos clássicos da doença (OI tipos I a IV), o sequenciamento direto dos 104 exons totais dos genes *COL1A1* e *COL1A2*, com o reconhecimento de sítios de *splicing* ou o sequenciamento direto de cDNA cobrindo toda a região codificante de cada um dos genes, é uma constante.

A associação de técnicas economicamente viáveis para triagem de mutações, como a técnica de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP), torna possível o diagnóstico molecular da OI em laboratórios de pequeno porte e, sobretudo, acessível para o Sistema Único de Saúde (SUS). Em adição, o desenvolvimento e o uso racional de biotecnologias emergentes em diagnóstico e tratamento possibilitam a qualificação de profissionais diferenciados no sentido de garantir a reprodutibilidade das técnicas empregadas para o diagnóstico molecular da doença.

Desta forma, pesquisas básicas que visam o estudo molecular em OI são essenciais para uma melhor compreensão das bases clínicas e genéticas da doença, o que reflete na elaboração de processos e aplicações biotecnológicas impactantes sobre a qualidade de vida dos afetados pela doença.

1.1 Histórico

Inicialmente denominada de osteomalácia congênita, no século XVII, o termo “*osteogenesis imperfecta*” (OI) só foi adotado no final do século XIX e início do século XX (ROUGHLEY; RAUCH; GLORIEUX, 2003).

Existem confirmações de que a manifestação da OI foi observada há mais de 3.000 anos atrás. Um exemplo é a de um crânio parcialmente reconstituído, vestígios de uma múmia egípcia datada do ano 1.000 A.C., cujas peculiaridades nele observadas indicaram pertencer a uma criança afetada por OI (GRAY, 1969). Investigações posteriores detalharam a presença de alterações esqueléticas, como ossos finos e frágeis, além de dentinogênese imperfeita (LOWENSTEIN, 2009).

Em 1788, Ekman (apud WEIL, 1981) elaborou uma tese sobre osteomalácia congênita e descreveu três gerações de uma família com fragilidade óssea hereditária e deformidades graves, mas com ausência de esclerótica azulada e surdez.

Em 1831, Axmann (apud SILLENCE; SENN; DANKS, 1979) descreveu a doença nele mesmo e nos seus irmãos, estabelecendo a associação entre fragilidade óssea e uma característica nunca antes mencionada, a esclerótica azulada.

Em 1833, Lobstein (apud WEIL, 1981) descreveu três casos de uma forma grave de fragilidade óssea em adultos de uma mesma família, denominando-a de “*osteopsatirose idiopática*” (KIM; COE; CHIN, 1970).

A forma congênita foi descrita em 1849 por Vrolik (apud WEIL, 1981), que identificou pela primeira vez a doença em um recém-nascido com múltiplas fraturas ao nascimento, ossos *wormianos* e com evolução a óbito perinatal, dando origem ao termo “*osteogenesis imperfecta*”, doença genética caracterizada pela fragilidade óssea (KIM; COE; CHIN, 1970).

No início, a OI e a “*osteopsatirose idiopática*” foram consideradas doenças distintas. Em 1897, Schmidt (apud WEIL, 1981) observou que os fenótipos expressos tanto em adultos quanto em crianças tratavam-se de uma mesma enfermidade.

Spurway (1897) enfatizou a ocorrência da esclerótica azulada em pacientes com fragilidade óssea. Posteriormente, Eddowes (1900) propôs a mesma associação, o que ajudou a delinear a coloração azulada de escleróticas como um dos sinais da OI.

Looser (1906), após analisar as semelhanças histológicas ósseas da OI e da osteopsatirose idiopática, investiu na tentativa de classificar a OI e dividiu a doença em duas formas: (a) congênita ou doença de Vrolik, caracterizada pela presença de numerosas fraturas ao nascimento, incluindo natimortos ou aqueles que morreram em poucas horas após o nascimento, e (b) tardia ou doença de Eckamnn-Lobstein, na qual as fraturas ocorrem após o período perinatal.

Em 1912, Adair-Dighton (apud WEIL, 1981) foi o primeiro autor que descreveu a perda auditiva associada à fragilidade óssea e esclerótica azulada. Preiswerk foi o primeiro a descrever as alterações dentárias observadas em OI (MEDINA; LICÉAGA, 2010).

Van der Hoeve e de Kleijn (1918) associaram a surdez com a otosclerose, o que foi posteriormente interpretado como uma manifestação localizada da OI, e descreveram a primeira família com três membros afetados em quatro gerações apresentando as três características clássicas da OI. Por existirem diferentes relatos, a conclusão de que os três sintomas principais (a) fragilidade óssea, (b) esclerótica azulada e (c) surdez tratavam-se da tríade clássica da OI foi de difícil resolução (MARINI, 1988; MEDINA; LICÉAGA, 2010; PEDERSEN; ELBROND, 1979).

Em 1928, Bell (apud RODGER, 1936) revisou mais de 300 casos de OI e pôde constatar a presença da tríade clínica em 44% dos mesmos.

Em 1949, Seedorf (apud SILLENCE; SENN; DANKS, 1979) subclassificou a OI tardia em tardia grave e tardia leve, dando origem a três outros tipos: (a) Tipo I – congênita (conforme determinado por Looser); (b) Tipo II – tardia grave, na qual a primeira fratura ocorre no nascimento ou no primeiro ano de vida, com deformidade dos ossos longos e coluna; (c) Tipo III – tardia leve, na qual as fraturas ocorrem depois do primeiro ano de vida, com deformidades leves ou ausentes.

Em 1979, Silience e colaboradores apresentaram a classificação dos quatro tipos clínicos de OI (I-IV) e até hoje continua sendo uma referência na literatura médica (CHANG et al., 2010).

1.2 A Caracterização da OI

A osteogênese imperfeita (OI) é uma desordem hereditária geneticamente heterogênea que ocorre igualmente em todos os grupos étnico-raciais. Com frequência de ocorrência variável de 1 em cada 10.000 a 20.000 indivíduos nascidos, a OI é caracterizada por deformidades no tecido conjuntivo e pela fragilidade óssea, o que torna o indivíduo com OI mais suscetível à ocorrência de fraturas, em razão de traumas mínimos ou impactos não traumáticos (BODIAN et al., 2009; ALANAY et al., 2010).

O diagnóstico clínico da OI é baseado, principalmente, na observação de alguns sinais e sintomas, tais como baixa estatura, esclerótica azulada, deformidades ósseas, fraturas ósseas, hipermobilidade articular, macrocefalia, dentinogênese imperfeita e surdez progressiva, entre outros (BARNES et al., 2010; BODIAN et al., 2009; BONADIO; RAMIREZ; BARR, 1990; CABRAL et al., 2003; CABRAL et al., 2007; CHANG; LIN; HSU, 2007; HARTIKKA et al., 2004; HUBER, 2007; KATAOKA et al., 2007; MARINI et al., 2007a; RAUCH; GLORIEUX, 2004; SANTILI et al., 2005).

A expressão fenotípica em OI é um *continuum* que compreende desde formas mais graves (letalidade perinatal devido a múltiplas fraturas intrauterinas), até casos em que a doença é de difícil percepção (ausência de fraturas ou deformidades ósseas e com mobilidade normal). Acredita-se que casos mais leves da doença sejam provavelmente subestimados, diante da dificuldade de se realizar um diagnóstico preciso (GLORIEUX, 2008; RAUCH; GLORIEUX, 2004; SILLENCE; SENN; DANKS, 1979).

Em sua grande maioria, os casos de OI são herdados de forma autossômico dominante (AD) devido a uma mutação em heterozigose nos genes *COL1A1* ou *COL1A2*, que codificam as cadeias de pró-colágeno $\alpha 1(I)$ e $\alpha 2(I)$ do colágeno tipo I, respectivamente. Não obstante, a existência de formas recessivas de OI em razão de mutações nos genes *CRTAP*, *FKBP10*, *LEPRE1*, *PLOD2*, *PPIB*, *SERPINF1*, *SERPINH1* e *SP7* são também outras formas de ocorrência da OI. Assim, a categorização de pacientes em tipos clínicos é útil para o estabelecimento do diagnóstico e na avaliação de possíveis intervenções terapêuticas (DALGLEISH, 1998; GAJKO-GALICKA, 2002; MARINI et al., 2007b; RAUCH; GLORIEUX, 2004; VAN DIJK et al., 2009a; WILLAERT et al., 2009).

1.3 A Classificação da OI

Clinicamente, a OI não é uma entidade única, mas uma família de anormalidades semelhantes que compartilham uma tendência à fragilidade óssea e ocorrência de fraturas. Inicialmente, com base em critérios clínicos e radiológicos, Sillence e colaboradores (1979) distinguiram inicialmente os tipos I (MIM# 166200), II (MIM# 166210), III (MIM# 259420) e IV (MIM# 166220) de OI. Recentemente, os tipos V (MIM# 610967), VI (MIM# 610968), VII (MIM# 610682), VIII (MIM# 610915), IX (MIM# 259440), X (MIM# 613848), XI (MIM# 259440) e XII (MIM# 259440) foram reportados. Contudo, vários pesquisadores ainda utilizam a *classificação de Sillence* devido à praticidade de aplicação em âmbito clínico (BECKER et al., 2011; CABRAL et al., 2007; CHRISTIANSEN et al. 2010; GLORIEUX et al., 2000; 2002; LAPUNZINA et al. 2010; VAN DIJK et al., 2009b; WARD et al., 2002).

Em linhas gerais podemos dizer que a OI tipo I é a forma mais leve caracterizada por fraturas com pouca ou nenhuma deformidade e estatura normal a ligeiramente baixa, enquanto que o tipo II é a forma letal perinatal, na maioria das vezes devido à insuficiência respiratória resultante de fraturas múltiplas de costelas. O tipo III é caracterizado por deformidades progressivas e fraturas que são frequentemente

presentes ao nascimento. O tipo IV representa um espectro de gravidade moderada. A gravidade dos tipos V, VI e VII está entre aquelas observadas nos tipos I e III. Os tipos VIII e IX apresentam-se clinicamente similares aos tipos II e III. Em adição, os tipos X e XII de OI são clinicamente similares ao tipo III, enquanto que o tipo XI é similar ao tipo IV (BECKER et al., 2011; CHRISTIANSEN et al. 2010; KANEKO et al., 2011; LAPUNZINA et al. 2010).

1.3.1 OI Tipo I

A OI tipo I é a forma mais branda da doença com herança autossômica dominante, onde a heterogeneidade intrafamiliar e interfamiliar é significativa. Em geral, os indivíduos afetados apresentam esclerótica azulada, estatura normal ou levemente baixa, surdez precoce em cerca de 50% dos pacientes, fragilidade óssea variável, um risco aumentado de fraturas em decorrência de traumas leves que habitualmente ocorrem com o início da deambulação e/ou deformidades ósseas mínimas em radiologia, como uma leve osteopenia, ossos com cortical fina e crânio com ossos *wormianos* em mosaico. A OI tipo I ainda pode ser subclassificada com base na ausência (IA) ou presença (IB) de dentinogênese imperfeita (CHEUNG; GLORIEUX, 2008; GAJKO-GALICKA, 2002; HUBER, 2007; KANEKO et al., 2011; LEVIN; SALINAS; JORGENSON, 1978; PRIMORAC et al., 2001; RAUCH et al., 2003; ROUGHLEY; RAUCH; GLORIEUX, 2003).

1.3.2 OI Tipo II

Sillence e colaboradores (1979) subdividiram a OI tipo II em três subtipos distintos, com base no achados clínicos e radiológicos. O subtipo IIA representa a forma mais

grave, associada à letalidade no período perinatal, com múltiplas fraturas intrauterinas e deformidades ósseas. Caracteriza-se por esclerótica azulada ou acinzentada, proptose, deficiência na ossificação craniana, estatura e peso baixos. Os achados radiológicos são ossos pouco mineralizados, largos e curtos, ossos *wormianos* em mosaico, platispondilia, fêmures em fita, múltiplas fraturas e costelas em rosário. A insuficiência respiratória é a principal causa de morte devido a fraturas múltiplas de costelas e insuficiência pulmonar. O subtipo IIC é uma forma grave de OI com face triangular, protusão ocular, hipertelorismo, deficiência na ossificação craniana, extremidades longas e relativamente encurvadas. As principais características radiológicas são ossos pouco mineralizados, escápulas com forma e ossificação irregulares, ísquios longos e angulados, ossos longos finos e encurvados, sendo a coluna praticamente normal. O subtipo IIB não pode ser diferenciado clínica ou radiologicamente do tipo III. A doença ocorre sobre um padrão de recorrência autossômico dominante em razão de mutações novas e esporádicas nos genes associados à síntese e formação do colágeno tipo I (BYERS et al. 1988; CHEUNG, GLORIEUX, 2008; GAJKO-GALICKA, 2002; KANEKO et al., 2011; YOUNG et al. 1987).

1.3.3 OI Tipo III

A OI tipo III (similar ao tipo IIB) é compatível com a sobrevivência após o período neonatal e ao nascimento, observa-se pelas fraturas múltiplas e deformidades ósseas resultantes de fraturas intrauterinas. Caracteriza-se por esclerótica azulada, *caput* membranáceo, baixa estatura (varia de 90 a 120cm), escoliose e, ocasionalmente, dentinogênese imperfeita. Frequentemente apresenta perda auditiva progressiva. Os achados radiológicos são osteopenia, costelas finas com fraturas descontínuas, platispondilia, ossos *wormianos* em mosaico, ossos tubulares encurtados com metáfises alargadas. Estes indivíduos fraturam com maior frequência do que em qualquer outro tipo de OI e apresenta expectativa de vida relativamente curta. A deformidade óssea progressiva de ossos longos e de coluna

está associada com fraturas de repetição e com a própria heterogeneidade genética da doença, o que pode requerer múltiplos procedimentos de correção ortopédica (haste intramedular) e locomoção com auxílio de cadeira de rodas. O óbito na infância pode ocorrer por problemas respiratórios em virtude de comprometimento torácico ou por traumas, como fratura craniana. O padrão de recorrência é, em geral, autossômico dominante, contudo existem casos em que a mutação é recessiva (BYERS et al. 1988; CHEUNG & GLORIEUX, 2008; CHRISTIANSEN et al. 2010; GAJKO-GALICKA, 2002; HUBER, 2007; KUIVANIEMI; TROMP; PROCKOP, 1997; PRIMORAC et al., 2001; ROUGHLEY; RAUCH; GLORIEUX, 2003).

1.3.4 OI Tipo IV

A OI tipo IV representa o grupo de maior variabilidade fenotípica (intrafamiliar e interfamiliar) da classificação de Sillence, o que sugere forte heterogeneidade genética, uma vez que engloba todos os indivíduos que não se enquadram nos demais tipos. Com similaridades entre os tipos I e III, o fenótipo pode variar de leve (com mobilidade normal) a grave (dependente de cadeira de rodas), com observação de fraturas e deformidades ósseas ao nascimento, além da expectativa de vida menor. Caracteriza-se pela presença de esclerótica normal ou levemente acinzentada, deformidades ósseas de leve a grave e perda auditiva (é menos comum do que no tipo I). Frequentemente, a baixa estatura e dentinogênese imperfeita (ausente no tipo IVA e presente no tipo IVB) podem ser observadas. Não há retardo no crescimento intrauterino, mas o crescimento pós-natal é bem reduzido e segue baixos percentis. Outras manifestações incluem hipermobilidade articular e escoliose, variando de leve a severa. As fraturas costumam quiescer entre os 20 e 40 anos de idade, sendo mais frequentes da infância à puberdade e em idades mais avançadas. O padrão de recorrência é, em geral, autossômico dominante, contudo existem casos em que a mutação é recessiva (BYERS et al. 1988; CHEUNG; GLORIEUX, 2008; GAJKO-GALICKA, 2002; HANSCOM; BLOOM, 1988; HUBER,

2007; LAPUNZINA et al. 2010; PRIMORAC et al., 2001; RAUCH; GLORIEUX, 2004; ROUGHLEY; RAUCH; GLORIEUX, 2003).

1.3.5 OI Tipo V

A OI tipo V, previamente classificada como OI tipo IV, ocorre sobre um padrão de recorrência autossômico dominante. Contudo, a sua etiologia genética permanece indeterminada até os dias atuais. É caracterizada pela fragilidade óssea e osteopenia de moderada a severa e ausência de esclerótica azulada ou dentinogênese imperfeita. Ocorrem três peculiaridades distintas: (a) o frequente desenvolvimento de calo hipertrófico nos sítios de fratura, após cura ou cirurgia corretiva, mimetizando osteosarcoma; (b) a calcificação de membranas interósseas entre os ossos do antebraço, o que pode limitar movimentos de pronação e a supinação e, secundariamente, provocar o deslocamento da cabeça do rádio e, (c) a presença em radiologias de bandas metafásicas radiopacas adjacentes às fises (anéis de crescimento). A análise histomorfométrica de biópsia de crista ilíaca revela lamelação óssea irregular do tipo *mesh-like*, claramente distinta do que ocorre em OI tipos I e IV (CHEUNG; GLORIEUX, 2008; GLORIEUX, 2008; HUBER, 2007; KANEKO et al., 2011; PRIMORAC et al., 2001; RAUCH; GLORIEUX, 2004; ROUGHLEY; RAUCH; GLORIEUX, 2003).

1.3.6 OI Tipo VI

A OI tipo VI, classificada anteriormente como OI tipo IV, ocorre sobre um padrão de recorrência autossômico recessivo e está associada a mutações no gene *FKBP10* que codifica a “*FK506-binding protein 65*” (FKBP65), que é uma chaperona de

dobramento do pró-colágeno tipo I. Os indivíduos afetados experimentam fraturas mais frequentes do que aqueles com OI tipo IV e todos apresentam fraturas de compressão vertebral. Também apresentam graus de deformidade esquelética e fragilidade óssea de moderados a severos, com ausência de dentinogênese imperfeita, esclerótica de coloração normal ou discretamente azul, estatura moderada e escoliose. A análise histomorfométrica de biópsia de crista ilíaca revela lamelação óssea irregular com um padrão do tipo *fish-scale*, além da presença excessiva de osteóides nas superfícies ósseas. Embora a acumulação de osteóides sugira um defeito de mineralização, não há anormalidades nos níveis de cálcio, fosfato, hormônio paratireoideano ou no metabolismo da vitamina D. Em adição, estes pacientes não respondem bem ao tratamento com bisfosfonatos quando comparados com os outros tipos de OI (ALANAY et al., 2010; CHEUNG; GLORIEUX, 2008; GLORIEUX, 2008; HUBER, 2007; KANEKO et al., 2011; PRIMORAC et al., 2001; RAUCH; GLORIEUX, 2004; ROUGHLEY; RAUCH; GLORIEUX, 2003).

1.3.7 OI Tipo VII

A OI tipo VII ocorre sobre um padrão de recorrência autossômico recessivo e foi descrito apenas em uma comunidade de nativos americanos, no norte de Quebec, Canadá. A OI tipo VII está associada a mutações no gene *CRTAP* (MIM# 605497), que codifica a *cartilage-associated protein*, cuja expressão está reduzida em 90% nos pacientes homocigotos para mutações patogênicas neste gene. A ausência total de expressão do gene foi também identificada na forma letal de OI. É caracterizada por deformidade esquelética e fragilidade óssea de moderadas a graves, com ausência de esclerótica azulada ou dentinogênese imperfeita. As peculiaridades que ocorrem são: (a) encurtamento rizomélico do úmero e do fêmur e (b) coxa vara, que pode se manifestar ainda na infância (CHEUNG; GLORIEUX, 2008; GLORIEUX, 2008; HUBER, 2007; KANEKO et al., 2011); MORELLO et al., 2006; RAUCH; GLORIEUX, 2004; ROUGHLEY; RAUCH; GLORIEUX, 2003).

1.3.8 OI Tipo VIII

A OI tipo VIII ocorre sobre um padrão de recorrência autossômico recessivo e está associada a mutações no gene *LEPRE1* que codifica a *prolyl 3-hydroxylase 1* (P3H1). Os fenótipos observados sobrepõem-se aos tipos II e III de OI, com a ocorrência de múltiplas fraturas ao nascimento, osteoporose severa, encurtamento de ossos longos e crânio flexível com fontanela de grande abertura. Em contraste à esclerótica azulada, face triangular e tórax de tamanho limitado, características observadas nas formas graves e letais de OI, já foram descritos casos de pacientes com esclerótica normal, grave retardo do crescimento, face arredondada e tórax curto em forma de barril. As características radiológicas são ossos longos delgados pouco mineralizados e com metáfises bulbosas, além de aparente desorganização da matriz óssea. As mãos são relativamente alongadas, quando comparadas ao antebraço, com longas falanges e metacarpos curtos. Ocorrem também fraturas de compressão vertebral e os valores de densidade óssea são mais baixos daqueles com OI severa. Já foram relatados casos em africanos, afro-americanos ou afro-caribenhos e em um paquistanês (CABRAL et al., 2007).

1.3.9 OI Tipo IX

A OI tipo IX, de fenótipo similar ao tipo IIB/III, ocorre sobre um padrão de recorrência autossômico recessivo associado a mutações no gene *PPIB* (MIM# 123841) que codifica a ciclofilina B (*CyPB*). Da mesma forma que ocorre em pacientes com déficits de *P3H1* ou *CRTAP*, a falta de *CyPB* não causa dentinogênese imperfeita, esclerótica azulada, rizomelia, grave retardo no crescimento ou anormalidades do disco de crescimento, observado em casos severos autossômicos dominantes ou recessivos de OI. As mãos são proporcionais e com metacarpos não encurtados, como ocorre no déficit de *P3H1*. Caracteriza-se pela baixa massa óssea e múltiplas fraturas de ossos longos, o que requer procedimentos de correção ortopédica como

osteotomia e implante de haste intramedular, mas com manutenção da ambulação. A osteoporose é muito menos severa do que nos tipos VII e VIII (BARNES et al., 2010; VAN DIJK et al., 2009a)

1.3.10 OI Tipos X, XI e XII

Recentemente, foram relatadas mutações recessivas no gene *SERPINH1* (MIM# 600943) em pacientes clinicamente compatíveis com a OI tipo III (OI tipo X), no gene *SP7/Osterix* (MIM# 606633) em pacientes compatíveis com a OI tipo IV (OI tipo XI), e no gene *SERPINF1* (MIM# 613982) em pacientes também compatíveis com a OI tipo III (OI tipo XII). Os genes citados codificam uma chaperona “*heat shock protein 47*”, um fator de transcrição específico de osteoblasto e um inibidor de serino-proteases, respectivamente (BECKER et al., 2011; CHRISTIANSEN et al. 2010; LAPUNZINA et al. 2010).

