



Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

**Avaliação fenotípica, genotípica e dos níveis de transcritos de
RMRP e pré-rRNA 5.8S em pacientes com Hipoplasia de
Cartilagem-Cabelo**

Maria Eduarda de Souza Gomes

**RIO DE JANEIRO
Julho de 2017**



Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

**Avaliação fenotípica, genotípica e dos níveis de transcritos de
RMRP e pré-rRNA 5.8S em pacientes com Hipoplasia de
Cartilagem-Cabelo**

Maria Eduarda de Souza Gomes

**RIO DE JANEIRO
Março de 2017**



Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

**Avaliação fenotípica, genotípica e dos níveis de transcritos de
RMRP e pré-rRNA 5.8S em pacientes com Hipoplasia de
Cartilagem-Cabelo**

Maria Eduarda de Souza Gomes

Dissertação apresentada à Pós
Graduação em Pesquisa Aplicada
à Saúde da Criança e da Mulher,
como parte dos pré-requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Orientador: Juan Clinton Llerena Junior

Co-orientadora: Sayonara Maria de Carvalho Gonzalez

**RIO DE JANEIRO
Março de 2017**

CIP - Catalogação na Publicação

Gomes, Maria Eduarda de Souza.

Avaliação fenotípica, genotípica e dos níveis de transcritos de RMRP e pré-rRNA 5.8S em pacientes com Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo / Maria Eduarda de Souza Gomes. - Rio de Janeiro, 2017.

115 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2017.

Orientador: Juan Clinton Llerena Jr.

Co-orientador: Sayonara Maria de Carvalho Gonzalez.

Bibliografia: f. 103-106

1. Displasia esquelética. 2. Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo. 3. Gene RMRP. 4. Análise de mutação. 5. Expressão gênica. I. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos melhores pais do mundo! Esse espaço nunca será suficientemente grande para descrever todo o sentimento de amor e gratidão que tenho por vocês. As dificuldades nunca foram impedimento para vocês me fazerem crescer.

Obrigada, de coração, pelo amor, pela dedicação,
pelo dom da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amor, porque eu nada seria se não fosse você...

Aos meus pais e irmão, que primaram pela minha educação não só acadêmica, mas também como ser humano.

À todos os meus familiares, que sei que torcem pelo meu sucesso.

À Dra. Sayonara Gonzalez, se cheguei até aqui, foi porque você me fez caminhar. Que sorte a minha de a vida ter feito nos encontrar. Vou ser sempre muito grata por você acreditar em mim!

Ao Dr. Juan Llerena, pelo encaminhamento dos pacientes envolvidos nesse projeto e por todo o suporte de informações da clínica médica.

Às queridas amigas Célia Zuma e Luiza Paternostro, pelo carinho, amizade e por toda a colaboração com os experimentos.

À Natana Rabelo, pelas valiosas dicas e observações e também pela revisão do trabalho.

À Valéria Moura, que colaborou com a implantação deste projeto, permitindo que ele crescesse.

À Elisabeth Magalhães, que auxiliou com o tratamento dos dados.

Às Dras. Denise Cavalcanti, Têmis Félix e Maria Teresa Sanseverino que se empenharam em colaborar com o projeto desde o início.

Às minhas lindinhas, que sempre me apoiaram (ou melhor, aturaram!) e estavam sempre prontas para ajudar em qualquer que fosse o problema. Amo vocês demais!

À toda equipe do Laboratório de Medicina Genômica e Biologia Molecular, diversão de cada dia e pelo o apoio.

À Jamily de Almeida, querido presente da UNIRIO para a vida, que mesmo longe, está e sempre estará sempre por perto.

À banca examinadora, pela disponibilidade em participar e pelas contribuições acerca dessa dissertação.

À divisão de laboratórios do CEMO/INCA, em especial à Dra. Eliana Abdelhay, Dra. Rocio Hassan e à Dra. Gabriela Lozada pela colaboração.

Aos professores da Pós-Graduação, por todo o aprendizado e por despertarem o interesse da sabedoria.

À minha turma do curso do Mestrado, que sempre muito animada esteve unida nos momentos de alegria e nos momentos de tensão, inerentes a qualquer curso de Pós-Graduação.

Aos membros da Secretaria Acadêmica, por todo o suporte.

A todos os amigos do Laboratório de Medicina Genômica, Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Laboratório de Alta Complexidade do IFF pelo apoio.

À CAPES, FIOTEC e à FIOCRUZ pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
cDNA	DNA complementar
CHH	Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo (do inglês, Cartilage Hair Hypoplasia)
cm	Centímetro
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
dTTP	Desoxitimina trifosfato
DC	Defeito congênito
DE	Displasia Esquelética
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotideo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ECLAMC	Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas

g	Grama
IFF	Instituto Nacional da Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira
mg	Miligrama
nin	Min
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NCBI	National Center of Biotechnology Information
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TAE	Tampão Tris-Acetato EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA

Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidades
V	Volts
x	Vezes
x g	Vezes a força da gravidade
µg	Micrograma
µL	Microlitro
λ HIND III	DNA Lambda digerido com enzima HIND III

RESUMO

Avaliação fenotípica, genotípica e dos níveis de transcritos de RMRP e pré-rRNA 5.8S em pacientes com Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo

A Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo (do termo em inglês Cartilage Hair Hypoplasia – CHH; #250250) é uma displasia esquelética (DE) de etiologia autossômica recessiva caracterizada por anormalidades esqueléticas, predominantemente metafisárias, além de cabelos finos e esparsos. Também podem ocorrer alterações imunológicas e predisposição para alguns tipos de câncer. Essa patologia é causada por mutações no gene *RMRP*, que não é traduzido em proteína e codifica um RNA integrante do complexo RNase MRP, envolvido no processamento do rRNA de 5.8S, na replicação do DNA mitocondrial e na progressão do ciclo celular. Este trabalho visou identificar mutações no gene *RMRP* e avaliar os níveis do seu transcrito, assim como a abundância de rRNA 5.8s, um de seus alvos, em pacientes com suspeita de CHH. Para isso, o DNA genômico dos pacientes foi extraído a partir de sangue periférico pelo método de *Salting Out*. Para a discriminação alélica as regiões promotora e transcrita foram amplificadas por PCR, clonadas em plasmídeo pGEM-T e os plasmídeos recombinantes resultantes, foram utilizados para transformar bactérias competentes da cepa DH5 α . Após seleção por PCR, as colônias positivas foram sequenciadas pelo método de Sanger. Também foram analisadas amostras dos progenitores, quando disponíveis, para determinar a origem parental dos alelos. Neste estudo, em uma série de 20 pacientes brasileiros reportamos 22 mutações diferentes do tipo duplicações, triplicações, inserções e mutações pontuais, das quais 11 ainda não foram descritas na literatura. Todas as alterações ocorreram em heterozigose composta (uma mutação na região promotora associada à uma alteração na região transcrita ou duas alterações distintas na região transcrita). Concomitantemente, também foram identificados 7 tipos de polimorfismos já descritos na literatura. Vale ressaltar que a mutação g.71A>G, mais frequentemente descrita na literatura para CHH, não foi encontrada em nosso grupo de estudo. Em contrapartida, a mutação g.196C>T foi encontrada em mais de 50% dos nossos pacientes, uma frequência ainda não descrita em outros países. Para análise dos níveis de transcritos de RMRP e 5.8S não processados, foram realizadas reações de RT-qPCR em um estudo piloto. Cinco pacientes analisados apresentaram uma tendência à redução da atividade de transcrição do gene *RMRP*. Além disso, dois pacientes apresentaram uma tendência ao aumento nos níveis de transcritos de rRNA de 5.8S não clivado em relação ao indivíduo controle. O resultado molecular confirma a etiologia da doença e permite o aconselhamento genético das famílias, visando detectar precocemente complicações clínicas graves, como varicela em pacientes não imunizados e desenvolvimento de câncer infantil (particularmente linfoma). Em conjunto esses dados podem contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nessa patologia e para futuros estudos epidemiológicos.

Palavras chave: Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo, displasia esquelética, gene *RMRP*, mutações patogênicas, análise da expressão gênica

ABSTRACT

Phenotypic, genotypic and levels of RMRP and pre-rRNA 5.8S transcripts analysis in patients with Cartilage-Hair Hypoplasia

Cartilage-Hair Hypoplasia (CHH, # 250250) is an autosomal recessive skeletal dysplasia (ED) characterized by skeletal abnormalities, predominantly metaphyseal and thin and sparse hair. Immune deficiency and predisposition for some types of cancer can also occur. This disorder is caused by mutations in *RMRP* gene, responsible for coding a non-translated RNA, member of riboproteic RNase MRP complex. This gene is involved in pre-5.8S rRNA, mitochondrial DNA replication, and in cell cycle progression. The goal of this project was to identify mutations in the *RMRP* gene and to investigate the levels of the transcript, as well as the abundance of pre-5.8S rRNA, one of its targets, in patients suspected of CHH. Genomic DNA from patients was extracted from peripheral blood by Salting Out method. For allelic discrimination, promoter and transcribed regions were PCR amplified, cloned into pGEM-T vector and the resulting recombinant plasmids were used for transforming competent bacteria from the DH5 α strain. After PCR selection, positive colonies were subsequently sequenced by Sanger method. In this study, we report in one series of 20 Brazilian patients, 22 different mutations such as duplications, triplications, insertions and point mutations, of which 11 have not yet been described in the literature. All genotypes occurred as compound heterozygosity (a mutation in the promoter region associated with a change in the transcribed region or two changes in the transcribed region). Pathogenic mutations were concomitant to polymorphisms already described in the literature. It is noteworthy that g.71A>G mutation, the most worldwide frequently described mutation in CHH patients, was not found in our cohort. In contrast, more than 50% of our patients presented the g.196C>T mutation, a frequency not previously found in other countries. For analysis of transcript levels of RMRP and unprocessed 5.8S, RT-qPCR reactions were performed in a pilot study. Five patients analyzed showed a tendency in the reduced levels of transcription activity of *RMRP* gene. In addition, two patients showed a tendency in increased levels of non-cleaved 5.8S rRNA transcripts relative to control subject. The molecular result confirms the etiology of disease and allows genetic counseling of the families, anticipating clinical interventions in patients and avoiding serious clinical complications, such as varicela in non-immunized patients and development of childhood cancer (particularly lymphoma). Together, this data can contribute to a better understanding of the mechanisms involved in the pathology and for future epidemiological studies.

Keywords: Cartilage Hair Hypoplasia, skeletal dysplasia, *RMRP* gene, pathogenic mutations

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	31
4.1. Geral:.....	31
4.2: Específicos:	31
4. REFERENCIAL TEÓRICO	32
4.1 Sistema Esquelético e Osteogênese.....	32
4.2 Displasias Esqueléticas.....	37
4.3 Características clínicas da Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo	38
4.4 Aspectos Moleculares da Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo.....	40
5. HIPÓTESE	51
6. METODOLOGIA.....	52
6.1 Aspectos Éticos.....	52
6.2 Local do estudo.....	52
6.3 Tipo de estudo.....	52
6.4 População do estudo.....	52
6.5 Amostras do estudo	52
6.6 Critérios de Inclusão.....	53
6.7 Critérios de Exclusão.....	53
6.8 Desenho do estudo	53
6.9 Coleta de Dados Clínicos e Radiológicos.....	54
6.10 Análise de mutações no gene <i>RMRP</i>	54
6.10.1 Extração de DNA.....	54

6.10.2 Amplificação de DNA	56
6.10.3 Purificação de produto de PCR.....	57
6.10.4 Sequenciamento.....	58
6.11 Discriminação Alélica	59
6.11.1 Ligações de fragmentos de DNA a vetores de clonagem.....	59
6.11.2 Preparo de células competentes.....	60
6.11.3 Transformação das Células Competentes.....	61
6.11.4 Seleção das Colônias de bactérias transformadas	62
6.11.5 PCR de Colônias	62
6.2 Análises de bioinformática.....	64
6.2.1 Análise de Frequência de mutações no gene <i>RMRP</i>	64
6.2.2 Análise Estrutural de Mutações no RNA <i>RMRP</i>	64
6.12 Análise de Expressão do gene <i>RMRP</i> e de sua atividade catalítica por RT-qPCR.....	65
6.12.1 Obtenção de células mononucleares (CMN) de sangue periférico	65
6.12.2 Extração de RNA total de células mononucleares do sangue periférico	65
6.12.3 Tratamento com DNase.....	67
6.13.4 Síntese de cDNA (DNA complementar)	67
6.14.5 Análise de expressão por PCR em tempo real	68
7. RESULTADOS	70
7.1 Pacientes e características clínicas.....	70

7.2 Análise de mutações no gene <i>RMRP</i>	78
7.3 Análises computacionais de mutações	85
7.4 Padronização da Análise de Expressão Gênica por PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)	87
7.5 Nível de expressão do gene <i>RMRP</i> e análise da atividade catalítica sobre seus alvos	89
8. DISCUSSÃO	92
8.1 Mutações no gene <i>RMRP</i>	92
8.2 Características fenotípicas dos pacientes	94
8.3 Análises de mutações <i>in silico</i>	96
8.4 Análise de expressão e da atividade catalítica do gene <i>RMRP</i>	98
9. CONCLUSÕES	101
10. BIBLIOGRAFIA	103
11. APÊNDICE:	107
Apêndice 1: Ficha de Coleta de Dados	107
Apêndice 2: História clínica dos pacientes	111

LISTA DE QUADROS, FIGURAS E TABELAS:

Figura 1: Ossificação intramembranosa. Células do mesênquima se tornam arredondas e formam um blastema no qual, por diferenciação, originam-se osteoblastos que produzem tecido ósseo primário¹²..... 33

Figura 2:Esquema da ossificação endocondral. (A, B) Células mesenquimais condensam e se diferenciam em condrócitos para formar o molde cartilaginoso dos ossos. (C) Condrócitos no centro do eixo sofrem hipertrofia. Ocorre a redução e mineralização da matriz extracelular e morte por apoptose dos condrócitos. A morte dos condrócitos permite a entrada de vasos sanguíneos. (D, E) Os vasos sanguíneos trazem osteoblastos, que se ligam à matriz cartilaginosa em degeneração e ao depósito de matriz óssea. (F, G) Formação da medula óssea. (G, H) Crescimento ósseo a partir da placa de crescimento. Centros de ossificação secundários também são formados quando os vasos sanguíneos entram nas pontas dos ossos¹⁵. 35

Figura 3: Esquema da placa de crescimento evidenciando as zonas da distribuição dos condrócitosà partir da epífise: zona germinativa, zona proliferativa, zona hipertrófica e zona de ossificação endocondral¹⁶..... 36

Figura 4: A) Paciente com CHH aos 14 anos de idade (ancestralidade européia); ²⁵ **B)** Pacientes com MDWH aos 10 anos e 8,5 anos, respectivamente (ancestralidade desconhecida)²⁶; **C)** Paciente com AD aos 16,5 anos de idade (ancestralidade européia)¹¹ 40

Figura 5: Esquema da estrutura bidimensional da Rnase MRP. Para formar a ribonuclease, aproximadamente dez diferentes proteínas se ligam a domínios específicos da estrutura secundária do RNA (coloração verde e azul). As mutações pontuais estão sombreadas de amarelo e laranja; as setas vermelhas indicam inserções e deleções ²⁴. 41

Figura 6: RNase MRP atua no processamento de pré-rRNA em *S. cerevisiae* no nucléolo. O transcrito primário 35S é processado em rRNAs maduros 25S, 18S e 5.8S. Na figura, estão descritos os locais de clivagem (A0 até E), os espaçadores transcritos externos (5'-ETS e 3'-ETS) e os espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2). A pequena caixa branca representa a sequência da forma longa de rRNA 5.8S (5.8Sl) e está ausente na forma curta (5.8Ss). A RNase MRP processa o local A3 em ITS1⁷. 42

Figura 7: A) RNase MRP está envolvida no processo de replicação do DNA mitocondrial, através da clivagem de iniciadores. O processo se inicia com a transcrição da fita leve feita pela RNA polimerase mitocondrial, a partir do promotor. Em seguida a fita pesada também é transcrita. O transcrito permanece ligado ao duplex de DNA e é clivado pela RNase MRP para formar os iniciadores que são usados para a iniciar a replicação do DNA pela DNA polimerase gama. **B)** O gene *RMRP* codifica o RNA integrante do complexo RNase MRP, que é essencial para o crescimento e divisão de células em levedura e em seres humanos. Na presença de mutações, a função do complexo RNase MRP sobre o processamento do precursor do rRNA 5.8S, que é uma subunidade da partícula ribossômica de 60S fica gravemente afetada e

a montagem ribossomal fica atrasada, resultando em uma capacidade reduzida de sintetizar proteínas. Como efeito secundário, a ciclina A2, que promove transições de fase G1/S e G2/M, é diminuída, correlacionando-se com a magnitude do atraso no ciclo celular. CyA: Ciclina A cyB: Ciclina B.^{7,11} 43

Figura 8: A) Esquema da estrutura do gene *RMRP*. O gene não contém íntrons, não é traduzido em proteína e seu transcrito apresenta 267b de comprimento (vermelho). A região promotora contém um sítio de ligação SP1 (roxo), uma octâmero (azul), um elemento de sequência proximal (do inglês PSE) (cinza) e uma caixa TATA (verde); **(b)** sequência do promotor do gene selvagem (do inglês WT) e dos promotores mutantes. Os triângulos mostram os locais de iniciação da transcrição. O retângulo mostra a caixa TATA. As sequências vermelhas e azuis mostram o promotor central e as mutações de duplicação. As sequências sublinhadas são as que foram duplicadas (indicadas pela numeração seguidas da sigla dup). Figura adaptada de Hermanns P. *et al.*, (2005)³¹ e Bonafé *et al.*, (2005)³². 45

Figura 9: Alinhamento de sequências múltiplas da região promotora de *RMRP* de nove espécies de mamífero (desde o nucleotídeo g.80 até o sítio de início da transcrição da sequência humana). Polimorfismos e variantes raras são indicados como caixas azuis (alterações de um único nucleotídeo); as setas vermelhas indicam inserções patogénicas e as linhas vermelhas indicam duplicações patogénicas e triplicações. As posições foram consideradas como conservadas se oito das nove espécies tinham o mesmo nucleotídeo ³². 48

Figura 10: Alinhamento de Sequência Múltipla da Região Transcrita *RMRP* É mostrado o alinhamento da sequência de 12 espécies de mamíferos (11 placentários e 1 marsupial) da região transcrita de *RMRP* (do nucleotídeo g.28 a g.247 da sequência humana). Mutações patogênicas putativas são indicadas como caixas vermelhas (alterações de um único nucleotídeo) ou setas vermelhas (inserção / duplicações / deleções); polimorfismos e variantes raras são indicados como caixas azuis (alterações de um único nucleotídeo) ou setas azuis (inserção / duplicações / deleções). As posições foram consideradas como conservadas se 11 das 12 espécies tivessem o mesmo nucleotídeo³².. 49

Figura 11: Fluxograma da genotipagem dos pacientes com CHH. 59

Figura 12: Mapa do vetor comercial utilizado nesse estudo (pGEM T Easy Vector-Promega). A enzima Taq DNA Polimerase adiciona ao final de cada fragmento, um nucleotídeo do tipo adenina (A), complementar ao nucleotídeo timina (T) presente em forma coesiva no vetor, facilitando assim, a ligação entre o DNA alvo e o plasmídeo..... 60

Figura 13: Esquema do processo de clonagem do DNA dos pacientes com mutações do tipo inserção, duplicação ou triplicação para separação alélica. **A)** O gene de interesse (*RMRP*) foi amplificado por PCR convencional. **B)** O produto desta reação foi ligado ao vetor de clonagem (pGEM-T) e em seguida **C)** utilizado para transformar células competentes *E.coli* cepa DH5α. Neste processo, apenas um dos alelos é incorporado no vetor. Ao final desse processo, **D)** as bactérias que incorporaram o DNA recombinante (colônias

positivas) são selecionadas pela coloração branca e azul. **E)** O DNA das colônias brancas foi utilizado como molde na PCR (PCR de colônia). **F)** Dez por cento dos produtos resultantes foram resolvidos em gel de agarose para confirmar as colônias positivas e o restante da reação é purificado e **G)** sequenciado..... 63

Figura 14: Fotos clínicas de 11 pacientes do estudo. Linha superior: paciente 1-6. Linha inferior: paciente 10-11, paciente 16-17, paciente 19..... 73

Figura 15: A) Da esquerda para a direita: radiografias de joelhos e mãos dos pacientes 2, 3, 4,10 e 11. **B)** Da esquerda para a direita: radiografias de joelhos e mãos (quando disponíveis) dos pacientes 15, 17, 19 e 20. 75

Figura 16: Gráfico de percentis de comprimento e peso por idade para meninos do nascimento-36 meses. Triângulos coloridos representam a altura dos pacientes em sua respectiva idade em sua última consulta médica (gráfico adaptado da OMS/2000). 76

Figura 17: Gráfico de percentis de estatura e peso por idade para meninos de 2-20 anos, Triângulos coloridos representam a altura dos pacientes em sua respectiva idade em sua última consulta médica (gráfico adaptado da OMS/2000). 77

Figura 18: Gráfico de percentis de estatura e peso por idade para meninas de 2-20 anos, Triângulos coloridos representam a altura das pacientes em sua

respectiva idade em sua última consulta médica (gráfico adaptado da OMS/2000)..... 78

Figura 19: Corrida eletroforética representativa de DNA genômico extraído a partir de sangue periférico pelo método de salting out. Poço1: padrão de peso molecular λ HIND III; poço 2-6: amostra de DNA genômico dos pacientes paciente 1-5, respectivamente. 79

Figura 20: Eletroferograma representativo do sequenciamento da amostra do paciente 4 com mutações em heterozigose composta, mostrando **A)** uma duplicação na região promotora do gene *RMRP* (g.-22_-14dup9(TACTCTGTG) e **B)** uma substituição de uma única base (g.196C>T) em heterozigose na região transcrita de *RMRP*. 79

Figura 21: Foto representativa do gel de agarose de 1,2% do PCR de colônia realizado com a amostra da paciente 4. Poço 1: 1 Kb Plus, poço 2: Branco; poços 3 e 4: colônias que não continham o plasmídeo recombinante (negativas); poços 5-8: colônias que continham o plasmídeo recombinante (positivas)..... 80

Figura 22: **A)** Eletroferograma representativo do sequenciamento após a clonagem para separação dos alelos do paciente 4, mostrando uma duplicação de 9 pb no promotor (g. -22_-14dup9(TACTCTGTG) combinada a uma **B)** mutação pontual na região transcrita do gene *RMRP*(g.196C>T).**C)** Alinhamento representativo da sequência de referência do gene *RMRP* com a

sequência obtida pelo sequenciamento da mesma amostra clonada. O retângulo vermelho indica a região duplicada que não ocorre na sequência de referência (representado pelo tracejado). Polimorfismos estão marcados pelos retângulos azuis. 80

Figura 23: Eletroferograma representativo do sequenciamento da amostra de paciente 19 com mutações em heterozigose composta na região transcrita (g.36G>T e g.97G>A) de *RMRP*. 81

Figura 24: Gel de agarose de 1,2% do PCR da amostra do paciente 16. Poço 1: Padrão de peso molecular 1 Kb Plus, poço 2-3: PCR da amostra do paciente 15; poço 4-5: PCR da amostra do paciente 15. 81

Figura 25: Marcação das mutações encontradas nos pacientes (círculos vermelhos) no mapa de conservação entre espécies e dos respectivos domínios de ligação de proteína P1-P4, P8 e 9, P12 e P19 (retângulos pontilhados) no RNA *RMRP*. Nucleotídeos classificados quanto à sua conservação entre 10 espécies (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Canis familiaris*, *Dasyprocta novemcinctus*, *Loxodonta africana*, *Monodelphis domestica*, e *Xenopus tropicalis*). Para as classificações, foi considerado altamente conservado quando o mesmo nucleotídeo estivesse presente em uma determinada posição nas 10 espécies; significativamente conservado – presente em 8 ou 9 espécies; moderadamente conservado – presente em 6 espécies. Figura adaptada de Thiel et al., 2007²⁴. 86

Figura 26: Mapa dos oligonucleotídeos sintéticos desenhados para a quantificação do produto gênico por RT-qPCR representados pelas setas coloridas esquema do **A)** dos genes que codificam para orna humano e para a **B)** CCNB2 humano. 87

Figura 27: A) Curva de eficiência para o oligonucleotídeos *RMRP* (eficiência 100%, inclinação:-3,33 e R2: 0,994), **B)** Curva de eficiência para o oligonucleotídeo 5.8S não clivado (eficiência 100%, inclinação:-3,33 e R2: 0,999) 88

Figura 28: Abundância relativa de RNA *RMRP* determinados por PCR quantitativo em tempo real nos indivíduos afetados..... 90

Figura 29: Abundância relativa de rRNA pré-5.8S determinados por PCR quantitativo em tempo real nos indivíduos afetados..... 91

*Não te deixes destruir...
Ajuntando novas pedras
e construindo novos poemas.
Recria tua vida, sempre, sempre.
Remove pedras e planta roseiras e faz doces. Recomeça.
Faz de tua vida mesquinha
um poema.
E viverás no coração dos jovens
e na memória das gerações que hão de vir.
Esta fonte é para uso de todos os sedentos.
Toma a tua parte.
Vem a estas páginas
e não entres seu uso
aos que têm sede.*

Cora Coralina

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O Centro de Genética Médica do Instituto Nacional da Saúde da Mulher da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/FIOCRUZ) faz o acompanhamento clínico de patologias genéticas raras, de caráter evolutivo, crônico e de alta complexidade médica. Há anos vem aprimorando e desenvolvendo metodologias laboratoriais, como técnicas de genética molecular no estudo etiológico das malformações congênitas e doenças do desenvolvimento na criança. Neste sentido, tornou-se uma referência no estado do Rio de Janeiro como centro de referência para doenças raras para o estudo destas doenças (Portaria 119/2014 – Ministério da Saúde entrou em vigor, em 28 de dezembro de 2016), entre elas as Displasias Esqueléticas (DEs).