1.4 O Tecido Ósseo

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).

1.4.1 O Osso

Os ossos existem em diferentes formatos e possuem uma complexa estrutura interna e externa que os permitem serem leves, porém fortes e resistentes para o desempenho de suas funções, graças a um significativo grau de elasticidade conferida pelo colágeno (ADEBISI, 2009).

O osso é formado por células vivas mergulhadas em uma matriz mineralizada, constituindo o esqueleto dos vertebrados, e que desempenha funções importantes: estrutural (suporte e zonas de inserção dos ligamentos, tendões e músculos), protetora (caixa torácica e do crânio, por exemplo, proporcionam proteção para os órgãos abdominais, torácicos e o cérebro) e metabólica (armazenamento de minerais essenciais e suporte à produção de células sanguíneas vermelhas e brancas) (ADEBISI, 2009).

Morfologicamente, existem dois tipos de ossos, denominados de cortical (compacto) e trabecular (esponjoso). O osso cortical é denso e predomina nos ossos longos esqueléticos. Representa 80% da massa óssea esquelética total adulta e é caracterizado por camadas de matriz óssea (lamelas) arranjadas de forma concêntrica em estruturas cilíndricas denominadas de sistemas haversianos. Cada estrutura cilíndrica é circundada por um canal haversiano que contém nervos e canais linfáticos e sanguíneos que se comunicam entre si por meio dos canais de Volkmann. O osso trabecular situa-se no interior do córtex e consiste de uma rede de placas perfuradas interconectadas por onde passam os vasos sanguíneos. A medula óssea situa-se entre essas placas. Externamente, exceto em articulações, os ossos são revestidos pelo perióstio (externamente fibroso e internamente osteogênico), que é rico em vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (ADEBISI, 2009; GUSMÃO; BELANGERO, 2009).

1.4.2 Os Componentes da Matriz Óssea

Em linhas gerais, podemos dizer que os ossos são constituídos de células ósseas (osteoblasto, osteócitos e osteoclastos), matriz orgânica (colágeno e proteoglicanas) e minerais (fosfato de cálcio depositado sob a forma de hidroxiapatita). Com exceção do colágeno Tipo I, os assuntos relacionados às demais proteínas da matriz óssea, assim como minerais serão abordados de maneira sucinta.

1.4.2.1 Células do Tecido Ósseo

Os osteoblastos, derivados de células-tronco mesenquimais presentes na medula óssea e superfícies ósseas onde a matriz está sendo formada, produzem e secretam a maior parte da matriz orgânica e regula a sua mineralização. Sintetizam o colágeno tipo I, o mais abundante da matriz orgânica, assim como proteoglicanas, glicoproteínas entre outros. Regulam a diferenciação e a atividade absorptiva osteoclástica. Podem entrar em apoptose após um período de atividade secretória, como também podem se incorporar à matriz óssea através da diferenciação em osteócitos (MACKIE, 2003).

Os osteócitos, presentes em maior quantidade no tecido ósseo maduro, localizam-se em lacunas internas e se comunicam por uma rede de conexões constituída por processos intracanaliculares que permitem o trânsito de metabólitos, íons e sinalizadoras intracelulares. Participam dos processos de manutenção, formação, viabilidade e reabsorção da matriz e dos minerais pela osteólise osteocítica, mantendo constantes os níveis de cálcio extracelulares, além de imprimirem sinais bioquímicos que regulam o *turnover* ósseo em resposta a forças mecânicas (AARDEN; NIJWEIDE; BURGER, 1994; OCARINO et al., 2006).

Os osteoclastos são células multinucleadas derivados da fusão de precursores das células mononucleares (monócitos e macrófagos) hematopoiéticas com diferenciação dependente de estímulos liberados por osteoblastos, culminando com o início do remodelamento ósseo. Localizam-se na superfície das trabéculas e dos canais haversianos e no periósteo, alojados nas lacunas de Howship. Os osteoclastos têm a capacidade de erodir tanto a matriz orgânica quanto a matriz mineral por osteoclasia (ADEBISI, 2009; OCARINO; SERAKIDES, 2006).

1.4.2.2 Colágenos

Existem diversos tipos de colágenos reconhecidos no corpo humano, subdivididos em dois grupos, os fibrilares e os não fibrilares. Os colágenos tipos I, II, III, V e XI pertencem ao grupo de colágenos fibrilares que conferem integridade funcional e estrutural ao corpo humano e consistem de uma longa e contínua hélice tripla cujas subunidades dobram-se entre si formando fibras colágenas altamente organizadas. O colágeno tipo I é a proteína extracelular mais abundante no osso, representando até 90-95% da matriz óssea orgânica. É também um dos principais constituintes dos tendões, ligamentos, pele, dentes e fáscias, entre outros (BARSH; BYERS, 1981; BECK et al., 2000; GAJKO-GALICKA, 2002; HUBER, 2007; POPE et al., 1985; PROCKOP; KIVIRIKKO, 1984, 1995).

1.4.2.2.1 Colágeno Tipo I

A maioria dos pacientes (90%) com OI tipos I a IV tem mutações dominantes em um dos genes que codificam as cadeias de pró-colágeno $\alpha 1(I)$ e $\alpha 2(I)$, *COL1A1* (MIM# 120150) no cromossomo 17q21.31-q22 e *COL1A2* (MIM# 120160) no cromossomo

7q22.1, respectivamente. Ambos os genes *COL1A1* e *COL1A2* possuem 52 exons e geram mRNAs de tamanhos parecidos (HUBER, 2007; MARINI et al., 2007a; PACE et al., 2001; PROCKOP; KIVIRIKKO, 1995; RAMSHAW, 1998; RAUCH; GLORIEUX, 2004; WITECKA et al., 2008).

O pró-colágeno tipo I, precursor do colágeno tipo I, é constituído por um heterotrímero de duas cadeias $\alpha 1(I)$ e uma cadeia $\alpha 2(I)$, e consiste de uma estrutura super enovelada em tripla hélice construída a partir de três cadeias extensas de poliprolina tipo II. As cadeias consistem de um peptídeo sinal, extremidades pró-peptídicas não colágenas N-terminal e C-terminal, telopeptídeos N-terminal e C-terminal, e de um domínio colágeno longo e helicoidal (Ilustração 1) (HUBER, 2007; MARINI et al., 2007a; PACE et al., 2001; PROCKOP; KIVIRIKKO, 1995; RAMSHAW, 1998; WITECKA et al., 2008).

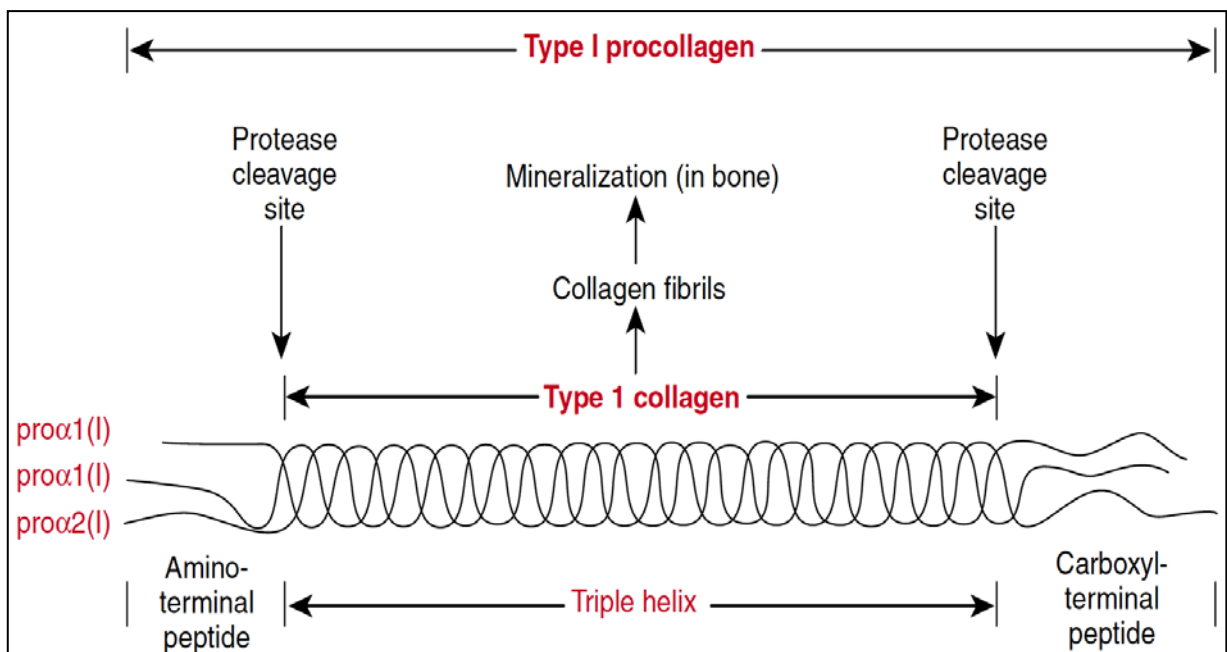


Ilustração 1 – A Estrutura do pró-colágeno Tipo I. O pró-colágeno tipo I é composto por duas cadeias $\alpha 1(I)$ e um pro cadeia $\alpha 2(I)$. A interação entre as cadeias de pró-colágeno $\alpha 1(I)$ e $\alpha 2(I)$ resulta em uma estrutura em forma de tripla hélice que é secretado no espaço pericelular (região funcional da proteína). Os domínios N e C-terminal são clivados extracelularmente para formar colágeno. As fibrilas de colágeno maduro agregam-se entre si e, nos ossos, são mineralizadas (WALTER BURNS SAUNDERS COMPANY, acesso em 21 jul. 2011 - Modificado).

Os 43 exons que codificam o domínio em tripla hélice do colágeno, parte funcional da molécula que provê força de tensão e serve como molde para a deposição de

minerais nos ossos, são compostos de 338 *triplets* (trincas) de aminoácidos Gly-Xaa-Yaa, gerando um padrão de sequência repetitiva do tipo $(\text{Gly-X-Y})_n$. O *triplet* mais frequente é *Gly-Pro-Hyp*, que também contribui para a máxima estabilidade da tripla hélice. Em adição ao alto conteúdo de aminoácidos prolina e hidroxiprolina, a tripla hélice também é estabilizada pelo íntimo dobramento das três cadeias graças à presença da glicina a cada terceiro resíduo, por pontes de hidrogênio entre as cadeias e por uma extensiva rede de hidratação. A glicina (Gly), que possui a cadeia lateral composta por um único hidrogênio, é essencial a cada terceira posição da cadeia (próximo ao centro da hélice) por ser o único resíduo pequeno o suficiente para permitir a formação de uma íntima e apertada estrutura helicoidalmente torcida sem que haja qualquer distorção (BAUM; BRODSKY, 1997; BECK et al., 2000; BUEVICH et al., 2004; BYERS, 2000; HUBER, 2007; MARAKAREEVA et al., 2008; MARINI et al., 2007a, 2007b; PACE et al, 2001; PROCKOP; KIVIRIKKO, 1995; RAMSHAW, 1998; WITECKA et al., 2008).

In vivo, as moléculas de colágeno Tipo I são sintetizadas sob a forma de pró-colágeno. Os mRNAs maduros precursores destas moléculas são traduzidos junto à membrana dos polissomos se associam no lúmen do retículo endoplasmático rugoso. As moléculas de pró-colágenos maduros são transportadas para o Golgi e empacotadas em vesículas de transporte, onde ocorre a agregação lateral – algumas prolinas e lisinas na posição Y são hidroxiladas, e alguns resíduos de lisina podem ser subsequentemente glicosilados por glicosiltransferases. A região C-terminal, responsável pelo processo de trimerização (seleção e o alinhamento cadeia-cadeia, montagem dos constituintes das cadeias e o registro apropriado do domínio helicoidal triplo), não apresenta obrigatoriedade pela sequência $(\text{Gly-X-Y})_n$ e contém diversos resíduos de cisteína e triptofano, ausentes no domínio funcional do colágeno, que podem formar pontes dissulfeto intracadeias. Estes resíduos são conservados e desempenham papéis cruciais nos estágios iniciais de montagem do pró-colágeno. Os demais participam de ligações covalentes entre cadeias do mesmo trímero. A nucleação C-terminal através da sequência $(\text{Gly-Pro-Hyp})_5$ e a subsequente formação da tripla hélice é propagada linearmente em direção a região N-terminal das cadeias, conduzida por um mecanismo em forma de zíper sob uma taxa limitada pela lenta isomerização *cis-trans* das pontes de aminoácidos (BAUM;

BRODSKY, 1997; BECK et al., 2000; BUEVICH et al., 2004; BYERS, 2000; HUBER, 2007; MARAKAREEVA et al., 2008; MARINI et al., 2007a, 2007b; PACE et al, 2001).

Uma vez produzida e secretada para o espaço pericelular, ocorre a clivagem das extremidades globulares N-terminal e C-terminal para criar moléculas de colágeno funcionais, as quais se auto-associam em um padrão escalonado para formar as fibrilas de 300nm (Ilustração 2) (BAUM; BRODSKY, 1997; BECK et al., 2000; BUEVICH et al., 2004; BYERS, 2000; HUBER, 2007; MARAKAREEVA et al., 2008; MARINI et al., 2007a, 2007b; PACE et al, 2001; PROCKOP; KIVIRIKKO, 1995; RAMSHAW, 1998; WITECKA et al., 2008).

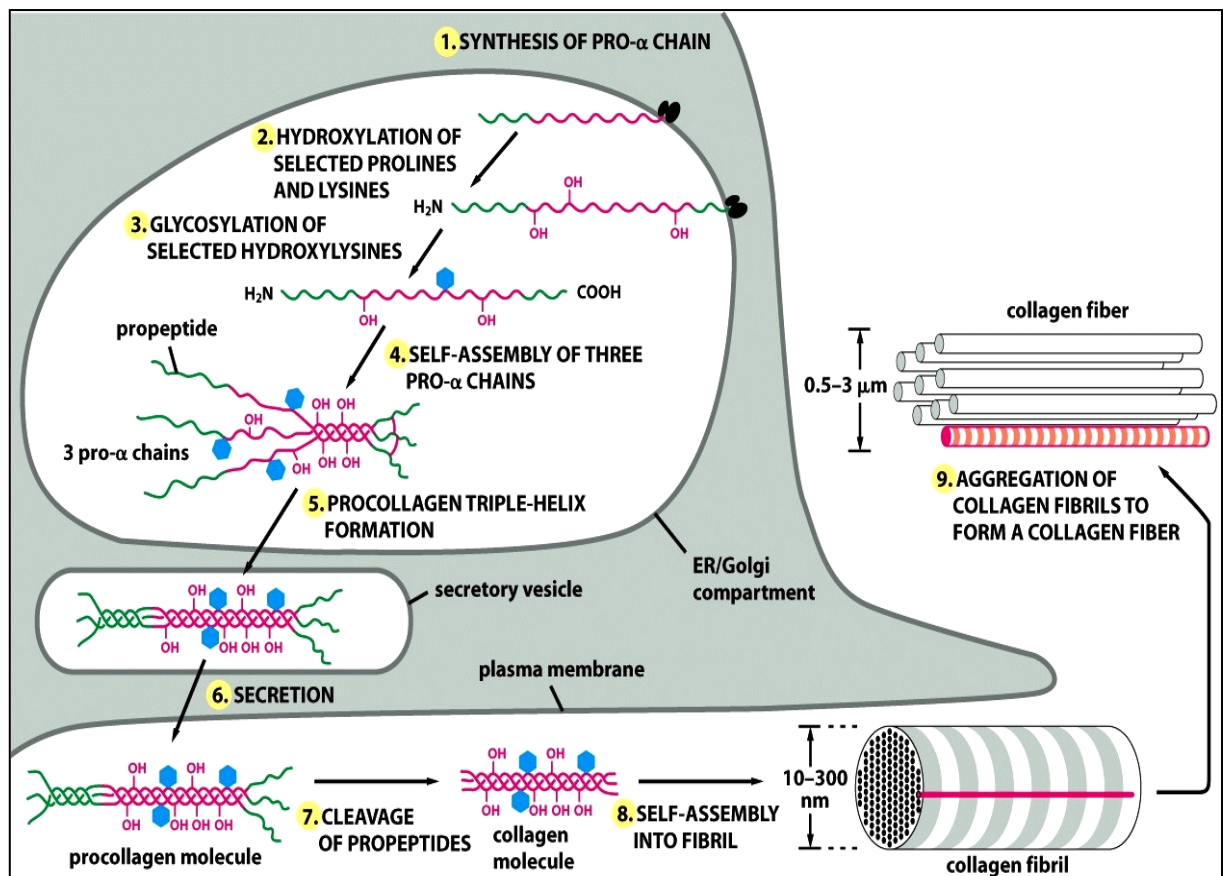


Ilustração 2 – Eventos Intracelulares e Extracelulares na Formação de uma Fibrila de Colágeno Tipo I (ALBERTS, B. et al., 2007 - Modificado).

1.4.2.3 *Demais Proteínas*

As proteínas não colágenas dos ossos compõem cerca de 10% da matriz orgânica e formam um grupo heterogêneo único, sendo as proteoglicanas de matriz e as glicoproteínas as mais abundantes, e que provavelmente desempenham um papel importante na mineralização e na reabsorção óssea. Por exemplo, a osteopontina e sialoproteína óssea são proteínas necessárias para o início da mineralização óssea e atuam como nucleadoras de cristais. Já a osteocalcina e a osteonectina estão presentes na matriz totalmente mineralizada e podem estar associadas com o controle do processo de formação de cristais (tamanho e forma) e velocidade de formação. Durante a reabsorção óssea, a osteocalcina atua como agente quimiotactante de osteoclastos enquanto que a osteopontina e a sialoproteína óssea parecem facilitar a associação dos osteoclastos à matriz óssea (ROACH, 1994).

1.4.2.4 *Minerais*

O tecido ósseo é um reservatório de minerais essenciais e representa aproximadamente 99% do cálcio, 85% do fósforo e até 60% do sódio e potássio corporais. Tais minerais são disponibilizados a partir da matriz óssea por meio da reabsorção óssea e também podem ser incorporados novamente durante a fase de mineralização óssea. O componente mineral principal dos ossos é a forma inorgânica do cálcio denominada de hidroxiapatita, composta por íons cálcio, fosfato e hidroxilas sob a razão $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HUNTER; GOLDBERG, 1993; BAHT; HUNTER; GOLDBERG, 2008).

1.5 Aspectos Genéticos e Moleculares da OI

1.5.1 Os Genes Humanos Associados à OI

O gene *COL1A1* (MIM# 120150), pró-colágeno $\alpha 1(I)$, está localizado no cromossomo 17q21.3-q22.1, possui aproximadamente 18kb de extensão e é constituído por 52 exons. É responsável pela síntese de duas cadeias de pró-colágeno $\alpha 1$, subunidades estruturais da tripla hélice do colágeno tipo I (GAJKO-GALICKA, 2002; MARINI et al., 2007a; TROMP et al., 1988).

O gene *COL1A2* (MIM# 120160), pró-colágeno $\alpha 2(I)$, está localizado no cromossomo 7q21.3-q22.1, possui aproximadamente 38kb de extensão e é constituído por 52 exons. É responsável pela síntese de uma cadeia de pró-colágeno $\alpha 1$, subunidade estrutural da tripla hélice do colágeno tipo I (GAJKO-GALICKA, 2002; DE WET et al., 1987; KUIVANIEMI et al., 1988; MARINI et al., 2007a).

O gene *CRTAP* (MIM# 605497), *cartilage associated protein*, está localizado no cromossomo 3p22.3, possui aproximadamente 6kb de extensão e é constituído por 7 exons. Forma um complexo com os genes *LEPRE1* (*prolyl 3-hydroxylase-1*) e *PPIB* (*cyclophilin-B*) que catalisa uma modificação pós-traducional específica: a 3-hidroxilação da prolina 986 da cadeia de pró-colágeno $\alpha 1(I)$ (BARNES et al., 2006; CASTAGNOLA et al., 1997; MARINI; CABRAL; BARNES, 2010; MORELLO et al., 2006; TONACHINI, L. et al. 1999).

O gene *LEPRE1* (MIM# 610339), *prolyl 3-hydroxylase 1*, está localizado no cromossomo 1p34.1. Codifica uma enzima de 84kDa da família das prolin hidroxilases, localizada no retículo endoplasmático, cujas atividade é fundamental para a perfeita síntese e montagem da molécula do colágeno tipo I. Forma um complexo com os genes *CRTAP* (*cartilage associated protein*) e *PPIB* (*cyclophilin-B*) (JARNUM et al., 2004; KAUL et al., 2000; MARINI; CABRAL; BARNES, 2010; VRANKA; SAKAI; BACHINGER, 2004).

O gene *PPIB* (MIM# 123841), *peptidyl-prolyl isomerase B (cyclophilin B)*, está localizado no cromossomo 15q21-q22. Codifica uma proteína de 21kDa que forma um complexo com os genes *LEPRE1 (prolyl 3-hydroxylase-1)* e *CRTAP (cartilage associated protein)*. É uma proteína de ligação de ciclosporinas que reside no retículo endoplasmático, conhecida por associar-se com o colágeno tipo I e facilitar o dobramento da tripla hélice, além de estar associada com as vias secretórias celulares (BARNES et al., 2010; PRICE et al., 1991; MARINI et al., 2007b).

O gene *FKBP10* (MIM# 607063), *FK506 binding protein 10*, 65 kDa, está localizado no cromossomo 17q21.2. Codifica uma proteína da família das PPlases (*FKBP-type peptidyl-prolyl cis/trans isomerase*) presentes no retículo endoplasmático e atua também como uma chaperona por participar do dobramento do colágeno tipo I (ALANAY et al., 2010; PATTERSON et al., 2000).

O gene *PLOD2* (MIM# 601865), *lysyl hydroxylase 2*, está localizado no cromossomo 3q24. Codifica uma enzima homodimérica de ligação à membrana, que se localiza nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso, cuja função é a de catalisar (ferro e ácido ascórbico como co-fatores) a hidroxilação dos resíduos de lisina de peptídeos *collagen-like*. Os grupamentos hidroxilil resultantes são sítios de ligação de carboidratos no colágeno e são críticos para a estabilidade das ligações intermoleculares (VALTAVAARA et al., 1997; VAN DER SLOT et al., 2003).

O gene *SERPINF1* (MIM# 172860), *serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1*, está localizado no cromossomo 17p13.3. Codifica uma proteína inibidora de serino-proteases (BECKER et al., 2011; TOMBRAN-TINK et al., 1994).

O gene *SERPINH1* (MIM# 600943), *serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)*, está localizado no cromossomo 11q13.5. Codifica uma glicoproteína que se liga ao colágeno tipo I (CHRISTIANSEN et al. 2010; IKEGAWA et al., 1995).

O gene *SP7* (MIM# 606633), *Sp7 transcription factor*, está localizado no cromossomo 12q13.13. Codifica um fator de transcrição dedo de zinco *C2H2-type*, específico do tecido ósseo, e é um importante regulador da diferenciação de

osteoblastos e da formação óssea (GAO et al., 2004; LAPUNZINA et al. 2010, NAKASHIMA et al., 2002).

1.5.2 Mutações nos Genes Estruturais do Colágeno Tipo I e a Expressão Clínica da OI

Mutações nos genes estruturais do colágeno tipo I são a causa principal de OI tipos I a IV com padrão de recorrência autossômico dominante. A expressão clínica da OI, frequentemente, advém de mutações *de novo* ou por mosaïcismo gonadal parental. Variações genéticas nos demais genes da OI foram detectadas em pacientes com as formas grave ou letal, assim como as demais formas de OI, com um padrão de recorrência autossômico recessivo (DALGLEISH, 1997, 1998).

Atualmente estão descritas junto ao *Database of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations* mais de 680 variantes genéticas para o gene *COL1A1*, e mais de 440 para o gene *COL1A2*, das quais uma grande parcela resulta em quadros clínicos de OI tipos I a IV (DALGLEISH, 1997, 1998; ZHANG et al., 2011).

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 (Ilustração 3). As mutações que afetam $\alpha 1(I)$ costumam originar fenótipos clínicos mais graves daqueles observados em $\alpha 2(I)$, uma vez que o trímero de colágeno tipo I consiste de duas cadeias $\alpha 1(I)$, mas apenas de uma cadeia $\alpha 2(I)$ (MARINI et al., 2007a; RAUCH et al., 2010).

As mutações que provocam um defeito quantitativo normalmente provocam a falha na síntese de produtos de um dos alelos *COL1A1* ou no alelo *COL1A2*, o que caracteriza um quadro de haploinsuficiência do gene em virtude de mutações dos

tipos *frameshift*, *nonsense*, e mutações em sítios de *splicing*, fato comumente observado em indivíduos com quadro clínico de OI tipo I (MARINI et al., 2007a).

Já mutações que provocam a síntese de moléculas estruturalmente anormais de colágeno tipo I, advindas de alterações na sequência do domínio da tripla hélice da proteína – substituições da glicina constitutiva do *triplet Gly-X-Y* – resultam em um amplo espectro fenotípico com quadros clínicos variando de letal (OI tipo II) a leve (OI tipo I) (MARINI et al., 2007a).

Em se tratando de mutações que interferem qualitativamente na estrutura do colágeno tipo I, os fenótipos clínicos dependem de parâmetros como (a) a natureza da alteração (substituições, duplicações, inserções, deleções, *frameshifts*, *nonsense*, entre outras; (b) o aminoácido que substitui a glicina; (c) a posição da mutação ao longo da tripla hélice, domínio estrutural funcional da molécula de colágeno tipo I, além de possíveis fatores externos (qualidade de vida, fatores ambientais, entre outros) (MARINI et al., 2007a; ZHANG et al., 2011).

A substituição do aminoácido glicina por qualquer outro ao longo das cadeias de pró-colágeno tipo I interfere no dobramento desta molécula, o que ocasiona uma mineralização óssea precária e, conseqüentemente, a expressão fenotípica da doença. O grau de comprometimento, com base no aminoácido que substitui a glicina, pode ser representado, em linhas gerais, como $Ala \leq Ser < Cys_{red} < Arg < Val < Glu \leq Asp$ (BECK et al., 2000; BUEVICH et al., 2004).

Após o evento inicial de nucleação, a conformação em tripla hélice do colágeno tipo I é propagada da região C-terminal para a N-terminal. Assim, sugere-se que substituições de glicina ao longo da região C-terminal das cadeias $\alpha 1(I)$ ou $\alpha 2(I)$ resultam em fenótipos mais graves daqueles observados ao longo da região N-terminal, uma vez que atrasos no processo de dobramento da tripla hélice podem significar excessivas modificações pós-traducionais e comprometimento estrutural da molécula de colágeno nascente. A fragilidade óssea, na presença de fibrilas colágenas anormais, é o reflexo das alterações sobre as estruturas dos cristais minerais ósseos (BATEMAN et al., 1992; BHATE et al., 2002; BUEVICH et al., 2004; BYERS et al., 2001).

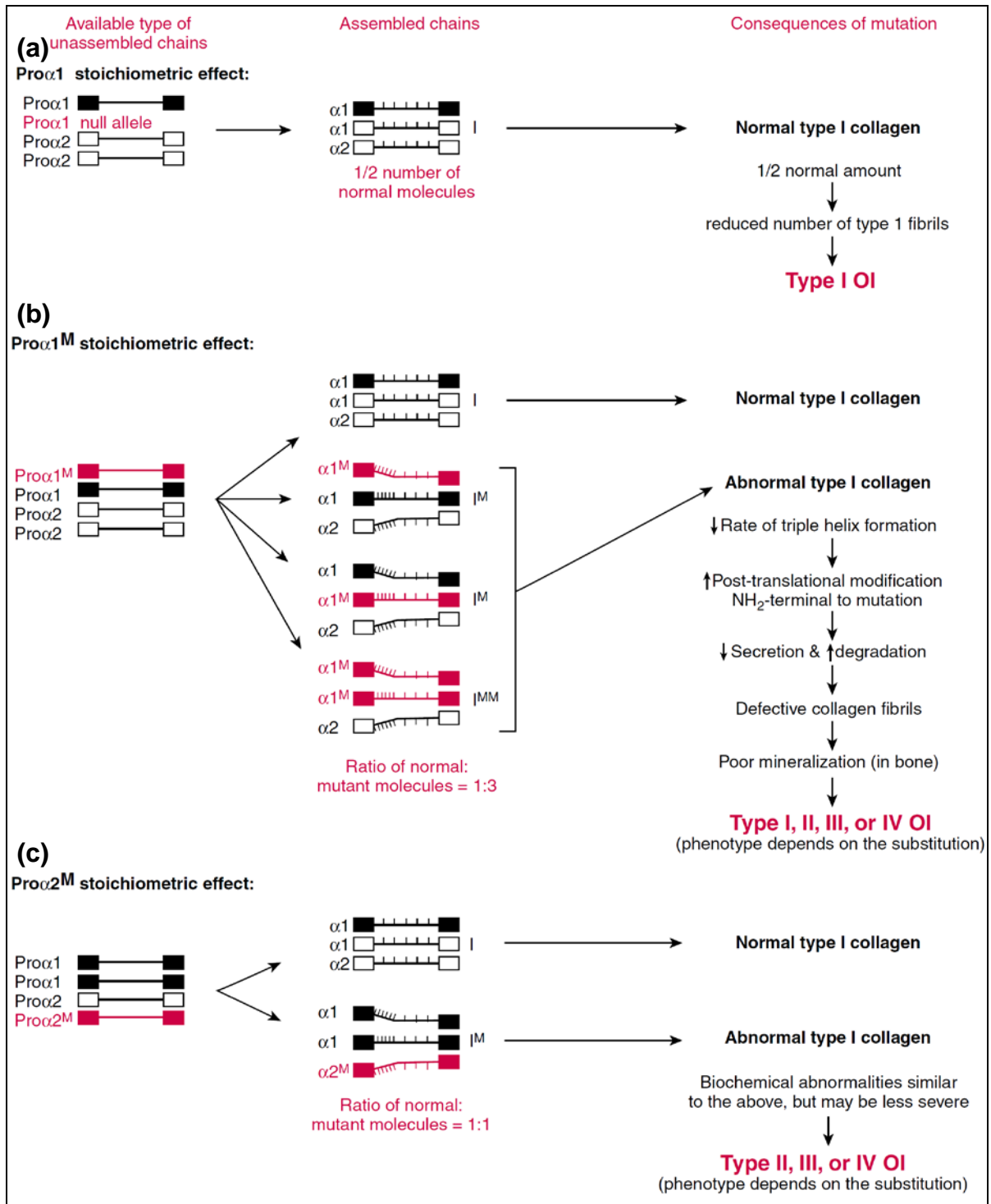


Ilustração 3 – Relação entre Cadeias α 1(I) e α 2(I) Normais vs. Anormais e os Fenótipos Resultantes. (a) Haploinsuficiência do alelo COL1A1 (OI tipo I). (b) Moléculas α 1(I) estruturalmente anormais (vermelho) com mutações em região de tripla hélice (OI tipos I, II, III e IV). (c) Moléculas α 2(I) estruturalmente anormais (vermelho) com mutações em região de tripla hélice (OI tipos II, III e IV). Coluna 1: cadeias de pró-colágenos disponíveis para formação da tripla hélice. Coluna 2: Efeito estequiométrico do pró-colágeno tipo I e a razão de formação de moléculas normais e defeituosas. As barras verticais em cada cadeia de pró-colágeno indicam as modificações pós-traducionais. Coluna 3: O efeito da mutação no processamento bioquímico do colágeno. α 1^M/ α 2^M = cadeias com mutação *missense* (WALTER BURNS SAUNDERS COMPANY, acesso em 21 jul. 2011 - Modificado).

Verificar a correlação genótipo: fenótipo em OI com base nas mutações estruturais do colágeno tipo I tem sido uma tarefa bastante difícil e complexa, pois, uma dada alteração pode resultar em quadros clínicos distintos, assim como um mesmo quadro clínico pode ter origens genéticas distintas em diferentes indivíduos (MARINI et al, 2007a).

1.6 Técnicas Básicas em Biologia Molecular Aplicadas ao Diagnóstico de Doenças Genéticas

A universalização da Biotecnologia tem permitido diagnosticar diferentes doenças Mendelianas por meio de técnicas de Biologia Molecular e Bioinformática, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o Sequenciamento Automático, entre outros. Em virtude da grande heterogeneidade genética da doença, a associação de técnicas economicamente viáveis com foco na triagem de mutações, como a técnica de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP), viabiliza a aplicação de um protocolo de diagnóstico molecular em OI. Em adição, o desenvolvimento e o uso racional de biotecnologias emergentes em diagnóstico e tratamento possibilitam a qualificação de profissionais diferenciados no sentido de garantir a reprodutibilidade das técnicas empregadas para o diagnóstico molecular da doença.

1.6.1 Reação em Cadeia da Polimerase

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método revolucionário com base na habilidade da enzima DNA polimerase em sintetizar novas fitas de DNA complementares a uma fita molde. Pelo fato da enzima adicionar nucleotídeos somente em extremidades com o grupo 3'-OH, é necessário o uso de *primers* para

que o primeiro nucleotídeo possa ser adicionado. Por este motivo, a técnica permite delinear uma região específica da sequência molde da qual se deseja amplificar. Ao final da reação de PCR, a sequência específica será acumulada aos bilhões de cópias (amplicons) (INNIS; GELFAND, 1990; MULLIS; FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1985).

Uma vez que não há um protocolo único apropriado para todas as situações, cada reação de PCR necessita ser padronizada a fim de se evitar produtos indetectáveis ou em baixa concentração do produto desejado, a presença de bandas inespecíficas por anelamento dos *primers* em regiões distintas, a formação de dímeros de *primers* que competem pela amplificação juntamente com os produtos desejados, entre outros. Existe uma série de parâmetros que influenciam a especificidade, fidelidade e o rendimento do produto desejado, como a concentração da enzima DNA polimerase, dNTP (deoxinucleotídeos trifosfatados), presença ou ausência de dimetilsulfóxido (DMSO), concentração de $MgCl_2$ (cloreto de magnésio), nº. de ciclos e tempo/temperatura ideais em cada uma das etapas envolvidas na amplificação: (a) desnaturação do molde; (b) anelamento dos *primers* e, (c) extensão e síntese de *amplicons*, entre outros (INNIS; GELFAND, 1990; MULLIS; FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1985).

1.6.2 Polimorfismo Conformacional de Fita Simples

A técnica de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP) é um procedimento simples com base na desnaturação química ou térmica de ssDNAs (DNA fita simples) de diferentes estruturas primárias que se dobras em diferentes conformações, como resultado de autocomplementaridades e de interações intramoleculares. Sob condições eletroforéticas apropriadas, ssDNAs de diferentes conformações migram diferencialmente durante a eletroforese em gel de poliacrilamida, e a presença de possíveis mutações pode ser detectada como um padrão de bandas com mobilidade diferenciada ou pela alteração no número de

bandas visualizadas em gel (ORITA et al., 1989; SPINARDI; MAZARS; THEILLET, 1991).

Da mesma forma que ocorre com a PCR, diferentes parâmetros podem influenciar a capacidade de detecção de mutações pela técnica de SSCP como o tipo de mutação presente na sequência analisada, o tamanho do fragmento de DNA e seu conteúdo de GC (guanina e citosina), a temperatura do gel durante a eletroforese, a composição e a concentração do gel, a composição do tampão de corrida (força iônica e pH), a concentração de DNA, entre outros. Em geral, diferenças em um ou mais nucleotídeos podem ser detectados em fragmentos de 100pb-300pb e 300pb-450pb com aproximadamente 99% e 90% de acurácia, respectivamente. Contudo, existem relatos de detecção de mutações em fragmentos com até 800pb (HAYASHI; YANDELL, 1993; KUKITA et al., 1997; MEUSNIER et al., 2002; SUNNUCKS et al., 2000).

1.6.3 Sequenciamento Automático por Eletroforese Capilar

O sequenciamento é um processo que visa determinar a ordem dos nucleotídeos de um fragmento de DNA. A técnica mais utilizada é o método didesoxi ou de *Sanger*. Diferente da técnica de PCR tradicional, nesta técnica são utilizados deoxinucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e dideoxinucleotídeos (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP), que são marcados com material fluorescente e sem o grupo hidroxila no carbono 3'. Desta forma, a incorporação ao acaso de um dideoxinucleotídeo pela DNA polimerase interrompe a polimerização, o que gera ao final do processo fragmentos de tamanhos diferentes. A eletroforese capilar ou em gel dos fragmentos permite a separação por tamanho e a identificação dos fragmentos pela incidência de um laser sobre os dideoxinucleotídeos fluorescentes, o que gera um eletroferograma no qual cada nucleotídeo fica representado por um pico colorido. Ao final do processo obtemos o perfil constitutivo da sequência correspondente à região amplificada de interesse (SANGER; COULSON, 1975).

1.7 Tratamento e Perspectivas Futuras em OI

O gerenciamento clínico da OI é um evento multidisciplinar, pois envolve procedimentos cirúrgicos associados à reabilitação física progressiva, o cuidado das anormalidades auditivas, dentais e pulmonares, assim como a utilização de drogas, como os bifosfonatos e hormônio do crescimento (GH) recombinante. Os esforços terapêuticos visam maximizar a mobilidade e outras capacidades funcionais dos afetados. Em alguns casos, os atos de sentar e de caminhar são alcançados somente com o realinhamento de ossos longos, como o fêmur e a tíbia, após a aplicação de hastes intramedulares (ABULSAAD; ABDELRAHMAN, 2009; CHO et al., 2011; FORLINO et al., 2011).

No entanto, estes tratamentos não alteram a condição de fragilidade óssea, característica marcante da doença. Por esta razão, a busca por novas condutas médicas para o fortalecimento ósseo tem sido o principal foco das pesquisas em tratamento da OI. Assim, promessas futuras para o tratamento em OI envolvem o uso de terapia celular e a descoberta de novas drogas mais potentes (FORLINO et al., 2011; GLORIEUX, 2007).

Nos últimos 20 anos, uma grande variedade de bifosfonatos orais e parenterais tem sido utilizada no tratamento da OI, principalmente depois de observada uma drástica redução da dor óssea e na ocorrência de fraturas com o uso do pamidronato, um dos primeiros a ser utilizado. Os bifosfonatos são potentes agentes antirreabsortivos que inibem a função osteoclástica. A hipótese que permeia o uso destas drogas é de que a redução na atividade do sistema de reabsorção óssea possa compensar a deficiência osteoblástica (Ilustração 4). O seu uso está associado ao aumento da densidade mineral óssea (BMD), aumento no tamanho dos corpos vertebrais e espessamento do córtex ósseo, o que resulta na redução da ocorrência de fraturas e uma melhora global significativa no status funcional e deambulatório (BACHRACH; WARD, 2009; CHEUNG; GLORIEUX; RAUCH, 2009; GLORIEUX, 2007; LIN et al., 2008; LINDSAY, 2002).

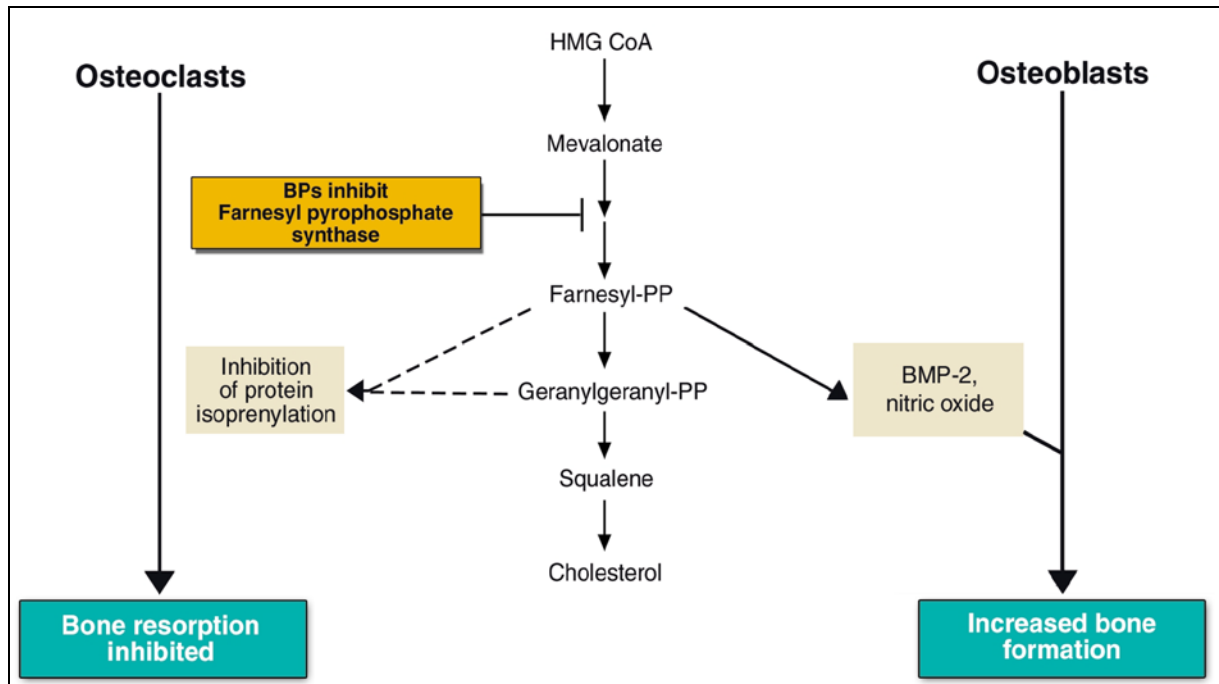


Ilustração 4 – Mecanismo Proposto de Ação dos Bifosfonatos (BP). BPs inibem um passo chave na via da *hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA)* redutase através da inibição da *farnesylpyrophosphate* sintase. Inibição da isoprenilação protéica resulta na apoptose de osteoclastos e inibição da reabsorção óssea osteoclástica. *GTP=guanosine 5' -triphosphate*; *PP=pyrophosphate*; *BMP-2=bone morphogenetic protein-2* (LINDSAY, 2002).

Pamidronato, alendronato, risedronato, neridronato, ácido zoledrônico, olpadronato, entre outros, são bifosfonatos (análogos sintéticos do pirofosfato) que inibem a farnesilpirofosfato sintase, uma enzima chave na via da *3-hydroxy-3methyl-glutaryl-coenzyme-A* redutase, necessária para a prenilação de proteínas intracelulares e a potencial inibição da atividade osteoclástica (CHEUNG; GLORIEUX; RAUCH, 2009; LIN et al., 2008; LINDSAY, 2002; WARD et al., 2011).

O pamidronato é um dos bifosfonatos mais utilizados nas formas grave a moderada de OI. No Brasil, a utilização do medicamento está autorizada desde 19 de dezembro de 2001, por meio da portaria nº. 2.305/GM. No Espírito Santo, o Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória de Vitória (HINSG) é um dos centros de referência no tratamento da OI. É administrado de forma sistêmica intravenosa em ciclos de 3 dias em intervalos de 4 meses, com doses de 1mg/kg/dia de peso corporal. A terapia oral, outra forma de posologia, já foi estabelecida através do uso de olpadronato e de alendronato, com melhoras significativas no aumento da densidade mineral óssea (BMD) e redução na incidência de fraturas de ossos longos (CHEUNG;

GLORIEUX; RAUCH, 2009; LIN et al., 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, acesso em 30 jul. 2011).