As DEs são desordens da cartilagem e do esqueleto, que em sua maioria está relacionada a mutações genéticas. Com isso, o diagnóstico molecular frequentemente confirma o diagnóstico clínico e radiológico destas patologias, proporcionando um melhor aconselhamento genético.

De forma concomitante, o IFF, através do Centro de Genética Médica, também participou do Consórcio CosMO-B (Malformações Congênitas do Esqueleto e Osteocondrodismplasias no Brasil, do inglês Congenital Malformations and Osteochondrodysplasias in Brazil), uma rede colaborativa que visava a realização de diagnóstico molecular de pacientes com DEs, além de estimular o intercâmbio de informações e a pesquisa. Como no Brasil não existem estudos clínicos e moleculares sobre pacientes com DE do tipo Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo (do termo em inglês Cartilage-Hair

Hypoplasia - CHH), através de reuniões com a rede de osteocondrodisplasias foi estabelecido que o Laboratório de Medicina Genômica do IFF seria a instituição referência para o diagnóstico desse tipo de displasia, começando assim a trabalhar em rede com outros centros de genética médica brasileiros.

Deste modo, a implantação deste projeto possibilitou o estabelecimento de um fluxo para o estudo de CHH, que permite o aconselhamento genético das famílias, o acompanhamento clínico adequado dos pacientes, através da confirmação do diagnóstico clínico pela análise molecular, além de contribuir com novos dados acerca da CHH no Brasil.

Deste modo, a implantação deste projeto possibilitou o estabelecimento de um fluxo para o estudo de CHH, que permite a confirmação do diagnóstico clínico pela análise molecular, o aconselhamento genético das famílias e o acompanhamento clínico adequado dos pacientes, além de contribuir com novos dados acerca da CHH no Brasil.

1.INTRODUÇÃO

Defeito congênito (DC) refere-se a um distúrbio de origem genética e/ou ambiental que ocorre no período embrionário-fetal, envolvendo comprometimento estrutural, funcional ou ambos¹. O registro de defeitos congênitos no Brasil vem sendo aprimorado, e tem mostrado especialmente para a malformação congênita, que esta é a segunda causa de mortalidade infantil. Dados do DATASUS² indicam que as DCs são responsáveis por 21% do total de mortes infantis e esses números demonstram a necessidade de um programa de saúde pública para a redução dessa estatística.

O Instituto Nacional de Saúde da Mulher da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF), desempenha papel importante no estudo dos defeitos congênitos devido ao seu atendimento de alta complexidade, principalmente após o seu ingresso em 2007 no ECLAMC (Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas)³, que possibilitou a otimização da coleta de dados dos nascidos com DC no IFF e a uniformização destas informações.

Dentre os casos de defeitos congênitos atendidos no hospital, encontram-se as displasias esqueléticas (DEs), que são doenças genéticas que envolvem o crescimento e desenvolvimento do sistema esquelético. Surgem a partir de alterações durante o desenvolvimento embrio-fetal e durante o crescimento e a homeostase da cartilagem e do esqueleto, com caráter progressivo⁴. Devido à grande variedade de fenótipos, o diagnóstico clínico-radiológico destas doenças ainda é um grande desafio e o estudo das

bases moleculares se faz cada vez mais necessário para o estabelecimento do diagnóstico definitivo⁵.

A Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo (do termo em inglês Cartilage-Hair Hypoplasia – CHH; OMIM 250250) é uma DE caracterizada por baixa estatura com membros curtos e anormalidades esqueléticas predominantemente metafisárias⁶. Clinicamente podem ser observados cabelos finos e esparsos em alguns pacientes e frouxidão ligamentar⁷. Também podem fazer parte do quadro clínico alterações gastrointestinais, anemia, deficiência imunológica e até evolução para alguns tipos de câncer, sendo linfomas os majoritários^{8,9}. Dada a variabilidade clínica o diagnóstico correto pode ser difícil.

Essa patologia é causada por mutações recessivas no gene *RMRP* que não é traduzido em proteína¹⁰. O *RMRP* é um gene de expressão ubiquitária que codifica um RNA de 267 nucleotídeos que é um componente estrutural do complexo RNase MRP (do termo em inglês *mitochondrial RNA processing*), uma enzima responsável pelo processamento do rRNA de 5.8S e iniciadores de RNA necessários para a replicação do DNA mitocondrial e progressão do ciclo celular¹¹.

Este projeto teve como objetivo identificar mutações no gene *RMRP* (do termo em inglês RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease) em amostras de pacientes encaminhados ao IFF com características clínicas e radiográficas compatíveis com CHH. Esse estudo também visou avaliar a expressão do gene *RMRP* e a sua influência nos níveis de RNA ribossomal de 5.8S (rRNA 5.8S) e ciclina B2 (*CCNB2*).

A identificação das mutações no gene *RMRP* em pacientes com quadro clínico-radiológico sugestivo de CHH permitiu o diagnóstico de certeza

e um aconselhamento genético preciso. Por fim, os resultados obtidos poderão contribuir com a literatura e fornecer dados para futuros estudos epidemiológicos da CHH no Brasil.

2. JUSTIFICATIVA

A dificuldade da identificação de CHH através de radiografias durante o primeiro ano de vida, alterações ósseas sutis, somada à sobreposição fenotípica com outras DEs dificulta o diagnóstico da doença. Dessa forma, a análise molecular das mutações no gene *RMRP* é o padrão ouro, que, além de possibilitar uma maior confiabilidade do diagnóstico clínico, contribui para o aconselhamento genético adequado de pacientes e seus familiares.

A ausência de investigação sistemática de pacientes com essa displasia no Brasil, acrescida do fato de que ainda não existe uma correlação genótipo-fenótipo precisa fez com que o Laboratório de Medicina Genômica do Centro de Genética Médica do IFF, através da parceria firmada com o grupo de osteocondrodismplasias (CoSMO-B), se constituísse como uma referência para o diagnóstico e pesquisa de CHH.

Acredita-se que as mutações presentes nos pacientes com CHH podem alterar em diferentes níveis a expressão do gene *RMRP*, influenciando no espectro clínico da doença, que além do sistema esquelético pode também afetar o sistema imune. Com isso, a avaliação genética torna-se de grande importância para a prevenção de patologias associadas, como a vigilância para incidência de câncer e a antecipação da vacina para varicela, bastante grave nesses pacientes.

Os mecanismos que levam a CHH ainda são pouco conhecidos em função da raridade da doença. Nesse sentido os ensaios moleculares propostos neste estudo têm o potencial de trazer dados sobre essa doença, que ampliem o conhecimento sobre a correlação genótipo-fenótipo.

Pouco se sabe sobre a prevalência desse tipo de DE no Brasil, assim, este estudo também poderá contribuir para futuros estudos epidemiológicos do perfil clínico e molecular dessa displasia esquelética no Brasil.

Vale ressaltar que este projeto contempla parcerias importantes com o Hospital de Clínicas de Porto Alegre e com a Universidade Estadual de Campinas através de seus pesquisadores que são lideranças em suas áreas, contribuindo com suas expertises além de propiciar intercâmbio científico, importante para a formação de recursos humanos.

3. OBJETIVOS

4.1. Geral:

Descrever os genótipos, as características fenotípicas, os níveis de transcrito de *RMRP* e de pré-rRNA 5.8S e *CCNB2* não processados em pacientes com Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo.

4.2: Específicos:

- Investigar a presença de mutações no gene *RMRP* através de sequenciamento de amostras de DNA dos pacientes.
- Confirmar através da investigação de mutações no gene *RMRP*, o diagnóstico clínico e radiológico dos pacientes.
- Realizar análises de bioinformática para avaliar a possível patogenicidade das mutações encontradas.
- Avaliar os níveis de transcritos de *RMRP* através de RT-qPCR dos pacientes.
- Investigar a abundância de rRNA de 5.8S e *CCNB2* não clivados por RT-qPCR dos pacientes.
- Descrever o fenótipo de pacientes com Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Sistema Esquelético e Osteogênese

O sistema esquelético é composto por ossos, cartilagens, ligamentos e tendões e é responsável por diversas funções no organismo. A principal função do esqueleto é a sustentação do corpo e a proteção dos órgãos internos. Além disso, o sistema esquelético em coordenação com os músculos e articulações permite a realização dos movimentos. Outras funções são reservas de sais minerais, como cálcio e fósforo e a produção de células do tecido sanguíneo na medula óssea¹².

O processo de formação óssea, ou osteogênese, se inicia no feto no terceiro mês da gestação e é completado no final da adolescência^{12,13}. No embrião, o esqueleto é gerado por três linhagens distintas. Os somitos são responsáveis pelo desenvolvimento do esqueleto axial. Já a crista neural cranial dá origem ao arco branquial e aos ossos e cartilagem craniofaciais e, o mesoderma lateral origina os membros¹⁴.

Existem dois processos principais de formação óssea: a ossificação intramembranosa e a ossificação endocondral. No primeiro, ocorre a conversão direta do tecido conjuntivo primitivo (mesênquima) em osso. No segundo, as células mesenquimais se diferenciam em cartilagem, formando um molde cartilaginoso que é progressivamente substituído por células ósseas¹².

Ossificação Intramembranosa

Através da ossificação intramembranosa são formados alguns dos ossos do crânio. Esta também contribui para o crescimento de ossos curtos e para o espessamento dos ossos longos ¹².

Nesse processo de ossificação o tecido ósseo não é depositado sobre um molde cartilaginoso. A ossificação intramembranosa começa no centro de ossificação primária, no interior de membranas de tecido conjuntivo. Primeiramente, ocorre a diferenciação de células mesenquimáticas em osteoblastos agrupados que sintetizam uma matriz ainda não mineralizada, chamada osteóide (figura 1). Com a mineralização dessa matriz, alguns osteoblastos são aprisionados e permanecem aderidos à matriz, tornando-se osteócitos¹².



Figura 1: Ossificação intramembranosa. Células do mesênquima se tornam arredondas e formam um blastema no qual, por diferenciação, originam-se osteoblastos que produzem tecido ósseo primário¹².

No centro de ossificação é possível observar que vários desses grupos surgem simultaneamente. Assim, as trabéculas ósseas formadas se confluem, conferindo ao osso um aspecto esponjoso. A medula óssea surge a partir das cavidades formadas entres essas trabéculas, que são invadidas por vasos sanguíneos e células mesenquimais indiferenciadas. Como há o crescimento

radial de vários centros de ossificação, a membrana conjuntiva preexistente é gradualmente substituída por tecido ósseo e a parte da membrana conjuntiva que não sofre ossificação passa a constituir o endóstio e o perióstio¹².

Ossificação Endocondral

Através da ossificação endocondral são formados os ossos longos e curtos¹². Esse processo é caracterizado pela deposição de tecido ósseo sobre um molde de cartilagem hialina, que tem formato similar ao produto ósseo final, porém com tamanho reduzido (figura 2)¹³.

Esse processo de desenvolvimento dos ossos se inicia com a transformação do pericôndrio em perióstio, pela formação de uma membrana de tecido conjuntivo formando um cilindro, chamado colar ósseo, que envolve o futuro osso.

Abrigados pelo perióstio, os centros de ossificação primários (na região onde será a diáfise) começam a transformação do molde de cartilagem com a modificação dos condrócitos. Estes sofrem hipertrofia, e sua matriz torna-se calcificada e favorecem a formação de trabéculas. Em seguida, os condrócitos sofrem apoptose e ocorre a invasão por vasos sanguíneos e células mesenquimais indiferenciadas nas cavidades antes ocupadas pelos condrócitos. As células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos, que irão depositar a matriz óssea sobre os tabiques de cartilagem calcificada (zona de cartilagem calcificada). A matriz óssea calcifica-se e aprisiona os osteoblastos, que então se transformam em osteócitos. Desse modo, formam-se espículas ósseas com uma parte central de cartilagem calcificada e uma parte superficial de tecido ósseo primário¹².

Durante a produção de matriz pelos osteoblastos, os osteoclastos derivados dos macrófagos invadem a região mediana do osso e pelo processo de reabsorção óssea criam uma cavidade longitudinal, formando o canal medular. As células mesenquimais que chegam a este canal formam a medula óssea hematogênica e dão início a produção de células sanguíneas¹².

Após a ossificação da diáfise, o processo se irradia em direção às epífises, através de centros de ossificação secundários, porém com o crescimento radial, e não longitudinal¹².

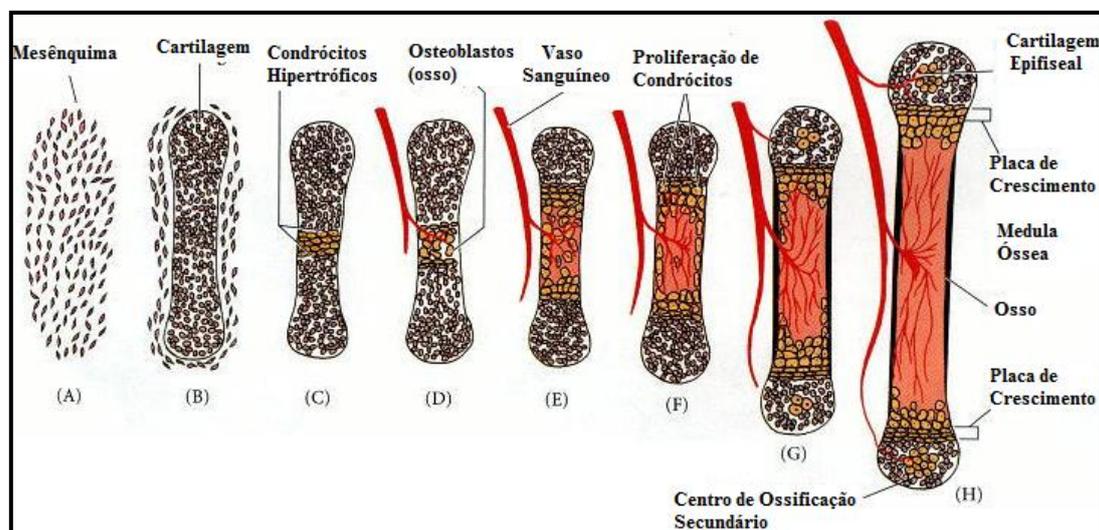


Figura 2: Esquema da ossificação endocondral. (A, B) Células mesenquimais condensam e se diferenciam em condrocitos para formar o molde cartilaginoso dos ossos. (C) Condrócitos no centro do eixo sofrem hipertrofia. Ocorre a redução e mineralização da matriz extracelular e morte por apoptose dos condrocitos. A morte dos condrocitos permite a entrada de vasos sanguíneos. (D, E) Os vasos sanguíneos trazem osteoblastos, que se ligam à matriz cartilaginosa em degeneração e ao depósito de matriz óssea. (F, G) Formação da medula óssea. (G, H) Crescimento ósseo a partir da placa de crescimento. Centros de ossificação secundários também são formados quando os vasos sanguíneos entram nas pontas dos ossos¹⁵.

Ao final da deposição de matriz óssea nas epífises, o tecido cartilaginoso existirá apenas nos pontos de articulação e na placa de crescimento, que é responsável pelo crescimento longitudinal dos ossos longos. Ela está localizada entre as epífises e a diáfise e é um disco

cartilaginosa que não é penetrado pelo osso em expansão durante sua formação. Nela, os condrócitos se distribuem em cinco zonas distintas a partir da epífise: zona de repouso, zona de proliferação, zona de cartilagem hipertrófica, zona de cartilagem calcificada e zona de ossificação (figura 3)¹².

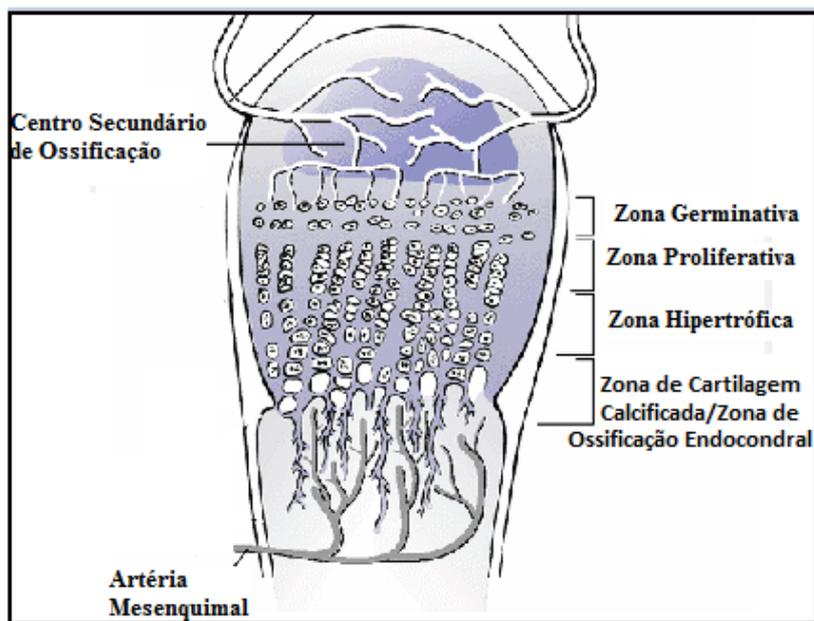


Figura 3: Esquema da placa de crescimento evidenciando as zonas da distribuição dos condrócitos a partir da epífise: zona germinativa, zona proliferativa, zona hipertrófica e zona de ossificação endocondral¹⁶.

Uma região da placa de crescimento próximo à epífise mantém a cartilagem hialina sem qualquer alteração em sua morfologia, sendo essa região correspondente a zona de repouso ou zona germinativa. Adjacente a esta zona, os condrócitos dividem-se rapidamente e formam fileiras paralelas no sentido longitudinal do osso, formando a zona proliferativa. Ocorre então a modificação da cartilagem hialina havendo hipertrofia dos condrócitos e redução da matriz cartilaginosa a finos tabiques, sendo esta a zona de cartilagem hipertrófica. Em seguida, a matriz cartilaginosa é mineralizada e os condrócitos sofrem morte por apoptose¹⁴.

O crescimento do comprimento normalmente decorre deste processo de crescimento de cartilagem, degeneração, calcificação e substituição pelo tecido ósseo.

Devido ao crescimento endocondral ser um processo bastante complexo e altamente regulado, qualquer alteração envolvendo este mecanismo de crescimento pode resultar em anormalidades do esqueleto compatíveis com displasias esqueléticas¹⁷.

4.2 Displasias Esqueléticas

Displasias esqueléticas (DEs) integram um grupo de desordens decorrentes de distúrbios nos processos de desenvolvimento, crescimento e homeostase da cartilagem e do esqueleto. Esses distúrbios caracterizam-se por anormalidades na forma, tamanho e densidade mineral do osso e são frequentemente associadas a mutações genéticas^{4,18}.

Algumas das características das displasias esqueléticas incluem encurtamento nos ossos das pernas e/ou braços, ossos curvados ou fraturados, tórax pequeno, encurtamento das costelas, crescimento ósseo assimétrico, duplicação dos dedos das mãos ou dos pés, ossos irregulares (espessos ou finos) e desmineralização¹⁹.

O esqueleto fetal pode ser avaliado em ultrassonografia de rotina e geralmente em torno de 20 semanas de gravidez é possível fazer um diagnóstico pré-natal de DEs¹⁷.

As DEs podem ter causas variadas como herança autossômica dominante, autossômica recessiva, ligada ao cromossomo X, resultado de mutações *de novo* e mutações secundárias à exposição a uma substância

teratogena ou agente infeccioso que resulta na interrupção do desenvolvimento esquelético normal⁴.

A incidência global de recém-nascidos com alguma displasia esquelética é estimada em 1/5000 nascidos vivos²⁰. De acordo com a versão do ano de 2015 da Classificação de Displasias Esqueléticas²¹, existem 436 DEs classificadas em 42 grupos seguindo critérios clínicos, radiológicos, e moleculares, como por exemplo, o grupo das condrodisplasias relacionadas ao *FGFR3*, que apresenta 7 tipos de patologias (Displasia Tanatofórica tipos I e II, SADDAN, Acondroplasia, Hipocondroplasia, CATSHL e Displasias semelhantes à Hipocondroplasia); e o grupo das Displasias Metafisárias, que apresenta 10 patologias, dentre elas a CHH. A maioria dessas condições está associada à mutações em 364 genes diferentes²¹. Em comparação com a classificação de 2010, diversas displasias foram reclassificadas, reduzindo em 4% o número de patologias. Além disso, foram incluídos novos grupos e foram identificados novos genes relacionados às displasias esqueléticas aumentando em 5% o número de grupos e em 61% o número de genes²¹. Assim, o número de displasias esqueléticas foi reduzido, porém muitos novos genes associados, dentre eles o gene *RMRP* associado a CHH.

4.3 Características clínicas da Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo

A Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo ou Doença de McKusick (OMIM #250250) é uma doença autossômica recessiva, inicialmente descrita na Velha Ordem Amish em 1965 por Victor McKusick⁶ e posteriormente observada em diversas outras populações. A prevalência dessa patologia na Ordem Amish é de 1:1000 e é considerada alta, assim como a incidência para a população

finlandesa, onde a doença afeta 1 em cada 23.000 nascidos vivos. No entanto, para outras regiões estas informações ainda são escassas²².

Clinicamente a CHH se caracteriza por uma baixa estatura com encurtamento de membros, displasia metafisária, frouxidão dos ligamentos e um crescimento deficiente do cabelo, resultando numa aparência de fios finos e ralos. Em alguns casos a expressão fenotípica pode ser ainda mais pleiotrópica²³, podendo ocorrer também alterações gastrointestinais, anemia, deficiência imunológica e evolução para alguns tipos de câncer como leucemia, neoplasias de pele, fígado e linfomas, sendo o mais frequente o linfoma do tipo não-Hodgkin, que pode acometer cerca de 10% dos pacientes^{7,9,22}.

Uma outra classificação distribui as características clínicas em 3 subtipos baseados no nível de baixa estatura e características radiográficas adicionais: Displasia Metafisária sem Hipotricose (MDWH), Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo (CHH) e Displasia Anauxética (AD)^{22,24}. Os pacientes com MDWH são caracterizados apenas pela displasia metafisária leve. Já os pacientes com CHH além do comprometimento esquelético moderado, apresentam cabelos finos e esparsos (hipotricose), problemas intestinais e defeitos imunológicos. Os pacientes com AD apresentam displasia metafisária grave com comprometimento da coluna (displasia espôndilo-epi-metafisária), hipodontia, características faciais especiais e deficiência intelectual leve^{22,24} (figura 4).

Apesar da classificação das doenças variar de acordo com um espectro de gravidade, não se sabe se existe relação entre a ocorrência de anormalidades extra esqueléticas com a gravidade das manifestações esqueléticas²².

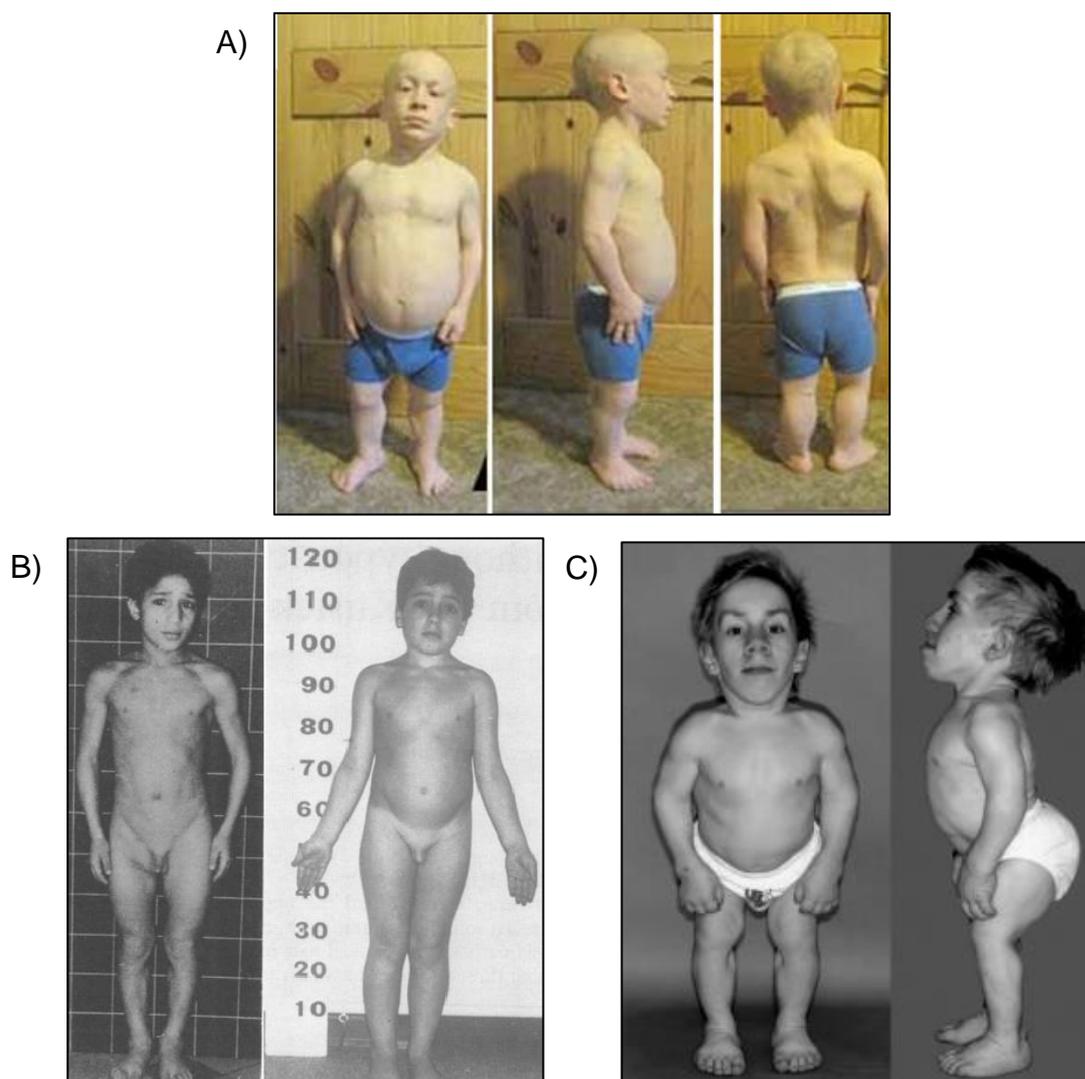


Figura 4: **A)** Paciente com CHH aos 14 anos de idade (ancestralidade européia); ²⁵ **B)** Pacientes com MDWH aos 10 anos e 8,5 anos, respectivamente (ancestralidade desconhecida)²⁶; **C)** Paciente com AD aos 16,5 anos de idade (ancestralidade européia)¹¹.

4.4 Aspectos Moleculares da Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo

Em 2001, Ridanpaa e colaboradores⁶, demonstraram a associação de mutações no gene *RMRP* com a CHH. O *RMRP* está localizado na região 9p13 e transcreve um RNA de 267 pares de bases (GenBank M29916), que não é traduzido em proteína²⁷. Esse RNA, é um componente da enzima RNase MRP (do termo em inglês *mitochondrial RNA processing*) (figura 5), um complexo ribonucleoproteico com função de clivagem sobre diversos alvos⁷.

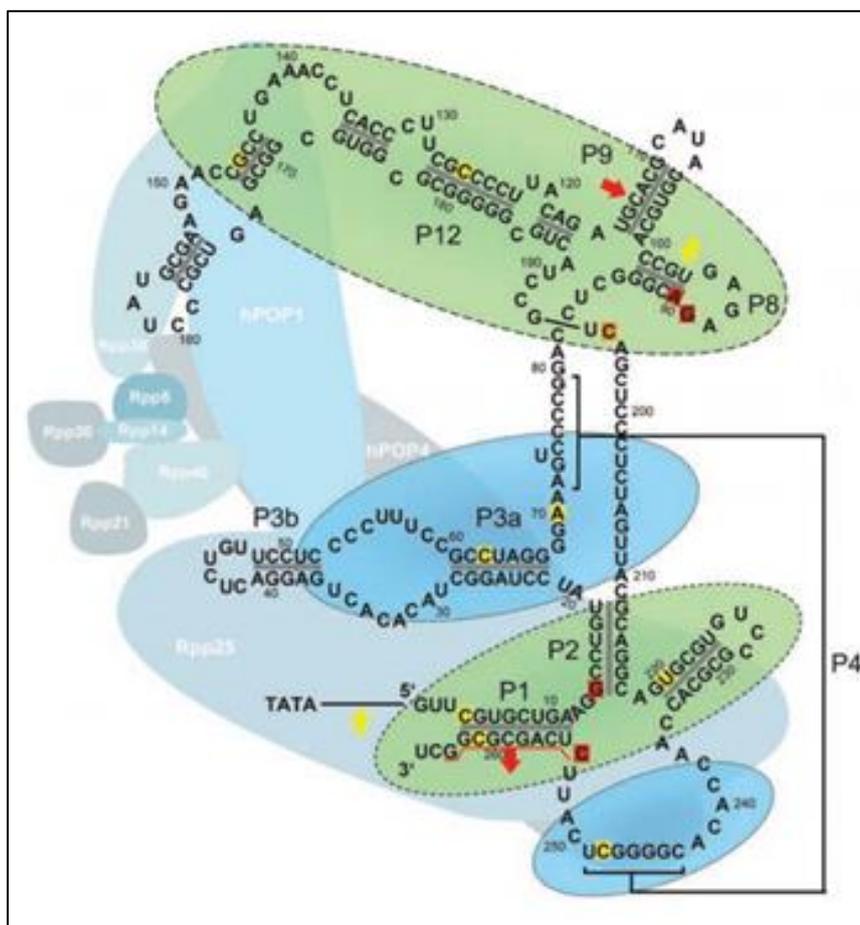


Figura 5: Esquema da estrutura bidimensional da Rnase MRP. Para formar a ribonuclease, aproximadamente dez diferentes proteínas se ligam a domínios específicos da estrutura secundária do RNA (coloração verde e azul). As mutações pontuais estão sombreadas de amarelo e laranja; as setas vermelhas indicam inserções e deleções²⁴.

O RNA produzido pelo gene *RMRP* é classificado como RNA longo não codificante, do inglês, *long non-coding RNA* (lncRNA). Nesse grupo estão incluídos transcritos que apresentam mais de 200 pares de base de comprimento e não são traduzidos em proteína²⁹. Os lncRNAs correspondem a grande parte do transcriptoma de mamíferos e a eles tem sido atribuídas diversas funções celulares, incluindo a regulação da transcrição gênica²⁹.

Uma das funções da RNase MRP é o processamento do pré-rRNA no nucléolo para gerar o rRNA de 5.8S. Estudos em leveduras demonstraram que

o complexo RNase MRP cliva o pre-rRNA no sítio A3 e ajuda a converter a forma longa do rRNA de 5.8S em sua forma curta e ativa⁷ (figura 6).

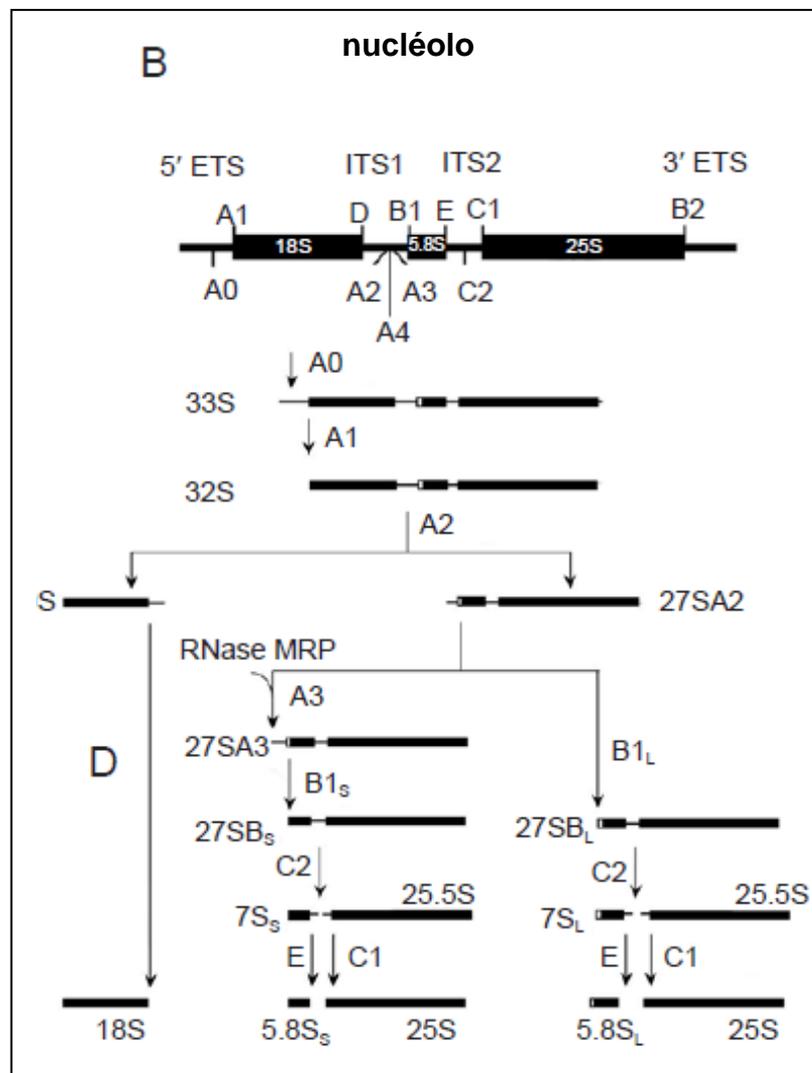


Figura 6: RNase MRP atua no processamento de pré-rRNA em *S. cerevisiae* no nucléolo. O transcrito primário 35S é processado em rRNAs maduros 25S, 18S e 5.8S. Na figura, estão descritos os locais de clivagem (A0 até E), os espaçadores transcritos externos (5'-ETS e 3'-ETS) e os espaçadores transcritos internos (ITS1 E ITS2). A pequena caixa branca representa a sequência da forma longa de rRNA 5.8S (5.8S_L) e está ausente na forma curta (5.8S_S). A RNase MRP processa o local A3 em ITS1⁷.

Além disso, o complexo RNase MRP também é responsável pela clivagem de iniciadores de RNA necessários para a replicação do DNA na mitocôndria⁷ (figura 7A) e também influencia na progressão do ciclo celular no final da mitose, através da degradação de mRNA ciclina B2¹¹ (figura 7B). A

síntese da ciclina B2 é essencial para a entrada em mitose e a sua degradação marca a saída desta fase. Em leveduras, foi observado que as mutações afetam a clivagem pela RNase MRP da região 5'UTR do mRNA de CLB2 (do termo em inglês Cyclin like B2), o ortólogo da ciclina B2 em humanos, promovendo o aumento dos seus níveis e levando assim, a parada na fase final da mitose³⁰.

Além disso, é provável que o RNA codificado pelo gene *RMRP* desempenhe outras funções que ainda não foram bem definidas⁷. Atualmente sabe-se que embora inicialmente isolada na mitocôndria, a enzima é localizada predominantemente no nucléolo⁷.

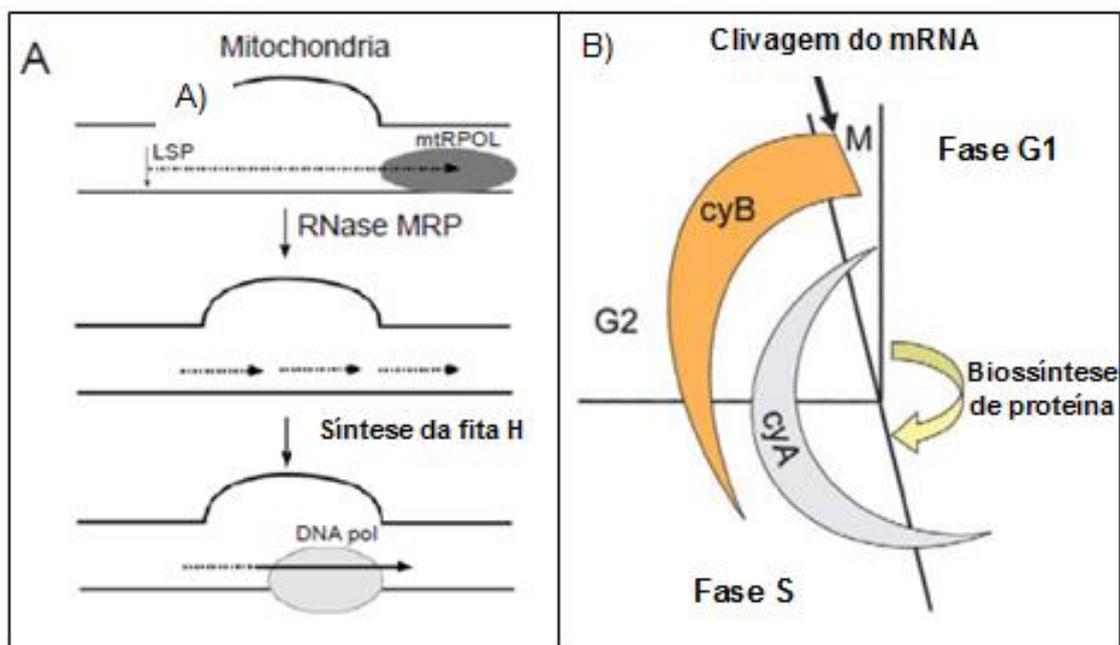


Figura 7: **A)** RNase MRP está envolvida no processo de replicação do DNA mitocondrial, através da clivagem de iniciadores. O processo se inicia com a transcrição da fita leve feita pela RNA polimerase mitocondrial, a partir do promotor. Em seguida a fita pesada também é transcrita. O transcrito permanece ligado ao duplex de DNA e é clivado pela RNase MRP para formar os iniciadores que são usados para a iniciar a replicação do DNA pela DNA polimerase gama. **B)** O gene *RMRP* codifica o RNA integrante do complexo RNase MRP, que é essencial para o crescimento e divisão de células em levedura e em seres humanos. Na presença de mutações, a função do complexo RNase MRP sobre o processamento do precursor do rRNA 5.8S, que é uma subunidade da partícula ribossômica de 60S fica gravemente afetada e a montagem ribossomal fica atrasada, resultando em uma capacidade reduzida de sintetizar

proteínas. Como efeito secundário, a ciclina A2, que promove transições de fase G1/S e G2/M, é diminuída, correlacionando-se com a magnitude do atraso no ciclo celular. CyA: Ciclina A cyB: Ciclina B.^{7,11}

A expressão de *RMRP* é ubiquitária (expresso constantemente em vários tecidos simultaneamente); no entanto, quando alterado, o *RMRP*, promove uma interrupção da progressão do ciclo celular em células que se dividem rapidamente, como linfócitos e condrócitos³¹.

Estudos moleculares do gene *RMRP* demonstraram a presença de uma alta densidade de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e uma extensa série de variantes alélicas patogênicas que estão em desacordo com a alta conservação do gene *RMRP* entre espécies³².

As alterações patogênicas podem ser classificadas em duas categorias, a primeira inclui inserções, duplicações, ou triplicações no promotor do gene *RMRP* entre o elemento TATA e o sítio de iniciação da transcrição³² (figura 8). O elemento TATA é reconhecido pela proteína TBP (do inglês, *TATA binding protein*) que é requerida para a correta iniciação da transcrição pelas três RNAs polimerases de eucariotos para a transcrição de RNA ribossomal, transportador, mensageiro e snoRNA (do inglês, *small nucleolar RNA*)³³. Estas mutações na região regulatória do gene resultam na redução significativa da expressão do gene⁶. Acredita-se que isto pode estar relacionado ao fato do gene *RMRP* ser transcrito pela RNA polimerase III; e nesse caso, a distância entre o elemento TATA e sítio de iniciação da transcrição é essencial para a transcrição eficiente³⁴. Até o momento, já foram identificadas cerca de 30 diferentes mutações deste tipo associadas com CHH²³. A segunda categoria contempla mutações no transcrito e, portanto, na molécula de RNA, que está associada com diversas proteínas que irão formar o complexo proteico³². Estas

alterações são do tipo mutações pontuais e estão possivelmente associadas a uma função anômala do RNA. Mais de 70 mutações distintas foram identificadas nesta região²³.

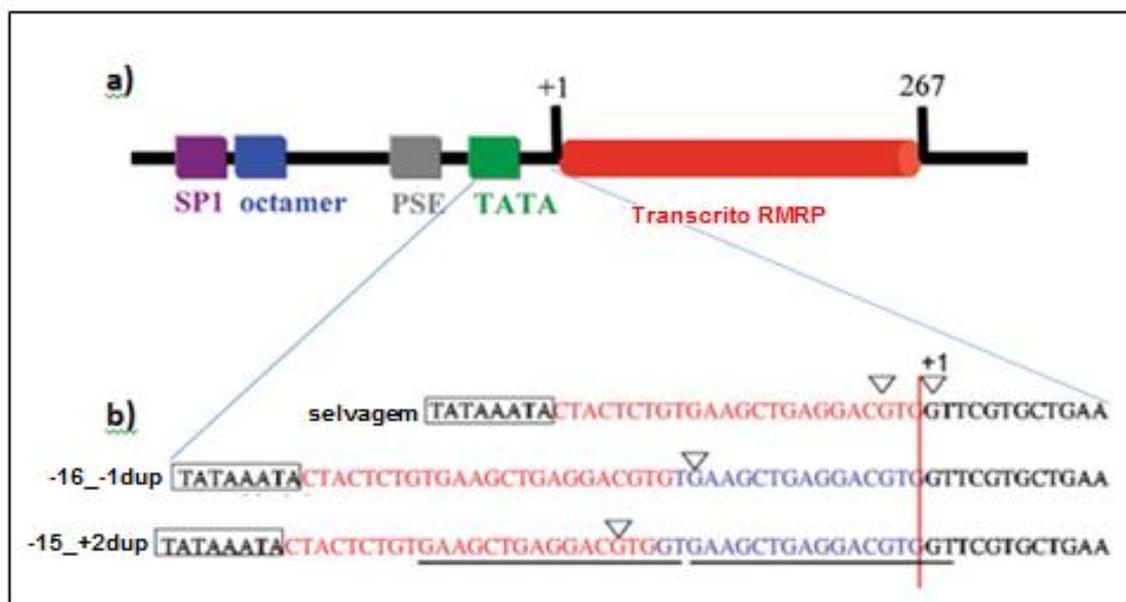


Figura 8: A) Esquema da estrutura do gene RMRP. O gene não contém íntrons, não é traduzido em proteína e seu transcrito apresenta 267b de comprimento (vermelho). A região promotora contém um sítio de ligação SP1 (roxo), uma octâmero (azul), um elemento de sequência proximal (do inglês PSE) (cinza) e uma caixa TATA (verde); **(b)** sequência do promotor do gene selvagem (do inglês WT) e dos promotores mutantes. Os triângulos mostram os locais de iniciação da transcrição. O retângulo mostra a caixa TATA. As sequências vermelhas e azuis mostram o promotor central e as mutações de duplicação. As sequências sublinhadas são as que foram duplicadas (indicadas pela numeração seguida da sigla dup). Figura adaptada de Hermans P. *et al.*, (2005)³¹ e Bonafé *et al.*, (2005)³².

Em geral, os pacientes com CHH podem apresentar um genótipo em homozigose ou heterozigose composta⁸. Assim, esses pacientes são caracterizados por alterações diferentes nos dois alelos, podendo ocorrer a combinação de uma mutação no promotor de um alelo e uma mutação na região transcrita do outro alelo, ou uma combinação de duas mutações na região transcrita em ambos os alelos³².

Diversos estudos relatam que a presença de mutações homocigotas ou heterocigotas compostas para duplicações ou inserções na região promotora talvez seja uma condição incompatível com a vida. Esses dados são controversos, pois já foram relatados dois pacientes com duas alterações no promotor^{35,36}. Reforçando essa hipótese, nenhum estudo conseguiu obter murinos apresentando alelos nulos para *RMRP*, indicando que estes animais são letais embrionários³⁷. No entanto, alterações afetando os dois alelos na região transcrita são comuns na literatura. Essas mutações resultam em alterações estruturais no RNA. A redução drástica da quantidade de RNA de *RMRP* em decorrência de mutações na região promotora do gene parece ser mais deletéria do que quantidades normais de RNA de *RMRP* contendo mudanças estruturais sutis, decorrentes de mutações na região transcrita³².

A alteração em *RMRP* mais frequentemente associada a esta patologia é a substituição g.71A>G²⁷, anteriormente apontada como g.70A>G na sequência de referência do genoma humano (GRCH37), que foi reclassificada em função da submissão da versão mais recente do genoma humano (GRCh38) em 2013 nos bancos de dados de nucleotídeos. Esta mutação está presente na maioria, se não em todos os pacientes de origem Amish, em mais de 90% de pacientes de origem finlandesa e em outras populações Europeias²⁴. Já em pacientes japoneses, ao invés desta alteração, foram identificadas duas mutações fundadoras: a duplicação de 17 nucleotídeos na região transcrita e a substituição g.219A>G, classificada anteriormente como g.218A>G³⁸.

Tem sido descrito na literatura que o elevado grau da heterogeneidade das mutações em *RMRP* encontradas em pacientes com CHH pode afetar em

diferentes níveis a expressão do gene *RMRP* e também a sua função³⁹, e que, por conseguinte, pode estar relacionada com o agravamento do fenótipo da doença.

Outra característica importante do gene *RMRP* é o fato de haver abundância de SNPs além de uma grande diversidade de mutações patogênicas que estão em desacordo com a alta conservação do gene *RMRP* entre espécies³². Ainda não está claro se o gene *RMRP* é afetado particularmente por uma elevada incidência de mutações pontuais, ou se há uma redução na eficiência do mecanismo de reparo do DNA específico para esse gene³².

Em geral, para o diagnóstico molecular, a segregação correta das mutações nas famílias, a ausência de mutações nos controles, a frequência das variantes na população e no caso de mutações não-sinônimas, o grau do efeito danoso na proteína são critérios comumente usados na definição de patogenicidade de uma variante³². Como o gene *RMRP* codifica um RNA que não é traduzido, a interpretação do efeito de alguma alteração torna-se mais difícil. Neste caso, a classificação da patogenicidade de alterações no gene leva em consideração outros critérios, tais como: a localização do nucleotídeo alterado, ou seja, se estão localizados na região de pareamento das bases para formar a estrutura secundária do RNA, na região de interação com as proteínas que irão formar o complexo RNase MRP ou então em sequências conservadas evolutivamente¹⁰. Esta última tem sido utilizada como uma ferramenta essencial para identificar essas regiões funcionais que foram conservadas ao longo da evolução, pois ela parte da premissa básica de que a conservação de sequências decorre da sua importância funcional⁴⁰. O grupo de

Bonafé (2005)³², realizou a análise comparativa de sequências regulatórias de 9 espécies (figura 9).

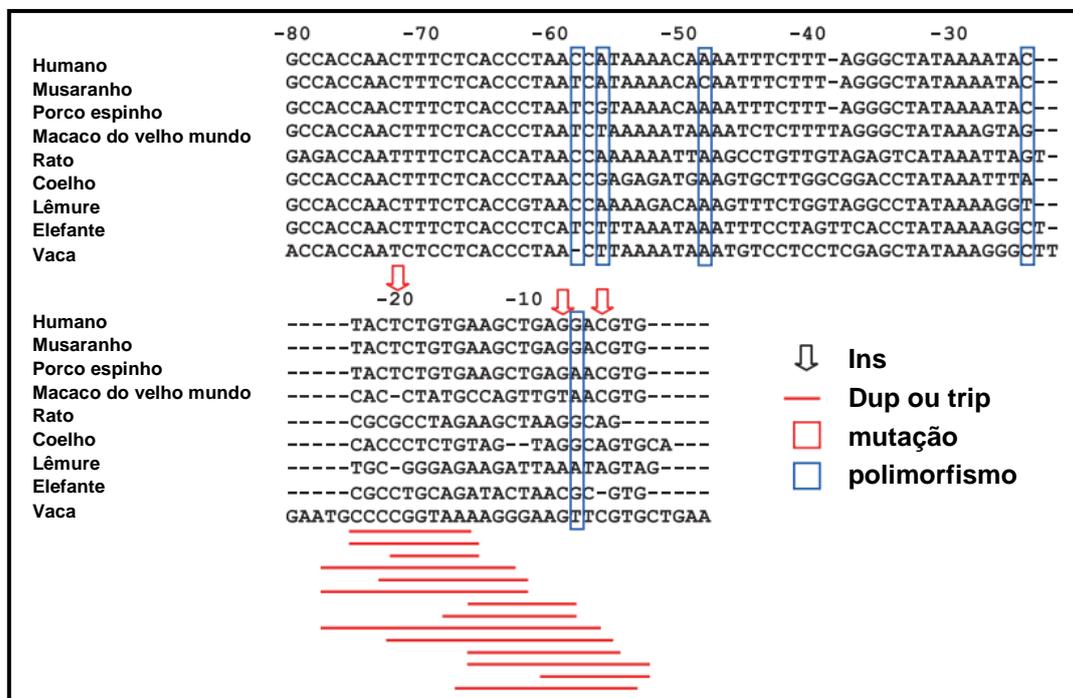


Figura 9: Alinhamento de sequências múltiplas da região promotora de *RMRP* de nove espécies de mamífero (desde o nucleotídeo g.80 até o sítio de início da transcrição da sequência humana). Polimorfismos e variantes raras são indicados como caixas azuis (alterações de um único nucleotídeo); as setas vermelhas indicam inserções patogénicas e as linhas vermelhas indicam duplicações patogénicas e triplicações. As posições foram consideradas como conservadas se oito das nove espécies tinham o mesmo nucleotídeo³².