Nas formas leves da doença, é desejável que todos os pacientes apresentem níveis adequados de vitamina D (400-800U/dia) e de cálcio (800-1000mg/dia durante a infância), controlados mediante dieta ou suplementação. Contudo, deve-se avaliar a necessidade de uso de bifosfonatos e/ou hormônio do crescimento (GH) em cada caso. O GH afeta o crescimento ósseo e o *turnover* ósseo por estimular os osteoblastos, a síntese de colágeno e o crescimento longitudinal de ossos. Parâmetros referentes ao metabolismo ósseo são avaliados pelo menos duas vezes ao ano, enquanto que a massa óssea é verificada de uma a duas vezes ao ano, dependendo do comprometimento ósseo e idade do paciente, entre outros (HEATH, 2010; MONTI et al., 2010).

O ácido zoledrônico é um bifosfonato bastante recente cujo uso tem demonstrado vantagens sobre o pamidronato, tais como a aplicação em doses mais baixas (2-4mg) e menos frequentes (a cada 6 meses), por ter maior potência e eficácia a longo prazo na supressão do *turnover* ósseo e, principalmente, um baixo tempo de infusão (redução de 2-4 horas para 15 minutos), o que ocasiona uma menor irritação venosa (PANIGRAHI et al., 2010; VUORIMIES et al. 2011).

Tecnologias recentes em Biologia Molecular têm propiciado o desenvolvimento de modelos transgênicos de OI, necessários para o desenvolvimento de terapias gênicas e celulares, como tratamentos em potencial para a OI. Contudo, um fator de complicação à terapia gênica é a heterogeneidade genética da doença e pelo fato de que grande parte das mutações em OI são dominantes negativas, onde o alelo mutado interfere no funcionamento do alelo normal (MARIJANOVIĆ et al., 2010).

A terapia gênica em OI visa à reposição ou o silenciamento do alelo mutante como fator de correção para o defeito causativo da doença. As terapias de supressão anti-senso visam reduzir ou o silenciar seletivamente a expressão do alelo mutante, sem interferir na expressão do alelo normal e, como consequência, transformam bioquimicamente uma condição grave da doença em uma forma mais branda. Assim, terapias com RNA de interferência (RNAi) baseiam-se no uso de pequenas moléculas de RNA dupla-fita (siRNAs) que suprimem, por sequência-dependência,

um gene expresso. Uma das limitações das técnicas anti-senso é a falta de uma real especificidade contra o transcrito mutante e a dificuldade de uma expressão estável das moléculas anti-senso, o que limita a terapia gênica a estudos *in vitro* ou *ex vivo* (LINDAHL et al., 2008; MARIJANOVIĆ et al., 2010; MONTI et al., 2010).

Outra possibilidade é a reposição molecular de células que carregam o gene mutado por células normais, obtidas a partir de células tronco mesenquimais/embrionárias, uma vez que as mesmas podem migrar para os ossos e se diferenciarem em osteoblastos, com formação de ossos *in vivo*. Contudo, a compatibilidade doador-receptor é uma das dificuldades a ser enfrentada. Existe também a possibilidade de transplante precoce de células tronco intrauterino, durante o desenvolvimento fetal (MONTI et al., 2010).

Em suma, a combinação da terapia gênica e o transplante de células tronco estão sendo continuamente avaliada e poderá ser uma alternativa de tratamento em OI no futuro, dada a complexidade da doença (NIYIBIZI; LI, 2009).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Verificar a ocorrência de mutações patogênicas em regiões codificantes do gene *COL1A1*, incluindo sítios de *splicing* e regiões flanqueadoras, em pacientes com Osteogênese Imperfeita atendidos no Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, Vitória/ES.

2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar uma técnica de triagem de mutações economicamente viável para o gene *COL1A1* por meio da implantação da técnica de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP);
- Verificar a presença de mutações patogênicas em regiões codificantes do gene *COL1A1*, incluindo sítios de *splicing* e regiões flanqueadoras, a partir de amostras de sangue periférico extraídas de pacientes com Osteogênese Imperfeita (OI) dos tipos I, III e IV;
- Identificar as alterações genéticas evidenciadas em amostras de DNA de pacientes que apresentarem perfis distintos de mobilidade eletroforética em géis de SSCP, a partir dos produtos amplificados pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), por meio de Sequenciamento automático e comparação das sequências obtidas com as sequências de referência para o gene *COL1A1*;
- Verificar a correlação genótipo: fenótipo por meio da associação das mutações genéticas com os sintomas clínicos observados em pacientes com OI.

3 Metodologia

3.1 Amostras

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 compreendeu 33 famílias não aparentadas, das quais 25 representam casos esporádicos. Os demais são casos familiares onde ocorre a recidiva da doença na família. Assim, pacientes afetados pela doença que foram atendidos no HINSG, incluindo pais/responsáveis, foram convidados a participar do estudo. Aqueles que consentiram em participar da pesquisa o ratificaram por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, mediante esclarecimento prévio a cerca de procedimentos, riscos e benefícios do estudo.

A considerável variabilidade fenotípica, tanto no âmbito intrafamiliar como no interfamiliar, tornam a classificação clínica um processo arduamente difícil e complexo, o que requer observações mais aprofundadas a cerca das diferentes peculiaridades clínicas apresentadas pelos indivíduos afetados.

Apesar dos avanços envolvendo estudos bioquímicos, genéticos e moleculares recentes terem contribuído para um melhor entendimento da patogênese da doença, o mesmo não podemos dizer a cerca da classificação clínica, que ainda é controversa no meio científico. Algumas correntes propõem a continuidade no uso dos critérios de Sillence e colaboradores (1979) I, II-A, II-B, II-C, III e IV para a classificação clínica e radiológica da OI, mas com a adição de informações genéticas, o que evitaria o surgimento de novos tipos clínicos com base na etiologia genética. Os tipos V e VI ainda seriam parte da classificação revisada por conta de peculiaridades clínicas, radiológicas e/ou histológicas, observadas nesses tipos (VAN DIJK et al., 2010).

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 5mL 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 \pm 4.55 anos. Os dados clínicos coletados para cada paciente, obtidos mediante entrevista e pesquisa de informações junto aos prontuários clínicos (Apêndice), estão descritos nos Quadros 1, 2 e 3.

Quadro 1 – Relação de Pacientes com OI Tipo I

Registro	Sexo	Idade	F/E	Fraturas	DO	MD	CV	DA	EA	CA
C5	M	12	F	4	leve	+	+	-	-	-
C7	M	9	E	11	moderada	+	-	-	-	-
C9	F	16	F	5	-	-	-	-	+	-
C10	M	7	E	7	leve	-	-	-	+	-
C25	F	5	E	14	leve	+	-	+	-	-
C27	M	4	F	17	-	-	-	-	+	-
C29	F	13	E	4	leve	+	+	-	+	-
C31	M	16	F	2	-	-	-	-	+	+
C37	F	2	F	4	leve	-	-	-	+	-
C42	F	11	E	8	leve	-	-	-	+	-
C46	M	11	E	18	leve	-	-	-	+	-
C58	M	13	E	4	-	-	-	-	+	-
C59	M	3	E	5	-	-	-	-	+	-
C61	M	3	F	1	leve	-	-	-	+	-
C72	M	10	E	15	leve	-	-	-	+	-

F: OI familiar; E: OI esporádica; DO: deformidade óssea; MD: manifestações dentárias; CV: comprometimento da visão; DA: deambulação anormal; EA: Esclerótica azulada; CA: comprometimento auditivo; -: Ausência; +: Presença.

Quadro 2 – Relação de Pacientes com OI Tipo III

Registro	Sexo	Idade	F/E	Fraturas	DO	MD	CV	DA	EA	CA
C1	M	10	F	50	grave	+	-	+	+	-
C2	M	14	E	19	moderada	-	-	+	+	-
C12	M	8	E	incontáveis	moderada	+	-	+	+	-
C20	M	13	E	incontáveis	moderada	+	+	+	+	-
C21	F	16	F	incontáveis	grave	-	+	+	+	-
C24	M	2	E	10	moderada	-	-	+	-	-
C26	M	4	E	50	grave	+	-	+	+	-
C33	F	4	E	26	leve	+	-	+	+	-
C45	F	7	E	20	grave	+	-	+	+	-
C57	M	3	E	incontáveis	grave	+	-	+	+	-

F: OI familiar; E: OI esporádica; DO: deformidade óssea; MD: manifestações dentárias; CV: comprometimento da visão; DA: deambulação anormal; EA: Esclerótica azulada; CA: comprometimento auditivo; -: Ausência; +: Presença.

Quadro 3 – Relação de Pacientes com OI Tipo IV

Registro	Sexo	Idade	F/E	Fraturas	DO	MD	CV	DA	EA	CA
C8	M	9	E	74	leve	+	-	+	-	-
C11	M	9	E	3	leve	+	-	+	+	-
C23	F	8	E	5	moderada	+	-	-	-	-
C30	F	4	E	21	moderada	-	-	-	-	-
C36	F	1	E	4	leve	-	-	-	+	-
C41	F	6	E	2	leve	+	-	+	-	-
C43	F	2	F	2	moderada	+	-	-	+	-
C44	F	6	E	10	leve	-	-	+	+	-

F: OI familiar; E: OI esporádica; DO: deformidade óssea; MD: manifestações dentárias; CV: comprometimento da visão; DA: deambulação anormal; EA: Esclerótica azulada; CA: comprometimento auditivo; -: Ausência; +: Presença.

Para auxiliar na distinção entre variações genéticas normais e patogênicas na amostra de pacientes e padronização das técnicas abordadas neste estudo, foram coletados entre 2 a 5mL de sangue periférico de 100 indivíduos normais (45 homens e 55 mulheres com faixa etária entre 18 e 30 anos) – aqueles saudáveis e que não possuem sinais/sintomas da doença ou casos isolados na família e que consentiram em participar do estudo – junto ao Departamento de Biologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), no Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM). Os mesmos foram armazenados em geladeira a 4°C até o processamento. Os pacientes foram registrados sob a letra C, e controles normais sob a letra N. A coleta e o estudo das amostras foi realizada no NGHM-UFES por meio da

colaboração dos integrantes do grupo de pesquisa especialmente pelos alunos Clara Barbirato Furtado, Márcio Germello, Geise Quirino, Bruno Pimenta e Thaíssa Oliveira, entre outros. A identidade de pacientes e familiares foi preservada, assim como a de todos os indivíduos normais que contribuíram com o estudo. Todos os dados clínicos e materiais biológicos estão sob a responsabilidade da pesquisadora responsável, Prof^a. Dr^a. Flavia de Paula.

3.2 Extração de DNA

A técnica de extração de DNA a partir de 2 a 5mL de sangue periférico foi elaborada com base em metodologia previamente descrita (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988). As amostras de DNA de controles normais foram inicialmente extraídas, quantificadas e utilizadas para a padronização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio da amplificação de fragmentos contendo os 52 exons do gene *COL1A1*, incluindo sítios de *splicing* e regiões flanqueadoras. Todos os DNAs extraídos foram quantificados em espectrofotômetro *NanoDropTM 1000[®]* (Thermo Scientific, USA) e diluídos para a concentração ideal de uso (20ng/μL) em água ultrapura. O equipamento foi utilizado em colaboração junto ao NGACB-UFES, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Valéria Fagundes.

3.3 Amplificação das Regiões de Interesse do DNA e Análise dos Fragmentos Amplificados

Os fragmentos de exons do gene *COL1A1* foram amplificados através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), com base em metodologias previamente descritas e amplamente conhecidas (INNIS; GELFAND, 1990; MULLIS; FALOONA,

1987; SAIKI et al., 1985). Termocicladores *Verity*[®] *Thermal Cycler* (Applied Biosystems, USA) e *GeneAmp*[®] *PCR System 9700* (Applied Biosystems, USA) foram utilizados na padronização da técnica que permitiu amplificar as regiões codificantes do gene *COL1A1*, incluindo sítios de *splicing* e regiões flanqueadoras. Para amplificar fragmentos de todos os 52 exons, foram sintetizados 51 pares de *primers* previamente publicados, uma vez que os fragmentos compreendidos pelos exons 33 e 34 foram fusionados e amplificados com apenas 1 par de *primer* (KÖRKKO et al., 1998). Os tamanhos dos fragmentos de DNA amplificados variaram de 220pb a 475pb (Quadro 4).

As condições de amplificação obedeceram as recomendações do fabricante da enzima Taq Polimerase Recombinant BR (*Invitrogen*TM, BR): 1X PCR Buffer 10X; 0.2mM dNTP 10mM; 0.5mM para cada um dos primers (*forward* e *reverse*) e 1U de Taq Polimerase. Foram utilizados 40ng de DNA em cada reação de PCR. A padronização da PCR possibilita a determinação das variáveis ótimas para concentração de cloreto de magnésio (MgCl₂ 50mM), dimetilsufóxido (DMSO), tempo e temperatura para cada um dos fragmentos amplificados. As condições ideais de amplificação de cada fragmento do gene *COL1A1* padronizadas e as variáveis presença ou ausência de dimetilsufóxido (DMSO), concentração de MgCl₂ (cloreto de magnésio), nº. de ciclos e tempo/temperatura ideais estão descritas no Quadro 5.

O objetivo da técnica de eletroforese em gel no processo de padronização da PCR é verificar a ocorrência de uma única banda de tamanho esperado, quando comparada com um padrão de peso molecular, aplicado no gel e utilizado como referência. Para verificar o resultado da amplificação, quatro microlitros de *Gel Loading Buffer* [*Bromofenol Blue* 0.25%; *Sacarose* 40%] foram incorporados a seis microlitros de cada amostra amplificada pela PCR e aplicados em gel de poliacrilamida 7% [9.0mL de poliacrilamida 40%; 5.0mL de tampão TBE 10X (890mM Tris base, 890mM ácido bórico; 20mM EDTA; pH8.0); 350µL de APS 10% (persulfato de amônio); 35µL de TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine), completar com água destilada até 50mL]. A voltagem padrão utilizada foi de 240V durante 90 minutos. A coloração do gel foi executada com base em metodologia já descrita e amplamente utilizada até a visualização das bandas (BASSAM;

CAETANO-ANOLLÉS; GRESSHOFF, 1991; SANGUINETTI; DIAS NETO; SIMPSON, 1994).

Quadro 4 - Relação de *Primers* Utilizados no Estudo do Gene COL1A1

(continua)

Exon	Tamanho	Fragmento	Primers	Sequência do primer (5'-3')
1	70pb	321pb	<i>forward</i>	GACGGGAGTTTCTCCTCGGGGTC
			<i>reverse</i>	GAGTCTCCGGATCATCCACGTC
2	11pb	333pb	<i>forward</i>	GCTGATGAGGAGCAGGCGAG
			<i>forward</i>	ATCCAAGTGTGCCTCTTAGAC
3	15pb	240pb	<i>reverse</i>	GTTTGCTAATGCTGCTCCCGTC
			<i>forward</i>	GCTGGAGGCTCTGCCGACGGGAGCAGC
4	36pb	372pb	<i>reverse</i>	GGCCTCGGGGGCCAGTGTCTC
			<i>forward</i>	GCCTCTGCCGACGGGAGCAGC
5	93pb	386pb	<i>reverse</i>	AGGCTGTCCAGGGATGCCATC
			<i>forward</i>	ACCTGGCCTCTTGTTCCTTCTC
6	54pb	261pb	<i>reverse</i>	CTGTAGGATTCTTGCAACTTTTCT
			<i>forward</i>	CACACCAGGAAGTGCATGATGTCAG
7	45pb	300pb	<i>reverse</i>	CTCCCAAGCTGTCTATAACCAGCCGC
			<i>forward</i>	ATACGCGGCTGGTATAGACAG
8	54pb	247pb	<i>reverse</i>	TCTCTGAGCATCTCTCCTGCCCTCA
			<i>forward</i>	TGGAGGGAAGACTGGGATGAG
9	54pb	347pb	<i>reverse</i>	AAGACCCAGGCCTGGGAGTTCTTCT
			<i>forward</i>	CCCCTGGTGAGCCTGGCGAG
10	54pb	262pb	<i>reverse</i>	CTGAGTATCGTTCCCAAATGTG
			<i>forward</i>	CTGGGGCCCCCAAACCTGACCTGC
11	54pb	292pb	<i>reverse</i>	GGCCATTAGAACAACACTCACTG
			<i>forward</i>	CTGAACCTGGGCTTCACTGCAC
12	54pb	253pb	<i>reverse</i>	GATGTCCACTCTCTGGCCCTTG
			<i>forward</i>	CAAAGGGATGGCGGTGATGAC
13	45pb	228pb	<i>reverse</i>	CTGTAGATCAGAGAATAATGAG
			<i>forward</i>	GTAAGAGGCTGTCTGAACATC
14	54pb	263pb	<i>reverse</i>	GTCAGATGAGATGGGAGACAGC
			<i>forward</i>	GGTGAGTGTGCCAGTTCCAG
15	45pb	279pb	<i>reverse</i>	CGTTAAGTCCACTGAGCACTG
			<i>forward</i>	GATCCCTGAGCTCTGGAAGGGGCTC
16	54pb	229pb	<i>reverse</i>	GAGATGGCAGCTGCAAGTCAC
			<i>forward</i>	GGCGAGGTTATGTTGGTCTG
17	99pb	320pb	<i>reverse</i>	TTTGGGGAACAGGGAGACATGAACC
			<i>forward</i>	CTGATCATTGCTCTCCTGTCCCTGT
18	45pb	220pb	<i>reverse</i>	ACCAGGCTGTCCATCAGCAC
			<i>forward</i>	TAAGTGTCCCCGACTCAGTGTC
19	99pb	319pb	<i>reverse</i>	AGCCAGGGCGTGACGTAGGAG
			<i>forward</i>	GAAGAGGATGAGCTGAGAGTC
			<i>reverse</i>	AAGGGTAACAGCGTGAGTAC

Quadro 4 - Relação de *Primers* Utilizados no Estudo do Gene COL1A1

(continuação)

Exon	Tamanho	Fragmento	Primers	Sequência do primer (5'-3')
20	54pb	348pb	<i>forward</i>	CAAGGGTAACAGCGTGAGTAC
			<i>reverse</i>	TGAGGCTGGGCCTCCAGTGTC
21	108pb	292pb	<i>forward</i>	GGCTCTGAGGCTGGCACAGGATG
			<i>reverse</i>	GGAAACCACGGCTACCAGGTC
22	54pb	278pb	<i>forward</i>	CCGGACCCCTGGCGAGCGTG
			<i>reverse</i>	CACAGGAACAGTTAGGGTCTC
23	99pb	309pb	<i>forward</i>	CCCAAGGTAACCTCTCCTTGC
			<i>reverse</i>	GATCCGGAACGCCTCATCCCAAGAC
24	54pb	283pb	<i>forward</i>	GTCTTGGGATGAGGCGTTCGGATC
			<i>reverse</i>	GTCCGGGGCGACCATCTTGAC
25	99pb	368pb	<i>forward</i>	GCCCTGGCAGCCCTGGTCCTG
			<i>reverse</i>	TAGGGAGGCTGAGGTCCAGAAAGTG
26	54pb	309pb	<i>forward</i>	AGGGCCCAGCAAGAAGCACCTGC
			<i>reverse</i>	GCTGAGGACCGTGGCCTCTAGC
27	54pb	239pb	<i>forward</i>	CCTGCAGGAGGGGTGCTAGAG
			<i>reverse</i>	CACAGAGAGAACTACAGTCAC
28	54pb	247pb	<i>forward</i>	CTGCTGTGAGTGTCCCTGATG
			<i>reverse</i>	GGAGGGAAGGTTTAGAATCTG
29	54pb	251pb	<i>forward</i>	GGTGAGGCCTCATGGCTGTC
			<i>reverse</i>	TGGCTGTCTGATTAGCTAGGAGGCGG
30	45pb	246pb	<i>forward</i>	GGGTTCTCTCTAATCACGGCCAGAC
			<i>reverse</i>	AGAAGGGAAGGACAGGGCATGTGAAG
31	99pb	318pb	<i>forward</i>	CCTCTGGAGCAAGAGTAAGTAG
			<i>reverse</i>	ACCCACACCCTATCTCCATG
32	108pb	291pb	<i>forward</i>	TTTCTCAAGGCTTGTGCTTGGCCTTG
			<i>reverse</i>	GATTCAAAGGAGGCAGAGATGGGAGC
33-34	108pb	318pb	<i>forward</i>	CCTCTCAGGAAACCCAGACACAAGCA
			<i>reverse</i>	GTTCCAGGTTGACAGCTCAG
35	54pb	327pb	<i>forward</i>	GTCCTGCCAAACTGAGCTGTC
			<i>reverse</i>	ATTGGAGAGATGCGTCTGACAGGAGG
36	54pb	249pb	<i>forward</i>	CCCTGTCTGTGCCTTCACCCCTTGC
			<i>reverse</i>	CTTCTCCCCTGAGGATGGCTGAC
37	108pb	276pb	<i>forward</i>	TGCCTCCATTACTGCTCCTCC
			<i>reverse</i>	TGTAGGAGAGCACAGACGCATCAAGC
38	54pb	240pb	<i>forward</i>	TGAGTGGCTTGGCCCTCTGTG
			<i>reverse</i>	AGAGGGAGAACAGCCAACTCATCCG
39	54pb	259pb	<i>forward</i>	GAGTATCACCCGCCTCTCTGTTGAGC
			<i>reverse</i>	TCAGTCAGCCCCACCATCCTTCTG
40	162pb	337pb	<i>forward</i>	GTGGGGGCTGCCAGAAGGATG
			<i>reverse</i>	TGAGGTGCCAGACAGCAGCACAG
41	108pb	309pb	<i>forward</i>	AGTGCCAGCTCAGATCTCTGCAGCTC
			<i>reverse</i>	GTCCGCTGGAGTCATCTCTAC
42	108pb	329pb	<i>forward</i>	GAGAACAGATTTGGTAGAGATGAC
			<i>reverse</i>	CAGGGGAACCTTCGGCACCAG
43	54pb	242pb	<i>forward</i>	CCCATGCCAGTACCCTCAGCATGGC
			<i>reverse</i>	GGGAGAGCAGGGGAATATGGGTCAG