Já para a região transcrita foi feita a análise de conservação de sequências entre 12 espécies (figura 10).

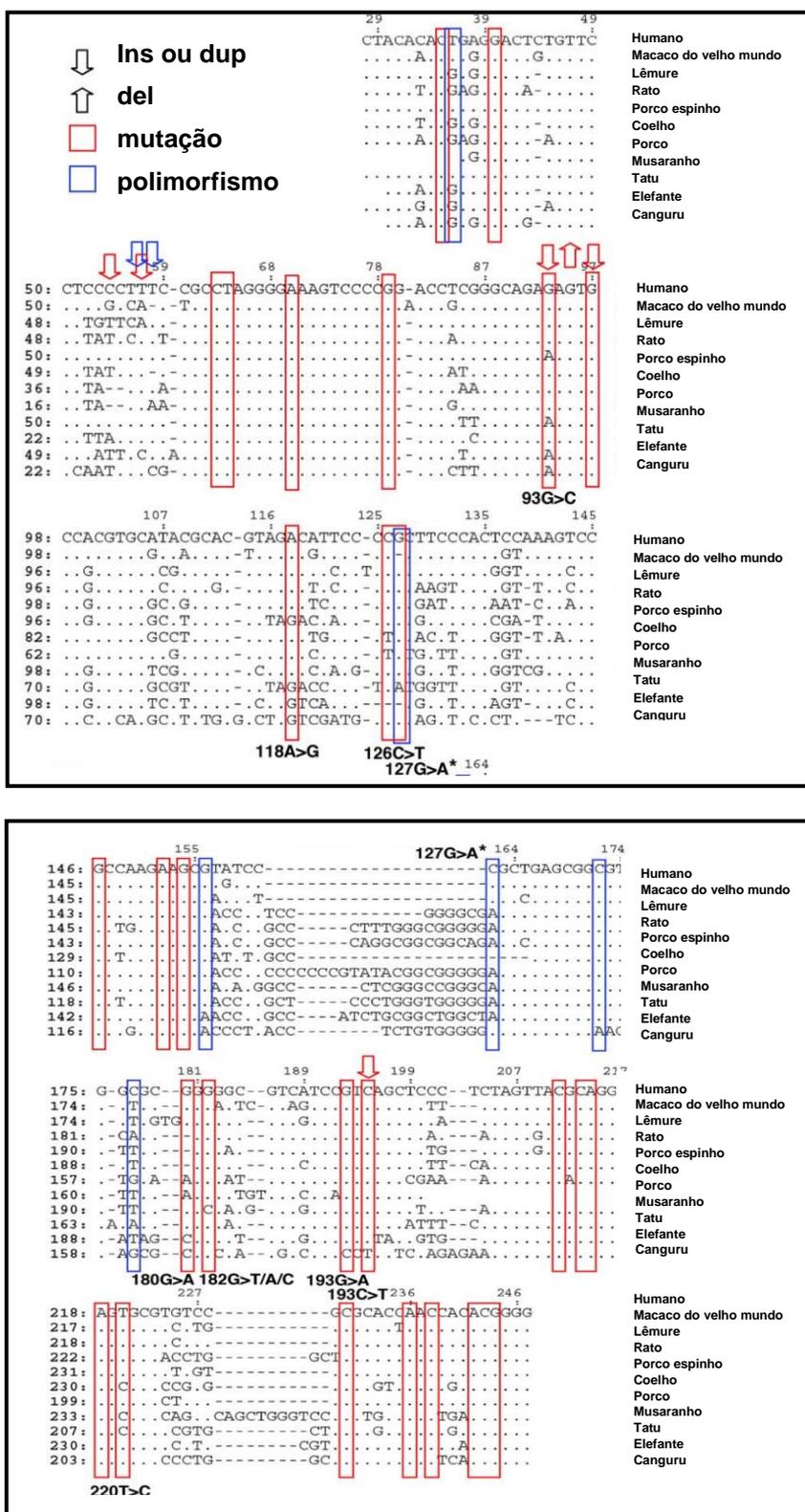


Figura 10: Alinhamento de Sequência Múltipla da Região Transcrita *RMRP* É mostrado o alinhamento da sequência de 12 espécies de mamíferos (11 placentários e 1 marsupial) da região transcrita de *RMRP* (do nucleotídeo g.28 a g.247 da sequência humana). Mutações patogênicas putativas são indicadas como caixas vermelhas (alterações de um único nucleotídeo) ou setas vermelhas (inserção / duplicações / deleções); polimorfismos e variantes

raras são indicados como caixas azuis (alterações de um único nucleotídeo) ou setas azuis (inserção / duplicações / deleções). As posições foram consideradas como conservadas se 11 das 12 espécies tivessem o mesmo nucleotídeo³²

Pelo exposto, é possível perceber que as informações sobre a CHH não são tão precisas, especialmente no que tange a correlação genótipo-fenótipo. Desta forma, a ampliação de conhecimento no âmbito molecular, faz-se extremamente necessária, pois pode permitir um melhor entendimento desta patologia e um melhor acompanhamento dos indivíduos afetados.

5. HIPÓTESE

A Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo ocorre por alterações genéticas, porém, poucos registros na literatura relacionam essas mutações ao padrão clínico desta doença. ***Diferentes tipos de mutações podem estar relacionadas aos diferentes níveis de transcritos de RMRP, pré-rRNA 5.8S e CCNB2 não processado, diferenciando assim a gravidade do fenótipo dos pacientes.***

6. METODOLOGIA

6.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi cadastrado no CEP do IFF (1.557.698) e também no CEP das instituições coparticipantes, UNICAMP e HCPA, objetivando seguir a Resolução 466/12, que trata das diretrizes e normas de pesquisas envolvendo seres humanos.

6.2 Local do estudo

Os ensaios deste estudo foram realizados no Laboratório de Medicina Genômica do Instituto Nacional de Saúde da Mulher da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF) e nas Plataformas Tecnológicas das Fiocruz.

6.3 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo observacional, descritivo e transversal.

6.4 População do estudo

Pacientes Brasileiros, sem restrição de idade, com suspeita diagnóstica de CHH.

6.5 Amostras do estudo

O estudo foi realizado a partir de amostras de conveniência provenientes de pacientes que apresentaram fenótipo clínico compatível com

displasia esquelética tipo CHH atendidos no IFF, no Hospital de Clínicas da UNICAMP e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

6.6 Critérios de Inclusão

Foram considerados apenas indivíduos com suspeita diagnóstica de CHH baseado em avaliação clínica e radiográfica. Por ser uma doença de herança autossômica recessiva, quando possível, foram coletadas também amostras biológicas dos pais dos pacientes para a investigação da origem parental das mutações.

6.7 Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo indivíduos que apresentavam outras formas de nanismo que não configuravam displasias ósseas do tipo Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo, indivíduos portadores de aberrações cromossômicas e síndromes genéticas.

6.8 Desenho do estudo

No Laboratório de Medicina Genômica do IFF e nas Plataformas da FIOCRUZ foram realizados os seguintes ensaios: extração de DNA; análise de bioinformática para obtenção da sequência dos genes *RMRP*, *rDNA* e *CCNB2* a partir do banco de dados *GenBank* e desenho de iniciadores, amplificação do gene *RMRP* pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase); sequenciamento, análise *in silico*, extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão do gene *RMRP* através da técnica de PCR em tempo real. Os

ensaios laboratoriais foram desenvolvidos de acordo com os métodos descritos abaixo.

6.9 Coleta de Dados Clínicos e Radiológicos

Um questionário de avaliação clínica foi aplicado pelos médicos geneticistas responsáveis pelo atendimento nos ambulatórios das instituições participantes do estudo a todos os pacientes ou responsáveis, de forma a identificar fenótipo clínico dos pacientes com Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo estudados (Apêndice 1).

As radiografias dos pacientes também foram analisadas a fim de se obter maiores informações acerca das alterações ósseas associadas à Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo.

6.10 Análise de mutações no gene *RMRP*

6.10.1 Extração de DNA

Após obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram utilizadas amostras de sangue coletadas em tubos contendo anticoagulante EDTA para a extração de DNA. As amostras de sangue periférico dos pacientes foram enviadas ao Laboratório de Medicina Genômica do IFF, devidamente identificadas por códigos numéricos afim de preservar a identidade dos sujeitos de pesquisa, em um prazo de até 72 horas após sua coleta, seguindo as normas vigentes de biossegurança. O DNA foi extraído a partir de células mononucleares, utilizando-se a técnica de *Salting out*⁴¹.

O volume total de sangue (1-5 mL) foi transferido para um tubo cônico e então foi adicionada a solução de lise de hemácias (155 mM de NH_4Cl Ph 7,4; 10mM de KHCO_3 ; 1 mM de EDTA) na proporção 3,5:1mL de sangue, seguido de homogeneização em vórtex (Thermolyne) e incubação no gelo por 30 min. Após a incubação, o tubo foi centrifugado a 300 x g por 15 min (Centrifuga Eppendorf, modelo 5415R) e o sobrenadante descartado. Ao precipitado foi adicionado mais 1 mL de solução de lise de hemácias para cada 1 mL de sangue total e o material foi novamente homogeneizado por vórtex. O tubo foi centrifugado a 300 x g por 10 min e o sobrenadante descartado. Caso o precipitado ainda contivesse resquícios de hemácias, era feita mais uma lavagem, adicionando-se solução de lise de hemácia na proporção de 1:1 mL de sangue total seguida de homogeneização por vórtex e centrifugação a 300 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi agitado por vórtex. Os núcleos das células foram lisados adicionando-se 0,6 mL de solução de lise de núcleo (10mM de Tris-HCl; 400 mM de NaCl pH 8,2; 2Mm de EDTA) para cada 1 mL de solução de sangue total, 50 μL de SDS 20% para cada mL de solução de lise de núcleo utilizada e proteinase K (25mg/mL) (Sigma) na proporção de 4 μL :1 mL de solução de lise de núcleo. O lisado foi homogeneizado por vórtex e incubado até o dia seguinte à 56^aC. Após a incubação foi adicionado o mesmo volume de proteinase K utilizado anteriormente e em seguida foi incubado novamente a 56^oC por 2 horas. Em seguida o tubo foi centrifugado a 800 x g por 15 min e o sobrenadante foi transferido com auxílio de uma pipeta para outro tubo cônico contendo etanol absoluto gelado (Merck) com volume equivalente a 2 vezes o volume do sobrenadante. O tubo vertido cuidadosamente para que a fibra de DNA fosse

formada. Em seguida o DNA foi recuperado com auxílio de uma alça de vidro e lavado em etanol 70% (Merck). Após a breve secagem da fibra, o DNA foi eluído em 50-200 μ L de TE de acordo com o volume de sangue inicial.

Após a extração, a concentração e a pureza do DNA foram determinadas pelo método espectrofométrico utilizando o Nanodrop 2000 (NanoDrop) (Termo Scientific). A qualidade do DNA foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% dissolvida em TAE 1X (0,04M Tris-acetato, 0,001M EDTA) contendo 0,5 μ g/ml de brometo de etídeo (Invitrogen). As amostras foram preparadas com tampão de corrida 1X (30% de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xileno cianol). Como padrão de peso molecular, foi utilizado o DNA de fago λ digerido com enzima de restrição *Hind* III (BRL). A corrida eletroforética foi realizada a 5V/cm.

O DNA foi mantido a 4°C, até a sua utilização.

6.10.2 Amplificação de DNA

O gene *RMRP* foi amplificado por PCR utilizando oligonucleotídeos sintéticos localizados em regiões flangeadoras das regiões de interesse (promotora e transcrita), que foram gentilmente cedidos pelos pesquisadores Andrea Superti-Furga e Luiza Bonafé do Hospital Universitário de Lausanne/Suíça (tabela 1). As reações foram realizadas em volume final de 50 μ L, utilizando 100ng de DNA, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de GoTaq DNA polimerase (Promega), 1,5mM de MgCl₂, 25mM de cada desoxiribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), tampão 1X apropriado para Taq (Promega). O programa de PCR consistia de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 54°C por 30seg,

e 72°C por 45 seg e uma etapa de extensão final a 72°C por 5 min. A qualidade e o tamanho apropriado dos fragmentos obtidos foram visualizadas pela técnica de eletroforese em gel de agarose 1,2% dissolvida em TAE 1X contendo 0,5µg/ml de brometo de etídeo (Invitrogen). Foi utilizado o padrão de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen). A eletroforese era realizada a 5V/cm.

6.10.3 Purificação de produto de PCR

O produto proveniente das reações de PCR a partir de sangue periférico foi purificado usando o kit *Wizard®SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega). O volume do produto de PCR foi aferido e a ele adicionado água destilada para um volume de 350µL. Foram adicionados 350µL de *Membrane Binding Solution* e em seguida a mistura transferida para uma coluna posicionada sobre um tubo de coleta para ser incubado à temperatura ambiente por 1 min. A coluna foi então centrifugada a 16.000 x g por 1min (modelo Micromax, ThermolEC) e transferida para um novo tubo de coleta. Foram feitas duas lavagens subsequentes da coluna utilizando-se 700 µL e 500 µL de *Membrane Wash solution* (com etanol 95% adicionado na proporção de 5:1) e centrifugações a 16.000 x g por 1 min para a primeira lavagem e 5 min para a segunda lavagem. O filtrado foi então descartado e a coluna foi centrifugada com a tampa interna da centrífuga aberta a 16.000 x g por 1 min para permitir que todo etanol residual evaporasse. A eluição do DNA foi feita por adição de 50µL de *Nuclease Free Water* diretamente no centro da coluna seguida de incubação por 1 min a temperatura ambiente e centrifugação a 16.000 x g por 1 min. O produto de PCR purificado foi quantificado utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 e armazenado a -20°C até a sua utilização

em reações de sequenciamento ou de ligação para obtenção de vetores recombinantes.

6.10.4 Sequenciamento

Os produtos de PCR foram sequenciados na Plataforma de Sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz, utilizando-se o equipamento ABI PRISM™ 3100 Capillary DNA Sequencer Applied Biosystems. As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com Sanger *et al.*, (1997)⁴² utilizando-se o *Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1 Ready Reaction* (AppliedBiosystems). O sequenciamento de cada paciente foi realizado com oligonucleotídeos senso e antisenso e em duplicata.

As sequências obtidas foram alinhadas com a sequência de referência do gene *RMRP* para verificação das similaridades entre as sequências resultantes do sequenciamento e a sequência do gene, obtida no banco de dados de nucleotídeos do *GeneBank*. Para estas análises foram utilizados os programas *Clone Manager* (versão 9.0) e *BioEdit* (versão 7.1.9.0). As sequências senso e antisenso foram comparadas entre si, assim como o resultado do primeiro e segundo sequenciamentos de cada amostra para reforçar a confiabilidade do resultado molecular.

Os fragmentos sequenciados que apresentavam alterações do tipo duplicação, triplicação ou inserção, eram inseridos em vetor de clonagem apropriados para produto de PCR com o intuito de se realizar discriminação dos alelos, conforme descrito posteriormente (figura 11).

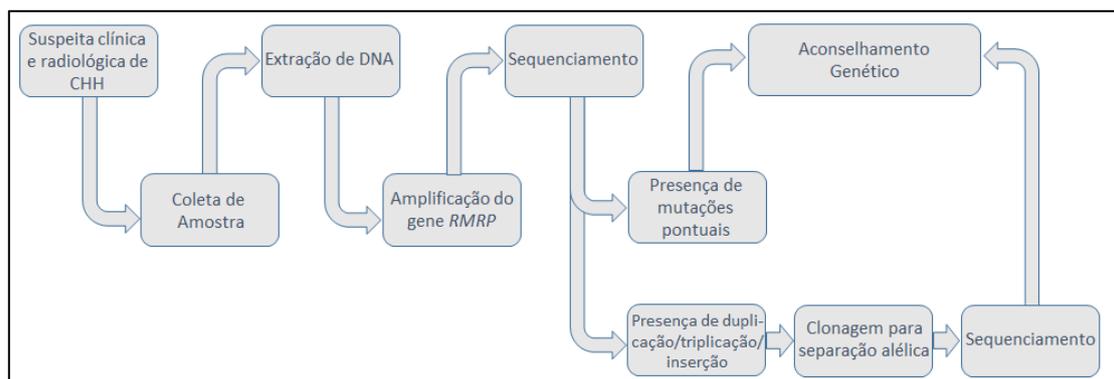


Figura 11: Fluxograma da genotipagem dos pacientes com CHH.

6.11 Discriminação Alélica

6.11.1 Ligações de fragmentos de DNA a vetores de clonagem

Após a purificação dos fragmentos de interesse, o material foi submetido a reações de ligação, seguindo-se a relação molar de inserto/vetor de 3:1, onde foi utilizada uma concentração típica de 50 ng de DNA do vetor. Em todas as construções foi utilizado o plasmídeo pGEM-T (Promega) (figura 12), sistema que destina-se à clonagem direta de produto de PCR.

Para a reação de ligação adicionava-se à mistura inserto/vetor, 5 μ L tampão de ligação rápida 2X (Promega), 1 μ L do vetor pGEM®-T (50ng/ μ L), 1 μ L de T4 – DNA ligase (3 U Weiss/ μ L - Promega), 1-3 μ L do produto de PCR purificado (36 ng) e água destilada para um volume final de 10 μ L. As reações foram incubadas a 4°C durante a noite. Alíquotas de 2 μ L desta reação foram utilizadas para transformar bactérias competentes da cepa DH5 α .

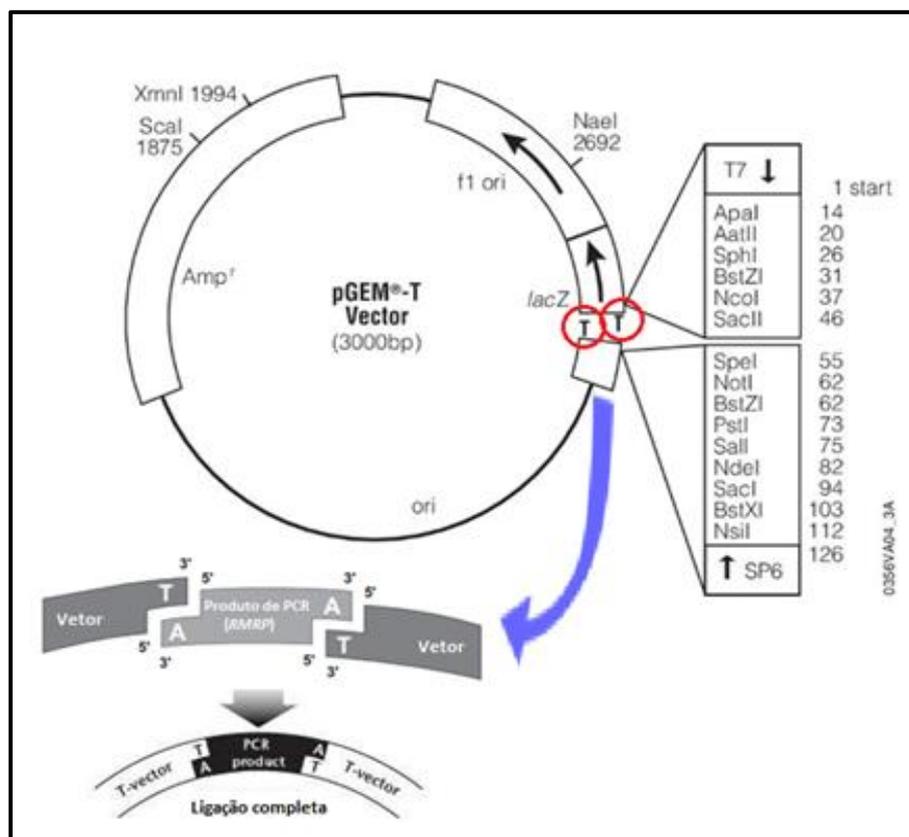


Figura 12: Mapa do vetor comercial utilizado nesse estudo (pGEM T Easy Vector-Promega). A enzima Taq DNA Polimerase adiciona ao final de cada fragmento, um nucleotídeo do tipo adenina (A), complementar ao nucleotídeo timina (T) presente em forma coesiva no vetor, facilitando assim, a ligação entre o DNA alvo e o plasmídeo.

6.11.2 Preparo de células competentes

Uma colônia isolada de *Escherichia coli* da cepa DH5 α (genótipo no apêndice II) foi retirada de uma placa de petri contendo meio de cultura LB (1% bactotripton; 0,5% de extrato de levedura; 1% de NaCl) e 1,5% de bactoagar e incubada em 5 mL de meio de cultura LB a 37°C durante a noite, sob agitação. A cultura obtida no dia seguinte foi diluída 20X em um volume final de 100 mL de meio LB e incubada a 37°C com agitação por aproximadamente 2h. A cada 30 min a cultura foi monitorada em comprimento de onda de 600nm até atingir densidade ótica (D.O.) de 0,2-0,5. A cultura foi incubada em gelo por 10 min e

em então centrifugada a 4.000 x g durante 3 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 10mL de CaCl₂ (100mM) gelado. As células foram incubadas no gelo por 20 min e novamente centrifugada a 4.000 x g durante 3 min. O precipitado foi ressuspendido em 5 mL de uma solução de CaCl₂ (100mM) a 75%, glicerol a 15% e água destilada. Posteriormente, o material foi aliquotado em tubo de microcentrífuga (300µL por tubo) sendo mantido para -80°C até sua utilização.

6.11.3 Transformação das Células Competentes

Para a transformação, 20% da ligação foi incubado em gelo durante 30 min em 100 µL de célula competente. Após o período de incubação as células foram submetidas a um choque térmico, em banho-maria, a 42°C por 90 seg então foram adicionados 900 µL de LB. A mistura foi incubada a 37°C com agitação por 1h (modelo C24KC Incubator Shaker, marca New Brunswick). Cerca de 50 e 100 µL de cada transformação foram transferidos separadamente para placas de cultura descartáveis (Come Grow) contendo 1,5% de ágar, 100µg/mL de ampicilina, 20µg/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-galactosídeo) e 200µg/mL de IPTG (isopropil-1-thio-B-D-galactosídeo) em um volume final de 20 mL de LB. As placas foram mantidas por 16-20h a 37°C em estufa de incubação (modelo 347 CD, marca FANEM) e em seguida transferida para 4°C por 24h, incubação necessária para que eventuais colônias brancas se tornassem azuis⁴³.

6.11.4 Seleção das Colônias de bactérias transformadas

As colônias de bactérias transformadas foram selecionadas através de plaqueamento em meio contendo X-Gal/IPTG, com base na ausência ou presença de atividade do gene Lac Z que codifica a enzima β galactosidase. Esse processo é baseado no mecanismo de α -complementação⁴³. As colônias recombinantes apresentavam coloração branca enquanto que as não recombinantes apresentavam coloração azuis. Em seguida, foram realizadas em reações de PCR para confirmação da presença do plasmídeo de interesse.

6.11.5 PCR de Colônias

Cinco colônias foram transferidas separadamente para microtubos contendo 34,4 μ L de água Milli-Q autoclavada e aquecidas a 99°C por 6 min, para que o DNA dessas colônias fosse utilizado como molde para as reações de PCR. Para isso, a mistura água/bactéria foi mantida em gelo e em seguida foram adicionados 10pmol de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de GoTaq DNA polimerase (Promega), 1.5mM de MgCl₂, 25mM de cada desoxiribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), tampão 1X apropriado para Taq (Promega). As reações foram realizadas em volume final de 50 μ L e incubadas no termociclador (modelo Mater cycler Gradient, marca Eppendorf). O programa de PCR consistia de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 61°C por 30 seg, e 72°C por 45 seg e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2 %dissolvida em TAE 1X contendo 0,5 μ g/ml de brometo de etídeo (Invitrogen). Foi utilizado o padrão de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen) e a corrida eletroforética foi realizada a

5V/cm. Os produtos de PCR foram purificados conforme item 6.10.3 e sequenciados conforme item 6.10.4.

O esquema da clonagem está sumarizado na figura 13.

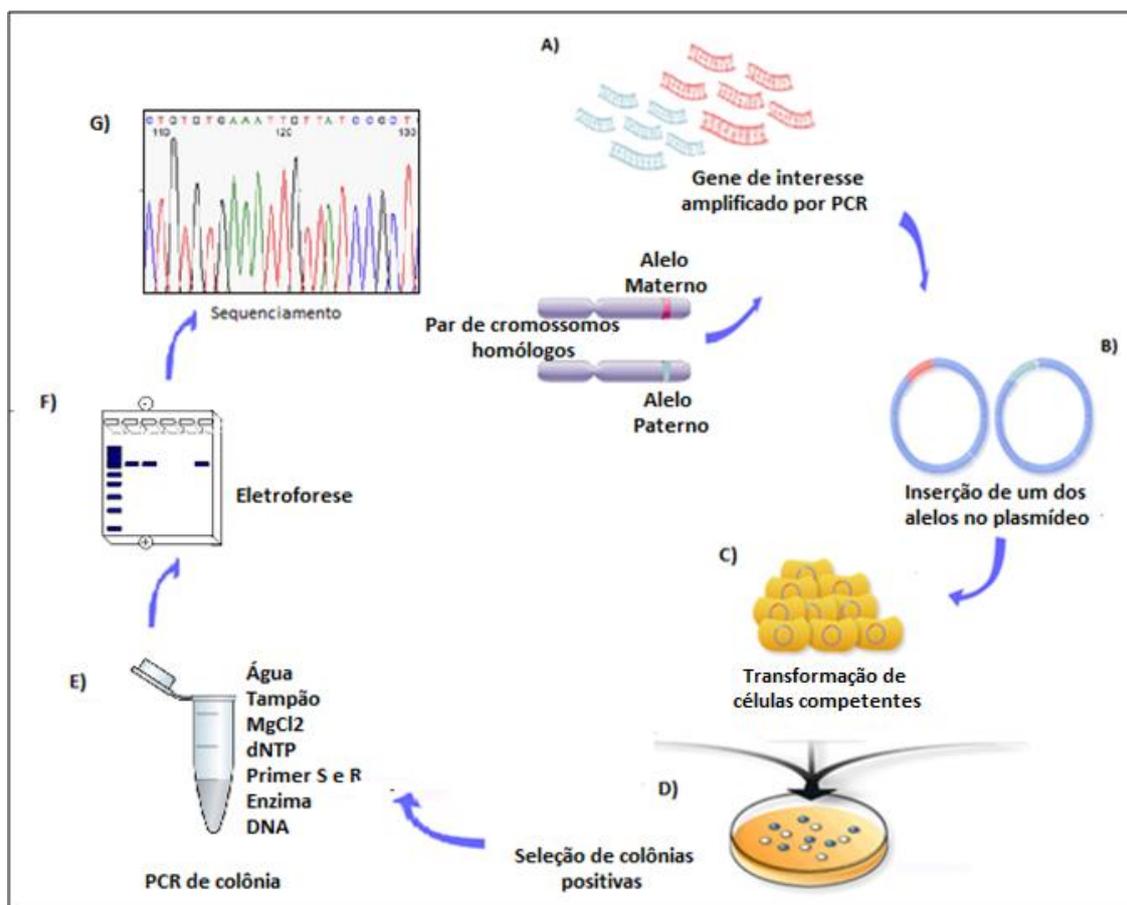


Figura 13: Esquema do processo de clonagem do DNA dos pacientes com mutações do tipo inserção, duplicação ou triplicação para separação alélica. **A)** O gene de interesse (*RMRP*) foi amplificado por PCR convencional. **B)** O produto desta reação foi ligado ao vetor de clonagem (pGEM-T) e em seguida **C)** utilizado para transformar células competentes *E.coli* cepa DH5 α . Neste processo, apenas um dos alelos é incorporado no vetor. Ao final desse processo, **D)** as bactérias que incorporaram o DNA recombinante (colônias positivas) são selecionadas pela coloração branca e azul. **E)** O DNA das colônias brancas foi utilizado como molde na PCR (PCR de colônia). **F)** Dez por cento dos produtos resultantes foram resolvidos em gel de agarose para confirmar as colônias positivas e o restante da reação é purificado e **G)** sequenciado.

6.2 Análises de bioinformática

6.2.1 Análise de Frequência de mutações no gene *RMRP*

Com o intuito de avaliar as mutações encontradas nos pacientes, foi feita uma busca dessas alterações em bancos de dados populacionais. Para isso, foram feitas consultas no banco de dados dbSNP (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism Database*) para verificar a frequência das alterações de interesse.

A frequência de variantes no gene *RMRP* também foi obtida através dos resultados de sequenciamento completo do exoma de 3600 alelos, generosamente cedidos pela empresa brasileira Mendelics de análise genômica. A base de dados dessa empresa contém informações de 1800 indivíduos provenientes de diferentes localidades do Brasil.

6.2.2 Análise Estrutural de Mutações no RNA *RMRP*

Para avaliar a possível patogenicidade das alterações encontradas no gene *RMRP*, foram feitas análises comparativas das sequências obtidas dos sequenciamentos dos pacientes com o modelo de conservação filogenética inicialmente proposto por Bonafé *et al.*, 2015³² e posteriormente aperfeiçoado por Thiel *et al.*, 2007²⁴ que propôs 4 níveis de conservação de acordo com o número de espécies apresentando o mesmo nucleotídeo em uma determinada posição (alto: 10/10, significativo: 8 ou 9/10, moderado: 7 e 6/10 e não conservado: menos de 6 espécies).

Estas análises também foram estendidas as sequências correspondentes aos domínios de ligação a proteínas do complexo riboproteico

e a sequências responsáveis pela formação da estrutura secundária da molécula de RNA MRP.

6.12 Análise de Expressão do gene RMRP e de sua atividade catalítica por RT-qPCR

6.12.1 Obtenção de células mononucleares (CMN) de sangue periférico

As células mononucleares (CMN) foram obtidas através da técnica de separação celular por gradiente de densidade (Ficoll-paque, $d=1077$ g/L, Amersham). As amostras de sangue periférico dos pacientes (2-5 mL) foram enviadas ao Laboratório de Medicina Genômica do IFF em tubos contendo anticoagulante EDTA identificados por código numérico, em um prazo de até 48 horas após sua coleta, seguindo as normas vigentes de biossegurança. O sangue total foi aplicado sobre o meio de gradiente de densidade (GE Healthcare) em temperatura ambiente na proporção 4:3 e centrifugado por 30 min a $400 \times g$ a 20°C em centrífuga clínica (modelo Universal 320R, marca HETTICH) em rotor de ângulo móvel (do inglês, *swinging bucket*) para formação do anel de células mononucleares. As células da interface foram retiradas com auxílio de pipeta e lavadas em 8 mL de tampão PBS por duas vezes (15 min a $450 \times g$ a 20°C). As células foram ressuspensas em 1 mL de em solução salina tamponada (PBS 1X) e contadas em câmara de Neubauer.

6.12.2 Extração de RNA total de células mononucleares do sangue periférico

O RNA total foi extraído a partir de células mononucleares (previamente purificadas por ficoll-paque) de sangue periférico utilizando o

reagente Trizol (Invitrogen). Para isso, após a contagem das CMN na câmara de Neubauer, 10^7 células foram centrifugadas a $400 \times g$ por 5 min (modelo 5424R, marca Eppendorf). Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de Trizol. A solução obtida foi incubada por 5 min à temperatura ambiente para completa dissociação das proteínas e em seguida foram adicionados 200 μ L de Clorofórmio (Merck). A solução foi homogeneizada vigorosamente por inversão e após uma incubação por 2 min à temperatura ambiente, essa solução foi centrifugada a $12.000 \times g$ por 15 min a 4°C . Ao término da centrifugação, foi obtida uma mistura contendo 3 fases: uma inferior de coloração rosa (fenol-clorofórmio), uma interfase (proteínas) e uma superior, aquosa e incolor, a qual contém o RNA. A fase superior foi transferida para um novo tubo livre de RNase, onde foram adicionados 500 μ L de isopropanol (Merck). A solução foi homogeneizada e incubada por 10 min à temperatura ambiente e em seguida, submetida a centrifugação a $12.000 \times g$ por 10 min a 4°C . Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão. O pellet foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado e centrifugado a $7500 \times g$ por 5 min. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado com uma pipeta e o precipitado ressuspenso em água destilada contendo 0,01% do inibidor de RNase de Dietilpirocarbonato (DEPC).

Após a extração, o RNA foi quantificado pelo método espectrofométrico no Nanodrop 2000 (Termo Scientific) e a qualidade do RNA analisada em gel de agarose 0,8% dissolvida em TAE 1X (0,04M Tris-acetato, 0,001M EDTA, água contendo 0,01% de Dietilpirocarbonato (DEPC), acrescido de 0,5 μ g/ml de brometo de etídeo (Invitrogen). A corrida eletroforética foi realizada a 5V/cm.

6.12.3 Tratamento com DNase

O RNA extraído por trizol foi submetido a tratamento com DNase I livre de RNase (New EnglandBiosciences) para degradar qualquer contaminação por DNA genômico. Em um microtubo contendo 1-2 µg de RNA, foi adicionado 1 µL de tampão de reação da DNase 10X (New EnglandBiosciences), 1 U de DNase I (2 U/µL) e o volume foi completado até 9 µL com água tratada com DEPC. A mistura foi incubada a 37°C por 10 min. Em seguida, foi adicionado 1 µL de EDTA (0,5 M) e o tubo incubado a 75°C por 10 min para inativação da enzima.

6.13.4 Síntese de cDNA (DNA complementar)

A partir de 1 µg do RNA extraído (item 6.11.2) das CMN, foi sintetizada a fita de DNA complementar utilizando-se a enzima *SuperScriptII* (Invitrogen) e oligonucleotídeos randômicos (Invitrogen).

A síntese de cDNA foi realizada em um tubo de microcentrífuga, adicionando-se 1 µL de oligonucleotídeo randômico (Invitrogen) na concentração de 200ng/µL, 1 µL de mix de dNTP na concentração de 10 mM, 1-10 µL de RNA e água contendo 0,01% Dietilpirocarbonato (DEPC) em volume final de 12 µL. A mistura foi incubada a 65°C por 5 min e colocada em gelo imediatamente após a incubação. Logo após, foram adicionados 4 µL de tampão apropriado 5X para SuperScript II (Invitrogen), 2 µL de 0.1 M DTT e 1 µL de água tratada com DEPC. O conteúdo foi homogeneizado gentilmente por fluxo e refluxo e incubado por 2 min a 25°C. Em seguida, foi adicionado 1 µL (200 unidades) de SuperScript™ II RT e novamente homogeneizado. O tubo foi

incubado a 25°C por 10 min, a 42°C por 50 min e então a 70°C por 15 min para inativação da reação.

6.14.5 Análise de expressão por PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real foi padronizada, utilizando o equipamento ABI 7500 Fast (AppliedBiosystems), para analisar e quantificar a expressão do gene *RMRP*, dos genes *ciclina B2 (CCNB2)* e *5.8S rRNA*, alvos conhecidos da função de clivagem do gene *RMRP*, visando inferir o estado funcional do RNA MRP. Para isto, dois diferentes conjuntos de oligonucleotídeos foram desenhados utilizando os *softwares* Clone Manager v.9.2e Primer3 Plus com base nas sequências do RNA mensageiro disponíveis no banco de dados GenBank (www.ncbi.gov). Após a seleção dos iniciadores, foi feita uma análise utilizando a ferramenta Primer BLAST disponível em NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para analisar a especificidade dos iniciadores. Para a normalização dos RT-qPCR, cinco pares de iniciadores para controles endógenos já padronizados foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Oncovirologia do CEMO/INCA: HPRTI, GPI, GAPDH, GUSB e HMBS. Para determinar os genes normalizadores mais eficientes, foram utilizados os algoritmos matemáticos geNorm⁴⁴ e Normfinder⁴⁵.

As reações foram feitas com 20 ng de cDNA, 7,5 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems), 0,2-0,6 µM de cada oligonucleotídeo (tabela x). As reações foram realizadas em volume final de 15 µL nas seguintes condições de ciclagem: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, e 40 ciclos de duas etapas, sendo uma de 15 seg a 95°C e uma de 1 min a 60°C. As

curvas de dissociação dos produtos finais foram analisadas para avaliar a especificidade das amplificações. As RT-qPCRs foram normalizadas em relação aos níveis de transcritos de *GAPDH* e *GPI*. A quantificação das variações dos níveis de mRNA foram baseadas em Livak e Schmittgen(2001)⁴⁶ e Pfaffl⁴⁷. Previamente ao estudo clínico, as eficiências de amplificação do cDNA do gene alvo e do gene de referência foram determinadas por curva de eficiência de amplificação, visando eficiências similares (entre 90% e 100%) para todos os genes. As quantificações, foram determinadas pelo cálculo do DDCt. Os produtos das amplificações foram entre 80 a 220 pares de bases. Todas as reações foram feitas em triplicata. As leituras das fluorescências foram realizadas pelo 7500 *Software*. Testes estatísticos não foram realizados devido quantidade reduzida de amostras.

Todos os iniciadores usados e as respectivas concentrações na reação estão descritos na tabela abaixo (tabela 1).

Tabela 1: Tabela de iniciadores utilizados para avaliar os alvos *RMRP*, 5.8S clivado, 5.8S não clivado, *GAPDH* e *GPI*.

Primer	Técnica	Sequência	Tamanho do Fragmento	Concentração na reação
CHH	PCR convencional	F: 5'GCCACAATGCCTCTGAAAGC3' F: 5'GTTCTTGGCCTTGCTATGAAG3'	719 pb	200 µM
<i>RMRP</i>	RT-qPCR	F: 5'TGCTGAAGGCCTGTATCC3' F: 5'CTGCCTGCGTAACTAGAG3'	213 pb	300 µM
5.8 S não Clivado	RT-qPCR	F: 5'TGTGAAACCTCCGACCCCTCT3' R: 5'CGAGTGATCCACCGCTAAGAGTCGTA3'	194 pb	200 µM
<i>GAPDH</i>	RT-qPCR	F:5'AATCCCATCACCATCTTCCA3' R: 5'TGGA CTCCACGACGTA CTCA3'	82 pb	200 µM
<i>GPI</i>	RT-qPCR	F: 5'GAGGACGCTACTCGCTGTG3' F: 5'CTGCTCGAAGTTGTCAAACC3'	74 pb	300 µM

7. RESULTADOS

7.1 Pacientes e características clínicas

Este estudo foi realizado com 20 pacientes brasileiros diagnosticados clínica e radiologicamente com CHH encaminhados pelo serviço de Genética Médica do Instituto Nacional da Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira e pelas instituições coparticipantes (figuras 10 e 11 e Apêndice 2).

Em nossa coorte, 5 pacientes (25%) são provenientes do Rio de Janeiro, 7 (35%) do Rio Grande do Sul, 5 (25%) de São Paulo, 2 (10%) da Bahia, 1 (5%) de Pernambuco. Duas famílias apresentam a recorrência da síndrome em dois irmãos. Em apenas uma dessas famílias se teve acesso à amostra de ambos os indivíduos afetados (pacientes 10-11). Além disso, uma família apresentou consanguinidade com grau de parentesco de primos em primeiro grau (paciente 19).

A coleta dos dados clínicos foi feita através de questionário clínico (apêndice 3). Dos 20 pacientes, três tiveram interrupção do seguimento ambulatorial e não foi possível coletar todos os dados clínicos. As informações obtidas dos 20 pacientes estão sumarizadas na tabela 2. Fotos clínicas e radiografias disponíveis também são apresentadas nas figuras 14 e 15.

Tabela 2: Principais características clínicas dos pacientes coletadas a partir de questionários clínicos (Apêndice 1)

Paciente	Gênero	Procedência	Sintomas Iniciais	Idade ao Diagnóstico	Histórico Familiar	Ancestralidade	Intercorrências e Comorbidades	Idade atual/ Óbito
1	M	RJ	Baixa estatura	3a e 6m	ND	Europeu latino/ Ameríndio/ Afro-descendência	Várias otites médias	4a
2	F	RJ	Baixa estatura, cabelos finos e/ou esparsos	6a e 4m	ND	Europeu latino /Ameríndio/ Afro-descendência	Várias	7a
3	M	RJ	Baixa estatura	8a e 10m	ND	Europeu latino/Europeu não latino	Não	9a e 7m
4	M	RJ	Baixa estatura, cabelos finos e/ou esparsos, frouxidão ligamentar	3a e 5m	ND	Brasileiros de ambos os lados	Bronquite recorrente	4a e 6m
5	M	RS	Baixa estatura	2a	ND	Europeu não latino	ND	2a e 7m
6	M	SP	Baixa estatura	2a e 8m	ND	Europeu não latino/ Europeu Latino	Várias	ND
7	F	SP	Baixa estatura	9a	ND	Europeu latino /Ameríndio/ Afro-descendência	Não	ND
8	F	SP	Baixa estatura	8a	ND	Europeu Latino	Não	9a e 8m
9	F	SP	Baixa estatura	ND	ND	ND	ND	ND
10	M	BA	Baixa estatura e cabelos esparsos	9a e 5m	Irmã afetada (paciente 11)	ND	ND	ND

Paciente	Gênero	Procedência	Sintomas Iniciais	Idade ao Diagnóstico	Histórico Familiar	Ancestralidade	Intercorrências e Comorbidades	Idade atual/ Óbito
11	F	BA	Baixa estatura	12a e 7m	Irmão afetado (paciente 10)	ND	ND	ND
12	M	PE	Baixa estatura	9a	ND	Europeu latino/Ameríndio	Não	9a e 3m
13	M	SP	Baixa estatura	9a	ND	Europeu latino	Pneumonia (1 caso) / resfriado comum	10a e 9m
14	F	SP	Baixa estatura	ND	ND	ND	ND	3a e 3m
15	M	RS	Baixa estatura, cabelos finos e/ou esparsos, frouxidão ligamentar	9a e 3m	ND	ND	Pneumonia recorrente/ Linfoma Não Hodgkin	Óbito (Linfoma)
16	M	RS	Baixa estatura, cabelos finos e/ou esparsos	14a	ND	Europeu Latino/Ameríndio	ND	19a e 3m
17	M	RS	Baixa estatura, cabelos finos e/ou esparsos	1a e 3m	ND	Afrodescendente	Não	7a e 10m
18	M	RS	Baixa estatura	ND	Irmã afetada	ND	ND	25a e 5m
19	M	RS	Baixa estatura, cabelos finos e/ou esparsos, frouxidão ligamentar	2a	Consanguinidade	Europeu não latino	Não	2a e 9m
20	F	RS	Baixa estatura, cabelos finos e/ou esparsos, frouxidão ligamentar	9a e 8m	ND	Europeu não latino	Não	10a e 3m

Legenda: A: anos; F: Feminino; M: Masculino; cm: centímetros; ND: não disponível

O diagnóstico de CHH foi estabelecido baseado nas características clínicas e radiológicas clássicas, baixa estatura e alterações metafisárias. Foram observadas evidência de displasia metafisária com irregularidade e serrilhamento das bordas metafisárias do fêmur nesses pacientes. Além disso, encurtamento, invaginação e esclerose das metáfises metacarpianas e deformidades cônicas das metáfises falangianas também estiveram presentes nos pacientes. Cabelo fino e esparso foi documentado em 8 pacientes (40%). Outro dado clínico interessante foi a observação do tamanho reduzido das mãos e pés.



Figura 14: Fotos clínicas de 11 pacientes do estudo. Linha superior: paciente 1-6. Linha inferior: paciente 10-11, paciente 16-17, paciente 19.

Baixa estatura, muito abaixo do percentil 5, foi documentado na maioria dos pacientes, aos quais se teve acesso aos dados clínicos atuais (figura 16-18). Apenas a paciente 20 apresentou uma altura limítrofe, dentro do percentil 5 de estatura para sua idade.

Um histórico de infecções e outras comorbidades foi documentado em cinco pacientes (1, 2, 4, 6 e 15). O paciente 15 desenvolveu linfoma não-Hodgkin aos 12 anos e faleceu poucos meses após o transplante de medula óssea.



Figura 15: A) Da esquerda para a direita: radiografias de joelhos e mãos dos pacientes 2, 3, 4,10 e 11. **B)** Da esquerda para a direita: radiografias de joelhos e mãos (quando disponíveis) dos pacientes 15, 17, 19 e 20.

Nascimento aos 36 meses: meninos

Gráfico de desenvolvimento de meninos para cálculo de percentil de comprimento e peso por idade

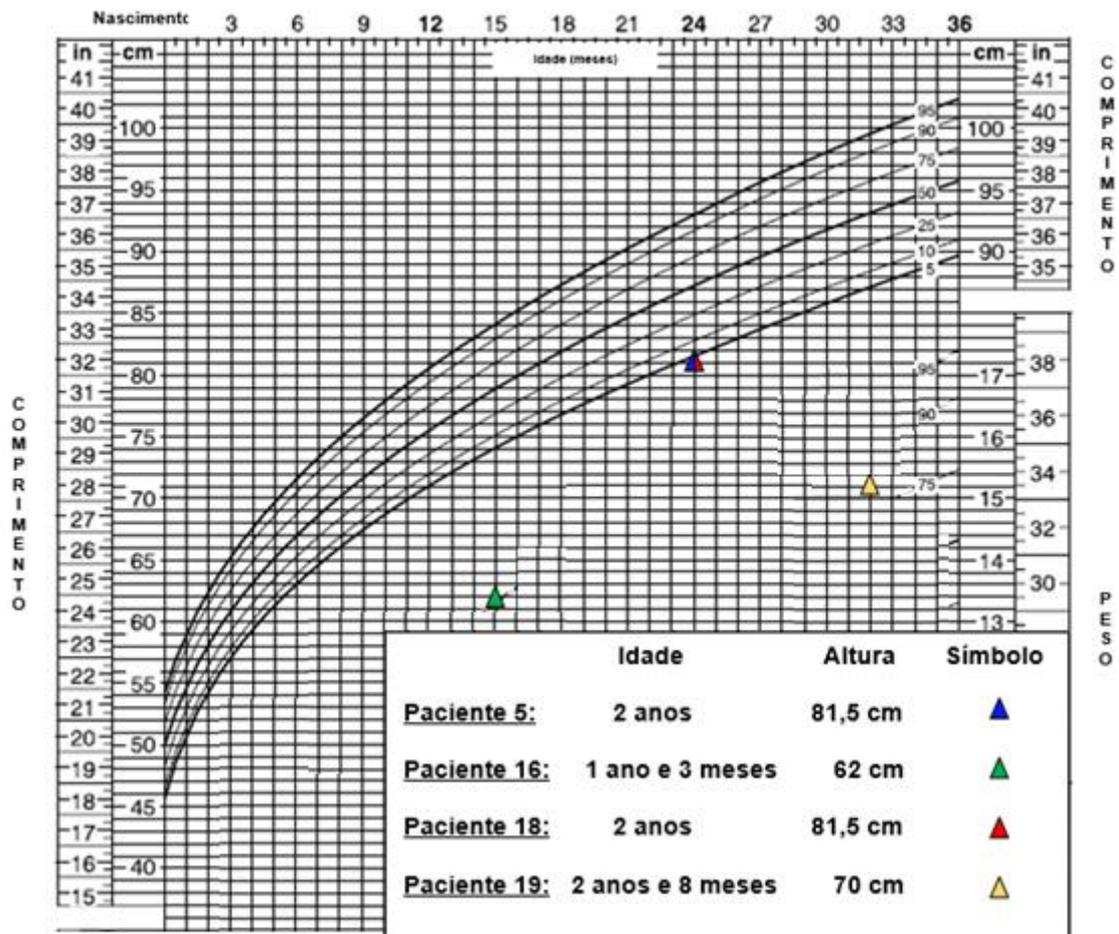


Figura 16: Gráfico de percentis de comprimento e peso por idade para meninos do nascimento-36 meses. Triângulos coloridos representam a altura dos pacientes em sua respectiva idade em sua última consulta médica (gráfico adaptado da OMS/2000).

2 a 20 anos: meninos

Gráfico de desenvolvimento de meninos para cálculo de percentil de altura e peso por idade

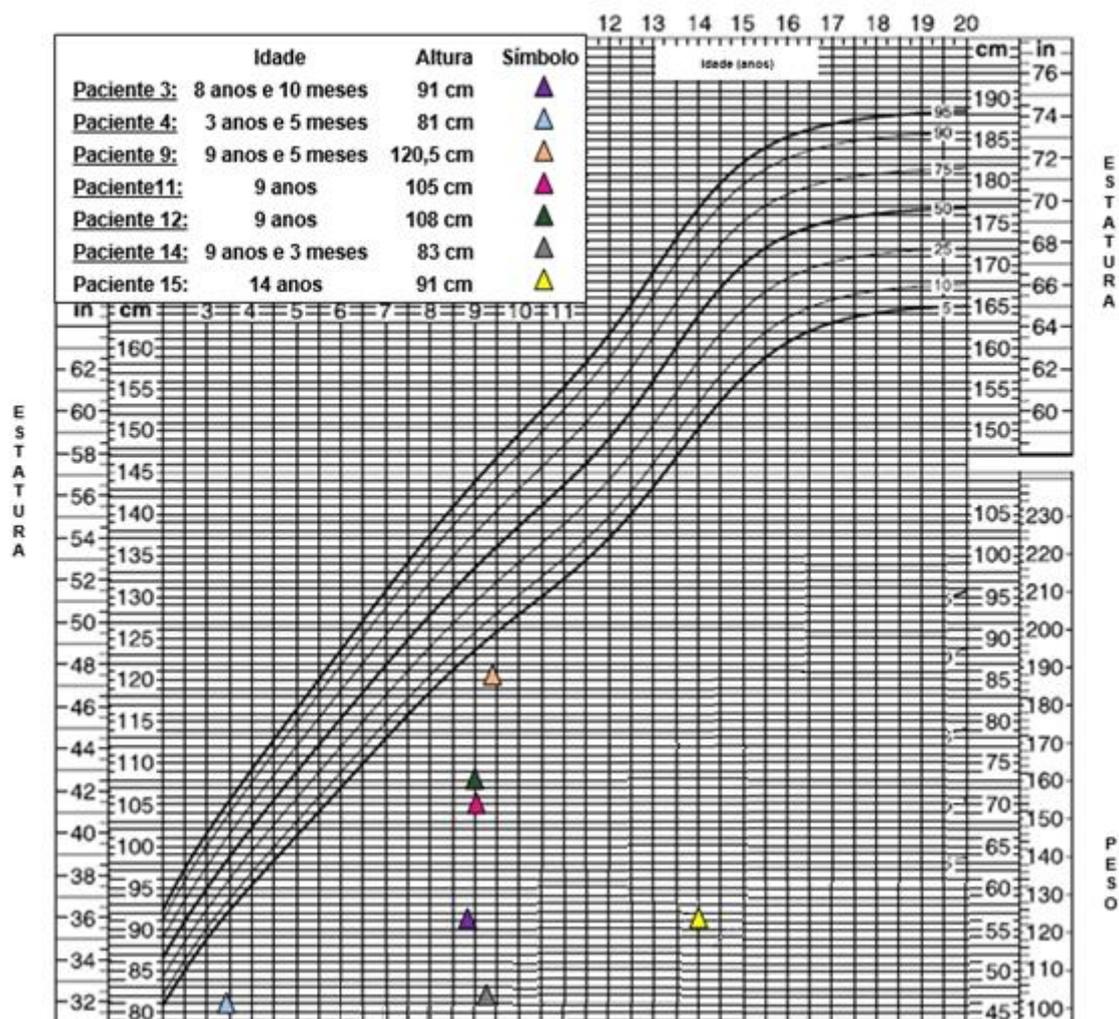


Figura 17: Gráfico de percentis de estatura e peso por idade para meninos de 2-20 anos, Triângulos coloridos representam a altura dos pacientes em sua respectiva idade em sua última consulta médica (gráfico adaptado da OMS/2000).