Quadro 4 - Relação de *Primers* Utilizados no Estudo do Gene COL1A1

(conclusão)

Exon	Tamanho	Fragmento	Primers	Sequência do primer (5'-3')
44	108pb	304pb	<i>forward</i>	GCAACACTCCATGACCACAGC
			<i>reverse</i>	CCTGCCTGGGTGAAGTCCGAC
45	54pb	246pb	<i>forward</i>	GGAGAGAGAGATCCAGCAGAGGGGA
			<i>reverse</i>	GGGACAAACTGTCAGGCGGAAGTTC
46	108pb	297pb	<i>forward</i>	CATGCCTTCAGAACTCTACAG
			<i>reverse</i>	GGGAAAGAATGACTATCCAG
47	54pb	249pb	<i>forward</i>	GTTGCCACACTGCCCTTGTC
			<i>reverse</i>	AACCCTTCTCCAGAGAGGCAAAGGG
48	108pb	299pb	<i>forward</i>	CCGTGGGGCCAGAGCCAGCAG
			<i>reverse</i>	GCACAGAGAGGGAAGAGAGTGGGGA
49	258pb	475pb	<i>forward</i>	GCTGGTCCTGTTGTATGTAGC
			<i>reverse</i>	CCAGCACCATATGGTAGGGGCACAT
50	183pb	344pb	<i>forward</i>	CCAGGGTCCCCATGCCCATATGTGC
			<i>reverse</i>	CATGTCCCTTCTGAGCACTGGGCTA
51	243pb	399pb	<i>forward</i>	GGACCCTGGACAGGAAGGCCAGCAGG
			<i>reverse</i>	GATGGAGAGAGGGCACTATGGC
52	147pb	319pb	<i>forward</i>	GGGCTTTTTGGCCAGGCCATAGTGCC
			<i>reverse</i>	GAGGGGGTTCAGTTTGGGTTGCTTGCTG

Fonte: Modificado de Körkkö et al. (1998)

Quadro 5 – Padronização da PCR Para o Gene COL1A1

(continua)

Exon	DI	D	A	E	EF	Ciclos	MgCl ₂	DMSO
1		94°C / 30s	70°C / 30s	72°C / 30s		30	3.50mM	-
2		94°C / 30s	57°C / 30s	72°C / 30s		35	0.75mM	5%
3		94°C / 30s	70°C / 30s	72°C / 30s		25	2.50mM	5%
4		94°C / 30s	72°C / 30s	72°C / 30s		25	1.50mM	-
5		94°C / 30s	59°C / 30s	72°C / 30s		30	1.00mM	-
6		94°C / 30s	72°C / 30s	72°C / 30s		25	1.50mM	-
7		94°C / 30s	72°C / 30s	72°C / 30s		30	3.50mM	-
8		94°C / 30s	67°C / 30s	72°C / 30s		30	2.50mM	-
9		94°C / 30s	64°C / 30s	72°C / 30s		30	1,50mM	-
10		94°C / 30s	62°C / 30s	72°C / 30s		30	0.75mM	5%
11	94°C	94°C / 30s	68°C / 30s	72°C / 30s	72°C	25	3.50mM	5%
12	5min	94°C / 30s	62°C / 30s	72°C / 30s	5min	25	4.50mM	5%
13		94°C / 30s	66°C / 30s	72°C / 30s		30	3.50mM	5%
14		94°C / 30s	65°C / 30s	72°C / 30s		30	1.50mM	-
15		94°C / 30s	69°C / 30s	72°C / 30s		25	3.50mM	5%
16		94°C / 30s	69°C / 30s	72°C / 30s		30	3.50mM	-
17		94°C / 30s	67°C / 30s	72°C / 30s		30	1.50mM	5%
18		94°C / 30s	67°C / 30s	72°C / 30s		30	2.50mM	-
19		94°C / 30s	59°C / 30s	72°C / 30s		30	3.50mM	5%
20		94°C / 30s	68°C / 30s	72°C / 30s		30	1.50mM	-
21		94°C / 30s	55°C / 30s	72°C / 30s		25	1.50mM	10%
22		94°C / 30s	62°C / 30s	72°C / 30s		30	2.50mM	-

Quadro 5 – Padronização da PCR Para o Gene COL1A1

								(conclusão)
Exon	DI	D	A	E	EF	Ciclos	MgCl ₂	DMSO
23		94°C / 30s	66°C / 30s	72°C / 30s		30	2.50mM	-
24		94°C / 30s	64°C / 30s	72°C / 30s		25	1.25mM	-
25		94°C / 30s	70°C / 30s	72°C / 30s		25	2.50mM	5%
26		94°C / 30s	70°C / 30s	72°C / 30s		25	2.50mM	5%
27		94°C / 30s	66°C / 30s	72°C / 30s		30	2.50mM	5%
28		94°C / 30s	60°C / 30s	72°C / 30s		25	2.50mM	5%
29		94°C / 30s	69.5°C / 30s	72°C / 30s		30	2.50mM	5%
30		94°C / 30s	72°C / 30s	72°C / 30s		25	2.50mM	5%
31		94°C / 30s	63°C / 30s	72°C / 30s		30	1.25mM	-
32		94°C / 30s	61°C / 30s	72°C / 30s		25	2.50mM	5%
33/34		94°C / 30s	70°C / 30s	72°C / 30s		30	1.50mM	-
35		94°C / 30s	66°C / 30s	72°C / 30s		25	2.00mM	5%
36		94°C / 30s	67°C / 30s	72°C / 30s		25	2.50mM	-
37	94°C	94°C / 30s	68°C / 30s	72°C / 30s	72°C	25	2.00mM	-
38	5min	94°C / 30s	68°C / 30s	72°C / 30s	5min	30	2.50mM	-
39		94°C / 30s	68°C / 30s	72°C / 30s		30	0.75mM	5%
40		94°C / 30s	72°C / 30s	72°C / 30s		27	1.25mM	-
41		94°C / 30s	72°C / 30s	72°C / 30s		30	3.25mM	-
42		94°C / 30s	60°C / 30s	72°C / 30s		30	1.00mM	10%
43		94°C / 30s	72°C / 30s	72°C / 30s		30	2.50mM	10%
44		94°C / 30s	68°C / 30s	72°C / 30s		30	3.50mM	5%
45		94°C / 30s	72°C / 30s	72°C / 30s		30	2.50mM	5%
46		94°C / 30s	57°C / 30s	72°C / 30s		27	2.50mM	-
47		94°C / 30s	74°C / 30s	72°C / 30s		25	1.50mM	-
48		94°C / 30s	74°C / 30s	72°C / 30s		30	1.50mM	-
49		94°C / 45s	74°C / 45s	72°C / 45s		35	1.50mM	-
50		94°C / 30s	76°C / 30s	72°C / 30s		25	3.50mM	5%
51		94°C / 30s	72°C / 30s	72°C / 30s		30	2.50mM	-
52		94°C / 30s	70°C / 30s	72°C / 30s		25	1.00mM	5%

“DI”: Desnaturação inicial; “D”: Desnaturação; “A”: Anelamento; “E”: Extensão; “EF”: Extensão final.

3.4 Triagem de Mutações no Gene COL1A1

A técnica de *Single Strand Conformation Polymorphism*, ou Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP), foi aplicada na amostra analisada, após a amplificação de fragmentos do gene *COL1A1* por PCR, para verificar a presença de

possíveis alterações genéticas na amostra (ORITA et al., 1989; SPINARDI, MAZARS & THEILLET, 1991).

Cerca de 10µL de cada produto de PCR foram misturados a 2µL de *SSCP Loading Buffer* [Azul de bromofenol 0.05%, Xilenocianol 0.05%, Formamida 95%, 20mM EDTA], seguido de denaturação a 94°C por 10 minutos e choque térmico em gelo, sendo mantidas em temperatura abaixo de 0°C até a aplicação nos géis. Foram utilizadas três condições de géis de poliacrilamida: (a) 5% [9mL de Poliacrilamida 40%; 3,5mL de TBE 10X; 3.5mL de Glicerol; 600µL de APS 10%; 30µL de TEMED; completar com água destilada até 70mL], (b) 7% [12.25mL de Poliacrilamida 40%] e a versão comercial (c) *MDE[®] Gel Solution (Lonza Group Ltd., CH)* [13.75mL de MDE; 3.3mL de TBE 10X; 2.75mL de Glicerol; 220µL de APS 10%; 22µL de TEMED; completar com água destilada até 55mL].

A presença do glicerol em baixas concentrações (5-10%) favorece um aumento na sensibilidade do gel de SSCP e a separação de sequências mutadas, uma vez que os padrões eletroforéticos em SSCP são melhor visualizados em pH abaixo de 8.1. O glicerol reduz o pH do tampão de 8.4 para 7.7 ao formar um complexo ácido com os o íon borato. O glicerol, por causa de sua fraca ação desnaturante sobre ácidos nucleicos, abre parcialmente a estrutura dobrada de moléculas fita simples de forma que uma maior área superficial da molécula fica exposta, o que aumenta a chance das fibras da poliacrilamida detectarem as diferenças estruturais causadas por mutações, localmente confinadas (HAYASHI, 1991; KUKITA et al., 1997).

Os géis foram submetidos à eletroforese sob 8W de potência – um dos parâmetros que favorecem o aumento da temperatura de corrida do gel durante a eletroforese é a potência selecionada na fonte – em ambiente refrigerado (20-25°C). O tempo de corrida variou de acordo com os parâmetros (a) tamanho de fragmento (220-475pb) e (b) concentração do gel (5-7%/MDE), de forma que o padrão de bandas analisado ficasse localizado ao menos 2/3 distantes em extensão do gel (cerca de 40cm), contabilizados a partir da interface gel/tampão, o que representa uma faixa de tempo de 9-25h de corrida eletroforética. O aparato eletroforético utilizado na técnica foi a *S2 Sequencing Gel Electrophoresis Apparatus (Whatman Biometra, DE)*, que possui uma placa metálica de alumínio que permite a dissipação do calor e uma corrida eletroforética em temperatura uniforme por toda a extensão do gel (FUJITA; SILVER,

1994; HAYASHI; YANDELL, 1993; HUMPHRIES et al., 1997; KUKITA et al., 1997; SPINARDI; MAZARS; THEILLET, 1991).

A identificação de variações alélicas foi possibilitada após coloração do gel pela metodologia para coloração de géis descrita no item 4.3. (Amplificação das regiões de interesse do DNA e análise de fragmentos amplificados).

3.5 Sequenciamento e Análise das Alterações Genéticas

Todos os produtos de PCR que apresentaram um padrão de mobilidade eletroforética distinta ou variações no número de bandas visualizadas pela técnica de SSCP foram encaminhados ao serviço de sequenciamento do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As amostras foram previamente purificadas com kits de purificação por coluna *GenElute™ PCR Clean-Up Kit* (Sigma-Aldrich, USA), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop™ 1000®* (Thermo Scientific, USA).

A plataforma de sequenciamento utilizada foi a ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) e o kit utilizado para a reação de sequenciamento foi o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, do mesmo fabricante. A reação de sequenciamento foi executada com base nas instruções fornecidas pelo fabricante, modificada para ½ reação (10µL), conforme descrita a seguir: ½X *Ready Reaction Mix BigDye 2.5X*; 3.3pmol de *primer forward* ou *reverse*; 1X *Sequencing Buffer 5X*; DNA/H₂O até o volume final de 10µL. Foram utilizados 10ng/100pb de DNA em cada reação, que foram realizadas nos termocicladores *Verity® Thermal Cycler* (Applied Biosystems, USA) e *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems, USA). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, seguida de desnaturação a 96°C por 30-45 segundos, 55–76°C por 30 segundos e 60°C por 30-45 segundos, por 35 ciclos.

O produto de PCR purificado a ser sequenciado pré-sequenciamento foi precipitado pela técnica de Etanol/EDTA/ NaOAc/Glicogênio, segundo sugerido pelo fabricante do reagente *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, USA), conforme descrito a seguir: (1) Para cada reação de sequenciamento (10µL), adicionar 15µL de mix de precipitação [2µL de NaOAc 3M pH 5.2 + 2µL de Na₂-EDTA 125mM pH 8.0 + 1µL de glicogênio 1mg/mL + 10µL de água ultrapura] e vortexar por 1 minuto; (2) Incubar as amostras à - 20°C de 30 minutos a overnight; (3) Adicionar 60µL de etanol 100% a -20°C e vortexar por 1 minuto. Centrifugar imediatamente a 12.000g a 4°C por 30 minutos; (4) Remover o sobrenadante e lavar o pellet 2 vezes com 200µL de etanol 70% a -20°C. Em cada lavagem, vortexar por 1 minuto e centrifugar imediatamente a 12.000g a 4°C por 15 minutos; (5) Levar os microtubos em termociclador a 94°C por 1 minuto para eliminar vestígios de etanol; (6) Manter a 4°C até serem processadas.

Os eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento das amostras foram analisados com base na sequência referência NG_007400.1 disponível on-line (NCBI, acesso em 02 ago. 2011) e os resultados comparados com os dados presentes no *Database of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations* (DALGLEISH, 1997, 1998).

Resultados e Discussão

4.1 Resultados

Uma vez padronizada a técnica de PCR, os fragmentos dos 52 exons do gene *COL1A1* de 33 pacientes foram amplificados e submetidos à triagem de mutações por meio da técnica de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (SSCP), exemplificada pela Ilustração 5. Por se tratar de um método comparativo, amostras de controles normais também foram aplicadas no gel, o que favoreceu a detecção de fragmentos com alterações genéticas na amostra de pacientes com OI, através da comparação do padrão eletroforético e número de bandas observadas.

A utilização de três variações da técnica de SSCP – gel de poliacrilamida 5% e 7%, e *MDE[®] Gel Solution* – para a triagem de mutações do gene *COL1A1*, na amostra de pacientes com OI, possibilitou a detecção de diferentes alterações genéticas em DNA. O Sequenciamento automático dos fragmentos com alteração em SSCP identificou sete mutações patogênicas pontuais e em heterozigose, associadas com a expressão clínica da OI (Ilustração 6). Assim, o diagnóstico molecular da OI foi possível em aproximadamente 22% (7/33) dos pacientes analisados.

Duas mutações do tipo *frameshift* (mudança do quadro de leitura), provocadas por deleções e que resultam na formação de códons de parada prematuros adiante do sítio de alteração, estão caracterizadas a seguir.

Uma delas foi identificada no fragmento do exon 40 do paciente C31, portador de OI tipo I. Trata-se de uma deleção em heterozigose de uma guanina (G) codificante da posição 2750 (c.2750delG). Esta alteração provoca a mudança do quadro de leitura em uma das fitas de DNA pela conversão do aminoácido glicina (Gly-917; GGA) em ácido aspártico (Asp; GAC), com formação de um códon de parada (TAA) a 191 aminoácidos distantes, contabilizados a partir do aminoácido Asp resultante (p.Gly917AspfsX191). Esta mutação ainda não foi descrita na literatura científica e/ou registrada junto ao *Database of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations* (DALGLEISH, 1997, 1998).

A outra foi identificada no fragmento do exon 45 do paciente C2, que possui OI tipo III. Trata-se de uma deleção em heterozigose de uma citosina (C) codificante da

posição 3239 (c.3239delC). Esta alteração provoca a mudança do quadro de leitura em uma das fitas de DNA pela conversão do aminoácido prolina 1080 (Pro; CCT) em leucina (Leu; CTG), com formação de um códon de parada (TAA) a 28 aminoácidos distantes, contabilizados a partir do aminoácido Leu resultante (p.Pro1080LeufsX28). Esta mutação também não foi descrita na literatura científica e/ou registrada junto ao *Database of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations* (DALGLEISH, 1997, 1998).

Foram identificadas duas mutações do tipo *missense* (não sinônimas) que resultam na substituição do aminoácido glicina por outro aminoácido, e estão caracterizadas a seguir.

A primeira mutação do tipo *missense* foi identificada no fragmento do exon 17 do paciente C25, portador de OI tipo I, e trata-se de uma transverso em heterozigose de uma guanina (G) codificante da posição 1138 por uma timina (T) (c.1138G>T). Esta alteração provoca a substituição do aminoácido glicina 202 (Gly; GGT) por uma cisteína (Cys; TGT) (Gly202Cys). Esta mutação, identificada em colaboração com o aluno Márcio Germello de Almeida, já foi descrita e apresenta 1 registro junto ao *Database of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations* (DALGLEISH, 1997, 1998; MARINI et al., 2007a).

A segunda mutação do tipo *missense* foi identificada no fragmento do exon 45 do paciente C9, que possui OI tipo I, e trata-se de uma transição purínica em heterozigose de uma guanina (G) codificante da posição 3235 por uma adenina (A) (c.3235G>A). Esta alteração provoca a substituição do aminoácido glicina 901 (Gly; GGC) por uma serina (Ser; AGC) (Gly901Ser). Esta mutação já foi descrita e apresenta 10 registros junto ao *Database of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations* (DALGLEISH, 1997, 1998; HARTIKKA et al., 2004; KANEKO et al., 2011; MARINI et al., 2007a; MOTTES et al., 1992; ROSCHGER et al., 2008; ZHANG et al., 2011).

Também foram detectadas três mutações pontuais em regiões intrônicas conservadas, associadas aos eventos de *splicing*, e estão caracterizadas a seguir.

A primeira mutação pontual foi identificada no fragmento do íntron 16 do paciente C44, portador de OI tipo IV, e trata-se de uma transição purínica em heterozigose de

uma guanina (G) não codificante da posição +1 por uma adenina (A), adjacente à última base do *triplet* codificável do exon 16, IVS16+1G>A (c.1056+1G>A). Esta mutação, identificada em colaboração com o aluno Márcio Germello de Almeida, já foi descrita e apresenta 1 registro junto ao *Database of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations* (DALGLEISH, 1997, 1998; MARINI et al., 2007a).

A segunda mutação pontual foi identificada no fragmento do íntron 27 do paciente C20, que possui OI tipo III, e trata-se de uma transversão em heterozigose de uma guanina (G) não codificante da posição +1 por uma citosina (C), adjacente à última base do *triplet* codificável do exon 27, IVS27+1G>C (c.1875+1G>C). Esta mutação já foi descrita e apresenta 2 registros junto ao *Database of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations* (DALGLEISH, 1997, 1998). Um dos registros representa um trabalho publicado por BARBIRATO e colaboradores (2009).

A terceira mutação foi identificada no fragmento do íntron 37 do paciente C37, portador de OI tipo I, e trata-se de uma transição purínica em heterozigose de uma guanina (G) não codificante da posição +1 por uma adenina (A), adjacente à última base do *triplet* codificável do exon 37, IVS37+1G>A (c.2559+1G>A). Esta mutação, identificada em colaboração com o aluno Bruno Vinícius Pimenta de Almada, já foi descrita e apresenta 1 registro junto ao *Database of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations* (DALGLEISH, 1997, 1998; ZHANG et al., 2011).

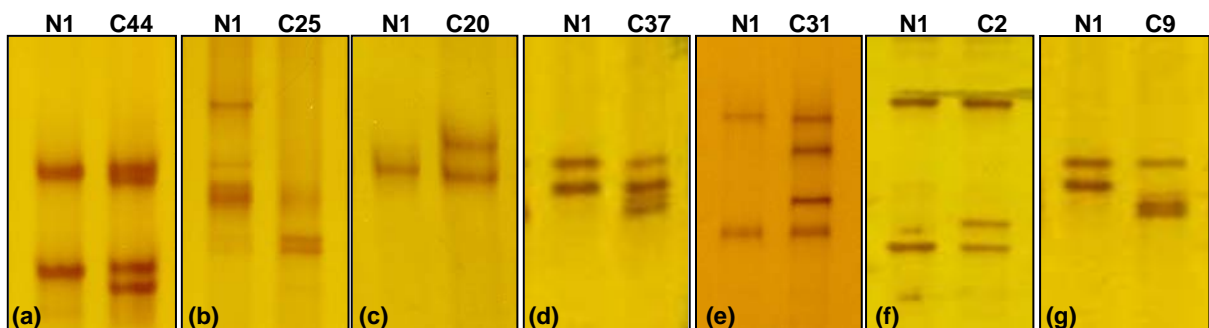


Ilustração 5 – Aplicação da Técnica de Triagem de Mutações por SSCP. A presença de possíveis mutações pode ser detectada como um padrão de bandas em gel de SSCP (poliacrilamida/MDE) com mobilidade diferenciada ou pela alteração no número de bandas visualizadas. N: controle normal (referência); C: amostra com alteração genética em SSCP. (a) Exon 16; (b) Exon 17; (c) Exon 27; (d) Exon 37; (e) Exon 40; (f) Exon 45; (g) Exon 45.