2 a 20 anos: meninas

Gráfico de desenvolvimento de meninas para cálculo de percentil de altura e peso por idade

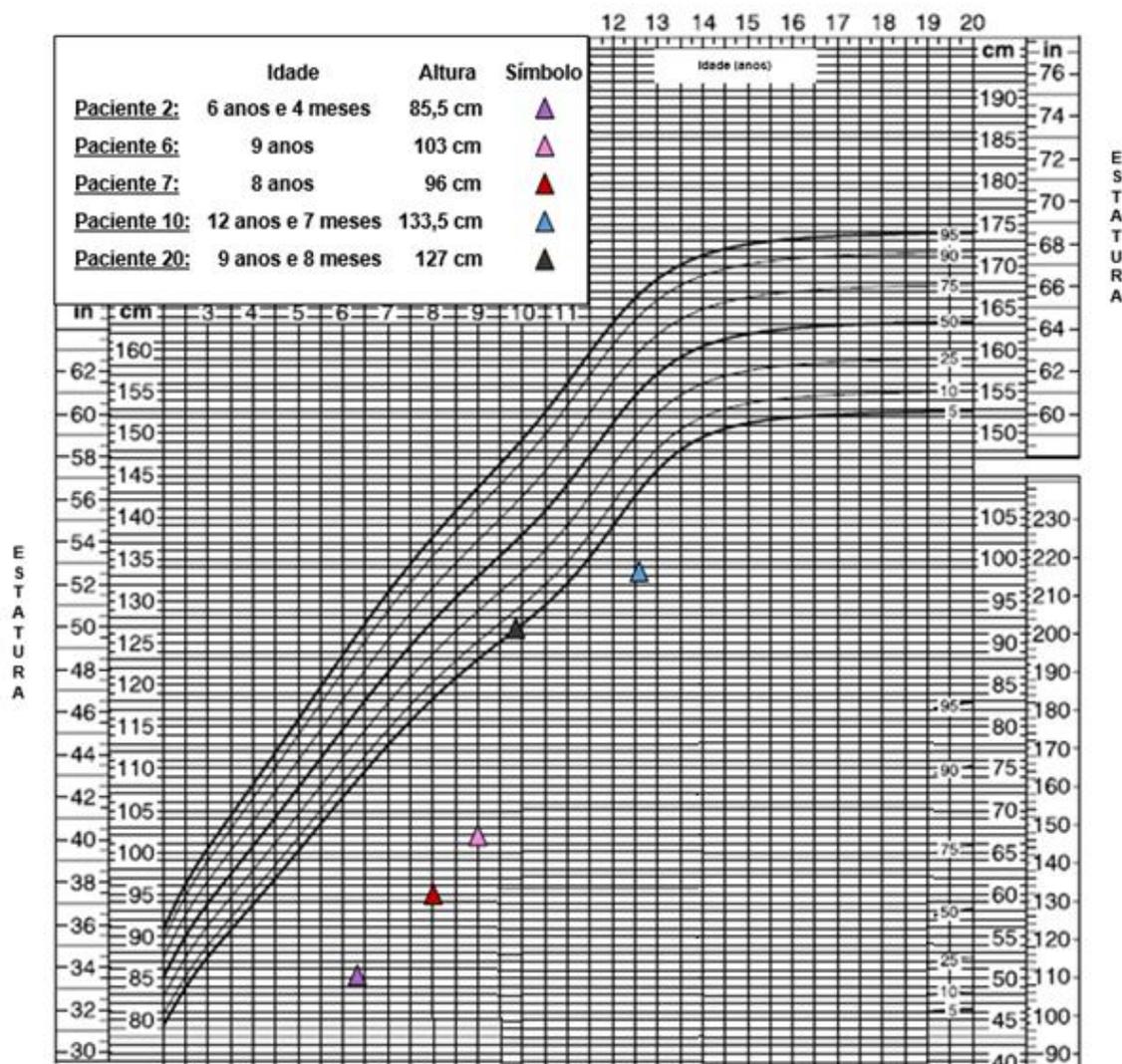


Figura 18: Gráfico de percentis de estatura e peso por idade para meninas de 2-20 anos, Triângulos coloridos representam a altura das pacientes em sua respectiva idade em sua última consulta médica (gráfico adaptado da OMS/2000).

7.2 Análise de mutações no gene *RMRP*

Foram obtidas vinte amostras de sangue de pacientes com suspeita clínica e radiológica de CHH, sendo cinco provenientes do IFF, oito da UNICAMP e sete do HCPA. Também foram recebidas vinte e seis amostras de progenitores de 13 pacientes analisados, totalizando quarenta e seis amostras recebidas e processadas.

O DNA genômico foi extraído a partir das amostras de sangue e em seguida, a região promotora e a região transcrita do gene *RMRP* foram amplificadas pela técnica de PCR (figura 19).

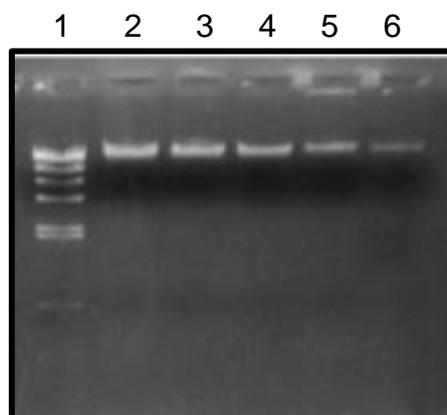


Figura 19: Corrida eletroforética representativa de DNA genômico extraído a partir de sangue periférico pelo método de salting out. Poço 1: padrão de peso molecular λ HIND III; poço 2-6: amostra de DNA genômico dos pacientes paciente 1-5, respectivamente.

As amostras foram sequenciadas pelo método de Sanger. Após o sequenciamento inicial das 20 amostras, 15 pacientes (1-6, 8, 11-15, 16, 17, 19, 20) apresentaram eletroferograma compatível com a presença de mutações do tipo duplicação, triplicação ou inserção (figura 20 A e B).

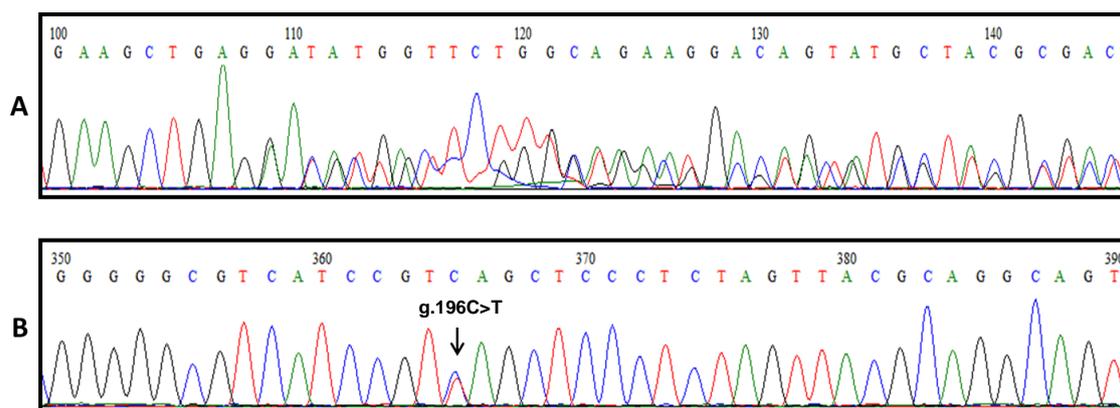


Figura 20: Eletroferograma representativo do sequenciamento da amostra do paciente 4 com mutações em heterozigose composta, mostrando **A**) uma duplicação na região promotora do gene *RMRP* (g.-22_-14dup9(TACTCTGTG) e **B**) uma substituição de uma única base (g.196C>T) em heterozigose na região transcrita de *RMRP*.

Essas amostras foram clonadas para a separação alélica e sequenciadas novamente (figuras 21 e 22 A-D).

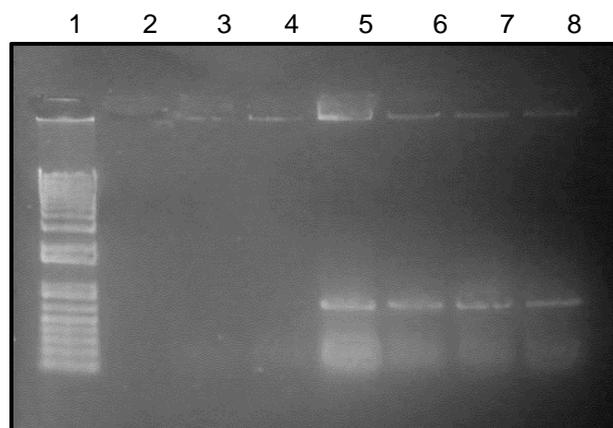


Figura 21: Foto representativa do gel de agarose de 1,2% do PCR de colônia realizado com a amostra da paciente 4. Poço 1: 1 Kb Plus, poço 2: Branco; poços 3 e 4: colônias que não continham o plasmídeo recombinante (negativas); poços 5-8: colônias que continham o plasmídeo recombinante (positivas).

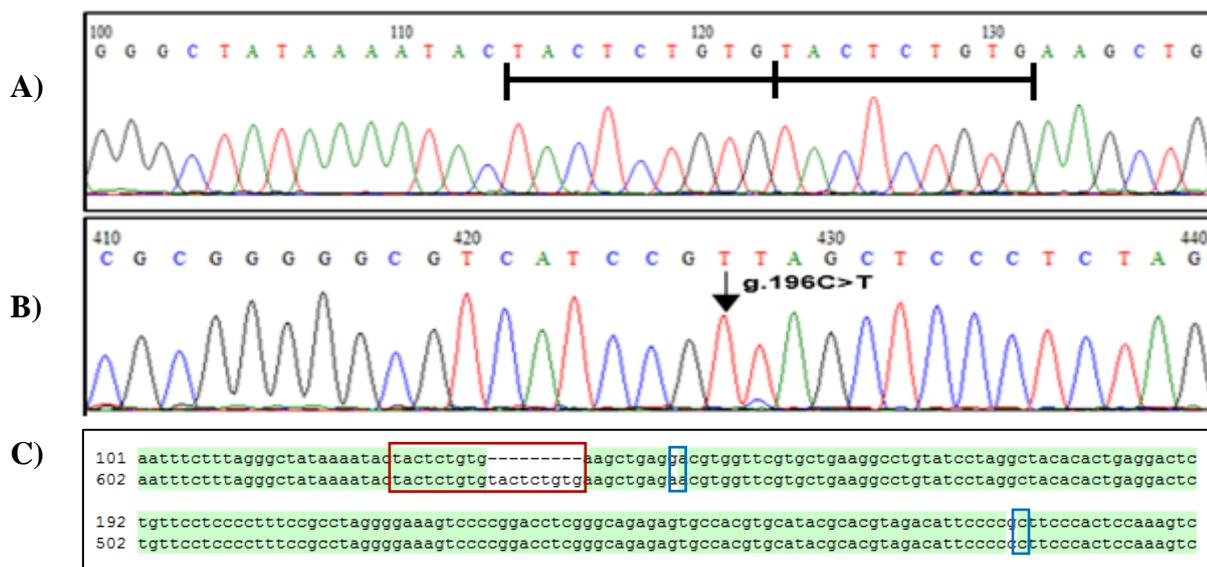


Figura 22: **A)** Eletroferograma representativo do sequenciamento após a clonagem para separação dos alelos do paciente 4, mostrando uma duplicação de 9 pb no promotor (g. -22_-14dup9(TACTCTGTG) combinada a uma **B)** mutação pontual na região transcrita do gene *RMRP*(g.196C>T). **C)** Alinhamento representativo da sequência de referência do gene *RMRP* com a sequência obtida pelo sequenciamento da mesma amostra clonada. O retângulo vermelho indica a região duplicada que não ocorre na sequência de referência (representado pelo tracejado). Polimorfismos estão marcados pelos retângulos azuis.

As 5 amostras (pacientes 7, 9, 10, 15 e 18) restantes foram analisadas imediatamente, pois apresentavam apenas mutações pontuais (figura 23).

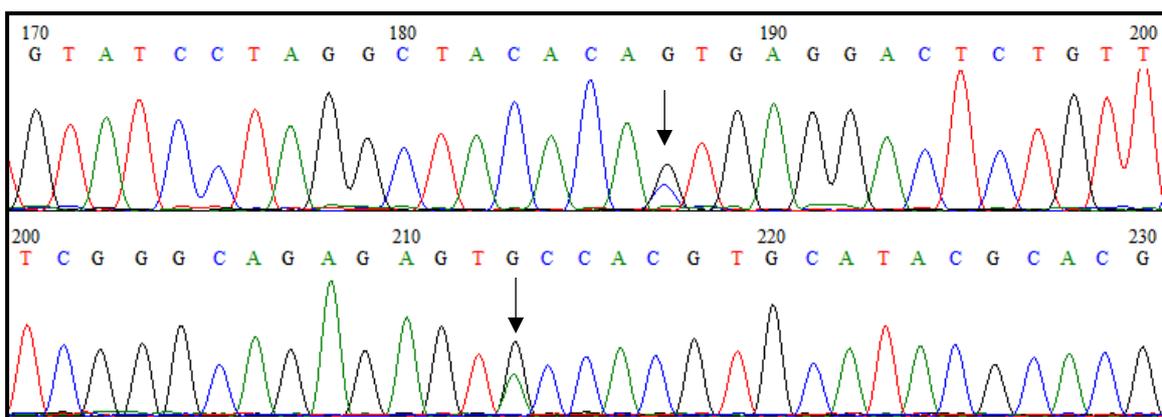


Figura 23: Eletroferograma representativo do sequenciamento da amostra de paciente 19 com mutações em heterozigose composta na região transcrita (g.36G>T e g.97G>A) de *RMRP*.

A amostra do paciente 16 apresentou duas bandas no gel de agarose (figura 24) após a amplificação por PCR, evidenciando uma possível grande duplicação/inserção em um dos alelos. Por isso, a amostra desse paciente foi clonada diretamente antes do sequenciamento.

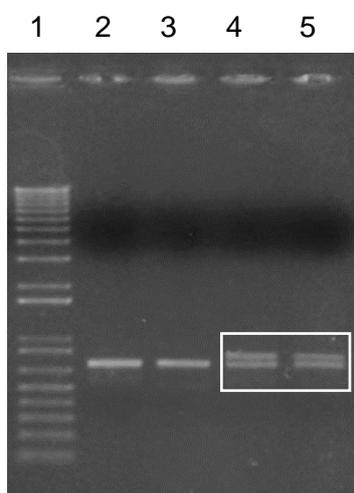


Figura 24: Gel de agarose de 1,2% do PCR da amostra do paciente 16. Poço 1: Padrão de peso molecular 1 Kb Plus, poço 2-3: PCR da amostra do paciente 15; poço 4-5: PCR da amostra do paciente 15.

Análise dos fragmentos permitiu identificar alterações em heterozigose composta nos vinte pacientes analisados. A sumarização dos resultados está descrita na tabela 3.

Do total das 20 amostras de pacientes, onze apresentaram combinações de mutações do tipo duplicações, triplicações ou inserções na região promotora em um dos alelos e mutações pontuais na região transcrita do outro alelo (55%). Em dois pacientes foram observadas uma duplicação na região transcrita em um dos alelos e uma duplicação na região promotora do outro alelo (10%). Sete pacientes apresentaram apenas mutações na região transcrita de cada um dos alelos (35%).

Tabela 3: Sumarização dos resultados das análises do gene *RMRP* dos pacientes e os respectivos domínios referentes ao RNA. Mutações não descritas estão assinaladas em negrito e sublinhado.

Identificação da Amostra	Instituição de Origem	Alelo 1	Domínio	Alelo 2	Domínio
Paciente 1	IFF	<u>g.-21_-2dup20(ACTCTGTGAAGCTGAGGACG)</u>	Promotor	g.196C>T	-
Paciente 2	IFF	g.-25_-4dup22(TACTACTCTGTGAAGCTGAGAA)	Promotor	g.196C>T	-
Paciente 3	IFF	<u>g.-19_-3trip17(TCTGTGAAGCTGAGGAC)</u>	Promotor	g.194 G>A	-
Paciente 4	IFF	g.-22_-14dup9(TACTCTGTG)	Promotor	g.196C>T	-
Paciente 5	IFF	<u>g.-24_-15dup10(ACTACTCTGT)</u>	Promotor	g.97_98dup(TG)	-
Paciente 6	IFF	g.-25_-4dup22(TACTACTCTGTGAAGCTGAGAA)	Promotor	g.196C>T	-
Paciente 7	UNICAMP	g.-19_-3dup17(TCTGTGAAGCTGAGGAC)	Promotor	g.181G>A	-
Paciente 8	UNICAMP	<u>g.6G>T</u>	P1	g.196C>T	-
Paciente 9	UNICAMP	<u>g.-20_+3dup23(CTCTGTGAAGCTGAGAACGTGGT)</u>	Promotor	g.5C>T	P1
Paciente 10	UNICAMP	<u>g.36C>G</u>	P3	<u>g.252A>C</u>	-
Paciente 11	UNICAMP	<u>g.36C>G</u>	P3	<u>g.252A>C</u>	-
Paciente 12	UNICAMP	g.-13_+1dup14(AAGCTGAGGACGTG)	Promotor	g.196C>T	-
Paciente 13	UNICAMP	<u>g.-8_-7ins20(GGGACTACTCTGTGAAGCTG)</u>	Promotor	g.196C>T	-
Paciente 14	UNICAMP	g.-25_-4dup22(TACTACTCTGTGAAGCTGAGAA)	Promotor	g.97_98dup(TG)	P8
Paciente 15	HCPA	g.97_98dup(TG)	P8	g.147G>C	P12
Paciente 16	HCPA	<u>g.6G>T</u>	P1	g.196C>T	-
Paciente 17	HCPA	<u>g.-22_-1dup20(TACTCTGTGAAGCTGAGAAC) + g.261_331dup70</u>	Promotor + Pós-transcrito	g.196C>T	-
Paciente 18	HCPA	g.-25_-4dup22(TACTACTCTGTGAAGCTGAGAA)	Promotor	g.196C>T	-
Paciente 19	HCPA	<u>g.36C>G</u>	P3	g.98G>A	P8
Paciente 20	HCPA	<u>g.69_70ins1(T)</u>	-	g.196C>T	-

Foram encontradas vinte e duas mutações diferentes, das quais onze ainda não foram descritas na literatura. Dentre essas não descritas, 6 ocorrem no promotor, 4 ocorrem na região transcrita e 1 se inicia no final da região transcrita e se estende 63 pb após o seu término. No total, foram contabilizados 6 tipos de duplicações, 1 tipo de triplicação, 1 tipo de inserção e 3 tipos de mutações pontuais não descritas anteriormente (tabela 3, texto em negrito e sublinhado). Além disso, concomitante às mutações, também foram observados sete tipos de alterações não patogênicas já descritas na literatura (g.-57T>C, g.-55A>G, g.-47C>A, g.-5G>A, g.128G>C, g.157G>C e g.178C>T).

As frequências de alterações no gene *RMRP* cedidas pela empresa Mendelics estão descritas na tabela 4 e a frequência obtidas do banco de dados dbSNP estão apontadas na tabela 5.

Tabela 4: Frequência das mutações na região transcrita encontradas nos pacientes segundo o banco de dados dbSNP.

Alteração	Posição Genômica	RS	Alelos RefSNP (Fita senso)	Frequência/MAF
g.5C>T	35658014 (GRCh38.p2)	rs772443941	A/G	A=0.0003/3 (ExAC)
g.6G>T	35658013 (GRCh38.p2)	rs552002151	C/T	T=0.0001/1 (ExAC) T=0.0004/2 (1000 Genomes)
g.36C>G	35657983 (GRCh38.p2)	rs549085067	C/G/T	T=0.0004/4 (ExAC) C=0.0002/1 (1000 Genomes)
g.98G>A/ 97_98dup2(TG)	35657921:35657922	rs748911449	ACT	A=0.00009/1 (ExAC)
g.147G>C	35657872 (GRCh38.p2)	rs753874439	C/G/T	T=0.00009/1 (ExAC)
g.181G>A	ND	ND	ND	ND
g.194G>A	35657825 (GRCh38.p2)	rs761398394	C/T	T=0.0002/2 (ExAC)
g.196C>T	35657823: (GRCh38.p2)	rs796065036	ND	ND
g.252A>C	35657767 RCh38.p2)	rs748268184	C/T	C=0.0001/1 (ExAC)

Tabela 5: Tabela de frequências alélicas (*RMRP*) cedidas pela empresa Mendelics. Alterações já descritas como polimorfismos estão marcadas em azul, enquanto que as alterações conhecidamente patogênicas estão assinaladas em vermelho.

Alteração	Posição genômica (Fita antisense)	Frequência
g.178G>A (C>T)	9_35657838_G_A	0.1242
g.157C>G (G>C)	9_35657859_C_G	0.1239
g.127C>G (G>C)	9_35657888_C_G	0.0072
g.196G>A (C>T)	9_35657820_G_A	0.0003
g.181C>G (G>C)	9_35657835_C_G	0.0003

ND: Não disponível; RS (RefSNP): SNP de referência; MAF: (Minor Allele Frequency); ExAC: (*Exome Aggregation Consortium*) e 1000 Genomas (*1000 genomes*): banco de dados de alterações genéticas.

7.3 Análises computacionais de mutações

As mutações identificadas nos pacientes foram comparativamente analisadas, com o intuito de verificar se estas residiam na região regulatória, podendo comprometer a expressão do RNA *RMRP* ou em regiões conservadas ao longo da escala filogenética, pois regiões conservadas entre diferentes espécies sugerem uma conservação de função biológica. Também foi investigada a presença de alterações em regiões do RNA importantes para a sua ligação com proteínas do complexo *RMRP*, além de regiões importantes para a formação da estrutura tridimensional do RNA *RMRP*, que poderiam, por conseguinte, comprometer a sua função.

Foram observadas 10 mutações diferentes na região regulatória do gene *RMRP*, que estavam localizadas entre as posições g.-26 e g.+2, onde a maioria dos nucleotídeos não é conservada (figura 18). Já na região transcrita, foram identificados 12 tipos diferentes de alterações, todas ocorrendo em regiões envolvendo sequências altamente ou significativamente conservadas (figura 25).