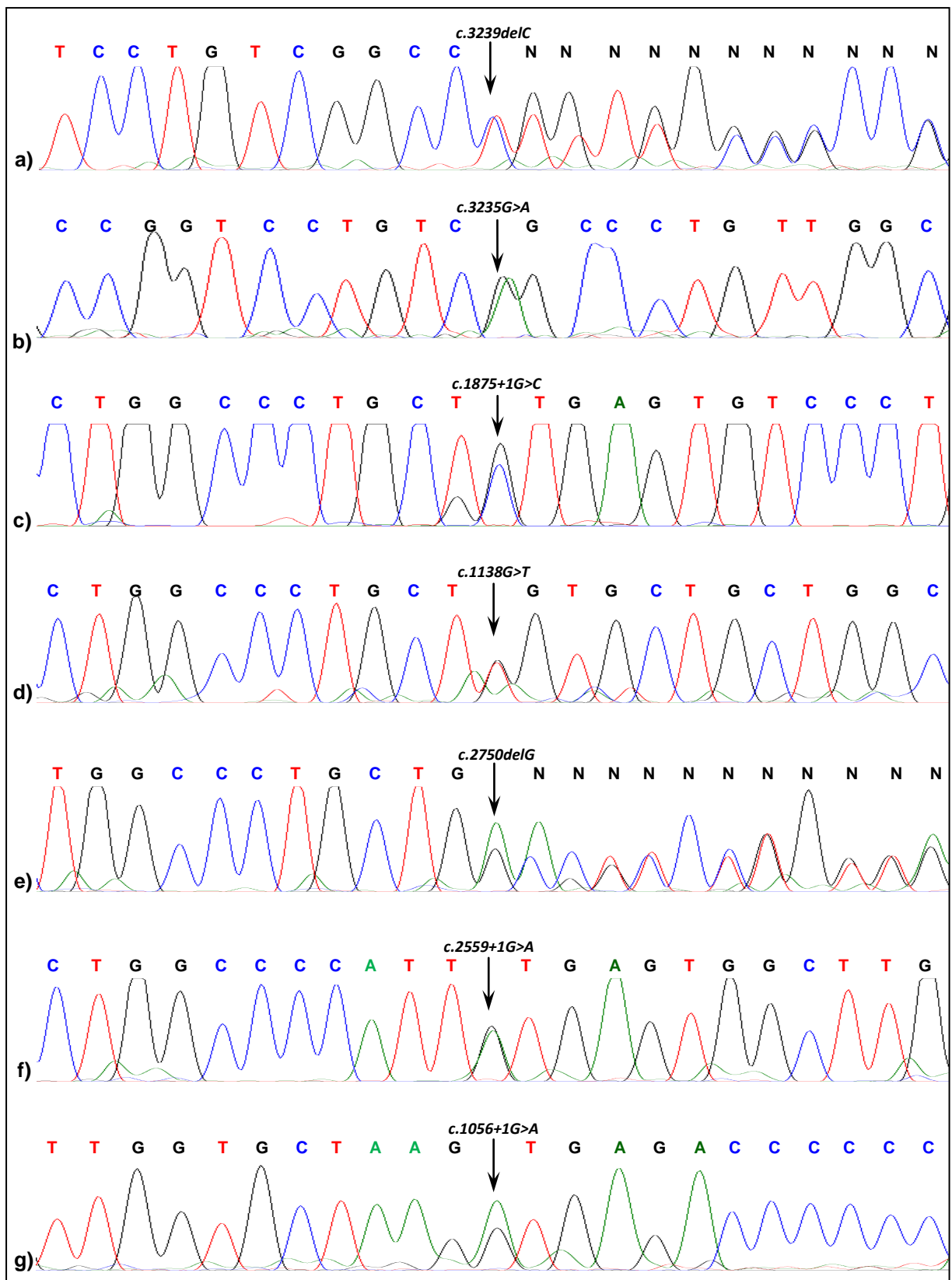


Ilustração 6 – Eletroferogramas de Pacientes com Mutações em $\alpha 1(I)$. a) Mutação heterozigótica *c.3239delC* no paciente C2; b) Mutação heterozigótica *c.3235G>A* no paciente C9; c) Mutação heterozigótica *c.1875+1G>C* no paciente C20; d) Mutação heterozigótica *c.1138G>T* no paciente C25; e) Mutação 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.

4.2 Discussão

Ao longo dos anos, diferentes abordagens de classificação da OI foram propostas para melhor avaliação do perfil clínico, prognóstico em pacientes e aconselhamento genético às famílias com OI. Com base em critérios clínicos, radiológicos e padrões de herança, Sillence e colaboradores (1979) distinguiram inicialmente os tipos I (MIM# 166200), II (MIM# 166210), III (MIM# 259420) e IV (MIM# 166220), sendo a classificação mais utilizada. Em virtude de similaridades com os tipos clínicos de Sillence e colaboradores (1979), não podemos excluir a possibilidade de que os pacientes com OI tipos I, III e IV da amostra estudada sejam, na verdade, portadores dos tipos V, VI, VII VIII, IX, X, XI e XII de OI.

O diagnóstico da OI é facilitado em indivíduos com um histórico familiar positivo ou naqueles em que os sinais/sintomas típicos estão presentes. Mas pode ser difícil na ausência de membros familiares afetados e, principalmente, quando a fragilidade óssea não está associada a anormalidades esqueléticas perceptíveis ao exame clínico. A incerteza do diagnóstico, nesses casos, está ligada diretamente ao fato de que não há um critério mínimo que possa estabelecer o diagnóstico clínico da doença. Em geral, procura-se estabelecer um ponto de partida para o diagnóstico molecular da doença. Analisar os genes estruturais do colágeno tipo I (*COL1A1* e *COL1A2*) levanta informações críticas sobre a doença, e pode ser efetuado por meio da investigação quantitativa e qualitativa das moléculas de pró-colágeno tipo I, derivadas de fibroblastos cultivados a partir de biópsia de pele. Opcionalmente, o DNA genômico pode ser extraído a partir de amostras de sangue periférico e então, as regiões codificantes dos genes estruturais do colágeno tipo I são submetidas à análise genética por meio da associação de técnicas como o SSCP e o sequenciamento (RAUCH; GLORIEUX, 2004).

Com a aplicação destas metodologias, amplamente difundidas, é possível detectar até 90% de todas as mutações que ocorrem nos genes *COL1A1* ou *COL1A2*. A observação 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 (RAUCH; GLORIEUX, 2004).

Uma vez que já foram descritos dez genes distintos associados com a OI [*COL1A1* (MIM# 120150); *COL1A2* (MIM# 120160); *CRTAP* (MIM# 605497); *LEPRE1* (MIM# 610339); *PPIB* (MIM# 123841); *FKBP10* (MIM# 607063); *PLOD2* (MIM# 601865); *SERPINF1* (MIM# 172860); *SERPINH1* (MIM# 600943) e, *SP7* (MIM# 606633)], a triagem de mutações em cada paciente teria que ser conduzida por critério de exclusão, através da análise sequencial de diferentes genes associados a um determinado tipo clínico.

Atualmente, o padrão-ouro de diagnóstico molecular para uma vasta gama de doenças genéticas tem sido o Sequenciamento automático direto, desvinculado de métodos de triagem, o que torna o teste molecular oneroso. Assim, a elaboração de protocolos economicamente viáveis busca a combinação de técnicas de triagem em substituição ao sequenciamento de todo o gene *COL1A1*, um procedimento ainda de alto custo.

Em uma análise superficial do custo da aplicação de duas técnicas de investigação de mutações bastante conhecidas, (1) SSCP e (2) Sequenciamento automático, com base apenas no custo do reagente principal e mais caro, utilizado em cada técnica (o que exclui os demais processos de quantificação, purificação, amplificação, mão de obra qualificada, entre outros), pode-se inferir que o custo da técnica de SSCP é drasticamente inferior ao custo do sequenciamento, levando em consideração a triagem de mutações em todo o gene (ver Quadro 6). Nesta simulação não foram contabilizados os custos de aplicação das reações de sequenciamento em sequenciador automático. Assim, em adição aos R\$ 2.040,00 gastos somente com fluoróforos, devemos acrescentar ainda um custo extra de R\$ 816,00 referente ao custo de aplicação de cada reação pronta (em geral, centros especializados cobram R\$ 8,00 por aplicação), a totalizar em média R\$ 2.856,00 por *COL1A1*/paciente, um custo oito vezes superior ao da técnica de SSCP.

Desta forma, a combinação das técnicas de SSCP e Sequenciamento automático favorecem a realização de testes de triagem de mutações em OI a preços

acessíveis. O valor estimado de R\$ 361,00 por paciente submetido a análise pela técnica de SSCP não incluiu gastos com sequenciamento necessários para a identificação das alterações detectadas pela técnica. Contudo, se estimarmos dez sequenciamentos por paciente, o valor de aplicação da técnica aumenta para R\$ 441,00, o que ainda torna a diferença dos custos entre as duas técnicas considerável.

Quadro 6 – Levantamento do Custo de Análise de Mutações em Duas Técnicas de Rotina

Técnica	Reagente	Custo (R\$)	Rendimento	Sensibilidade	Paciente (R\$)
1	MDE Gel™ 250mL	2.000,00	288 análises pareadas* (18 géis de 32 poços)	Até 99%	361,00
2	BigDye® 100 reações	2.000,00	50 análises pareadas** (<i>forward</i> e <i>reverse</i>)	≈99%***	2.040,00

*Cada gel suporta 16 análises, sendo cada par de amostras formado por 1 controle e 1 amostra suspeita; **A análise se dá por sequenciamento das fitas de DNA senso e anti-senso para a confirmação da alteração genética. *** HOFF, 2009.

Além do baixo custo, a técnica de triagem por SSCP nos permite triar simultaneamente inúmeras amostras individuais de PCR para a detecção de variações, de acordo com o pente utilizado. O uso de pentes de grande capacidade na confecção do gel de SSCP permite a análise de aproximadamente 100 amostras em uma única corrida eletroforética. Por este motivo, a técnica é bastante utilizada na detecção de novos alelos em um loci de interesse, a fim de se reduzir a quantidade de amostras submetidas ao sequenciamento, ou para estimar frequências alélicas de populações, entre outras aplicações (SUNNUCKS et al., 2000; SWEETMAN et al. 1992).

Em geral, diferenças em um ou mais nucleotídeos podem ser detectados em fragmentos de 100pb-300pb e 300pb-450pb com aproximadamente 99% e 90% de acurácia, respectivamente. Contudo, existem relatos de detecção de mutações em fragmentos com até 800pb (HAYASHI; YANDELL, 1993; KUKITA et al., 1997; MEUSNIER et al., 2002; SUNNUCKS et al., 2000). Como a sensibilidade da técnica é limitada, a não detecção em SSCP não significa a ausência de alterações genéticas nas moléculas analisadas. As condições utilizadas neste estudo

possibilitaram observar alterações em SSCP em fragmentos de até 372pb, representado pelo fragmento do exon 4 do gene *COL1A1*, que apresentou pelo menos dois padrões distintos em gel. O mesmo não foi possível para fragmentos acima de 372pb, como observado nos exons 5 (386pb), 49 (475pb) e 51 (399pb), o que pode ser justificado pelo tamanho do fragmento analisado.

A ocorrência de dobramentos em *loop* de fragmentos de DNA fita simples por alto complementaridade é dependente do conteúdo de guanina e citosina, uma vez que a ponte de hidrogênio tripla que ocorre entre GC é mais estável que as duas pontes de hidrogênio formadas entre adenina e timina (AT). Os genes estruturais do colágeno tipo I apresentam um alto conteúdo de guanina e citosina (GC). Assim, o surgimento de estruturas secundárias estáveis pode afetar a detecção de uma mutação pontual devido à alta estabilidade da estrutura formada e, assim, dificultar a observação de um padrão de mobilidade eletroforético distinto em fragmentos anormais submetidos ao gel de SSCP (KALVATCHEV; DRAGANOV, 2005; NIELSEN; NOVORADOVSKYL; GOLDMAN, 1995; GENOVESE et al., 1989).

Ocasionalmente, uma mesma sequência pode apresentar diferentes padrões de bandas, o que sugere a ocorrência de diferentes conformações estáveis. Existem situações onde uma ou duas conformações são detectadas como borrões, ao invés de bandas: (1) Quando diferenças mínimas na condição eletroforética, como diferenças de temperatura entre as extremidades e a região central do gel, são suficientes para permitirem diferentes conformações; (2) Quando as diferentes conformações estão em equilíbrio e mudam de uma para outra durante a eletroforese (HAYASHI; YANDELL, 1993).

A análise do heteroduplex (DNA dupla fita) em SSCP também pode ser uma ferramenta útil e complementar às análises de fragmentos em fita simples, principalmente quando não é possível a distinção entre fragmentos de DNA fita simples normais e alterados em SSCP (GENOVESE et al., 1989; KALVATCHEV; DRAGANOV, 2005; NIELSEN; NOVORADOVSKYL; GOLDMAN, 1995).

Por meio da combinação de duas técnicas de triagem de mutações – SSCP e Sequenciamento automático – foi possível a identificação de sete mutações

patogênicas pontuais e em heterozigose, todas associadas com a expressão clínica da OI: quatro em regiões exônicas e três em regiões intrônicas.

Mutações do tipo *frameshift* (mudança do quadro de leitura), provocadas por deleções e que resultam na formação de códons de parada prematuros adiante do sítio de alteração, com formação de moléculas de pró-colágeno truncadas de tamanho distinto e defeituosas, foram observadas nos pacientes C31 (c.2750delG; exon 40) e C2 (c.3239delC; exon 45), que possuem OI tipos I e III, respectivamente. Em geral, estas mutações levam a uma redução de 50% na secreção de moléculas de pró-colágeno normais, o que provoca um quadro de haploinsuficiência do gene *COL1A1*.

Mutações do tipo *missense* (não sinônimas) provocam alterações qualitativas, uma vez que a substituição do aminoácido glicina (Gly) por um outro em região de tripla hélice do colágeno tipo I provoca a síntese de moléculas de colágeno tipo I defeituosas, o que pode levar a quadros clínicos de OI tipos I, II, III e IV. Tais alterações foram identificadas nos pacientes C25 (c.1138G>T; Gly202Cys; exon 17) e C9 (c.3235G>A; Gly901Ser; exon 45), ambos portadores de OI tipo I.

Já mutações pontuais nas extremidades conservadas 5' e 3' de todos os íntrons, associadas aos eventos de *splicing*, interferem na síntese e processamento normais das moléculas de mRNA do gene *COL1A1*. Tais alterações foram identificadas nos pacientes C44 (c.1056+1G>A; íntron 16), C20 (c.1875+1G>C; íntron 27) e C37 (c.2559+1G>A; íntron 37), portadores de OI tipos IV, III e I, respectivamente.

Uma vez identificadas as mutações na amostra de pacientes, foi possível realizar a comparação com as demais que estão descritas junto ao *Database of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations*, que armazena dados de mais de 680 variantes genéticas para o gene *COL1A1*, e mais de 440 para o gene *COL1A2*, das quais uma grande parcela resulta em quadros clínicos de OI tipos I-IV (DALGLEISH, 1997, 1998; ZHANG et al., 2011).

Duas mutações já foram descritas no íntron 16 do gene *COL1A1*: c.1056+1G>A, em OI tipo I (dois relatos: um publicado, e os dados não publicados deste estudo), e c.1057-2A>C, em OI tipos I (2 relatos), IA e IV.

Vinte mutações estão descritas para o exon 17 do gene *COL1A1*: (a) Quinze do tipo *missense*: c.1057G>A (p.Gly353Ser; Gly175Ser) em OI tipos III e IV; c.1057G>T (p.Gly353Cys; Gly175Cys) em OI tipos III/IV e IV; c.1058G>A (p.Gly353Asp; Gly175Asp) em OI tipo II; c.1066G>T (p.Gly356Cys; Gly178Cys) em OI tipo I/IV; c.1094G>C (p.Gly365Ala; Gly187Ala) em OI tipo III/IV; c.1094G>T (p.Gly365Val; Gly187Val) em OI tipo II; c.1102G>A (p.Gly368Ser; Gly190Ser) em OI tipo II/III; c.1103G>T (p.Gly368Val; Gly190Val) em OI tipo II; c.1111G>A (p.Gly371Ser; Gly193Ser) em OI tipo III (2 relatos); c.1121G>C (p.Gly374Ala; Gly196Ala) em OI tipo III; c.1130G>C (p.Gly377Ala; Gly199Ala) em OI tipo III/IV; c.1138G>T (p.Gly380Cys; Gly202Cys) em OI tipo IV (dois relatos: um publicado, e os dados não publicados deste estudo); c.1139G>T (p.Gly380Val; Gly202Val) em OI tipo II/III; c.1147G>A (p.Gly383Ser; Gly205Ser) em OI tipo OI III/IV; c.1147G>T (p.Gly383Cys; Gly205Cys) em OI tipos II e II/III (2 relatos). (b) Uma do tipo *nonsense*: c.1081C>T (p.Arg361*; Arg183Stop) em OI tipo I (8 relatos). (c) Quatro do tipo *frameshift*: c.1099C>T (p.Gln367*; Gln189Stop) em OI tipo I (3 relatos); c.1127delC (p.Pro376LeufsX165) em OI tipo I (2 relatos); c.1127dupC (p.Gly377TrpfsX15) em OI tipo I; c.1128delT (p.Gly377Alafs*164) em OI tipo I (5 relatos).

Seis mutações estão descritas para o íntron 27 do gene *COL1A1*: c.1875+1G>A em OI tipo I; c.1875+1G>C em OI tipos II e III (relato publicado deste estudo); c.1876-2A>G em OI tipos I e IV; c.1876-2delA em OI tipo I; c.1876-2_1876-1delinsCT em OI tipo IV; c.1876-1G>C em OI tipo IV.

Quatro mutações estão descritas para o íntron 37 do gene *COL1A1*: c.2559+1G>A em OI tipo III (dois relatos: um publicado e, os dados não publicados deste estudo); c.2559+2T>C em OI tipo I; c.2559+5G>A em OI tipo I; c.2560-1G>A em OI tipo I.

Nove mutações já foram descritas para o exon 40 do gene *COL1A1*: (a) Três do tipo *frameshift*: c.2684delC (p.Pro895LeufsX213) em OI tipos I e IV; c.2774delC (p.Pro925Leufs*183) em OI tipos I/IV; c.2784delT (p.Gly929Alafs*179) em OI tipo I (3 relatos). (b) Cinco do tipo *missense*: c.2686G>T (p.Gly896Cys; Gly718Cys) em OI tipo II (2 relatos); c.2687G>A (p.Gly896Asp; Gly718Asp) em OI tipo II; c.2716G>A (p.Gly906Ser; Gly728Ser) em OI não classificada; c.2750G>A (p.Gly917Glu; Gly739Glu) em OI tipo II; c.2776G>T (p.Gly926Cys; Gly748Cys) em OI tipo II. (c)

Uma deleção *in-frame*: c.2725_2733del (p.Pro909_Gly911del; Pro731_Gly733del) em OI tipo II.

Seis mutações já foram descritas para o exon 45 do gene *COL1A1*: (a) Cinco do tipo *missense*: c.3226G>A (p.Gly1076Ser; Gly898Ser) em OI tipos II, III (3 relatos), III/IV e IV (3 relatos); c.3226G>T (p.Gly1076Cys; Gly898Cys) em OI tipos II e IIA; c.3235G>A (p.Gly1079Ser; Gly901Ser) em OI tipos I (sete relatos: seis publicados, e os dados não publicados deste estudo) e IV (4 relatos); c.3244G>T (p.Gly1082Cys; Gly904Cys) em OI tipo II; c.3253G>A (p.Gly1085Ser; Gly907Ser) em OI tipo IV. (b) Uma do tipo *frameshift*: c.3241delG (p.Val1081LeufsX27) em OI tipo I.

A mutação c.1056+1G>A (IVS16+1G>A) está localizada no fragmento do íntron 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, deambulação anormal (anda com dificuldade) e esclerótica azulada. Sob exame clínico, não foram observadas manifestações dentárias ou comprometimento da visão e auditivo. Esta alteração já foi registrada junto ao *Database of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations*, identificada em um paciente com OI tipo I (DALGLEISH, 1997, 1998; MARINI et al., 2007a).

Primeiramente descrita em um paciente com OI tipo IV, a mutação c.1138G>T, uma transversão em heterozigose de uma guanina (G) codificante da posição 1138 por uma timina (T) (c.1138G>T), que provoca a substituição do aminoácido glicina 202 (Gly; GGT) por uma cisteína (Cys; TGT) (p.Gly380Cys; Gly202Cys), está localizada no fragmento do exon 17 (DALGLEISH, 1997, 1998; MARINI et al., 2007a). Foi identificada no paciente C25 (OI tipo I, esporádica), do sexo feminino, 5 anos de idade, 14Kg, 95cm, histórico de 14 fraturas, e que apresentou deformidades ósseas leves, manifestações dentárias e deambulação anormal (“anda balançando”). O exame clínico não revelou comprometimento da visão e da audição ou esclerótica azulada.

A mutação c.1875+1G>C (IVS27+1G>C) está localizada no fragmento do íntron 27 e foi identificada no paciente C20 (OI tipo III, esporádica), do sexo masculino, 13 anos de idade, 25Kg, 131cm, 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 *Database of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations* e representam o primeiro relato da alteração em um paciente com OI Tipo III (BARBIRATO et al., 2009; DALGLEISH, 1997, 1998).

Primeiramente descrita em um paciente com OI tipo III, a mutação c.2559+1G>A (IVS37+1G>A) está localizada no fragmento do íntron 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, 1997, 1998; ZHANG et al., 2011). Os dados clínicos dos demais membros da família não foram analisados, contudo, serão posteriormente investigados.

A mutação inédita c.2750delG, que provoca a mudança do quadro de leitura em uma das fitas de DNA pela conversão do aminoácido glicina (Gly-917; GGA) em ácido aspártico (Asp; GAC), com formação de um códon de parada (TAA) a 191 aminoácidos distantes, contabilizados a partir do aminoácido Asp resultante (p.Gly917AspfsX191), 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, escoliose e comprometimento auditivo, sob exame clínico. Não foram observadas manifestações dentárias, deformidades de ossos longos, comprometimento da visão e deambulação anormal. A mãe, portadora da mesma alteração em heterozigose, 45 anos de idade, 72Kg, 164cm, possui um histórico de 9 fraturas e características similares às do filho, mas que apresenta comprometimento da visão, o que pode sugerir expressividade variável da doença, ou até mesmo o avanço da idade e envelhecimento). O pai e os tios maternos do paciente (seis homens e duas mulheres), com idade média de 36 ± 10.50 anos, não apresentaram os sinais ou sintomas típicos da doença. Por se tratar de uma mutação nova, estes dados serão publicados e posteriormente registrados junto ao

Database of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations (DALGLEISH, 1997, 1998).

A mutação c.3235G>A, uma transição purínica em heterozigose de uma guanina (G) codificante da posição 3235 por uma adenina (A) (c.3235G>A), e que provoca a substituição do aminoácido glicina 901 (Gly; GGC) por uma serina (Ser; AGC) (p.Gly1079Ser; Gly901Ser), está localizada no fragmento do exon 45. Foi identificada no paciente C9 (OI tipo I, familiar), do sexo feminino, 16 anos de idade, 54Kg, 155cm, histórico de 5 fraturas, e que apresentou esclerótica azulada e manifestações dentárias. Não foram observadas deformidades ósseas significativas, comprometimento da visão ou auditivo e deambulação anormal, sob exame clínico. A mãe, três tias e dois tios, todos portadores da mutação em heterozigose, com idade média de 45 anos (DP=3.86) apresentaram baixa estatura, manifestações dentárias incluindo fragilidade, esclerótica azulada, problemas na visão e perda auditiva (usam aparelho auditivo), mas sem relatos de fraturas ósseas. Estes dados confirmam aqueles observados na literatura científica, uma vez que existem seis relatos da alteração em pacientes com OI tipo I e quatro relatos em pacientes com OI tipo IV (DALGLEISH, 1997, 1998; MARINI et al., 2007a).

A mutação inédita c.3239delC, uma deleção em heterozigose de uma citosina (C) codificante da posição 3239 (c.3239delC) que provoca a mudança do quadro de leitura em uma das fitas de DNA pela conversão do aminoácido prolina 1080 (Pro; CCT) em leucina (Leu; CTG), com formação de um códon de parada (TAA) a 28 aminoácidos distantes, contabilizados a partir do aminoácido Leu resultante (p.Pro1080LeufsX28), 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, 36Kg, 145cm, histórico de 19 fraturas, que apresentou deformidades ósseas moderadas e deambulação comprometida (cadeira de rodas), 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 *Database of Human Osteogenesis Imperfecta and Type III Collagen Mutations* (DALGLEISH, 1997, 1998).

A OI tipo I é forma mais leve da doença e resulta, principalmente, de falhas na síntese das cadeias de pró-colágeno $\alpha 1(I)$ em razão de: (a) alterações no quadro de leitura (*frameshift*) devido a pequenas deleções; (b) mutações pontuais que geram códons de terminação e, (c) mutações em sítios de *splicing*, que resultam na inclusão ou deleção de nucleotídeos devido ao *splicing* alternativo, entre outros. Entretanto, mutações quantitativas e qualitativas no gene *COL1A1* podem produzir fenótipos similares em OI (BYERS, 2000).

OI tipos I, II, III e IV podem resultar de mutações qualitativas, provocadas por mudanças em um único nucleotídeo que resulta na substituição de um resíduo de glicina da sequência $(\text{Gly-Xaa-Yaa})_n$, principal elemento que constitui o domínio em tripla hélice das cadeias $\alpha 1(I)$ e $\alpha 2(I)$ (DALGLEISH, 1997, 1998). A ocorrência do aminoácido glicina na terceira posição de cada *triplet* de aminoácidos Gly-Xaa-Xaa permite com que as cadeias $\alpha 1(I)$ e $\alpha 2(I)$ adotem uma conformação em tripla hélice estável e característica (BATEMAN et al., 1992; KATAOKA et al., 2007).

Com relação à integridade da matriz colágena, as duas cadeias de pró-colágeno tipo I desempenham papéis distintos, e o fenótipo depende de eventos intra e extracelulares (MARINI et al., 2007a). Por esta razão, existem elementos cruciais que devem ser incluídos em análises mais aprofundadas, como a natureza do resíduo que substitui o aminoácido glicina, a cadeia mutada, a posição da mutação ao longo do domínio em tripla hélice e a sequência de aminoácidos adjacentes ao sítio de mutação (BECK et al., 2000).

As mutações do tipo *missense* c.1138G>T (p.Gly380Cys; Gly202Cys) no paciente C25 (OI tipo I), e a c.3235G>A (p.Gly1079Ser; Gly901Ser) no paciente C9 (OI tipo I), provocam a substituição do aminoácido glicina pelo resíduo cisteína (Cys), um aminoácido polar neutro que possui um grupo sulfidrílica ou tiol em sua cadeia lateral, e serina (Ser), aminoácido de cadeia lateral polar eletricamente neutra, e com hidroxilas alifáticas, respectivamente.

Mutações do tipo *missense* nas cadeias de pró-colágeno $\alpha 1(I)$ e $\alpha 2(I)$, que provocam uma interferência local no dobramento da tripla hélice, advindas da substituição de uma glicina do *triplet* de aminoácidos Gly-Xaa-Xaa por resíduos volumosos de cadeia lateral maiores como Arg, Asp, Glu, Cys, Ser, Ala ou Val, resultam em

redução da estabilidade térmica e helicoidal, atrasos na propagação da tripla hélice, aumento dos níveis de modificações pós-traducionais dos resíduos lisil e redução na secreção de colágeno tipo I por degradação das moléculas nascentes, entre outros (BATEMAN et al., 1992; CABRAL et al., 2003; COLE, 1997).

Um estudo comparativo dos níveis de desestabilização por meio da substituição de diferentes glicinas e observação da transição térmica em vários peptídeos indicou que a ordem de desestabilização pode ser representada pela ordem Ala \leq Ser < Cys_{red} < Arg < Val < Glu \leq Asp. O comprometimento clínico relativo para os diferentes resíduos analisados demonstraram que os resíduos mais desestabilizadores e que provocam fenótipos mais graves foram Asp, Val e Arg, enquanto que os resíduos Ser, Cys e Ala provocam fenótipos mais brandos (BECK et al., 2000).

Uma vez que a conformação em tripla hélice é propagada por um mecanismo semelhante a um zíper da extremidade C-terminal em direção à N-terminal a uma taxa limitada pela isomerização das ligações dos aminoácidos, sequências locais situadas em região N-terminal ao sítio de mutação podem também influenciar a propensão à renucleação, se uma substituição de glicina interromper a propagação da tripla hélice. A propagação da região C-terminal em direção à região N-terminal pára no sítio da mutação, somente com a tripla hélice C-terminal estruturado, e eventos de nucleação independentes da extremidade N-terminal em direção ao sítio da mutação parecem ser facilitados pelas sequências ricas em hidroxiprolinas (*Hyp-rich*) do colágeno em favor da formação da tripla hélice do colágeno (BUEVICH et al., 2004).

Há muitos anos propõe-se que substituições de glicina ao longo da região C-terminal das cadeias $\alpha 1(I)$ são clinicamente mais graves do que aquelas ao longo da região N-terminal, uma vez que a formação da tripla hélice é propagada da extremidade C-para a N-terminal. A melhor evidência que dá suporte a esta proposição advém de substituições de glicina por cisteína em $\alpha 1(I)$, que interfere no dobramento das três cadeias do colágeno tipo I e resulta em situações onde ocorre uma mineralização óssea extremamente defeituosa (WESTERHAUSEN; KISHI; PROCKOP, 1990). Os dados obtidos com este estudo não são compatíveis com este “modelo em

gradiente” de fenótipos clínicos da doença para mutações em $\alpha 1(I)$, contudo, parece ser aplicável quando as mutações são em $\alpha 2(I)$ (RAUCH et al., 2010).

Muitos genes humanos têm íntrons que precisam ser removidos precisamente para gerar mRNAs maduros que codificam um produto protéico viável. Um mecanismo bastante comum em doenças genéticas envolve mutações nos sítios de *splicing*. Em mamíferos, muitos íntrons possuem sequências 5' e 3' conservadas que flanqueiam os exons (exon/GU-intron-AG/exon), ou seja, as duas primeiras bases intrônicas de um transcrito são guanina e uracila (GU) e as duas últimas são adenina e guanina (AG). O *splicing* é um evento onde o sítio doador 5' e as polipirimidinas adjacentes do sítio aceptor 3' são reconhecidas por elementos do spliceossomo em um processo que culmina com a excisão de íntrons da molécula de mRNA e a ligação justaposta dos elementos codificantes no mRNA maduro (SCHWARZE; STARMAN; BYERS, 1999; XIA et al., 2008).

A base molecular de um alelo nulo, como resultado da síntese de polipeptídeos menores e truncados, pode advir de uma mutação pontual *nonsense* que converte um aminoácido funcional em um códon de parada ou, indiretamente, de uma mutação do tipo *frameshift*, ou ainda por mutações que causam anormalidades no *splicing* do mRNA (REDFORD-BADWAL et al., 1996).

É reconhecido que o efeito primário de determinadas mutações afeta a estabilidade do RNA, mas com um possível segundo efeito sobre o *splicing* do RNA. Assim, mutações do tipo *nonsense* e *frameshift*, que provocam o término prematuro da tradução, frequentemente, ocasionam uma redução na síntese do alelo mutante. Contudo, também podem afetar o *splicing* e induzir o salto (*skipping*) do exon que contém o códon de parada (WILLING et al., 1996).

Mutações em sítios doadores de *splicing* (extremidade 5'), em geral, levam ao *skipping* do exon devido ao uso de sítios crípticos de *splicing* presentes no íntron seguinte (*downstream*) ou em um exon adjacente, ou ainda, a inclusão de um íntron inteiro se o mesmo for pequeno. Mutações em sítios aceptores de *splicing* (extremidade 3'), em geral, favorecem o uso de sítios crípticos localizados no exon seguinte (*downstream*) ou, menos frequente, no íntron anterior (*upstream*). Em algumas situações, mutações em sítios aceptores de *splicing* levam ao *skipping* de

exons ou, raramente, favorecem a inclusão do íntron anterior (*upstream*). A abundância e estabilidade do mRNA gerados a partir de sítios alternativos de *splicing* dependem de diversos fatores, como por exemplo, se os produtos estão em sequência (*in-frame*) de leitura, se há formação de códon de parada prematuro em regiões codificantes e, se o códon de parada é sucedido por um íntron (SCHWARZE; STARMAN; BYERS, 1999).

Assim como o observado para a mutação c.1821+1G>A descrita por STOVER e colaboradores (1993), a alteração c.2559+1G>A (IVS37+1G>A) no paciente C37 (OI tipo I), localizada em um sítio doador de *splicing* (extremidade 5'), possivelmente provoca a retenção do íntron 37 e a redefinição do exon subsequente, que passa a contar com um códon de parada (TAA) *in-frame*, o que introduz uma mudança no quadro de leitura do mRNA pela inserção de um códon de parada adiante do ponto da alteração em questão. Diferente de outras mutações de *splicing* que resultam no *skipping* de exons e em transcritos de RNA truncados mas *in-frame* (em sequência), esta mutação não resulta na produção de cadeias $\alpha 1(I)$ defeituosas. Neste caso, o quadro clínico de OI tipo I é compatível com aqueles resultantes por haploinsuficiência do gene *COL1A1* como resultado da redução na síntese de cadeias de pró-colágeno $\alpha 1(I)$ normais (STOVER et al., 1993).

As mutações c.1056+1G>A (IVS16+1G>A) no paciente C44 (OI tipo IV) e c.1875+1G>C (IVS27+1G>C) no paciente C20 (OI tipo III), também localizadas em sítios doadores de *splicing* (extremidade 5'), parecem estar relacionadas provavelmente com a síntese de cadeias de pró-colágeno $\alpha 1(I)$ *in-frame* de tamanhos anormais. Uma vez que o *splicing* incorreto do alelo mutante pode resultar na manutenção do quadro de leitura dos códons, as cadeias $\alpha 1(I)$ podem apresentar inserções de sequências de aminoácidos não colágenos em meio aos motivos sequenciais repetitivos Gly-Xaa-Yaa do colágeno. Neste caso, os quadros clínicos de OI tipos III e IV são compatíveis com aqueles resultantes da síntese de cadeias $\alpha 1(I)$ defeituosas (STOVER et al., 1993).

Uma mutação pontual em heterozigose (G>A) no gene *COL1A1* na posição +5 do íntron 8, sítio doador de *splicing*, foi descrita em um paciente com OI tipo IV. A mutação, neste caso, resultou no *skipping* do exon anterior (*upstream*) 8, mas também ativou um sítio críptico de *splicing* no íntron 7, o que levou a uma

redefinição do limite do exon 7. O pré-mRNA resultante apresenta deleção do exon 8 e a inclusão de 96pb da sequência de nucleotídeos do íntron 7 (BATEMAN et al., 1994).

Com base em todas as informações levantadas, podemos sugerir que a mutação c.2750delG (p.Gly917AspfsX191) no paciente C31 (OI tipo I) provavelmente leva a uma redução na secreção de moléculas de pró-colágenos α 1(I) normais devido a um quadro de haploinsuficiência do gene *COL1A1* pela formação de um códon de parada, compatível com a OI tipo I. Contudo, a mutação c.3239delC (p.Pro1080LeufsX28) no paciente C2 (OI tipo III) parece provocar a síntese de cadeias α 1(I) defeituosas *in-frame* de tamanhos anormais, o que resultaria em um quadro clínico compatível com OI tipos II, III ou IV.

5 Conclusões

A OI associada a padrões de herança autossômico dominante, em geral, advém de mutações quantitativas ou qualitativas nos genes estruturais do colágeno tipo I, *COL1A1* e *COL1A2*.

O estabelecimento de estratégias para investigar mutações em regiões codificantes do gene *COL1A1*, incluindo sítios de *splicing* e regiões flangeadoras, por meio da associação das técnicas de SSCP e Sequenciamento automático, favoreceu a elaboração de um protocolo de diagnóstico molecular economicamente viável em OI.

O emprego de três variações da técnica de SSCP (poliacrilamida 5%, 7% e *MDE*[®] *Gel Solution*) permitiu identificar alterações em fragmentos de até 372pb (exon 4) do gene *COL1A1*.

O Sequenciamento automático das amostras de DNA alteradas em SSCP identificou sete mutações patogênicas pontuais e em heterozigose, todas associadas com a expressão clínica da OI: (1) c.2750delG (exon 40) no paciente C31 (OI tipo I); (2) c.3239delC (exon 45) no paciente C2 (OI tipo III); (3) c.1138G>T (Gly202Cys; exon 17) no paciente C25 (OI tipo I); (4) c.3235G>A (Gly901Ser; exon 45) no paciente C9 (OI tipo I); (5) c.1056+1G>A (íntron 16) no paciente C44 (OI tipo IV); (6) c.1875+1G>C (íntron 27) no paciente C20 (OI tipo III) e c.2559+1G>A (íntron 37) no paciente C37 (OI tipo I).

Foi possível o diagnóstico molecular da OI e a correlação genótipo: fenótipo em 21,21% (7/33) dos pacientes analisados. 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, uma vez que 78,78% (26/33) dos casos analisados são de OI esporádica e podem estar relacionados com mutações *de novo*, mosaicismo gonadal parental ou, até mesmo, com a forma recessiva da doença.

Estes dados enfatizam a importância da realização de estudos moleculares em OI, o que pode contribuir para a compreensão dos aspectos clínicos e genéticos da doença e, principalmente, evitar a recorrência de novos casos por meio do aconselhamento genético.

6 Referências

AARDEN, E. M.; NIJWEIDE, P. J.; BURGER, E. H. Function of osteocytes in bone. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.55, p.287–299, 1994.

ABULSAAD, M.; ABDELRAHMAN, A. Modified Sofield-Millar operation: less invasive surgery of lower limbs in osteogenesis imperfecta. **International Orthopaedics**, v.33, p.527-532, 2009.

ADAIR-DIGHTON. The Ophthalmoscope, v.?, p.188. 1912. In: WEIL, U. V. Osteogenesis imperfecta: Historical background. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.159, p.06-10, 1981.

ADEBISI, S. S. Current Trends in Human Bone Development and Growth. **Journal of Life Sciences**, v.1, n.1, p.9-14, 2009.

ALANAY, Y. et al. Mutations in the Gene Encoding the RER Protein FKBP65 Cause Autosomal-Recessive Osteogenesis Imperfecta. **The American Journal of Human Genetics**, v.86, p.551-559, 2010.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 5th edition. New York: Garland Science, 2007. 1392 p. ISBN 978-0-8153-4106-2.

AXMANN, E. Merkwürdige Fragilität der Knochen ohne dyskrasische ursache als Krankhafte Eigenthumlickkeit dreier Geschwister. *Annalen Geschichte Heilkunde*, v.4, p.58-68, 1831. In: SILLENCE, D. O.; SENN, A.; DANKS, D. M. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. **Journal of Medical Genetics**, v.16, p.101-116, 1979.

BAHT, G. S.; HUNTER, G. K.; GOLDBERG, H. A. Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation. **Matrix Biology**, v.27, p.600-608, 2008.

BARBIRATO, C. et al. A novel COL1A1 gene-splicing mutation (c.1875+1G>C) in a Brazilian patient with osteogenesis imperfecta. **Genetics and Molecular Research**, v.8, n.1, p.173-178, 2009.

BARNES, A. M. et al. Deficiency of Cartilage-Associated Protein in Recessive Lethal Osteogenesis Imperfecta. **The New England Journal of Medicine**, v.355, p.2757-2764, 2006.

BARNES, A. M. et al. Lack of Cyclophilin B in Osteogenesis Imperfecta with Normal Collagen Folding. **New England Journal of Medicine**, v.362, p.521-528, 2010.

BARSH, G. S.; BYERS, P. H. Reduced secretion of structurally abnormal type I procollagen in a form of osteogenesis imperfecta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.78, n.8, p.5142-5146, 1981.

BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.196, p.80-83, 1991.

- BATEMAN, J. F. et al. Characterization of three osteogenesis imperfecta collagen α (I) glycine to serine mutations demonstrating a position-dependent gradient of phenotypic severity. **Biochemical Journal**, v.288, p.131-135, 1992.
- BAUM, J.; BRODSKY, B. Real-time NMR investigations of triple-helix folding and collagen folding diseases. **Folding & Design**, v.1, n.2, p.R53-R60, 1997.
- BECK, K. et al. Destabilization of osteogenesis imperfecta collagen-like model peptides correlates with the identity of the residue replacing glycine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.8, p.4273-4278, 2000.
- BECKER, J. et al. Exome Sequencing Identifies Truncating Mutations in Human SERPINF1 in Autosomal-Recessive Osteogenesis Imperfecta. **The American Journal of Human Genetics**, v.88, n.3, p.362-371, 2011.
- BELL, J. Eugenic Lab. Memoirs 24 Treasury of human inheritance. 1928. In: RODGER, T. R. Otosclerosis associated with Blue Sclerotics and Fragilitas Ossium. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v.29, n.9, p.1107-1114, 1936.
- BODIAN, D. L. et al. Mutation and polymorphism spectrum in osteogenesis imperfecta type II: implications for genotype-phenotype relationships. **Human Molecular Genetics**, v.18, n.3, p.463-471, 2009.
- BONADIO, J.; RAMIREZ, F.; BARR, M. An Intron Mutation in the Human α (I) Collagen Gene Alters the Efficiency of Pre-mRNA Splicing and Is Associated with Osteogenesis Imperfecta Type II. **The Journal of Biological Chemistry**, v.265, n.4, p.2262-2268, 1990.
- BYERS, P. H. et al. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta (OI type II): a biochemically heterogeneous disorder usually due to new mutations in the gene for type I collagen. **American Journal of Human Genetics**, v.42, p.237-248, 1988.
- BYERS, P. H.; WALLIS, G. A.; WILLING, M. C. Osteogenesis imperfecta: translation of mutation to phenotype. **Journal of Medical Genetics**, v.28, p.433-442, 1991.
- BYERS, P. H. Collagens: building blocks at the end of the development line. **Clinical Genetics**, v.58, p.270-279, 2000.
- BUEVICH, A. V. et al. Transformation of the Mechanism of Triple-helix Peptide Folding in the Absence of a C-terminal Nucleation Domain and Its Implications for Mutations in Collagen Disorders. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, n.45, p.46890-46895, 2004.
- CABRAL, W. A. et al. Type I Collagen Triplet Duplication Mutation in Lethal Osteogenesis Imperfecta Shifts Register of Chains throughout the Helix and Disrupts Incorporation of Mutant Helices into Fibrils and Extracellular Matrix. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.12, p.10006-10012, 2003.
- CABRAL, W. A. et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. **Nature Genetics**, v.39, p.359-365, 2007.

- CASTAGNOLA, P. et al. Cartilage associated protein (CASP) is a novel developmentally regulated chick embryo protein. **Journal of Cell Science**, v.110, p.1351-1359, 1997.
- CHANG, W. et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 and CRTAP are mutually stabilizing in the endoplasmic reticulum collagen prolyl 3-hydroxylation complex. **Human Molecular Genetics**, v.19, n.2, p.223–234, 2010.
- CHANG, P.; LIN, S.; HSU, K. The craniofacial characteristics of osteogenesis imperfecta patients. **European Journal of Orthodontics**, v.29, p.232-237, 2007.
- CHEUNG, M.; GLORIEUX, F. H. Osteogenesis Imperfecta: Update on presentation and management. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v.9 p.153-160, 2008.
- CHEUNG, M. S.; GLORIEUX, F. H.; RAUCH, F. Intravenous Pamidronate in Osteogenesis Imperfecta Type VII. **Calcified Tissue International**, v.84, p.203-209, 2009.
- CHO, T. J. et al. Fracture in long bones stabilised by telescopic intramedullary rods in patients with osteogenesis imperfecta. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.93B, n.5, p.634-638, 2011.
- CHRISTIANSEN, H. E. et al. Homozygosity for a missense mutation in SERPINH1, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta. **American Journal of Human Genetics**, v.86, p.389-398, 2010.
- COLE, W. G. The molecular pathology of osteogenesis imperfecta. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.343, p.235-248, 1997.
- DALGLEISH, R. The Human Collagen Mutation Database 1998. **Nucleic Acids Research**, v.26, n.1, p.253-255, 1998.
- DE WET, W. et al. Organization of the human pro-alpha-2(I) collagen gene. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.16032-16036, 1987.
- EDDOWES A. Dark sclerotics and fragilitas ossium. **British Medical Journal**, v.2, p.222, 1900.
- EKMAN, O. S. Descriptionem et casus aliquot osteomalaciae sistens. Dissertatio Medica, Uppsala, Sweden, 1788. In: WEIL, U. V. Osteogenesis imperfecta: Historical background. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.159, p.06-10, 1981.
- FORLINO, A. et al. New perspectives on osteogenesis imperfecta. **Nature Reviews Endocrinology**, v.7, p.540-557, 2011.
- FUJITA, K.; SILVER, J. Single-strand conformational polymorphism. **Genome Research**, v.4, p.137-140, 1994.
- GAJKO-GALICKA, A. Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. **Acta Biochimica Polonica**, v.49, n.2, p.433–441, 2002.