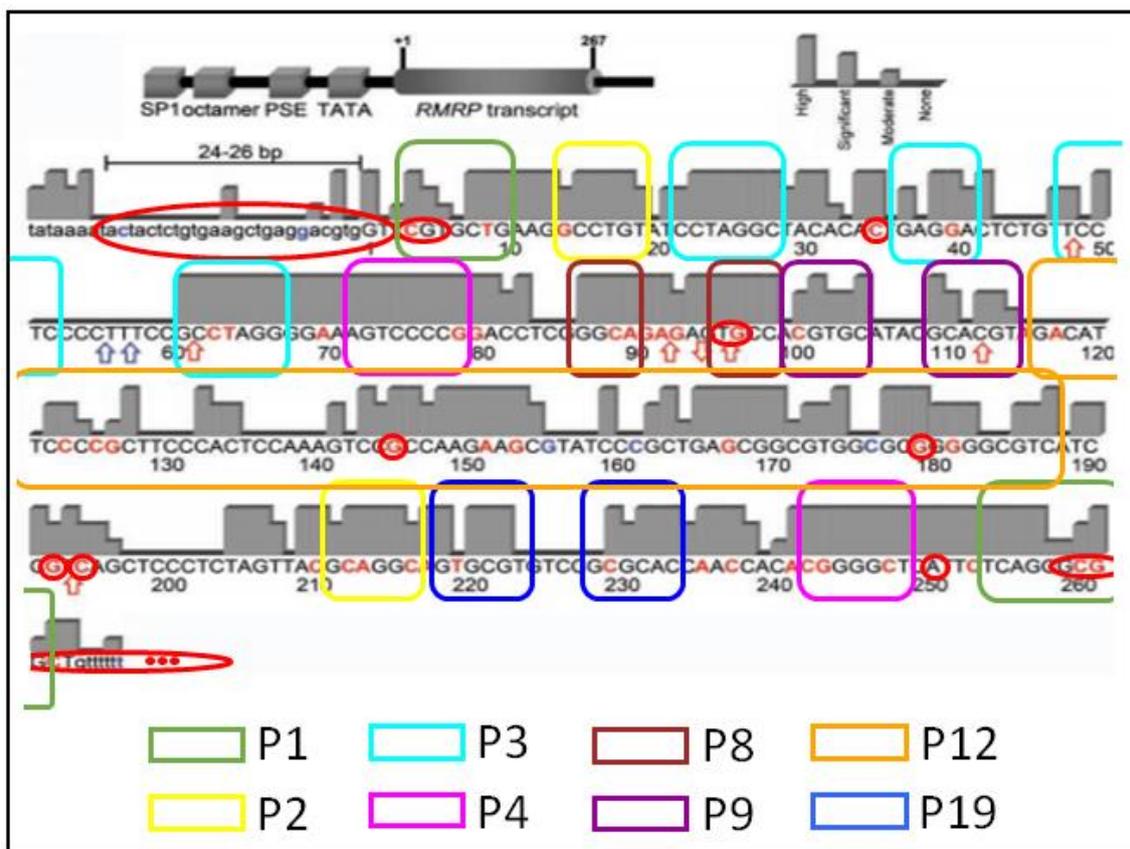


Figura 25: Marcação das mutações encontradas nos pacientes (círculos vermelhos) no mapa de conservação entre espécies e dos respectivos domínios de ligação de proteína P1-P4, P8 e 9, P12 e P19 (retângulos pontilhados) no RNA *RMRP*. Nucleotídeos classificados quanto à sua conservação entre 10 espécies (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Oryctolagus cuniculus*, *canis familiaris*, *Dasyus novemcinctus*, *Loxodonta africana*, *Monodelphis domestica*, e *Xenopus tropicalis*). Para as classificações, foi considerado altamente conservado quando o mesmo nucleotídeo estivesse presente em uma determinada posição nas 10 espécies; significativamente conservado – presente em 8 ou 9 espécies; moderadamente conservado – presente em 6 espécies. Figura adaptada de Thiel et al., 2007²⁴.

As alterações que ocorreram na região transcrita foram analisadas quanto à posição dentro da estrutura tridimensional do RNA *RMRP* e da interação com as proteínas do complexo RNase MRP. Dez tipos de mutações ocorreram em regiões de pareamento do RNA, que são locais importantes para a formação da conformação tridimensional do RNA *RMRP*. Quatro mutações da região transcrita ocorreram em domínios de ligação com proteínas do complexo RNase MRP. As mutações g.98G>A e g.97_98dup(TG) se localizam no domínio P8, importante para a ligação com a proteína Rpp20, enquanto que

as mutações g.181G>A g.147G>C se localizam no domínio P12, onde se liga a proteína Rpp38.

7.4 Padronização da Análise de Expressão Gênica por PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

Para quantificação da expressão do gene *RMRP*, foi necessário desenhar um par de oligonucleotídeos em regiões que não contivessem alguma das mutações encontradas na região transcrita do gene *RMRP* nas amostras dos pacientes. Como estratégia para avaliação da clivagem do rRNA de 5.8S, optou-se primeiramente por quantificar apenas a abundância do 5.8S não clivado. Para isso, utilizou-se um conjunto de iniciadores descrito no artigo de Glazovet *al.*, 2011⁴⁸, sendo o iniciador senso localizado em uma região próxima ao sítio de clivagem pelo RNase MRP e o iniciador reverso localizado em uma região posterior à este sítio (figura 26A). Para avaliação da clivagem da ciclina B2, foi utilizada uma estratégia semelhante. Foi desenhado um par de oligonucleotídeos, de modo que a região 5'UTR da ciclina, que é a região clivada, estivesse contida dentro do produto de amplificação (figura 26B).

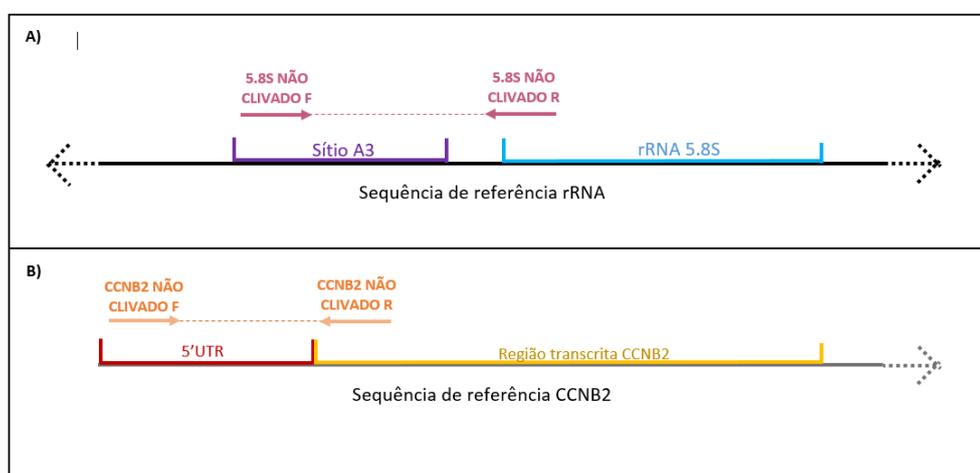


Figura 26: Mapa dos oligonucleotídeos sintéticos desenhados para a quantificação do produto gênico por RT-qPCR representados pelas setas coloridas esquema do **A)** dos genes que codificam para orna humano e para a **B)** CCNB2 humano.

A padronização da técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real para análise da expressão gênica e da atividade catalítica do complexo RNase MRP sobre seus alvos foi feita através de curvas de eficiência. A curva foi feita para investigar a quantidade ótima de oligonucleotídeos de modo a atingir uma eficiência de amplificação em torno de 100% para cada par de oligonucleotídeos. Foram utilizados 5 pontos de diluições seriadas de 1:10 a partir de um cDNA de amostra controle. Todos os pontos foram feitos em triplicatas.

A eficiência obtida para o par de oligonucleotídeos sintetizado para analisar o gene *RMRP* e o rRNA 5.8S não clivado foi de 100% para ambos, (figuras 27).

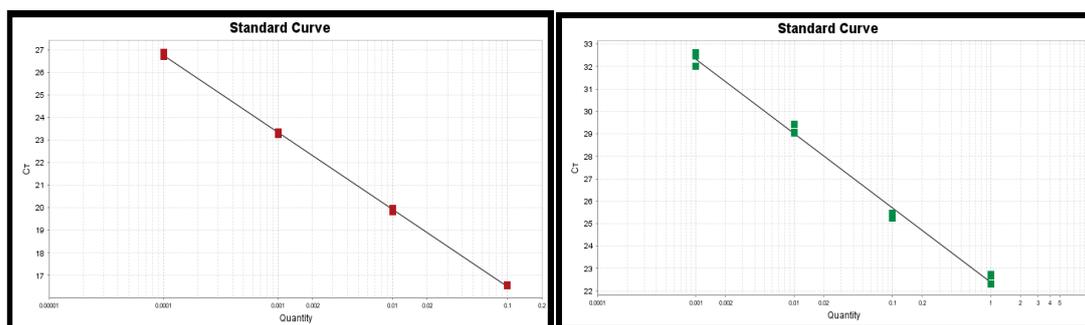


Figura 27: **A)** Curva de eficiência para o oligonucleotídeos *RMRP* (eficiência 100%, inclinação:-3,33 e R2: 0,994), **B)** Curva de eficiência para o oligonucleotídeo 5.8S não clivado (eficiência 100%, inclinação:-3,33 e R2: 0,999)

Foram obtidos valores de eficiência variados (em torno de 50%) durante a padronização dos iniciadores utilizados para avaliação da clivagem da ciclina B2. Com o intuito de melhorar a eficiência de amplificação, foram desenhados outros 3 conjuntos de iniciadores, obtendo-se resultados semelhantes. Portanto, a expressão de ciclina B2 não foi incluída a avaliação da clivagem pela RNase MRP e futuramente será utilizada outra técnica para avaliar a progressão do ciclo celular nos pacientes.

Foram testados também 5 pares de iniciadores de genes normalizadores, cujas sequências foram cedidas pelo Laboratório de Oncovirologia do CEMO/INCA: HPRTI, GPI, GAPDH, GUSB e HMBS, cujas eficiências já haviam sido padronizadas no próprio laboratório (98%, 95%, 114%, 99%, 98%, respectivamente). Com o intuito de determinar os dois melhores genes endógenos desta seleção, foi realizado um experimento teste com amostras de cDNA extraídas de pacientes e os resultados foram analisados através do uso de dois algoritmos matemáticos, geNorm e Normfinder. A partir dos resultados ficou definido que seriam usados como controle endógeno o gene *GAPDH* e *GPI*.

7.5 Nível de expressão do gene *RMRP* e análise da atividade catalítica sobre seus alvos

Para avaliar se os níveis de expressão do gene *RMRP* estavam alterados nos pacientes em decorrência das mutações em comparação com um indivíduo controle, foi feito um estudo piloto utilizando o método de quantificação relativa por RT-qPCR. Os níveis de expressão de RNA foram normalizados utilizando o gene constitutivo *GAPDH* e *GPI* como referência.

Até o momento só foram obtidas amostras de cDNA de 5 pacientes (paciente 4, 5, 8, 13 e 15). Desses, três pacientes apresentam uma mutação na região promotora combinada com uma mutação na região transcrita (pacientes 4, 5 e 13) e dois pacientes tem apenas mutações na região transcrita (pacientes 8 e 15).

Nossos resultados mostram que houve uma tendência à redução na abundância relativa de RNA RMRP em todos os pacientes em comparação com o indivíduo controle (figura 28).

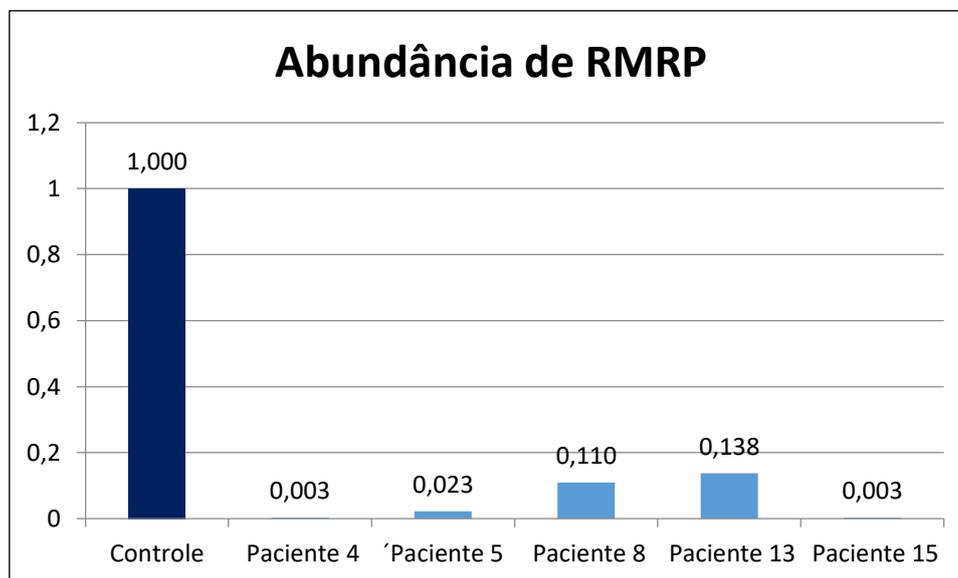


Figura 28: Abundância relativa de RNA RMRP determinados por PCR quantitativo em tempo real nos indivíduos afetados.

Sabendo-se que uma das funções celulares do complexo RNase MRP é o processamento do RNA ribossomal 5.8S e que por isso os níveis dessa molécula também poderiam estar alterados nos pacientes, optou-se também por fazer a quantificação da forma não madura do rRNA 5.8S (figura 29).

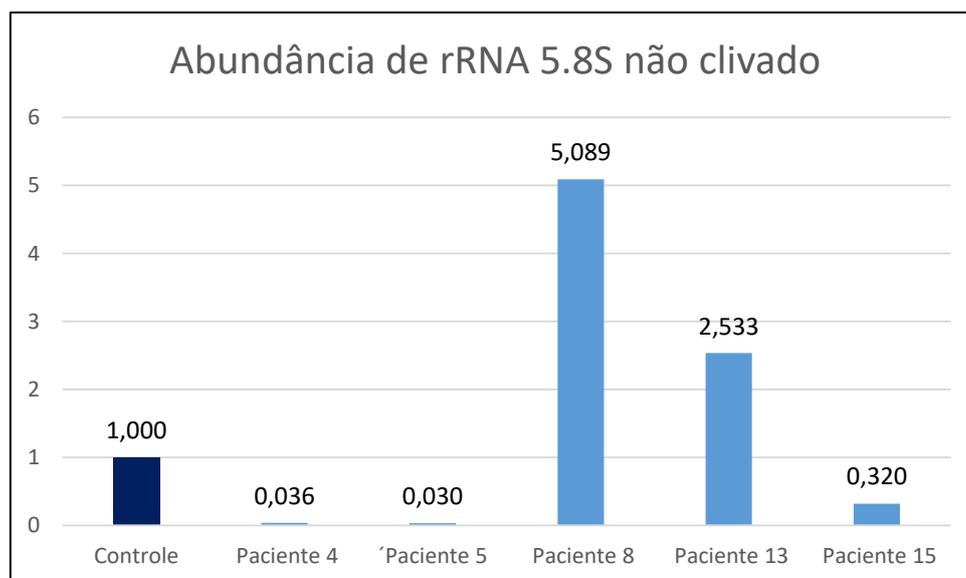


Figura 29: Abundância relativa de rRNA pré-5.8S determinados por PCR quantitativo em tempo real nos indivíduos afetados.

Os pacientes 8 e 13 apresentaram uma tendência ao aumento da abundância de rRNA de 5.8S não processado quando comparado com o indivíduo controle. Por outro lado, nos pacientes 4, 5 e 15 verificou-se uma aparente menor abundância de pré rRNA 5.8S em relação ao indivíduo não-afetado.

Por ser uma doença rara, não foi possível realizar agrupamentos de pacientes por características clínicas e por isso, impedindo a realização de análises estatísticas.

8. DISCUSSÃO

8.1 Mutações no gene *RMRP*

A Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo está relacionada com diferentes mutações recessivas no gene *RMRP*. Essas alterações podem ocorrer em homozigose ou heterozigose composta⁸. Neste estudo, foram analisados 20 pacientes, nos quais foram observadas 22 diferentes mutações, sendo 11 ainda não descritas na literatura. Segundo Bonafé *et al.*, 2005³², o gene *RMRP* apresenta uma alta densidade de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) e uma extensa série de variantes alélicas possivelmente patogênicas, o que retrata a diversidade de mutações encontradas nos pacientes analisados. Vale ressaltar que a mutação g.71A>G, descrita como a mais frequente em pacientes com CHH, presente em 92% dos pacientes Finlandeses e em 48% dos pacientes de outras populações europeias, não foi identificada nesse estudo²⁷.

A alteração pontual na região transcrita, g.196C>T, foi vista em 11 dos 20 pacientes (55%). Essa alteração já foi descrita para as populações da Suíça/Dinamarca, Israel, Espanha/França e Brasil²⁴, porém não com uma frequência tão elevada. Em alguns estudos, como o de Bonafé *et al.*, 2005³² foram observados 4 casos com essa mutação (provenientes do Canadá, Itália, Suíça e EUA) em um total de 36 pacientes analisados. Já no trabalho de Hermann *et al.*, 2005³¹ foi relatado apenas um caso em 27, sendo o paciente proveniente dos EUA. Ridanpää *et al.*, 2002²⁷ descreveu 3 casos (provenientes de Israel, Brasil e EUA), em um total de 44 casos não finlandeses. Assim, é possível dizer que nossos dados não estão de acordo com o observado na literatura. Além disso, não foi possível localizar esta mesma alteração no

GenBank e tampouco nos bancos de dados de alterações, como o dbSNP, 1000 genomas, ExAC e ClinVar. Entretanto, é preciso considerar que essa informação pode não estar disponível devido à pouca homogeneidade dos dados depositados e pela baixa frequência de atualização desses bancos.

Interessantemente, os dados cedidos pela empresa brasileira Mendelics de análise genômica, mostram uma frequência de 1/3.600 (0,0003) para a alteração g.196C>T, calculada através da análise de 1.800 indivíduos (3.600 alelos). Essa mesma frequência foi observada para a alteração g.181G>C. No nosso estudo, a mutação g.196C>T foi identificada em 11 pacientes, enquanto que a mutação g.181G>C foi identificada em apenas um paciente. Ambas as alterações podem ser consideradas raras, cuja definição inclui as variantes com frequência MAF (do inglês, Minor Allele Frequency) inferior a 1%⁴⁹. Neste caso, o fato da mutação g.196C>T ter sido encontrada no nosso estudo em mais de 50% dos nossos pacientes, enquanto que a outra foi vista em apenas 5% dos pacientes, pode significar um possível efeito fundador para a nossa população. Segundo Ridley 2006⁵⁰, uma consequência do efeito fundador é a mudança da frequência alélica da população filha em comparação com a população parental. Entretanto, não temos dados suficientes para fazer uma afirmação consistente. Estudos futuros podem ser importantes para a investigação de uma possível origem étnica para esta alteração.

As alterações g.-25_-4dup2(TACTACTCTGTGAAGCTGAGAA), g.97_98dup2(TG) também foram observadas em nosso estudo em 4/20 e 3/20 pacientes, respectivamente. Ambas as alterações foram descritas anteriormente, a primeira foi descrita por Hermmans *et. al.*, 2006⁸ (1 caso em 27 pacientes) e a segunda alteração, foi relatada por Ridanpää *et. al.*, 2002¹⁰ (3 em 44 pacientes) e por Bonafé *et al.*, 2005³² (2 em 36 pacientes). Já as

alterações, g.6G>T e g.36C>G, também foram observadas em 2 dos 20 pacientes do presente estudo. Vale ressaltar que essas mutações ainda não foram descritas na literatura, relacionadas à CHH. Apesar do número amostral ser reduzido, o presente estudo parece mostrar que essas mutações são possivelmente mais frequentes na nossa população, embora diversas dessas mutações estejam descritas no dbSNP em uma frequência muito baixa, MAF abaixo de 1%.

8.2 Características fenotípicas dos pacientes

As curvas de crescimento podem ser utilizadas tanto para analisar a criança num dado momento quanto para avaliar a evolução do seu desenvolvimento. Ela é dividida em várias curvas que representam os percentis. Os valores considerados normais se encontram entre 5% e 95%⁵¹. A maioria dos pacientes desse estudo apresentaram valores muito abaixo do percentil 5 para comprimento comparado à sua idade. No entanto, a paciente 20 encontrou-se dentro da área de normalidade (no percentil 3), o significa que ela é menor que a média, mas não é considerada fora dos valores de referência. Esse valor acima do esperado pode estar relacionado ao padrão de crescimento característico desta família. Apesar destes dados não terem sido coletados, é possível que o grupo familiar desta paciente tenha uma estatura mais elevada nas gerações precedentes, o que pode estar compensando em algum grau a baixa estatura determinada pela combinação de mutações no gene *RMRP* que ela apresenta.

Em nossa coorte alguns pacientes apresentaram o mesmo genótipo. Três pacientes (2, 6 e 18) apresentaram a duplicação no promotor g. -25_-04dup22(TACTACTCTGTGAAGCTGAGAA) combinada com a alteração

pontual g.196C>T. Pelos dados disponíveis, foi observado que baixa estatura persistente e evidências de displasia metafisária esteve presente nos pacientes 2 e 6, porém, apenas a paciente 2 apresentou hipotricose. Esse é um dado muito interessante, pois embora os genótipos sejam iguais há uma diversidade fenotípica sugerindo que outros fatores podem influenciar no fenótipo, como por exemplo, o *background* genético. Este representa a capacidade de todos os genes influenciarem ou modificarem os efeitos de mutações. Essas mutações expressam seus efeitos no nível fenotípico de uma forma modulada por todo o genoma⁵². O paciente 18 ainda fará a consulta ambulatorial de retorno, onde então serão feitas as avaliações clínica e preenchimento de ficha clínica e por isso não foi possível avaliar o quadro clínico da doença.

Também não pode ser descartada a possibilidade de existirem outros mecanismos por trás da doença. Rogler, 2014⁵³ descreve que o RNA RMRP serve como fonte para biogênese de dois pequenos RNAs que atuam como miRNA (RMRP-S1 e RMRP-S2) e que regulam positivamente e negativamente diversos alvos, dentre eles, genes de proliferação, crescimento e desenvolvimento ósseo, relacionados à hematopoese. Assim, na hipótese de alterações do nível de transcrito de RNA RMRP celulares, devido às diferentes mutações, toda essa regulação gênica exercida pelos miRNAs derivado de RMRP poderia ser afetada, alterando assim, o fenótipo dos pacientes⁵³.

Interessantemente, os pacientes 10 e 11, apesar de serem irmãos e apresentaram duas mutações iguais (g. 36C>G + g.252A>C), não apresentam fenótipo muito semelhante, pois a menina apresenta encurtamento de membros muito menos grave do que o irmão, apesar da diferença de quase três anos de idade entre eles. Além disso, a menina também apresentou cabelos mais esparsos que o irmão.

Os pacientes 8 e 16 apresentaram o genótipo g.6G>T + g.196G>T, mas não foi possível fazer a comparação devido à indisponibilidade de radiografias, dados e fotos clínicas, pois esses foram dois pacientes os quais perdemos o seguimento ambulatorial devido a dificuldades de contato.

8.3 Análises de mutações *in silico*

No diagnóstico molecular de CHH, a definição de critérios de patogenicidade para qualquer mutação é uma questão-chave. Devido ao fato do gene *RMRP* não ser traduzido em proteína, qualquer previsão das consequências de uma mudança de nucleotídeo é difícil. A correta segregação de mutações nas famílias e a ausência de mutações nos controles são dois critérios comumente utilizados. Outro critério sugerido é a análise da presença da mutação em regiões de pareamento do RNA³². Essas regiões de pareamento são importantes para formar a estrutura secundária do RNA e muitas delas se ligam a proteínas do complexo RNase MRP²⁸. Mudanças nessas sequências podem resultar em transcritos anômalos, que apresentam estruturas instáveis e até mesmo mais suscetíveis a degradação do RNA, comprometendo assim, a funcionalidade ou até de uma maneira mais drástica a formação do complexo RNase MRP³⁹.

A presença de mutações em regiões que foram conservadas entre várias espécies ao longo da evolução também é uma maneira de avaliar a patogenicidade de determinada alteração³². Esta conservação de sequência sugere uma conservação função do gene⁴⁰. De fato, Bonafé e cols, 2005³², quando alinharam a sequência de *RMRP* de diversas espécies mostraram que mutações patogênicas associadas a CHH localizavam-se em nucleotídeos fortemente conservados. Além disso, as posições correspondentes aos SNPs

localizam-se em regiões não conservadas, tanto no promotor como na região transcrita.

No presente estudo, foram observados 11 tipos de mutações na região regulatória do gene *RMRP*, que estavam localizadas entre as posições g.-26 e g.+2. Segundo Thielet *al*, 2007²⁴, a maioria dos nucleotídeos desta região não são conservados (figura 21). Nesta região, mais importante do que a conservação de sequência é a presença do elemento TATA, que é uma sequência de 7 nucleotídeos, rico em timinas (T) e adeninas (A), localizado a cerca de 25 nucleotídeos antes do sítio de iniciação da transcrição (g.+1)⁵⁴. A distância entre o elemento TATA e o local de iniciação da transcrição é crítica para regulação da expressão gênica, pois é nessa sequência que se inicia a ligação do complexo basal de transcrição em eucariotos⁵⁵. Estudos têm mostrado que duplicações/Inserções nesta região causam redução da taxa transcrição³⁹. Além disso, a ausência na literatura de pacientes homozigotos ou heterozigotos compostos para tais mutações pode indicar que alterações nessa região são fenotipicamente letais, sugerindo que a redução drástica das quantidades de RNA *RMRP*, embora de estrutura normal, é mais deletério do que quantidades normais desse RNA contendo alterações estruturais sutis, decorrentes de mutações pontuais³².

Além das alterações na região promotora do gene *RMRP*, também foram identificados 11 tipos diferentes de alterações na região transcrita. Todas essas mutações estão localizadas em região altamente ou significativamente conservada, segundo o modelo proposto por Thiel *et al.*, 2007²⁴. Outras análises computacionais dessas mutações, mostraram que 9 mutações ocorreram em regiões de pareamento de bases dentro do RNA *RMRP* e 7 ocorrem em domínios importantes para a ligação das proteínas do complexo

RNase MRP. Segundo, Welting *et al.*, 2010²⁸, dez proteínas integram esse complexo em humanos, dentre elas, 6 estão diretamente ligadas ao RNA de *RMRP*.

8.4 Análise de expressão e da atividade catalítica do gene *RMRP*

Os ensaios de PCR quantitativo em tempo real para quantificação da expressão do gene e sua atividade catalítica são uma alternativa na tentativa de compreender os efeitos das mutações nos pacientes e o mecanismo da doença.

Diversos autores relatam que as mutações associadas à CHH resultam em uma redução de transcritos celulares devido à transcrição afetada ou à instabilidade do RNA³⁹. O grupo de Hermmans (2005)³¹, estudando mutações em levedura, também demonstrou a redução da de RNA NME1 (o ortólogo *RMRP* em levedura).

No presente trabalho, um teste piloto foi realizado para avaliar o nível de transcritos de *RMRP* e 5.8S não clivado por RT-qPCR em cinco pacientes (4, 5, 8, 13 e 15) com CHH. Os pacientes 4, 5 e 15 apresentam uma combinação de uma mutação no promotor associada à uma mutação na região transcrita: g.-22_-14dup9(TACTCTGTG) + g.196C>T; g.-24_-15dup10(ACTACTCTGT) + g.196C>T; g.97_98dup(TG) + g.147G>C, respectivamente. Já os pacientes 8 e 13 apresentaram apenas mutações na região transcrita do gene: g.6G>T + g.196C>T e g.-8_-7ins20(GGGACTACTCTGTGAAGCTG) + g.196C>T, respectivamente. Todos os pacientes apresentaram uma tendência à redução da expressão de *RMRP* quando comparado ao indivíduo controle. Entretanto, por tratar-se de uma doença rara e que apresenta grande heterogeneidade

genotípica, não foi possível obter amostras de indivíduos apresentando o mesmo genótipo dificultando a realização de testes estatísticos⁵⁶.

Alguns autores levantam a hipótese de que as alterações na região promotora do gene apresentam um maior efeito no nível de transcritos da célula em relação a alterações na região transcrita^{6,32}. Porém, embora sejam preliminares, os nossos dados mostraram que, independente da natureza da mutação, foi observada uma tendência à redução da atividade de transcrição do gene *RMRP*. Similarmente, Hermmans *et al.*, 2005³¹ também observou uma redução nos níveis do RNA do gene *RMRP*, sugerindo que ambas as classes de alterações podem afetar transcrição ou a estabilidade do RNA nesses pacientes^{31,39}.

Além da diminuição da expressão de *RMRP* nos pacientes, alguns autores sugerem que a clivagem da ciclina B2 e do rRNA de 5.8S realizada pelo complexo RNase MRP, também pode ser afetada^{24,48}. Desse modo, os pacientes que apresentam mutações relacionadas à CHH, teriam uma maior abundância desses alvos em consequência da redução de transcritos *RMRP* na célula. No estudo piloto realizado neste projeto, foi observada uma tendência de aumento de abundância relativa de pré-rRNA 5.8S em 2 de 5 pacientes (8 e 13). Curiosamente, esses pacientes também apresentaram maior nível de expressão de *RMRP*, em relação aos outros três pacientes, ainda que estes valores sejam menores que o do controle. Interessantemente, o grupo de Hermman (2005)³¹ também realizou uma análise deste alvo em leveduras que continham diversas mutações já descritas para CHH, onde foi observado um nível de abundância variada de rRNA 5.8S na presença de diferentes mutações. Com base nesse resultado, esse grupo sugere que as mutações podem interferir na atividade catalítica do complexo RNase MRP de

maneira heterogênea, pois dependendo da mutação que atinge o transcrito RMRP, a estrutura do sítio ativo pode ser alterada, levando à uma clivagem menos eficiente do rRNA³¹. No entanto, a razão para a ausência de efeito dessas mutações permanece pouco clara³¹.

Não foi possível padronizar os ensaios de avaliação da clivagem da ciclina B2, devido à baixa eficiência de amplificação dos três pares de oligonucleotídeos desenhados para esse alvo.

Futuramente, novos ensaios devem ser conduzidos onde devem ser consideradas outras mutações, além do aumento do valor amostral tanto de pacientes quanto de indivíduos controle, para obtenção de resultados mais robustos, o que permitirá uma melhor compreensão deste fenômeno.

9. CONCLUSÕES

- Foi confirmado o diagnóstico clínico e radiológico de Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo através da análise de mutações no gene *RMRP* em 20 pacientes.

- Foram descritas as características clínicas de 20 pacientes.

- Foram encontrados pela análise molecular dos pacientes 22 mutações diferentes e 7 tipos de polimorfismos.

- Foram encontradas 11 mutações ainda não previamente descritos na literatura.

- Todos os genótipos ocorreram em heterozigose composta.

- A mutação g.196C>T foi encontrada em mais de 50% dos pacientes, frequência ainda não descrita em outros países, o que pode significar um possível efeito fundador nos pacientes brasileiros.

- Foi observada uma tendência à redução da expressão do gene *RMRP* nos pacientes com Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo.

- Foi observado uma tendência ao aumento de abundância de RNA ribossomal de 5.8S não processado em dois pacientes em relação ao indivíduo controle.

- Não foi possível realizar a avaliação dos níveis de transcritos de *CCNB2* não processado devido à baixa eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos.

- A confirmação da etiologia da doença permitiu a orientação clínica especificamente direcionada, podendo evitar complicações clínicas graves, como varicela em pacientes não imunizados e o desenvolvimento de câncer

infantil (particularmente linfoma), além de permitir o aconselhamento genético adequado das famílias.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Horovitz, D. D. G., Llerena Jr., J. C. & Mattos, R. A. de. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: panorama atual. *Cad. Saude Publica* **21**, 1055–1064 (2005).
2. Painel de Monitoramento da Mortalidade Infantil e Fetal. Available at: <http://svs.aids.gov.br/dashboard/mortalidade/infantil.show.mtw>. (Accessed: 14th March 2017)
3. Castilla, E. E. & Orioli, I. M. ECLAMC: The Latin-American Collaborative Study of Congenital Malformations. *Public Health Genomics* **7**, 76–94 (2004).
4. Warman, M. L. *et al.* Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am. J. Med. Genet. Part A* **155**, 943–968 (2011).
5. Mäkitie, O. Molecular defects causing skeletal dysplasias. *Endocr. Dev.* **21**, 78–84 (2011).
6. Ridanpää, M. *et al.* Mutations in the RNA component of RNase MRP cause a pleiotropic human disease, cartilage-hair hypoplasia. *Cell* **104**, 195–203 (2001).
7. Martin, A. N. & Li, Y. RNase MRP RNA and human genetic diseases. *Cell Res.* (2007).
8. Hermanns, P. *et al.* RMRP mutations in cartilage-hair hypoplasia. *Am. J. Med. Genet. Part A* **140A**, 2121–2130 (2006).
9. Rider, N. L. *et al.* Immunologic and clinical features of 25 Amish patients with RMRP 70 A→G cartilage hair hypoplasia. *Clin. Immunol.* **131**, 119–128 (2009).
10. Bonafé, L., Schmitt, K., Eich, G., Giedion, A. & Superti-Furga, A. RMRP gene sequence analysis confirms a cartilage-hair hypoplasia variant with only skeletal manifestations and reveals a high density of single-nucleotide polymorphisms. *Clin. Genet.* **61**, 146–51 (2002).
11. Thiel, C. T. *et al.* Severely Incapacitating Mutations in Patients with Extreme Short Stature Identify RNA-Processing Endoribonuclease RMRP as an Essential Cell Growth Regulator. *Am. J. Hum. Genet* **77**, 795–806 (2005).
12. Junqueira, L. C. & Carneiro, J. *Histologia Básica*. (Guanabara Koogan, 2004).
13. Moore, K. & Persaud, T. *Embriologia Clínica*. (Elsevier, 2008).
14. White, A. & Wallis, G. Endochondral ossification: A delicate balance

- between growth and mineralisation. *Curr. Biol.* **11**, R589–R591 (2001).
15. Gilbert, S. *The Development of Bones*. (Sinauer Associates, 2000).
 16. JH, B. & JH, K. *Fraturas em crianças*. (Manole, 2004).
 17. Krakow, D., Lachman, R. S. & Rimoin, D. L. Guidelines for the prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasias. *Genet. Med.* **11**, 127–133 (2009).
 18. Ozono, K. *et al.* Pediatric aspects of skeletal dysplasia. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* **10 Suppl 1**, 35–43 (2012).
 19. Skeletal Dysplasias | Children's Hospital of Philadelphia. Available at: <http://www.chop.edu/conditions-diseases/skeletal-dysplasias>. (Accessed: 14th March 2017)
 20. Savarirayan, R. & Rimoin, D. L. The skeletal dysplasias. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* **16**, 547–560 (2002).
 21. Bonafe, L. *et al.* Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. *Am. J. Med. Genet. Part A* **167**, 2869–2892 (2015).
 22. Mäkitie, O. & Kostjukovits, S. *Cartilage-Hair Hypoplasia – Anauxetic Dysplasia Spectrum Disorders*. *GeneReviews®* (University of Washington, Seattle, 1993).
 23. Mattijssen, S., Welting, T. J. M. & Pruijn, G. J. M. RNase MRP and disease. *Wiley Interdiscip. Rev. - RNA* **1**, n/a-n/a (2010).
 24. Thiel, C. T., Mortier, G., Kaitila, I., Reis, A. & Rauch, A. Type and Level of RMRP Functional Impairment Predicts Phenotype in the Cartilage Hair Hypoplasia–Anauxetic Dysplasia Spectrum. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 519–529 (2007).
 25. Kwan, A., Manning, M. A., Zollars, L. K. & Hoyme, H. E. Marked variability in the radiographic features of cartilage-hair hypoplasia: Case report and review of the literature. *Am. J. Med. Genet. Part A* **158A**, 2911–2916 (2012).
 26. Verloes, A., Pierard, G. E., Le Merrer, M. & Maroteaux, P. Recessive metaphyseal dysplasia without hypotrichosis. A syndrome clinically distinct from McKusick cartilage-hair hypoplasia. *J Med Genet* **27**, 693–696 (1990).
 27. Ridanpää, M. *et al.* Worldwide mutation spectrum in cartilage-hair hypoplasia: ancient founder origin of the major 70A>G mutation of the untranslated RMRP. *Eur. J. Hum. Genet.* **10**, 439–447 (2002).
 28. Welting, T. J. M., van Venrooij, W. J. & Pruijn, G. J. M. Mutual interactions between subunits of the human RNase MRP ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Res.* **32**, 2138–2146 (2004).

29. Engreitz, J. M., Ollikainen, N. & Guttman, M. Long non-coding RNAs: spatial amplifiers that control nuclear structure and gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 756–770 (2016).
30. Cai, T., Aulds, J., Gill, T., Cerio, M. & Schmitt, M. E. The *Saccharomyces cerevisiae* RNase mitochondrial RNA processing is critical for cell cycle progression at the end of mitosis. *Genetics* **161**, 1029–42 (2002).
31. Hermanns, P. *et al.* Consequences of mutations in the non-coding RMRP RNA in cartilage-hair hypoplasia. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3723–3740 (2005).
32. Bonafé, L. *et al.* Evolutionary comparison provides evidence for pathogenicity of RMRP mutations. *PLoS Genet.* **1**, 0444–0454 (2005).
33. Burley, S. K. The TATA box binding protein. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 69–75 (1996).
34. Murphy, S. *et al.* The in vitro transcription of the 7SK RNA gene by RNA polymerase III is dependent only on the presence of an upstream promoter. *Cell* **51**, 81–7 (1987).
35. Kavadas, F. D. *et al.* Variability of clinical and laboratory features among patients with ribonuclease mitochondrial RNA processing endoribonuclease gene mutations. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 1178–1184 (2008).
36. Vatanavicharn, N. *et al.* An infant with cartilage-hair hypoplasia due to a novel homozygous mutation in the promoter region of the RMRP gene associated with chondrodysplasia and severe immunodeficiency. *J. Appl. Genet.* **51**, 523–528 (2010).
37. Rosenbluh, J. *et al.* RMRP is a non-coding RNA essential for early murine development. *PLoS One* **6**, e26270 (2011).
38. Nakashima, E. *et al.* RMRP mutations in Japanese patients with cartilage-hair hypoplasia. *Am. J. Med. Genet.* **123A**, 253–256 (2003).
39. Nakashima, E. *et al.* Cartilage hair hypoplasia mutations that lead to RMRP promoter inefficiency or RNA transcript instability. *Am. J. Med. Genet. Part A* **143A**, 2675–2681 (2007).
40. Koonin, E. V & Galperin, M. Y. Evolutionary Concept in Genetics and Genomics. (2003).
41. Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
42. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463–7 (1977).

43. Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989).
44. geNorm normalization of real-time PCR expression data. Available at: <https://genorm.cmgg.be/>. (Accessed: 15th March 2017)
45. NormFinder software. Available at: <http://moma.dk/normfinder-software>. (Accessed: 14th March 2017)
46. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *METHODS* **25**, 402–408 (2001).
47. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
48. Glazov, E. A. *et al.* Whole-Exome Re-Sequencing in a Family Quartet Identifies POP1 Mutations As the Cause of a Novel Skeletal Dysplasia. (2011). doi:10.1371/journal.pgen.1002027
49. Reedik Mägi *et al.*, Genome-Wide Association Analysis of Imputed Rare Variants: Application to Seven Common Complex Diseases. *Genet Epidemiol.* 2012 Dec; 36(8): 785–796 (2012).
50. Ridley, M. *Eventos Aleatórios na Genética de Populações*. In: *Evolução*. 4^a edição. Artmed, Porto Alegre, (2006).
51. Brasil - Ministério da Saúde. *Saúde da Criança - Acompanhamento do crescimento e desenvolvimento infantil*. *Annals of Physics* **54**, (Ministério da Saúde, 2002).
52. Rouhani, F. *et al.* Genetic Background Drives Transcriptional Variation in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS Genet* **10**, (2014).
53. Rogler, L. E. *et al.* Small RNAs derived from lncRNA RNase MRP have gene-silencing activity relevant to human cartilage-hair hypoplasia. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 368–382 (2014).
54. Carroll, S. B., Griffiths, Anthony J. F. Wessler, S. R. & DOEBLEY, J. *Introdução à genética*. (Guanabara Koogan, 2008).
55. Alberts, B. *et al.* *Biologia Molecular da Célula*. (Artmed, 2010).
56. Gerß, J. W. O. & Köpcke, W. in *Advances in experimental medicine and biology* **686**, 173–190 (2010).

11. APÊNDICE:

Apêndice 1: Ficha de Coleta de Dados

“Caracterização de mutações, análise de expressão do gene *RMRP* e avaliação do perfil imunológico de pacientes com Hipoplasia de Cartilagem-Cabelo”

Ficha de Coleta de Dados Nº ____

Bloco I - Identificação:

Prontuário: _____

Idade: _____

Data de Nascimento:

Idade de Mãe:

Idade de Pai:

Ancestralidade: Europeu Latino ()

Europeu não Latino ()

Sírio Turco Libanês ()

Ameríndio()

Negro ()

Asiático (incluindo Índia)

Consanguinidade: 1- sim; 2- não

Especifique: _____

Antecedente de Síndrome genética na família? 1- sim; 2- não.

Especifique: _____

_____ - não se aplica

Bloco II - Pré-natal:

Paridade: _____

Anomalias congênitas em filhos anteriores 1- sim; 2- não.

Quais? _____

_____ - não se aplica

Síndromes específicas com ou sem estudo genético em filhos anteriores (cariótipo,

outros): _____

_____ - não

se aplica

IG do Primeiro US: _____ semanas e ____ dias

Rastreio do Primeiro Trimestre: 1-baixo risco; 2-alto risco; 3-não fez

US morfológica fetal: 1-Normal; 2-Amormal; 3-não fez

Se morfológico anormal, detalhar os achados:

_____ - não se aplica

Realizou cariótipo fetal: 1-sim; 2-não

Se realizou cariótipo fetal, qual o resultado? _____

Natimorto anterior: 1- sim; 2-não

Neomorto anterior: 1- sim; 2-não

Outras comorbidades _____

Bloco III - Dados do parto:

IG do parto: _____

Via de parto: 1- vaginal ; 2- cesárea eletiva; 3- cesárea de urgência

Natimorto: 1- sim; 2-não

Se natimorto, morte ocorreu durante o trabalho de parto: 1- sim; 2-não; 3 - não se aplica

Se realizou necropsia de natimorto ou neomorto, detalhar os achados: _____

- não se aplica

Bloco IV - Dados Neonatais:

IG calculada ao nascimento: _____ - não se aplica

Peso em gramas: _____ - não se aplica

Comprimento em centímetros: _____ - não se aplica

PC em centímetros: _____ - não se aplica

RN encaminhado à UTI neo: 1- sim; 2-não; - não se aplica

Dias de internação na UTI neo: _____ - não se aplica

Dias de internação no IFF: _____ - não se aplica

Peso da alta: _____ - não se aplica

Condições do RN na alta: 1- vivo; 2-óbito neonatal; - não se aplica

Idade do neonato por ocasião do óbito em dias: _____ - não se aplica

Bloco V: Dados Pós-Natais:

Idade: _____

Peso em gramas: _____

Altura em centímetros: _____

PC: _____

Proporcional: 1- sim; 2-não

Membros curtos: 1- sim; 2-não

Tronco curto: 1- sim; 2-não

Hipoplasia pulmonar: 1- sim; 2-não

Luxações: 1- sim; 2-não

Fraturas: 1- sim; 2-não

Outros achados: 1- sim; 2-não

Especifique: _____

Exame Físico: _____

Bloco VI - Dados de Avaliação ImunológicaInfecção bacteriana **antes** dos 2 anos de idade: 1- sim; 2-não

Qual:_____

Recorrência (em menos de 1 ano): 1- sim; 2-não

Nº de recorrências_____

Tratamento:_____

Infecção viral **antes** dos 2 anos de idade: 1- sim; 2-não

Qual:_____

Recorrência (em menos de 1 ano): 1- sim; 2-não

Nº de recorrências_____

Tratamento:_____

Vacinação em dia: 1- sim; 2-não

Infecção bacteriana **após** 2 anos de idade: 1- sim; 2-não

Qual:_____

Recorrência (em menos de 1 ano): 1- sim; 2-não

Nº de recorrências_____

Infecção viral **após** 2 anos de idade: 1- sim; 2-não

Qual:_____

Recorrência (em menos de 1 ano): 1- sim; 2-não

Nº de recorrências_____

Transplante de medula óssea: sim; 2-não

Imunoterapia: 1- sim; 2-não

Outras observações:_____

Apêndice 2: História clínica dos pacientes

Paciente 1: paciente do sexo masculino, com descendência de brasileiros de ambos os progenitores e diagnóstico molecular realizado aos 3 anos e 6 meses de idade. Apresenta como sintomas baixa estatura, cabelos finos e esparsos e acometimento de várias otites medias no período de um ano. Não foi documentado frouxidão ligamentar. Ao nascimento apresentou 3.720 g e 42 cm de comprimento.

Paciente 2: paciente do sexo feminino, com descendência de brasileiros de ambos os progenitores e diagnóstico molecular realizado aos 6 anos e 4 meses de idade, na qual apresentava 12.300g e 85,5 de altura. Apresenta como sintomas baixa estatura, hipotricose acentuada e acometimento várias infecções recorrentes no período de um ano. Não foi documentado frouxidão ligamentar. Ao nascimento apresentou 3.000 g e 45 cm de comprimento.

Paciente 3: paciente do sexo masculino, com descendência de europeu latino e europeu não-latino e diagnóstico molecular realizado aos 8 anos e 10 meses de idade, na qual apresentava 18.000 g e 91 cm de altura. Apresenta como sintoma baixa estatura acentuada. Não foi documentado hipotricose, frouxidão ligamentar e infecções recorrentes. Paciente nasceu prematuro (7 meses e meio meses) apresentando 1.240 g e 33 cm de comprimento.

Paciente 4: paciente do sexo masculino, com descendência de brasileiros de ambos os progenitores e diagnóstico molecular realizado aos 3 anos e 5 meses de idade, época na qual apresentava 13.300 g e 81 cm de altura. Apresenta

como sintoma baixa estatura, cabelos esparsos, frouxidão ligamentar e bronquite recorrente. Ao nascimento apresentou 3.160 g e 49 cm de comprimento.

Paciente 5: paciente do sexo masculino, com descendência de europeu não latino e diagnóstico molecular realizado aos 2 anos de idade, época em que apresentou 12.340 g e 77 cm de comprimento. Apresenta como sintomas baixa estatura.

Paciente 6: paciente do sexo masculino, com descendência de europeu não latino (Polonês) e europeu latino (Português) e diagnóstico molecular realizado aos 2 anos e 8 meses de idade, época na qual apresentava 9.200 g e 70 cm de altura. Apresenta como sintomas baixa estatura e várias infecções recorrentes. Ao nascimento apresentou 2.710 g e 40,5 cm de comprimento.

Paciente 7: paciente do sexo feminino, com descendência de europeu latino, ameríndio e afro descendência e diagnóstico molecular realizado aos 9 anos de idade, na qual apresentava 27.000 g e 103 de altura. Apresenta como sintoma baixa estatura. Não foi documentado infecção recorrente. Ao nascimento apresentou 2.520 g e 40 cm de comprimento.

Paciente 8: paciente do sexo feminino, com descendência de europeu latino e diagnóstico molecular realizado aos 8 anos de idade, na qual apresentava 19.200 g e 96 cm de altura. Apresenta como sintoma baixa estatura. Não foi documentado infecção recorrente. Ao nascimento apresentou 2.940 g e 41 cm de comprimento.

Paciente 9: paciente do sexo feminino com perda de seguimento clínico.

Paciente 10: paciente do sexo masculino, com irmã afetada (paciente 11) e diagnóstico molecular realizado aos 9 anos e 5 meses de idade, época na qual apresentava 36.500 g e 120,5 cm de altura. Apresenta como sintoma baixa estatura. Não foi documentado hipotricose e infecções recorrentes. Paciente com perda de seguimento clínico.

Paciente 11: paciente do sexo feminino, com irmão afetado (paciente 10) e diagnóstico molecular realizado aos 12 anos e 7 meses de idade, época na qual apresentava 32.100 g e 133,5 cm de altura. Apresenta como sintoma baixa estatura e cabelos esparsos. Não foi documentado infecções recorrentes. Paciente com perda de seguimento clínico.

Paciente 12: paciente do sexo masculino, com descendência de europeu latinoe ameríndio e diagnóstico molecular realizado aos 9 anos de idade, época na qual apresentava 32.000 g e 105 cm de altura. Apresenta como sintoma baixa estatura. Não foi documentado hipotricose, frouxidão ligamentar e infecções recorrentes. Ao nascimento apresentou 2.340 g e 42 cm de comprimento.

Paciente 13: paciente do sexo masculino, com descendência de europeu latino e diagnóstico molecular realizado aos 9 anos de idade, época na qual apresentava 28.900 g e 108 cm de altura. Apresenta como sintoma baixa

estatura, incidência de resfriado comum e um episódio de pneumonia. Ao nascimento apresentou 2.930 g e 44 cm de comprimento.

Paciente 14: paciente do sexo feminino ainda sem documentação de dados clínicos.

Paciente 15: paciente do sexo masculino, com descendência de europeu latino e diagnóstico molecular realizado aos 9 anos e 3 meses de idade, época na qual apresentava 12.650 g e 83 cm de altura. Apresentou como sintomas baixa estatura e hipotricose, frouxidão ligamentar e pneumonia recorrente no período de um ano. Aos 12 anos desenvolveu linfoma não-hojdkin, foi submetido a transplante e veio a óbito poucos meses depois. Ao nascimento apresentou 2,920 g e 49 cm de comprimento.

Paciente 16: paciente do sexo masculino, com descendência de europeu latino e ameríndio (brasileiro) e diagnóstico molecular realizado aos 14 anos de idade, época na qual apresentava 47.000 g e 91 cm de altura. Apresenta como sintomas baixa estatura e hipotricose. Não foi documentado frouxidão ligamentar e nem infecções recorrentes. Ao nascimento apresentou 2.865 g e 42 cm de comprimento.

Paciente 17: paciente do sexo masculino, afrodescendente, com diagnóstico molecular realizado quando o paciente apresentava 1 ano e 3 meses, época na qual apresentava 8.500 g e 62 cm de altura. Apresenta como sintomas baixa estatura e cabelos esparsos. Não foi documentado frouxidão ligamentar e

nem infecções recorrentes. Ao nascimento apresentou 3.035 g e 43 cm de comprimento.

Paciente 18: paciente do sexo masculino, com irmã afetada (material genético não analisado) e ainda sem documentação de dados clínicos.

Paciente 19: paciente do sexo masculino, filho de casal consanguíneo (primos em primeiro grau) com descendência de europeu não latino (alemão) e diagnóstico molecular realizado aos 2 anos e 3 meses de idade, época na qual apresentava 10.550 g e 81,5 cm de altura. Apresenta como sintomas baixa estatura e cabelos finos e esparsos e frouxidão ligamentar. Não foi documentada infecções recorrentes. Ao nascimento apresentou 3.475 g e 49 cm de comprimento.

Paciente 20: paciente do sexo feminino, com descendência de europeu não latino e com diagnóstico molecular realizado aos 9 anos e 8 meses de idade, época na qual apresentava 33.100 g e 127 cm de altura. Apresenta como sintomas baixa estatura e cabelos finos e esparsos e frouxidão ligamentar. Não foi documentada infecções recorrentes. Ao nascimento apresentou 3.085 g e 47 cm de comprimento.