GAO, Y. et al. Molecular cloning, structure, expression, and chromosomal localization of the human Osterix (SP7) gene. **Gene**, v.341, p.101-110, 2004.

GENOVESE, C. et al. Detection of Mutations in Human Type I Collagen mRNA in Osteogenesis Imperfecta by Indirect RNase Protection. **The Journal of Biological Chemistry**, v.264, n.16, p. 9632-9637, 1989.

GLORIEUX, F. H. et al. Type V osteogenesis imperfecta: a new form of brittle bone disease. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.15, p.1650-1658, 2000.

GLORIEUX, F. H. et al. Osteogenesis imperfecta type VI: a form of brittle bone disease with a mineralization defect. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.17, p.30-38, 2002.

GLORIEUX, F. H. Treatment of Osteogenesis Imperfecta: Who, Why, What? **Hormone Research**, v.68, p.8-11, 2007.

GLORIEUX, F.H. Osteogenesis imperfect. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v.22, n.1, p.85-100, 2008.

GRAY, P. H. K. A case of Osteogenesis imperfecta, associated with dentinogenesis imperfecta, dating from antiquity. **Clinical Radiology**, v.20, p.106, 1969.

GUSMÃO, C. V. B.; BELANGERO, W. D. Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico? **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.44m n.4, p.299-305, 2009.

HANSCOM, D. A.; BLOOM, B. A. The spine in osteogenesis imperfecta. **Orthopedic Clinics of North America**, v.19, p.449-458, 1988.

HARTIKKA, H. et al. Lack of Correlation between the Type of COL1A1 or COL1A2 Mutation and Hearing Loss in Osteogenesis Imperfecta Patients. **Human Mutation**, v.24, p.147-154, 2004.

HAYASHI, K.; YANDELL, D. W. How sensitive is PCR-SSCP? **Human Mutation**, v.2, p.338-346, 1993.

HAYASHI, K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. **Genome Research**, v.1, p.34-38, 1991.

HEATH, V. Bone: Promising combination therapy for children with osteogenesis imperfecta. **Nature Reviews Endocrinology**, v.6, p.535, 2010.

HOFF, K. J. The effect of sequencing errors on metagenomic gene prediction. **BioMed Central Genomics**, v.10, p.520, 2009.

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

HUNTER, G. K.; GOLDBERG, H. A. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p.8562-8565, 1993.

INNIS, M. A.; GELFAND, D.H. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic, 1990. 354p.

IKEGAWA, S. et al. Isolation, characterization and chromosomal assignment of human colligin-2 gene (CBP2). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.71, p.182-186, 1995.

JARNUM, S. et al. LEPREL1, a novel ER and Golgi resident member of the Leprecan family. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.317, p.342-351, 2004.

KALVATCHEV, Z.; DRAGANOV, P. Single-Strand Conformation Polymorphism (Sscp) Analysis: A Rapid And Sensitive Method For Detection Of Genetic Diversity Among Virus Population. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.19, n.3, p.09-14, 2005.

KAUL, S. C. et al. Gros1, a potential growth suppressor on chromosome 1: its identity to basement membrane-associated proteoglycan, leprecan. **Oncogene**, v.19, p.3576-3583, 2000.

KANEKO, H. et al. Hyperuricemia cosegregating with osteogenesis imperfecta is associated with a mutation in GPATCH8. **Human Genetics**, v.130, n.5, p.671-683, 2011.

KATAOKA, K. et al. Mutations in type I collagen genes in Japanese osteogenesis imperfecta patients. **Pediatrics International**, v.49, p.564-569, 2007.

KEITH, C. S. et al. Partia1 Sequence Analysis of 130 Randomly Selected Maize cDNA Clones. **Plant Physiology**, v.101, p.329-332, 1993.

KIM, P. K.; COE, C. J.; CHIN, D. S. Osteogenesis Imperfcta Congenita – Five cases and review of the literature. **Yonsei Medical Journal**, v.11, n.1, p.45-53, 1970.

KÖRKKÖ, J. et al. Analysis of the COL1A1 and COL1A2 Genes by PCR Amplification and Scanning by Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis Identifies Only COL1A1 Mutations in 15 Patients with Osteogenesis Imperfecta Type I: Identification of Common Sequences of Null-Allele Mutations. **American Journal of Human Genetics**, v.62, p.98-110, 1998.

KUIVANIEMI, H. et.al. Structure of a full-length cDNA clone for the prepro-alpha-2(I) chain of human type I procollagen: comparison with the chicken gene confirms unusual patterns of gene conservation. **Biochemical Journal**, v.252, p.633-640, 1988.

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

KUKITA, Y. et al. SSCP Analysis of Long DNA Fragments in Low pH Gel. **Human Mutation**, v.10, p.400-407, 1997.

- LIN, H. et al. Intravenous Pamidronate Therapy in Taiwanese Patients with Osteogenesis Imperfecta. **Pediatrics & Neonatology**, v.49, n.5, p.161-165, 2008.
- LINDSAY, R. Modeling the benefits of pamidronate in children with osteogenesis imperfecta. **Journal of Clinical Investigation**, v.110, p.1239-1241, 2002.
- LOOSER, E. Zur Kenntnis der osteogenesis imperfecta congenita und tarda. **Mittlungen aus der Grenzgebieten Medizin und Chirurgie**, v.15, p.161-207, 1906.
- LAPUNZINA et al. Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. **American Journal of Human Genetics**, v.87, p.110-114, 2010.
- LEVIN, L. S.; SALINAS, C. F.; JORGENSON, R. J. Classification of osteogenesis imperfecta by dental characteristics. **Lancet**, v.1, p.322. 1978.
- LINDAHL, K. et al. Allele dependent silencing of COL1A2 using small interfering RNAs. **International Journal of Medical Sciences**, v.5, n.6, p.361-365, 2008.
- LOBSTEIN, J. F. G. C. M. De la fragilité des os, ou de l'ostéopsathyrose. *Traité de l'Anatomie Pathologique*, v.2, p.204-212, 1833. In: WEIL, U. V. Osteogenesis imperfecta: Historical background. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.159, p.06-10, 1981.
- LOWENSTEIN, E. J. Osteogenesis imperfecta in a 3,000-year-old mummy. **Child's Nervous System**, v.25, n.5, p.515-516, 2009.
- MACKIE, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.35, p.1301-1305, 2003.
- MARAKAREEVA, E. et al. Structural Heterogeneity of Type I Collagen Triple Helix and Its Role in Osteogenesis Imperfecta. **The Journal of Biological Chemistry**, v.283, n.8, p.4787-4798, 2008.
- MARIJANOVIĆ, I. et al. Osteogenesis imperfecta and achievements in cell and gene therapy. **Acta Medica Croatica**, v.64, n.3, p.191-200, 2010.
- MARINI, J. C. Osteogenesis imperfecta: Comprehensive Management. **Advances in Pediatrics**, v.35, p.391, 1988.
- MARINI, J. C. et al. Consortium for Osteogenesis Imperfecta Mutations in the Helical Domain of Type I Collagen: Regions Rich in Lethal Mutations Align With Collagen Binding Sites for Integrins and Proteoglycans. **Human Mutation**, v.28, n.3, p.209-221, 2007a.
- MARINI, J. C. et al. Components of the Collagen Prolyl 3-Hydroxylation Complex are Crucial for Normal Bone Development. **Cell Cycle**, v.6, n.14, p.1675-1681, 2007b.
- MARINI, J. C.; CABRAL, W. A.; BARNES, A. M. Null mutations in LEPRE1 and CRTAP cause severe recessive osteogenesis imperfecta. **Cell and Tissue Research**, v.339, p.59-70, 2010.

MEDINA, T. E. M.; LICÉAGA, R. R. Cirurgia ortognática en paciente con osteogénesis imperfecta, presentación de um caso y revisión de la literatura. **Acta Odontológica Venezolana**, v.48, n.4, p.1-11, 2010.

MEUSNIER, I. et al. Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analyses of nuclear and chloroplast DNA provide evidence for recombination, multiple introductions and nascent speciation in the *Caulerpa taxifolia* complex. **Molecular Ecology**, v.11, p.2317-2325, 2002.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, n.3, p.1215, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/>>. Acesso em: 30 jul. 2011.

MONTI, E. et al. Current and emerging treatments for the management of osteogenesis imperfecta. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v.6, p.367-381, 2010.

MORELLO, R. et al. CRTAP is required for prolyl 3-hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. **Cell**, v.127, p.291-304, 2006.

MOTTES, M. et al. Mild dominant osteogenesis imperfecta with intrafamilial variability: the cause is a serine for glycine alpha 1(I) 901 substitution in a type-I collagen gene. **Human Genetics**, v.89, n.5, p.480-484, 1992.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.155, p.335-350, 1987.

NAKASHIMA, K. et al. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell**, v.108, p.17-29, 2002.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. **Nucleotide**. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NG_007400.1?>. Acesso em: 02 ago. 2011.

NIELSEN, D. A.; NOVORADOVSKYL, A.; GOLDMAN, D. SSCP primer design based on single-strand DNA structure predicted by a DNA folding program. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.12, p.2287-2291, 1995.

NIYIBIZI, C.; LI, F. Potential implications of cell therapy for osteogenesis imperfecta. **International Journal of Clinical Rheumatology**, v.4, n.1, p.57-66, 2009.

OCARINO, N. M. et al. Técnica histoquímica aplicada ao tecido ósseo desmineralizado e parafinado para o estudo do osteócito e suas conexões. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, n.1, p.37-39, 2006.

OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Efeito da atividade física no osso normal e na prevenção e tratamento da osteoporose. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.12, n.3, p. 164-168, 2006.

- ORITA, M. et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics**, v.5, p.874-879, 1989.
- PACE, J. M. et al. Disruption of one intra-chain disulphide bond in the carboxyl-terminal propeptide of the pro α 1(I) chain of type I procollagen permits slow assembly and secretion of overmodified, but stable procollagen trimers and results in mild osteogenesis imperfecta. **Journal of Medical Genetics**, v.38, p.443-449, 2001.
- PANIGRAHI, I. et al. Response to zoledronic acid in children with type III osteogenesis imperfecta. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v.28, p.451-455, 2010.
- PATTERSON, C. E. et al. Developmental regulation of FKBP65: an ER localized extracellular matrix-binding protein. **Molecular Biology of the Cell**, v.11, p.3925-3935, 2000.
- PEDERSEN, U.; ELBROND, O. Surgical findings and results of stapedectomy on patients with osteogenesis imperfect. **The Journal of Laryngology and Otology**, v.93, p.1229-1233, 1979.
- POPE, F. M. et al. Collagen genes and proteins in osteogenesis imperfecta. **Journal of Medical Genetics**, v.22, n.6, p.466-478, 1985.
- PREISWERK, R. Jahrb Kinderheilk v.76, p.40, 1912. In: RUSHTON, M. A. Anomalies of human dentine. **Annals of The Royal College of Surgeons of England**, v.16, n.2, p.94-117, 1955.
- PRICE, E. R. et al. Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.1903-1907, 1991.
- PRIMORAC, D. et al. Osteogenesis Imperfecta at the Beginning of Bone and Joint Decade. **Croatian Medical Journal**, v.42, p.393-415, 2001.
- PROCKOP, D. J.; KIVIRIKKO, K. I. Heritable diseases of collagen. **New England Journal of Medicine**, v.311, p.376-396, 1984.
- PROCKOP, D. J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. **Annual Review of Biochemistry**, v.64, p.403-434, 1995.
- RAMSHAW, J. A. M. Gly-X-Y Tripeptide Frequencies in Collagen: A Context for Host-Guest Triple-Helical Peptides. **Journal of Structural Biology**, v.122, p.86-91, 1998.
- RAUCH, F. et al. Osteogenesis Imperfecta Types I, III, and IV: Effect of Pamidronate Therapy on Bone and Mineral Metabolism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.88, n.3, p.986-992, 2003.
- RAUCH, F.; GLORIEUX, F. H. Osteogenesis imperfecta. **Lancet**, v.363, p.1377-1385, 2004.

RAUCH, F. et al. Genotype–phenotype correlations in nonlethal osteogenesis imperfecta caused by mutations in the helical domain of collagen type I. **European Journal of Human Genetics**, v.18, p.642–647, 2010.

REDFORD-BADWAL, D. A. et al. Nuclear Retention of COL1A1 Messenger RNA Identifies Null Alleles Causing Mild Osteogenesis Imperfecta. **The Journal of Clinical Investigation**, v.97, n.4, p.1035-1040, 1996.

ROACH, H. I. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. **Cell Biology International Reports**, v.18, p.617-628, 1994.

ROSCHGER, P. et al. Evidence that abnormal high bone mineralization in growing children with osteogenesis imperfecta is not associated with specific collagen mutations. **Calcified Tissue International**, v.82, n.4, p.263-270, 2008.

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. et al. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v.94, n.3, p.441-448, 1975.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v.17, p.915-919, 1994.

SANTILI, C. et al. Avaliação clínica, radiográfica e laboratorial de pacientes com osteogênese imperfeita. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.51, n.4, p.214-220, 2005.

SEEDORF, K. S. Osteogenesis Imperfecta: A Study of Clinical Features and Heredity Based on 55 Danish Families Comprising 180 Affected Members. Universitetsforlaget I Arhus, Copenhagen, 1949. In: SILLENCE, D. O.; SENN, A.; DANKS, D. M. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. **Journal of Medical Genetics**, v.16, p.101-116, 1979.

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

SCHMIDT, M. B. 1897. In: WEIL, U. V. Osteogenesis imperfecta: Historical background. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.159, p.06-10, 1981.

SCHWARZE, U.; STARMAN, B. J.; BYERS, P. H. Redefinition of Exon 7 in the COL1A1 Gene of Type I Collagen by an Intron 8 Splice-Donor–Site Mutation in a Form of Osteogenesis Imperfecta: Influence of Intron Splice Order on Outcome of

- Splice-Site Mutation. **American Journal of Medical Genetics**, v.65, p.336-344, 1999.
- SPINARDI, L.; MAZARS, R.; THEILLET, C. Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. **Nucleic Acids Research**, v.19, n.14, p.4009, 1991.
- SPURWAY, J. Hereditary tendency to fracture. **British Medical Journal**, v.2, p.844, 1896.
- STOVER, M. L. et al. Defective Splicing of mRNA from One COL1A1 Allele of Type I Collagen in Nondeforming (Type I) Osteogenesis Imperfecta. **The Journal of Clinical Investigation**, v.92, p.1994-2002, 1993.
- SUNNUCKS, P. et al. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. **Molecular Ecology**, v.9, p.1699-1710, 2000.
- SWEETMAN, W. A. et al. SSCP and segregation analysis of the human type X collagen gene (COL10A1) in heritable forms of chondrodysplasia. **American Journal of Human Genetics**, v.51, p.841-849, 1992.
- TOMBRAN-TINK, J. et al. Localization of the gene for pigment epithelium-derived factor (PEDF) to chromosome 17p13.1 and expression in cultured human retinoblastoma cells. **Genomics**, v.19, p.266-272, 1994.
- TONACHINI, L. et al. cDNA cloning, characterization and chromosome mapping of the gene encoding human cartilage associated protein (CRTAP). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.87, p. 191-194, 1999.
- TROMP, G. et al. Structure of a full-length cDNA clone for the prepro-alpha-1(I) chain of human type I procollagen. **Biochemical Journal**, v.253, p.919-922, 1988.
- VALTAVAARA, M. et al. Cloning and characterization of a novel human lysyl hydroxylase isoform highly expressed in pancreas and muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.6831-6834, 1997.
- VAN DER HOEVE, J.; DE KLEJN, A. Blau Scleae, Knochenbruechigkeit und Schwerhorigkeit. **Archives of Ophthalmology**, v.95, p.91-93, 1918.
- VAN DER SLOT, A. J. et al. Identification of **PLOD2** as telopeptide lysyl hydroxylase, an important enzyme in fibrosis. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.40967-40972, 2003.
- VAN DIJK, F. S. et al. PPIB mutations cause severe osteogenesis imperfecta. **American Journal of Human Genetics**, v.85, p.521-527, 2009a.
- VAN DIJK, F. S. et al. CRTAP mutations in lethal and severe osteogenesis imperfecta: the importance of combining biochemical and molecular genetic analysis. **European Journal of Human Genetics**, v.17, p.1560-1569, 2009b.
- VAN DIJK, F. S. et al. Classification of Osteogenesis Imperfecta revisited. **European Journal of Medical Genetics**, v. 53, p.1-5, 2010.

VRANKA, J. A.; SAKAI, L. Y.; BACHINGER, H. P. Prolyl 3-hydroxylase 1, enzyme characterization and identification of a novel family of enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.23615-23621, 2004.

VROLIK, W. Tabulae ad illustrandum embryogenesisim hominis et mammalium, tam naturatem quam abnormen, Amsterdam, 1849. In: WEIL, U. V. Osteogenesis imperfecta: Historical background. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.159, p.06-10, 1981.

VUORIMIES, I. et al. Zoledronic Acid Treatment in Children with Osteogenesis Imperfecta. **Hormone Research In Paediatrics**, v.75, p.346-353, 2011.

WALTER BURNS SAUNDERS COMPANY. **Chapter 12: The Molecular and Biomechanical Basis of Genetic Disease**. Disponível em <<http://pv2.sbd.udl.es/cdmedics/genmed/DATA/Pages/c12.htm>>. Acesso em: 21 jul. 2011.

WARD, L. M. et al. Osteogenesis imperfecta type VII: an autosomal recessive form of brittle bone disease. **Bone**, v.31, p.12-18, 2002.

WEIL, U. V. Osteogenesis imperfecta: Historical background. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.159, p.06-10, 1981.

WESTERHAUSEN, A.; KISHI, J.; PROCKOP, D. J. Mutations That Substitute Serine for Glycine α -598 and Glycine α -631 in Type I Procollagen. **The Journal of Biological Chemistry**, v.265, p.13995-14000, 1990.

WILLAERT, A. et al. Recessive osteogenesis imperfecta caused by LEPRE1 mutations: clinical documentation and identification of the splice form responsible for prolyl 3-hydroxylation. **Journal of Medical Genetics**, v.46, p.233-241, 2009.

WILLIAMS, P. F. Fragmentation and rodding in osteogenesis imperfecta. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.47b, n.1, p.23-31, 1965.

WILLING, M. C. et al. Premature Chain Termination Is a Unifying Mechanism for COL1A1 Null Alleles in Osteogenesis Imperfecta Type I Cell Strains. **American Journal of Medical Genetics**, v.59, p.799-809, 1996.

WITECKA, J. et al. Two novel COL1A1 mutations in patients with osteogenesis imperfecta (OI) affect the stability of the collagen type I triple-helix. **Journal of Applied Genetics**, v.49, n.3, p.283-295, 2008.

XIA, X. et al. A novel RNA-splicing mutation in COL1A1 gene causing osteogenesis imperfecta type I in a Chinese family. **Clinica Chimica Acta**, v.398, n.1-2, p.148-151, 2008.

YOUNG, I. D. et al. Osteogenesis imperfect type IIA: evidence for dominant inheritance. **Journal of Medical Genetics**, v.24, p.386-389, 1987.

ZHANG, Z. et al. 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.

7

Apêndice

7.1 Ficha de Inclusão de Pacientes à Pesquisa

1. REGISTRO

HINSG: _____ Laboratório: _____ DATA DO ATENDIMENTO: ____/____/____

2. DADOS PESSOAIS DO PACIENTE

NOME: _____

DATA NASC.: ____/____/____ IDADE ATUAL: _____ SEXO: ()M ()F

NOME DO PAI: _____

DATA NASC.: ____/____/____

NOME DA MÃE: _____

DATA NASC.: ____/____/____

PARTO: _____

3. DADOS CLÍNICOS DO PACIENTE

PESO: _____ ALTURA: _____ PC: _____ PERCENTIL: _____

FORMATO DO CRÂNIO: _____

PROBLEMAS CARDÍACOS: _____

*COMENTÁRIOS: _____

3.1. TRATAMENTO

DATA DE INÍCIO DO TRATAMENTO: ____/____/____ IDADE DE INÍCIO DO TRATAMENTO: _____

*COMENTÁRIOS: _____

3.2. FRATURAS

Nº. TOTAL DE FRATURAS: _____ IDADE DA 1ª. FRATURA: _____

Nº. DE FRATURAS ANTES DO INÍCIO DO TRATAMENTO: _____

Nº. DE FRATURAS DEPOIS DO INÍCIO DO TRATAMENTO: _____

*COMENTÁRIOS: _____

3.3. DEFORMIDADE DE OSSOS LONGOS: NORMAL LEVE MODERADA GRAVE

()NORMAL ()LEVE ()MODERADA ()GRAVE

HIPERMOBILIDADE DAS ARTICULAÇÕES: _____

DEFORMIDADE DA ESPINHA: _____

*COMENTÁRIOS: _____

3.4. DENTIÇÃO

()NORMAL ()DENTINOGÊNESE IMPERFEITA ()FORMAÇÃO NORMAL COM OCLUSÃO

*COMENTÁRIOS: _____

3.5. VISÃO

()NORMAL ()COMPROMETIDA ()ARCO SENIL PREMATURO

*COMENTÁRIOS: _____

3.6. ESCLERÓTICA

()NORMAL ()AZUL AO NASCER ()AZUL PERMANENTEMENTE

*COMENTÁRIOS: _____

3.7. AUDIÇÃO

()NORMAL ()COMPROMETIDA ()SURDEZ TOTAL

*COMENTÁRIOS: _____

3.8. DEAMBULAÇÃO

()NORMAL ()SÓ ENGATINHA ()APOIO-BENGALA ()CADEIRA DE RODAS

*COMENTÁRIOS: _____

4. TIPO DE OI DIAGNOSTICADO: _____